

Aus der Klinik und Poliklinik II - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. B. Göke

**Einfluss von Cannabinoiden auf die Motilität des
Dünn- und Dickdarms von Maus und Ratte**
Ajulemic Acid – Ein neues Cannabinoid ohne zentrale Nebenwirkungen

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

vorgelegt von
Markus Kemmer
aus
München
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Martin Storr
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Rainer Rupprecht Priv. Doz. Dr. Bärbel Otto
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Birol Yüce
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	25.06.2009

Meinen Eltern gewidmet

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation führten zu folgender Publikation und Vorträgen:

Publikationen:

Sibaev, A., Yüce, B., Kemmer, M., Van Nassauw, L., Broedl, U., Allescher, H-D., Göke, B., Timmermans, J-P., Storr, M.

Cannabinoid-1 (CB1) receptors regulate colonic propulsion by acting at motor neurons within the ascending motor pathways in mouse colon

American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology, 2009;
296:119-28

Vorträge:

Kemmer, M., Yüce, B., Sibaev, A., Müller, M., Kreis, M., Göke, B., Storr, M.

Cholinergic transmission in the enteric nervous system is inhibited by the novel peripherally active Cannabinoid Ajulemic Acid.

Jahrestagung 2008, 28. - 30.03.2008, Schloss Hohenkammer bei Freising

Kemmer, M., Yüce, B., Sibaev, A., Müller, M., Kreis, M., Göke, B., Storr, M.

Einfluss von Cannabinoiden auf die Dünndarmmotilität von Maus und Ratte

12. Retreat der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Klinikums Großhadern, München

19.11.2008, Kultur- und Tagungszentrum Starnberg, Schlossberghalle, 82319 Starnberg

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
3	MATERIAL UND METHODEN	6
3.1	ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN LONGITUDINALEN UND ZIRKULÄREN MUSKELSTREIFEN VON MAUS UND RATTE	6
3.1.1	<i>Versuchstiere</i>	6
3.1.2	<i>Versuchsordnung</i>	6
3.1.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	8
3.1.4	<i>Datenauswertung</i>	9
3.1.5	<i>Statistische Auswertung</i>	10
3.2	MYENTERISCHER ANTEIL DES PERISTALTISCHEN REFLEXES AM DÜNNDARM DER RATTE	10
3.2.1	<i>Versuchstiere</i>	10
3.2.2	<i>Versuchsordnung</i>	10
3.2.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	11
3.2.4	<i>Datenauswertung</i>	12
3.2.5	<i>Statistische Auswertung</i>	12
3.3	DÜNNDARMTRANSIT DER MAUS	13
3.3.1	<i>Versuchstiere</i>	13
3.3.2	<i>Versuchsdurchführung</i>	13
3.3.3	<i>Datenauswertung</i>	14
3.3.4	<i>Statistische Auswertung</i>	14
3.4	KOLON-EXPULSION DER MAUS	14
3.4.1	<i>Versuchstiere</i>	14
3.4.2	<i>Versuchsvorbereitung</i>	14
3.4.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	14
3.4.4	<i>Datenauswertung</i>	15
3.4.5	<i>Statistische Auswertung</i>	15

3.5	VERWENDETE SUBSTANZEN	16
3.6	VERWENDETE GERÄTE.....	17
4	ERGEBNISSE.....	19
4.1	ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION AN LONGITUDINALEN UND ZIRKULÄREN MUSKELSTREIFEN VON MAUS UND RATTE	19
4.1.1	<i>Frequenzauswahl zur Darstellung glattmuskulärer Kontraktionsereignisse</i>	<i>19</i>
4.1.2	<i>Charakterisierung der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente glattmuskulärer Kontraktionsereignisse mit Hilfe von Atropin und Tetrodotoxin.....</i>	<i>22</i>
4.1.3	<i>Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die longitudinale Muskulatur der Maus</i>	<i>26</i>
4.1.4	<i>Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die zirkuläre Muskulatur der Maus.....</i>	<i>29</i>
4.1.5	<i>Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die longitudinale Muskulatur der Ratte</i>	<i>31</i>
4.1.6	<i>Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die zirkuläre Muskulatur der Ratte.....</i>	<i>35</i>
4.1.7	<i>Wirkung von Ajulemic Acid auf die zirkuläre Muskulatur der Maus und Charakterisierung eventueller Effekte mit Blockern der CB₁-, CB₂-, TRPV₁-, Opioid-, ORL₁-, α- und β-Rezeptoren</i>	<i>37</i>
4.2	MYENTERISCHER ANTEIL DES PERISTALTISCHEN REFLEXES AM DÜNNDARM DER RATTE	39
4.2.1	<i>Exemplarische Darstellung der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation anhand von WIN 55,212-2</i>	<i>39</i>
4.2.2	<i>Wirkung von WIN 55,212-2 und SR 141716A auf die Amplitude, AUC und Latenz der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation.....</i>	<i>40</i>
4.2.3	<i>Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf die Amplitude, AUC und Latenz der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation.....</i>	<i>44</i>

4.3	DÜNNDARMTRANSIT DER MAUS	47
4.3.1	<i>Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf den Dünndarmtransit</i>	<i>47</i>
4.4	KOLON-EXPULSION DER MAUS	49
4.4.1	<i>Wirkung von WIN 55,212-2 und SR 141716A auf die Kolon-Expulsionszeit</i>	<i>49</i>
4.4.2	<i>Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf die Kolon-Expulsionszeit</i>	<i>50</i>
5	ALLGEMEINE DISKUSSION	51
5.1	DAS ENTERISCHE NERVENSYSTEM (ENS)	51
5.2	MEILENSTEINE DER CANNABINOID-FORSCHUNG	52
5.3	DAS ENDOCANNABINOIDSYSTEM	53
5.4	WIRKUNGEN DER CANNABINOIDE AUF DIE DARMMOTILITÄT	55
5.5	EINFLUSS DER CANNABINOIDE AUF ENTZÜNDUNG, SEKRETION UND SENSITIVITÄT IM GI-TRAKT	57
5.6	DIE MENSCHLICHE DARMMOTILITÄT – ANGEWANDTE CANNABINOID- FORSCHUNG	60
6	SPEZIELLE DISKUSSION	61
6.1	ELEKTRISCHE FELDSTIMULATION	62
6.2	EFS AN DER LONGITUDINALMUSKULATUR VON MAUS UND RATTE	63
6.3	EFS AN DER ZIRKULÄRMUSKULATUR VON MAUS UND RATTE	65
6.4	EFS DER ZIRKULÄRMUSKULATUR DER MAUS UND AJULEMIC ACID	66
6.5	PERISTALTISCHER REFLEX	69
6.6	DÜNNDARMTRANSIT	70
6.7	KOLON-EXPULSION	71

7	ZUSAMMENFASSUNG	74
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	76
9	TABELLENVERZEICHNIS	82
10	REFERENZEN	83
11	LEBENS LAUF	91
12	DANKSAGUNG	94

1 Einleitung

Das Endocannabinoidsystem (ECS), das in Menschen und anderen Lebewesen, wie Mäusen und Ratten, nachgewiesen werden konnte, spielt im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) eine bedeutende Rolle. Die Regulation von Motilität, Nozizeption und Inflammation im GI-Trakt durch die Liganden dieses Systems, die Cannabinoide, ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung in experimentellen und klinischen Studien.

Seit der Kenntnis spezifischer Cannabinoid-Rezeptoren, wie dem Cannabis 1-Rezeptor (CB₁) und dem pharmakologisch noch weitgehend unerforschten Cannabis 2-Rezeptor (CB₂) sowie verschiedener endogener Liganden (dem CB₁ / CB₂-Agonisten Anandamid oder dem CB₁-Agonisten Noladin), rücken auch synthetisch hergestellte Cannabinoide immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussbarkeit der Cannabinoid-Rezeptoren des ECS durch diese künstlich hergestellten Substanzen sollen langfristig dazu beitragen, die Palette an therapeutischen Optionen, u. a. zur Behandlung von Motilitätsstörungen des Darms, zu erweitern. Bisher werden Cannabinoide zur Behandlung der Chemotherapie assoziierten Übelkeit (Marinol[®] - Wirkstoff Dronabinol, Zulassung nur in den USA) und der mit dem metabolischen Syndrom im Zusammenhang stehenden Adipositas (Acomplia[®] - Wirkstoff Rimonabant) eingesetzt (43;69;88;96). Ein Grund für die bis dato noch spärliche Bandbreite zugelassener Medikamenten dieser Wirkungsgruppe ist sicherlich in den Nebenwirkungen der Cannabinoide zu suchen. Diese Substanzen sind stark lipophil und somit leicht liquorgängig. Die daraus resultierenden unerwünschten zentralen Nebenwirkungen, wie z. B. rauschähnliche Zustände und Benommenheit, geben Anlass dazu, nach alternativen Cannabinoiden zu suchen, die diese zentralen Nebenwirkungen nicht aufweisen (56). Mit Ajulemic Acid steht aktuell ein Cannabinoid zur Verfügung, das die Blut-Hirnschranke nicht zu überschreiten vermag und somit seine Wirkung nur peripher entfaltet. Untersuchungen zu Effekten dieser Substanz am GI-Trakt und im Speziellen am Darmtrakt sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht publiziert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von Cannabinoiden auf die Motilität des Dünndarm und Dickdarm von Maus und Ratte. In diesem Zusammenhang kamen synthetische Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten des ECS und das Cannabinoid Ajulemic Acid, dessen Wirkung und

Rezeptorzugehörigkeit am ECS noch unerforscht ist, zum Einsatz. Es wurden Experimente an zwei in vitro und zwei in vivo Versuchsmodellen durchgeführt. Unter den nachfolgenden Punkten A - D sind die Zielsetzungen dieser Versuche detailliert aufgeführt.

A Kontraktionen der longitudinalen und zirkulären Muskelschichten des Dünndarms von Mäusen und Ratten in vitro, induziert durch Elektrische Feldstimulation (EFS).

1. Vorversuche sollen die bestmöglichen Stimulationsparameter zur optimalen Darstellung und Wiederholbarkeit glattmuskulärer Kontraktionsereignisse ermitteln. Dies beinhaltet insbesondere eine optimale Darstellung der bekannten „schnellen“ neuronal-cholinergen als auch der „langsamen“ neuronal-tachykinergen Kontraktionsantwort.
2. Charakterisierung der „schnellen“ elektrisch induzierten Kontraktionen mit Hilfe von Atropin und Tetrodotoxin als neuronal-cholinerg vermittelt.
3. Charakterisierung der Beeinflussung der Kontraktion durch den synthetischen CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des synthetischen selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A.
4. Charakterisierung der Beeinflussung der Kontraktion durch das nicht-liquorgängige Cannabinoid Ajulemic Acid - und Charakterisierung eventueller Effekte mit Blockern der CB₁-, CB₂-, TRPV₁-, Opioid-, ORL₁-, α -Adreno- und β -Adrenorezeptoren.

B *Elektrisch induzierte aszendierende Kontraktionen des myenterischen Anteils des Peristaltischen Reflexes im Dünndarm von Ratten in vitro.*

1. Charakterisierung der Beeinflussung der aszendierenden Kontraktion durch den CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und den selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A.
2. Charakterisierung der Beeinflussung der aszendierenden Kontraktion durch das nicht-liquorgängige Cannabinoid Ajulemic Acid und Charakterisierung der beteiligten Rezeptoren.

C *Dünndarmtransit in vivo*

1. Charakterisierung des Einflusses des nicht-liquorgängigen Cannabinoids Ajulemic Acid und des selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A auf den Dünndarmtransit eines Farbmarkers.

D *Kolon-Expulsion in vivo*

1. Charakterisierung des Einflusses des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A auf die Kolon-Expulsion.
2. Charakterisierung des Einflusses des nicht-liquorgängigen Cannabinoids Ajulemic Acid auf die Kolon-Expulsion und Charakterisierung des möglichen Einflusses des CB₁-Rezeptors mit Hilfe des selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A.

2 Abkürzungsverzeichnis

ACh:	Acetylcholin
2-AG:	2-Arachidonylglycerol
AMT:	Anandamid Membran Transporter
ATP:	Adenosin-5'-triphosphat
AUC:	Area under the curve
CaCl₂:	Calciumchlorid
cAMP:	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBD:	Cannabidiol
CB:	Cannabinoid
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DW:	Dosis-Wirkungskurve
ECS:	Endocannabinoidsystem
EFS:	Elektrische Feldstimulation
ENS:	Enterisches Nervensystem
FAAH:	Fatty acid amide hydrolase
GDP:	Guanosindiphosphat
GI-Trakt:	Gastrointestinaltrakt
GTP:	Guanosintriphosphat
KCl:	Kaliumchlorid
KRP:	Krebs Ringer Puffer
MAGL:	Monoacylglycerol-Lipase
MgSO₄:	Magnesiumsulfat
NADA:	N-arachidonyldopamin
NANC:	Nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NaCl:	Natriumchlorid

NaHCO₃:	Natriumhydrogencarbonat
NaH₂PO₄:	Natriumdihydrogenphosphat
NO:	Stickstoffmonoxid
OEA:	Oleylethanolamid
ORL:	Opioid receptor like
PACAP:	Pituitary Adenylat Cyclase Activating Polypeptid
THC:	Tetrahydrocannabinol
TNBS:	Trinitrobenzensulphonsäure
TRP:	Transiente Rezeptorpotentialkanäle
TTX:	Tetrodotoxin
VIP:	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS:	Zentrales Nervensystem

3 Material und Methoden

3.1 Elektrische Feldstimulation an longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen von Maus und Ratte

3.1.1 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung wurden männliche C57/BL6 Mäuse (ca. 19 - 21 g) und männliche Wistar-Ratten (ca. 300 - 350 g) verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River GmbH, Sulzfeld/Deutschland bezogen. Bei einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus und unter standardisierten Bedingungen war eine artgerechte Haltung der Tiere gewährleistet. Die Tiere erhielten sowohl Trockenfutter als auch Wasser. Am Vorabend des Versuchstages wurden die Tiere nüchtern gesetzt, hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser.

3.1.2 Versuchsanordnung

Sechs doppelwandige Organbäder wurden je mit 6 ml Krebs Ringer Puffer (KRP) (NaCl 115,5 mM, MgSO₄ 1,16 mM, NaH₂PO₄ 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO₃ 21,9 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,16 mM) befüllt. Der umgebende Herzkreislauf hielt den mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begasten Puffer konstant bei einer Temperatur von 37,0 °C. Für die Versuche zur Längsmuskulatur des Dünndarms von Mäusen und Ratten wurden ca. 1 cm lange Streifen benutzt. An die beiden Enden der Streifen wurden nicht-elastische Fäden geknotet. Mit Hilfe des Fadens konnte das aborale Ende des Streifens sicher an einem Haken des Elektrodenhalters befestigt werden. Der Elektrodenhalter wies zwei Platinringe (ca. 0,6 cm Abstand voneinander) auf, durch die die Darmstreifen geführt wurden. Nach Einbringen des Elektrodenhalters samt Darmstreifen in das Organbad wurde der Faden des oralen Endes mit dem isometrischen Kraftwandler verbunden. Die durch den Stimulator ausgelöste EFS (Stimulationsparameter: 40 V, Pulsdauer 0,5 ms, Stimulationsdauer 10 sec, Stimulationsfrequenz Maus 10 Hz und 50 Hz; Ratte 10 Hz und 20 Hz) regte den Darm zur Kontraktion in longitudinaler Richtung an, die mit Hilfe des

Kraftwandlers, eines Verstärkers und des A/D-Wandlers am Monitor des PC's zur Darstellung kam (s. Abb. 1, S. 7).

Für die Versuche zur Ringmuskulatur des Dünndarms von Mäusen und Ratten wurden ca. 0,4 cm lange Streifen verwendet. Die Elektrodenhalter besaßen hier zwei obere und eine untere Platinstabelektrode im Abstand von ca. 0,6 cm. Die Streifen wurden derart auf die untere Elektrode des Elektrodenhalters und eines L-förmigen Platindrahtes, der mit dem Kraftwandler verbunden war, aufgefädelt, dass sich der Darm zwischen der unteren und den beiden oberen Elektroden des Elektrodenhalters befand und sich durch die EFS (Stimulationsparameter: 40 V, Pulsdauer 0,5 ms, Stimulationsdauer 10 sec, Stimulationsfrequenz Maus 10 Hz und 20 Hz; Ratte 20 Hz und 50 Hz) in zirkulärer Richtung kontrahierte. Die Aufzeichnung der Kontraktionen wurde analog, wie oben erwähnt, vorgenommen (s. Abb. 2, S. 8).

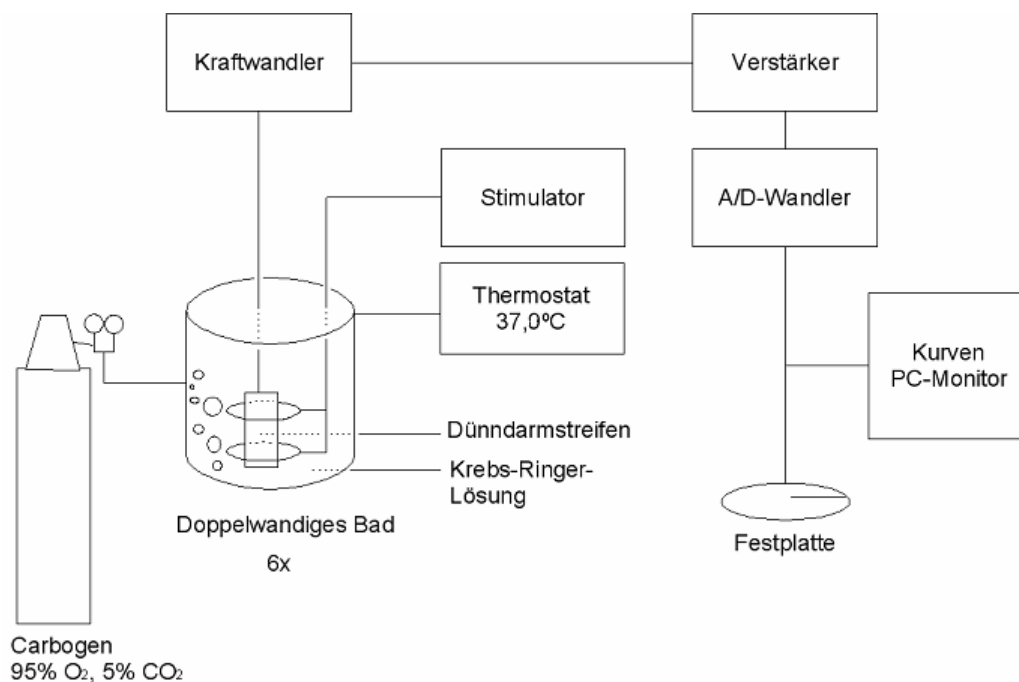


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen der Längsmuskulatur von Maus und Ratte.

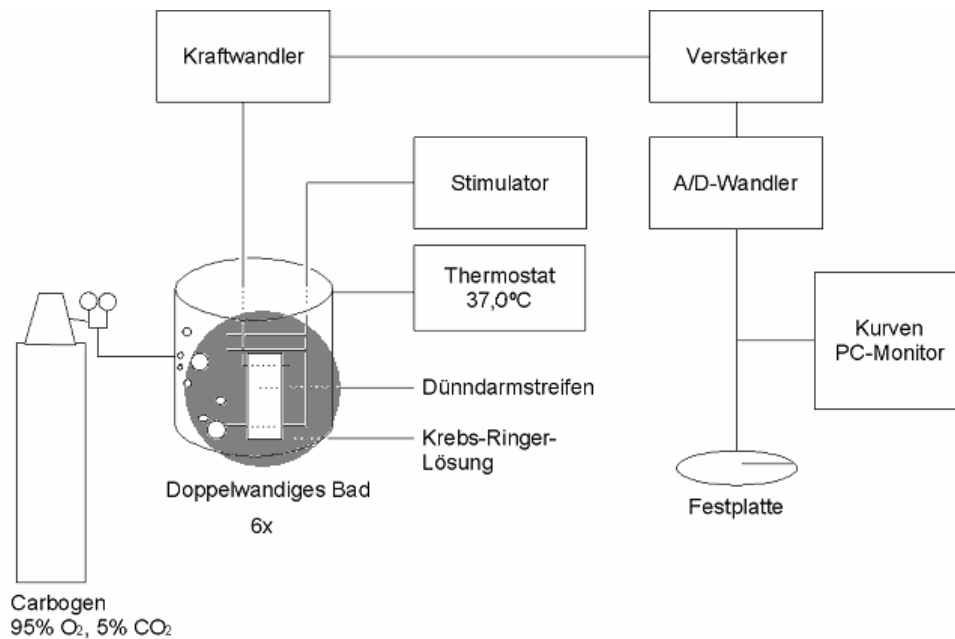


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen der zirkulären Muskulatur von Maus und Ratte. Der grau hinterlegte Bereich stellt – im Vergleich zu Abbildung 1 – die im vorausgegangenen Text beschriebenen Unterschiede/abweichenden Platzierungen der Elektroden und der Dünndarmstreifen dar.

