

II. Medizinische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

Einfluss der Endocannabinoide auf die neuronale Transmitterfreisetzung im Dünndarm der Ratte

Andreas Michael Hamel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. Kurjak
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 18.11.2005 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 29.03.2006 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet
In liebevoller Erinnerung an meine Mutter † 16.06.2004

Wer will die welten zählen. die vorübergegangen sind oder die schöpfungen, die sich wieder und wieder aus dem formlosen abgrund der weiten wasser erhoben haben. wer will die stets wieder vergehenden zeitalter der welten zählen, wie sie endlos aufeinander folgen. und wer will die weiten unendlichkeiten des raums erforschen, um all die allwelten säuberlich zu zählen {Rohner-Radegast W 1999}.

Abkürzungsverzeichnis.....	5
1 Einleitung und Zielsetzung	6
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Präparation.....	8
2.1.1 Versuchstiere.....	8
2.1.2 Entnahme des Dünndarms	8
2.1.3 Präparation der longitudinalen Muskelschicht	9
2.1.4 Zerkleinerung und Homogenisierung.....	10
2.1.5 Zentrifugation	11
2.2 Versuchsdurchführung	11
2.2.1 VIP-, Somatostatin- und Ghrelin-Immunreaktivität.....	11
2.2.2 NOS-Assay	13
2.3 CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptor-Nachweis mittels RT-PCR.....	14
2.4 Verwendete Stoffe und Substanzen	15
2.5 Statistik.....	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Effekte der Endocannabinoide auf die NO-Synthase-Aktivität	16
3.1.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2	16
3.1.2 Rezeptorvermittelte Effekte der Cannabinoide	18
3.1.3 Effekte von endogenem Anandamid.....	21
3.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Freisetzung von VIP	23
3.2.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2	23
3.2.2 CB ₁ -Rezeptor-Effekt	24
3.2.3 CB ₂ -Rezeptor-Effekt	25
3.2.4 Vanilloid-Rezeptor 1-Effekt.....	26
3.2.5 Effekte von endogenem Anandamid.....	27
3.3 Effekte der Endocannabinoide auf die Ghrelin-Freisetzung	28
3.3.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2	28
3.3.2 CB ₁ -Rezeptor-Effekt	29
3.3.3 CB ₂ -Rezeptor-Effekt	30
3.3.4 Vanilloid-Rezeptor 1-Effekt.....	31
3.4 Effekte der Endocannabinoide auf die Freisetzung von Somatostatin.....	32
3.4.1 Rezeptorvermittelte Effekte	32
3.4.2 Effekt von endogenem Anandamid.....	33
3.5 RNA-Nachweis von CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptoren im ENS	34
4 Allgemeine Diskussion	36
4.1 Endogene und synthetische Cannabinoide, ihre Rezeptoren und Effekte im Gastrointestinaltrakt.....	36
4.1.1 Cannabinoide.....	36
4.1.2 Endocannabinoide und Endocannabinoid-System	39
4.1.3 Einflüsse der Endocannabinoide auf den Gastrointestinaltrakt	53
5 Spezielle Diskussion	68
5.1 Effekte der Endocannabinoide auf inhibitorische Transmitter im ENS	68
5.1.1 Effekte der Endocannabinoide auf die NO-Synthase-Aktivität.....	68
5.1.2 Effekte der Endocannabinoide auf die VIP-Sekretion	70
5.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Sekretion der motilitätswirksamen Transmitter Ghrelin und Somatostatin	71
5.2.1 Effekte der Endocannabinoide auf die Ghrelin-Sekretion	71
5.2.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Somatostatin-Sekretion	72
5.3 Charakterisierung der Endocannabinoid-Effekte auf zellulärer Ebene.....	73

5.3.1 Mechanismus der NO-Synthase-Aktivitätssteigerung durch Endocannabinoide	73
5.3.2 Mechanismus der evozierten VIP-Stimulation durch Endocannabinoide	74
5.4 Effekte von endogenem Anandamid auf die beschriebenen Transmittersysteme	76
5.4.1 Effekte von endogenem Anandamid auf die NO-Synthase-Aktivität ..	76
5.4.2 Effekte von endogenem Anandamid auf die VIP-Freisetzung	77
5.5 Nachweis von CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptoren im ENS	77
6 Zusammenfassung	79
8 Danksagung	81
9 Abbildungsverzeichnis	83
9.1 Abbildungen	83
9.2 Tabellen	84
9.3 Graphiken	84
10 Literaturverzeichnis	87
11 Lebenslauf	105

Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
ACh	Acetylcholin
AT	Anandamid-Transporter
CB	Cannabinoide
CB ₁ -R	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB ₂ -R	Cannabinoid-Rezeptor 2
GABA	Gamma-Amino-Butyric-Acid
ENS	enterisches Nervensystem
FAAH	Fatty Acid Amide Hydrolase
GIT	Gastrointestinaltrakt
MOPS	3-(N-Morpholino-) Propan-Sulfonsäure
NANC	nicht adrenerg und nicht cholinerg
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
RIA	Radioimmunoassay
SOM	Somatostatin
THC	Tetra-Hydrocannabinol
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VR1	Vanilloid-Rezeptor 1
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Zielsetzung

Cannabis ist seit mehr als 5000 Jahren für seine therapeutischen und psychoaktiven Wirkungen bekannt. Noch heute findet es Verwendung bei der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen, wie der Migräne, Muskelverspannungen und -spasmen, bei der Glaukombehandlung, bei Schmerzen, Übelkeit und Appetitlosigkeit.

Aus der Cannabispflanze, *Cannabis sativa*, lassen sich Substanzen und Verbindungen isolieren, die als Cannabinoide bezeichnet werden {Marsicano G 2002}. Das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) ist aus der Gruppe der Cannabinoide wohl der bekannteste Inhaltsstoff und die Komponente mit der größten psychoaktiven Potenz.

Ende der 1980er Jahre entdeckte man, dass die Cannabinoidwirkung über Rezeptoren vermittelt wird.

Anfang der 1990er Jahre erfolgte die Klonierung und Sequenzierung des ersten Cannabinoid-Rezeptors, des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB₁-R). Im Anschluss fand man auch einen zweiten Rezeptor, den Cannabinoid-Rezeptor 2 (CB₂-R) {Felder CC 1998}.

Bei den Cannabinoid-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gebundene, transmembranale Rezeptoren. CB₁-Rezeptoren finden sich vor allem in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems, CB₂-Rezeptoren zum Grossteil in immunkompetenten Zellen {Lutz B 2002}{Vigna Steven R 2003}.

Mehrere endogene, vom Organismus selbst produzierte Substanzen zeigen eine agonistische Wirkung an den Cannabinoid-Rezeptoren. Diese mehrfach ungesättigte Fettsäuren wurden endogene Cannabinoide auch Endocannabinoide genannt.

Als erster Substanz dieser endogenen Cannabinoide konnte das Anandamid isoliert werden. Es wirkt als Agonist an beiden Cannabinoid-Rezeptoren, wie auch am Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1), welcher an der Vermittlung von Schmerz beteiligt ist. Neuere Arbeiten beschreiben den Einfluss der Endocannabinoide auf die Motilität im Gastrointestinaltrakt. Anandamid und 2-Arachidonylglycerol (2-AG), ein weiterer Cannabinoid-Rezeptor-Agonist, führten zu einer Relaxation glatter Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt {Pertwee RG 1995}{Pinto L 2002}.

Über welche Mechanismen dieser Effekt vermittelt wird ist bis heute noch nicht befriedigend geklärt.

Der Einfluss der Endocannabinoide auf die Motilität im Gastrointestinaltrakt ist die zentrale Fragestellung dieser Arbeit.

Wir untersuchten die zellulären Mechanismen der Endocannabinoidwirkung auf die inhibitorischen Neurotransmitter, NO (Stickstoffmonoxid) und VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid), und die motilitätswirksamen Peptidhormone und Neurotransmitter, Ghrelin und Somatostatin.

Darüber hinaus war es wesentlicher Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit, die Effekte der endogen gebildeten Cannabinoide im Vergleich zu exogen zugeführten Endocannabinoid-Substanzen zu untersuchen.

Mit Hilfe des Modells der Synaptosomen war es uns möglich die intra- und subzellulären Mechanismen der Transmitterfreisetzung im enterischen Nervensystem systematisch zu erforschen {Kurjak M 1994}.

Die Zielsetzungen dieser Arbeit waren im Einzelnen:

- 1) Charakterisierung der Effekte exogen zugeführter Endocannabinoide auf die inhibitorischen Transmitter NO und VIP.
- 2) Einfluss exogen zugeführter Endocannabinoide auf die Sekretion der motilitätswirksamen Peptidhormone und Neurotransmitter Ghrelin und Somatostatin.
- 3) Charakterisierung der Signalvermittlung der Effekte der Endocannabinoide auf zellulärer Ebene.
- 4) Charakterisierung der Einflüsse von endogenen Cannabinoiden.
- 5) Nachweis der Existenz von CB₁- und CB₂-Rezeptoren in der longitudinalen Muskelschicht des Dünndarms mit anhängendem Plexus myentericus mittels RT-PCR.

2 Material und Methoden

2.1 Präparation

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche CD-Ratten (der Firma Charles River in Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 150 bis 250 g verwendet.

Die Tierhaltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen im Tierstall der experimentellen Chirurgie des Klinikums rechts der Isar in München. Am Tag der Präparation wurden die Ratten durch Einleitung von Kohlendioxid in den Käfig betäubt. Nach Narkoseeintritt wurden die Tiere dekaptiert. Für alle Tierversuche lag eine Genehmigung der zuständigen Ethikkommission vor.

2.1.2 Entnahme des Dünndarms

Für die Präparation wurden je Versuchsdurchführung 5 weibliche Ratten verwendet. Zuerst erfolgte die Eröffnung der Bauchwand entlang der Linea alba senkrecht von kaudal nach kranial mit einer chirurgischen Schere. Nach Orientierung im Bauchsitus erfolgte die Freipräparation des Dünndarms vom Pylorus des Magens bis zum Caecum. Der freigelegte Darmabschnitt wurde kaudal des Pylorus und kranial des Caecums mit einer Präparationsschere abgetrennt. Das entnommene Präparat wurde nun in etwa 5 bis 10 cm lange Abschnitte zerteilt und bis zum darauffolgenden Präparationsschritt in eisgekühltem MOPS-Präparationsspuffer [25mM MOPS, 10mM MgCl₂, 8% (wt/vol) Saccharose, bei pH 7.40] aufbewahrt.



Abbildung 1: Eröffneter Bauchsitus einer weiblichen Ratte mit Einblick in die Darmeingeweide. Nach Auffinden des Magenausgangs, wurde dieser mit einer Schere abgetrennt. Der Darminhalt des Dünndarms wurde bis zum Colon ascendens ausgestrichen. Auf Höhe der Ileocoecalklappe erfolgte die Abtrennung vom Dickdarm.

2.1.3 Präparation der longitudinalen Muskelschicht

Die Darmwand der zerteilten Abschnitte wurde mit Hilfe einer chirurgischen Schere entlang der Mesenterialansatzlinie eröffnet, die Serosa und Längsmuskelschichten durchtrennt. Die eröffneten Darmabschnitte wurden nun auf eine Präparationsunterlage unter geringem Zug gepinnt. Daraufhin folgte die vorsichtige Abpräparation der Mucosa, Submucosa und Faeces mit einem Skalpel.



Abbildung 2: Darstellung der 5 bis 10 cm langen Dünndarmabschnitte, rechts die beiden noch nicht eröffneten Strukturen. Bei der linken Struktur handelt es sich um die eröffnete Darmwand vor Entfernung der Mucosa und Submucosa.

Anschließend erfolgte die Säuberung der Muskelpräparate in MOPS-Pufferlösung. Mit einer Waage wurde das jeweilige Feuchtgewicht bestimmt. Bei allen Versuchen lag es zwischen 13.0 g und 24.0 g. In einem Verhältnis von 1 zu 8 wurde nun ein Inhibitorenpufer [200 ml MOPS, 10 mM Pepstatin, 100 μ M Thiorphan, 50 μ M PMSF, 1 mM Dithiothreitol, 0,5 μ M Trypsininhibitor, und 1 mM Captopril] zugegeben.

2.1.4 Zerkleinerung und Homogenisierung

Mit einer Präparationsschere wurden die Muskelpräparate sorgfältig zerkleinert und anschließend mit einem Polytron PT20 Homogenisator bei 8000 [g] bei einer Temperatur von 4 °C für 15 sec. (3 x für 5 sec.) homogenisiert.

2.1.5 Zentrifugation

Das erhaltene Homogenisat wurde in drei Schritten (1 x 10 min. bei 800 [g], 1 x 10 min. bei 2000 [g], und 1 x 10 min. bei 12.000 [g]) zentrifugiert. Das nach der Zentrifugation erhaltene P2-Fraktions-Pellet (P2 = grober synaptosomaler Überstand) wurde rehomogenisiert und in einem Mischungsverhältnis von 1 zu 10 mit MOPS-Pufferlösung verdünnt und in einem Meßzylinder auf ein Gesamtvolumen von 35 ml aufgefüllt.

2.2 Versuchsdurchführung

Der Gehalt an VIP, Somatostatin und Ghrelin wurde mittels Radioimmunassays bestimmt. Die Aktivitätsmessung der NO-Synthase erfolgte durch NOS-Assays.

2.2.1 VIP-, Somatostatin- und Ghrelin-Immunreaktivität

2.2.1.1 Versuchsablauf

In 2 ml Safe-Lock-Gefäßen (Eppendorf) wurden je 150 µl der zu untersuchenden Substanzen zugegeben. Je nach Menge der Substanzen folgte eine Zugabe von entweder 1200 µl , 1050 µl oder 900 µl Krebs-Ringer-Puffer.

Krebs-Ringer-Puffer: 6.75 g NaCl + 1.86 NaHCO₃ + 2.0 g Glucose + 1 Liter Aqua dest.; weiter erfolgte eine Begasung mit: 3,43% KCl, 2.86% NaH₂PO₄, 1.6% MgSO₄ und 3.68% CaCl₂;

Um die Reaktion zu starten wurde je 300 µl der Membranflüssigkeiten in die Safe-Locks pipettiert und für 15 min. in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Safe-Locks verschlossen und für 10 min. bei 4°C vorgekühlter Zentrifuge bei 3500 [g] zentrifugiert. Als nächster Schritt folgte das Pipettieren des Überstandes für die Bestimmung der Immunreaktivität von VIP, Somatostatin und Ghrelin.

2.2.1.2 Radioimmunassay (= RIA)

Der Ablauf der Assays war bis auf die jeweiligen spezifischen Antikörper (=AK) identisch (Versuchsaufbau siehe unter 2.2.1.3).

Als Antikörper für die einzelnen Versuche wurden folgende Antikörper verwendet: [125I]-markierte VIP-Antikörper (Sigma, München, Deutschland), [Tyr1]-markierte Somatostatin-Antikörper (Salk Institut, La Jolla, CA, USA) und [125I]-markierte bioaktive Ghrelin-Antikörper {Erdmann J, Topsch R, et al. 2004}.

2.2.1.3 Aufbau der Radioimmunoassays

1. Puffer A: 0.06 M Phosphat-EDTA Puffer pH 7.40
9.8 g Na_2HPO_4
0.824 g KH_2PO_4 (=Kaliumdihydrogenphosphat)
3.724 g EDTA
0.5 g NaN_3 (=Natriumazid)
ad 1000 ml Aqua destillata.
2. Assay Puffer B: 0.3 g BSA (=Rinderalbumin) wurden in 100 ml 0.06 M Phosphat Puffer geben.
3. Trennungspuffer C: 0.250 g Gelatine wurde durch erwärmen in 100 ml Puffer A gelöst. Es folgte die Zugabe von 1.2 g Kohle Nortit A und 0.12 g Dextran.
4. Antikörper: Weiter wurden je nach Versuchsreihe die spezifischen AK (siehe unter 2.2.1.2) in 1 ml Rabbitserum aufgelöst. Es wurde nun 10 μl der AK für 100 Proben in 10 μl Assay gelöst.
5. Tracer: Es folgte das Lösen des Lyophilisat (Amersham, UK) in 0.2 ml Aqua destillata.
6. Pipettierschema: Proben, Standard, AK, J^{125} , Puffer.
7. Als nächster Schritt folgte die Inkubation für 96 Stunden bei einer Temperatur von 4°C.
8. Mit einem Vortex-Schüttelgerät wurden die Substanzen geschüttelt und vermischt.
9. Nun folgte die Zentrifugation für 20 min. bei 2500 [g].
10. Jede Minute wurde eine Sedimentzählung durchgeführt.

2.2.2 NOS-Assay

Die NOS-Aktivität wurde säulenchromatographisch durch die enzymatische Umsetzung von L-[³H]-Arginin in L-[³H]-Citrullin gemessen.

2.2.2.1 Versuchsvorbereitung

Zu Beginn erfolgte die Anfertigung von Poly-Prep-Chromatographen-Säulen (Bio-Rad). Diese wurden mit einer Menge von je 1 g Resin gefüllt. Es folgte nun die Zugabe von 2 ml Aqua destillata. Die Säulen wurden im nächsten Schritt geschüttelt und für 1 Stunde belassen. Nach dieser Zeit wurde der Deckel am Boden der Säule entfernt. Nun wurden die eröffneten Säulen in einem 3-maliger Spülvorgang mit je 1 ml NaOH, je 1 ml Aqua destillata und mit je 1 ml MOPS-Pufferlösung gespült. In 2 ml Safe-Lock-Gefäße wurden jetzt je 100 µl der zu untersuchenden Substanzen pipettiert [Arginin-Citrullin-Stopp-Lösung: 210.7 mg Arginin + 175.2 mg Citrullin + 50 ml Aqua destillata].

2.2.2.2 Anfertigung einer L-[³H]-Arginin-Probe

In diesem Versuchsabschnitt wurden zwischen 10 bis 15 µl L-[³H]-Arginin zu 500 bis 1000 µl MOPS in ein Meßgefäß pipettiert. Danach erfolgte die Bestimmung der radioaktiven β-Strahlung in einem β-Counter-Meßgeräte. Die β-Aktivität lag bei allen Versuchen zwischen 300.000 bis 1.000.000 cpm (counts per minute).

2.2.2.3 Versuchsaufbau

Anfangs erfolgte die Zugabe von je 30 µl Enzym-Co-Faktoren [= 4 µl FMN, 4 µl FAD, 2 mM CaCl₂, 1 µM Calmodulin, 0.1 µM THB und 0.1 mM DTT] in jeweils ein 2 ml Safe-Lock-Gefäß. Dazu wurden je 500 µl der Membranflüssigkeit pipettiert. Als nächstes wurden je 15 µl L-³H-Arginin-MOPS-Puffer-Flüssigkeit aus der L-[³H]-Arginin-Probe hinzupipettiert. Das restliche Volumen wurde mit MOPS-Puffer aufgefüllt. Um die Enzym-Reaktion zu starten wurden nun je 30 µl β-NADPH zugegeben.

Die Safe-Lock-Gefäße wurden für 15 min. in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Danach folgte eine 6 min. Protein-Ausfällungsreaktion in einem 95°C erhitzten Heizblock. Daraufhin wurde je 1 ml einer Arginin-Citrullin-Stopp-Lösung zugegeben. Weiter folgte ein Zentrifugationsschritt für 3 min. bei 10000 [g]. Die Safe-Lock-Gefäße wurden nun geöffnet und der Inhalt in die Säulen eingefüllt. Dieser lief nach Passage der Filtersäulen in die Meßgefäße. Nun wurden die Säulen mit je 1 ml Aqua destillata nachgespült. Weiter wurde je 1.5 ml Szintiflüssigkeit in die Meßgefäße gegeben. Diese wurden nach Verschluss mit einem Deckel in das Counter-Meßgerät für β -Strahlung gestellt. Als Ausdruck für die Aktivität der NO-Synthase wurde in unseren Versuchen die L-[^3H]-Citrullin-Aktivität gemessen.

2.2.2.4 Versuchsauswertung

Das Ergebnis der β -Radioaktivität wurde in der Einheit dpm erfasst und in fmol/mg/min umgerechnet.

2.3 CB₁- und CB₂-Rezeptor-Nachweis mittels RT-PCR

Zu Beginn wurde aus Gehirngewebe, aus Gewebe des myenterischen Plexus der longitudinalen Muskelschicht und aus der Mukosagewebe des Ileums von Ratten die gesamte RNA entnommen. Die erhaltenen Gewebeproben wurde homogenisiert. Die RNA wurde nun mittels DNase für 15 min. bei Raumtemperatur behandelt und isoliert (1U DNase I/ μg RNA, Invitrogen; Groningen, Niederlande).

Weiter erfolgte die Umschreibung der gesamten RNA in komplementäre DNA (cDNA). Um die Expression der CB₁- und CB₂-Rezeptoren auf mRNA-Ebene darzustellen, verwendeten wir spezifische CB-Rezeptor-Primer. Weiter wurden 35 PCR-Zyklen mit 2.5 U Taq Polymerase (Sigma®, Deutschland) durchgeführt. 1 μl des RT-Reaktions-Gemisches wurde nach einer Hitze-Startreaktion bei einer Temperatur von 95°C für 3 min. denaturiert. Dieser Schritt wurde bei jedem PCR-Zyklus durchgeführt. Es folgten weitere Zyklen für 20 sec. bei 94°C, weitere für 20 sec. bei 60°C und wieder weitere für 45 sec. bei 72°C. Der letzte Zyklus wurde für 7 min. bei einer Temperatur von 72°C durchgeführt. Als Negativ-Probe, wurde eine isolierte RNA ohne Anwesenheit von einer Reversen-Transkriptase und den spezifischen Primern vervielfältigt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden nun mittels einem 1.5% Agarosegel in der Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Die Banden wurden vom Gel abgetrennt, durch ein Gelextraktionsgerät (Qiagen; Hilden, Deutschland) gereinigt und in einen TOPO-PCR II-Vektor eingebaut (Invitrogen). Die Nukleotidsequenzen wurden aus zyklischen Sequenzen von isolierten Plasmiden (Qiagen, QIAprep spin Miniprep- Kit) mit T7-Folgesequenzen (GATC; Konstanz, Deutschland) gebildet. Die Analyse der Sequenzabschnitte erfolgte durch das Softwareprogramm "BLASTn-Homology-Search".

2.4 Verwendete Stoffe und Substanzen

Ghrelin (Phoenix Pharma. Inc., USA), Capsaicin (Sigma®, Deutschland), Capsazepine (Sigma®, Deutschland), SR141716A (Sanofi Recherche), SR144528 (Sanofi Recherche), Anandamid, WIN 55,212-2, Substanz P, β -NADPH (Sigma®, Deutschland), SNAP (Calbiochem®, Deutschland), KCl, CaCl₂, NaCl, Glucose, NaHCO₃, L-[2,3,4,5- ³H] Arginine monohydrochlorid (Amersham pharmacia biotech, UK), AM404 (Cayman Chemical, USA), PMSF, CCH (= Carbachol), FAD, FMN, Calmodulin, THB (= Tetrahydrobiopterin), MgCl₂, Pepstatin, Thiorphan, DTT (= Dithiotreitol), Saccharose, Trypsininhibitor, Captopril, Arginin, Citrullin, Lyophilisat-Tracer (Amersham Pharm. Biotech, UK), BSA (= Rinderalbumin), Phosphat- Puffer, Dextran, VIP- Antikörper (Hammer Smith Hospital, London, UK), Somatostatin-Antikörper (Amersham Biosciences Europe, Freiburg), Ghrelin- Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG Serum, Phoenix Pharma. Inc., USA), GABA, Tiagabine, MOPS (= 3- N-Morpholino- Propan- Sulfonsäure), CB₁- und CB₂-Rezeptor-Primer und AG 50W-X8 Resin.

2.5 Statistik

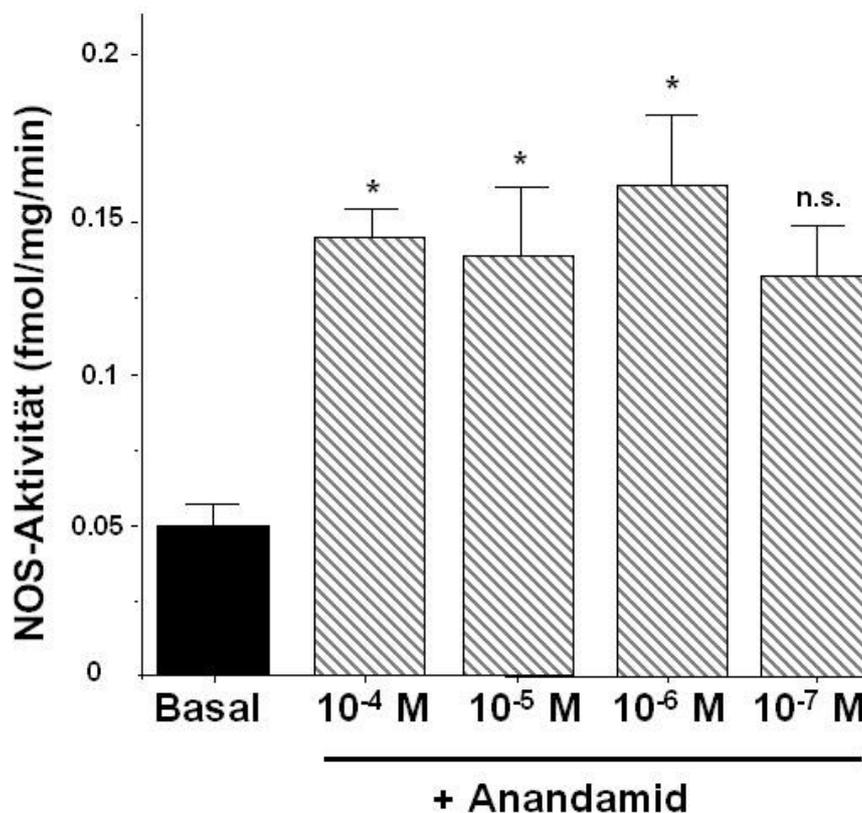
Alle Daten wurden als Mittelwert (=MW) \pm Standardfehler (=SEM) angegeben. Als Statistiksoftwareprogramm wurde Sigma-Stat verwendet. Die Mittelwerte wurden mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) verglichen, der Student-t-Test für gepaarte und ungepaarte Stichproben angewandt. Als Signifikanzniveau wurde die Wahrscheinlichkeit $p < 0.05$ festgelegt. "***" steht für signifikante Ergebnisse und "n.s." für nicht signifikante Resultate. Mit "n" wurde die Anzahl der Versuche angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte der Endocannabinoide auf die NO-Synthase-Aktivität

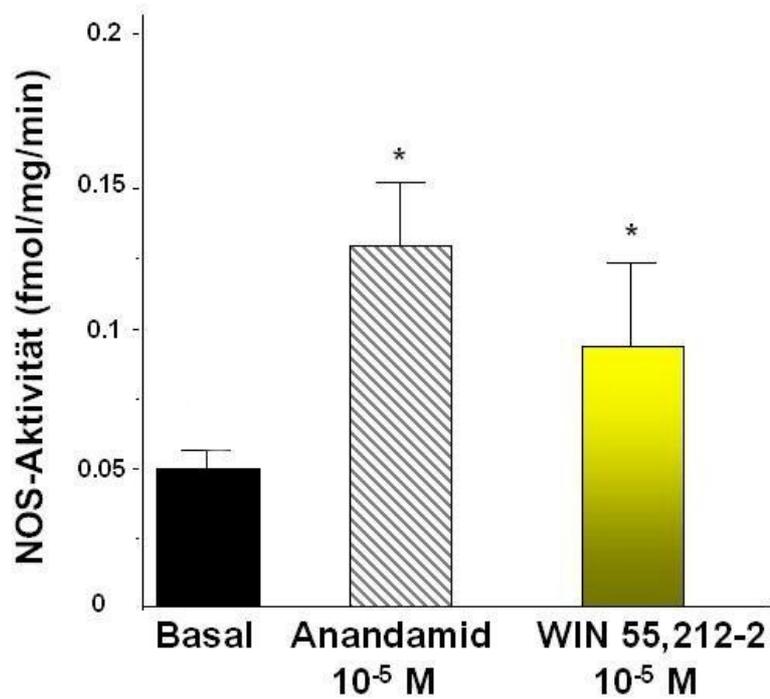
3.1.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2

Unter Zugabe von Anandamid [10^{-4} M bis 10^{-6} M] fand sich ein statistisch signifikanter Zuwachs der NO-Synthase-Aktivität gegenüber der basalen Aktivität.



Graphik 1: Die Zugabe von Anandamid führte zu einer signifikanten Zunahme der NO-Synthase-Aktivität gegenüber der basalen Aktivität ([fmol/mg/min] Basal: 0.05 ± 0.01 fmol/mg/min, n=4) in den Konzentrationen von 10^{-4} M bis 10^{-6} M (Anandamid 10^{-4} M: 0.14 ± 0.02 fmol/mg/min, Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 fmol/mg/min, Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.05 fmol/mg/min, n=4) und bei einer Konzentration von 10^{-7} M (Anandamid 10^{-7} M: 0.13 ± 0.04 fmol/mg/min, n=4).

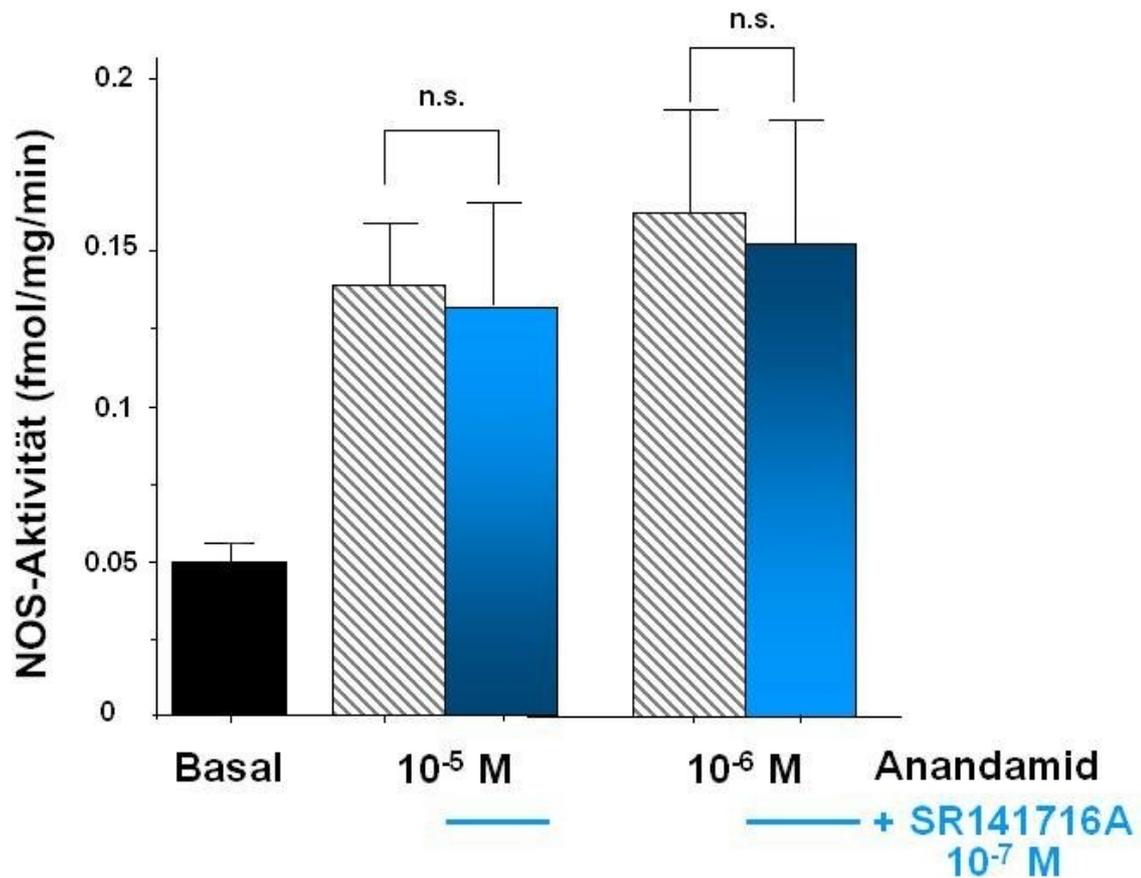
WIN 55,212-2 [10^{-5} M] und Anandamid [10^{-5} M] konnten beide eine signifikante Steigerung der NO-Synthase-Aktivität im Vergleich zur basalen Aktivität erzielen.



Graphik 2: Sowohl Anandamid als auch WIN 55,212-2 führen beide zu einem signifikanten Zuwachs der NO-Synthase-Aktivität ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.049 ± 0.01 , Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 0.1 ± 0.02 , n=4).

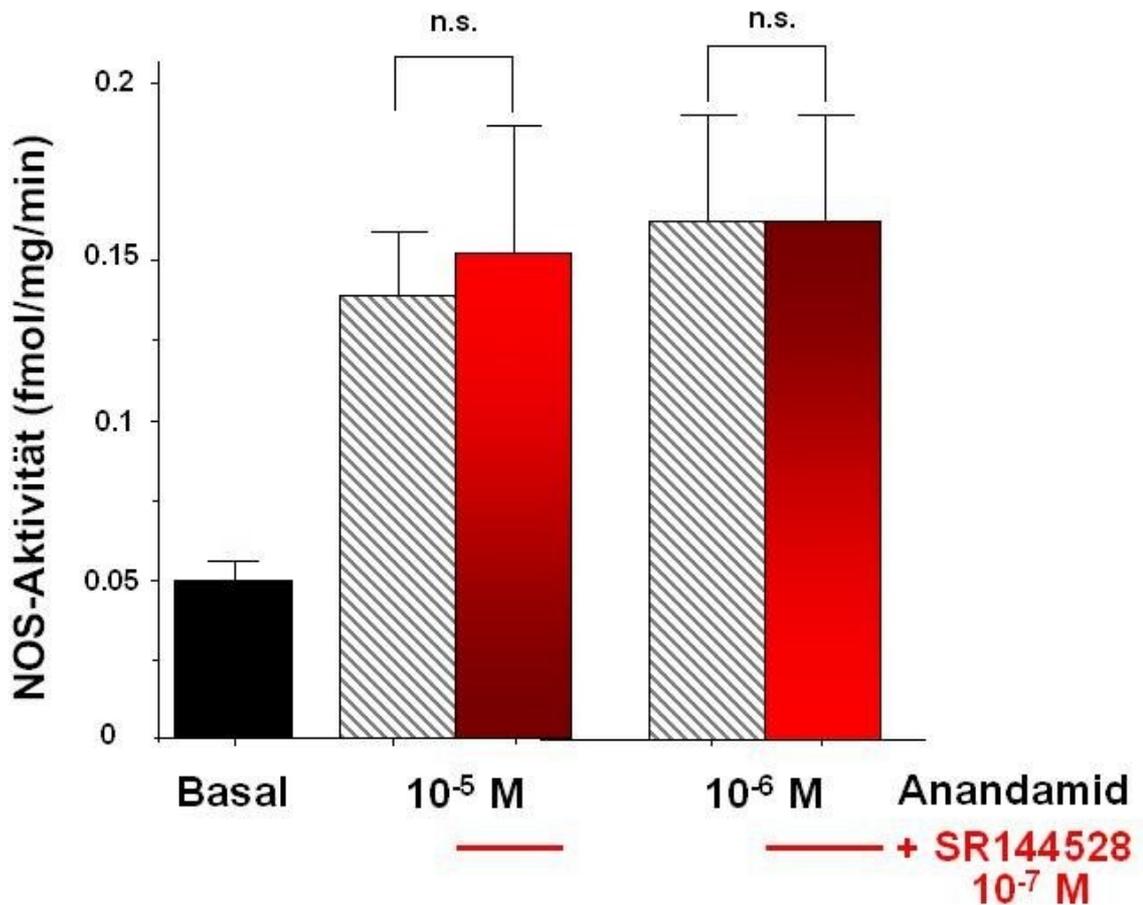
3.1.2 Rezeptorvermittelte Effekte der Cannabinoide

Die Steigerung der NO-Synthase-Aktivität konnte durch den spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten, SR141716A [10⁻⁷ M], nicht signifikant verändert werden.



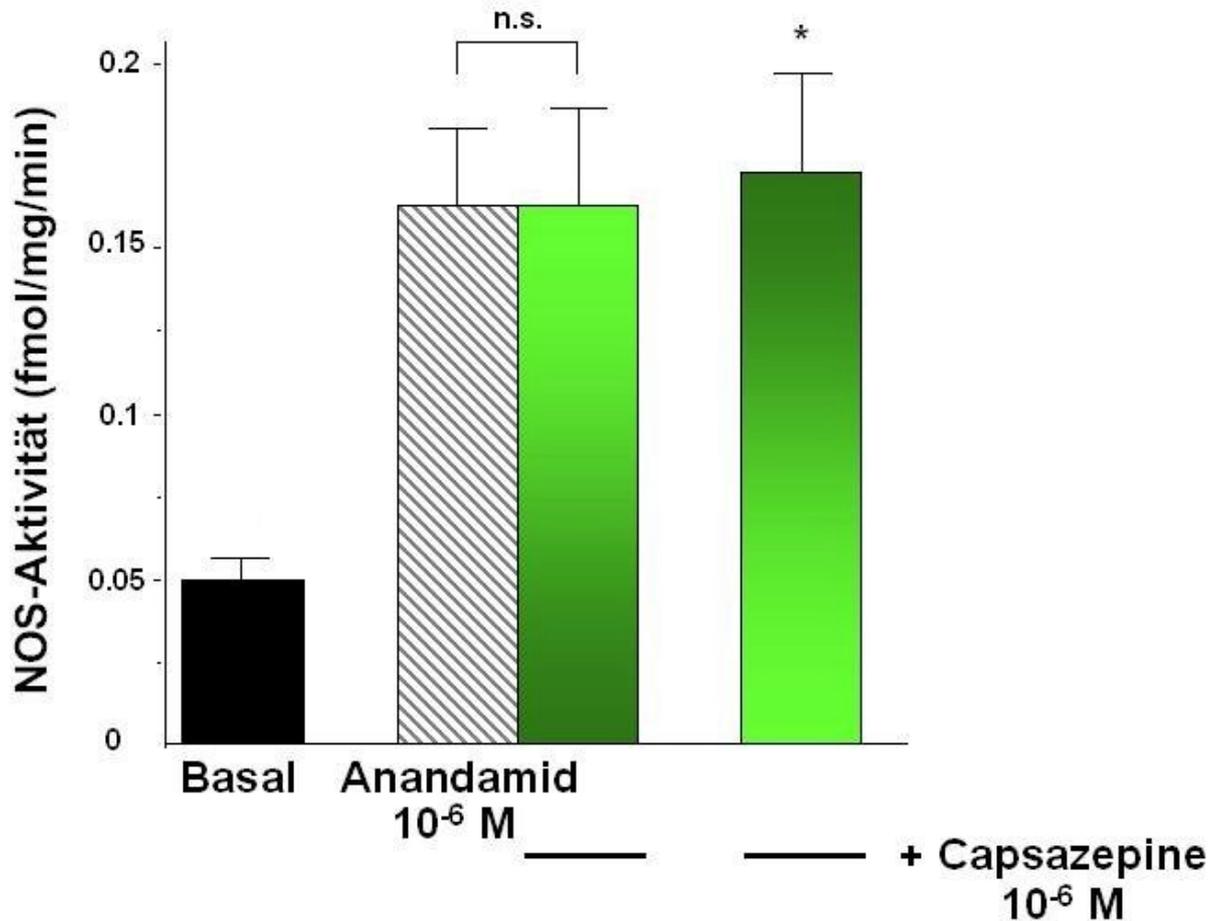
Graphik 3: Nach Zugabe des spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten, SR141716A, fand sich keine signifikante Änderung der Anandamid induzierten NO-Synthase-Aktivitätssteigerung ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01, Anandamid 10⁻⁵ M: 0.13 ± 0.05, Anandamid 10⁻⁵ M + SR141716A 10⁻⁷ M: 0.14 ± 0.03, Anandamid 10⁻⁶ M: 0.16 ± 0.03, Anandamid 10⁻⁶ M + SR141716A 10⁻⁷ M: 0.15 ± 0.04, n=4).

Durch Zugabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528 [10⁻⁷ M], wurde keine signifikante Änderung der Anandamid-induzierten NO-Synthase-Aktivitäts-Steigerung erzielt.



Graphik 4: Die Aktivitätszunahme der NO-Synthase, nach exogener Anandamidgabe, wurde durch die Anwesenheit des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528, nicht signifikant verändert ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01, Anandamid 10⁻⁵ M: 0.13 ± 0.05, Anandamid 10⁻⁵ M + SR144528 10⁻⁷ M: 0.15 ± 0.04, Anandamid 10⁻⁶ M: 0.16 ± 0.03, Anandamid 10⁻⁶ M + SR144528 10⁻⁷ M: 0.1 ± 0.03, n=4).

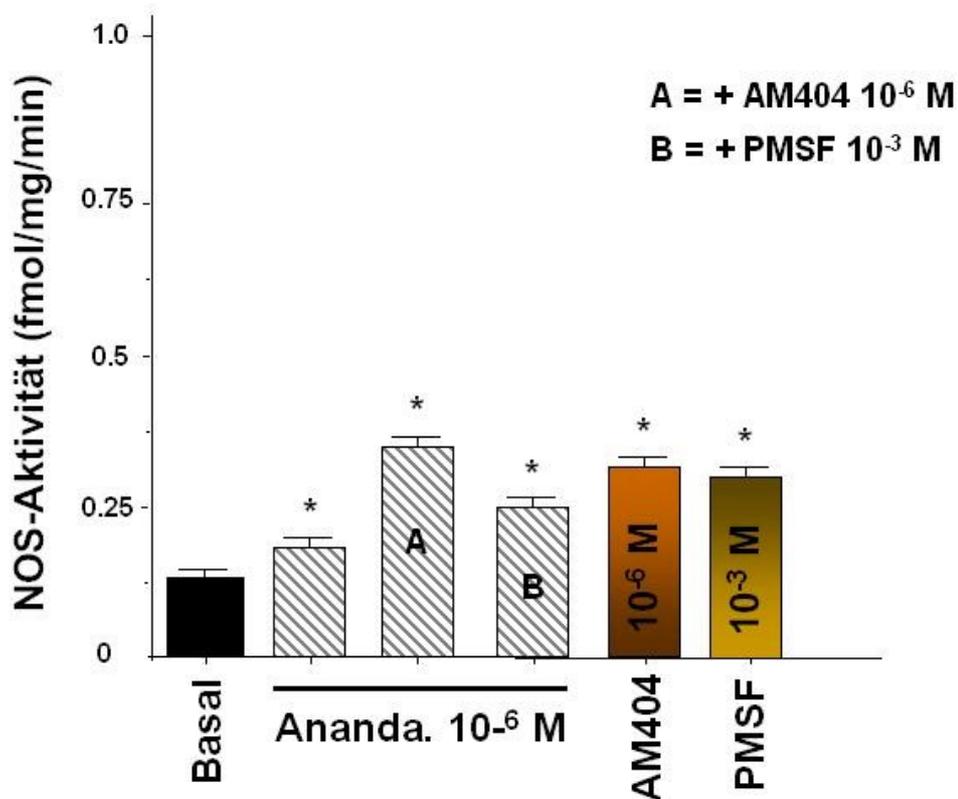
Die spezifische Antagonisierung des Vanilloid-Rezeptors 1 durch Capsazepine [10^{-6} M], führte keine signifikante Änderung der durch exogene Anandamidzugabe hervorgerufenen Steigerung der NO-Synthase-Aktivität herbei. Nach alleiniger Capsazepine-Gabe [10^{-6} M] fand sich hingegen eine signifikante Aktivitätszunahme der NOS gegenüber dem Grundumsatz.



Graphik 5: Die alleinige Gabe von Capsazepine führte zu einer signifikanten Aktivitätszunahme der NOS. Dagegen zeigte sich nach Zugabe von Capsazepine und Anandamid keine signifikante Veränderung der Anandamid induzierten NOS-Aktivitätssteigerung ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01 , Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M + Capsazepine 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Capsazepine 10^{-6} M: 0.17 ± 0.03 , n=4).

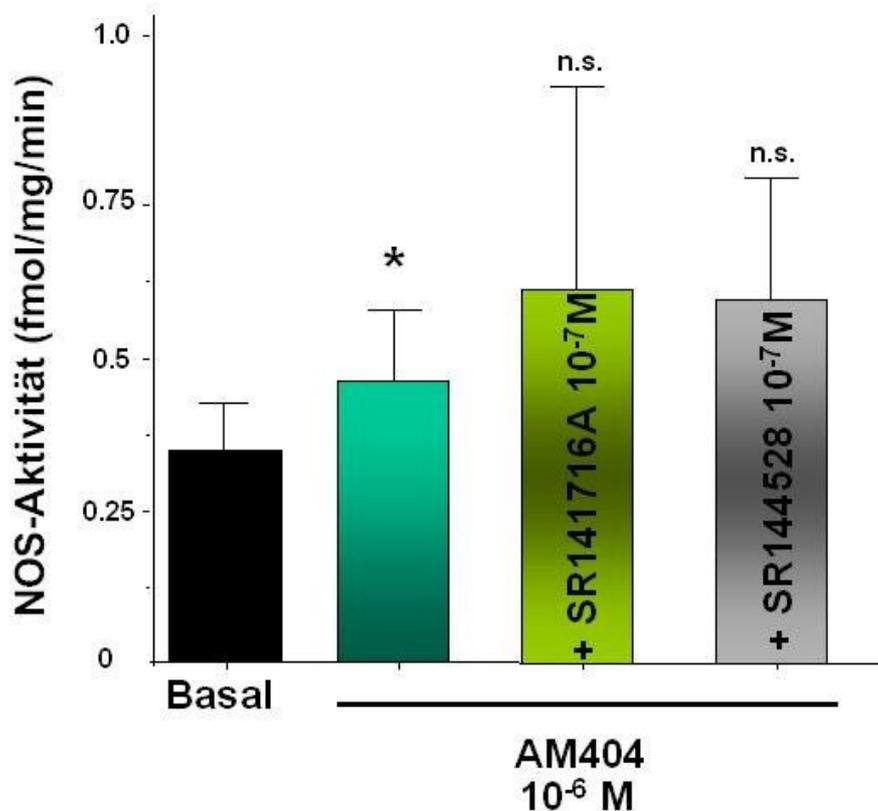
3.1.3 Effekte von endogenem Anandamid

Durch Inhibierung der Anandamid abbauenden Hydrolase (= FAAH) mittels PMSF, und durch Blockade des Anandamid-Transporters durch AM404 kann die endogene Wirkung von Anandamid simuliert werden. Sowohl durch die Gabe von Anandamid [10^{-6} M] + AM404 [10^{-6} M] und Anandamid [10^{-6} M] + PMSF [10^{-3} M], als auch bei Zugabe von AM404 [10^{-6} M] und PMSF [10^{-3} M] zeigte sich ein signifikanter Zuwachs der NO-Synthase-Aktivität.



Graphik 6: Es fand sich eine Aktivitätszunahme der NOS, hervorgerufen durch exogene Zugabe von Anandamid, wie auch nach Gabe von Anandamid mit AM404 und mit PMSF. Auch durch Zugabe von AMA404 und PMSF konnte die NOS-Aktivität signifikant gesteigert werden ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.12 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M: 0.22 ± 0.02 , Anandamid 10^{-6} M + AM404 10^{-6} M : 0.29 ± 0.06 , Anandamid 10^{-6} M + PMSF 10^{-3} M: 0.27 ± 0.03 , AM404 10^{-6} M: 0.32 ± 0.08 , PMSF 10^{-3} M: 0.30 ± 0.06 , n=6).

Die signifikante Zunahme der NO-Synthase-Aktivität nach spezifischer Antagonisierung des Anandamid-Transporters mittels AM404 [10^{-6} M], wurde weder durch Zugabe des spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten, SR141716A [10^{-7} M], noch durch die Gabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528 [10^{-7} M], in ihrer Aktivität verändert.

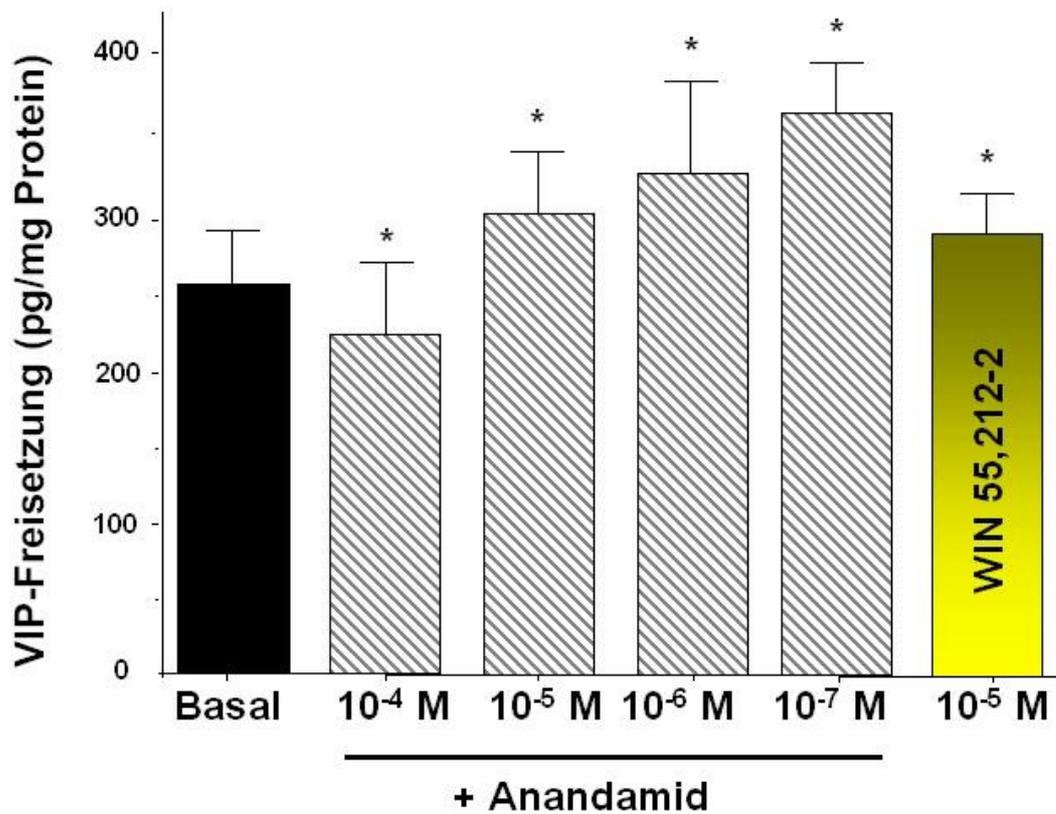


Graphik 7: AM404 führte zu einer signifikanten Zunahme der NO-Synthase-Aktivität. Die selektive Blockade der CB₁- und CB₂-Rezeptoren veränderte die Aktivitätszunahme der NOS nicht signifikant ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.3 ± 0.07 , AM404 10^{-6} M: 0.45 ± 0.13 , AM404 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 0.64 ± 0.35 , AM404 10^{-6} M + SR144528 10^{-7} M: 0.62 ± 0.2 , n=6).

3.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Freisetzung von VIP

3.2.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2

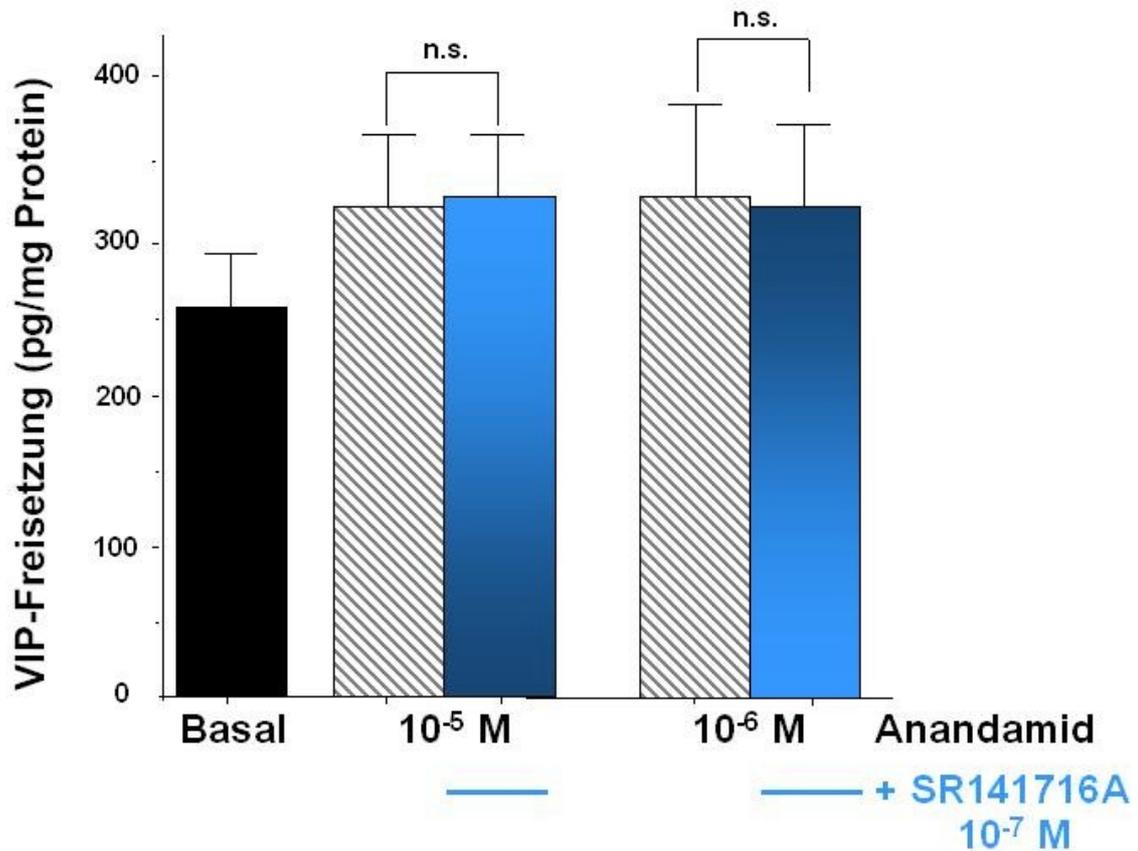
Bei Zugabe von Anandamid [10^{-5} M bis 10^{-7} M] und WIN 55,212-2 [10^{-5} M] erfolgte eine signifikante Zunahme der VIP-Freisetzung gegenüber der basalen Sekretion.



Graphik 8: Es zeigte sich ein signifikanter Zuwachs der VIP-Sekretion nach Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 gegenüber der basalen Freisetzung ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-4} M: 232.9 ± 50.6 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-6} M: 337.2 ± 61.1 , Anandamid 10^{-7} M: 350.9 ± 33.6 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 292.6 ± 27.8 , n=6).

3.2.2 CB₁-Rezeptor-Effekt

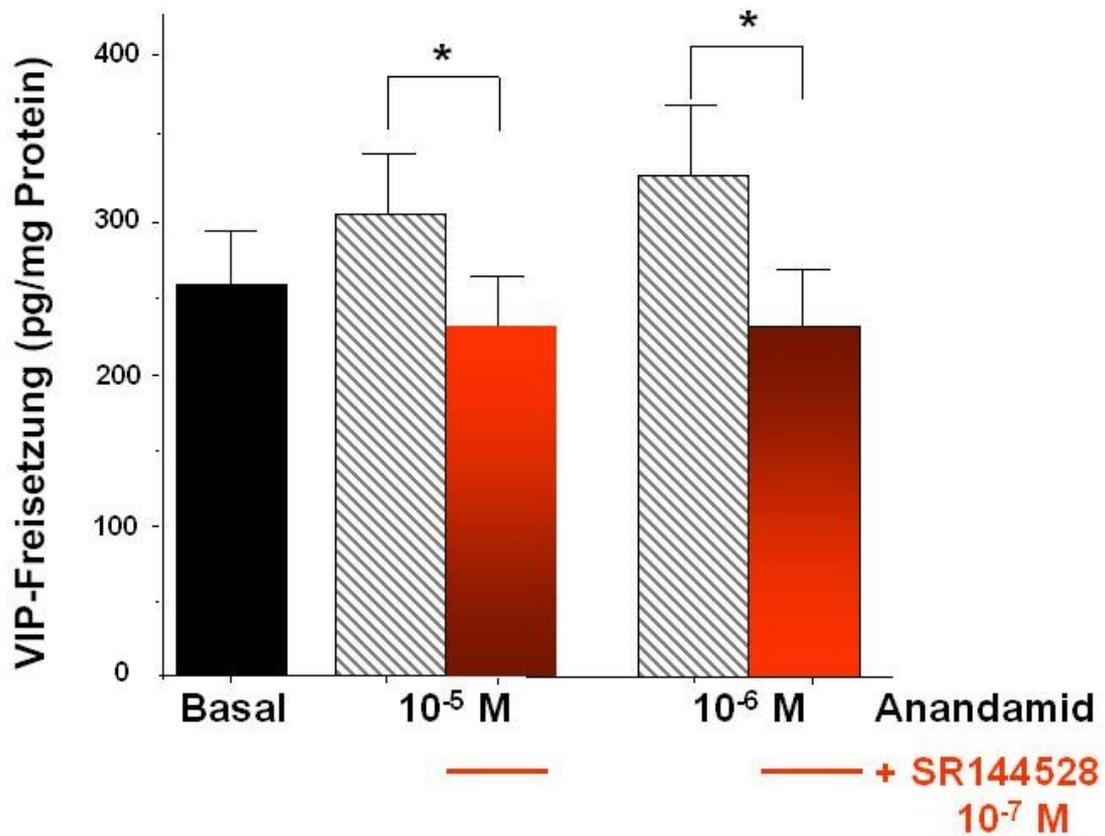
Nach Zugabe des spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten, SR 141716A [10^{-5} M und 10^{-6} M], fand sich keine signifikante Änderung der Anandamid induzierten vermehrten VIP-Freisetzung.



Graphik 9: Es zeigte sich kein signifikanter Rückgang der VIP-Freisetzung nach Zugabe von SR141617A, dem spezifischen CB₁-Rezeptor-Antagonisten ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2, Anandamid 10⁻⁵ M: 308.0 ± 42.3, Anandamid 10⁻⁵ M + SR141716A 10⁻⁷ M: 309.6 ± 44.3, Anandamid 10⁻⁶ M: 337.2 ± 61.1, Anandamid 10⁻⁶ M + SR141716A 10⁻⁷ M: 334.1 ± 53.2, n=6).