3.1.3 Versuchsdurchführung

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran (Forene[®]) betäubt. Die Mäuse wurden anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Ratten bekamen im Nackenbereich eine Überdosis Natrium-Pentobarbital (Narcoren[®]) s. c. gespritzt. Nach Eröffnung des Abdomens durch einen Medianschnitt wurde das Ileum und das Jejunum dargestellt und entnommen. Während des Abpräparierens des Darmgekröses und der Darmspülung wurde dieser in ein mit KRP gefülltes Schälchen platziert und ständig mit Carbogen[®] begast. Nachdem ca. 1 cm bzw. ca. 0,4 cm lange Streifen angefertigt waren, wurden diese wie – in der Versuchsanordnung beschrieben – in die Organbäder eingebracht. Nach einem Pufferwechsel und dem Ende der Äquilibrationsphase von ca. 30 min wurde der Darm elektrisch stimuliert. Die ersten drei gleichmäßigen Kontraktionen, die im Abstand von 2 min ausgelöst wurden, dienten als Kontrollwerte. Nach Hinzufügen der Testsubstanzen in die Organbäder in kumulativ steigenden Konzentrationen und Abwarten der Einwirkzeit von je 15 min (Einwirkzeit von Tetrodotoxin und Atropin 5 min) wurden die Streifen einmal elektrisch stimuliert. In den Vorversuchen wurden

keine Testsubstanzen verwendet, sondern aufsteigende Frequenzen im Abstand von 3 min getestet. Im einzelnen wurden folgende Versuche durchgeführt:

- Vorversuche mit den Testfrequenzen 1, 5, 10, 20 und 50 Hz an longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen von Maus und Ratte. Auswahl von zwei Testfrequenzen zur optimalen Darstellung und Wiederholbarkeit glattmuskulärer Kontraktionsereignisse, insbesondere der „schnellen“ neuronal-cholinergen als auch der „langsamen“ neuronal-tachykinergen.
- Wirkung des Natrium-Kanalblockers Tetrodotoxin (3 x 1 μ M) und des m-cholino-Antagonisten Atropin (100 μ M) auf die „schnellen“ elektrisch induzierten Kontraktionen an longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen von Maus und Ratte.
- Eine Dosis-Wirkungskurve (DW) (1 nM-100 μ M) des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A an longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen von Maus und Ratte sowie eine DW von WIN 55,212-2 (1 nM-100 μ M) nach vorherigem Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M).
- Eine DW des Cannabinoids Ajulemic Acid (1 nM-100 μ M) alleine und nach vorherigem Blockadeversuch durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A (1 μ M), den CB₂-Antagonisten AM 630 (1 μ M), den TRPV₁-Antagonisten Capsazepine (10 μ M), den ORL₁-Antagonisten n-Phe-Nociceptin (1 μ M), den Opioid-Antagonisten Naloxon (1 μ M) und die Kombination aus dem α -Rezeptorblocker Phentolamine (1 μ M) und dem β -Rezeptorblocker Propranolol (1 μ M).

3.1.4 Datenauswertung

Die Amplituden der „schnellen“ und „langsamen“ Komponenten der elektrisch induzierten Kontraktionen gingen in die Auswertung ein. Die Amplitude stellte den größten Abstand zwischen dem Mittelwert der Basallinie und der Spitze der Amplitude dar. Der Kontrollwert ergab sich aus dem Mittelwert der drei zu Beginn durchgeführten Kontrollkontraktionen und wurde als 100% gewertet. Die Änderung der Amplitudenhöhe, die durch die Zugabe der Testsubstanzen bewirkt wurde, wurde

prozentual zum Kontrollwert ins Verhältnis gesetzt. Die Amplitude wurde mit Hilfe der Software SPIKE2 4.01 (Cambridge Electronic, Cambridge, U.K.) ausgewertet.

3.1.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard error of the mean SEM) angegeben. „n“ steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Organsegmenten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt.

3.2 Myenterischer Anteil des Peristaltischen Reflexes am Dünndarm der Ratte

3.2.1 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung wurden männliche Wistar-Ratten (300 - 400g) verwendet. Zur Bezugsquelle und Haltung der Tiere siehe 3.1.1. Die Tiere wurden am Vorabend des Versuchstages nüchtern gesetzt, hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser.

3.2.2 Versuchsanordnung

Zwei doppelwandige Organbäder wurden mit je ca. 40 ml KRP (NaCl 115,5 mM, MgSO₄ 1,16 mM, NaH₂PO₄ 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO₃ 21,9 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,16 mM) befüllt. Der kontinuierlich mit Carbogen[®] (95% O₂, 5% CO₂) begaste Puffer wurde durch den umgebenden Herzkreislauf konstant bei einer Temperatur von 37,0 °C gehalten. Ca. 10 cm lange Dünndarmstreifen wurden auf einen Drahtstab, der als Widerlager diente, aufgefädelt. Der Draht wurde in die beidseits an den Enden des Organbads gelegenen Abflussrohre aus Gummi eingeführt. Beide Darmenden wurden über die Abflussrohre gestülpt und mit Kanülen sicher fixiert. Bei freier Beweglichkeit war auch eine konstante Höhe des Darms sichergestellt. Zur elektrischen Stimulation des Darms durch die EFS

(Stimulationsparameter: 40 V, Pulsdauer 0,5 ms, Stimulationsdauer 15 sec, Stimulationsfrequenz 3 Hz) wurde über das aborale Ende eine Platinelektrode kontaktfrei angelegt. Zwei Klammern des isometrischen Kraftwandlers wurden 2 cm und 4 cm oral der Stimulationselektrode angebracht. Die durch die EFS ausgelösten ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulationselektrode konnten mit Hilfe des Kraftwandlers, eines Verstärkers und eines A/D-Wandlers getrennt auf dem Monitor des PC's dargestellt werden.

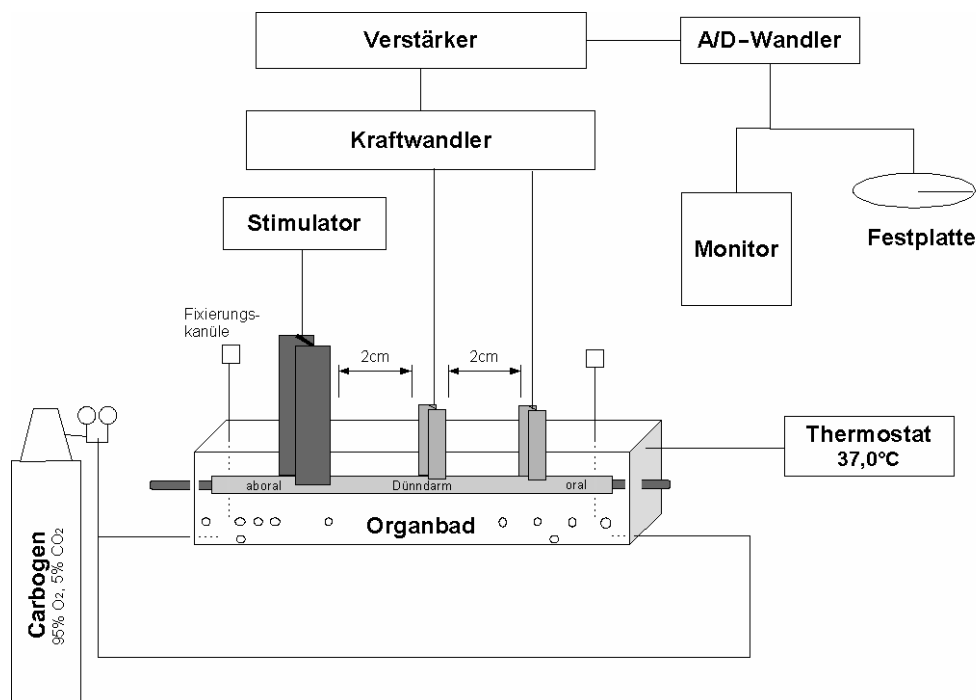


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen des Peristaltischen Reflexes 2 cm und 4 cm oral der Stimulationselektrode.

3.2.3 Versuchsdurchführung

Den Versuchstieren wurde nach kurzer Betäubung durch Isofluran (Forene[®]) im Nackenbereich eine subkutane Injektion mit Natrium-Pentobarbital (Narcoren[®]) in einer Dosierung von 250 mg/kg/KG gesetzt. Nach eingetretener Bewusstlosigkeit wurde das Abdomen mittels Medianschnitt eröffnet und der Pylorus und das Duodenum dargestellt. Zur Darmreinigung mit KRP in situ wurde nach Inzision des Duodenums ein Katheter eingeführt. Der noch im Darm vorhandene Inhalt konnte über das eröffnete terminale Ileum abfließen. Nach der Reinigung wurde der entnommene Darm in ein Schälchen mit KRP, der kontinuierlich mit Carbogen[®]

begast wurde, gelegt und vom Darmgekröse befreit. 10 cm lange Darmstreifen wurden, wie in 3.2.2 beschrieben, in die beiden Organbäder eingebracht.

Die Darmstreifen wurden kontinuierlich im Abstand von 2 min elektrisch stimuliert. Nach Ablauf der 30-minütigen Äquilibrationsphase dienten drei aufeinander folgende, gleichmäßige Kontraktionen als Kontrolle. Bei den anschließend in kumulativ steigender Konzentration zugegebenen Testsubstanzen wurde eine Einwirkzeit von 15 min eingehalten. Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Eine DW (1 nM-10 μ M) des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des CB₁-Antagonisten SR 141716A sowie eine DW (1 nM-10 μ M) von WIN 55,212-2 nach vorherigem Blockadeversuch durch SR 141716A (100 nM).
- Eine DW (1 nM-10 μ M) des Cannabinoids Ajulemic Acid alleine sowie nach vorherigem Blockadeversuch durch SR 141716A (100 nM).

3.2.4 Datenauswertung

Die Messparameter Amplitude, Fläche unter der Kurve und die Latenz wurden zur Auswertung herangezogen. Alle Messgrößen wurden mit Hilfe der Software SPIKE2 4.01 (Cambridge Electronic, Cambridge, U.K.) ausgewertet. Die Amplitude wurde als größter Abstand zwischen der Basallinie der Spontanaktivität und dem höchsten Punkt der jeweiligen Reflexantwort beurteilt. Die Fläche unter der Kurve errechnete die erwähnte Software. Die Zeit zwischen dem Stimulationsstart und dem Beginn der Kontraktion wurde als Latenz definiert.

Aus dem Mittelwert der ersten drei gleichmäßigen Kontraktionen nach Ablauf der Äquilibrationsphase ergab sich der Kontrollwert. Die Wirkung der Testsubstanzen wurde prozentual zum Kontrollwert berechnet. In die prozentuale Berechnung gingen jeweils der Mittelwert der letzten drei aufeinanderfolgenden Kontraktionen vor bis einschließlich Ablauf der angegebenen Einwirkzeit der Testsubstanzen ein.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard error of the mean SEM) angegeben. „n“ steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Organsegmenten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der

Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt.

3.3 Dünndarmtransit der Maus

3.3.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche C57/Bl6 Mäuse (ca. 19 - 21 g) verwendet. Zur Bezugsquelle und Haltung der Tiere siehe 3.1.1. Am Vorabend des Versuchstages wurden die Mäuse nüchtern gesetzt, hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser. Zwischen den einzelnen Versuchstagen wurde zwei Tage pausiert.

3.3.2 Versuchsdurchführung

Nach kurzer Betäubung mit Isofluran (Forene[®]) erhielten die Mäuse mittels einer Fütterungssonde 0,3 ml eines nicht resorbierbaren Markers (10% Carbo medicinalis, 5% gum arabicum) per os appliziert. 20 min nach der Instillation wurden die Versuchstiere nach wiederholter Betäubung durch zervikale Dislokation getötet. Sofort danach wurde das Abdomen durch einen Medianschnitt eröffnet und der Dünndarm der Tiere entnommen.

Die Testsubstanz Ajulemic Acid wurde den Mäusen nach kurzer Isofluran-Betäubung in kumulativ steigenden Konzentrationen intraperitoneal gespritzt. Nach Abwarten der Einwirkzeit von 40 min wurde den Mäusen – wie beschrieben – der Farbmarder appliziert. Bei dem Versuch, in dem sowohl der CB₁-Antagonist SR 141716A als auch Ajulemic Acid injiziert wurden, wurde 10 min nach Injektion des Antagonisten der Agonist gespritzt und dann weitere 30 min Einwirkzeit abgewartet.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Wirkung des Cannabinoids Ajulemic Acid in Konzentrationen von 1,0, 2,5, 5,0 und 10,0 mg/kg/KG auf den Dünndarmtransit.
- Wirkung des Cannabinoids Ajulemic Acid in Konzentrationen von 1,0, 2,5 und 5,0 mg/kg/KG nach vorheriger CB₁-Rezeptorblockade durch SR 141716A in einer Konzentration von 0,62 mg/kg/KG auf den Dünndarmtransit.

3.3.3 Datenauswertung

Die nach dem Pylorus zurückgelegte Strecke der Markersubstanz in Millimeter wurde ins Verhältnis zur Gesamtlänge des Dünndarms vom Pylorus bis zum Zökum gesetzt und in Prozent angegeben.

3.3.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard error of the mean SEM) angegeben. „n“ steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Versuchstieren. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Student-t-Test für ungepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt.

3.4 Kolon-Expulsion der Maus

3.4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche C57/Bl6 Mäuse (ca. 19 - 21 g) verwendet. Zur Bezugsquelle und Haltung der Tiere siehe 3.1.1. Am Vorabend des Versuchstages wurden die Mäuse nüchtern gesetzt, hatten aber weiterhin freien Zugang zu Wasser. Zwischen den einzelnen Versuchstagen wurde zwei Tage pausiert.

3.4.2 Versuchsvorbereitung

Alle Tiere wurden an zwei Versuchstagen an die unter 3.4.3 beschriebene Versuchsdurchführung ohne intraperitoneale Injektion gewöhnt.

3.4.3 Versuchsdurchführung

Nach kurzer Betäubung der Mäuse mit Isofluran (Forene[®]) wurde ihnen eine ca. 3 mm große, körperwarme Glaskugel mit Hilfe eines mit Gleitgel befeuchteten Pushers ca. 2,5 cm in das distale Kolon eingeführt. Die Zeit, bis die Glaskugel wieder ausgeschieden wurde, wurde gemessen und diente als Kontrollwert.

Testsubstanzen wurden den Mäusen nach kurzer Isofluran-Betäubung in kumulativ steigenden Konzentrationen intraperitoneal gespritzt. Nach Abwarten der Einwirkzeit von 40 min wurde den Mäusen – wie beschrieben – die Glaskugel appliziert und die Zeit bis zu ihrer Ausscheidung gemessen. Bei Versuchen, in denen sowohl ein Antagonist als auch ein Agonist injiziert wurden, wurde 10 min nach Injektion des Antagonisten der Agonist gespritzt und dann weitere 30 min Einwirkzeit abgewartet.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Wirkung des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des Cannabinoids Ajulemic Acid in Konzentrationen von 0,1, 0,3, 1,0 und 3,0 mg/kg/KG auf die Kolon-Expulsionszeit.
- Wirkung des CB₁-Antagonisten SR 141716A in Konzentrationen von 0,3, 1,0, 10,0 und 20,0 mg/kg/KG auf die Kolon-Expulsionszeit.
- Wirkung des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und des Cannabinoids Ajulemic Acid in Konzentrationen von 0,1, 0,3, 1,0 und 3,0 mg/kg/KG nach vorherigem Blockadeversuch durch SR 141716A in einer Konzentration von 1,0 mg/kg/KG.

3.4.4 Datenauswertung

Der Mittelwert der Kontrollzeiten wurde als 100% gesetzt. Der Mittelwert der erreichten Zeiten bei Einsatz der Testsubstanzen in den unterschiedlichen Konzentrationen wurde prozentual zum Mittelwert der Kontrollzeit ins Verhältnis gesetzt.

3.4.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (Standard error of the mean SEM) angegeben. „n“ steht für die Anzahl unabhängiger Experimente an unterschiedlichen Versuchstieren. Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der Student-t-Test für gepaarte Stichproben angewendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,01$ festgelegt.

3.5 Verwendete Substanzen

Atropin:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)
Tetrodotoxin:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
WIN 55,212-2:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
SR 141716:	(Sanofi-Synthelabo Recherche, Longjumeau, Frankreich)
Ajulemic Acid:	(Geschenk von Indevus Pharmaceuticals, Inc., New Jersey, USA)
Capsazepine:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
Propranolol:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)
Phentolamine:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)
AM 630:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
n-Phe-Nociceptin:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
Naloxon:	(Tocris Bioscience, Ellisville, USA)
Narcoren:	(Merial, Hallbergmoos, Deutschland)
Forene:	(Abbott GmbH & CO. KG, Wiesbaden, Deutschland)
DMSO:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)
Essigsäure 100%:	(Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
NaCl 0,9%:	(B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Carbo medicinalis:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)
gum arabicum:	(Sigma Aldrich, München, Deutschland)

Die Endverdünnung aller Testsubstanzen für die Versuche zur Elektrischen Feldstimulation (3.1) und zum Peristaltischen Reflex (3.2) wurde so gewählt, dass durch die Zugabe von 6 µl bzw. 40 µl die erwünschte Endkonzentration im Organbad erreicht wurde. Für die Versuche zum Dünndarmtransit und zur Kolon-Expulsion wurden die Substanzen gleich in den angegebenen Konzentrationen zubereitet.

Die Testsubstanzen wurden in folgenden Lösungsmitteln zubereitet:

- WIN 55,212-2, SR 141716A, Ajulemic Acid, Capsazepine und AM 630 wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in Aqua ad injectabilis bis zur gewünschten Konzentration verdünnt.

- Für die Substanzen Atropin, Propranolol, Phentolamine und Naloxon kam Natriumchlorid 0,9% als Lösungsmittel zum Einsatz.
- Für die Testsubstanz Tetrodotoxin wurde Essigsäure 100% benutzt. Die gewünschte Konzentration wurde durch die Verdünnung mit Aqua ad injectabilis erzielt.
- n-Phe-Nociceptin konnte durch Natriumchlorid 0,9% in Lösung gebracht werden.
- Die Lösung von Carbo medicinalis und gum arabicum erfolgte in NaCl 0,9%.

3.6 Verwendete Geräte

Kraftwandler:	FTO3C Force Transducer (Grass, Quincy, Massachusetts, USA)
Verstärker:	Transbridge (World Precision Instruments, Inc., Florida, USA)
Analog-to-digital Wandler:	Power 1401 (Cambridge Electronic, Cambridge, U.K.)
Stimulator:	Grass S11 Stimulator (Grass, Quincy, Massachusetts, USA)
Stimulatorbox :	Eigenbau Ralf Heigermoser (cand. med., II. Med. Klinik, LMU München, München, Deutschland)
Computer:	(Fujitsu Siemens Computers GmbH, München, Deutschland)
Software Origin:	Version 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA)
Platinelektroden Organbad:	Eigenbau Dr. med. Andrei Sibaev (II. Med. Klinik, LMU München, München, Deutschland)
Thermostat:	Thermomix 1420 (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Mundgeblasenes Organbad doppelwandig aus Glas:	(Laborglaswaren Josef Schmitz, München, Deutschland)
Platinelektroden in Glas:	Eigenbau Prof. Dr. med. Hans-Dieter Allescher, (Chefarzt Klinikum Garmisch-Partenkirchen GmbH, Garmisch-Partenkirchen, Deutschland)

Glaskugeln: (Laborglaswaren Josef Schmitz, München,
Deutschland)

Software SPIKE2: Version 4.01 (Cambridge Electronic, Cambridge, U.K.)

4 Ergebnisse

4.1 Elektrische Feldstimulation an longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen von Maus und Ratte

4.1.1 Frequenzauswahl zur Darstellung glattmuskulärer Kontraktionsereignisse

Die Größe der Amplitude der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente der glattmuskulären Kontraktion ist abhängig von der Stimulationsfrequenz. Mit steigender Testfrequenz vergrößerten sich die Amplituden beider Komponenten. Eine Ausnahme ergab sich bei der Kontraktionsantwort der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei 50 Hz. Hier wurde ein Abfall der Amplitudengröße beider Kontraktionsanteile beobachtet. „Langsame“ Komponenten traten gut sichtbar bei Versuchen zur longitudinalen Muskulatur beider Tierspezies auf. In Versuchen zur zirkulären Muskulatur trat die „langsame“ Komponente ausschließlich bei Ratten – nur in Ansätzen und nicht kontinuierlich – reproduzierbar auf.

In den später aufgeführten Versuchen mit Testsubstanzen ergaben sich Änderungen der Amplitudengrößen beider Komponenten. Um einen möglichen Einfluss der Frequenz auf diese Veränderungen beurteilen zu können, wurden in den Vorversuchen zwei Frequenzen ausgewählt. Die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus war nur in höherer Frequenz (50 Hz) darstellbar und wurde deswegen anhand nur einer Frequenz beurteilt. Testfrequenzen größer als 50 Hz wurden nicht ausgetestet.

Die Kriterien der bestmöglichen Darstellbarkeit und Wiederholbarkeit erfüllten die folgenden tabellarisch (s. Tabelle 1, S. 20) dargestellten Testfrequenzen:

Tabelle 1: Ausgewählte Frequenzen zur bestmöglichen Darstellung und Wiederholbarkeit der „schnellen“ und „langsamen“ Komponente der longitudinalen und zirkulären Muskulatur von Maus und Ratte.

Tierart	Frequenz der „schnellen“ Komponente / longitudinale Muskulatur	Frequenz der „langsamen“ Komponente / longitudinale Muskulatur	Frequenz der „schnellen“ Komponente / zirkuläre Muskulatur	Frequenz der „langsamen“ Komponente / zirkuläre Muskulatur
Maus	10 Hz, 50 Hz	50 Hz	10 Hz, 20 Hz	-----
Ratte	10 Hz, 20 Hz	10 Hz, 20 Hz	20 Hz, 50 Hz	(50 Hz)

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Kontraktionsantworten der glatten Muskulatur von Maus und Ratte.

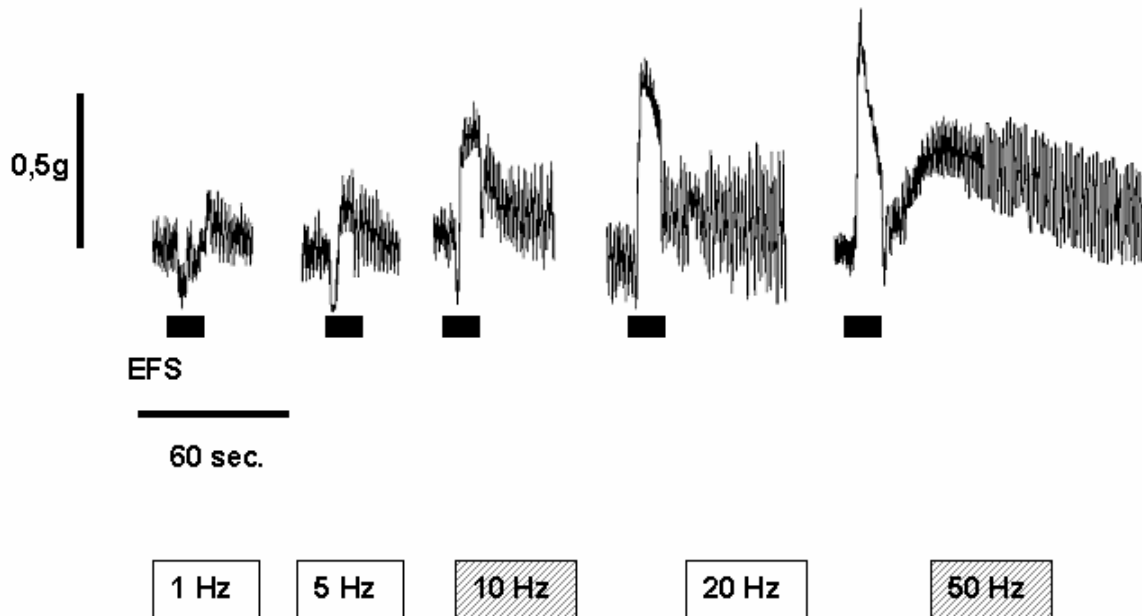


Abbildung 5: Kontraktionsantworten der longitudinalen Muskulatur der Maus bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert.