3.2.3 CB₂-Rezeptor-Effekt

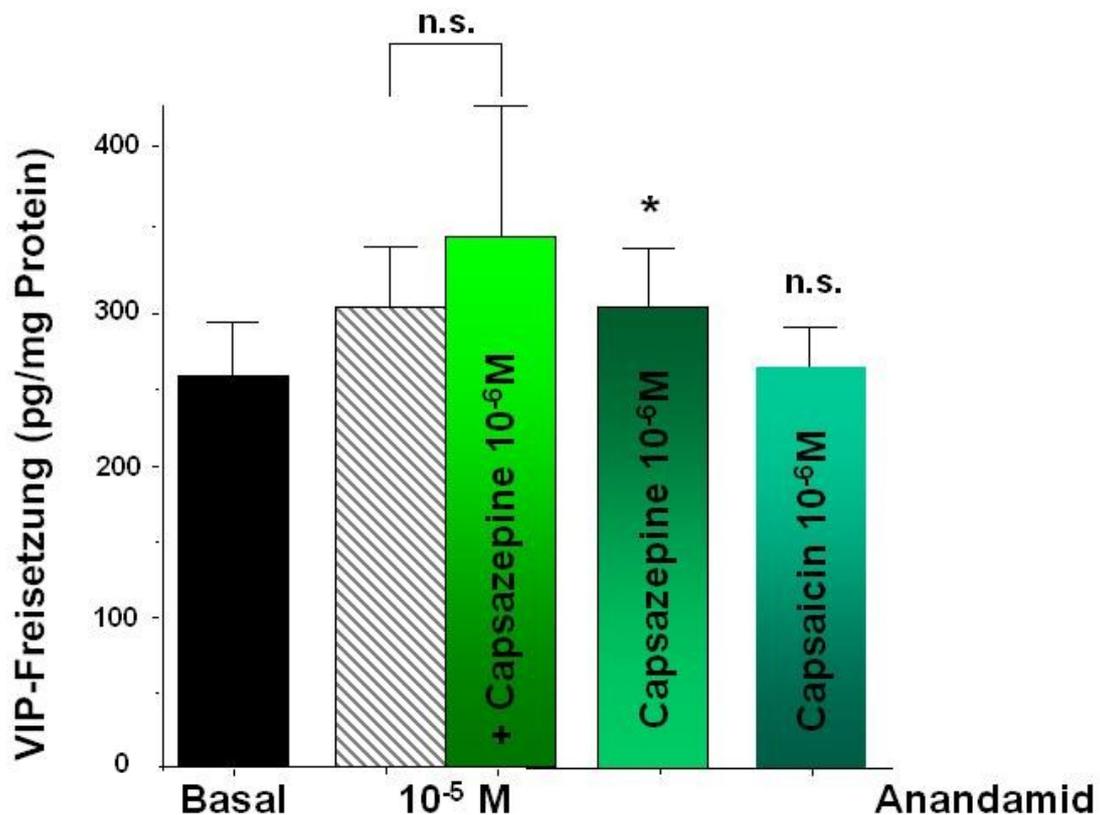
Durch die Zugabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR 144528 [10⁻⁵ M und 10⁻⁶ M], wurde die Anandamid induzierte Freisetzung von VIP signifikant gehemmt.



Graphik 10: Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der VIP-Freisetzung nach Zugabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528 ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2, Anandamid 10⁻⁵ M: 308.0 ± 42.3, Anandamid 10⁻⁵ M + SR144528 10⁻⁷ M: 243.6 ± 45.4, Anandamid 10⁻⁶ M: 337.2 ± 61.1, Anandamid 10⁻⁶ M + SR144528 10⁻⁷ M: 247.1 ± 40.9, n=6).

3.2.4 Vanilloid-Rezeptor 1-Effekt

Weder durch Zugabe des spezifischen Vanilloid-Rezeptor 1-Agonisten, Capsaicin [10^{-6} M], noch durch die Gabe von Capsazepine [10^{-6} M], ein spezifischer VR1-Antagonist, ließ sich die Anandamid induzierte vermehrte VIP-Sekretion signifikant verändern. Die alleinige Gabe des spezifischen VR1-Antagonisten, Capsazepine [10^{-6} M], führte zu einer signifikanten Mehrsekretion von VIP gegenüber der basalen Freisetzung.



Graphik 11: Die Zugabe von Capsazepine, dem spezifischen Antagonist am VR1, führte zu einer signifikanten Mehrsekretion von VIP. Die alleinige Gabe von Capsaicin, dem spezifischen Agonisten am VR1, und die Kombinationsgabe von Anandamid und Capsazepine hatte keine signifikante Veränderung der VIP-Sekretion gegenüber der basalen Freisetzung zur Folge ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-5} M + Capsazepine 10^{-6} M: 351.6 ± 84.3 , Capsaicin 10^{-6} M: 275.6 ± 26.4 , Capsazepine 10^{-6} M: 306.8 ± 28.9 , n=6).

3.2.5 Effekte von endogenem Anandamid

Durch die Gabe von AM404, ein spezifischer Antagonist des Anandamid-Transporters, stieg die VIP-Sekretion im Vergleich zur basalen Freisetzung an ([pg/mg] Basalwert = $3.1 \text{ pg/mg} \pm 1.2$, AM404 10^{-6} M : $5.0 \text{ pg/mg} \pm 1.1$, n=5).

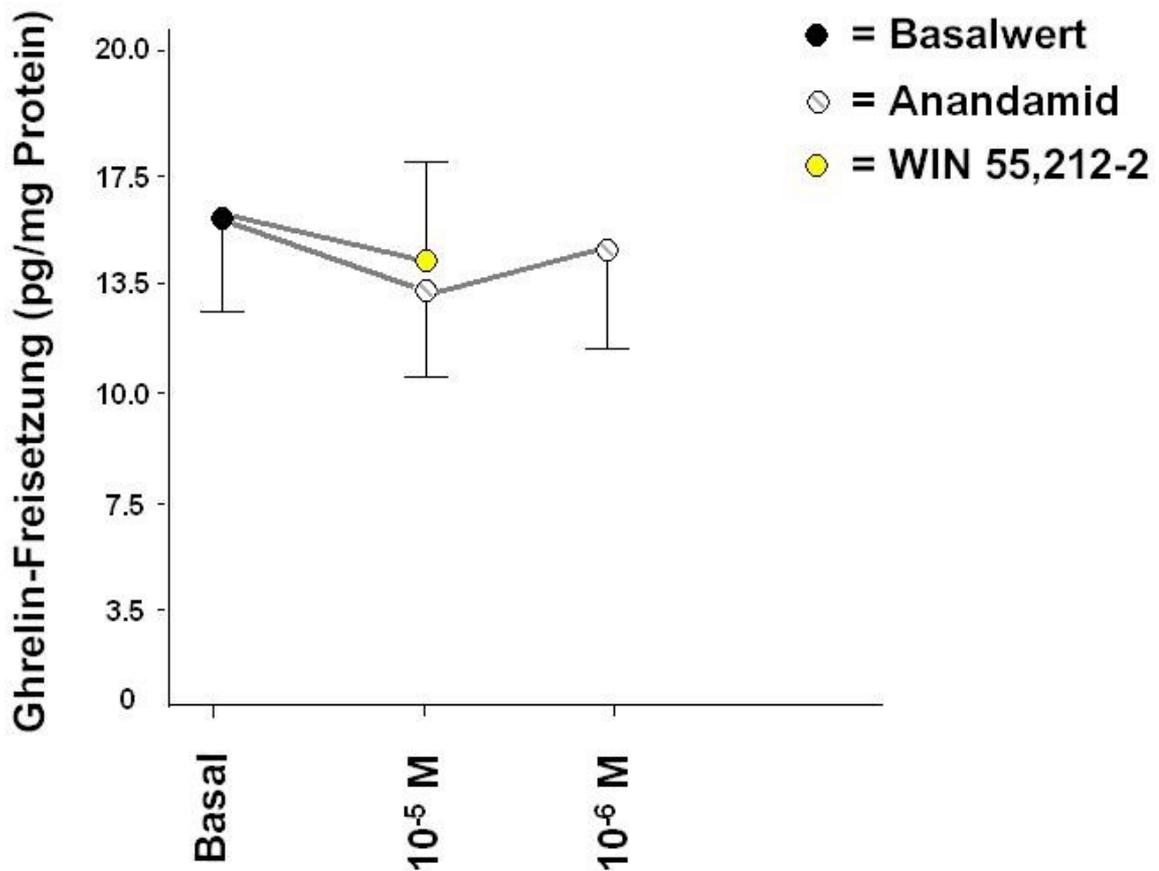
Die Zugabe des spezifischen CB₁-Rezeptor-Inhibitors, SR141716A, ergab keine signifikante Sekretionsänderung (AM404 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M :

$8.4 \text{ pg/mg} \pm 1.9$). Ebenso wenig führte die Zugabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528, zu einer Veränderung der Sekretion des vasoaktive intestinale Polypeptids (AM404 10^{-6} M + SR144528 10^{-7} M : $8.7 \text{ pg/mg} \pm 3.6$).

3.3 Effekte der Endocannabinoide auf die Ghrelin-Freisetzung

3.3.1 Effekte von Anandamid und WIN 55,212-2

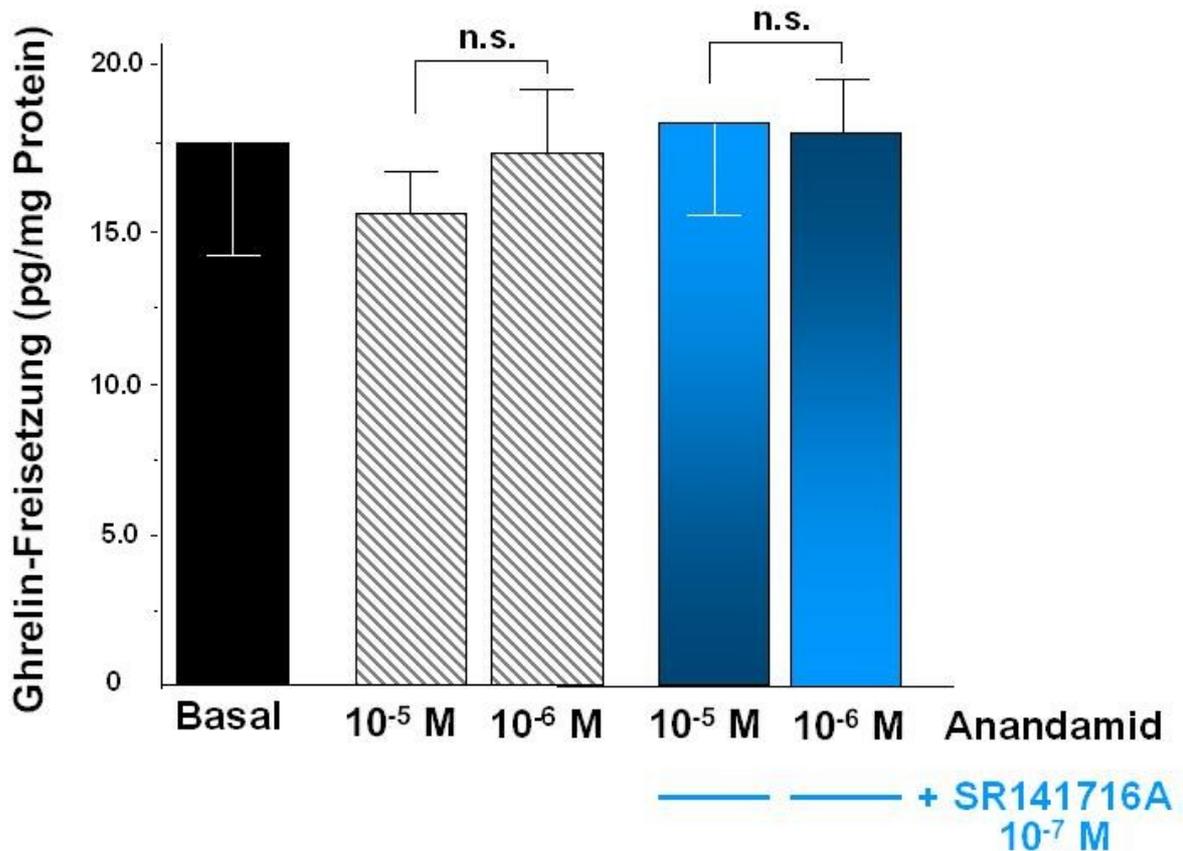
Die Zugabe von Anandamid [10^{-5} M und 10^{-6} M] und WIN 55,212-2 [10^{-5} M] rief keine signifikante Veränderung der Ghrelin-Freisetzung gegenüber der basalen Freisetzung herbei.



Graphik 12: Diese Graphik soll die unveränderte Sekretion von Ghrelin nach Zugabe von Anandamid [10^{-5} M und 10^{-6} M] und WIN 55,212-2 [10^{-5} M] im Vergleich zum basalen Grundumsatz verdeutlichen ([pg/mg] Basalwert: 16.9 ± 2.3 ; Anandamid 10^{-5} M: 13.5 ± 1.9 , 10^{-6} M: 15.2 ± 2.3 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 15.8 ± 2.4 , n=11).

3.3.2 CB₁-Rezeptor-Effekt

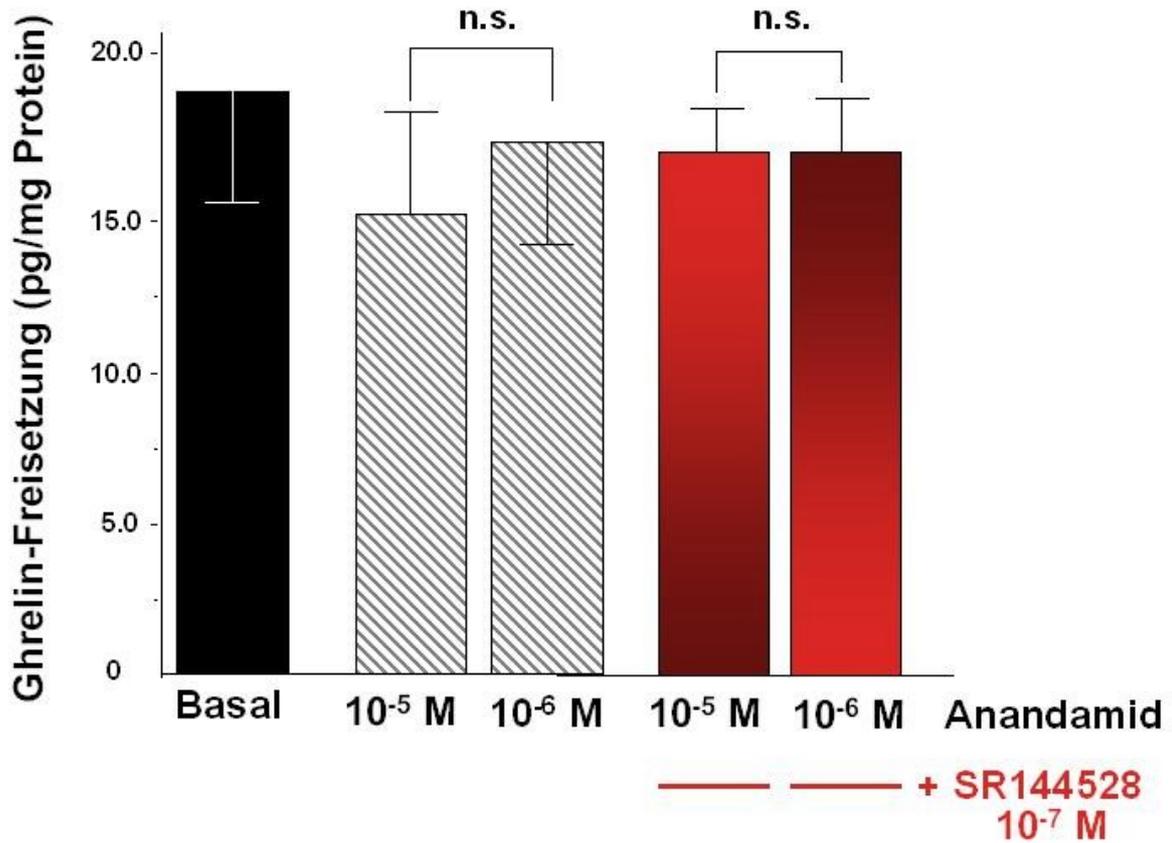
Durch die spezifische Blockade des CB₁-Rezeptors mit SR141716A [10^{-7} M] konnte keine signifikante Änderung der Ghrelin-Freisetzung gegenüber der Anandamid induzierten Sekretion beobachtet werden.



Graphik 13: Unsere Daten zeigten keine signifikante Veränderung der Freisetzung von Ghrelin, weder durch Zugabe von Anandamid, noch nach spezifischer CB₁-Rezeptor-Blockade, gegenüber dem basalen Grundumsatz ([pg/mg] Basalwert: 17.5 ± 3.9 ; Anandamid 10^{-5} M: 15.8 ± 1.9 , 10^{-6} M: 17.7 ± 2.3 , Anandamid 10^{-5} M + SR141716A 10^{-7} M: 17.9 ± 2.8 , Anandamid 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 17.5 ± 2.0 , n=6).

3.3.3 CB₂-Rezeptor-Effekt

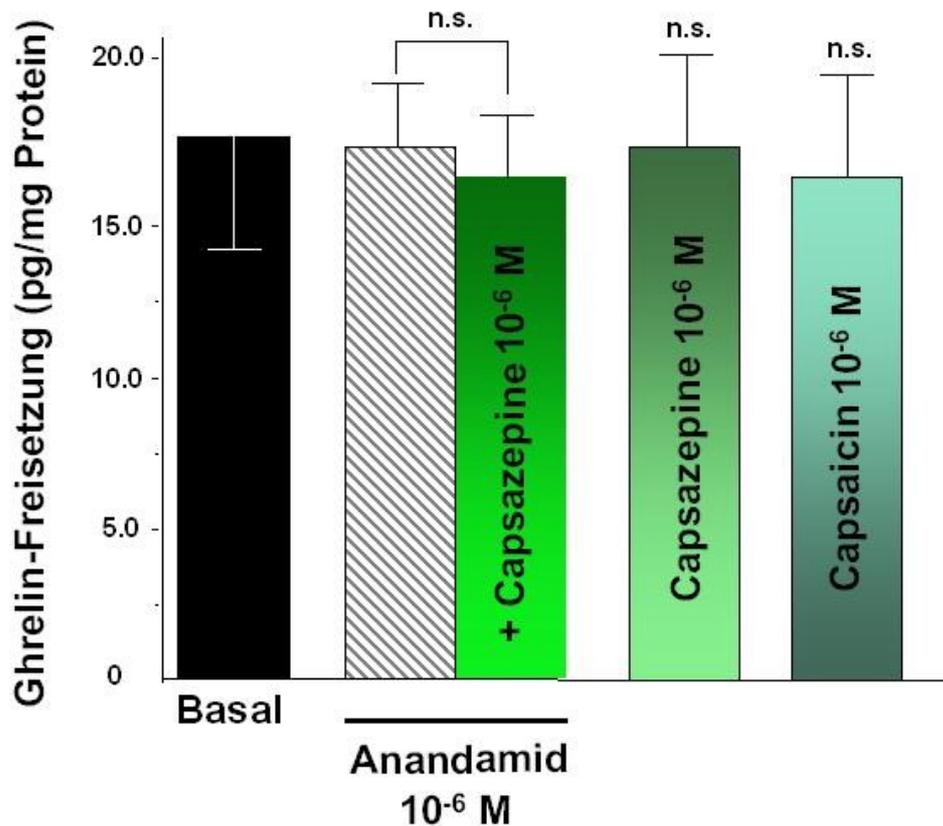
In unserer Versuchsreihe war nach spezifische Antagonisierung des CB₂-Rezeptors durch SR144528 [10⁻⁷ M] keine signifikanten Veränderung der Ghrelin-Freisetzung, gegenüber der Ghrelinsekretion in Anwesenheit von Anandamid, zu erkennen.



Graphik 14: Nach Anandamid- und nach Gabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528, fand sich keine signifikante Veränderung der Ghrelinfreisetzung ([pg/mg] Basalwert: 17.5 ± 3.9; Anandamid 10⁻⁵ M: 15.8 ± 1.9, 10⁻⁶ M: 17.73 ± 2.34, Anandamid 10⁻⁵ M + SR144528 M⁻⁷: 17.5 ± 1.6, Anandamid 10⁻⁶ M + SR144528 M⁻⁷: 17.5 ± 2.2, n=6).

3.3.4 Vanilloid-Rezeptor 1-Effekt

Capsaicin [10^{-6} M] führte keine signifikante Veränderung der Ghrelin-Freisetzung herbei. Die alleinige Gabe von Capsazepine [10^{-6} M] und die Gabe in Kombination mit Anandamid hatten beide keine signifikante Effekt auf die Freisetzung von Ghrelin im Vergleich zur basalen Sekretion.



Graphik 15: Capsaicin und Capsazepine führten beide zu keine signifikante Veränderung der Sekretion von Ghrelin im Vergleich zur basalen Fresetzung. Dies galt auch für die gemeinsame Gabe von Anandamid mit dem spezifischen VR1-Antagonisten, Capsazepine ([pg/mg] Basalwert: 17.52 ± 3.9 ; Anandamid 10^{-6} M: 17.7 ± 2.34 , Capsaicin 10^{-6} M: 16.6 ± 3.3 , Capsazepine 10^{-6} M: 17.7 ± 2.8 , Anandamid 10^{-6} M + Capsazepine 10^{-6} M: 16.6 ± 1.9 , n=6).

3.4 Effekte der Endocannabinoide auf die Freisetzung von Somatostatin

3.4.1 Rezeptorvermittelte Effekte

Tabelle 1: Anandamid und WIN 55,212-2 hatten beide keinen signifikanten Effekt auf die Somatostatin-Sekretion gegenüber der basalen Freisetzung. Die spezifische Blockade der CB₁-, CB₂-Rezeptoren und des VR1, ergab auch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur basalen Somatostatin-Freisetzung.

Substanzen	Somatostatin-Freisetzung [pg/mg] ± SEM	Signifikanz, (n=6)
Basalwert	11.7 ± 3.8	
Anandamid 10 ⁻⁴ M	13.1 ± 4.3	n.s.
Anandamid 10 ⁻⁵ M	12.8 ± 2.5	signifikant
Anandamid 10 ⁻⁶ M	14.9 ± 3.0	signifikant
Anandamid 10 ⁻⁷ M	13.8 ± 1.7	signifikant
WIN55,212-2 10 ⁻⁵ M	13.1 ± 3.5	n.s.
Anadamid 10 ⁻⁶ M + SR141617A 10 ⁻⁷ M	12.8 ± 3.2	n.s.
Anadamid 10 ⁻⁶ M + SR144528 10 ⁻⁷ M	15.6 ± 3.5	n.s.
Anadamid 10 ⁻⁵ M + Capsazepine 10 ⁻⁶ M	15.8 ± 3.7	n.s.
Anadamid 10 ⁻⁶ M + Capsazepine 10 ⁻⁶ M	16.1 ± 3.5	n.s.

Die Zugabe von Anandamid [10⁻⁴ M bis 10⁻⁷ M] und WIN55,212-2 [10⁻⁵ M], beeinflusste die Somatostatin-Freisetzung gegenüber der basalen Sekretion nicht signifikant. Weder die Anwesenheit der spezifischen CB₁- und CB₂-Rezeptor-Anatagonisten, noch die des spezifischen Antagonisten am VR1 zeigte einen signifikanten Effekt auf die Somatostatin-Freisetzung.

3.4.2 Effekt von endogenem Anandamid

Tabelle 2: Die spezifische Blockade des Anandamid-Transporters durch AM404 hatte keinen Effekt auf die Somatostatin-Sekretion verglichen mit der basalen Freisetzung. Auch die spezifische Inhibierung des CB₁- und CB₂-Rezeptors, in Anwesenheit von AM404, hatte keine signifikante Veränderung der Somatostatin-Freisetzung zur Folge.

Substanzen	SOM-Freisetzung [pg/mg] ± SEM	Signifikanz, (n=5)
Basalwert	5,6 ± 0,9	
AM404 10 ⁻⁶ M	5,6 ± 1,3	signifikant
AM404 10 ⁻⁶ M + SR141617A 10 ⁻⁷ M	4,2 ± 1,3	signifikant
AM404 10 ⁻⁶ M + SR144528 10 ⁻⁷ M	6,7 ± 1,9	signifikant

Die spezifische Inhibierung des Anandamid-Transporters mittels AM404 führte zu keiner signifikanten Änderung der Somatostatin-Sekretion gegenüber der basalen Freisetzung. Die Gabe von AMA404 in Kombination mit dem jeweiligen spezifischen Antagonisten am CB₁- und CB₂-Rezeptor hatte keinen Einfluss auf die basale Freisetzung von Somatostatin.

3.5 RNA-Nachweis von CB₁- und CB₂-Rezeptoren im ENS

Bis heute fehlt jeglicher Nachweis des Cannabinoid-Rezeptor 2-Subtyps in Nervenzellen im enterischen Nervensystem {Kulkarni-Narla A 2000}{Pertwee RG 2001}. In unseren Daten fand sich dagegen ein funktioneller CB₂-Rezeptor-Effekt an Nervenendigungen im ENS.

Wir untersuchten daraufhin mittels RT-PCR auf RNA-Ebene die Existenz eines Cannabis-Rezeptor 2-Subtyps in der longitudinalen Muskulatur mit anhängendem myenterischen Plexus im Dünndarm der Ratte. Mit Hilfe von spezifischen CB₁- und CB₂-Rezeptor-Primern (Tabelle 3), gelang es unserer Arbeitsgruppe, aus der longitudinalen Muskelschicht des Ileums von Ratten beide Cannabis-Rezeptor-Subtypen erstmalig zu isolieren. Die Existenz beider Rezeptoren, vor allem aber der Nachweis eines CB₂-Rezeptors an Nervenendigungen im enterischen Nervensystem war uns somit gelungen.

Tabelle 3: Die Oligonukleotide des Sense (S)- und Antisense-Strang-(AS)-Primers der CB₁- und CB₂-Rezeptoren für die RT-PCR in 5'-->3'Richtung.

Name	Sequence 5'-----3'	PCR- Produkt (pb)	EMBL AC-No.
CB-1 (S)	CCTGGGCTGGAAGTCAA	351	U40395
CB-1 (AS)	CCGAAGACGTCATACACCATGA		
CB-2 (S)	CGGCTTGGAGTTCAACCCTA	481	AF176350
CB-2 (AS)	ACAACAAGTCCACCCCATGAG		

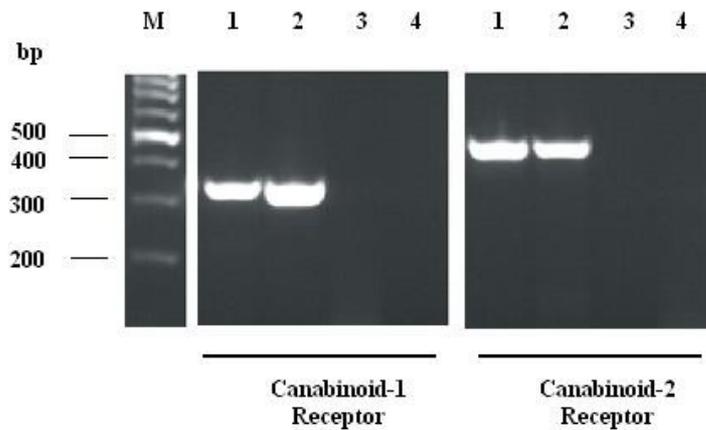


Abbildung 3: Darstellung der RT-PCR der CB₁- und CB₂-Rezeptoren entnommen aus der gesamten RNA von Anteilen aus isoliertem Hirngewebe (Bande 1), aus Gewebeanteilen der longitudinalen Muskelschicht mit anhängendem myenterischen Plexus (LM/MP, Bande 2) und aus Mucosagewebe des Ileums (Bande 3) der Ratte. Einzelne Banden mit der Grösse von ca. 350 Basenpaaren (= bp) und 480 bp konnten die gesicherten Expressionsorte von CB₁- und CB₂-Rezeptoren in der longitudinalen myenterischen Plexusschicht des Rattenileums darstellen. Die Negativ-Kontrolle (Bande 4) zeigte kein PCR-Produkt.

4 Allgemeine Diskussion

4.1 Endogene und synthetische Cannabinoide, ihre Rezeptoren und Effekte im Gastrointestinaltrakt

4.1.1 Cannabinoide



Abbildung 4: Bild von Hanfpflanzen, *Cannabis* spp., aus denen sich cannabinoide Substanzen extrahieren lassen (Abbildungsquelle: www.erowid.org, Photo von Piklz, (c) erowid.org).

4.1.1.1 Cannabis und der Wirkstoff Δ^9 -THC

Die Hanfpflanze, *Cannabis sativa*, zeichnet sich durch eine Vielzahl an Inhaltsstoffen aus. Darunter befinden sich Flavonoide, Aminosäuren und Terpene. Mehr als 60 Hydrocarbon-Komponenten, die Cannabinoide genannt werden, können aus der Hanfpflanze isoliert werden. Von diesen besitzt das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) die grösste psychotrope Potenz {Zimmer A 1999}{Pertwee RG 2001}.

4.1.1.2 Δ^9 -THC-Wirkungen

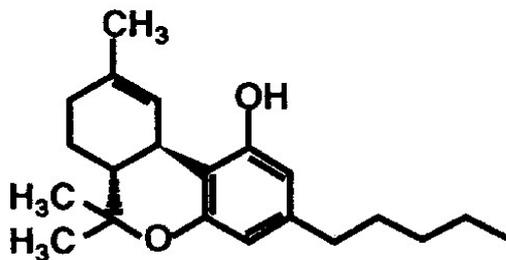


Abbildung 5 Darstellung der chemischen Struktur von Δ^9 -THC (Abbildungsquelle:{Sugiura T 2004}).

Das Δ^9 -Tetrahydrocannabinol besitzt eine psychotrope Wirkung, die zu Stimmungsveränderungen, Wahrnehmungsbeeinträchtigungen, Beeinträchtigung des Zeitgefühls und des Kurzzeitgedächtnisses führt {Fadda P 2004}{Hoffman & Lupica 2000}. Dosisabhängig wirkt es anregend oder beruhigend. Die Fähigkeit komplexe Tätigkeiten auszuführen wird durch den Konsum von Cannabis, bzw. Δ^9 -THC stark beeinträchtigt. Diese Substanz beeinflusst das psychomotorische Verhalten, die Merkfähigkeit, vor allem aber das Kurzzeitgedächtnis.

Δ^9 -THC wirkt modulierend auf die Freisetzung vieler Neurotransmitter (GABA, Dopamine, 5-HT, L-Glutamat) {Rettori V 1990}{Howlett AC 1987}.

Das Hydrocannabinol senkt die Krampfschwelle, wirkt antiemetisch, kann den Augeninnendruck senken, wirkt bronchodilatatorisch und kann Schmerzen und Muskelspasmen lindern {Williamson EM 2000}.

In einem Model an Mäusen, mit einer induzierten Multiplen Sklerose, konnten Brooks et al. in einer Arbeit zeigen, dass Muskelspasmen und lang andauernde

Schmerzzustände, Symptome die häufig bei dieser Erkrankung auftreten, durch die Gabe von Endocannabinoiden vermindert werden konnten {Brooks JW 2002}. Δ^9 -THC wirkt auch stimulierend auf die Nahrungsaufnahme {Iversen L 2003}{Carlini EA 2004}. In klinischen Studie aus dem Jahr 2001 zeigte sich, dass die Gabe von Cannabis bei Personen, die an AIDS erkrankt waren, an einer Krebserkrankung litten oder eine Chemotherapie erhielten, den Appetit deutlich steigern konnte {Jamshidi N 2001}.

Seit Januar 2001 wird das Cannabis-Präparat Dronabinol bei der Schmerztherapie wie bei der Therapie von AIDS- und Krebs-Patienten, sowie bei ZNS-Erkrankungen mit vermehrter Spastik wie Multiple Sklerose oder Querschnittslähmung mit muskulären Krämpfen oder Spastiken verwendet.

Das Wirkspektrum des Präparats liegt in der Reduzierung von Schmerzen, Spastik, Nausea (=Übelkeit) und Emesis (=Erbrechen), wie in der Apetitsteigerung.

In einer 6-wöchigen Studie mit 139 an AIDS erkrankten Personen, bei denen Apetit- und Gewichtsverlust vorlag, fand sich nach Dronabinol-Gabe ein positiver Einfluss auf die Stimmung, sowie eine signifikante Apetit- und Gewichtszunahme, verglichen mit einer Placebo-Kontrollgruppe {El Sohly MA 2001}.

Neben der vielseitigen klinischen Relevanz von Δ^9 -THC ist diese Substanz vor allem wegen seiner hallozinogene Wirkung als Rauschmittel bekannt. Wie bei keiner anderen Droge gehen die verschiedenen Meinungen über Gefahr und Suchtpotential weit auseinander.

4.1.1.3 Abhängigkeitspotential und Schädigung durch Cannabiskonsum

Weltweit ist Cannabis die häufigste illegale konsumierte Substanz. In Deutschland findet sich in den letzten Jahren eine zunehmende Tendenz des Konsums. Laut WHO kann trotz unzureichender Publikationsdaten, bezogen auf die körperliche Anhängigkeit, von einem Cannabis-Abhängigkeitssyndrom gesprochen werden {Abood ME 1992}. Die Substanz verursacht bei Konsumenten eine starke Tendenz der Dosissteigerung. Das Risiko einer Abhängigkeit ist bei Personen, die täglich diese Droge konsumieren, am höchsten. Ein langfristiger Konsum scheint irreversibel geistige Fähigkeiten und die Merkfähigkeit einzuschränken {Iversen L 2003}. Auch weiss man heute, dass Erkrankungen an Schizophrenie bei Langzeitkonsumenten häufiger als bei Nichtkonsumenten auftreten {Henquet C 2004}.

Die psychogenen Effekte sind vor allem dem THC zuzuschreiben. Sowohl die oraler Einnahme von THC wie das Rauchen von Marijuana-Pflanzen verursachen ähnliche subjektive psychogene Effekte {Wachtel SR 2002}.

4.1.2 Endocannabinoide und Endocannabinoid-System

4.1.2.1 Historie

- 1964 konnten Mechoulam et al. an der Universität in Jerusalem, Israel erstmals Δ^9 -THC isolieren (Literaturquelle: www.erowid.org).
- 1987 demonstrierten Howlett et al., dass die Cannabiswirkung Rezeptor vermittelt wird {Howlett AC 2002}.
- 1988 wurden Rezeptoren im zentralen Nervensystem nachgewiesen, mit denen Cannabinoide eine Bindung eingingen {Howlett AC 2002}{Howlett AC 1987}.
- 1992 wurde der erste endogene Ligand, Arachidonylethanolamid, an Cannabisrezeptoren in Nervengewebe von Schweinen entdeckt und Anandamid genannt {Devane WA 1992}.

4.1.2.2 Allgemeines

Endocannabinoide sind endogene Substanzen, die vom Organismus selbst gebildet werden. Sie binden an Cannabinoid-Rezeptoren und führen zu deren Aktivierung. Das 'System der Endocannabinoide' umfasst zwei Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen, die CB₁- und CB₂-Rezeptoren, eine Vielzahl von endogenen Liganden und Enzyme für die endogenen Cannabinoid-Biosynthese und den Abbau der cannabinoiden Substanzen {Di Marzo V 1998}.

Anandamid und 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) sind die bekanntesten Vertreter dieser Stoffklasse. Sie verhalten sich wie 'echte endogene Cannabinoide' (=Endocannabinoide) und haben eine hohe Affinität zu beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen {De Marchi N 2003}.

Bis heute konnte in vielen Arbeiten gezeigt werden, dass Endocannabinoide bei einer großen Zahl von physiologischen Modulationen und Funktionen im peripheren

wie auch im zentralen Nervensystem von Bedeutung sind {Voruganti LN 2001}{Lastres-Becker I 2001}{Hoffman & Lupica 2000}{Devlin & Christopoulos 2002}. Endocannabinoide, Cannabinoid-Rezeptoren und Enzyme für die Biosynthese und den Abbau dieser Substanzen, wurden in verschiedenen Organismen gefunden. So ließen sich z. B. CB₁-Rezeptoren im enterischen Nervensystem von Ratten, Mäusen, Meerschweinchen und auch beim Menschen nachweisen {Pertwee RG 2001}.

Die Arbeitsgruppe um Stefano entdeckte CB₁-Rezeptoren, Anandamid und die Anandamid-Amidase in Immunozyten und Mikrogliazellen von Intervertebraten. Die Arbeit zeigt, dass das System der Endocannabinoid, mit seinen Rezeptoren und Substanzen, seit mehr als 500 Millionen Jahren existieren muss {Stefano GB 1996}.

4.1.2.3 Cannabinoid-Rezeptoren und deren Liganden

CB₁-Rezeptor-Subtypen finden sich, je nach Lokalisation im gesamten Organismus in unterschiedlicher Konzentration {Glass M 1997}, CB₂-Rezeptoren dagegen vorrangig in Zellen des Immunsystems {Izzo AA 2004}.

An beide Rezeptor-Subtypen binden Δ^9 -THC, 2-AG und Anandamid selektiv.

Cannabinoid-Rezeptoren weisen 7-transmembrane Strukturabschnitte auf. Sie sind Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie.

Im ENS konnten bis heute CB₁-Rezeptoren, nicht aber Cannabis-Rezeptor 2 Subtypen nachgewiesen werden. In einer Arbeit von Kulkarni-Narla et al. wurden CB₁-Rezeptoren in myenterischen und submukösen Plexi des enterischen Nervensystems im Ileum und Colon von Schweinen nachgewiesen {Kulkarni-Narla A 2000}.

In einer im August 2005 veröffentlichten Arbeit aus Bath, England wurde humanes Colongewebe auf das Vorkommen von Cannabinoide-Rezeptoren untersucht. CB₁-Rezeptoren fanden sich im Colonepithel, in glatten Muskelzellen, und im myenterischen Plexus. CB₂-Rezeptoren ließen sich nur in Makrophagen in Plasmazellen der Lamina propria nachweisen {Wright K 2005}.

Neben den beiden bekannten Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen, CB₁-R und CB₂-R, wurde in Milzzellen ein bisher unbekannter Rezeptor-Subtyp, der mit Cannabinoiden

eine Bindung einging, entdeckt. Heute geht man davon aus, dass noch weitere Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen existieren (Literaturquelle: www.erowid.org).

Man unterscheidet exogene und endogene Liganden an den Cannabinoid-Rezeptoren.

Beispiele für exogene Cannabinoid-Rezeptor-Liganden:

Δ^9 -Tetra-Hydrocannabinol (Δ^9 -THC); WIN 55,212-2; HU 211 und CP 55,940;

Beispiele für endogene Cannabinoid-Rezeptor-Liganden:

Anandamid, Methanandamid und 2-Arachidonylglycerol (2-AG);

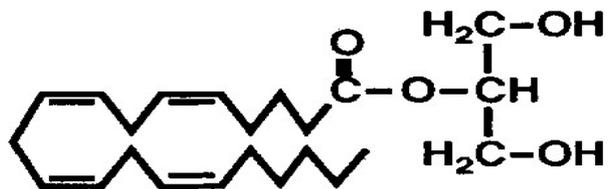


Abbildung 6: Darstellung der chemischen Struktur von 2-Arachidonylglycerol (2-AG)
(Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}).

4.1.2.4 Anandamid

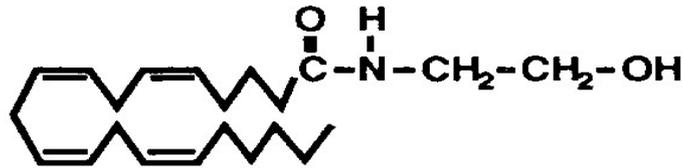


Abbildung 7: Darstellung der chemischen Struktur von Anandamid (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}).

Anandamid steht für N-Arachidonoyl-Ethanolamid (=AEA), ein Amid einer vierfach ungesättigten Fettsäure. Es wirkt als Agonist an CB₁- und CB₂-Rezeptor, wie auch am Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) {Helyes Z 2003}{Ahluwalia J 2003}.

4.1.2.4.1 Hintergrund

Anandamid war die erste im Jahre 1992 entdeckte Substanz der endogenen Cannabinoide (=Endocannabinoide). Der Name wurde dem Sanskrit entnommen und bedeutet "Glückseligkeit". Das Sanskrit ist eine Sammlung von religiösen, heilpflanzlichen und medizinischen Schriften des Hinduismus, die sich unter anderem mit den Heilwirkungen der Hanfpflanze beschäftigt {O'Shaugnessy WB 1839}.

4.1.2.4.2 Wirkungen

Anandamid weist eine ca. 4 bis 20 mal schwächere Wirkung als Δ^9 -THC auf. Es hat eine kürzere Wirkdauer als Δ^9 -THC, da es schneller durch körpereigene Enzyme abgebaut wird. Nach intravenöser Gabe von Anandamid sind alle Wirkungen nach ca. 30 Minuten vollständig abgeklungen, dagegen dauern diese bei THC mehrere Stunden an.

Die Wirkungen des Ethanolamids sind mit denen von Δ^9 -THC weitgehend identisch (Literaturquelle: www.erowid.org).

Es nimmt eine Sonderrolle unter den Endocannabinoiden ein, da es sowohl an beide Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen, wie auch an den Vanilloid-Rezeptor 1 bindet

{Jerman JC, Gray J, et al. 2002}. Um die rezeptorvermittelte Wirkung der Endocannabinoide zu untersuchen, verwendeten wir in unseren Versuchen neben WIN 55,212-2 vor allem Anandamid als Agonist an den Cannabinoid-Rezeptoren. Auch ist diese Substanz wegen seiner Vanilloid-Rezeptor 1-Aktivierung expositioniert.

Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit sind die bis heute bekannten Effekte der Endocannabinoide auf den Gastrointestinaltrakt.

Viele Arbeiten beschrieben eine hemmende Wirkung der Endocannabinoide auf die Magen-Darmpassage {Izzo AA 2001}{Izzo AA, Fezza F, Capasso R et al. 2001}. 1997 beschrieben Calignano et al. eine signifikante Verzögerung der intestinale Nahrungspassage bei Mäusen nach Anandamidgabe. Dieser Effekt wurde durch CB₁-Rezeptor-Blockade aufgehoben. Die Arbeitsgruppe geht von einem CB₁-Rezeptor-modulierten Effekt der Endocannabinoide auf die Magen-Darm-Passage aus {Calignano A 1997}.

Die Arbeitsgruppe um Pinto zeigte 2002, dass die Zugabe des Ethanolamids die Peristaltik im Ileum von Meerschweinchen durch eine Inhibition der Freisetzung von exzitatorischen Transmittern unterbinden konnte {Pinto L 2002}.

Pertwee et al. beschrieben 2001, dass Anandamid über eine CB₁-Rezeptor-Aktivierung die Freisetzung von Acetylcholin inhibierte und somit die Kontraktion longitudinaler und zirkulärer glatter Muskelzellen unterband {Pertwee RG 2001}. Anandamid hemmt neben der gastrointestinalen Motilität auch die intestinale Sekretion und Magensäureproduktion. Beide Effekte waren CB₁-Rezeptor vermittelt {Izzo AA 2001}.

Zusammenfassend beschreiben diese Arbeiten, dass eine Aktivierung des CB₁-Rezeptors zu einer Hemmung der gastrointestinalen Motilität, der intestinalen Sekretion und Magensäureproduktion führt.

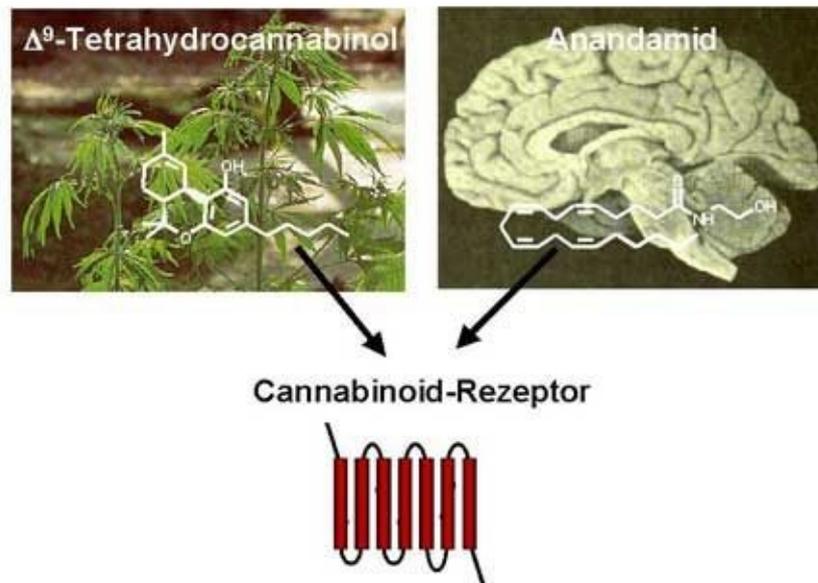
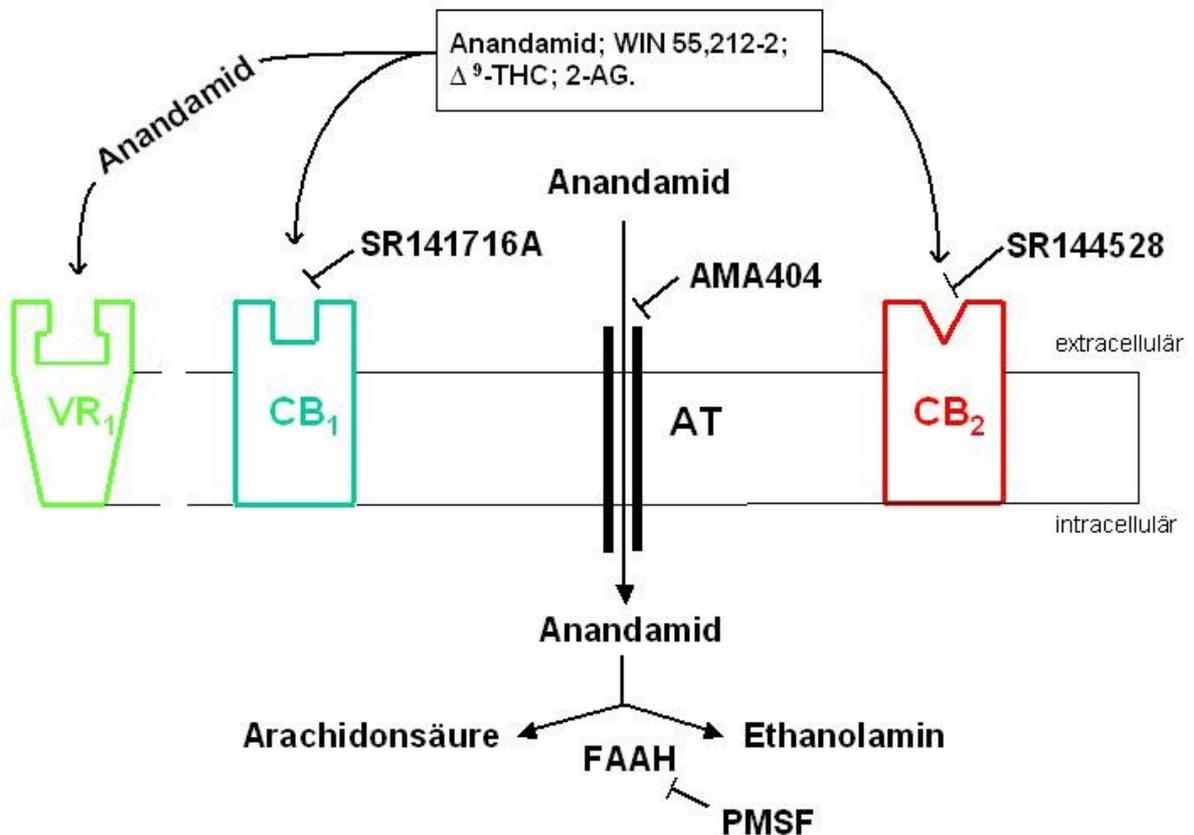


Abbildung 8: Δ^9 -THC und Anandamid vermitteln ihre Wirkungen über Cannabinoid-Rezeptoren. Beide Substanzen weisen unterschiedliche chemische Strukturen auf. Bei den Cannabinoiden, wie das Δ^9 -THC, handelt es sich um ein pflanzisches Extrakt. Bei den endogenen Cannabinoiden (=Endocannabinoiden) um körpereigene Substanzen. Im linken oberen Bild wird die chemische Struktur von Δ^9 -THC dargestellt, im rechten oberen Bild ist die chemische Struktur von Anandamid zu sehen (Abbildungsquelle: {Marsicano G 2002}).



Graphik 16: Die cannabinoiden Substanzen 2-AG, Anandamid, WIN 55,212-2, und das Δ^9 -THC, vermitteln ihre Wirkungen über eine Aktivierung der beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen (CB₁ und CB₂). Anandamid führt zusätzlich zu einer Aktivierung des Vanilloid-Rezeptors 1 (VR₁). SR141716A inhibiert spezifisch den CB₁-Rezeptor. Bei SR144528 handelt es sich um einen spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten. Anandamid wird durch den Anandamid-Transporter in das Zellinnere befördert. Dieser Transporter kann durch AM404 spezifisch gehemmt werden. Die Fatty Acid Amid Hydrolase (= FAAH) baut Anandamid ab, indem es die Substanz in die beiden Bestandteile Arachidonsäure und Ethanolamin spaltet. Dieses Enzym kann durch PMSF inhibiert werden.

4.1.2.4.3 Anandamid als Vanilloid-Rezeptor 1-Agonist

Vanilloide sind Stoffe die an sensorischen Neuronen zwei Arten von Wirkungen hervorrufen. Sie führen einerseits zu einer Aktivierung exzitatorischer Prozesse und sind andererseits Bestandteil bei der Vermittlung von Schmerz- und Entzündungs-Reaktionen {Di Marzo V 2002}. Sie vermitteln ihre Wirkungen über einen Rezeptor, den Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1) {Szallasi A 2001}{Caterina MJ 2000}. Anandamid wirkt auch als VR1-Agonist {Malinowska B 2001}{Zygmunt PM 1999}{Smart D 2000}. Die Arbeitsgruppe um Smart zeigte erstmals, dass Anandamid und Capsaicin beide als Agonisten am VR1 gleiche Wirkungen auslösen {Smart D 2000}.

4.1.2.4.3.1 Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1)

Der Vanilloid-Rezeptor 1 ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal. Capsaicin und sein Analogon Arvanil, N-Arachidonoyl-Vanillin-Amin, sind beide Agonisten an diesem Rezeptor {Szallasi A 2001}{Di Marzo V 2001}. VR1 finden sich vor allem auf C- und A γ -Nervenfasern, die zum Rückenmark führen, wie auch in zuführenden Fasern des Ganglion trigeminale, auch Ganglion Gasseri genannt {Szallasi A 1999}.

Für unsere Arbeit war von Bedeutung, dass dieser Rezeptor immunhistochemisch auch in myenterischen Neuronen des enterischen Nervensystems nachgewiesen wurde {Kulkarni-Narla A 2001}. Wir untersuchten daraufhin auch mögliche VR1 vermittelte Effekte der Endocannabinoide auf die Motilität im Gastrointestinaltrakt.

4.1.2.4.3.2 Capsaicin

Das Capsaicin ist eine Alkaloid, die sich von der Stoffgruppe der Capsaicinoide ableitet. Capsaicinoide verleihen den roten Chili-Pfeffer-Schoten ihren scharfen Geschmack. Der Hauptinhaltsstoff dieser Gruppe, das Capsaicin, wurde 1964 von den beiden japanischen Chemikern Kosuge S. und Inagaki Y. entdeckt. Es ist ein sehr beständiges Alkaloid, durch Kälte oder Hitze in seiner Wirkung kaum beeinflussbar, ist eine geschmacklose, farblose und geruchslose Substanz und lässt sich schwerlich in Wasser, dagegen sehr gut in Alkohol, Fetten und Ölen auflösen {Walpole CS 1994}.

Seine Anwesenheit führt zu einer Zunahme der Magensäuresekretion.

In einer Arbeit aus Japan von Minowa et al. zeigte sich, dass eine Aktivierung des VR1 im Magen von Ratten sowohl durch Gabe des Agonisten Capsaicin, wie auch durch Anandamidgabe eine vermehrte Magensäureproduktion hervorrief {Minowa S 2005}.

Eine weitere Effekt des Alkaloids ist die Steigerung der Magen-Darm-Passage. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Capsaicin zu einer Änderung der gastrointestinalen Motilität führt, indem es den oesophago-gastro-duodenalen Transit beschleunigt {Gonzalez R 1998}. Dieser prokinetische Effekt war für die hier vorliegende Arbeit von großer Bedeutung.

4.1.2.4.3.3 Capsazepine

Capsazepine, ein synthetisches Capsaicin-Analogon, ist ein spezifischer VR1-Antagonist. Es wurde 1994 von Walpole et al. als erster kompetitiver Antagonist am VR1 entdeckt und beschrieben {Walpole CS 1994}. Schnell konnten auf der Grundlage dieser Substanz neue Antagonisten am VR1 isoliert werden.

Heute ist Capsazepine vor allem durch seine inhibitorische Komponente am VR1 bedeutsam.

Durch spezifische VR1-Blockade mittels Capsazepine wurde ein hemmender Effekt auf den Transit im Magen-Darm-Trakt beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Nocerino veröffentlichte 2002 eine Arbeit, in der durch die Gabe von Capsazepine der Transit im oberen gastrointestinalen Trakt bei Ratten signifikant verringert werden konnte und postulierte, dass dieser Vanilloid-Rezeptor 1-Antagonist einen direkten hemmenden Einfluss auf die glatten intestinalen Muskelzellen bei Ratten hätte {Nocerino E 2002}. Diese Daten weckten unser Interesse zur weiteren Abklärung eines möglichen Effektes des VR1-Antagonisten, Capsazepine, auf die gastrointestinale Motilität.

4.1.2.5 WIN 55,212-2

Bei WIN 55,212-2 handelt es sich um ein synthetisches Cannabinoid. Es wirkt als Antagonist an beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen {Shen M 1998}.

WIN 55,212-2 ruft ähnliche Wirkungen wie Anandamid hervor. Dies lässt sich vor allem durch die Affinität der Substanzen zu beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen erklären. Eine VR1-Wirkung ist bei der synthetischen Substanz aber nicht bekannt. Der synthetische CB1- und CB2-Rezeptor-Agonist führt, wie Anandamid, zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Kontraktion glatter Muskelzellen {Pertwee RG 2001}{Storr M 2002}. Shen und Thayer beschrieben, dass diese Substanz, wie auch Anandamid, den Calciumeinstrom bei P/Q-Calcium-Kanälen inhibierte {Shen M 1998}. Chien et al. konnten nachweisen, dass sich durch die Gabe von WIN 55,212-2 der Augeninnendruck in Versuchen mit Primaten, denen Laser-induzierte Glaukome induziert wurden, deutlich senken liess. Dieser Effekt war Cannabinoid-Rezeptor 1-Subtyp vermittelt {Chien FY, Wang RF, et al. 2003}. Diese Arbeiten sind nur ein kleiner Auszug an heute publizierten Daten, sie sollen auch die identischen Wirkungen beider cannabinoiden Substanzen als Agonisten an beiden Rezeptor-Subtypen aufzeigen.

WIN 55,212-2 diente in der hier vorliegenden Arbeit vor allem der Prüfung, ob sich mögliche Endocannabinoid-Effekte, auch Anandamid-unabhängig erzielen lassen.

4.1.2.6 Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB₁-Rezeptor)

CB₁-Rezeptoren konnten in cholinerg sensiblen Neuronen, in interneuronalen und in Motoneuronen des myenterischen Plexus verschiedener Tierarten, wie der Maus, der Ratte, dem Meerschweinchen und beim Menschen, nachgewiesen werden {Kulkarni-Narla A 2001}{Kulkarni-Narla A 2000}{Coutts AA 2002}.

Humane und CB₁-Rezeptoren der Ratte gleichen sich zu 97.3% in der Struktur ihrer Aminosäuren, zu 100% in der Peptidsequenz. Das Molekulargewicht des Rezeptors beträgt in etwa 52.800 {Matsuda LA 1990}.

Eine Aktivierung des Rezeptors hat eine Veränderung der Regulierung der Adenylatcyclase, der Mitogen-aktivierten-Protein (=MAP)-Kinase, wie auch von Ionen-Kanälen zur Folge {Bouaboula M 1995}{Felder CC 1998}{Glass M 1997}. Sie führt {Glass M 1997} zur Hemmung der Adenylatcyclase {Mukhopadhyay S 2001}, zur Reduktion von zyklischem AMP (=cAMP), weiter zur Inhibierung des

Calciumeinstroms in N- und Q-Typ-Calcium-Kanäle {Mackie & Hille 1992}. Die Aktivität der MAP-Kinase wird dagegen gesteigert {Bouaboula M 1995}. Diese Kinase ist ein wichtiges Enzym der Signaltransduktion und Regulierung intracellulärer Vorgänge im Organismus {Pearson G 2001}.

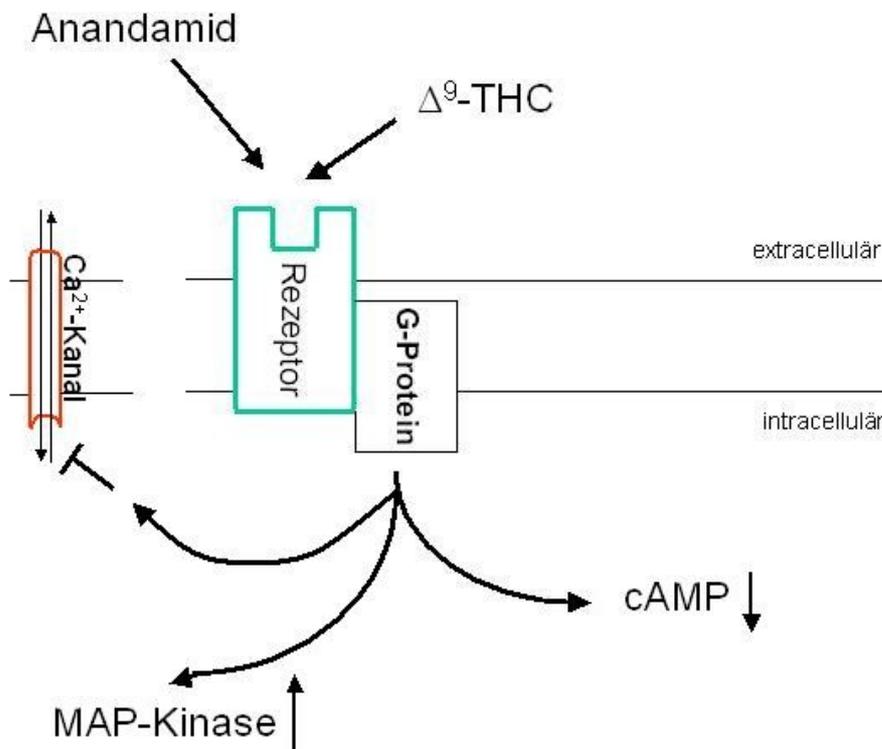


Abbildung 9: Darstellung der Signaltransduktion nach Aktivierung des CB_1 -Rezeptors. Eine Aktivierung des G-Protein gekoppelten Cannabinoid-Rezeptors (in der Abbildung als Rezeptor bezeichnet) führt zur Hemmung der Adenylatcyclase, zur Reduktion von zyklischem AMP (cAMP) und Blockierung spannungsabhängiger Calciumkanäle (in der Abbildung als Ca^{2+} -Kanal dargestellt), dagegen bewirkt es eine Aktivitätszunahme der MAP-Kinase.

Eine Vielzahl von Arbeiten haben sich mit den Effekten und Wirkungen dieses Rezeptors befasst.

Über CB_1 -Rezeptoren erfolgt eine Inhibition elektrisch ausgelöster Potentiale durch Unterdrückung der Noradrenalin- und ATP-Freisetzung {Pertwee RG 2002}. Die Aktivierung dieses Rezeptore-Subtyps inhibiert via einer G-Protein gekoppelten Signalkaskade die Adenylatcyclase und P/Q-Typ-Calcium-Kanäle {Matsuda LA 1990}. Storr, Sibaeve et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung des CB_1 -Rezeptors

im Mäusecolon, sowohl modulierend auf die exzitatorische, wie auch auf die inhibitorische Neurotransmission wirkt {Storr M 2004}. Pertwee beschrieb, dass eine Aktivierung dieses Cannabinoid-Rezeptors zu einer Reduktion der Magensäureproduktion bei Nagetieren, wie auch beim Menschen führte {Pertwee RG 2001}.