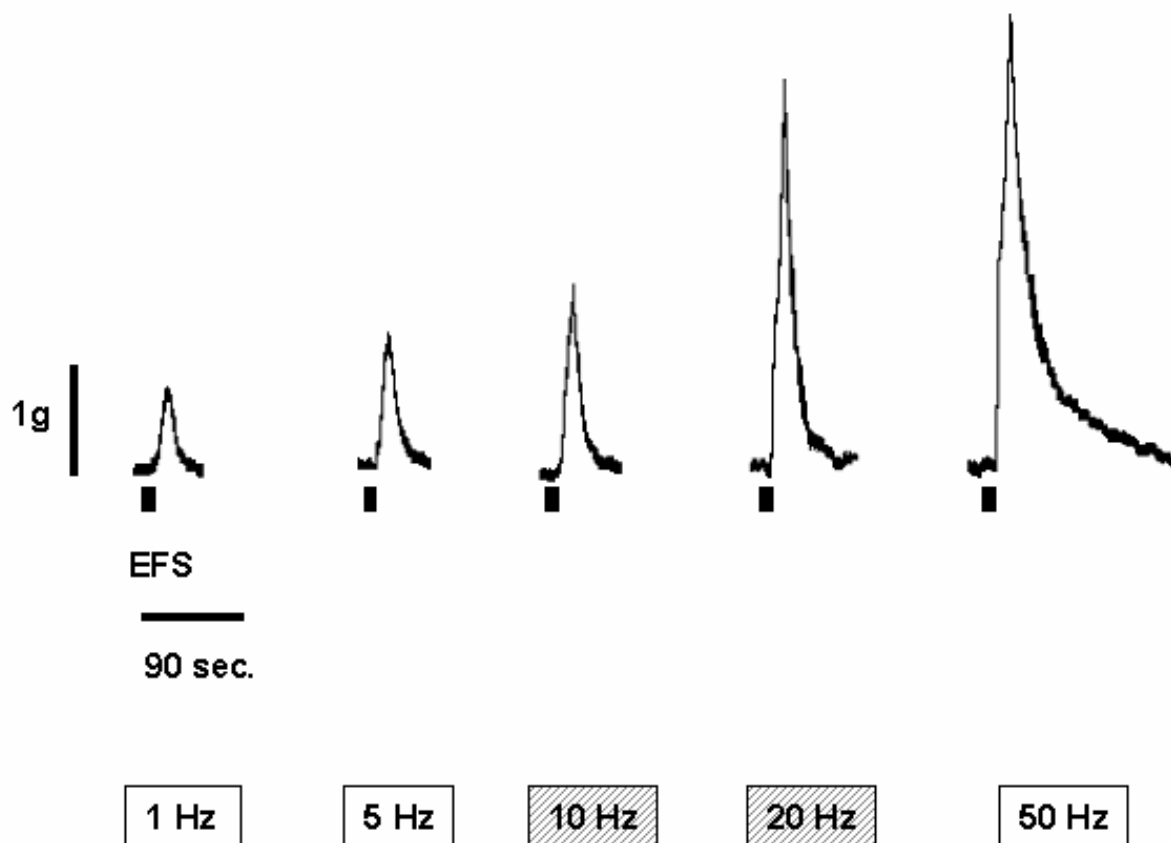


Abbildung 6: Kontraktionsantworten der zirkulären Muskulatur der Maus bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert.

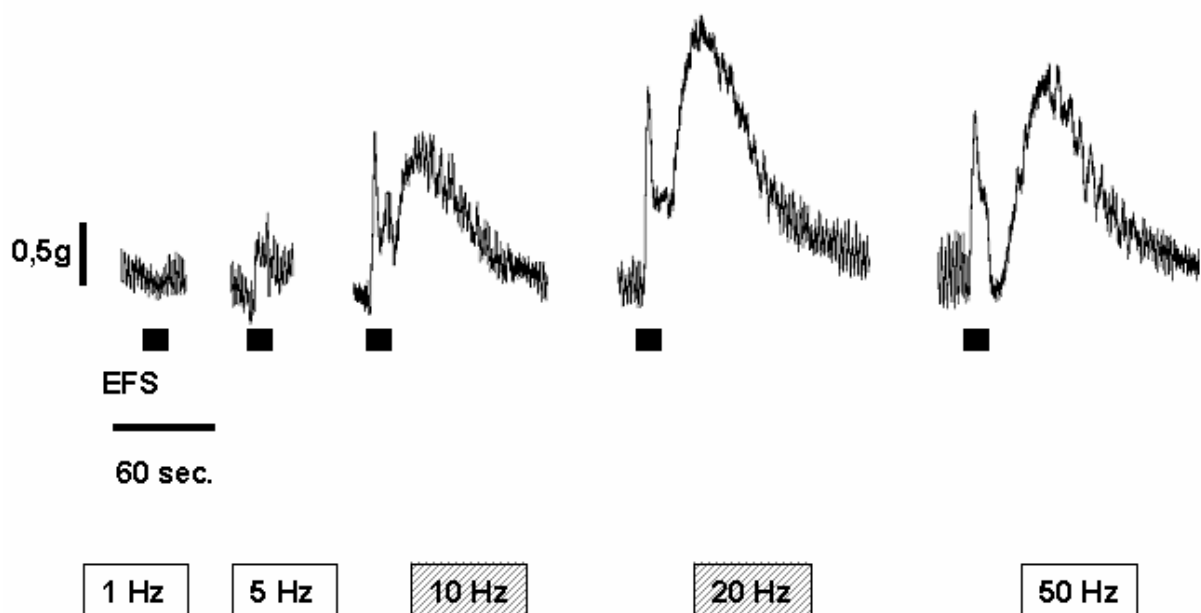


Abbildung 7: Kontraktionsantworten der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert.

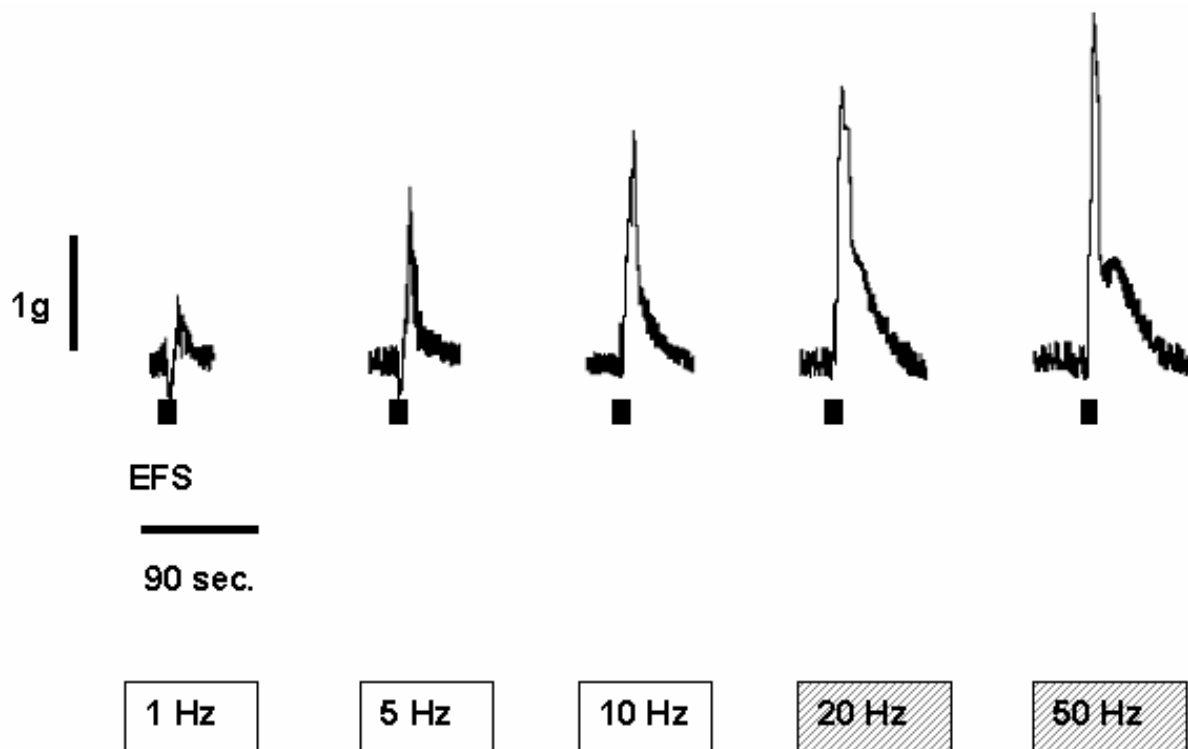


Abbildung 8: Kontraktionsantworten der zirkulären Muskulatur der Ratte bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert.

4.1.2 Charakterisierung der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente glattmuskulärer Kontraktionsereignisse mit Hilfe von Atropin und Tetrodotoxin

Die Zugabe des m-cholino-Rezeptorantagonisten Atropin in das Organbad bewirkte bei der longitudinalen Muskulatur von Maus und Ratte die völlige Blockade der „schnellen“ Komponente. Diese war begleitet von einer deutlichen Reduktion der Amplitudenhöhe der „langsamen“ Komponente. Diese Tatsache belegt, dass die „schnellen“ Anteile der Kontraktionen cholinerg vermittelt werden. An der zirkulären Muskulatur beider Tierspezies ergab die deutliche Reduktion der Amplitude den Beweis, dass die „schnelle“ Komponente zum überwiegenden Anteil durch den Neurotransmitter Acetylcholin vermittelt wird.

Die Zugabe des Na^+ -Kanal Blockers Tetrodotoxin führte an der longitudinalen Muskulatur von Maus und Ratte zur völligen Auslöschung jeglicher Kontraktionsantwort. Die Auslösung der „schnellen“ Komponente auf neuronalem Wege ist somit bewiesen. Die Kontraktionen der zirkulären Muskulatur beider Tierspezies waren nach Zugabe von Tetrodotoxin deutlich reduziert. Die „schnellen“ Kontraktionen werden folglich zum größten Teil neuronal vermittelt.

Die folgenden Abbildungen veranschaulichen diese Ergebnisse:

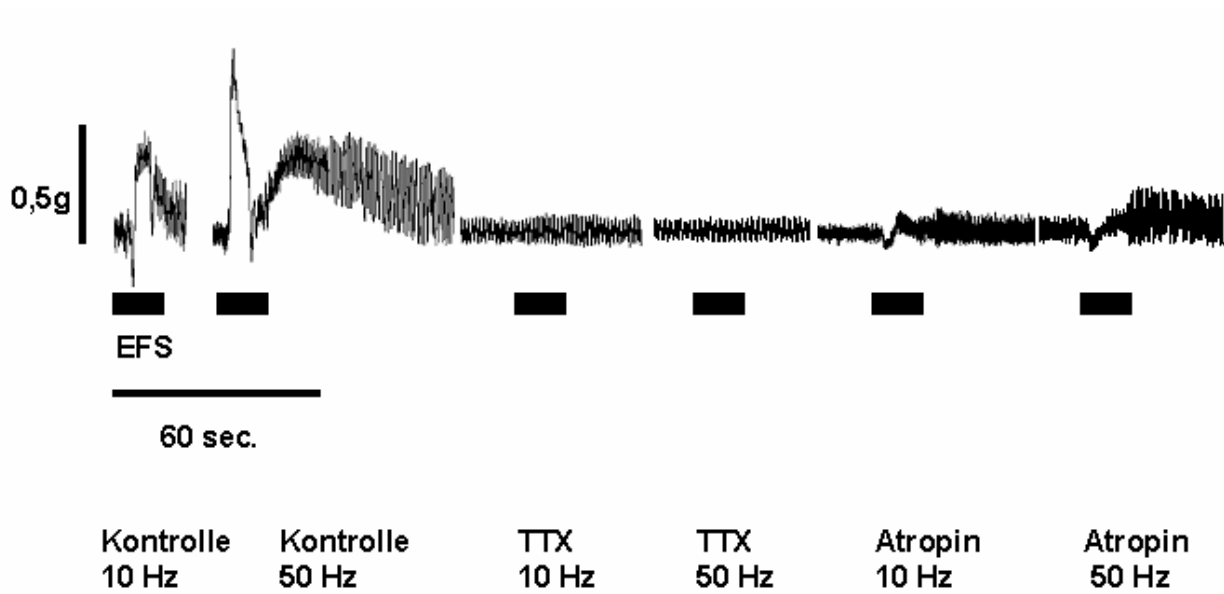


Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin (TTX) und Atropin auf die Kontraktionsantwort der longitudinalen Muskulatur der Maus bei 10 Hz und 50 Hz.

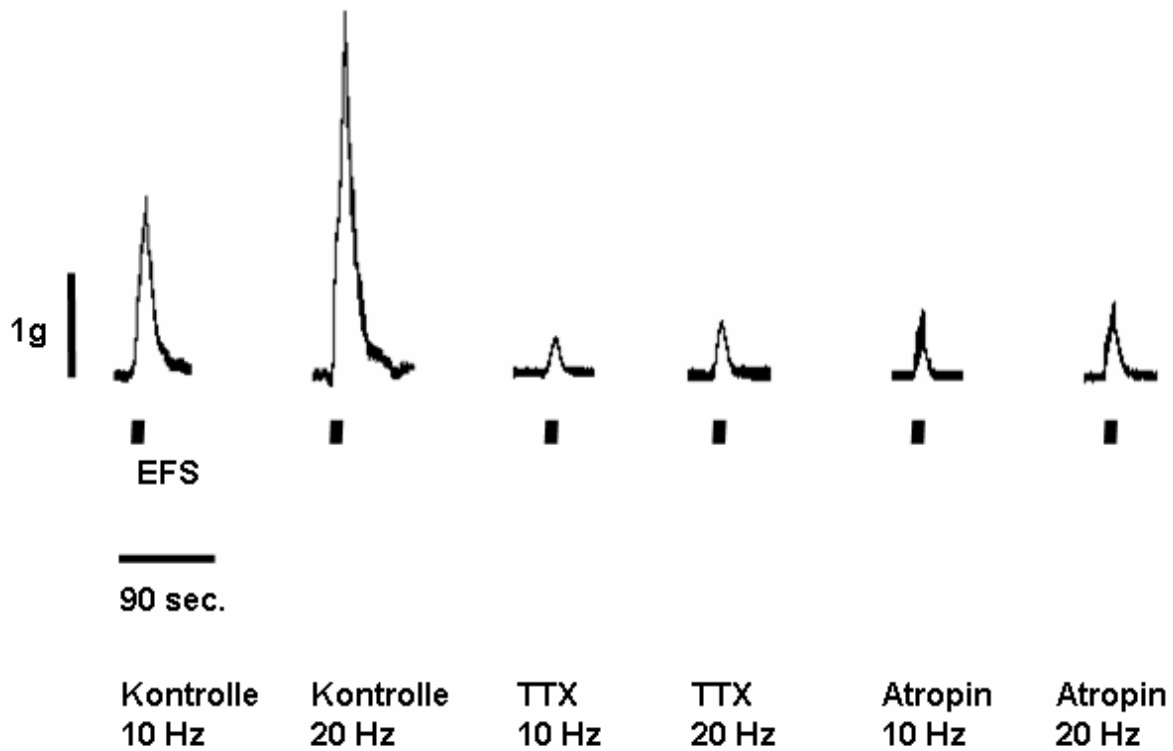


Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der zirkulären Muskulatur der Maus bei 10 Hz und 20 Hz.

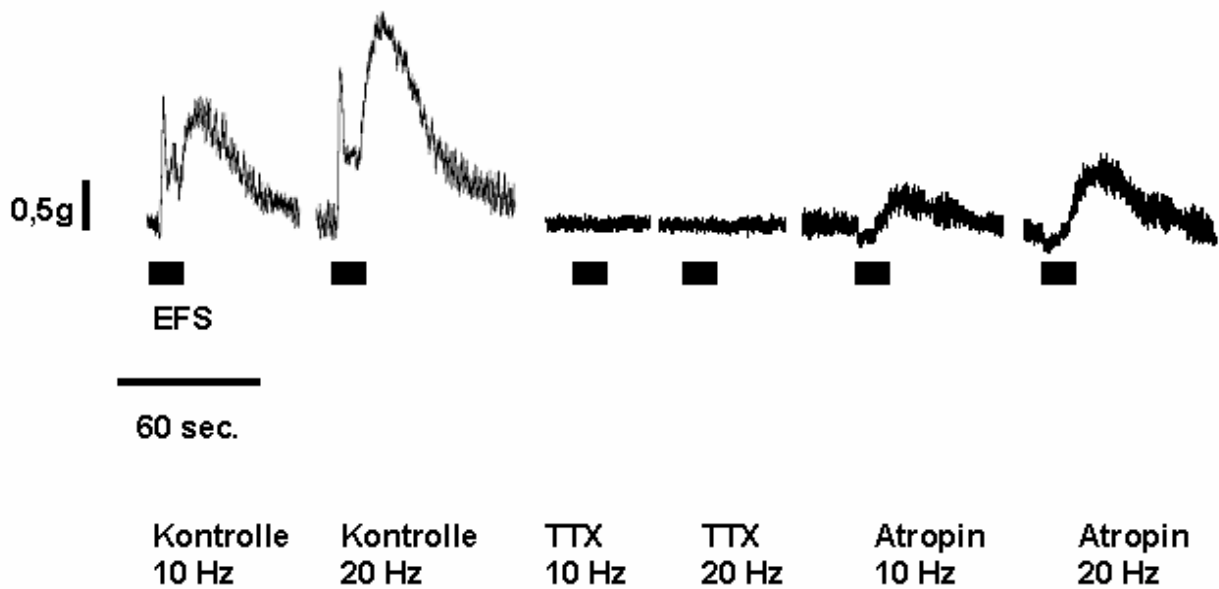


Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei 10 Hz und 20 Hz.

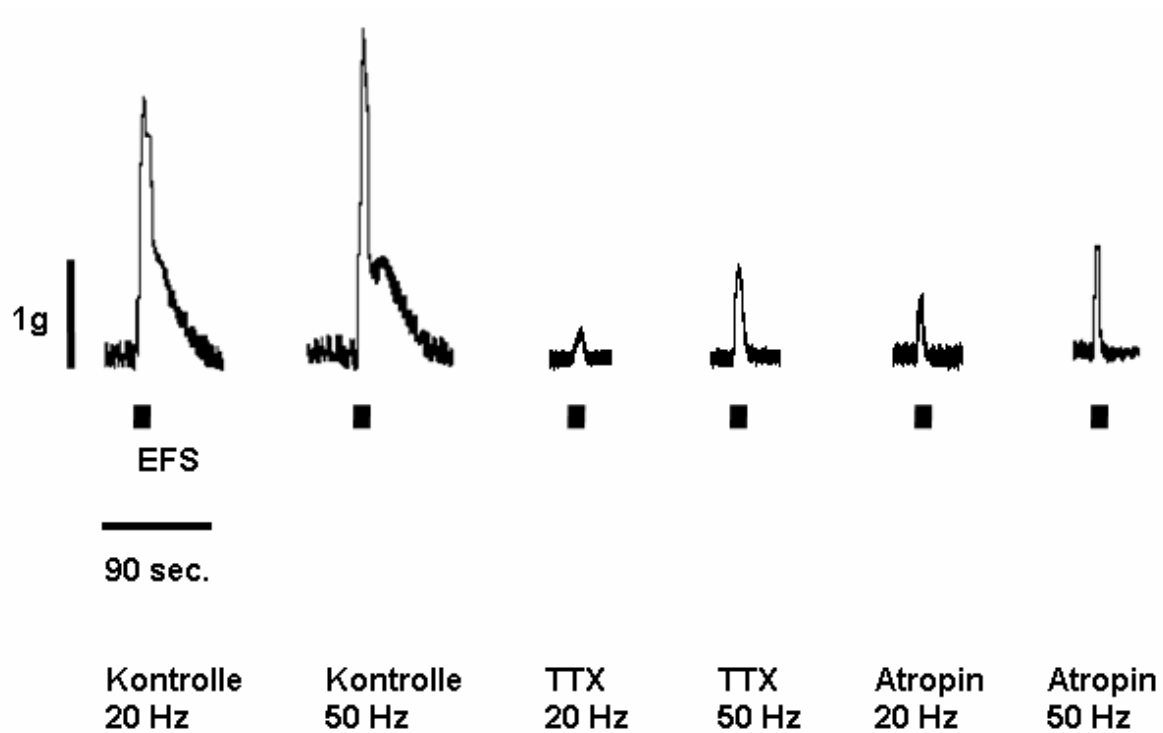


Abbildung 12: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der zirkulären Muskulatur der Ratte bei 20 Hz und 50 Hz.

Die für diese Versuche benutzten Trägersubstanzen Essigsäure 100% und NaCl 0,9% zeigten keinen Einfluss auf die Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt).