Hornby und Prouty zeigten, dass eine Relaxierung des unteren ösophagealen Sphinkters CB₁-Rezeptor vermittelt war. Weiter fand sich in dieser Arbeit eine Reduktion des Transits im proximalen Magenanteil, eine verminderte Magensäureproduktion und einen Rückgang der propulsiven Aktivität im gesamten Gastrointestinaltrakt {Hornby PJ 2004}.

Auch bei Entzündungsprozessen im Magen-Darm-Trakt scheint dieser Cannabinoid-Rezeptor-Subtyp von Bedeutung zu sein. In einer Arbeit von Izzo et al. wurde gezeigt, dass sich bei induzierten Entzündungsprozessen im Dünndarm von Mäusen eine vermehrte Expression von CB₁-Rezeptoren nachweisen ließ. Weiter nahm die Motilität in diesem Darmabschnitt ab. Es ergab sich eine erhöhte Konzentration von Anandamid und 2-Arachidonylglycerol im entzündlichen Gewebeanteil. Die Arbeitsgruppe um Izzo postulierte, dass eine vermehrte Expression dieses Rezeptor-Subtyps und eine erhöhte Konzentration an Endocannabinoiden die Ursache für eine verminderte Motilität bei Entzündungsprozessen im Magen-Darm-Trakt sein könnte {Izzo AA, Fezza F, Capasso R et al. 2001}.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2004 von MacNaughton, Sharkey et al. wurde die Modulation des Ionentransports im Ileum von Meerschweinchen nach Aktivierung oder Inhibierung des CB₁-Rezeptors untersucht.

In der Submucosa fanden sich VIP- und CB₁-Rezeptoren kolokalisiert in sekretomotorischen Neuronen, wie auch in NANC-Neuronen. Mittels der Antwort auf elektrische Feldstimulationen (EFS) wurde der Effekt von WIN 55,212-2, durch SR 141716A, den selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten und die Sensibilisierung des VIP-Rezeptors beurteilt. WIN 55,212-2 führte zu einer Inhibition der EFS, welche nach SR 141716A-Gabe zunahm. Die Aktivierung des VIP-Rezeptors hatte dagegen keinen Einfluss auf die EFS {MacNaughton WK 2004}.

Wie eine große Anzahl an bis heute publizierten Daten verdeutlicht ist der CB₁-Rezeptor an Prozessen, Modulationen, Vermittlungen und Signalkaskaden in verschiedenen Organismen beteiligt. Seine Aktivierung nimmt auf zellulärer Ebene eine zentrale Rolle richtungsweisender Vorgänge ein.

4.1.2.6.1 CB₁-Rezeptor-Antagonisten

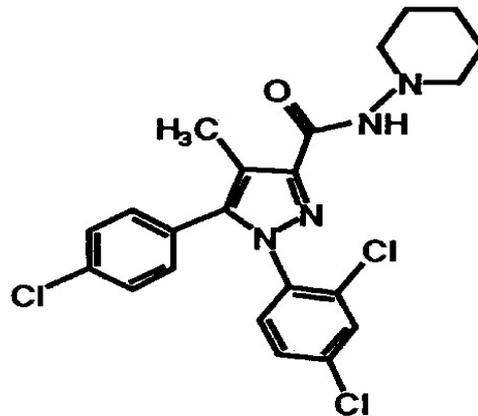


Abbildung 10: Darstellung der chemischen Struktur von SR141716A, ein spezifischer CB₁-Rezeptor-Antagonist (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}).

Um spezifische Antagonisten am CB₁-Rezeptor handelt es sich bei SR141716A (= N-Piperidin-1-yl-5-(4-Chlorophenyl)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-4-Methyl-1H-Pyrazole-3-Carboxamidehydrochlorid), auch als Rimonabant bekannt {Le Foll B 2005}.

LY320135 ist ein weiterer spezifischer CB₁-Rezeptor-Antagonist {Pertwee RG 2001}.

4.1.2.7 Cannabinoid-Rezeptor 2 (CB₂-Rezeptor)

CB₂-Rezeptoren lassen sich hauptsächlich in immunkompetenten Zellen nachweisen. Entdeckt wurde dieser Rezeptor-Subtyp auf Immunzellen der Milz. Dieser Cannabinoid-Rezeptor weist eine nur 44%-ige Übereinstimmung in der Struktur mit dem CB₁-Rezeptor auf. Am CB₂-Rezeptor kennt man heute eine viele spezifische Agonisten, wie L759633, L759656, JWH-133, HU-308 {Pertwee RG 2001}, AM 1241 {Nackley AG 2003} und Palmitylethanolamid (PEA), eine weitere Substanz der Endocannabinoide {Helyes Z 2003}. PEA fand sich neben 2-AG und Anandamid in Gewebeanteilen des menschlichen Auges, wie der Bindehaut, der Iris, dem Ziliar-Körper und der Netzhaut {Chen J 2005}.

Bekannt ist, dass eine Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps zu einer Hemmung der Sekretion von Neurotransmittern führt {Nackley AG 2003}.

4.1.2.7.1 CB₂-Rezeptor-Antagonisten

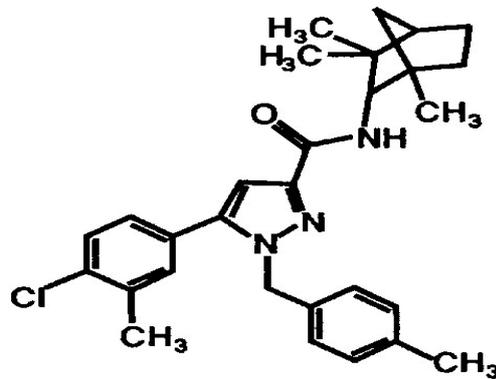


Abbildung 11: Darstellung der chemischen Struktur von SR144528, einem spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}).

SR 144528 ist der erste entdeckte, hoch potente und selektive Antagonist am CB₂-Rezeptor {Rinaldi-Carmona M 1998}{Vigna Steven R 2003}.

Bei AM 630 (= 6-iodo-pravadoline) handelt es sich um einen weiteren CB₂-Rezeptor-Antagonisten {Storr M 2002}.

4.1.2.8 Anandamid-Transporter (AT)

Der Anandamid-Transporter befördert Anandamid durch die Zellmembran von extrazellulär in die Zelle. AM 404 (= *N*-4-Hydroxyphenyl –Arachidonamid) ist ein spezifischer Inhibitor dieses Transporters {Calignano A 1997}{Pertwee RG 2001}{Piomelli D 1999}{Beltramo M 1997}. VDM11 ist ein weiterer selektiver Inhibitor des Anandamid-Zell-Uptakes {Mascolo N 2002}.

4.1.2.9 FAAH (fatty acid amide hydrolase)

Bei der FAAH handelt es sich um eine Hydrolase, die Anandamid intrazellulär abbaut {Cravatt BF 2003}{Muthian, Nithipatikom, et al. 2000}. Dieses Enzym spaltet Anandamid in Arachidonsäure und Ethanolamin {Di Marzo V 2002}. Man findet das Enzym in Microsomen von neuronalen und nicht neuronalen Zellen {Pertwee RG 2001}. Heute weiss man, dass es auch an der Synthese von Anandamid aus seinen Spaltprodukten beteiligt ist {Ueda N 1995}. Anandamid wird nicht wie andere Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert, sondern erst bei Bedarf aus Ethanolamin und der Arachidonsäure gebildet und in den synaptischen Spalt freigesetzt.

PMSF (= Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) ist ein synthetischer Serin-Protease-Inhibitor und hemmt die Hydrolase hochpotent {Capasso R 2001}{Pertwee RG 1995}.

4.1.3 Einflüsse der Endocannabinoiden auf den Gastrointestinaltrakt

Viele Arbeiten, welche die pharmakologische Modulation des endogenen Cannabinoid-Systems untersucht haben, zeigen die mögliche Bedeutung der Endocannabinoiden, bei einer großen Zahl gastrointestinalen Krankheitsbildern und -symptomen, wie Übelkeit und Erbrechen, Ulcuserkrankung {Adami M 2002}, Reizdarmsyndrom, Mb. Crohn, sekretorische Diarrhö, paralytischer Ileus und gastrooesophagealer Reflux, auf {Di Carlo G 2003}. Die Einflüsse der Endocannabinoiden auf den GIT erstrecken sich von der Motilität {Capasso R 2001}, über neoplastische Erkrankungen {Ligresti A 2003}, Entzündungsprozesse {Massa F 2004} bis hin zu Effekten auf die Nahrungsaufnahme und den Fettstoffwechsel des Organismus {Horvath TL 2003}{DI MARZO V 2001}.

4.1.4 Einflüsse der Endocannabinoiden auf die Motilität im Magen-Darm-Trakt

Endocannabinoiden spielen eine wichtige Rolle in der physiologischen Kontrolle der Motilität im Magen-Darm-Trakt. Sie wirken vor allem hemmend auf den gastrointestinalen Transit {Storr M 2002}{Pertwee RG 2001}{Mascolo N 2002}. Wie bereits beschrieben vermitteln cannabinoiden Substanzen diese Wirkung durch Aktivierung des CB₁-Rezeptors, indem sie eine Relaxation glatter Muskelzellen im GIT herbeiführen. Dies geschieht durch eine Hemmung der Durchlässigkeit von Calciumkanälen und durch Inhibierung der Adenylatcyclase {Mackie & Hille 1992}.

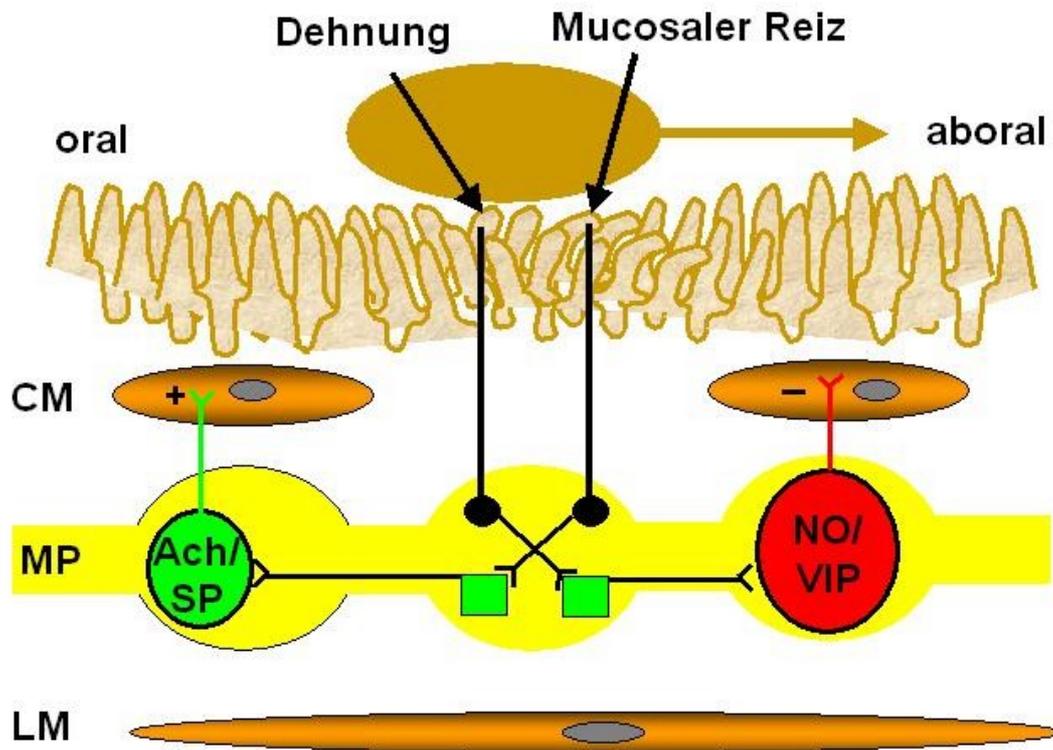
Um die Effekte der Endocannabinoiden auf die gastrointestinale Motilität besser verstehen zu können, muss erst auf das Motilitätsphänomen, die strukturellen Komponenten und das enterische Nervensystem und dessen Transmittersubstanzen eingegangen werden.

4.1.4.1 Motilitätsphänomene im Gastrointestinaltrakt

Der Begriff Motilität beinhaltet sowohl die Kontraktion als auch die Erschlaffung von Muskelzellen. An vielen Stellen im Gastrointestinaltrakt, vor allem im Dünndarm, gibt es zwei unterschiedliche Typen der Kontraktion: Segmentationsbewegungen und peristaltische Wellen, Segmentationsbewegungen, auch stehende Wellen genannt, dienen den Darminhalt zu durchmischen und analwärts zu befördern. Es wechseln sich in der Ringmuskulatur die Kontraktion mit der Erschlaffung ab. Eine geordnete Folge von Kontraktionswellen wird als Peristaltik bezeichnet. Jeder Kontraktionswelle geht eine Erschlaffungswelle voraus, diese geordnete Folge von Erschlaffung und Kontraktion wird als peristaltischer Reflex bezeichnet {Silbernagel S 1994}.

4.1.4.1.1 Der peristaltische Reflex

Die Erregung afferenter Neurone durch chemische oder mechanische (= Dehnung) Reize im Magen-Darm-Trakt ausgelöst, führt entweder über ein erregendes Neuron zu einer Kontraktion, oder über ein hemmendes Neuron zu einer Erschlaffung. Der peristaltische Reflex enthält mehrere dieser Komponenten an Kontraktionen und Erschlaffungen. Diese sind so aufeinander abgestimmt, dass eine gerichtete Bewegung des Darminhalts zustande kommt {Silbernagel S 1994}.



Graphik 17: Hier wird die Übersetzung von mechanischen und chemischen Reizen durch Neurotransmitter in Kontraktion oder Dilatation glatter Muskelzellen dargestellt. (CM = Zirkuläre Muskulatur, LM = Longitudinale Muskulatur, MP = myenterischer Plexus, + = Kontraktionsauslösung, - = Relaxation der Muskulatur, NO = Stickstoffmonoxid, Ach = Acetylcholin, VIP = vasoaktives intestinales Peptid, SP = Substanz P); (Abbildungsquelle: {Kurjak M 2000}).

4.1.4.2 Strukturelle Komponenten

Die Muskulatur des Magen-Darm-Trakts ist in drei Schichten glatter Muskelzellen gegliedert. Außen findet sich die Längsmuskelschicht, der sich eine Ringmuskelschicht und eine Lamina muscularis mucosae anschliesst. Weiter im Inneren folgt die Submucosa und Mucosa. Die glatte Muskulatur des Darmes setzt sich aus spindelförmigen Zellen die sich in Bündeln formieren zusammen. Zwischen den Bündleinheiten bestehen Querverbindungen. Innerhalb eines Bündels sind die Zellen sowohl mechanisch als auch elektrisch miteinander verknüpft. Aktionspotentiale breiten sich so, im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur, auf das ganze Muskelbündel aus {Silbernagel S 1994}.

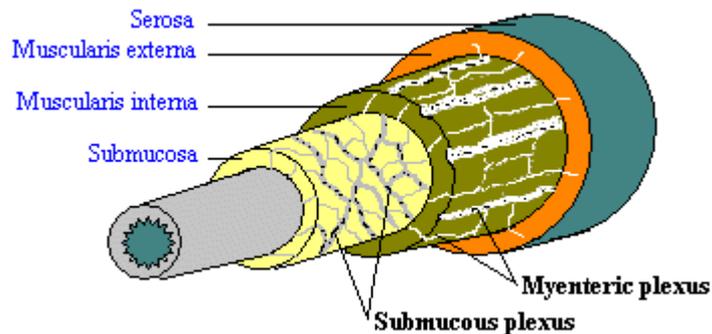


Abbildung 12: Darstellung der einzelnen Wandschichten sowie der Lokalisation der beiden Plexus (Abbildungsquelle: {Goyal FK 1996}).

4.1.4.3 Enterisches Nervensystem (ENS)

Das autonome Nervensystem wird in drei Gruppen unterteilt {Langley JN 1921}. Erstens das enterische, zweitens das sympathische und drittens das parasympathische Nervensystem. Das enterische Nervensystem ist in der Lage ohne zentrale Einflüsse komplexe Handlungen durchzuführen. In diesem System finden sich eine Vielzahl an Transmittersystemen und Neurotransmitter mit mannigfaltigen Interaktionen {Kurjak M 1994}.

Im ENS unterscheidet man zwei Plexus, den Plexus myentericus (= Auerbach) und den Plexus submucosus (= Meissner).

Der Auerbach Plexus, von Leopold Auerbach 1863 beschrieben, liegt zwischen der Längs- und Ringmuskulatur und kommt im ganzen Gastrointestinaltrakt (GIT) vor. Der Meissner Plexus, 1853 von Georg Meissner beschrieben, befindet sich in der Submucosa. Beide Plexus sind miteinander vernetzt und senden direkte Impulse zur glatten Muskulatur und zu Arteriolen im GIT. Epithelzellen dagegen werden nur vom Plexus submucosus innerviert {Silbernagel S 1994}.

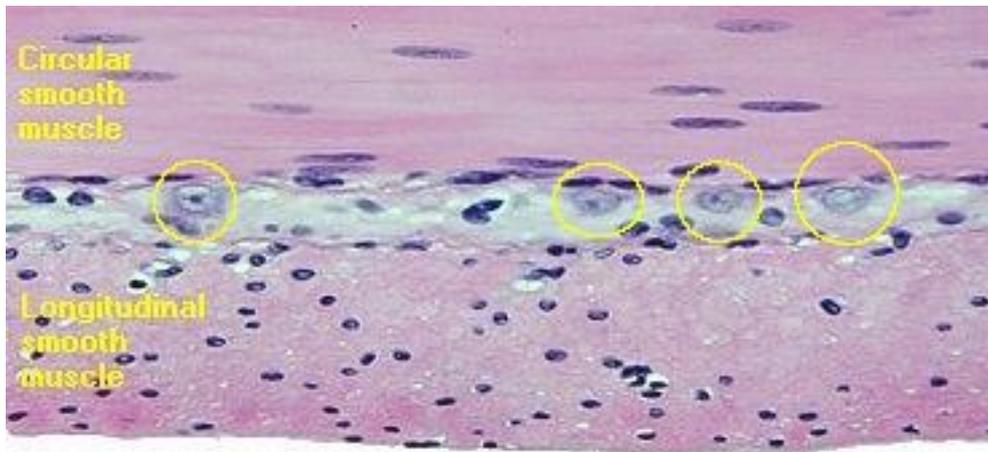


Abbildung 13: Abbildung eines histologischen Querschnitts der beiden glatten Muskelschichten im GIT. Zwischen der longitudinalen und zirkulären glatten Muskelschicht befinden sich gelb eingekreist die Neurone des Auerbach-Plexus (Abbildungsquelle: {Goyal FK 1996}).

Eine detaillierte Untersuchung der neuronalen Elemente ist auf verschiedene Weise denkbar. Unsere Arbeitsgruppe hat das Modell der Synaptosomen etabliert und validiert. Ein Vorteil dieser Methodik ist die Möglichkeit, zelluläre Mechanismen direkt untersuchen zu können.

4.1.4.3.1 Synaptosomen

Synaptosomen wurden 1958 erstmals von Whittaker isoliert und beschrieben. An ursprünglich verwendeten subzellulären Fraktionen des ZNS fanden sich elektromikroskopisch strukturelle Elemente einer Synapse. Nach Homogenisierung orientieren sich abgetrennte Nervenendigungen zu abgeschlossenen Vesikeln, die als Synaptosomen bezeichnet wurden {Whittaker VP 1993}. Sie sind in der Lage Glucose zu oxidieren, nach Stimulierung Ca^{2+} -abhängige Transmitter frei zu setzen und einen transmembranalen Ionengradienten aufrecht zu halten {Briggs CA 1981}. Mit Hilfe der Synaptosomen ist es möglich, intra- und subzelluläre Mechanismen der Neurotransmitterfreisetzung des enterischen Nervensystems ohne störende Einflüsse zu untersuchen {Kurjak M 1994}. Dazu werden in der Regel ungereinigte synaptosomale Fraktionen verwendet, die durch Homogenisierung und mehrere Zentrifugationsschritte gewonnen werden, auch P2-Fraktionen genannt.

	Synaptosomen	Plasmalemma
NOS-Aktivität	4.4	1.4
Saxitoxin-Anteil	8.2	3.0
VIP-IR	7.1	0.0
BLI-IR	4.0	1.2
Mg-ATPase	0.5	3.5



Graphik 18: Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines synaptosomalen Vesikels, in der Grösse von etwa 1 µm. Die Tabelle beschreibt die unterschiedlichen Anteile von VIP, Saxitoxin, Bombesin (BLI), der ATPase in Synaptosomen und Plasmalemma. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der NO-Synthase-Aktivität zwischen Plasmalemma und Synaptosomen (NOS-Aktivität in fmol/mg/min; Saxitoxin fmol/mg, VIP, BLI pg/mg, Mg-ATPase in µmol/h x mg); (Graphikquelle: {Kurjak M 2000}).

4.1.4.3.2 Drei Klassen von Neuronen im Magen-Darm-Trakt

Histochemisch unterscheidet man drei Klassen von Neuronen im GIT. Sie unterscheiden sich durch ihre Transmittersubstanzen:

Klasse 1: cholinerge Neurone

Klasse 2: adrenerge Neurone

Klasse 3: NANC (= nicht adrenerg und nicht cholinerg)-Neurone

Zu den cholinergen Neuronen zählt man vor allem die peripheren, parasympathischen, wie auch die meisten Plexusneurone der Darmmuskulatur. Adrenerge Neurone dagegen sind fast ausschließlich sympathischen Ursprungs, sie verlaufen von prävertebralen Ganglien in Richtung Plexus, zu Blutgefäßen und direkt zu glatten Muskelzellen. NANC-Neurone finden sich in allen Plexus gleichmässig verteilt. Ein Teil der NANC-Neurone wirkt erregend, der andere hemmend.

4.1.4.3.3 Erregende Neurotransmitter innerhalb des enterischen Nervensystems (ENS)

Erregende Nervenfasern des ENS enthalten die Neurotransmitter ACh, die Tachykinine, Substanz P und Substanz K, wie auch die Opioid-Peptide Dynorphin und Enkephalin {Johnson 1997}{Sternini 1988}.

Auch ist heute bekannt, dass das Peptidhormon und Neurotransmitter Ghrelin exzitatorische Effekte am Gastrointestinaltrakt ausübt {Asakawa A 2001}{Trudel L 2002}.

4.1.4.3.1.1 Ghrelin

Das azyklische Peptidhormon und Neurotransmitter Ghrelin wurde bei seiner Entdeckung als ein, die Freisetzung des Wachstumshormons, 'growth hormone (= GH)', im Hypophysenvorderlappen stimulierendes, Hormon beschrieben. Es setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen {Caminos JE 2003}. Gebildet wird es von endokrinen gastropankreatischen Zellen, von Zellen im Hypothalamus und der Hypophyse {Volante M 2003}.

Es fanden sich Rezeptoren, in der Hypophyse, im Hypothalamus, im Herzmuskel und in Fettzellen, bei deren Agonisierung es zu einer Sekretion des Wachstumshormons, 'growth hormone', kam. Man nannte diese Rezeptoren 'growth hormone secretagogue receptor' (GHS-R). 1999 wurde Ghrelin als natürlicher Agonist am GHS-R beschrieben. Heute ist dieser Rezeptortyp auch als Ghrelin-Rezeptor bekannt {Caminos JE 2003}.

Ghrelin weist eine Vielzahl von Wirkungen auf. So bewirkt seine Anwesenheit eine Zunahme des Hungergefühls über seinen Einfluss auf die im Hypothalamus befindlichen 'Fress-Zentren'. In Versuchen konnte man nach einer Ghrelininjektion eine starke Zunahme des Hungergefühls bei Probanden feststellen {Goyal FK 1996}. Ein weiterer beschriebener Ghrelin-Effekt ist die Unterdrückung der Fettverwertung in Fettzellen. Kurz nach der Nahrungsaufnahme ist die Konzentration von Ghrelin im Blut am geringsten und steigt bis zur nächsten Mahlzeit wieder an. Nach einer fettreichen Mahlzeit sinkt der Ghrelinspiegel im Blut ab {Erdmann J 2003}. Bei Personen die an Anorexie nervosa erkrankten, fand sich ein im Vergleich zu Nichterkrankten erhöhter Ghrelinspiegel im Blut, der sich nach Gewichtszunahme wieder senkte {Monteleone P 2003}. Ein weiterer Effekt, welcher für diese Arbeit von Bedeutsamkeit ist, ist die Beschleunigung der Magenentleerung und des intestinalen Transits {Asakawa A 2001}. So wird Ghrelin auch als 'motilin-related-peptide (MTRLRP) = Motilin-ähnliches-Peptid' bezeichnet. In einer Arbeit von Trudel et al. fand sich nach Ghrelin-Zugabe eine beschleunigte Magenentleerung bei Ratten, wie auch eine Zunahme des Transits im Ileum, dagegen kein Effekt im Colon {Trudel L 2002}. In einer Veröffentlichung von Masuda et al. im Jahr 2000, wurde das Peptidhormon zu Gewebeproben aus dem Magen von Menschen und Ratten gegeben. Es zeigte sich in beiden Fällen eine Zunahme der Magensäuresekretion, wie auch der gastralen Motilität. Diese beiden letzten Arbeiten lassen auf eine mögliche Rolle von Ghrelin bei der Kontrolle gastrointestinaler Funktionen, auch bei der Motilität, schließen {Masuda Y 2000}.

4.1.4.3.4 Hemmende Neurotransmitter innerhalb des enterischen Nervensystems

VIP und NO sind Transmittersubstanzen hemmender NANC-Neurone. Ihre Anwesenheit führt eine Relaxation der glatten Muskulatur im Magen-Darm-Trakt herbei. Somatostatin, ein zyklisches Peptidhormon und Neurotransmitter, senkt ebenso den Tonus glatter Muskelzellen im Gastrointestinaltrakt.

4.1.4.3.4.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Die Verbindung NO ist ein sehr kurzlebiges freies Radikal. Es ist ein vielseitiges biologisches und ubiquitäres Signalmolekül.

Das Monoxid wurde zuerst am Gefäßsystem durch seine vasodilatorische Wirkung entdeckt und 1978 von Murad et al. erstmals als EDRF (=endothelium-derived relaxing factor) beschrieben. Es entsteht während der Oxidation von L-Arginine zu L-Citrullin durch die NO-Synthase (NOS). Von der NOS kennt man heute drei Isoformen. Eine neuronale nNOS {Saur D 2002}, eine endotheliale eNOS und eine induzierbare iNOS.

Das gasförmige Molekül kann durch sämtliche Membranen diffundieren. Nach seiner Freisetzung reagiert es sofort mit Sauerstoff, Kationen und organischen Verbindungen zu verschiedenen Metaboliten, die selbst wieder zu NO-Donatoren werden. Zur Gruppe der NO-Donatoren zählen organische Nitrate, SNAP und die medikamentösen Wirkstoffe Molsidomin und Nitroprussid {Burgis E 2001}.

Auch im Nervensystem von wirbellosen Tieren konnte NO und Elemente der NO-Signalkaskade nachgewiesen werden {Stefano GB, Esch T, Cadet P et al. 2003}{Stefano GB et Ottaviani E 2002}.

Im Gastrointestinaltrakt spielt das Monoxid eine bedeutende Rolle als sogenannter „atypischer“, NANC-Neurotransmitter inhibitorischer Neurone.

In gastrointestinalen glatten Muskelzellen löst es eine Relaxation aus, die durch eine Aktivierung des cGMP/cGK-Signaltransduktionssystems vermittelt wird {Gaisa MM. 2003}{Fritsch R 2002}{Fritsch R 2004}.

Seit kurzem weiss man, dass die Signalvermittlung der Endocannabinoide auch an die NOS gekoppelt ist. Der Cannabinoid-Rezeptor-Agonist, Anandamid, führte über die Aktivierung der NO-Synthase zu einer vermehrten Bildung von NO. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Rolle von NO und der endogenen Cannabinoid-Signaltransduktion bei der Vermittlung der Relaxation glatter Muskeln im GIT wäre denkbar {Stefano GB 2003}.

Auch zwischen VIP, einem weiteren inhibitorischen Neurotransmitter, und NO wurde in vielen Arbeiten eine Interaktion beschrieben. Das Stickstoffmonoxid induziert eine vermehrte Freisetzung des vasoaktiven intestinalen Polypeptids {Kurjak M 2001}.

Dieser Vorgang scheint über einen präsynaptischen Mechanismus vermittelt zu sein {Allescher HD 1996}.

4.1.4.3.4.2 Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)

Das vasoaktive intestinale Polypeptid setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen. Es wird in Neuronen gebildet und freigesetzt. In cholinergen Neuronen dient VIP als Co-Transmitter {Whittaker VP 1989}.

Heute kennt man zwei VIP-Rezeptoren (VIPR1 und 2), die G-Protein gekoppelt ihre Wirkungen vermitteln.

Die Wirkungen des Polypeptids liegen in der Hemmung der Magensaftsekretion und in der Inhibition der gastrointestinalen Motilität, durch Relaxation glatter Muskelzellen. Einige Tumore, die von pankreatischen und nervalen Gewebe ausgehen, zeigen eine exzessive Sekretion von VIP, diese Tumore werden als VIPome bezeichnet.

Es wurden auch hemmende Einflüsse auf Entzündungsprozesse und Autoimmunerkrankungen durch VIP beschrieben. Juarranz et al. beschrieben in einer Arbeit aus dem Jahr 2004, dass das Polypeptid die Chemokin-Produktion erheblich inhibiert. VIP greift modulierend in die Aktivität von T-Lymphozyten, einschließlich deren Beweglichkeit, die Zytokin-Bildung und -Freisetzung, wie in Apoptose-Vorgänge ein {Juarranz MG 2004}.

4.1.4.3.4.3 Somatostatin

Somatostatin (SOM, STH-inhibierendes Hormon = SIH) ist ein zyklisches Polypeptid, das sich aus 14 Aminosäuren zusammensetzt. Es kommt neben zentralen und enterischen Neuronen auch in D-Zellen im Magen-Darm-Trakt und Pankreas vor. Den Namen erhielt es aus seiner zuerst entdeckten Wirkung, der Inhibition der STH-Sekretion (=SIH). Es ist ein wichtiger Regulator vieler Sekretionsprozesse und wirkt vorrangig hemmend.

Das zyklische Peptid inhibiert z. B. die ACh-Freisetzung, die STH-, TSH- und ACTH-Freisetzung, die VIP-Sekretion und die Freisetzung von vielen weiteren Hormonen und Transmittern wie auch die Bildung von NO {Vergara P 1995}{Silbernagel S 1994}. Es reduziert die Rate der intestinalen Entleerung, hemmt die Kontraktion glatter Muskeln und verringert den Blutfluss. Somatostatin senkt den Basaltonus glatter Muskelzellen {Marzio L 2003}.

Heute kennt man 5 Subtypen sogenannter Somatostatin-Rezeptoren, die mit ss(1) bis ss(5) bezeichnet werden. An allen 5 Rezeptoren bindet Somatostatin mit hoher Affinität {De Herder WW 2003}.

Klinisch findet das zyklische Polypeptid Anwendung bei der Behandlung von Gigantismus, Akromegalie und bei einigen Neoplasien, wie z. B. beim Gastrinom {Silbernagel S 1994}.

4.1.4.4 Effekte der Endocannabinoide auf die gastrointestinale Motilität

Heute weiss man, dass das System der Endocannabinoide (mit seinen Cannabinoide-Rezeptoren und endogenen Liganden) eine wichtige Rolle bei der physiologischen Kontrolle der intestinalen Motilität spielt {Mascolo N 2002}. Eine Vielzahl von Studien zeigen, dass Endocannabinoide die Peristaltik, Motilität und die exzitatorische Transmitterfreisetzung im Gastrointestinaltrakt hemmen {Mascolo N 2002}{Pinto L, Di Carlo G et al. 2002}{Pinto L, Izzo AA, Bisogno T et al. 2002}. Die beiden Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten, Anandamid und WIN 55,212-2, reduzieren konzentrationsabhängig cholinerg-, wie auch NANC-vermittelte Kontraktionen glatter Muskelzellen. Elektrisch ausgelösete Kontraktionen glatter Muskelzellen werden durch Anandamid und WIN 55,212-2 signifikant antagonisiert {Storr M 2002}. Dieser hemmende Effekt der Endocannabinoide auf die intestinale Motilität scheint vor allem CB₁-Rezeptor vermittelt zu sein {Izzo AA 2001}{Izzo AA 1998}.

In einer Arbeit von Izzo et al. aus dem Jahr 1998 wurde der molekulare Mechanismus der Relaxation glatter Muskelzellen im Ileum von Meerschweinchen untersucht. Durch Aktivierung des CB₁-Rezeptors durch WIN55,212 und Anandamid konnten sowohl cholinerge und auch NANC-Kontraktionen unterbunden werden {Izzo AA 1998}.

Die Arbeitsgruppe um Mascolo untersuchte 2002 einen möglichen Einfluss der Endocannabinoide auf die Entstehung eines paralytischen Ileus bei Mäusen. In den Versuchen induzierte die Gabe von Acetylsäure das typischen Symptom der Hypomotilität (Ileus). Weiter fand sich ein signifikant erhöhte Konzentration von Anandamid und CB₁-Rezeptor-Expression im paralytischen Gewebe. Die spezifische Inhibition des Cannabinoid-Rezeptors 1, durch SR141716A, führte zu einem Rückgang der durch Acetylsäure ausgelösten Hypomotilität. Die Arbeitsgruppe schloss daraus, dass die Reduktion der Motilität, durch den Anstieg an Endocannabinoiden, vor allem durch Anandamid, erklärt werden könne {Mascolo N 2002}.

Eine ähnliche Arbeit von Izzo et al. beschäftigte sich 2001 mit dem Einfluss der Endocannabinoid auf die Modulation intestinaler Motilität in entzündlichem Gewebe. In durch Kroton-Öl induzierten entzündlichem Dünndarmgewebe von Mäusen fand sich eine erhöhte Expression von CB₁-Rezeptoren. Auch war die Hypomotilität in diesem Gewebeabschnitt nach Anandamid-Gabe am ausgeprägtesten. Beide Effekte waren CB₁-Rezeptor vermittelt {Izzo AA 2001}.

Eine Vielzahl von Arbeiten hat sich mit der Hemmung der Magen- und Darm-Motilität durch Aktivierung des enterischen CB₁-Rezeptors beschäftigt. Neuere Arbeiten berichten auch von einem möglichen Einfluss des CB₂-Rezeptors auf Entzündungsreaktionen und die damit verbundene Reduktion der GIT-Motilität {Izzo AA 2004}.

4.1.4.5 Weitere Effekte der Endocannabinoide im Magen-Darm-Trakt

Neben den oben dargestellten Effekten auf die Motilität im Gastrointestinaltrakt sind heute weitere Effekte dieser Stoffklasse im Magen-Darm-Trakt beschrieben worden. Eine große Zahl an Arbeiten beschrieben Einflüsse der Endocannabinoide auf die gastrointestinale Sekretion, neoplastische und immunologische Erkrankungen im GIT. Auch spielen Endocannabinoide eine wichtige Rolle in der Schmerzvermittlung, sie beeinflussen die Appetitregulierung und Nahrungsaufnahme.

4.1.4.5.1 Gastrointestinale Sekretion

Täglich werden etwa 1-1.5 Liter sauren Magensafts produziert. Die Magensäure hydrolysiert Nahrungsproteine, inaktiviert aufgenommene Mikroorganismen und fördert die Resorption von Eisen im Dünndarm {Pfreundschuh M 2004}.

Endocannabinoide haben wie man heute weiß einen hemmenden Einfluss auf die Säureproduktion des Magen-Darm-Trakts {Coruzzi G 1999}. Zwei Arbeitsgruppen beschrieben 2001 und 2002, dass die Aktivierung des CB₁-Rezeptors zu einer Reduktion der Säureproduktion im Magen führte {Adami M 2002}{Pertwee RG 2001}.

4.1.4.5.2 Neoplastische Erkrankungen

Tumore im GIT finden sich selten im Dünndarm, sehr häufig im Dickdarm. Während im Dünndarm Lymphome und neuroendokrine Tumore dominieren, spielen im Dickdarm vor allem Polypen und das colorektale Karzinom eine Rolle {Pfreundschuh M 2004}.

Ende 2003 wurden auch Daten über den Einfluss der Endocannabinoide auf neoplastische Erkrankungen im GIT publiziert.

In einer italienischen Studie konnte eine 2-3 fache erhöhte Konzentration an Endocannabinoiden in colorektalen Adenomen und Karzinomen im Vergleich zur normalen colorektalen Mucosa festgestellt werden.

Die Gabe von Anandamid und 2-Arachidonylglycerol konnte die Proliferation von colorektalen Karzinom-Zell-Linien (CaCo-2 und DLD-1) erheblich inhibieren. Der Effekt der Proliferationshemmung wurde als CB₁-Rezeptor vermittelt angesehen {Ligresti A 2003}.

In einer Arbeit von Portella et al. fand sich eine über diesen Rezeptor vermittelte Hemmung der Aktivität des p21^{ras}-Proteins, ein Onkogen-Produkt, bei Thyroid-Karzinom-Zell-Tumoren {Portella G 2003}.

Bifulco et al. beschrieben 2001, dass durch CB₁-Rezeptor-Aktivierung das Wachstum eines ras-Onkogen gebundenen epithelialen Tumors in vivo reduziert werden konnte {Bifulco M 2001}.

4.1.4.5.3 Entzündliche Prozesse und immunologische Erkrankungen

Aus einer übermäßigen entzündlichen Reaktion kann potentielle Gefahr für die Gesundheit des Organismus entstehen. Die physiologische Bilanz zwischen pro- und antientzündlichen Prozessen spielt dabei eine wichtige Rolle beim körpereigenen Schutz gegen schädliche entzündliche Ereignisse.

Nach heutiger Datenlage spielen auch Endocannabinoide eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen.

In einer Studie aus dem Jahr 2004 der Arbeitsgruppe um Lutz, Storr, Sibaev et al. konnte gezeigt werden, dass Cannabinoid-Rezeptoren vom Subtyp 1 die eigentlichen Signale vermitteln, welche den proentzündlichen Antworten entgegenwirken.

Die Endocannabinoid-Gabe verhinderte eine experimentell induzierte Entzündung des Dickdarms bei Mäusen. Die Autoren schreiben, dass das endogene Cannabinoidsystem einen viel versprechenden therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung von Darmerkrankungen darstellen könne, die durch starke Entzündungsreaktionen gekennzeichnet sind {Massa F 2004}.

Izzo et al. untersuchten 2003 den Einfluss der Endocannabinoide auf Toxin-induzierte Entzündungsreaktionen. Cholera-Toxin (CT) ist als ein hoch potentes Enterotoxin bekannt, welches eine sekretorische Diarrhö auslösen kann. In dieser Arbeit wurde das Toxin in den Dünndarm von Mäusen eingebracht und führte dort zu einer massiven Flüssigkeitsansammlung. Daraufhin wurde immunhistochemisch ein Anstieg von CB₁-Rezeptoren nachgewiesen. Durch Gabe von CB₁-Rezeptor-Agonisten konnte die Flüssigkeitsansammlung vergrößert, dagegen durch SR 141716A-Gabe, ein spezifischer CB₁-Rezeptor-Antagonist, vermindert werden {Izzo AA 2003}.

Die Bedeutung des CB₁-Rezeptors bei entzündlichen Prozessen konnte auch in einer anderen Arbeit gezeigt werden. So fand sich in einer Arbeit von Izzo et al. im Jahr 2001 auch eine erhöhte Expression von CB₁-Rezeptoren bei entzündlichen Prozessen am Mausmodell {Izzo AA 2001}.

Es wird vermutet, dass Lymphozyten und Mastzellen direkt an der Regulierung des peripheren endogenen Cannabinoid-Systems beteiligt sind {Maccarrone M 2002}.

4.1.4.5.4 Appetit, Nahrungsaufnahme und Körperfett

Heute sind in den westlichen Industrieländern viele Krankheiten durch Übergewicht, Hypercholesterinämie und Bewegungsmangel bedingt. Gewichtsregulierung, Appetit, und Body-Mass-Index (BMI) sind längst als zentrale Begriffe in unseren Alltag eingekehrt. Forschungsergebnisse der letzten zehn Jahre haben Zusammenhänge zwischen dem Stoffgebiet der Endocannabinoide und der Nahrungsaufnahme, Appetit und Körperfettregulierung gezeigt. Die Nahrungsaufnahme scheint in engem Zusammenhang mit dem CB₁-Rezeptor zu stehen. Δ^9 -THC hat neben seiner psychogenen Wirkung auch einen starken Einfluss auf den Energiehaushalt des Körpers.

Cota et al. fanden 2003 einen CB₁-Rezeptor vermittelten Effekt der Endocannabinoide auf den Energiehaushalt bei Mäuse {Cota D 2003}.

Horvath untersuchte 2003 den Einfluss der Endocannabinoide auf den Appetit und den periphere Fettabbau. In diesem Versuchsaufbau fand sich bei CB₁-knock out-Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine Reduktion des Apettits, der Nahrungsaufnahme und das Körpergewichts. Der CB₁-Rezeptor, seine Agonisten und Antagonisten scheinen einen Einfluss auf die Regulation des Apettits und des Fettstoffwechsels im Organismus zu haben {Horvath TL 2003}.

Leptin ist seit einiger Zeit als Schlüsselhormon für die Apettitregulierung im Hypothalamus bekannt. Es reduziert die Nahrungsaufnahme durch Erhöhung appetitreduzierender Faktoren und Minderung appetitstimulierender Faktoren. Endocannabinoide, vor allem Anandamid und 2-Arachidonylglycerol, scheinen daran beteiligt zu sein. Heute weiß man, dass bei Menschen nach Cannabis- oder THC-Konsum der Apettit gesteigert ist, was bei Patienten mit Apettitverlust genutzt wird. In einer Arbeit von Martin et al. aus dem Jahr 2002 konnte gezeigt werden, dass Anandamid CB₁-Rezeptor vermittelt einen steigernden Effekt auf die Nahrungsaufnahme hat {Martin BR 2002}.

Eine Arbeit der Gruppe um Di Marzo et al. aus dem Jahr 2001 zeigte auch, dass die Gabe von Endocannabinoide bei Mäusen zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme führte {DI MARZO V 2001}.

5 Spezielle Diskussion

5.1 Effekte der Endocannabinoide auf inhibitorische Transmitter im ENS

5.1.1 Effekte der Endocannabinoide auf die NO-Synthase-Aktivität

Die durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Relaxation glatter Muskeln im GIT ist für die Unterhaltung der menschliche Darmfunktion von großer Bedeutung.

NO spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der inhibitorischen Antwort des peristaltischen Reflexes im Magen-Darm-Trakt.

Die Relaxation gastrointestinaler glatter Muskelzellen ist entweder auf direktem oder indirektem Wege durch die Modulierung von Neurotransmittern an enterischen Nervenendigungen vermittelt {Fritsch R 2004}.

Sowohl Endocannabinoide {Holland, Challiss, et al. 1999}, wie auch das Stickstoffmonoxid {Lam, Lan, et al. 2003}, führen beide zu einer Relaxation glatter Muskelzellen. Dies geschieht wie man heute weiss bei NO, über dessen Bindung an zyklisches GMP (cGMP), dies wiederum führt zu einer Hemmung der Calcium-Freisetzung aus seinem Zelldepot. Ein Abnahme an freiem Calcium zieht eine Reduktion der Kontraktion glatter Muskelzellen nach sich {Fritsch R 2004}. Wie cannabinoide Substanzen eine Relaxation glatter Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt herbeiführen, und ob Endocannabinoide und Stickstoffmonoxid auf ähnliche Art und Weise die oben beschriebene Reaktion herbeiführen, oder sich gegenseitig beeinflussen, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Mit dieser Frage haben sich schon einige Arbeiten beschäftigt.

1997 konnten Zygmunt et al. zeigen, dass Anandamid durch Inhibition der Freisetzung von Calcium aus seinem zellulären Speicher zu einer Relaxation glatter Muskelzellen bei hepatischen Arterien von Ratten führt {Zygmunt PM 1997}.

Sowohl NO, wie auch cannabinoide Substanzen lösen über eine Reduktion des freien Ca^{2+} -Gehaltes in der glatten Muskelzelle eine Relaxation aus. Basierend auf diesem Erkenntnissen haben wir untersucht, ob ein möglicher gemeinsamer zellulärer Mechanismus, oder ein direkter Endocannabinoid-Effekt auf die NO-Synthase-Aktivität existiert.

Dieser Fragen waren bis heute zwei Arbeiten nachgegangen.

Im Jahre 1996 hatte die Arbeitsgruppe um Stefano den Zusammenhang zwischen Endocannabinoiden und Stickstoffmonoxid, und der NO-Synthase-Aktivität untersucht.

Sie beschäftigte sich mit dem Vorkommen und der Signalkaskade des Endocannabinoid-Systems. Anandamid und CB₁-Rezeptoren (Bestandteile des Systems der Endocannabinoide) konnten in Immunozyten und Mikrogliazellen wirbelloser Tieren (Intervertebraten), wie in menschlichen Monoyzten nachgewiesen werden. Sowohl in Zellen der Intervertebraten, wie auch in humanen Zellen, wurde eine vermehrte Stickstoffmonoxid-Freisetzung, durch die Anwesenheit von Anandamid, festgestellt. Diese Signalvermittlung ist dem der Alkaloid-Opiate sehr ähnlich, es handelte sich um das gleiche Effektor-System. Weiter resultierte eine vermehrte Freisetzung von NO durch Bindung des Endocannabinoids an die NO-Synthase (NOS). Es bestand eine unterschiedliche Rezeptorvermittlung.

Erwähnenswert ist auch die Aussage dieser Arbeit, dass das Endocannabinoid-Systems schon über Millionen von Jahren existieren muss. Die Arbeitsgruppe fand cannabinoide Substanzen, wie CB₁-Rezeptoren, sowohl in humanen Zellen, als auch bei Intervertebraten deren evolutionäre Trennung vor mehr als 500 Millionen Jahren stattfand {Stefano GB 1996}.

Jahre später beschäftigte sich die Arbeitsgruppe um Stefano ein zweites Mal mit dem Einfluss der Endocannabinoide auf die NO-Synthase. Im Jahr 2003 konnte die Gruppe erneut feststellen, dass eine Aktivierung des CB₁-Rezeptors zu einer Zunahme an Stickstoffmonoxid führte. Wie man heute weiss, spielt die NOS eine wichtige Rolle bei der Zell-zu-Zell-Kommunikation. Es fand sich eine direkte Kopplung des CB₁-Rezeptors an die cNOS ('constitutive' NO-Synthase). Dies galt, wie auch in der vorherigen Arbeit von Stefano beschrieben, für Vertebraten und Intervertebraten, also für Säugetiere und wirbellosen Tiere. In weiteren Versuchen, basierend auf diesen Erkenntnissen, führte eine Aktivierung des genannten cNOS-gekoppelten Rezeptors bei menschlichen Endothelzellen von Blutgefäßen zu einer kurzzeitigen vermehrten Stickstoffmonoxid-Freisetzung und so zu deren Relaxation {Stefano GB 2003}.

Auch in unseren Daten konnte eine signifikante Zunahme der NO-Synthase-Aktivität im Dünndarm der Ratte nach Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 erzielt werden.

Unsere Ergebnisse unterstreichen die, in Konformität zu den oben beschriebenen Arbeiten, bekannte steigernde Wirkung der beiden Cannabinoid-Rezeptor Agonisten auf die Aktivität der NO-Synthase. Unsere Daten sprechen für die Hypothese, dass das System der Endocannabinoide direkt mit der NO-Synthase-Aktivität in Verbindung steht, und durch die vermehrte Konzentration an NO relaxierend auf glatte Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt wirkt.

In Bezug auf die bereits beschriebene Autoregulation der NOS und die signifikante Erhöhung der NOS-Aktivität in dieser Arbeit ist auf die Isoformen der NOS hinzuweisen {Huber A, Saur D, et al. 1998}. Bei Stefano et al., wie bereits oben beschrieben, induziert die Gabe von Anandamid über einen CB₁-Rezeptor-Effekt eine kurzzeitige Erhöhung der basalen Aktivität der cNOS und setzt vermehrt NO frei. Diese ging nach einiger Zeit wieder auf die basale Ausgangsaktivität zurück {Stefano GB 2003}. Da sich in unseren Daten eine signifikante Erhöhung der NO-Synthase-Aktivität findet, kann dies mit einer möglichen Wechselwirkung der Autoregulation der NOS durch Anandamid erklärt werden. Auch wäre denkbar, dass eine Isoform der NOS über die Autoregulation vermittelt und eine andere durch die Endocannabinoide in ihrer Aktivität signifikant erhöht wird.

5.1.2 Effekte der Endocannabinoide auf die VIP-Sekretion

Das vasoaktive intestinale Polypeptid, ein zyklisches induziert eine Relaxation glatter Muskeln im Gastrointestinaltrakt {Tomita R 2005}, wie auch eine Vasodilatation bei Koronararterien {Dalsgaard T 2003}.

Die hier vorliegende Arbeit hat einen möglichen Einfluss der Endocannabinoide auf die VIP-Sekretion untersucht. Bis heute haben sich zwei Arbeiten mit einer Interaktion zwischen dem vasoaktiven intestinalen Polypeptid und den Cannabinoiden, bzw. Endocannabinoiden und seinen Rezeptoren beschäftigt. 1999 untersuchte eine Arbeitsgruppe um Rodriguez de Fonseca eine mögliche Effekt von Cannabinoiden auf die VIP induzierte Prolactin-Sekretion in Zellen der Hypophyse von Ratten. Es fand sich eine Zunahme der Sekretion von Prolactin und eine

vermehrte cAMP-Bildung nach Agonisierung des CB₁-Rezeptors durch Δ⁹-THC {Rodriguez de Fonseca F 1999}.

In unseren Versuchen gaben wir Anandamid und WIN 55,212-2 den Synapostomen aus dem Dünndarm der Ratte zu. Als Ergebnis fand sich eine signifikante konzentrationsabhängige Steigerung der VIP-Freisetzung. Beide Substanzen führten zu einer vermehrten Freisetzung des vasoaktiven intestinalen Polypeptids. Eine weiterer Ursache für die Relaxation glatter Muskelzellen im Magen-Darm-Trakt durch Endocannabinoide, ist durch die Zunahme der VIP-Sekretion erklärbar.

5.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Sekretion der motilitätswirksamen Transmitter Ghrelin und Somatostatin

5.2.1 Effekte der Endocannabinoide auf die Ghrelin-Sekretion

Heute weiss man, dass Ghrelin {Erdmann J 2003}{Monteleone P 2003} und cannabinoide Substanzen {Horvath TL 2003}{DI MARZO V 2001} eine bedeutende Rolle in der Nahrungsaufnahme, bei der Regulierung des Appetits und der Energiebilanz des Organismus spielen.

Beide beeinflussen die Säureproduktion im Magen-Darm-Trakt. Endogene Cannabinoide wirken hemmend {Coruzzi G 1999}, Ghrelin dagegen stimulierend auf die Magensäureproduktion {Masuda Y 2000}.

Im Gastrointestinaltrakt führt Ghrelin zu einer Beschleunigung der Passage. Der Mechanismus des prokinetischen Effektes des Peptidhormons ist heute aber noch nicht gänzlich geklärt. Möglicherweise wirkt es am Gastrointestinaltrakt ähnlich aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zum Polypeptid Motilin {Xu L 2005}{Asakawa A 2001}{Masuda Y 2000}.

Die Substanzgruppe der Endocannabinoide haben eine hemmende Wirkung auf die Motilität des Magen-Darm-Trakts {Mascolo N 2002}{Pinto L 2002}.

Die vielen gemeinsamen Wirkungen und Angriffspunkte beider Transmittersubstanzen im GIT haben uns nach einer möglichen Verbindung zwischen Ghrelin und den Endocannabinoiden, im Bezug auf die Modulation der gastrointestinalen Motilität, suchen lassen.

Als Ziel unserer Versuche verfolgten wir einen möglichen Endocannabinoid-Effekt auf die Ghrelinsekretion. Nach Zuführung von Anandamid und WIN 55,212-2 fand sich keine signifikante Veränderung der Ghrelinsekretion gegenüber der basalen Freisetzung.

Unsere Daten zeigen, dass Endocannabinoide die Sekretion von Ghrelin nicht direkt beeinflussen. Bis heute finden sich auch keine weiteren Arbeiten über eine mögliche Interaktion von Endocannabinoiden und Ghrelin bei der Modulation gastrointestinaler Motilität.

5.2.2 Effekte der Endocannabinoide auf die Somatostatin-Sekretion

Die grundlegende Wirkung von Somatostatin (SOM) ist eine Inhibierung der Freisetzung vieler Hormone und Transmitter. Es hemmt die Sekretion von NO und VIP im Ileum von Hunden. SOM hat eine Zunahme der Kontraktion in glatten Muskelzellen im gastrointestinalen Trakt zur Folge. Die Gruppe um Vegara führte dies vor allem auf den hemmenden Einfluss des Neurotransmitters auf die NO-Freisetzung, und weniger auf die Reduktion der VIP-Sekretion zurück {Vergara P 1995}. Dagegen wird von der Arbeitsgruppe um Marzio 2003 eine Kontraktionshemmung der menschlichen Gallenblasenmuskulatur beschrieben {Marzio L 2003}. Beide Arbeiten haben gegensätzliche Aussagen über den Einfluss von Somatostatin auf die glatte Muskulatur im Magen-Darm-Trakt, doch verdeutlichen sie beide den modulierenden Effekt auf die glatte Muskulatur.

Der Einfluss auf die Sekretion von VIP und NO, wie auch die Modulation der Motilität im GIT, haben uns nach einem möglichen Zusammenhang von Somatostatin und dem Endocannabinoid-System suchen lassen.

Es beschäftigten sich schon zwei Arbeitsgruppen in den 1990er Jahren mit dem Einfluss der Cannabinoide auf die Sekretion von Somatostatin und seine Rezeptor vermittelte Signaltransduktion. Die Gruppe um Rettori untersuchte 1990 einen hemmenden Effekt von Δ^9 -THC auf die Freisetzung der Hormone LH (luteinizing hormone) und GH (growth hormone).

Die Sekretionshemmung von GH durch Δ^9 -THC wurde durch die Stimulierung der Somatostatin-Sekretion, welche durch die rezeptorvermittelte Wirkung von Δ^9 -THC zustande kam, erklärt {Rettori V 1990}. In einer anderen Arbeit von Vasquez et al., die sich mit einem Einfluss des CB₁-Rezeptors auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren beschäftigte, fand sich ein modulierender Effekt von hCB₁-Rezeptoren

(=humaner CB₁-Rezeptor) auf die Calciumfreisetzung an isolierten cervikalen Ganglienzellen beim Menschen. Die durch SOM ausgelöste Hemmung der Calcium-Freisetzung, wurde durch Aktivierung des hCB1 antagonisiert {Vasquez C 1999}.

In unseren Ergebnissen konnte durch Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 die Sekretion von Somatostatin, gegenüber ihrem basalen Grundumsatz, nicht signifikant verändert werden. Endocannabinoide scheinen die SOM-Sekretion im ENS der Ratte auf direktem Weg nicht zu beeinflussen.

5.3 Charakterisierung der Endocannabinoid-Effekte auf zellulärer Ebene

5.3.1 Mechanismus der NO-Synthase-Aktivitätssteigerung durch Endocannabinoide

In unseren Versuchsreihen zeigte sich durch Zugabe der Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten, Anandamid und WIN 55,212-2, eine Mehraktivität der NO-Synthase-Aktivität. Diese NOS-Stimulation konnte aber durch Zugabe der spezifischen CB-Rezeptor-Antagonisten, SR 141716A und SR 144528, nicht signifikant verändert werden.

Auch Capsazepine, ein selektiver Antagonist am Vanilloid-Rezeptor 1 (VR1), war dahingehend ineffektiv. Unsere Daten schließen eine Vermittlung des Endocannabinoideffekts der NOS-Aktivität über den VR1 aus.

Es ist aber darauf hin zu weisen, dass die alleinige Gabe von Capsazepine zu einer signifikanten Aktivitätszunahme der NOS führte. Unter basalen Bedingungen scheint der VR1 einen inhibierenden Effekt auf die NOS-Aktivität zu haben. Dieser Aspekt war aber nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und müsste in weiteren Ausführungen abgeklärt werden.

Problematisch ist der direkte Rückschluss des beschriebenen mediierten VR1-Effektes der Endocannabinoiden an dieser Synapse.

Da nach Zugabe von Anandamid und Capsazepine keine Potenzierung vorliegt ist die Wahrscheinlichkeit, dass der VR1 eine Rolle spielt, gering.

Aus den vorliegenden Daten könnte eine mögliche pharmakologische Evidenz für das Vorhandensein eines weiteren bis heute noch nicht entdeckten Cannabinoid-Rezeptors abgeleitet werden. Auch wäre ein direkter Effekt exogen zugeführter Endocannabinoide auf N- oder L-Typ-Calziumkanälen denkbar. Weiter könnte eine Konformitätsänderung der NO-Synthase durch Endocannabinoid-Gabe in Erwägung gezogen werden. Die wahrscheinlichste Hypothese ist wohl die NO-vermittelte Autoregulation der NO-Synthase, welche bereits an anderen Systemen beschrieben wurde {Kurjak, Koppitz, et al. 1999}.

Das Prinzip der NO-Autoregulation ist auch Endocannabinoid vermittelt, wie in der Arbeit von Stefano et al. im Jahr 2003 beschrieben wurde. Hier führte die Stimulation des CB₁-Rezeptors zu einer kurzfristigen Aktivierung der basalen cNOS-Aktivität und NO-Zunahme, gefolgt von einem Aktivitätsrückgang der cNOS {Stefano GB 2003}. Als mögliche Erklärung wäre eine Wechselwirkung mit Inhibition des Autoregulations-Mechanismus der cNOS durch die Endocannabinoide denkbar. Die Frage nach dem genauen Mechanismus bedarf weiteren Klärung.