4.1.3 Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die longitudinale Muskulatur der Maus

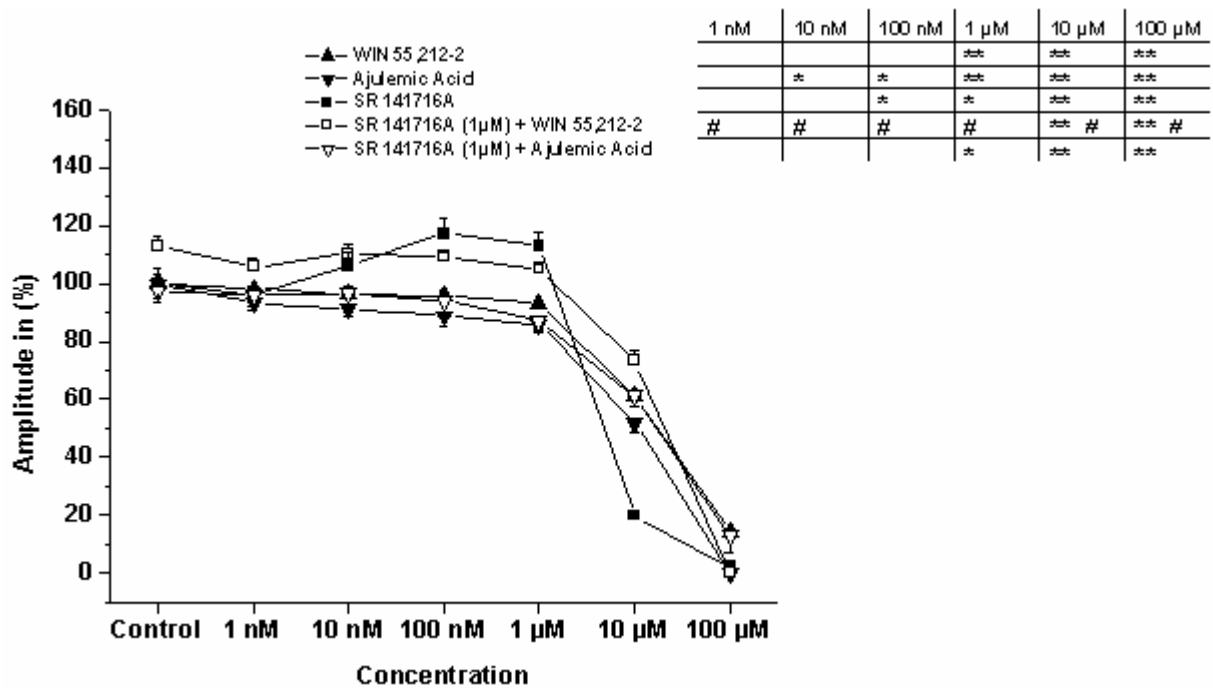


Abbildung 13: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 µM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 µM) + Ajulemic Acid; n = 6.

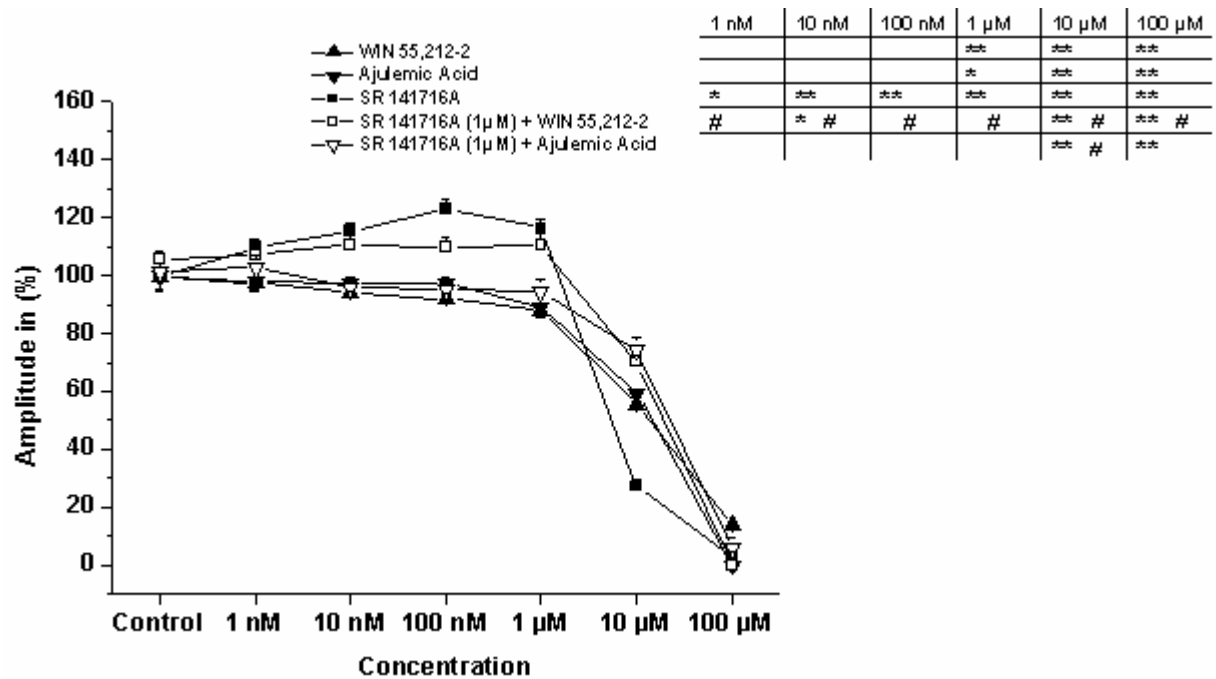


Abbildung 14: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 µM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 µM) + Ajulemic Acid; n = 6.

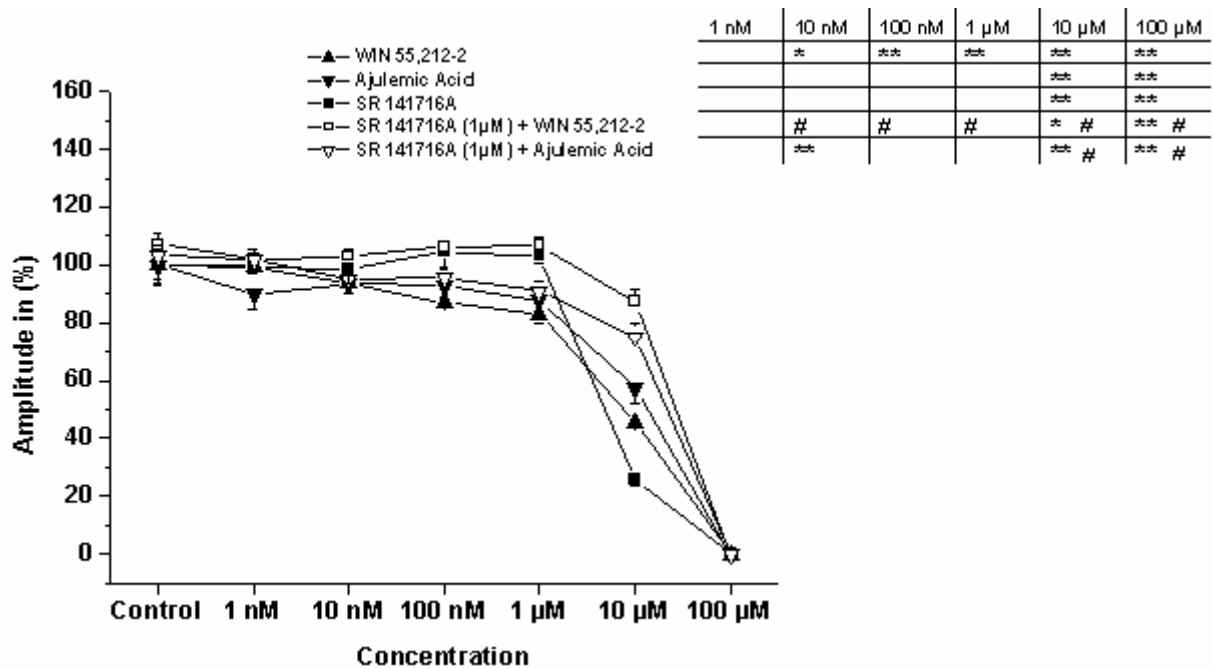


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 µM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 µM) + Ajulemic Acid; $n = 6$.

Der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 und das Cannabinoid Ajulemic Acid bewirken bei Zugabe in kumulativ steigenden Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Amplitude der „schnellen“ Komponente bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz und 50 Hz. Der CB₁-Antagonist SR 141716A lässt zunächst einen signifikanten Anstieg der Amplitude erkennen und verdeutlicht durch den Abfall der Amplitude bei Zugabe in einer Konzentration von $\geq 10 \mu\text{M}$ seine Wirkung als inverser Agonist.

Die nachstehenden Abbildungen zeigen, dass SR 141716A die Wirkung von WIN 55,212-2 zu blockieren vermag, die Wirkung von Ajulemic Acid aber nicht antagonisiert werden kann.

Die Amplituden der „langsamen“ Komponente (50 Hz) der Kontraktionsantworten verhalten sich weitgehend analog zu denen der „schnellen“ Komponente. Der Amplitudenanstieg nach Zugabe von SR 141716A ist hier nicht zu verzeichnen.

Alle Signifikanzen sind im Rahmen der Abbildungen dargestellt.

4.1.4 Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die zirkuläre Muskulatur der Maus

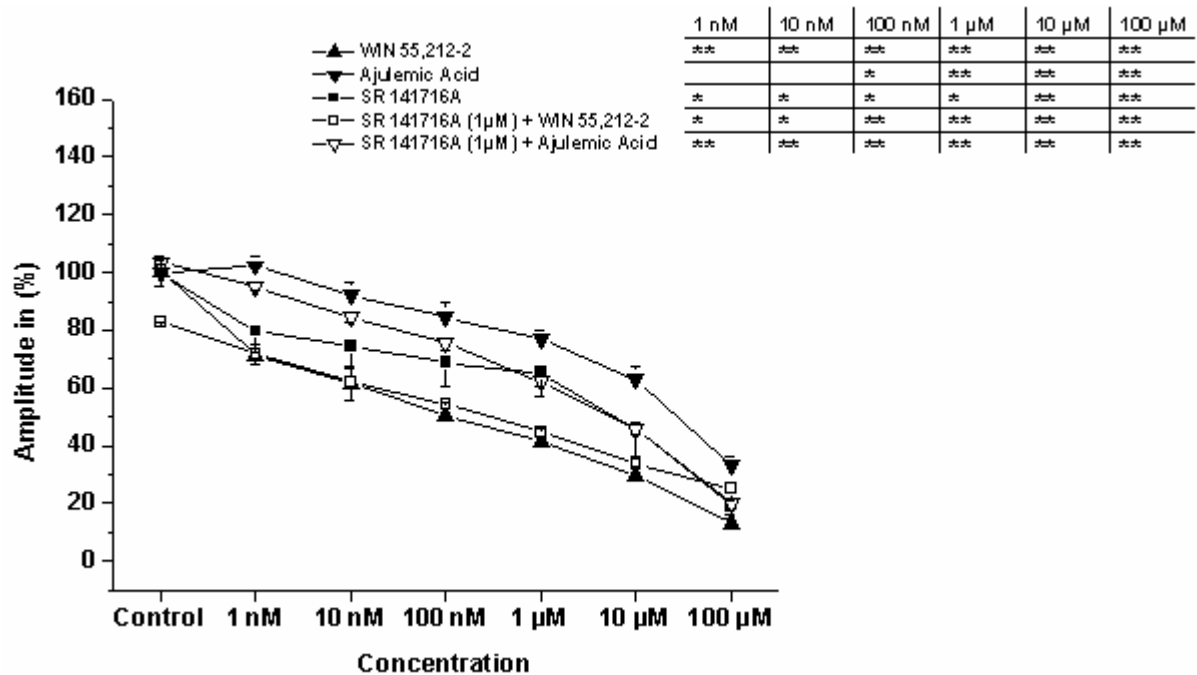


Abbildung 16: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

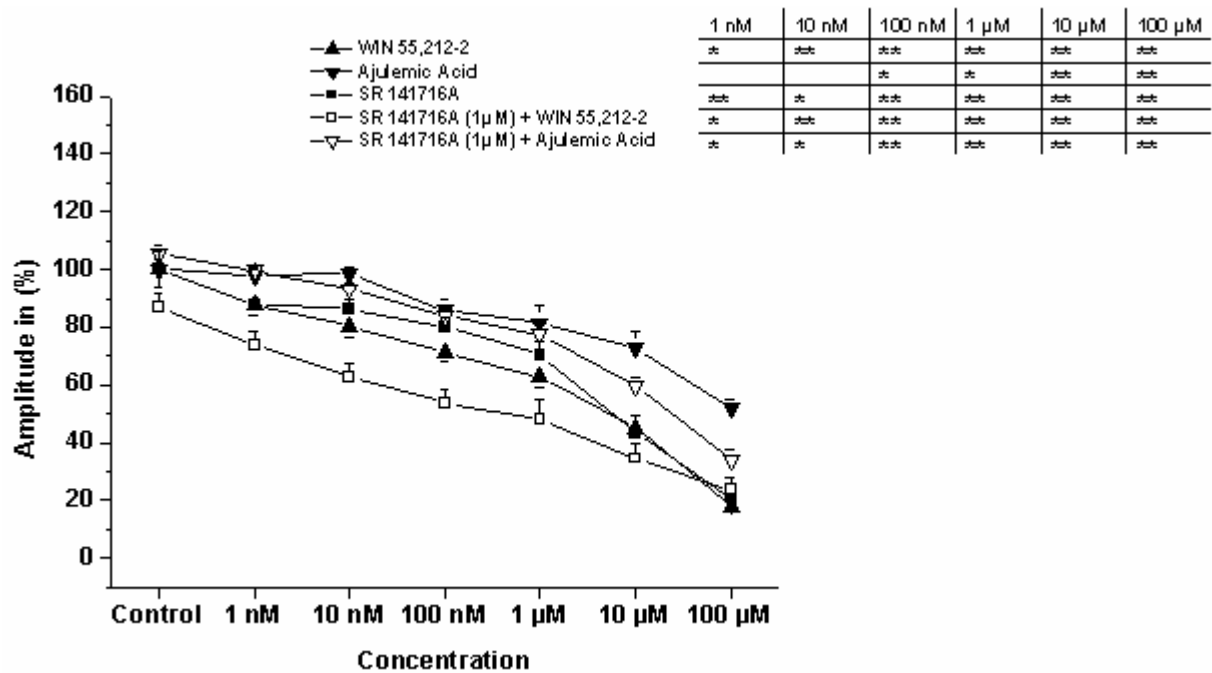


Abbildung 17: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

Der CB_1 -Agonist WIN 55,212-2 und das Cannabinoid Ajulemic Acid bewirken bei Zugabe in kumulativ steigenden Konzentrationen eine signifikante Abnahme der Amplitude der „schnellen“ Komponente bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz und 20 Hz. Der CB_1 -Antagonist SR 141716A entfaltet an der zirkulären Muskulatur schon bei Zugabe in einer Konzentration von 1 nM eine invers agonistische Wirkung, sichtbar durch eine signifikante Abnahme der Amplituden. Der positive Nachweis einer antagonistischen Wirkung auf WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid bleibt hier aus.

4.1.5 Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die longitudinale Muskulatur der Ratte

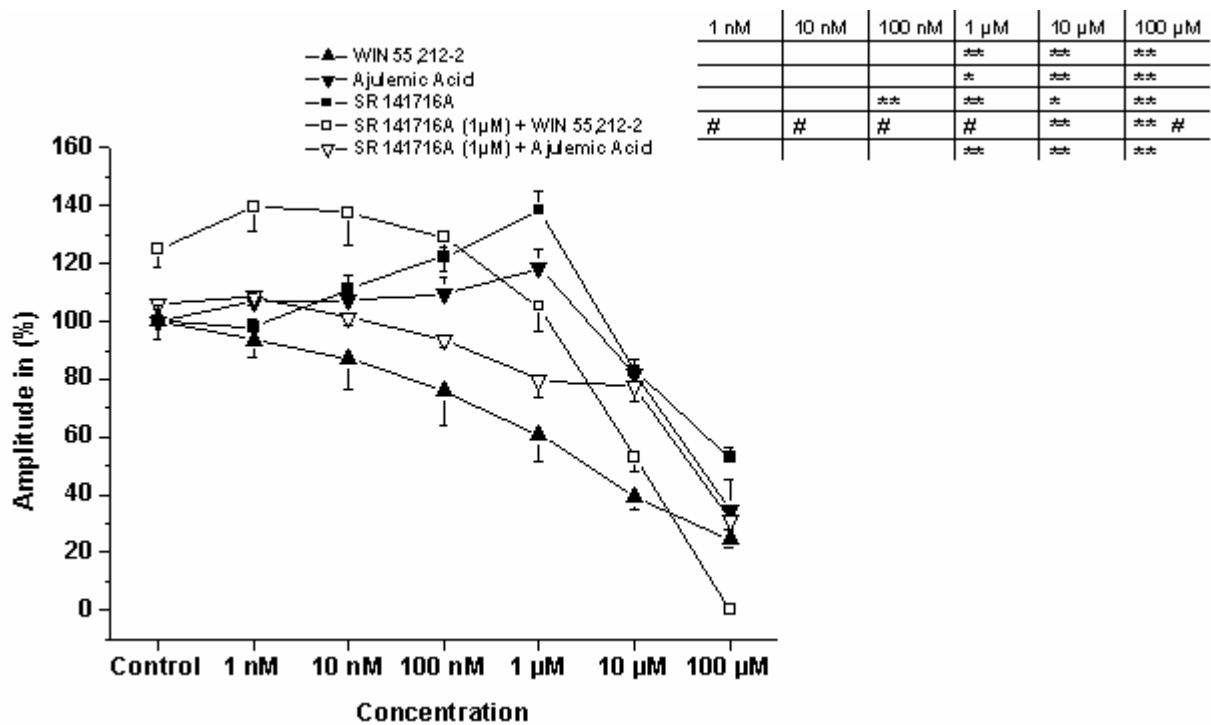


Abbildung 18: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 µM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 µM) + Ajulemic Acid; n = 6.

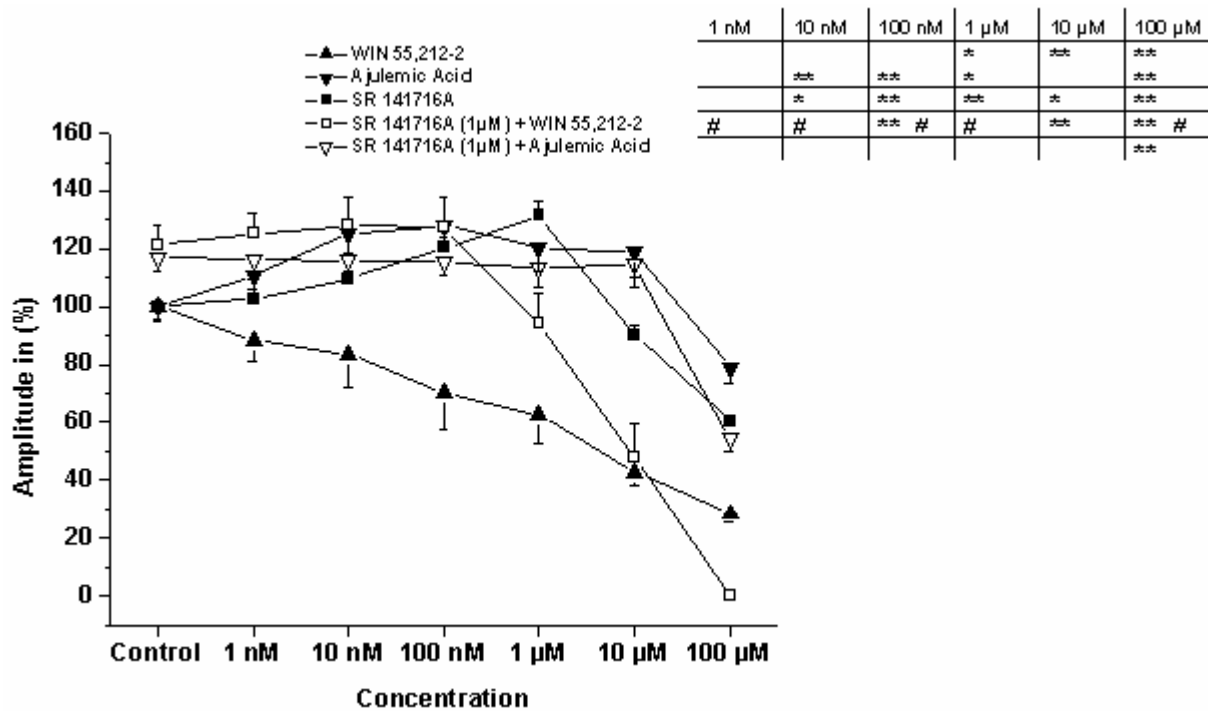


Abbildung 19: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; $n = 6$.

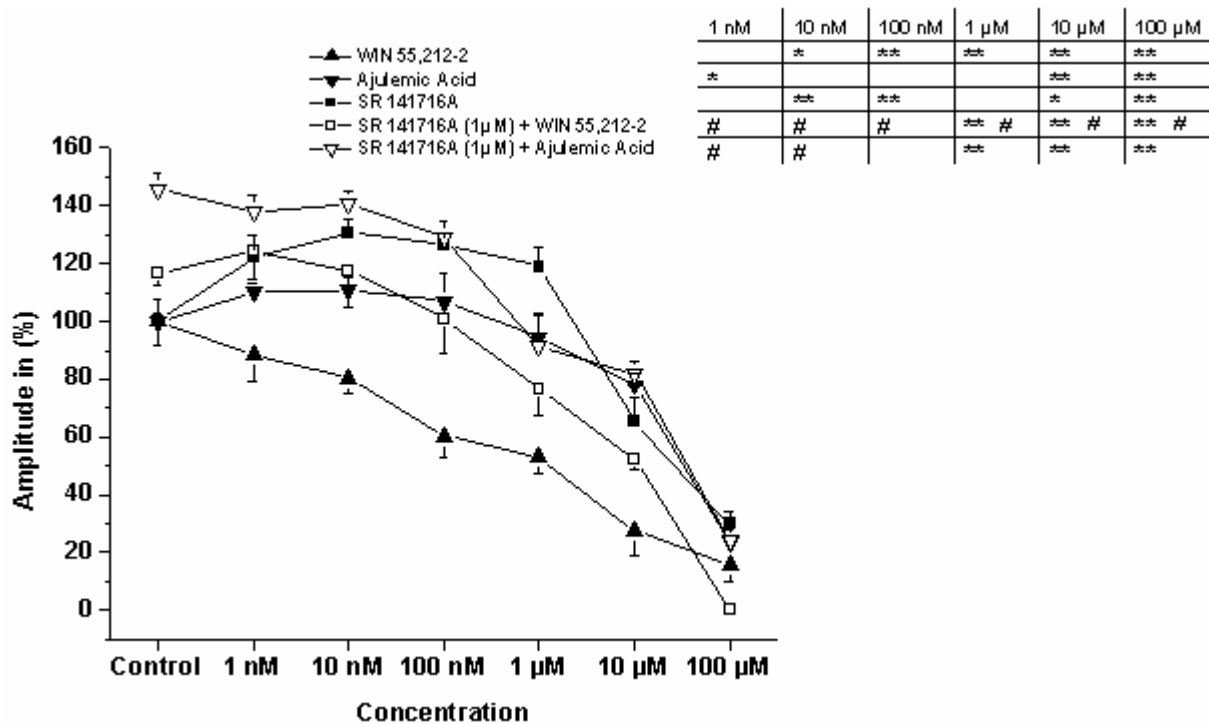


Abbildung 20: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μM)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μM) + Ajulemic Acid; $n = 6$.

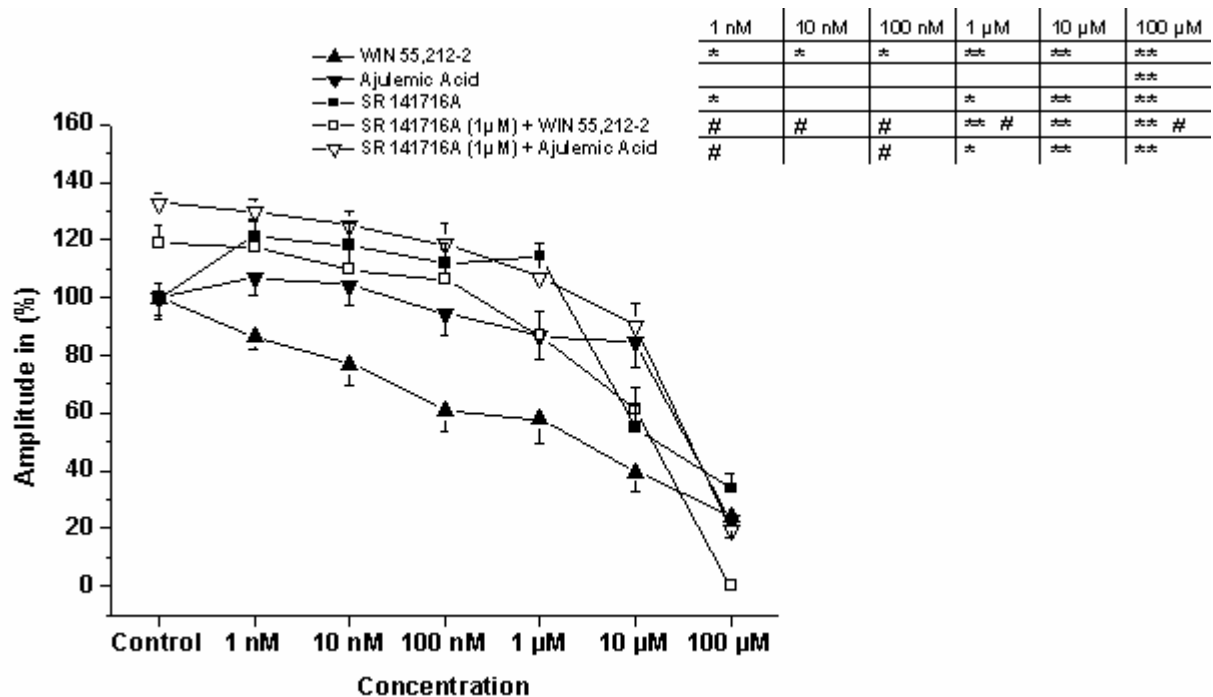


Abbildung 21: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 µM) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 µM) + Ajulemic Acid; $n = 6$.

Der CB_1 -Agonist WIN 55,212-2 verdeutlicht seine agonistische Wirkung durch die kontinuierliche und signifikante Reduktion der Kontraktionsantworten bezüglich der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponenten bei 10 Hz und 20 Hz. Der CB_1 -Antagonist SR 141716A, der alleine appliziert eine Amplitudenerhöhung erzielt, vermag WIN 55,212-2 zu blockieren. Das Cannabinoid Ajulemic Acid erhöht bei beiden Frequenzen die Amplitude der „schnellen“ Komponente bis zu einer Konzentration von 1 µM. Bei weiterer Konzentrationserhöhung (≥ 10 µM) verringern sich die Kontraktionsantworten signifikant. Dieser Effekt lässt sich bei der „langsamen“ Komponente bei beiden Frequenzen in ähnlicher Art und Weise beobachten. Eine Blockade durch SR 141716A lässt sich nicht nachweisen.

4.1.6 Wirkung von WIN 55,212-2, Ajulemic Acid und SR 141716A auf die zirkuläre Muskulatur der Ratte

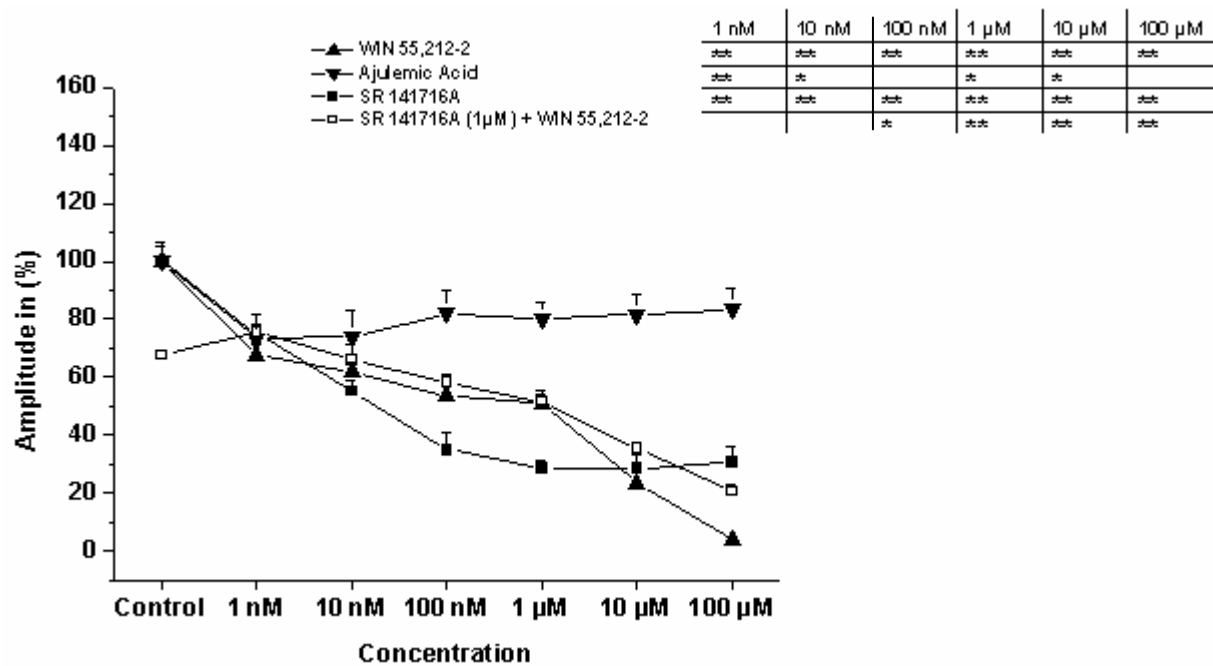


Abbildung 22: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

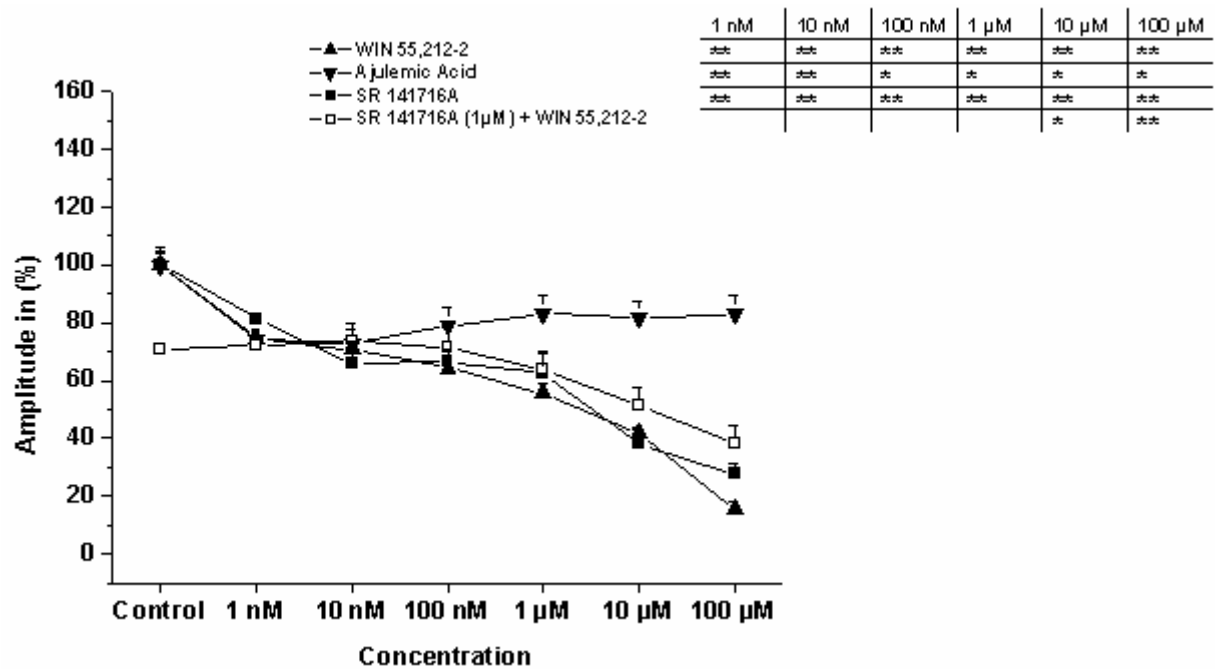


Abbildung 23: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 µM)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

An der zirkulären Muskulatur der Ratte werden durch den CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und die invers agonistische Wirkung des CB₁-Antagonisten SR 141716A signifikante Amplitudenverkleinerungen bewirkt. Das Cannabinoid Ajulemic Acid nimmt ab einer Konzentration von 10 nM keinen weiteren merklichen Einfluss mehr auf die Kontraktionsantworten. Eine blockierende Wirkung von SR 141716A zeigt sich weder in den Versuchen mit WIN 55,212-2 noch mit Ajulemic Acid.

4.1.7 Wirkung von Ajulemic Acid auf die zirkuläre Muskulatur der Maus und Charakterisierung eventueller Effekte mit Blockern der CB₁-, CB₂-, TRPV₁-, Opioid-, ORL₁-, α - und β -Rezeptoren

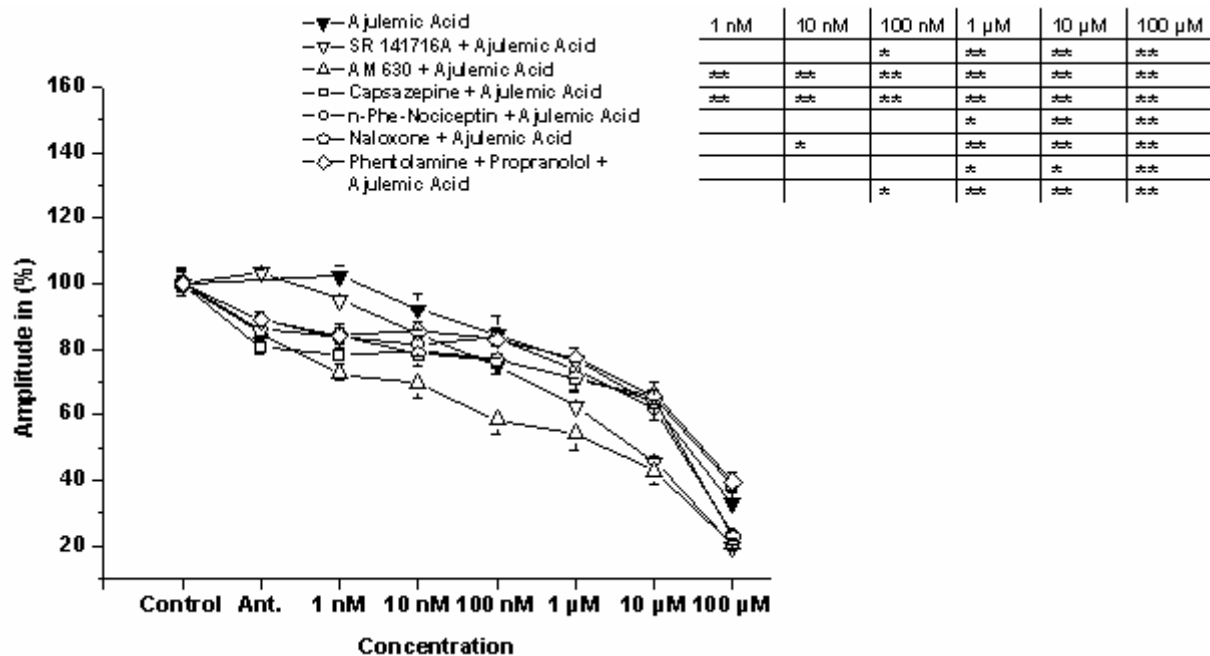


Abbildung 24: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ajulemic Acid alleine und nach Zugabe folgender Rezeptorblocker (beteiligter Rezeptor und applizierte Konzentration in Klammern): SR 141716A (CB₁, 1 µM), AM 630 (CB₂, 1 µM), Capsazepine (TRPV₁, 10 µM), n-Phe-Nociceptin (ORL₁, 1 µM), Naloxone (µ, κ, δ, 1 µM) und Phentolamine (α, 1 µM) + Propranolol (β, 1 µM) auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. Die einzelnen Rezeptorblocker nehmen bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirken in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die Blocker-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle (in der Abbildung als Ant. = Antagonist bezeichnet). Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle (Ant.) ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 8.

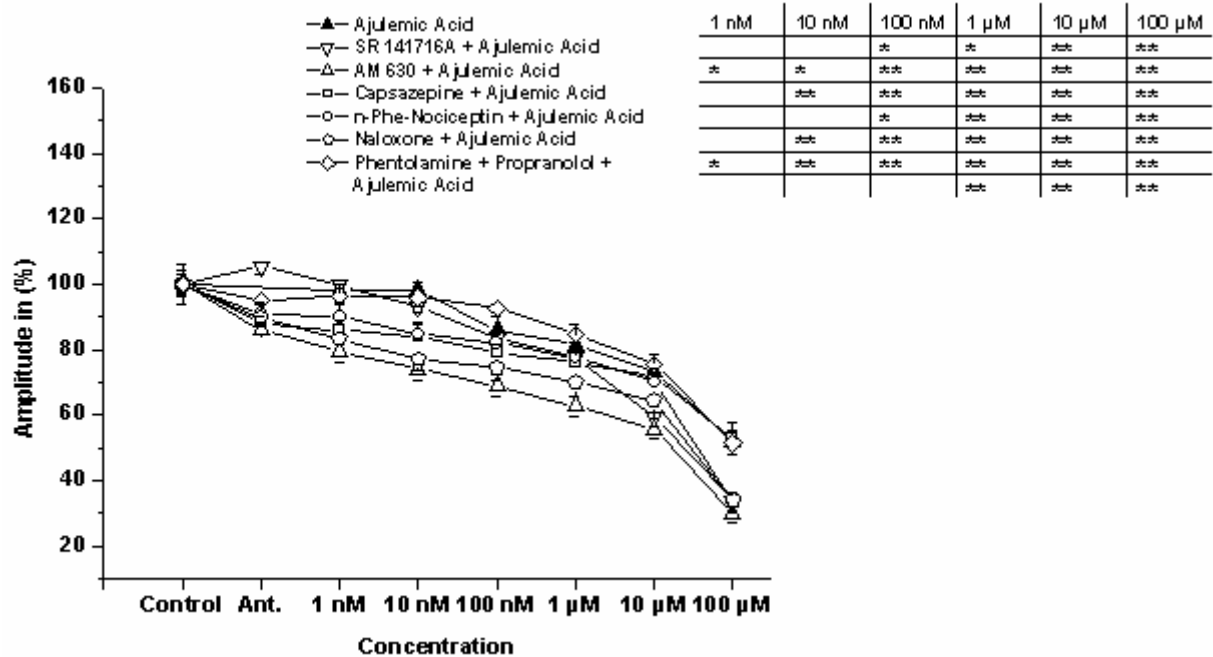


Abbildung 25: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ajulemic Acid alleine und nach Zugabe folgender Rezeptorblocker (beteiligter Rezeptor und applizierte Konzentration in Klammern): SR 141716A (CB₁, 1 µM), AM 630 (CB₂, 1 µM), Capsazepine (TRPV₁, 10 µM), n-Phe-Nociceptin (ORL₁, 1 µM), Naloxone (µ, κ, δ, 1 µM) und Phentolamine (α, 1 µM) + Propranolol (β, 1 µM) auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 20 Hz. Die einzelnen Rezeptorblocker nehmen bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirken in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die Blocker-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle (in der Abbildung als Ant. = Antagonist bezeichnet). Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle (Ant.) ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 8.

Es zeigt sich, dass die Wirkung des Cannabinoids Ajulemic Acid weder durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A, den CB₂-Antagonisten AM 630 noch durch den TRPV₁-Antagonisten Capsazepine blockiert werden kann. Der ORL1-Rezeptorblocker n-Phe-Nociceptin, der Opioid-Antagonist Naloxone und der α-Rezeptorblocker Phentolamine bzw. der β-Rezeptorblocker Propranolol bewirken ebenfalls keine Antagonisierung der Wirkung von Ajulemic Acid.

Die für diese Versuche benutzten Trägersubstanzen DMSO und NaCl 0,9% zeigten keinen Einfluss auf die Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt).

4.2 Myenterischer Anteil des Peristaltischen Reflexes am Dünndarm der Ratte

4.2.1 Exemplarische Darstellung der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation anhand von WIN 55,212-2

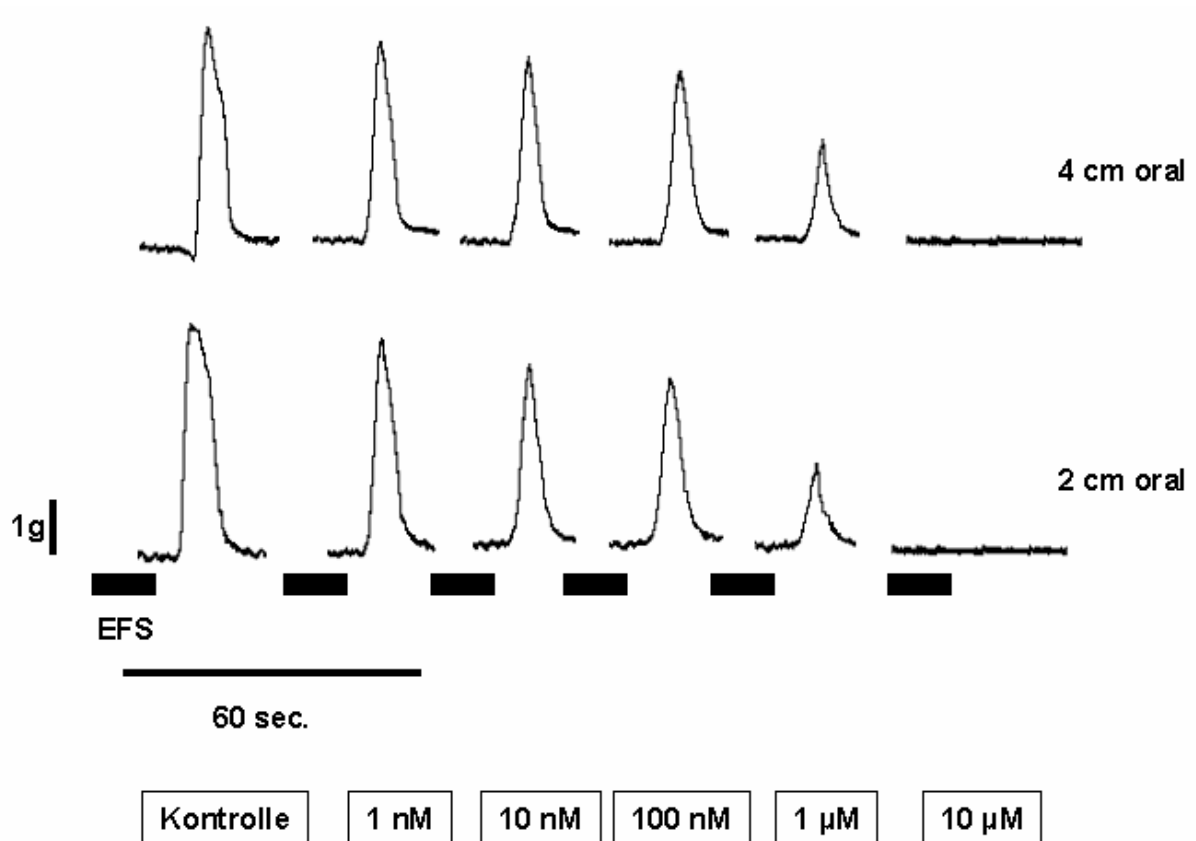


Abbildung 26: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der ascendierenden Reflexantworten 2 cm und 4 cm oral der Stimulation unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von WIN 55,212-2.

4.2.2 Wirkung von WIN 55,212-2 und SR 141716A auf die Amplitude, AUC und Latenz der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation

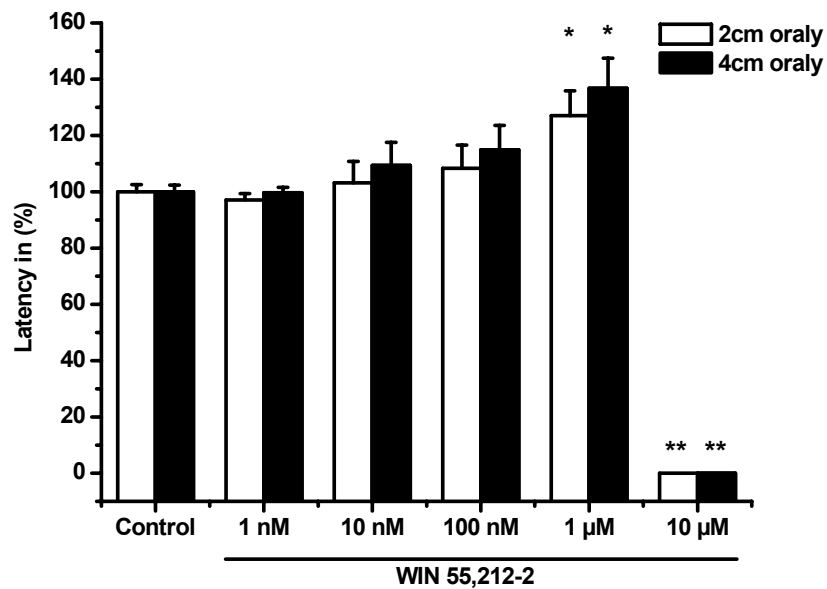


Abbildung 27: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Latenzen. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

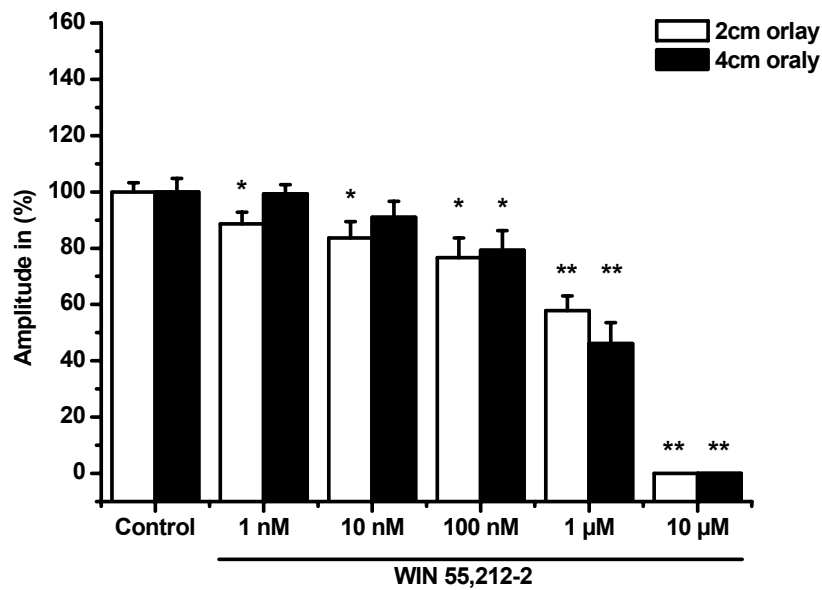


Abbildung 28: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Amplitude der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

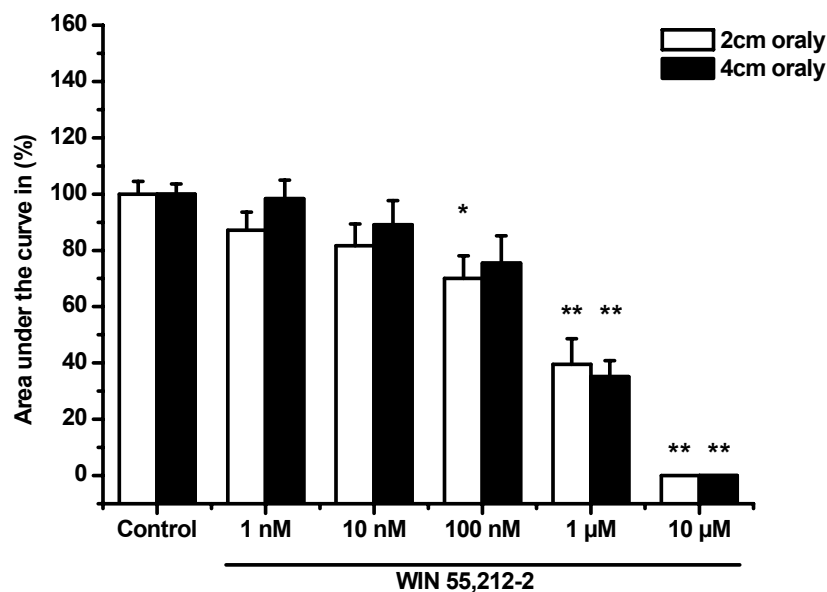


Abbildung 29: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Fläche unter der Kurve (AUC = Area under the curve) der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Flächen unter der Kurve. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$.

Die Zugabe von WIN 55,212-2 in kumulativ steigenden Konzentrationen zeigt einen signifikanten inhibierenden Einfluss auf die Amplitude, AUC und die Latenz der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Die am Peristaltischem Reflex involvierten Neurone zwischen dem Stimulationsort und den beiden Ableitungspunkten werden durch den CB₁-Agonisten beeinflusst.

Tabelle 2: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB₁-Antagonisten SR 141716A auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6.

Antagonist	2 cm orally	4 cm orally
SR 141716A		
Latency		
Control	100,0 ± 1,6	100,0 ± 2,9
1 nM	96,7 ± 2,3	95,9 ± 2,6
10 nM	102,0 ± 4,2	103,5 ± 2,1
100 nM	95,9 ± 2,9	98,3 ± 3,5
1 µM	81,8 ± 5,5 *	81,8 ± 7,1
10 µM	84,0 ± 1,3 **	74,9 ± 4,5 **
Amplitude		
Control	100,0 ± 2,9	100,0 ± 2,8
1 nM	107,8 ± 4,6	103,5 ± 4,4
10 nM	111,4 ± 4,9	104,6 ± 6,7
100 nM	106,4 ± 6,0	100,6 ± 6,3
1 µM	83,9 ± 9,1	64,1 ± 5,1 **
10 µM	2,7 ± 1,7 **	0,9 ± 0,9 **
Area under the curve		
Control	100,0 ± 2,6	100,0 ± 2,5
1 nM	110,7 ± 3,2 *	109,8 ± 7,2
10 nM	115,4 ± 4,3 *	107,4 ± 7,5
100 nM	103,4 ± 3,6	100,5 ± 9,0
1 µM	64,3 ± 6,9 **	57,1 ± 9,1 **
10 µM	1,7 ± 1,1 **	0,3 ± 0,3 **

Die Zugabe von SR 141716A in kumulativ steigenden Konzentrationen (1 nM - 100 nM) zeigt einen signifikanten Einfluss auf die Fläche unter der Kurve der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Die Amplitude weist einen Anstieg auf, der aber nicht signifikant ist. Die Prozentwerte der Latenz schwanken geringfügig um den 100%-Kontrollwert. Die am Peristaltischem Reflex involvierten Neurone zwischen dem Stimulationsort und den beiden Ableitungspunkten werden durch den CB₁-Antagonisten beeinflusst.

Höhere Konzentrationen (1 μM und 10 μM) bewirken eine signifikante Abnahme der Fläche unter der Kurve und der Amplitude. Die Verlängerung der Latenz ist ebenfalls signifikant. Die Wirkung von SR 141716A als inverser Agonist wird hierbei deutlich.

Tabelle 3: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB_1 -Antagonisten SR 141716A (100 nM) und des CB_1 -Agonisten WIN 55,212-2 auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A + WIN 55,212-2; n = 6.

Antagonist + Agonist	2 cm orally	4 cm orally
SR 141716A + WIN 55,212-2		
Latency		
Control	100,0 \pm 2,5	100,0 \pm 3,2
SR 141716A (100 nM)		
+		
WIN 55,212-2		
1 nM	80,6 \pm 4,2 ** #	81,8 \pm 2,8 ** #
10 nM	83,4 \pm 4,6 *	86,4 \pm 1,9 ** #
100 nM	87,3 \pm 4,1 * #	88,5 \pm 2,9 * #
1 μM	122,8 \pm 6,7 *	124,8 \pm 4,7 **
10 μM	0,0 \pm 0,0 **	0,0 \pm 0,0 **
Amplitude		
Control	100,0 \pm 2,6	100,0 \pm 3,2
SR 141716A (100 nM)		
+		
WIN 55,212-2		
1 nM	111,2 \pm 4,2 * #	102,0 \pm 4,6
10 nM	111,5 \pm 4,5 #	101,3 \pm 4,8
100 nM	105,8 \pm 4,4 #	100,5 \pm 5,7 #
1 μM	72,6 \pm 4,2 **	71,2 \pm 5,0 ** #
10 μM	0,0 \pm 0,0 **	0,0 \pm 0,0 **
Area under the curve		
Control	100,0 \pm 2,5	100,0 \pm 1,7
SR 141716A (100 nM)		
+		
WIN 55,212-2		
1 nM	134,4 \pm 7,3 ** #	119,2 \pm 6,1 * #
10 nM	138,9 \pm 6,8 ** #	121,1 \pm 5,3 * #
100 nM	126,1 \pm 6,4 ** #	112,7 \pm 3,8 * #
1 μM	64,2 \pm 5,8 ** #	55,4 \pm 6,5 ** #
10 μM	0,0 \pm 0,0 **	0,0 \pm 0,0 **

Die Zugabe des CB_1 -Antagonisten SR 141716A (100 nM) in Kombination mit dem CB_1 -Agonisten WIN 55,212-2 (1 nM - 10 μM) zeigt bei Konzentrationen von 1 nM - 100 nM sowohl signifikant verkürzte Latenzen als auch signifikant vergrößerte Flächen unter der Kurve. Die Amplituden sind erhöht, aber mit Ausnahme der

Amplitude 2 cm oral der Stimulation bei einer Konzentration von 1 nM nicht signifikant. Diese Daten machen im Vergleich zu den Ergebnissen von WIN 55,212-2 und SR 141716A alleine sichtbar, dass SR 141716A die Wirkung von WIN 55,212-2 antagonisiert. In höheren Konzentrationen (1 μ M und 10 μ M) verändern sich die Messparameter signifikant im Sinne einer alleinigen WIN 55,212-2-Zugabe. Eine Antagonisierung durch SR 141716A ist hier nicht nachweisbar.

4.2.3 Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf die Amplitude, AUC und Latenz der Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation

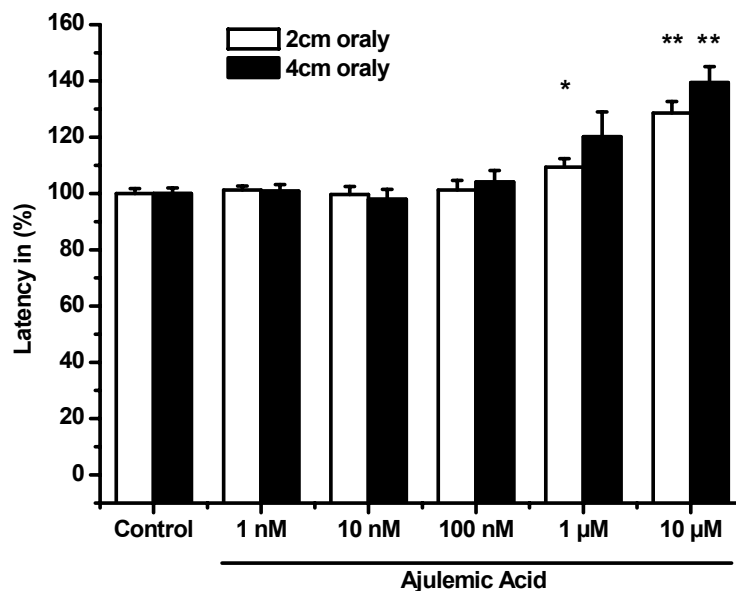


Abbildung 30: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Latenz der aufsteigenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Latenzen. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$

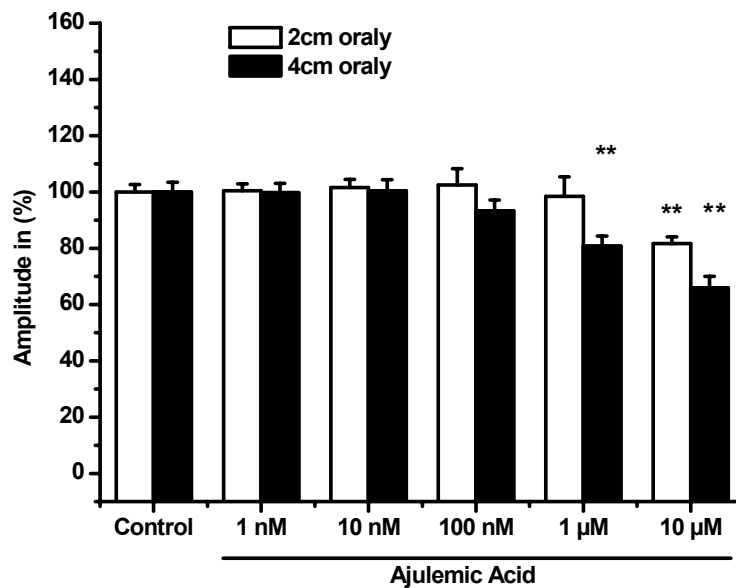


Abbildung 31: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Amplitude der ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$

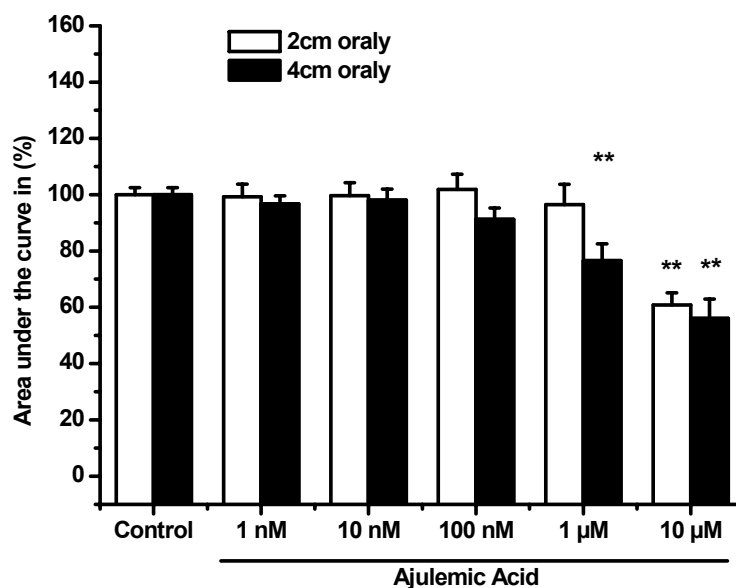


Abbildung 32: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Fläche unter der Kurve (AUC) der ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$

Das Cannabinoid Ajulemic Acid zeigt erst bei Zugabe in hohen Konzentrationen (1 μ M, 10 μ M) einen signifikanten Einfluss auf die Latenz, Amplitude und AUC. In niedrigerer Dosierung lassen sich für die genannten Parameter nur geringfügige, nicht signifikante Schwankungen um den 100%-Kontrollwert verzeichnen.

Die am Peristaltischem Reflex involvierten Interneurone zwischen dem Stimulationsort und den beiden Ableitungspunkten werden durch den CB₁-Agonisten beeinflusst.

Tabelle 4: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB₁-Antagonisten SR 141716A (100 nM) und des Cannabinoids Ajulemic Acid auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der aufsteigenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # = p < 0,05 für Ajulemic Acid gegen SR 141716A + Ajulemic Acid; n = 6.

Antagonist + Agonist	2 cm orally	4 cm orally
SR 141716A + Ajulemic Acid		
Latency		
Control	100,0 \pm 4,8	100,0 \pm 3,3
SR 141716A (100 nM)		
+		
Ajulemic Acid		
1 nM	103,0 \pm 4,1	102,5 \pm 2,4
10 nM	104,0 \pm 4,2	103,8 \pm 1,5
100 nM	108,5 \pm 2,9 *	107,5 \pm 3,2
1 μ M	116,2 \pm 4,0 **	111,7 \pm 4,1 *
10 μ M	134,1 \pm 1,4 **	131,9 \pm 4,6 **
Amplitude		
Control	100,0 \pm 5,4	100,0 \pm 2,4
SR 141716A (100 nM)		
+		
Ajulemic Acid		
1 nM	111,4 \pm 5,2	100,8 \pm 2,4
10 nM	110,1 \pm 7,2	101,4 \pm 3,6
100 nM	109,9 \pm 7,8	98,5 \pm 5,6
1 μ M	98,4 \pm 7,8	92,5 \pm 6,0
10 μ M	54,0 \pm 6,4 ** #	47,8 \pm 5,6 ** #
Area under the curve		
Control	100,0 \pm 4,4	100,0 \pm 4,4
SR 141716A (100 nM)		
+		
Ajulemic Acid		
1 nM	108,5 \pm 4,8	113,9 \pm 9,7
10 nM	112,4 \pm 10,2	115,5 \pm 10,6
100 nM	112,1 \pm 10,7	105,9 \pm 8,1
1 μ M	95,1 \pm 9,1	89,2 \pm 8,9
10 μ M	28,3 \pm 4,3 ** #	19,5 \pm 7,7 ** #

Die ermittelten Werte nach Zugabe des CB₁-Antagonisten SR 141716A (100 nM) in Kombination mit dem Cannabinoid Ajulemic Acid (1 nM - 10 µM) zeigen den gleichen Verlauf hinsichtlich der Beeinflussung der Latenz, Amplitude und AUC wie nach alleiniger Zugabe von Ajulemic Acid in kumulativ steigenden Konzentrationen. Statistisch ergibt sich bei diesem Blockadeversuch für die Parameter Amplitude und AUC ein signifikanter Unterschied für die Werte Ajulemic Acid (10 µM) gegen SR 141716A (1 nM) + Ajulemic Acid (10 µM).

Die für diese Versuche benutzten Trägersubstanzen DMSO und NaCl 0,9% zeigten keinen Einfluss auf die Kontraktionen (Ergebnisse nicht aufgeführt).

4.3 Dünndarmtransit der Maus

4.3.1 Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf den Dünndarmtransit

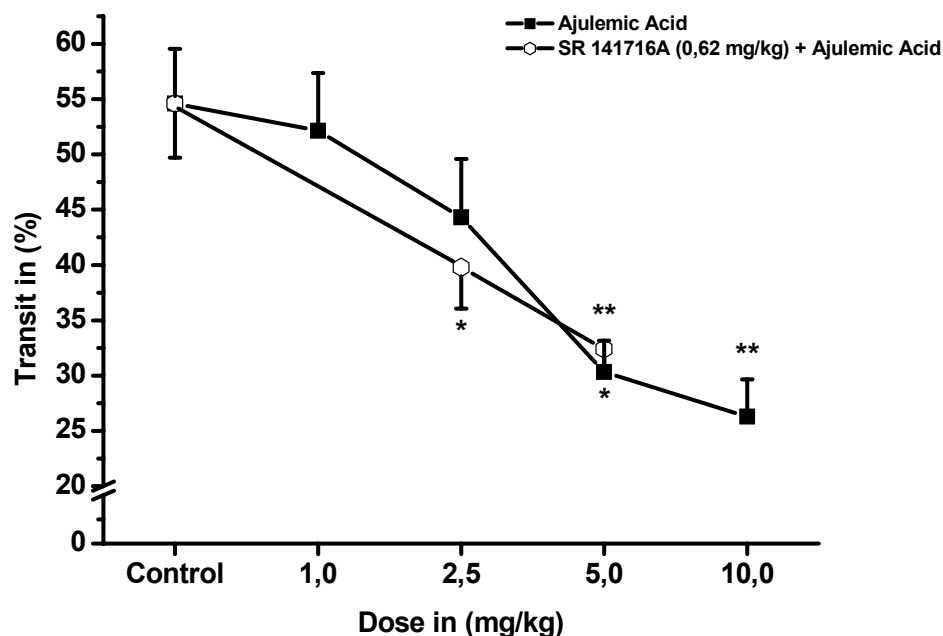


Abbildung 33: Einfluss des Cannabinoids Ajulemic Acid alleine und SR 141716A (0,62 mg/kg KG) + Ajulemic Acid in aufsteigenden Konzentrationen auf den Dünndarmtransit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 8$.

Das Cannabinoid Ajulemic Acid bewirkt dosisabhängig eine zur Kontrolle prozentual verkürzte Dünndarmtransitstrecke. Bei Konzentrationen von 5,0 und 10,0 mg/kg/KG von Ajulemic Acid sind die Ergebnisse signifikant. Der CB₁-Antagonist SR 141716A antagonisiert die Effekte von Ajulemic Acid nicht.

Auf die Durchführung dieser Dünndarmtransit-Versuche mit dem CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und der Kombination aus WIN 55,212-2 mit dem CB₁-Antagonisten SR 141716A wurde verzichtet –, da sich hierzu Ergebnisse in der Literatur finden. WIN 55,212-2 reduzierte in Versuchen an Mäusen dosisabhängig die Dünndarmtransitstrecke und konnte durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A in seiner Wirkung gehemmt werden (13;49).

Die alleinige Zugabe von SR 141716A führte zu einer verlängerten Dünndarmtransitstrecke (49).

Die für diese Versuche benutzten Trägersubstanzen DMSO und NaCl 0,9% zeigten keinen Einfluss auf den Dünndarmtransit (Ergebnisse nicht aufgeführt).

4.4 Kolon-Expulsion der Maus

4.4.1 Wirkung von WIN 55,212-2 und SR 141716A auf die Kolon-Expulsionszeit

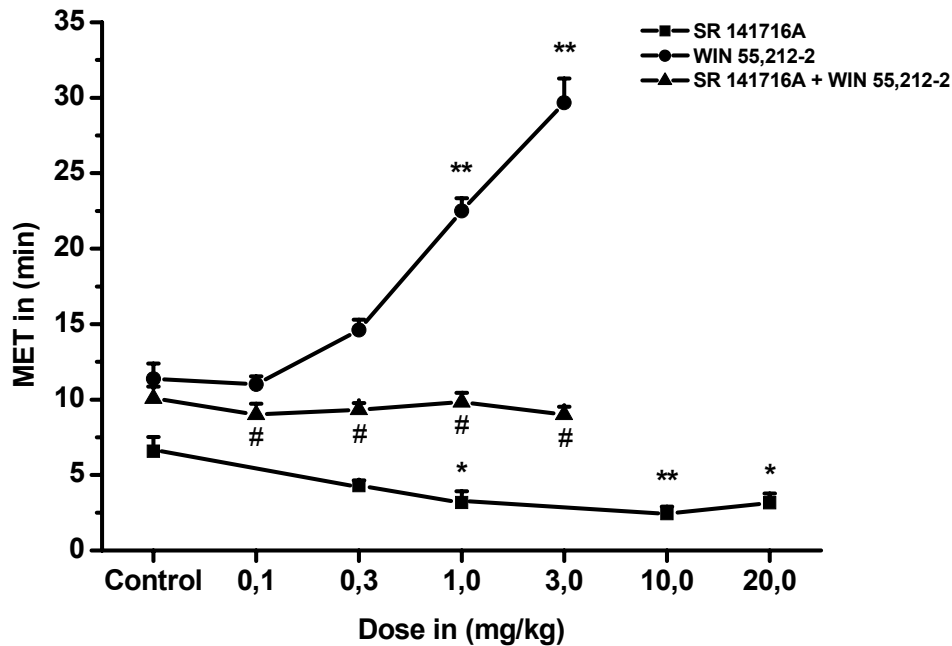


Abbildung 34: Einfluss des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2, des CB₁-Antagonisten SR 141716A, und SR 141716A (1 mg/kg/KG) + WIN 55,212-2 in aufsteigenden Konzentrationen auf die Kolon-Expulsionszeit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Minuten verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 mg/kg/KG) + WIN 55,212-2; n = 8.

Die Kolon-Expulsionszeit verlängert sich durch die intraperitoneale Injektion des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 signifikant. Dieser Effekt wird durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A blockiert, der seinerseits zu einer signifikanten Verkürzung der Passagezeit führt.

4.4.2 Wirkung von Ajulemic Acid und SR 141716A auf die Kolon-Expulsionszeit

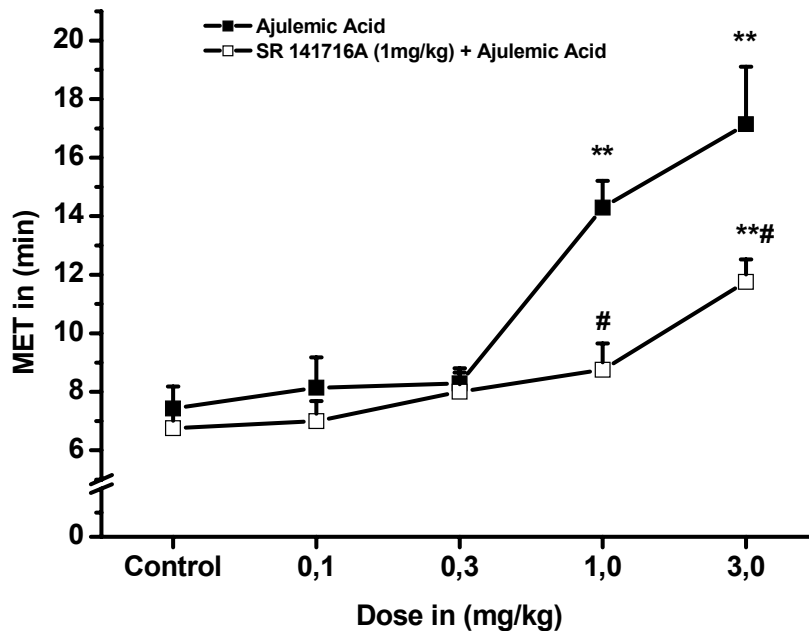


Abbildung 35: Einfluss des Cannabinoids Ajulemic Acid alleine und SR 141716A (1 mg/kg/KG) + Ajulemic Acid in aufsteigenden Konzentrationen auf die Kolon-Expulsionszeit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Minuten verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 mg/kg/KG) + Ajulemic Acid; $n = 9$.

Das Cannabinoid Ajulemic Acid bewirkt dosisabhängig eine Verlängerung der Kolon-Expulsionszeit, die ab einer Konzentration von 1,0 mg/kg/KG von Ajulemic Acid signifikant ist. Der CB_1 -Antagonist SR 141716A antagonisiert die Wirkung von Ajulemic Acid, besonders deutlich sichtbar bei den Konzentrationen 1,0 und 3,0 mg/kg/KG von Ajulemic Acid.

Die für diese Versuche benutzte Trägersubstanz DMSO zeigte keinen Einfluss auf die Kolon-Expulsion (Ergebnisse nicht aufgeführt).

5 Allgemeine Diskussion

5.1 Das Enterische Nervensystem (ENS)

Das Enterische Nervensystem (ENS) ist ein komplexes System, das die Funktionen des Gastrointestinaltraktes kontrolliert. Mit seinen ca. 80 - 100 Millionen Neurone ist es zahlenmäßig mit dem Rückenmark vergleichbar (4). Es findet sich in der Ösophagus-, Magen- und Darmwand und reguliert u. a. die Sekretion und Motilität (1;15;33). Verantwortlich für die Mukosafunktionen und somit der Sekretion ist der zwischen der Zirkulärmuskulatur und der Mukosa liegende Plexus submucosus (Meissner'scher Plexus) (91). Die Koordination der Motilität im GI-Trakt ist Aufgabe des Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus). Er ist zwischen der Zirkulär- und Längsmuskulatur lokalisiert und steuert die Funktionen der glatten Muskulatur (28). Beide Nervengeflechte sind seit über 150 Jahren bekannt und wurden von Meissner (66) und Auerbach (2) namensgebend erstbeschrieben.

Das ENS arbeitet weitgehend autonom und wird deshalb auch als „Gehirn des Magen-Darm-Traktes“ bezeichnet. Zusätzlich wird es aber auch vom vegetativen Nervensystem beeinflusst. Sympathische und parasympathische Afferenzen und Efferenzen sind mit den Schaltkreisen des ENS verknüpft. Diese einige tausend extrinsischen Nervenfasern sind mengenmäßig den enterischen Neurone weit unterlegen und können auf die Funktionen des Magen-Darm-Traktes nur modulierende Effekte ausüben (40;83).

Die Eigenständigkeit des ENS wurde schon 1895 von Langley beschrieben. Er begründete sie mit der Beobachtung, dass in einem isolierten Dünndarmsegment in vitro die gerichtete Propulsion eines intraluminalen Bolus verfolgt werden konnte (58). Der Transport kommt durch eine Muskelkontraktion oral und die Muskelrelaxation anal zu Stande. Dieser Reflex wurde 1899 schon von Bayliss und Starling wegen seiner grundlegenden Bedeutung als „law of the intestine“ bezeichnet (3).

Die Aufgabe des Peristaltischen Reflexes liegt in der Sicherstellung des analwärts gerichteten Transportes des Chymus. Er kann zum einen durch die mechanische

Stimulation der Muskulatur oder der Mukosa und zum anderen durch chemische Stimuli ausgelöst werden (3;36).

Das ENS wird als ein unabhängiges, integratives System angesehen, das strukturell und funktionell dem zentralen Nervensystem ähnlich ist (98). Es existieren eigene sensorische Neurone, Interneurone und Motoneurone. Die sensorischen Neurone fungieren als Chemo- und Mechanorezeptoren. Sie verschlüsseln verschiedene Stimuli, die auf die Magen-Darmwand einwirken und leiten die Information innerhalb des ENS weiter. Interneurone geben diese Information weiter und regulieren die Erregbarkeit der Motoneurone. Diese modulieren schließlich die Aktivität der Muskulatur und der Mukosa (98). Der ordnungsgemäße Ablauf der Motilität im GI-Trakt wird durch das fein abgestimmte Zusammenspiel von erregenden und hemmenden nervalen Regulationsmechanismen gewährleistet. Das Acetylcholin und die Neurokinine, zu denen u. a. das Neuropeptid Substanz P gehört, sind die wichtigsten exzitatorischen Transmitter (64). Sie aktivieren die glatte Muskulatur. Stickstoffmonoxid (NO), Adenosin 5'-Triphosphat (ATP), Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) und Adenylatzyklase Aktivierendes Polypeptid (PACAP „Pituitary Adenylat Cyclase Activating Polypeptid“) üben einen hemmenden Einfluss auf die glatte Muskulatur aus und treten als wichtigste inhibitorische Transmitter auf (64).

5.2 Meilensteine der Cannabinoid-Forschung

Cannabis fand schon vor mehreren tausend Jahren seine Anwendung als Nutz-, Rausch- und Heilmittel. In pharmakologischen Abhandlungen unter dem chinesischen Kaiser Shen-Nung (2737 v. Chr.) werden Cannabisanwendungen für verschiedenste Erkrankungen aufgeführt (37). In der medizinischen Literatur Indiens zwischen 2000 - 1400 v. Chr. findet sich die Verwendung von Cannabis als Appetitanreger, als Aphrodisiakum und als Mittel gegen eine Vielzahl von Erkrankungen (38). In der Antike setzte es der griechisch-römische Arzt Galen beispielsweise zur Behandlung der Flatulenz und bei Bauchschmerzen ein (30).

In der Neuzeit linderte man mit Cannabis Beschwerden des Magen-Darm-Traktes. Der chinesische Mediziner und Pharmakologe Li Shih-Chen verabreichte es als Antiemetikum erstmals im letzten Viertel des 16. Jahrhunderts (33;47).

Zu Beginn des 19. Jahrhunderts war das Interesse an einer chemischen Analyse der Hanfpflanze groß. Aufgrund des flüchtigen Charakters vieler Inhaltsstoffe erwies sich die Durchführung jedoch als schwierig. Mit der Strukturanalyse von Cannabidiol gelang Anfang der 1960er Jahre der Durchbruch. Kurz darauf war auch die Struktur von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol analysiert (65). Die Isolation und Darstellung der meisten Cannabinoide war Mitte der 1970er Jahre erreicht (44).

1988 wurde der Beweis für die Existenz eines spezifischen Cannabinoid-Rezeptors erbracht. Er wurde als erstes im Gehirn von Ratten nachgewiesen und im folgenden als Cannabinoid-1-Rezeptor (CB₁) bezeichnet (23). Das erste endogene Cannabinoid, das Anandamid, wurde 1992 identifiziert (24). Ihm folgten endogene Liganden, wie 2-Arachidonylglycerol (2-AG), Noladin, Virodhamin und N-arachidonyldopamin (NADA). Neben dem CB₁-Rezeptor konnte ein weiterer spezifischer Rezeptor nachgewiesen werden, der als Cannabis-2-Rezeptor (CB₂) bekannt ist (44).

Nach der Erkenntnis, dass Endocannabinoide auch über andere Rezeptorgruppen (z. B. Vanilloidrezeptoren) Wirkungen entfalten können, lag anhand von zahlreichen Studien die Vermutung nahe, dass weitere Cannabis-Rezeptoren (non-CB₁/non-CB₂-Rezeptoren) existieren müssen (6;25;84). Mit dem erst kürzlich geklonten GPR55-Rezeptor ist diese Vermutung bestätigt worden (59;73;74).

5.3 Das Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem besteht aus den Cannabinoid-Rezeptoren und den dazugehörigen endogenen Liganden. Fest etabliert sind bisher der CB₁- und der CB₂-Rezeptor. Der CB₁-Rezeptor ist v. a. auf Neurone des Zentralen Nervensystems (ZNS) und auf peripheren Neurone lokalisiert (68;92). Eine abschließende Klärung der gesamten Verteilung dieses Rezeptors ist aber noch nicht in Sicht, da beispielsweise auch andere Lokalisationen (z. B. Kolonepithelzellen) des CB₁-Rezeptors beschrieben sind (87;99). Der CB₂-Rezeptor wird bisher fast ausschließlich auf Immunzellen registriert. Diese Tatsache weist auf eine Rolle in der Immunmodulation hin (70;80).

Beide Rezeptoren gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an (67). Diese zeichnen sich durch sieben helicale hydrophobe Anteile aus, die die Plasmamembran durchdringen und jeweils drei intra- und extrazelluläre Schleifen bilden. Die Strukturähnlichkeit beider Rezeptoren hinsichtlich der Transmembrananteile eins und sieben beträgt nur 44% (32). Das ist geringer als es bei Rezeptoren innerhalb einer Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren üblich ist.

In Bezug auf die Darmmotilität spielt der CB₁-Rezeptor die führende Rolle. Nach der Bindung eines Liganden an den präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptor verändert dieser seine Konformation derartig, dass sich ein in der Membran befindliches inhibitorisches G-Protein (G_{i/o}) an ihn binden kann (44). In der Folge wird das an das G_{i/o}-Protein gebundene Guanosindiphosphat (GDP) gegen ein Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht. Das G_{i/o}-Protein dissoziiert vom Rezeptor und zerfällt in eine aktive α - und eine β/γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit des G_{i/o}-Proteins wandert zu der in der Zellmembran befindlichen Adenylatcyclase und hemmt dieses Enzym. Folglich bleibt die Katalyse von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus (31;45). Das cAMP löst als „second messenger“ für gewöhnlich eine Kaskade von Enzym-Reaktionen aus. Das Ziel dieser Reaktionen ist es, über die Öffnung von Ionenkanälen die Ausschüttung von erregenden Neurotransmittern, wie z. B. dem Acetylcholin (ACH), zu bewerkstelligen (62).

Die Wirkung der endogenen Cannabinoide wird durch spezielle Degradationssysteme beendet. Die Liganden werden nach der Carrier-vermittelten Wiederaufnahme in die Zelle hydrolytisch gespalten. Anandamid wird beispielsweise im wesentlichen durch die Fettsäure-Amid-Hydrolase (FAAH) gespalten, 2-AG im Wesentlichen durch die Monoacylglycerol-Lipase (MAGL) abgebaut (18;22;26;89).

Der CB₂-Rezeptor ist in erster Linie in der Peripherie lokalisiert und auf Immunzellen nachgewiesen. Aus diesem Grund wird er hier nur kurz besprochen. Es existieren aber auch für diesen Rezeptor Anhaltspunkte, die eine Beeinflussung gastrointestinaler Motilität und Inflammationsvorgänge durch diesen Rezeptor nahe legen (54;63).

Seit mehreren Jahren bestärken sich die Hinweise, dass Liganden am CB₁- und/oder CB₂-Rezeptor auch zusätzlich an anderen Rezeptoren ihre Wirkung entfalten (72).

Vor kurzem konnte von Ryberg et al. ein neuer G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der zur Familie der Cannabinoid-Rezeptoren gezählt wird, geklont werden (78). Protein-Sequenzen dieses Rezeptors konnten im Menschen, der Maus und der Ratte nachgewiesen werden (82). Es wird berichtet, dass der CB₁/CB₂-Rezeptor Ligand CP55940 spezifisch am menschlichen GPR55-Rezeptor bindet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass dieser Rezeptor auch von etablierten CB₁/CB₂-Rezeptor-Agonisten, wie dem Δ^9 -THC, HU-210, CP55940, Anandamid, 2-AG und dem CB₁-selektiven-Agonisten Noladin, aktiviert werden kann (73). Welche therapeutischen Nutzen in Zukunft aus diesen neuen Erkenntnissen zu ziehen sind, wird erst nach der genaueren pharmakologischen Charakterisierung des GPR55-Rezeptors und seiner Liganden abzusehen sein. Aktuell sind noch keine Antagonisten für diesen Rezeptor beschrieben.

5.4 Wirkungen der Cannabinoide auf die Darmmotilität

Die Wirkungen der Cannabinoide auf den GI-Trakt sind in zahlreichen Untersuchungen sowohl in in vitro als auch in in vivo Versuchsmodellen beschrieben worden. Cannabinoide reduzieren durch die Bindung an präsynaptisch lokalisierte CB₁-Rezeptoren die Kontraktilität der glatten Muskulatur des GI-Traktes und verzögern somit den gastrointestinalen Transit (50;86). An isolierten longitudinalen Muskelstreifen des Meerschweinchen-Ileums, die mittels Elektrischer Feldstimulation zur Muskelkontraktion angeregt wurden, konnte gezeigt werden, dass Cannabinoid-Agonisten, wie CP50,556, CP55,940, WIN 55,212-2, Nabilone, CP55,667, Δ^9 -THC, AM 630, Cannabinol und Anandamid, in unterschiedlichem Ausmaß einen hemmenden Einfluss auf die Kontraktionsantwort ausüben (75). Der hemmende Effekt von Anandamid konnte durch die Gabe des selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A kompetitiv gehemmt werden, was die Beteiligung des CB₁-Rezeptors belegt (75). Cannabinoide nehmen auch Einfluss auf den Peristaltischen Reflex, für dessen Ablauf die Motoneurone aber auch sensorische Neurone und Interneurone eine besondere Rolle spielen. Cannabinoide senken die Schwelle, die zur Auslösung des Reflexes nötig ist und beeinflussen die Kontraktionskraft im Rahmen des Peristaltischen Reflexes (39).

Organbaduntersuchungen zum Peristaltischen Reflex, die an isolierten Ileum-Streifen der Ratte durchgeführt wurden, zeigten, dass das Endocannabinoid Anandamid keinen Einfluss auf die ascendierende Kontraktion ausübt. Die am Reflex beteiligten Interneurone blieben unbeeinflusst, aber die nachgewiesene reduzierte Kontraktionskraft der glatten Muskulatur im Bereich des finalen Motoneurons demonstrierte die hemmende Wirkung von Anandamid (102).

Die Erkenntnisse um die Cannabinoidwirkungen auf die Darmmotilität sind auch durch in vivo Untersuchungen belegt. Männlichen Mäusen wurde oral oder mittels Magen- bzw. Duodenalsonde ein nicht resorbierbarer Marker, wie z. B. Kohle, in gum arabicum oder der rote Farbstoff Karmesin gegeben. Nach einer Wartezeit von 20 min wurden die Mäuse getötet und der GI-Trakt entnommen. Die Distanz, die der Marker in diesem Zeitraum zurückgelegt hatte, wurde gemessen und prozentual zur Länge des Dünndarms ins Verhältnis gesetzt. Nach Kontrolluntersuchungen wurden den Mäusen 20 min vor Verabreichung des Markers Cannabinoid-Agonisten und -Antagonisten alleine und in Kombination intraperitoneal injiziert. Die Ergebnisse zeigten anhand der gemessenen Passagestrecke des Markers, dass die Agonisten WIN 55,212-2 und Cannabinol den gastrointestinalen Transit verzögern und der selektive CB₁-Antagonist SR141716A die Passage beschleunigt. Die Wirkung der Cannabinoid-Agonisten konnte durch SR 141716A aber nicht durch den CB₂-Antagonisten SR 144528 blockiert werden, was die Beteiligung des CB₁-Rezeptors an der Regulierung des Transits im Darm bestätigt (13;52). Ähnliche Untersuchungen wurden auch an Ratten durchgeführt. Die verzögernde Wirkung auf die intestinale Propulsion konnte für die Cannabinoid-Agonisten WIN 55,212-2 und CP 55,940 nachgewiesen werden; SR 141716A hob diese Wirkung auf (57).

Experimente, in denen das Nass- und Trockengewicht des ausgeschiedenen Kots von Mäusen, die zuvor eine intraperitoneale Injektion von Cannabinoiden erhielten, ermittelt wurde, zeigten gleiche Resultate. SR 141716A bewirkte ein im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen höheres Nass- und Trockengewicht des Exkremments, was mit der schnelleren Passagezeit und der damit verbundenen verminderten Wasser-Resorption begründet wurde. WIN 55,212-2 zeigte gegenteilige Effekte, die durch SR 141716A antagonisiert werden konnten (49). Die Kolon-Propulsion von Mäusen kann nachweislich durch Cannabinoide verlangsamt bzw. beschleunigt werden. Eine in das Kolon eingeführte geschliffene Glaskugel wurde von den Tieren nach intraperitonealer Injektion von Cannabinoiden unterschiedlich schnell wieder

ausgeschieden. Agonisten, wie WIN 55,212-2, Anandamid und Cannabinol, verlängerten die Expulsionszeit, während der selektive CB₁-Antagonist SR 141716A diese verkürzte (76).

Weiterhin zeigten tierexperimentelle Daten aus verschiedenen Modellen, die pathologische Bilder imitieren, den Einfluss der Cannabinoide auf die gastrointestinale Motilität. Durch die intraperitoneale Injektion von Essigsäure wurde bei Mäusen eine Peritonitis provoziert, aus der ein paralytischer Ileus resultierte. Es zeigten sich ein erhöhter intestinaler Anandamidspiegel und eine erhöhte Expression von CB₁-Rezeptoren. Der selektive CB₁-Antagonist SR 141716A konnte in diesem Modell die normale Motilität wiederherstellen (60). Dies legt eine ursächliche Beteiligung des Cannabinoidsystems an der Pathogenese des Ileus nahe.

In experimentellen Diarrhoe-Modellen in Mäusen war nach oraler Gabe von Krotonöl begleitend die gastrointestinale Motilität erhöht. Die intraperitoneale Applikation des Cannabinoid-Agonisten WIN 55,212-2 und Cannabinol wirkten dieser dosisabhängig entgegen (52).

Die Resultate aus Experimenten verschiedener Versuchsmodelle bestätigten die Wirkung der Cannabinoide auf die Motilität im GI-Trakt. Sie nahmen aber auch Einfluss auf die Sekretion, die Sensitivität und Entzündungsreaktionen, die sich im Verdauungstrakt abspielten. Dies soll im folgenden erörtert werden.

5.5 Einfluss der Cannabinoide auf Entzündung, Sekretion und Sensitivität im GI-Trakt

Entzündliche Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, verursachen bei Patienten abdominale Schmerzen, Bauchkrämpfe, Übelkeit, Erbrechen und schwere, z. T. blutige Diarrhoen (5;46). Verantwortlich für diese Beschwerden ist die Entzündung der Darmwand, die Ulzerationen, Blutungen und Narbenbildungen nach sich zieht. Der Einsatz von Cannabinoiden zur Linderung dieser Inflammationsbeschwerden scheint möglich. Ein symptomatischer Benefiz nach Konsum von Marihuana, wie er in Patientenberichten dokumentiert ist, lässt positive Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Cannabinoiden bei gastrointestinalen

Entzündungen zu (41;55). Auch wenn klinische Studien, die den Einsatz von Cannabinoiden bei entzündlichen Darmerkrankungen rechtfertigen, noch ausstehen, gibt es zahlreiche tierexperimentelle Ergebnisse, die die antiinflammatorischen Eigenschaften von Cannabinoiden belegen. Anhand von Mausmodellen, in denen bei den Tieren experimentell eine Kolitis induziert wurde, konnte die protektive Wirkung von CB₁-Agonisten auf Entzündungsprozesse im Darm nachgewiesen werden. CB₁-Antagonisten blockierten diesen Effekt, was die Beteiligung des CB₁-Rezeptors belegt (19). Die mögliche Bedeutung dieses Rezeptors, respektive der Pathophysiologie von Inflammationsvorgängen im GI-Trakt, konnte mit Hilfe von CB₁-defizienten Mäusen weiter charakterisiert werden (61;85). Die in CB₁-defizienten Mäusen verursachte Kolitis verlief fulminanter, während bei den nicht defizienten Mäusen die Expression des CB₁-Rezeptors gesteigert war.

Das Wissen um die Beteiligung des CB₂-Rezeptors an Entzündungsreaktionen im Darm ist begrenzt. Die erhöhte Expression von CB₂-Rezeptoren auf Immunzellen im entzündeten Darm lässt pathophysiologische Zusammenhänge der Darminflammation erahnen (100). Dabei könnte die Aktivierung der CB₂-Rezeptoren der Herabregulierung der Leukozyteninfiltration während des Entzündungsprozesses dienen und die Produktion bzw. Freisetzung von Inflammationsmediatoren, wie den Zytokinen und Chemokinen, modulieren (100).

Cannabinoiden beeinflussen auch Sekretionsvorgänge im GI-Trakt. In *in vivo* Versuchen an Ratten konnte der Nachweis erbracht werden, dass die durch Pentagastrin stimulierte Magensäuresekretion durch WIN 55,212-2 gehemmt wird, gleichzeitig aber kein Einfluss auf die basale Sekretion ausgeübt wird (71).

In Versuchen an isolierten Rattenmägen gelang der Nachweis, dass Δ^9 -THC dosisabhängig die Histamin-induzierte Magensäuresekretion zu hemmen vermag, ohne die basale Sekretion zu verändern (71). Dieses Wissen wurde in Versuchen zum Magenulkus-Leiden bei Ratten genutzt. Bestehende Magenukzera wurden durch die Anwendung von Δ^9 -THC deutlich reduziert (71). Auch WIN 55,212-2 zeigte einen signifikanten Einfluss auf die Abheilung experimentell erzeugter Magenukzera bei Ratten (34). Zukünftig könnten Cannabinoide zur Prävention des Magenulkus zur Anwendung kommen.

Auch die Behandlung der sekretorischen Diarrhoe stellt eine zukünftige Indikation für eine Therapie mit Cannabinoiden dar. Die Erkrankung zeichnet sich durch die

gesteigerte aktive Sekretion und reduzierte Resorption von Wasser und Elektrolyten im Darm aus. Dies führt zu einem Anstieg von Stuhlvolumen und Stuhlgewicht. Motilitätsveränderungen im Sinne eines beschleunigten intestinalen Transits werden dabei oft beobachtet, sind aber nur selten als primäre Ursache einer massiven Diarrhoe anzusehen. Neben dem hemmenden Einfluss der Cannabinoide auf die Darmmotilität scheinen sie auch einen positiven Einfluss auf die Symptome der sekretorischen Diarrhoe zu haben. Sie reduzieren Sekretionsvorgänge und steigern die intestinale Resorption (47). Verantwortlich dafür sind Einflüsse auf die cholinerge (Azetylcholin-vermittelte) und nicht-cholinerge (VIP-vermittelte) enterische Neurotransmission, die reduziert wird (93).

Intermittierende abdominale Schmerzen, Spasmen und abdominelles Spannungsgefühl sind wesentliche Symptome der Reizdarmerkrankung. Diarrhoe und/oder Obstipation führen zu Veränderungen der Stuhlgangskonsistenz und -frequenz (90). Zur Behandlung dieser Erkrankung, die in der westlichen Welt bei Erwachsenen eine geschätzte Prävalenz von 8% - 23% aufweist (77), werden aktuell Spasmolytika (Anticholinergika) und Antidiarrhoika (z. B. Opiate) herangezogen. Vorrangiges Ziel dieser Medikamente ist es, Motilitätsveränderungen zu regulieren, die neben der viszeralen Hypersensitivität als teilweise kausal in der Pathogenese der Reizdarmerkrankung angesehen werden (27). Cannabinoide könnten in Zukunft das Repertoire der Therapeutika erweitern. Ihnen werden neben den motilitätsverändernden Einflüssen auch antinozizeptive und antihyperalgetische Effekte zugeschrieben (14;42). Der Einsatz von Cannabinoiden zu diesem Zweck ist aber noch nicht abzusehen, da klinische Untersuchungen noch ausstehen.

5.6 Die menschliche Darmmotilität – angewandte Cannabinoid-Forschung

Seit 2006 ist mit Rimonabant (SR 141716A), einem selektiven CB₁-Antagonisten, ein Wirkstoff auf dem europäischen Markt. Rimonabant erhielt seine Zulassung für die Behandlung der Adipositas oder übergewichtiger Patienten. Darüber hinaus weist es einen oder mehrere Risikofaktoren, wie den Typ II Diabetes oder die Dyslipidämie, auf. Ausgangspunkt für dieses neue Medikament war das Wissen um die Appetitstimulierende Eigenschaft von Cannabinoiden und die zunehmende Kenntnis über die CB₁-Rezeptor-Verteilung im ZNS. Die Wirkungsweise von Rimonabant besteht u. a. in der Blockade zentraler CB₁-Rezeptoren im Gehirn (Hypothalamus, Nucleus accumbens, Nervus Vagus, Ganglion nodosum) (97), die in Zusammenhang mit der Kontrolle der Nahrungsaufnahme stehen. In zahlreichen Studien, wie z. B. der „RIO-Europa“ (Rimonabant in Obesity), wurde über signifikante Gewichtsreduktionen von adipösen Patienten berichtet (94). Aus verschiedenen mitunter tierexperimentellen Untersuchungen weiß man aber auch, dass das Medikament entsprechend der CB₁-Rezeptor-Verteilung außerhalb des ZNS seine Wirkungen entfaltet. Es beeinflusst u. a. den Glukosestoffwechsel, steigert die Lipolyse im Fettgewebe, nimmt Einfluss auf den Plasmaspiegel von Triglyceriden und dem Gesamtcholesterin, etc. (97). Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass im aktuellen Beipackzettel des Medikaments eine Reihe von Nebenwirkungen aufgeführt werden, wie Diarrhoe und Übelkeit. Diese Nebenwirkungen sind wohl auf die bekannte motilitätssteigernde Wirkung von Cannabinoid-Antagonisten (SR 141716A) im Darm zurückzuführen. Der selektive CB₁-Antagonist Rimonabant (SR 141716A) wurde und wird in vielen experimentellen Untersuchungen zur Bestätigung der CB₁-Selektivität von Testsubstanzen eingesetzt und ist dahingehend etabliert. Hinsichtlich der Beeinflussung der Darmmotilität ist die Substanz Gegenstand dieser und vieler anderer Arbeiten, aus denen die prokinetische Wirkung am Darm hervorgeht. Sie ist ein „konventionelles Werkzeug“ in der Cannabinoid-Forschung und könnte in absehbarer Zeit nicht nur aufgrund der Erfahrungen mit dem zugelassenen Medikament Rimonabant zur Behandlung der Obstipation eingesetzt werden.

6 Spezielle Diskussion

Die experimentelle Erforschung der Wirkung von Cannabinoiden auf verschiedene Organsysteme beschäftigt viele internationale Arbeitsgruppen. Es existieren zahlreiche Untersuchungen, in denen mit verschiedenen Versuchsmodellen erstaunliche Cannabinoidwirkungen nachgewiesen werden konnten. Untersuchungen zur Beeinflussung der Motilität des Magen-Darm-Traktes stellen aufgrund bisheriger Erkenntnisse und steigender Aktualität ein reizvolles Themengebiet dar. Diese Dissertation entstand aus der Idee, die Grundlagenforschung zur Beeinflussung der Darmmotilität durch Cannabinoide mit Hilfe von 4 etablierten Versuchsmodellen auf noch breitere Füße zu stellen und weiter auszubauen. Dazu diente u. a. die EFS von isolierten Darm-Muskelstreifen in Organbädern. Sie ist eine etablierte Methode, um pharmakologische Wirkungen von Substanzen nachzuweisen. Das Wissen über die Cannabinoidwirkungen, das mittels dieses in vitro Modells gewonnen wurde, basiert in erster Linie auf Versuchen mit isolierten Muskelstreifen des Meerschweinchens. In dieser Arbeit kamen deswegen Mäuse und Ratten zum Einsatz, zwei Tierspezies, die außerdem im Vergleich auf mögliche Diskrepanzen in den Ergebnissen der Cannabinoidwirkungen geprüft wurden. Es wurden sowohl die longitudinale als auch die zirkuläre Darmmuskulatur beider Tierarten untersucht. Dies erscheint notwendig, da im zweiten in vitro Modell der komplexer ablaufende Peristaltische Reflex untersucht wurde, für dessen reibungslosen Ablauf das abgestimmte Zusammenspiel von Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur nötige Voraussetzung ist. In diesem standardisierten Organbad-Modell wurden ca. 10 cm lange Dünndarmstreifen der Ratte verwendet, da der experimentelle Nachweis des myenterischen Teils des Peristaltischen Reflexes an der Maus noch nicht gelungen ist. Die Streifen wurden mittels EFS angeregt, um nach Zugabe von Cannabinoiden den Ablauf des myenterischen Anteils des Peristaltischen Reflexes beurteilen zu können. In beiden Versuchsmodellen wurden etablierte Cannabinoide herangezogen und eindeutige Wirkungen verzeichnet, deren Nachweis bei diesen Tierarten bisher noch ausstand. Als weiteres Novum wurde Ajulemic Acid eingesetzt. Ein neues nicht liquorgängiges Cannabinoid, dessen Wirkung auf den Darm noch weitgehend unbekannt ist und mit diesen Modellen noch nicht nachgewiesen wurde. Die pharmakologische Potenz

dieser Substanz konnte so mit den gängigen Cannabinoiden qualitativ verglichen werden.

Die in vivo Versuchsmodelle, Experimente zum Dünndarmtransit und zur Kolon-Expulsion, sollten die Untersuchungen akademisch abrunden und nachweisen, dass die in vitro erhobenen Erfahrungen auf die in vivo Situation übertragbar sind. Hier kamen Mäuse vom Stamm C57/Bl6 zum Einsatz. Die Möglichkeit zur Zucht von $CB_1^{-/-}$ -Mäusen dieses Stammes prädestinierte sie hinsichtlich einer Weiterführung dieser Experimente für die durchgeführten Untersuchungen.

6.1 Elektrische Feldstimulation

Die Vorversuche zur Elektrischen Feldstimulation longitudinaler und zirkulärer Muskelstreifen von Maus und Ratte dienten der Evaluation geeigneter Stimulationsfrequenzen zur bestmöglichen Darstellung der Kontraktionsantworten. Die angestrebte prompt und zeitlich zuerst auftretende „schnelle“ Komponente und die sich daran anschließende, verzögert auftretende, „langsame“ Komponente der Kontraktionsantworten konnten mit den ausgewählten Frequenzen (s. Tabelle 1, S. 20) stabil reproduziert werden. Allein an der Zirkulärmuskulatur beider Tierarten waren die „langsamen“ Komponenten nur unregelmäßig darstellbar, weshalb hier das Augenmerk ausschließlich auf die ersten exzitatorischen Anteile gerichtet war. Die im Vergleich zur Literatur z. T. recht hoch gewählten Frequenzen (20 Hz, 50 Hz) sorgten u. a. für konstante Darstellungen der „langsamen“ Komponente an der Longitudinalmuskulatur. In Experimenten anderer Forschungsgruppen, deren Ziel die alleinige Untersuchung der „schnellen“ Komponente war, wurde z. B. zur Stimulation der longitudinalen Ileummuskulatur von Mäusen eine Frequenz von 10 Hz verwendet (91). Im Gegensatz zu den bestimmten Frequenzen stehen auch Angaben einer Veröffentlichung von JG De Man et al. Hier wurden zur Stimulation longitudinaler Ileummuskulatur von Mäusen Frequenzen zwischen 1 Hz - 8 Hz gewählt (20). Diese zeigten die bestmögliche Darstellung einer Inhibition der Darmmuskulatur unter nicht-adrenergen, nicht-cholineren (NANC) Bedingungen, die von den Wissenschaftlern bezweckt wurde. Für die durchgeführten Experimente dieser Arbeit kamen derart niedrige Frequenzen nicht in Betracht.

Die Elektrische Feldstimulation der glatten Muskelzellen des Dünndarms im Nativzustand, d. h. ohne Zugabe von Pharmaka in die Organbäder, bewirkte eine Kontraktion, sichtbar durch das Auftreten der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente. Nach Inkubation von Atropin (100 μM) und Tetrodotoxin ($3 \times 1 \mu\text{M}$) waren diese ausgelöscht bzw. auf ein Minimum reduziert. Das beweist den cholinerg und neuronal vermittelten Übertragungsweg zur Auslösung der Kontraktionen.

6.2 EFS an der Longitudinalmuskulatur von Maus und Ratte

Die longitudinalen und zirkulären Muskelstreifen beider Tierspezies wurden in den Organbaduntersuchungen jeweils mit zwei unterschiedlichen Frequenzen stimuliert. Ein Einfluss der Stimulationsfrequenz auf die Wirksamkeit der Testsubstanzen konnte nicht beobachtet werden. Dieser Rückschluss basiert nicht auf dem Vergleich der Ergebnisse mit Hilfe statistischer Mittel, sondern begründet sich auf den Vergleich der ermittelten Absolutwerte. Diese fielen bei beiden Frequenzen nahezu identisch aus und sind auch anhand der Kurvenverläufe in den Diagrammen nachvollziehbar.

Der CB_1 -Agonist WIN 55,212-2 und das Cannabinoid Ajulemic Acid bewirken an der longitudinalen Muskulatur der Maus bei Zugabe in kumulativ steigenden Konzentrationen eine vergleichbare, signifikante Abnahme der Amplitude der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente. Die Effekte von WIN 55,212-2 sind durch den selektiven CB_1 -Antagonisten SR 141716A blockierbar. WIN 55,212-2 wirkt somit nachweislich durch Bindung an den CB_1 -Rezeptor. Ajulemic Acid hingegen entfaltet auch in Anwesenheit von SR 141716A seine beschriebene Wirkung. Eine Beteiligung des CB_1 -Rezeptors kann nicht nachgewiesen werden. Die alleinige Zugabe von SR 141716A erzielte einen signifikanten Anstieg der Amplituden der „schnellen“ Komponente. Ab einer Konzentration von $\geq 10 \mu\text{M}$ zeigte sich jedoch im Sinne einer agonistischen Wirkung ein deutlicher Abfall der Amplituden. SR 141716A ist ein nachgewiesener CB_1 -Antagonist. Die vorliegenden Ergebnisse lassen aber auch an eine invers agonistische Wirkung denken. Darüber wird aber noch diskutiert, wie aus aktueller Literatur hervorgeht (16;101).

Die Resultate aus den Experimenten an der Longitudinalmuskulatur der Ratte wiesen Unterschiede zur Maus auf. Auffällig waren die Amplitudenvergrößerungen v. a. der „schnellen“ Komponenten unter dem Einfluss von Ajulemic Acid bis zu einer Konzentration von 1 μM . Da über die Effekte dieses Cannabinoids auf die Darmmotilität noch nicht viel bekannt ist, bleiben mögliche Erklärungsansätze für dieses Verhalten momentan spekulativ. Jedoch mehren sich hiermit die Vermutungen, dass an der Vermittlung seiner Effekte andere Rezeptoren involviert sein müssen (9). Zu den an der Wirkung von Ajulemic Acid beteiligten Rezeptoren wird an späterer Stelle genauer eingegangen.

Der CB_1 -Agonist WIN 55,212-2 verdeutlichte auch an der Longitudinalmuskulatur der Ratte seine agonistische Wirkung am CB_1 -Rezeptor. Belegt wurde dies sowohl durch die kontinuierliche und signifikante Reduktion der Kontraktionsantworten der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponenten als auch durch den Nachweis der Wirkungsblockade durch den CB_1 -Blocker SR 141716A. Ein sensibleres Ansprechen der Rattendünndarmmuskulatur auf WIN 55,212-2 wurde durch den angedeutet linearen Kurvenverlauf im Vergleich zum sigmoiden Verlauf bei der Maus registriert. Der CB_1 -Antagonist SR 141716A, der alleine appliziert eine Amplitudenerhöhung erzielte, konnte die Wirkung von Ajulemic Acid allenfalls modulieren, aber nach statistischer Auswertung nicht blockieren.

Die erzielten Ergebnisse für WIN 55,212-2 und SR 141716A an der Longitudinalmuskulatur von Maus und Ratte stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen. Sowohl die dosisabhängige Reduktion der Kontraktionsantworten durch WIN 55,212-2 als auch die Blockade dieses CB_1 -Agonisten durch den CB_1 -Antagonisten SR 141716A konnte an isolierten Muskelstreifen des Meerschweinchen-Ileums nachgewiesen werden (75). Die durch SR 141716A hervorgerufenen und den Cannabis-Agonisten entgegengesetzten Effekte – sichtbar im Anstieg der Amplituden bis zu einer Konzentration von 1 μM – sind auch an isolierten Meerschweinchen-Ileum-Streifen beobachtet worden (17;35).

Tachykinine, wie z. B. Neurokinin A und Substanz P, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation intestinaler Funktionen und sind am Auftreten der „langsamen“ Komponente elektrisch stimulierter Muskelstreifen beteiligt. Eine Beeinflussung dieses zweiten Anteils der Kontraktionsantwort durch die getesteten Cannabinoide wurde gezeigt. Eine Beeinflussung dieser Komponente durch

WIN 55,212-2 (Reduktion der Kontraktionsantwort) und SR 141716A (Anstieg der Kontraktionsantwort) ist bisher an der Zirkulärmuskulatur des Meerschweinchens gezeigt worden (48).

Die isolierten Dünndarmstreifen wurden, wie in Punkt 3 „Material und Methoden“ beschrieben, samt Mukosa und Submukosa für die Versuche verwendet. Welchen Einfluss diverse detoxifizierende Enzymsysteme dieser Dünndarmschichten auf die Wirkungsentfaltung der getesteten Cannabinoide ausüben, kann momentan noch nicht erörtert werden. Geplant sind aber Versuchsreihen, in denen longitudinale und zirkuläre Muskelstreifen nach Entfernung dieser Schichten zum Einsatz kommen.

6.3 EFS an der Zirkulärmuskulatur von Maus und Ratte

Die Kontraktion der Zirkulärmuskulatur während des Ablaufs der Peristaltik nimmt eine dominierende Stellung ein. Zur weiteren Klärung der Rolle von Cannabinoiden bei der Regulation der intestinalen Motilität durch Modulation der Neurotransmission an den finalen Motoneurone wurde die Zirkulärmuskulatur von Maus und Ratte herangezogen. Ein dosisabhängiger Abfall der Amplituden nach Zugabe von WIN 55,212-2 konnte bei beiden Tierspezies verzeichnet werden. Die Beweisführung der CB₁-Vermittlung dieser Effekte verlief jedoch ergebnislos, da der CB₁-Antagonist SR 141716A bei alleiniger Zugabe ebenfalls dosisabhängig einen Abfall der Amplituden im Sinne einer agonistischen Wirkung verursachte. Untersuchungen am Meerschweinchen zeigten ein konträres Ansprechen der Zirkulärmuskulatur auf SR 141716A (53). Hier konnte auch WIN 55,212-2, das seine agonistische Wirkung verdeutlichte, durch SR 141716A in seiner Wirkung blockiert werden (48).

Auch Ajulemic Acid zeigte unterschiedliche Effekte auf die Neurotransmission an der Zirkulärmuskulatur verschiedener Tierspezies. Während bei der Maus eine dosisabhängige Reduktion der Kontraktionsantworten zu verzeichnen war, konnten bei der Ratte keine Veränderungen der Amplituden beobachtet werden. Nach dem Ausbleiben einer Wirkung von Ajulemic Acid wurde folglich auf einen Blockadeversuch durch SR 141716A verzichtet.

Die bis hier aufgeführten Ergebnisse zur Longitudinal- und Zirkulärmuskulatur lassen erkennen, dass die Dünndarmmotilität *in vitro* durch den CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 und den CB₁-Antagonisten SR 141716A beeinflussbar ist. Des Weiteren übt das Cannabinoid Ajulemic Acid einen agonistischen Effekt auf die Neurotransmission an der Mausmuskulatur aus. Ungeklärt ist jedoch die Rezeptorzugehörigkeit von Ajulemic Acid, da mit Hilfe von SR 141716A keine Zuordnung der Wirkung zum CB₁-Rezeptor erfolgen konnte. Auch die fehlende Wirkung von Ajulemic Acid an der Zirkulärmuskulatur und der gegenteilige Effekt an der Longitudinalmuskulatur der Ratte weisen auf eine Wirkungsvermittlung durch einen anderen Rezeptor als den CB₁-Rezeptor hin, da WIN 55,212-2 und SR 141716A wohl wirken. Möglich wäre auch, dass die Ratte im Vergleich zur Maus andere Spleißvarianten der CB-Rezeptoren besitzt, die zwar eine Wirkung von WIN 55,212-2 und SR 141716A zulassen, aber keine Wirkung von Ajulemic Acid. Wahrscheinlicher ist aber, dass Ajulemic Acid über einen Rezeptor wirkt, der der Ratte fehlen könnte. Welcher Rezeptor das sein könnte, sollte mit den folgenden Versuchen geklärt werden.

6.4 EFS der Zirkulärmuskulatur der Maus und Ajulemic Acid

Die Versuche mit Ajulemic Acid und Blockern verschiedener Rezeptoren wurden an der Zirkulärmuskulatur der Maus durchgeführt. An diesem Gewebe zeigte Ajulemic Acid in den bisherigen Versuchen seine beste Wirkung. Das Ziel dieser Experimente war, herauszufinden, über welchen Rezeptor das Cannabinoid Ajulemic Acid seine Effekte vermittelt. Wie gezeigt, konnte es durch den selektiven CB₁-Antagonisten SR 141716A nicht blockiert werden. Dieser Blocker war das Mittel der ersten Wahl, denn Ajulemic Acid ist eine chemische Modifikation des Δ^9 -THC-Abbauproduktes THC-11-OIC-Acid (79;95). Diese Substanz zeichnet sich durch das Fehlen von psychotropen Effekten aus, wie es in Versuchen an Menschen nachgewiesen wurde (8;53). Überdies zeigte diese Substanz auch keine Verhaltensauffälligkeiten bei Versuchstieren, wie sie ansonsten typischerweise bei Experimenten mit Δ^9 -THC auftreten (10). Die Modifikation besteht in einer Verlängerung der Seitenkette

THC-11-OIC-Acid um 2 C-Atome sowie um eine Dimethylierung des C-Atoms nahe des aromatischen Ringes (s. Abb. 36, S. 67). Diese Veränderungen sollten zu einer Verbindung führen, die 50 - 100fach potenter ist als Δ^9 -THC.