5.3.2 Mechanismus der evozierten VIP-Stimulation durch Endocannabinoide

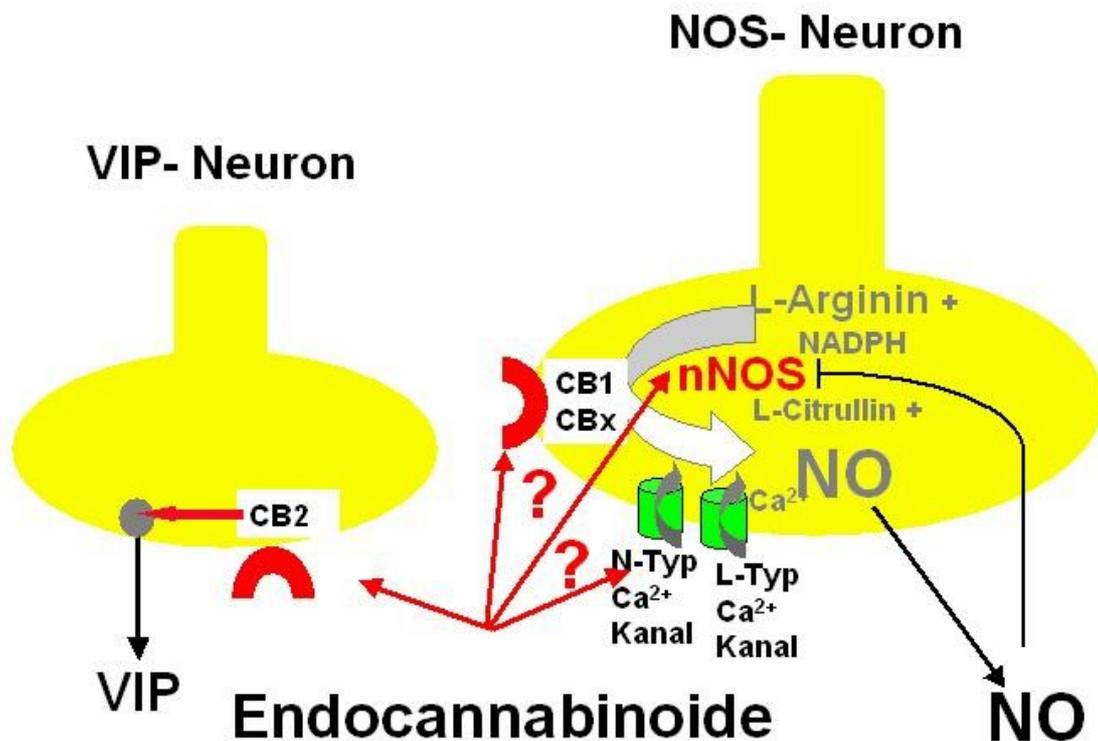
In unseren Ergebnissen führte die Zugabe von Anandamid zu einer signifikanten Sekretionserhöhung von VIP im Vergleich zur basalen Freisetzung. Der CB₁-Rezeptor-Antagonist, SR141716A, konnte die Anandamid induzierte VIP- Sekretion jedoch nicht signifikant verändern.

Nach Gabe des CB₂-Rezeptor-Antagonist, SR144528, fand sich in unseren Daten hingegen eine signifikante Hemmung der VIP-Freisetzung.

Diese legen die Existenz eines funktionellen CB₂-Rezeptors nahe.

Da bislang der Nachweis eines CB₂-Rezeptor-Subtyps an neuronalen Elementen fehlt, waren unsere funktionellen Ergebnisse der Anlass, an Präparaten longitudinaler Muskulatur mit anhängendem myenterischen Plexus nach der Existenz von CB₂-Rezeptoren mittels RT-PCR zu suchen (siehe unter 5.5).

Der VR1-Agonist, Capsaicin, hatte keinen signifikanten Effekt auf die VIP-Sekretion. Dagegen zeigte sich wie, schon bei der NOS-Aktivität beschrieben eine signifikante Zunahme der VIP-Freisetzung, nach Zugabe des spezifische VR1-Rezeptor-Antagonist, Capsazepine. Auch hier scheint der VR1 einen inhibierenden Effekt auf die VIP-Sekretion zu haben.



Graphik 19: Diese Graphik stellt die in unseren Ergebnissen erhaltenen rezeptorvermittelten Endocannabinoid-Effekte auf die NO-Synthase-Aktivität und VIP-Freisetzung auf zellulärer Ebene schematisch dar. Die Darstellungen beider Neurone sind nicht als zwei voneinander getrennte Nervenendigungen anzusehen. In der linken Darstellung (VIP-Neuron) wird der CB_2 -Rezeptor vermittelte Effekt der Endocannabinoide auf die VIP-Freisetzung in NANC-Neuronen dargestellt. Auf der rechten Seite (NOS-Neuron) ist die Ursache der Zunahme der NO-Synthase-Aktivität durch Endocannabinoide nicht vollständig geklärt. Möglich wäre ein direkter Einfluss der Endocannabinoide auf die Calcium-Kanäle (Ca^{2+} -Kanal), die bei der NOS eine wichtige Rolle spielen. Auch wäre ein Effekt der Endocannabinoide auf das Enzym der NOS selbst denkbar. Heute wird auch vermutet, dass die NOS-Aktivität über einen noch nicht entdeckten weiteren Cannabinoid-Rezeptor-Subtyp (CB_x) vermittelt wird. Am wahrscheinlichsten ist aber der Mechanismus der NO vermittelten Autoregulation der NOS.

5.4 Effekte von endogenem Anandamid auf die beschriebenen Transmittersysteme

In den vorangehenden Versuchen wurden Cannabinoide exogen zugeführt. Da es wie bekannt endogene Liganden an Cannabinoid-Rezeptoren, die Endocannabinoide, gibt, wurden weiterführende Experimente zur Charakterisierung der endogenen Effekte unternommen.

Durch die spezifische Blockade des Anandamid-Transporters (AT), der Anandamid aus dem synaptischen Spalt in die Zelle transportiert, und des Enzyms FAAH (=Fatty Acid Hydrolase) ist es möglich, direkte Effekte von endogenen Liganden an den Cannabisrezeptoren im synaptischen Spalt zu untersuchen. PMSF ist ein unspezifischer aber hochpotenter Antagonist der FAAH. Bei AM404 handelt es sich um einen selektiven Inhibitor des Anandamid-Transporters. Die Anwesenheit sowohl des einen als auch des anderen Inhibitors führt zu einer längeren Verweildauer und Aktivität des endogenen Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten, von "endogenem" Anandamid (siehe auch Schema, Graphik 16).

5.4.1 Effekte von endogenem Anandamid auf die NO-Synthase-Aktivität

Unsere Ergebnisse zeigten eine Zunahme der NO-Synthase-Aktivität durch Zugabe von AM404 oder PMSF.

Nach spezifischer Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisierung, mittels SR141716A, dem selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten, und SR144528, dem spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, fand sich aber keine Aktivitätsänderung der stimulierten NOS. Die NO-Synthase-Aktivität nahm sowohl durch exogene Zugabe von WIN 55,212-2 und Anandamid, wie auch durch Erhöhung der Konzentration von endogenem Anandamid im synaptischen Spalt zu. Wie schon bei den von exogenen zugeführten cannabinoide Substanzen fand sich auch hier kein Rezeptor vermittelter Effekt.

5.4.2 Effekte von endogenem Anandamid auf die VIP-Freisetzung

Durch Zugabe von AM404 konnte die VIP-Sekretion signifikant gesteigert werden. Dieses Ergebnis ist mit den Daten der exogen zugeführten Endocannabinoiden konform.

Im Gegensatz zum erzielten Effekt der exogen zugeführten Cannabinoide konnte die VIP-Sekretionssteigerung, nach Zugabe der beiden spezifischen Antagonisten, SR141716A und SR144528, hier nicht antagonisiert werden.

Der Unterschied des CB₂-Rezeptor-Effekts auf die VIP-Sekretion zwischen exogen zugeführten und endogenen Cannabinoid-Agonisten könnte auf eine unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Beziehung zurückzuführen sein. Wie in anderen Arbeiten nachgewiesen ist die durch AM 404 erzeugte Konzentration an endogenen Cannabinoiden nicht ausreichend um denselben funktionellen Effekt wie bei exogener Gabe zu erzielen {Calignano A 1997}. Für den Effekt der Endocannabinide auf die Sekretion von VIP ist die erzeugte Konzentration ausreichend, nicht aber um eine Rezeptor vermittelte Wirkungsbeziehung zu beweisen {Giuffrida A 2001}.

5.5 Nachweis von CB₁- und CB₂-Rezeptoren im ENS

Die Ergebnisse eines funktionellen CB₂-Rezeptor-Effektes bei der VIP-Sekretion {Kurjak M, Hamel AM, Storr M et al. 2003} konnten durch die bis heute bekannten Daten nicht erklärt werden. Nur CB₁-Rezeptoren wurden bisher immunhistochemisch und mittels PCR in Neuronen des ENS nachgewiesen {Izzo AA 2003}. Weder die funktionelle Darstellung, noch die Existenz eines CB₂-Rezeptors an Neuronen im gesamten Gastrointestinaltrakt ist bislang beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe um Sharkey beschäftigte sich 2004 mit einem möglichen Effekt des CB₂-Rezeptors auf den Transit im GIT der Ratte. Durch eine CB₂-Rezeptor-Aktivierung konnte auch eine Hemmung des Transits unter den Bedingungen der exogen induzierten Entzündung erzielt werden. Hier war der Effekt über eine Cyclooxygenase und nicht über eine im Versuchsaufbau mitberücksichtigte iNOS, eine Isoform der NOS, vermittelt. Denkbar wäre aber das eine andere Isoformen der NOS, wie die z. B. die cNOS, Einfluss auf den beschriebenen Mechanismus hat {Mathison R 2004}.

In unseren Ergebnissen fand sich ein CB₂-Rezeptor vermittelter Effekt bei der Endocannabinoid stimulierten VIP-Sekretion an enterischen Nervenendigungen.

Konsequenterweise untersuchten wir die Existenz von Cannabinoid-Rezeptoren an Präparaten der longitudinalen Muskulatur mit anhängendem myenterischen Plexus. Mit spezifischen CB₁- und CB₂-Rezeptor-Primern gelang es uns am Gewebe von longitudinaler Muskulatur aus dem Ileum der Ratte beide CB-Rezeptor-Subtypen mittels RT-PCR nachzuweisen. So konnte in unseren Ergebnissen der experimentelle Nachweis eines funktionellen Cannabinoid-Rezeptors vom Subtyp 2 an Neuronen des enterischen Nervensystems erbracht werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegende Arbeit wurden die Effekte der Endocannabinoide auf die Transmitter-Freisetzung im Dünndarm der Ratte untersucht. Sie bezog sich vor allem auf die nicht- adrenerge und nicht-cholinerge (NANC) Innervation im enterischen Nervensystem.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, mittels des Modells der Synaptosomen, Effekte der Endocannabinoide auf zellulärer Ebene zu erklären, deren Vermittlung und mögliche Einflüsse auf andere Transmittersysteme darzustellen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1) Effekte der Endocannabinoide auf die inhibitorischen Transmitter NO und VIP im ENS:

Die exogenes Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 führte zu einer signifikanten Zunahme der Aktivität der NO-Synthase.

Die exogene Zugabe der beiden Substanzen hatte auch eine vermehrte Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitters VIP zur Folge.

Unsere Daten zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Freisetzung der inhibitorischen Neurotransmitter NO und VIP und den Endocannabinoiden.

Durch die signifikante Zunahme der NO-Synthase-Aktivität und wie auch durch die vermehrte VIP-Sekretion nach Endocannabinoid-Gabe, kann der relaxierende Einfluss cannabinoider Substanzen auf die glatte Muskulatur im Gastrointestinaltrakt erklärt werden. Unsere Daten weisen auf eine wichtige neuromodulatorische Rolle der Endocannabinoide im Magen-Darm-Trakt hin.

2) Effekte der Endocannabinoide auf die Freisetzung der Peptidhormone Ghrelin und Somatostatin:

In unseren Daten fand sich nach exogener Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 kein signifikanter Effekt auf die Sekretion von Ghrelin und Somatostatin im Dünndarm der Ratte.

3) Signalvermittlung der Endocannabinoid-Effekte auf zellulärer Ebene:

NO: In unseren Ergebnissen zeigte sich bei signifikanter Zunahme der NO-Synthase-Aktivität ein nicht-CB₁- / nicht-CB₂-Rezeptor- und nicht-VR1 vermittelter Effekt der Endocannabinoide {Kurjak M, Hamel AM, Storr M et al. 2003}.

Diese Daten lassen alternative Signaltransduktionswege vermuten. Eine mögliche Erklärung wäre die Vermittlung dieses Effekts durch einen weiteren Cannabinoid-Rezeptor-Subtyp. Alternativ käme auch eine Beeinflussung der NO vermittelten Autoregulation der NO-Synthase durch die Endocannabinoide in Frage, die bereits an anderen Systemen beschrieben wurde (siehe auch 5.3.2 und Graphik 19). Diese Hypothese wäre durch weitere Experimente zu klären.

VIP: Die Anandamid-stimulierte VIP-Sekretion wird über einen CB₂-Rezeptor-Effekt vermittelt {Kurjak M, Hamel AM et al. 2003}.

4) Charakterisierung der Einflüsse endogener Cannabinoide:

Durch spezifische Blockade, einerseits des Anandamid-Transporters und andererseits durch Inhibierung der Anandamid abbauenden Hydrolasen, zeigte sich ebenfalls eine deutliche Aktivitätszunahme der NO-Synthase und eine vermehrte Freisetzung von VIP. Dies ist auf die Anwesenheit endogener Cannabinoide zurückzuführen.

5) CB₂-Rezeptor-Nachweis an Neuronen im GIT

Unsere Daten weisen auf einen CB₂-Rezeptor-Effekt bei der VIP-Sekretion im ENS hin. Mittels RT-PCR konnten wir die Existenz eines funktionellen CB₂-Rezeptors im myenterischen Plexus der longitudinalen Muskulatur im Ileum der Ratte nachweisen.

8 Danksagung

Meinen Dank möchte ich allen aussprechen, die mir bei der Erstellung dieser Dissertation mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Meiner Mutter möchte ich für ihre Liebe und Zuwendung danken. Großer Dank gebührt meinem Vater für seine Hartnäckigkeit und Unterstützung.

Dank zolle ich hiermit Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Allescher für die Überlassung des Themas.

Besonderen Dank möchte ich den Mitgliedern der GAP-Arbeitsgruppe für die familiäre Aufnahme und Unterstützung aussprechen.

Herrn MD Ph. D. Dr. med. Andrei Sibaev danke ich für die technischen Hilfestellungen, das nette familiäre Klima und die Zeit in Barcelona 2003.

Herrn PD Dr. med. Martin Storr möchte ich für die Überlassung von Substanzen und für seine Ratschläge danken.

Großer Dank gebührt Herrn Dr. med. Dieter Saur, für die tatkräftige Unterstützung und besonders für die Durchführung des PCR-CB₂-Rezeptor Nachweises.

Danken möchte ich hiermit auch besonders Frau Christine Herda für den enormen Arbeitsaufwand zahlreicher RIAs, für die praktische Unterweisung und das angenehme Arbeitsklima im Radioaktiv-Labor der II. Medizinischen Klinik im Klinikum rechts der Isar in München.

Danken möchte ich vor allem Herrn PD Dr. med. Manfred Kurjak für die freundschaftliche Aufnahme in die GAP-Arbeitsgruppe, die angenehmen Rahmenbedingungen und Hilfestellungen während der Durchführung und Fertigstellung dieser Dissertation und für die Zeit in Nürnberg und Barcelona 2003.



Abbildung 14: Die GAP-Arbeitsgruppe im Jahr 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. med. H.-D. Allescher. (von links nach rechts: Dr. med. Ralph Fritsch, Prof. Dr. med. Hans-Dieter Allescher, PD Dr. med. Martin Storr, MD Ph. D. Dr. med. Andrei Sibaev, PD Dr. med. Manfred Kurjak, Dr. med. Dieter Saur, Andreas Michael Hamel;)

9 Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildungen

- Abbildung 1: Eröffneter Bauchsitus einer weiblichen Ratte mit Einblick in die Darmeingeweide. Nach Auffinden des Magensausgangs, wurde dieser mit einer Schere abgetrennt. Der Darminhalt des Dünndarms wurde bis zum Colon ascendens ausgestrichen. Auf Höhe der Ileocoecalklappe erfolgte die Abtrennung vom Dickdarm. 9
- Abbildung 2: Darstellung der 5 bis 10 cm langen Dünndarmabschnitte, rechts die beiden noch nicht eröffneten Strukturen. Bei der linken Struktur handelt es sich um die eröffnete Darmwand vor Entfernung der Mucosa und Submucosa. 10
- Abbildung 3: Darstellung der RT-PCR der CB₁- und CB₂-Rezeptoren entnommen aus der gesamten RNA von Anteilen aus isoliertem Hirngewebe (Bande 1), aus Gewebeanteilen der longitudinalen Muskelschicht mit anhängendem myenterischen Plexus (LM/MP, Bande 2) und aus Mucosagewebe des Ileums (Bande 3) der Ratte. Einzelne Banden mit der Größe von ca. 350 Basenpaaren (= bp) und 480 bp konnten die gesicherten Expressionsorte von CB₁- und CB₂-Rezeptoren in der longitudinalen myenterischen Plexusschicht des Rattenileums darstellen. Die Negativ-Kontrolle (Bande 4) zeigte kein PCR-Produkt. 35
- Abbildung 4: Bild von Hanfpflanzen, Cannabis spp., aus denen sich cannabinoide Substanzen extrahieren lassen (Abbildungsquelle: www.erowid.org, Photo von Pikelz, (c) erowid.org). 36
- Abbildung 5 Darstellung der chemischen Struktur von Δ^9 -THC (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004})..... 37
- Abbildung 6: Darstellung der chemischen Struktur von 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}). 41
- Abbildung 7: Darstellung der chemischen Struktur von Anandamid (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}). 42
- Abbildung 8: Δ^9 -THC und Anandamid vermitteln ihre Wirkungen über Cannabinoid-Rezeptoren. Beide Substanzen weisen unterschiedliche chemische Strukturen auf. Bei den Cannabinoiden, wie das Δ^9 -THC, handelt es sich um ein pflanzliches Extrakt. Bei den endogenen Cannabinoiden (=Endocannabinoiden) um körpereigene Substanzen. Im linken oberen Bild wird die chemische Struktur von Δ^9 -THC dargestellt, im rechten oberen Bild ist die chemische Struktur von Anandamid zu sehen (Abbildungsquelle: {Marsicano G 2002}). 44
- Abbildung 9: Darstellung der Signaltransduktion nach Aktivierung des CB₁-Rezeptors. Eine Aktivierung des G-Protein gekoppelten Cannabinoid-Rezeptors (in der Abbildung als Rezeptor bezeichnet) führt zur Hemmung der Adenylatcyclase, zur Reduktion von zyklischem AMP (cAMP) und Blockierung spannungsabhängiger Calciumkanäle (in der Abbildung als Ca²⁺-Kanal dargestellt), dagegen bewirkt es eine Aktivitätszunahme der MAP-Kinase..... 49
- Abbildung 10: Darstellung der chemischen Struktur von SR141716A, ein spezifischer CB₁-Rezeptor-Antagonist (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}). 51
- Abbildung 11: Darstellung der chemischen Struktur von SR144528, einem spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten (Abbildungsquelle: {Sugiura T 2004}). 52
- Abbildung 12: Darstellung der einzelnen Wandschichten sowie der Lokalisation der beiden Plexus (Abbildungsquelle: {Goyal FK 1996}). 56

Abbildung 13: Abbildung eines histologischen Querschnitts der beiden glatten Muskelschichten im GIT. Zwischen der longitudinalen und zirkulären glatten Muskelschicht befinden sich gelb eingekreist die Neurone des Auerbach-Plexus (Abbildungsquelle: {Goyal FK 1996}).	57
Abbildung 14: Die GAP-Arbeitsgruppe im Jahr 2003 unter der Leitung von Prof. Dr. med. H.-D. Allescher. (von links nach rechts: Dr. med. Ralph Fritsch, Prof. Dr. med. Hans-Dieter Allescher, PD Dr. med. Martin Storr, MD Ph. D. Dr. med. Andrei Sibaev, PD Dr. med. Manfred Kurjak, Dr. med. Dieter Saur, Andreas Michael Hamel;)	82

9.2 Tabellen

Tabelle 1: Anandamid und WIN 55,212-2 hatten beide keinen signifikanten Effekt auf die Somatostatin-Sekretion gegenüber der basalen Freisetzung. Die spezifische Blockade der CB ₁ -, CB ₂ -Rezeptoren und des VR1, ergab auch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur basalen Somatostatin-Freisetzung.	32
Tabelle 2: Die spezifische Blockade des Anandamid-Transporters durch AM404 hatte keinen Effekt auf die Somatostatin-Sekretion verglichen mit der basalen Freisetzung. Auch die spezifische Inhibierung des CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptors, in Anwesenheit von AM404, hatte keine signifikante Veränderung der Somatostatin-Freisetzung zur Folge.	33
Tabelle 3: Die Oligonukleotide des Sense (S)- und Antisense-Strang-(AS)-Primers der CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptoren für die RT-PCR in 5'-->3'Richtung.	34

9.3 Graphiken

Graphik 1: Die Zugabe von Anandamid führte zu einer signifikanten Zunahme der NO-Synthase-Aktivität gegenüber der basalen Aktivität ([fmol/mg/min] Basal: 0.05 ± 0.01 fmol/mg/min, n=4) in den Konzentrationen von 10^{-4} M bis 10^{-6} M (Anandamid 10^{-4} M: 0.14 ± 0.02 fmol/mg/min, Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 fmol/mg/min, Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.05 fmol/mg/min, n=4) und bei einer Konzentration von 10^{-7} M (Anandamid 10^{-7} M: 0.13 ± 0.04 fmol/mg/min, n=4).	16
Graphik 2: Sowohl Anandamid als auch WIN 55,212-2 führen beide zu einem signifikanten Zuwachs der NO-Synthase-Aktivität ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.049 ± 0.01 , Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 0.1 ± 0.02 , n=4).	17
Graphik 3: Nach Zugabe des spezifischen CB ₁ -Rezeptor-Antagonisten, SR141716A, fand sich keine signifikante Änderung der Anandamid induzierten NO-Synthase-Aktivitätssteigerung ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01 , Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 , Anandamid 10^{-5} M + SR141716A 10^{-7} M: 0.14 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 0.15 ± 0.04 , n=4).	18
Graphik 4: Die Aktivitätszunahme der NO-Synthase, nach exogener Anandamidgabe, wurde durch die Anwesenheit des spezifischen CB ₂ -Rezeptor-Antagonisten, SR144528, nicht signifikant verändert ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01 , Anandamid 10^{-5} M: 0.13 ± 0.05 , Anandamid 10^{-5} M + SR144528 10^{-7} M: 0.15 ± 0.04 , Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M + SR144528 10^{-7} M: 0.1 ± 0.03 , n=4).	19
Graphik 5: Die alleinige Gabe von Capsazepine führte zu einer signifikanten Aktivitätszunahme der NOS. Dagegen zeigte sich nach Zugabe von	

Capsazepine und Anandamid keine signifikante Veränderung der Anandamid induzierten NOS-Aktivitätssteigerung ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.05 ± 0.01 , Anandamid 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M + Capsazepine 10^{-6} M: 0.16 ± 0.03 , Capsazepine 10^{-6} M: 0.17 ± 0.03 , n=4).	20
Graphik 6: Es fand sich eine Aktivitätszunahme der NOS, hervorgerufen durch exogene Zugabe von Anandamid, wie auch nach Gabe von Anandamid mit AM404 und mit PMSF. Auch durch Zugabe von AM404 und PMSF konnte die NOS-Aktivität signifikant gesteigert werden ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.12 ± 0.03 , Anandamid 10^{-6} M: 0.22 ± 0.02 , Anandamid 10^{-6} M + AM404 10^{-6} M: 0.29 ± 0.06 , Anandamid 10^{-6} M + PMSF 10^{-3} M: 0.27 ± 0.03 , AM404 10^{-6} M: 0.32 ± 0.08 , PMSF 10^{-3} M: 0.30 ± 0.06 , n=6).	21
Graphik 7: AM404 führte zu einer signifikanten Zunahme der NO-Synthase-Aktivität. Die selektive Blockade der CB ₁ - und CB ₂ -Rezeptoren veränderte die Aktivitätszunahme der NOS nicht signifikant ([fmol/mg/min] Basalwert: 0.3 ± 0.07 , AM404 10^{-6} M: 0.45 ± 0.13 , AM404 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 0.64 ± 0.35 , AM404 10^{-6} M + SR144528 10^{-7} M: 0.62 ± 0.2 , n=6).	22
Graphik 8: Es zeigte sich ein signifikanter Zuwachs der VIP-Sekretion nach Zugabe von Anandamid und WIN 55,212-2 gegenüber der basalen Freisetzung ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-4} M: 232.9 ± 50.6 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-6} M: 337.2 ± 61.1 , Anandamid 10^{-7} M: 350.9 ± 33.6 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 292.6 ± 27.8 , n=6).	23
Graphik 9: Es zeigte sich kein signifikanter Rückgang der VIP-Freisetzung nach Zugabe von SR141617A, dem spezifischen CB ₁ -Rezeptor-Antagonisten ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-5} M + SR141716A 10^{-7} M: 309.6 ± 44.3 , Anandamid 10^{-6} M: 337.2 ± 61.1 , Anandamid 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 334.1 ± 53.2 , n=6).	24
Graphik 10: Es zeigte sich ein signifikanter Rückgang der VIP-Freisetzung nach Zugabe des spezifischen CB ₂ -Rezeptor-Antagonisten, SR144528 ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-5} M + SR144528 10^{-7} M: 243.6 ± 45.4 , Anandamid 10^{-6} M: 337.2 ± 61.1 , Anandamid 10^{-6} M + SR144528 10^{-7} M: 247.1 ± 40.9 , n=6).	25
Graphik 11: Die Zugabe von Capsazepine, dem spezifischen Antagonist am VR1, führte zu einer signifikanten Mehrsekretion von VIP. Die alleinige Gabe von Capsaicin, dem spezifischen Agonisten am VR1, und die Kombinationsgabe von Anandamid und Capsazepine hatte keine signifikante Veränderung der VIP-Sekretion gegenüber der basalen Freisetzung zur Folge ([pg/mg] Basalwert: 259.0 ± 32.2 , Anandamid 10^{-5} M: 308.0 ± 42.3 , Anandamid 10^{-5} M + Capsazepine 10^{-6} M: 351.6 ± 84.3 , Capsaicin 10^{-6} M: 275.6 ± 26.4 , Capsazepine 10^{-6} M: 306.8 ± 28.9 , n=6).	26
Graphik 12: Diese Graphik soll die unveränderte Sekretion von Ghrelin nach Zugabe von Anandamid [10^{-5} M und 10^{-6} M] und WIN 55,212-2 [10^{-5} M] im Vergleich zum basalen Grundumsatz verdeutlichen ([pg/mg] Basalwert: 16.9 ± 2.3 ; Anandamid 10^{-5} M: 13.5 ± 1.9 , 10^{-6} M: 15.2 ± 2.3 , WIN 55,212-2 10^{-5} M: 15.8 ± 2.4 , n=11).	28
Graphik 13: Unsere Daten zeigten keine signifikante Veränderung der Freisetzung von Ghrelin, weder durch Zugabe von Anandamid, noch nach spezifischer CB ₁ -Rezeptor-Blockade, gegenüber dem basalen Grundumsatz ([pg/mg] Basalwert: 17.5 ± 3.9 ; Anandamid 10^{-5} M: 15.8 ± 1.9 , 10^{-6} M: 17.7 ± 2.3 , Anandamid 10^{-5} M + SR141716A 10^{-7} M: 17.9 ± 2.8 , Anandamid 10^{-6} M + SR141716A 10^{-7} M: 17.5 ± 2.0 , n=6).	29

- Graphik 14: Nach Anandamid- und nach Gabe des spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten, SR144528, fand sich keine signifikante Veränderung der Ghrelinfreisetzung ([pg/mg] Basalwert: 17.5 ± 3.9; Anandamid 10⁻⁵ M: 15.8 ± 1.9, 10⁻⁶ M: 17.73 ± 2.34, Anandamid 10⁻⁵ M + SR144528 M⁻⁷: 17.5 ± 1.6, Anandamid 10⁻⁶ M + SR144528 M⁻⁷: 17.5 ± 2.2, n=6)..... 30
- Graphik 15: Capsaicin und Capsazepine führten beide zu keine signifikante Veränderung der Sekretion von Ghrelin im Vergleich zur basalen Freisetzung. Dies galt auch für die gemeinsame Gabe von Anandamid mit dem spezifischen VR1-Antagonisten, Capsazepine ([pg/mg] Basalwert: 17.52± 3.9; Anandamid 10⁻⁶ M: 17.7 ± 2.34, Capsaicin 10⁻⁶ M: 16.6 ± 3.3, Capsazepine 10⁻⁶ M: 17.7 ± 2.8, Anandamid 10⁻⁶ M + Capsazepine M⁻⁶: 16.6 ± 1.9, n=6). 31
- Graphik 16: Die cannabinoiden Substanzen 2-AG, Anandamid, WIN 55,212-2, und das Δ⁹-THC, vermitteln ihre Wirkungen über eine Aktivierung der beiden Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen (CB₁ und CB₂). Anandamid führt zusätzlich zu einer Aktivierung des Vanilloid-Rezeptors 1 (VR1). SR141716A inhibiert spezifisch den CB₁-Rezeptor. Bei SR144528 handelt es sich um einen spezifischen CB₂-Rezeptor-Antagonisten. Anandamid wird durch den Anandamid-Transporter in das Zellinnere befördert. Dieser Transporter kann durch AM404 spezifisch gehemmt werden. Die Fatty Acid Amid Hydrolase (= FAAH) baut Anandamid ab, indem es die Substanz in die beiden Bestandteile Arachidonsäure und Ethanolamin spaltet. Dieses Enzym kann durch PMSF inhibiert werden..... 45
- Graphik 17: Hier wird die Übersetzung von mechanischen und chemischen Reizen durch Neurotransmitter in Kontraktion oder Dilatation glatter Muskelzellen dargestellt. (CM = Zirkuläre Muskulatur, LM = Longitudinale Muskulatur, MP = myenterischer Plexus, + = Kontraktionsauslösung, - = Relaxation der Muskulatur, NO = Stickstoffmonoxid, Ach = Acetylcholin, VIP = vasoaktives intestinales Peptid, SP = Substanz P); (Abbildungsquelle: {Kurjak M 2000}). 55
- Graphik 18: Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines synaptosomalen Vesikels, in der Grösse von etwa 1 μm. Die Tabelle beschreibt die unterschiedlichen Anteile von VIP, Saxitoxin, Bombesin (BLI), der ATPase in Synaptosomen und Plasmalemma. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der NO-Synthase-Aktivität zwischen Plasmalemma und Synaptosomen (NOS-Aktivität in fmol/mg/min; Saxitoxin fmol/mg, VIP, BLI pg/mg, Mg-ATPase in μmol/h x mg); (Graphikquelle: {Kurjak M 2000}). 58
- Graphik 19: Diese Graphik stellt die in unseren Ergebnissen erhaltenen rezeptorvermittelten Endocannabinoid-Effekte auf die NO-Synthase-Aktivität und VIP-Freisetzung auf zellulärer Ebene schematisch dar. Die Darstellungen beider Neurone sind nicht als zwei voneinander getrennte Nervenendigungen anzusehen. In der linken Darstellung (VIP-Neuron) wird der CB₂-Rezeptor vermittelte Effekt der Endocannabinoide auf die VIP-Freisetzung in NANC-Neuronen dargestellt. Auf der rechten Seite (NOS-Neuron) ist die Ursache der Zunahme der NO-Synthase-Aktivität durch Endocannabinoide nicht vollständig geklärt. Möglich wäre ein direkter Einfluss der Endocannabinoide auf die Calcium-Kanäle (Ca²⁺-Kanal), die bei der NOS eine wichtige Rolle spielen. Auch wäre ein Effekt der Endocannabinoide auf das Enzym der NOS selbst denkbar. Heute wird auch vermutet, dass die NOS-Aktivität über einen noch nicht entdeckten weiteren Cannabinoid-Rezeptor-Subtyp (CBx) vermittelt wird. Am wahrscheinlichsten ist aber der Mechanismus der NO vermittelten Autoregulation der NOS. 75

10 Literaturverzeichnis

1. Abood M. E., Martin B. R. **Neurobiology of marijuana abuse.** Trends Pharmacol Sci. 13 (1992) 201-206.
2. Adami M., Frati P., Bertini S., Kulkarni-Narla A., Brown D. R., de Caro G., Coruzzi G., Soldani G. **Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach.** Br J Pharmacol. 135 (2002) 1598-1606.
3. Ahluwalia J., Urban L., Bevan S., Nagy I. **Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the receptor 1 in vitro.** Eur J Neurosci. 17 (2003) 2611-2618.
4. Allescher H. D., Kurjak M., Huber A., Trudrung P., Schusdziarra V. **Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO.** Am J Physiol. 271 (1996) 568-574.
5. Asakawa A., Inui A., Kaga T., Yuzuriha H., Nagata T., Ueno N., Makino S., Fujimiya M., Niijima A., Fujino M. A., Kasuga M. **Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin.** Gastroenterology. 120 (2001) 337-345.
6. Beltramo M., Stella N., Calignano A., Lin S.Y., Makriyannis A., Piomelli D. **Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.** Science. 277 (1997) 1094-1097.
7. Bifulco M., Laezza C., Portella G., Vitale M., Orlando P., De Petrocellis L., Di Marzo V. **Control by the endogenous cannabinoid system of ras oncogene-dependent tumor growth.** Faseb J. 15 (2001) 2745-2747.

8. Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Bourrie B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Casellas P. **Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1.** Biochem J. 312 (1995) 637-641.
9. Briggs C. A., Cooper J.R. **A synaptosomal preparation from the guinea pig ileum myenteric plexus.** J Neurochem. 36 (1981) 1097-1108.
10. Brooks J. W., Pryce G., Bisogno T., Jaggar S.I., Hankey D. J., Brown P., Bridges D., Ledent C., Bifulco M., Rice A.S., Di Marzo V., Baker D. **Arvanil-induced inhibition of spasticity and persistent pain: evidence for therapeutic sites of action different from the VR1 receptor and cannabinoid CB(1)/CB(2) receptors.** Eur J Pharmacol. 439 (2002) 83-92.
11. Burgis E. **Intensivkurs: Allgemeine und spezielle Pharmakologie.**; Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2001, 2. Auflage, 76,77,123-126.
12. Calignano A., La Rana G., Beltramo M., Makriyannis A., Piomelli D. **Potentialiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404.** Eur J Pharmacol. 337 (1997) 1-2.
13. Calignano A., La Rana G., Makriyannis A., Lin S.Y., Beltramo M., Piomelli D. **Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid.** Eur J Pharmacol. 340 (1997) 7-8.
14. Caminos J. E. , Tena-Sempere M., Gaytán F., Sanchez-Criado J. E., Barreiro M. L., Nogueiras R., Casanueva F. F., Aguilar E., Diéguez C. **Expression of Ghrelin in the Cyclic and Pregnant Rat Ovary.** Endocrinology. 144 (2003) 1594-1602.
15. Capasso R., Izzo A. A., Fezza F., Pinto A., Capasso F., Mascolo N., Di Marzo V. **Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice.** Br J Pharmacol. 134 (2001) 945-950.

16. Carlini E. A. **The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans.** *Toxicol.* 44 (2004) 461-467.
17. Caterina M. J., Leffler A., Malmberg A. B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeitz K. R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** *Science.* 288 (2000) 306-313.
18. Chen J., Matias I., Dinh T., Lu T., Venezia S., Nieves A., Woodward D. F., Di Marzo V. **Finding of endocannabinoids in human eye tissues: implications for glaucoma.** *Biochem Biophys Res Commun.* 330 (2005) 1062-1067.
19. Chien F. Y., Wang R. F., Mittag T. W., Podos S.M. **Effect of WIN 55212-2, a Cannabinoid Receptor Agonist, on Aqueous Humor Dynamics in Monkeys.** *Arch Ophthalmol.* 121 (2003) 87-90.
20. Coruzzi G, Adami M., Coppelli G., Frati P., Soldani G. **Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anaesthetized rat.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 360 (1999) 715-718.
21. Cota D., Marsicano G., Tschöp M., Grubler Y., Flachskamm C., Schubert M., Auer D., Yassouridis A., Thone-Reineke C., Ortmann S., Tomassoni F., Cervino C., Nisoli E., Linthorst A.C., Pasquali R., Lutz B., Stalla G. K., Pagotto U. **The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.** *J Clin Invest.* 112 (2003) 423-431.
22. Coutts A. A., Irving A.J., Mackie K., Pertwee R. G., Anavi-Goffer S. **Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus.** *J Comp Neurol.* 448 (2002) 410-422.
23. Cravatt B. F., Lichtman A. H. **Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system.** *Curr Opin Chem Biol.* 7 (2003) 469-475.

24. Dalsgaard T., Mortensen A., Larsen C. R., Larsen J. J., Ottesen B. **Long-term estradiol treatment improves VIP-mediated vasodilation in atherosclerotic proximal coronary arteries.** Regul Pept. 116 (2003) 155-162.
25. De Herder W. W., Hofland L. J., Van Der Lely A. J., Lamberts S. W. **Somatostatin receptors in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumours.** Endocr Relat Cancer. 10 (2003) 451-458.
26. De Marchi N., De Petrocellis L., Orlando P., Daniele F., Fezza F., Di Marzo V. **Endocannabinoid signalling in the blood of patients with schizophrenia.** Lipids Health Dis. 2 (2003) 5.
27. Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** Science. 258 (1992) 1946-1949.
28. Devlin M. G., Christopoulos A. **Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum.** J Neurochem. 80 (2002) 1095-1102.
29. Di Carlo G., Izzo A. A. **Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications.** Expert Opin Investig Drugs. 12 (2003) 39-49.
30. Di Marzo V., Fontana A., Cadas H., Schinelli S., Cimino G., Schwartz J. C., Piomelli D. **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** Nature. 372 (2002) 686-691.
31. Di Marzo V., Blumberg P. M., Szallasi A. **Endovanilloid signaling in pain.** Curr Opin Neurobiol. 12 (2002) 372-379.

32. Di Marzo V., Lastres-Becker I., Bisogno T., De Petrocellis L., Milone A., Davis J. B., Fernandez-Ruiz J. J. **Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues.** Eur J Pharmacol. 420 (2001) 123-131.
33. Di Marzo V., Goparaju S. K., Wang L., Bátkai S., Járαι Z., Fezza F., Grant I., Miura R. D., Palmiter D., Sugiura T., Kunos G. **Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake.** Nature. 410 (2001) 822-825.
34. Di Marzo V. **'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance.** Biochim Biophys Acta. 1392 (1998) 153-175.
35. El Sohly M. A., de Wit H., Wachtel S. R., Feng S., Murphy T. P. **Delta9-tetrahydrocannabivarin as a marker for the ingestion of marijuana versus Marinol: results of a clinical study.** J Anal Toxicol. 25 (2001) 565-571.
36. Erdmann J., Topsch R., Lippel F., Gussmann P., Schusdziarra V. **Postprandial Response of Plasma Ghrelin Levels to Various Test Meals in Relation to Food Intake, Plasma Insulin, and Glucose.** J Clin Endocrinol Metab. 89 (2004) 3048-3054.
37. Erdmann J., Lippel F., Schusdziarra V. **Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man.** Regul Pept. 116 (2003) 101-107.
38. Fadda P., Robinson L., Fratta W., Pertwee R. G., Riedel G. **Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats.** Neuropharmacology. 47 (2004) 1170-1179.
39. Felder C. C, Glass M. **Cannabinoid receptors and their endogenous agonists.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 38 (1998) 179-200.

40. Fritsch R., Saur D., Kurjak M., Oesterle D., Schlossmann J., Geiselhoringer A., Hofmann F., Allescher H. D. **InsP3R-associated cGMP kinase substrate (IRAG) is essential for nitric oxide-induced inhibition of calcium signaling in human colonic smooth muscle.** J Biol Chem. 279 (2004) 12551-12559.
41. Fritsch R. **Nitrerge Mechanismen im Gastrointestinaltrakt: NOS-positive Neurone in Primärzellkultur und NO-abhängige Modulation des Calciumsignalstoffwechsels in humanen Colonmuskelzellen.** Dissertation, 2002.
42. Gaisa M. M. **Analyse der neuronalen Expression von cGMP-abhängigen Proteinkinasen und IRAG mittels In-situ-Hybridisierung.** Dissertation, 2003.
43. Giuffrida A., Beltramo M., Piomelli D. **Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology.** Pharmacol Exp Ther. 298 (2001) 7-14.
44. Glass M., Dragunow M., Faull R. L. **Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain.** Neuroscience. 77 (1997) 299-318.
45. Glass M., Felder C. C. **Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor.** J Neurosci. 17 (1997) 5327-5333.
46. Gonzalez R., Dunkel R., Koletzko B., Schusdziarra V., Allescher H. D. **Effect of capsaicin-containing red pepper sauce suspension on upper gastrointestinal motility in healthy volunteers.** Dig Dis Sci. 43 (1998) 1165-1171.
47. Goyal F. K, Hirano I. **Mechanisms of disease: The enteric nervous system.** New Eng J Med. 334 (1996) 1106-1115.

48. Helyes Z., Nemeth J., Than M., Bolcskei K., Pinter E., Szolcsanyi J. **Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat.** Life Sci. 73 (2003) 2345-2353.
49. Henquet C., Krabbendam L., Spauwen J., Kaplan C., Lieb R., Wittchen H. U., van Os J. **Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people.** BMJ. 330 (2005) 11.
50. Hoffman A. F., Lupica C. R. **Mechanisms of Cannabinoid Inhibition of GABA_A Synaptic Transmission in the Hippocampus.** J Neurosci. 20 (2000) 2470-2479.
51. Holland M., Challiss R. A. J, Standen N. B, Boyle J. P. **Cannabinoid CB1 receptors fail to cause relaxation, but couple via Gi/Go to the inhibition of adenylyl cyclase in carotid artery smooth muscle.** British Journal of Pharmacology. 128 (1999) 597-604.
52. Hornby P. J., Prouty S. M. **Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception.** Br J Pharmacol. 14 (2004) 1335-1345.
53. Horvath T. L. **Endocannabinoids and the regulation of body fat: the smoke is clearing.** J Clin Invest. 112 (2003) 323-326.
54. Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I., Cabral G., Casellas P., Devane W. A., Felder C. C., Herkenham M., Mackie K., Martin B. R., Mechoulam R., Pertwee R. G. **International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors.** Pharmacol Rev. 54 (2002) 161-202.
55. Howlett A. C. **Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marihuana.** Neuropharmacology. 26 (1987) 507-512.

56. Huber A., Saur D., Kurjak M., Schusdzarra V., Allescher H. D. **Characterization and splice variants of neuronal nitric oxide synthase in rat small intestine.** *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology* 275 (1998) 1146-1156.
57. Iversen L. **Cannabis and the brain.** *Brain.* 126 (2003) 1252-1270.
58. Izzo A. A., Capasso F., Costagliola A., Bisogno T., Marsicano G., Ligresti A., Matias I., Capasso R., Pinto L., Borrelli F., Cecio A., Lutz B., Mascolo N. Di Marzo V. **An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice.** *Gastroenterology* 125 (2003) 765-774.
59. Izzo A. A., Fezza F., Capasso R., Bisogno T., Pinto L., Iuvone T., Esposito G., Mascolo N., Di Marzo V., Capasso F. **Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation.** *Br J Pharmacol.* 134 (2001) 563-570.
60. Izzo A. A., Mascolo N., Borrelli F., Capasso F. **Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors.** *Br J Pharmacol.* 124 (1998) 1363-1368.
61. Izzo A. A. **The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids.** *Curr Opin Pharmacol.* 1 (2001) 597-603.
62. Izzo A. A. **Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors.** *Br J Pharmacol.* 142 (2004) 1247-1254.
63. Jamshidi N., Taylor D. A. **Anandamide administration into the ventromedial hypothalamus stimulates appetite in rats.** *Br J Pharmacol.* 134 (2001) 1151-1154.
64. Jerman J. C., Gray J., Brough S. J., Ooi L., Owen D., Davis J. B., Smart D. **Comparison of effects of anandamide at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors.** *Br J Anaesth.* 89 (2002) 882-887.
65. Johnson L. R. **Gastrointestinal Physiology.** Ullstein-Mosby Verlag. 1997, 5. Auflage, 1-19.

66. Juarranz M. G., Santiago B., Torroba M., Gutierrez-Canas I., Palao G., Galindo M., Abad C., Martinez C., Leceta J., Pablos J. L., Gomariz R. P. **Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells.** *Rheumatology (Oxford)*. 43 (2004) 416-422.
67. Kulkarni-Narla A., Brown D. R. **Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system.** *Cell Tissue Res.* 302 (2000) 73-80.
68. Kulkarni-Narla A., Brown D. R. **Opioid, cannabinoid and receptor localization on porcine cultured myenteric neurons.** *Neurosci Lett.* 308 (2001) 153-156.
69. Kurjak M., Allescher H. D, Schusdziarra V., Classen M. **Release of bombesin-like immunoreactivity from synaptosomal membranes isolated from the rat ileum.** *Eur J Pharmacol.* 257 (1994) 169-179.
70. Kurjak M., Fritsch R., Saur D., Schusdziarra V., Allescher H. D. **Functional coupling between nitric oxide synthesis and VIP release within enteric nerve terminals of the rat: involvement of protein kinase G and phosphodiesterase 5.** *J Physiol.* 534 (2001) 827-836.
71. Kurjak M, Hamel A. M., Storr M., Saur D., Allescher H. D. **Anandamid stimuliert die NO Synthese in enterischen Synaptosomen über einen nicht- CB1 / nicht- CB2-Rezeptor.** *Z Gastroenterol.* 41 (2003) 846.
72. Kurjak M., Hamel A. M., Storr M., Saur D., Allescher H. D. **Der CB2- Rezeptor vermittelt die Stimulation der VIP- Sekretion durch Cannabinoide an Synapsen enterischer Nerven.** *Z Gastroenterol.* 41 (2003) 848.
73. Kurjak M. **Stickstoffmonoxyd (NO) im enterischen Nervensystem - Mechanismen der NO-abhängigen Neuropeptidsekretion und Signaltransduktion.** Habilitation 2000.

74. Kurjak M., Koppitz P., Schusdziarra V., Allescher H. D. **Evidence for a feedback inhibition of NO synthesis in enteric synaptosomes via a nitrosothiol intermediate.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 277 (1999) 875-884.
75. Lam C. F., Lan R. S., van Heerden P. V., Ilett K. F., Henry P. J. **Diethylenetriamine NITRIC oxide adduct relaxes precontracted mouse tracheal smooth muscle.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 30 (2003) 709-711.
76. Langley J. N. **The Autonomic Nervous System Part 1.** London: 1921.
77. Lastres-Becker I., Cebeira M., de Ceballos M.L., Zeng B. Y., Jenner P., Ramos J. A., Fernandez-Ruiz J. J. **Increased cannabinoid CB1 receptor binding and activation of GTP-binding proteins in the basal ganglia of patients with Parkinson's syndrome and of MPTP-treated marmosets.** Eur J Neurosci. 14 (2001) 1827-1832.
78. Le Foll B., Goldberg S. R. **Cannabinoid CB1 receptor antagonists as promising new medications for drug dependence.** J Pharmacol Exp Ther. 312 (2005) 875-883.
79. Ligresti A., Bisogno T., Matias I., DePetrocellis L., Cascio M. G., Cosenza V., D'Argenio G., Scaglione G., Bifulco M., Sorrentini I., Di Marzo V. **Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth.** Gastroenterology 125 (2003) 677-688.
80. Lutz B. **Molecular biology of cannabinoid receptors.** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 66 (2002) 123-142.
81. Maccarrone M., Bari M., Battista N., Finazzi-Agro A. **Endocannabinoid degradation, endotoxic shock and inflammation.** Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 1 (2002) 53-63.
82. Mackie K., Hille B. **Cannabinoids Inhibit N-Type Calcium Channels in Neuroblastoma-Glioma Cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences 89 (1992) 3825-3829.

83. MacNaughton W. K., Van Sickle M. D., Keenan C. M., Cushing K., Mackie K., Sharkey K. A. **Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 286 (2004) 863-871.
84. Malinowska B., Kwolek G., Gothert M. **Anandamide and methanandamide induce both VR1- and cannabinoid CB1 receptor-mediated changes in heart rate and blood pressure in anaesthetized rats.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 364 (2001) 562-569.
85. Marsicano G., Wotjak C. T., Azad S. C., Bisogno T., Rammes G., Cascio M. G., Hermann H., Tang J., Hofmann C., Zieglgansberger W., Di Marzo V., Lutz B. **The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories.** Nature. 418 (2002) 530-534.
86. Martin B. R. **Identification of the Endogenous Cannabinoid System through Integrative Pharmacological Approaches.** Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics 301 (2002) 790-796.
87. Marzio L. **Factors affecting gallbladder motility: drugs.** Dig Liver Dis. 35 (2003) 17-19.
88. Mascolo N., Izzo A. A., Ligresti A., Costagliola A., Pinto L., Cascio M.G., Maffia P., Cecio A., Capasso F., Di Marzo V. **The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice.** Faseb J. 16 (2002) 1973-1975.
89. Massa F., Marsicano G., Hermann H., Cannich A., Monory K., Cravatt B. F., Ferri G. L., Sibaev A., Storr M., Lutz B. **The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation.** J Clin Invest. 113 (2004) 1202-1209.

90. Masuda Y., Tanaka T., Inomata N., Ohnuma N., Tanaka S., Itoh Z., Hosoda H., Kojima M., Kangawa K. **Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats.** *Biochem Biophys Res Commun.* 276 (2000) 905-908.
91. Mathison R., Ho W., Pittman Q. J., Davison J.S., Sharkey K.A. **Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats.** *Br J Pharmacol.* 142 (2004) 1247-1254.
92. Matsuda L. A., Lolait S.J., Brownstein M. J., Young A. C., Bonner T. I. **Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.** *Nature.* 346 (1990) 561-564.
93. Minowa S., Ishihara S., Tsuchiya S., Horie S., Murayama T. **Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain.** *Brain Res.* 1039 (2005) 75-83.
94. Monteleone P., Martiadis V., Fabrazzo M., Serritella C., Maj M. **Ghrelin and leptin responses to food ingestion in bulimia nervosa: implications for binge-eating and compensatory behaviours.** *Psychol Med.* 33 (2003) 1387-1394.
95. Mukhopadhyay S., Howlett AC. **CB1 receptor-G protein association. Subtype selectivity is determined by distinct intracellular domains.** *Eur J Biochem.* 268 (2001) 499-505.
96. Muthian S., Nithipatikom K., Campbell W. B., Hillard C. J. **Synthesis and Characterization of a Fluorescent Substrate for the N-Arachidonylethanolamine (Anandamide) Transmembrane Carrier.** *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* 293 (2000) 289-295.
97. Nackley A. G., Makriyannis A., Hohmann A. G. **Selective activation of cannabinoid CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation.** *Neuroscience.* 119 (2003) 747-757.

98. Nocerino E., Izzo A. A., Borrelli F., Capasso F., Capasso R., Pinto A., Sautebin L., Mascolo N. **Relaxant effect of capsazepine in the isolated rat ileum.** *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 365 (2002) 187-192.
99. O'Shaughnessy W. B. **On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah; (Cannabis indica); Their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases.** *Transactions of the Medical and Physical Society of Bengal.* (1839) 421-461.
100. Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. **Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.** *Endocr Rev.* 22 (2001) 153-183.
101. Pertwee R. G., Fernando S. R., Griffin G., Abadji V., Makriyannis A. **Effect of phenylmethylsulphonyl fluoride on the potency of anandamide as an inhibitor of electrically evoked contractions in two isolated tissue preparations.** *Eur J Pharmacol.* 272 (1995) 73-78.
102. Pertwee R. G., Ross R. A., Craib S. J., Thomas A. **(-)-Cannabidiol antagonizes cannabinoid receptor agonists and noradrenaline in the mouse vas deferens.** *Eur J Pharmacol.* 456 (2002) 99-106.
103. Pertwee R. G. **Cannabinoids and the gastrointestinal tract.** *Gut.* 48 (2001) 859-867.
104. Pfreundschuh M. S. J. **Pathophysiologie Pathobiochemie.** Elsevier, Urban & Fischer. 2004, 2. Auflage.
105. Pinto L., Capasso R., Di Carlo G., Izzo A. A. **Endocannabinoids and the gut.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66 (2002) 333-341.
106. Pinto L., Izzo A. A., Cascio M. G., Bisogno T., Hospodar-Scott K., Brown D. R., Mascolo N., Di Marzo V., Capasso F. **Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice.** *Gastroenterology.* 123 (2002) 227-234.

107. Piomelli D., Beltramo M.S., Glasnapp S. Y., Lin A., Makriyannis A. **Structural determinants for recognition and translocation by the anandamide transporter.** Proc Natl Acad Sci U S A. 96 (1999) 5802-5807.
108. Portella G., Laezza C., Laccetti P., De Petrocellis L., Di Marzo V., Bifulco M. **Inhibitory effects of cannabinoid CB1 receptor stimulation on tumor growth and metastatic spreading: actions on signals involved in angiogenesis and metastasis.** Faseb J. 17 (2003) 1771-1773.
109. Rettori V., Aguila M.C., Gimeno M. F., Franchi A. M., McCann S. M. **In vitro effect of delta 9-tetrahydrocannabinol to stimulate somatostatin release and block that of luteinizing hormone-releasing hormone by suppression of the release of prostaglandin E2.** Proc Natl Acad Sci U S A. 87 (1990) 10063-10066.
110. Rinaldi-Carmona M., Barth F., Millan J., Derocq J. M., Casellas P., Congy C., Oustric D., Sarran M., Bouaboula M., Calandra B., Portier M., Shire D., Breliere J. C., Le Fur G. L. **SR 144528, the First Potent and Selective Antagonist of the CB2 Cannabinoid Receptor.** J Pharmacol Exp Ther. 284 (1998) 644-650.
111. Rodriguez de Fonseca F., Wenger T., Navarro M., Murphy L. L. **Effects of delta9-THC on VIP-induced prolactin secretion in anterior pituitary cultures:evidence for the presence of functional cannabinoid CB1 receptors in pituitary cells.** Brain Res. 841 (1999) 114-122.
112. Rohner-Radegast W. **Kinderblitz, Jambudvipa.** Edition Isele, Eggingen, 1999, 184.
113. Saur D., Seidler B., Paehge H., Schusdziarra V., Allescher H. D. **Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors.** J Biol Chem. 277 (2002) 25798-25814. 2002.

114. Shen M., Thayer S. A. **The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons.** Brain Res. 783 (1998) 77-84.
115. Silbernagel S. K. R. **Lehrbuch der Physiologie.** Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York, 1994, 387-490.
116. Smart D., Gunthorpe M.J., Jerman J.C., Nasir S., Gray J., Muir A. I., Chambers J. K., Randall A. D., Davis J. B. **The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1).** Br J Pharmacol. 129 (2000) 227-230.
117. Stefano G. B., Esch T., Cadet P., Zhu W., Mantione K., Benson H. **Endocannabinoids as autoregulatory signaling molecules: coupling to nitric oxide and a possible association with the relaxation response.** Med Sci Monit. 9 (2003) 63-75. 2003.
118. Stefano G. B., Liu Y., Goligorsky M. S. **Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes.** J Biol Chem. 271 (1996) 19238-19242.
119. Stefano G. B., Ottaviani E. **The biochemical substrate on nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms.** Brain Res. 924 (2002) 82-89.
120. Sternini C. **Structural and Chemical Organization of the Myenteric Plexus.** Annual Review of Physiology. 50 (1988) 81-93.
121. Storr M., Gaffal E., Saur D., Schusdziarra V., Allescher H. D. **Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus.** Can J Physiol Pharmacol. 80(2002) 67-76.
122. Storr M., Sibaev A., Marsicano G., Lutz B., Schusdziarra V., Timmermans J. P., Allescher H. D. **Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 286 (2004) 110-117.

123. Sugiura T., Oka S., Gokoh M., Kishimoto S., Waku K. **New Perspectives in the Studies on Endocannabinoid and Cannabis: 2-Arachidonoylglycerol as a Possible Novel Mediator of Inflammation.** J Pharmacol Sci. 96 (2004) 367-375.
124. Szallasi A., Blumberg P. M. **Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms.** Pharmacol Rev. 51 (1999) 159-212.
125. Szallasi A. **Vanilloid receptor ligands: hopes and realities for the future.** Drugs Aging. 18 (2001) 561-573.
126. Tomita R., Fujisaki S., Park E., Ikeda T., Koshinaga T. **Substance P and vasoactive intestinal peptide in rat small-bowel isografts.** Am J Surg. 189 (2005) 63-70.
127. Trudel L., Tomasetto C., Rio M. C., Bouin M., Plourde V., Eberling P., Poitras P. **Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 282 (2002) 948-952.
128. Ueda N., Kurahashi Y., Yamamoto S., Tokunaga T. **Partial purification and characterization of the porcine brain enzyme hydrolyzing and synthesizing anandamide.** J Biol Chem. 270 (1995) 23823-23827.
129. Vasquez C., Lewis D. L. **The CB1 cannabinoid receptor can sequester G-proteins, making them unavailable to couple to other receptors.** J Neurosci. 19 (1999) 9271-9280.
130. Vergara P., Woskowska Z., Cipris S., Fox-Threlkeld J. E., Daniel E. E. **Somatostatin excites canine ileum ex vivo: role for nitric oxide?** Am J Physiol. 269 (1995) 12-21.
131. Vigna Steven R. **Cannabinoids and the gut.** (Editorial). Gastroenterology. 125 (2003).

132. Volante M. **Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth.** American Journal of Pathology. 162 (2003) 645-654.
133. Voruganti L. N., Slomka P., Zabel P., Mattar A., Awad A. G. **Cannabis induced dopamine release: an in-vivo SPECT study.** Psychiatry Res. 107 (2001) 173-177.
134. Wachtel S. R., El Sohly M. A., Ross S. A., Ambre J., de Wit H. **Comparison of the subjective effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol and marijuana in humans.** Psychopharmacology (Berl). 161 (2002) 331-339.
135. Walpole C. S., Bevan S., Bovermann G., Boelsterli J. J., Breckenridge R., Davies J. W., Hughes G. A., James I., Oberer L., Winter J. **The discovery of capsazepine, the first competitive antagonist of the sensory neuron excitants capsaicin and resiniferatoxin.** J Med Chem. 37 (1994) 1942-1954.
136. Whittaker V. P. **Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) as a cholinergic co-transmitter: some recent results.** Cell Biol Int Rep. 13 (1989) 1039-1051.
137. Whittaker V. P. **Thirty years of synaptosome research.** J Neurocytol. 22 (1993) 735-742.
138. Williamson E. M., Evans F. J. **Cannabinoids in clinical practice.** Drugs. 60 (2000) 1303-1314.
139. Wright K., Rooney N., Feeney M., Tate J., Robertson D., Welham M., Ward S. **Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing.** Gastroenterology. 129 (2005) 437-453.
140. Xu L., Depoortere I., Tomasetto C., Zandecki M., Tang M., Timmermans J. P., Peeters T.L. **Evidence for the presence of motilin, ghrelin, and the motilin and ghrelin receptor in neurons of the myenteric plexus.** Regul Pept. 124 (2005) 119-125.

141. Zimmer A., Zimmer A. M., Hohmann A. G., Herkenham M., Bonner T.I.
Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96 (1999) 5780-5785.
142. Zygmunt P. M., Hogestatt E. D., Waldeck K., Edwards G., Kirkup A. J., Weston A.H. **Studies on the effects of anandamide in rat hepatic artery.** Br J Pharmacol. 122 (1997) 1679-1686.
143. Zygmunt P. M, Petersson J., Andersson D. A., Chuang H., Sorgard M., Di Marzo V., Julius D., Hogestatt E. D. **Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide.** Nature. 400 (1999) 452-457.

11 Lebenslauf

PERSONALIEN:

Name: HAMEL

Vornamen: ANDREAS, MICHAEL

Geburtsdatum: 29.09.1974

Geburtsort: MÜNCHEN

Staatsangehörigkeit: DEUTSCH

Vater: HAMEL, MICHAEL; SOFTWARE-ENTWICKLER

Mutter: HAMEL, CHRISTIANE, † 16.06.2004

AUSBILDUNG:

1981- 1985 Grundschule Assling

1985- 1986 Gymnasium Grafing b. München

1986- 1995 Gymnasium Gars a. Inn

30.06.1995 Hochschulreife

1995- 1996 Zivildienst BRK Ebersberg

1996- 1997 Studium der Biologie in Würzburg

1997- 2004 Studium der Humanmedizin in München

31.03.2000 Ärztliche Vorprüfung

21.03.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

21.03.2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

20.04.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung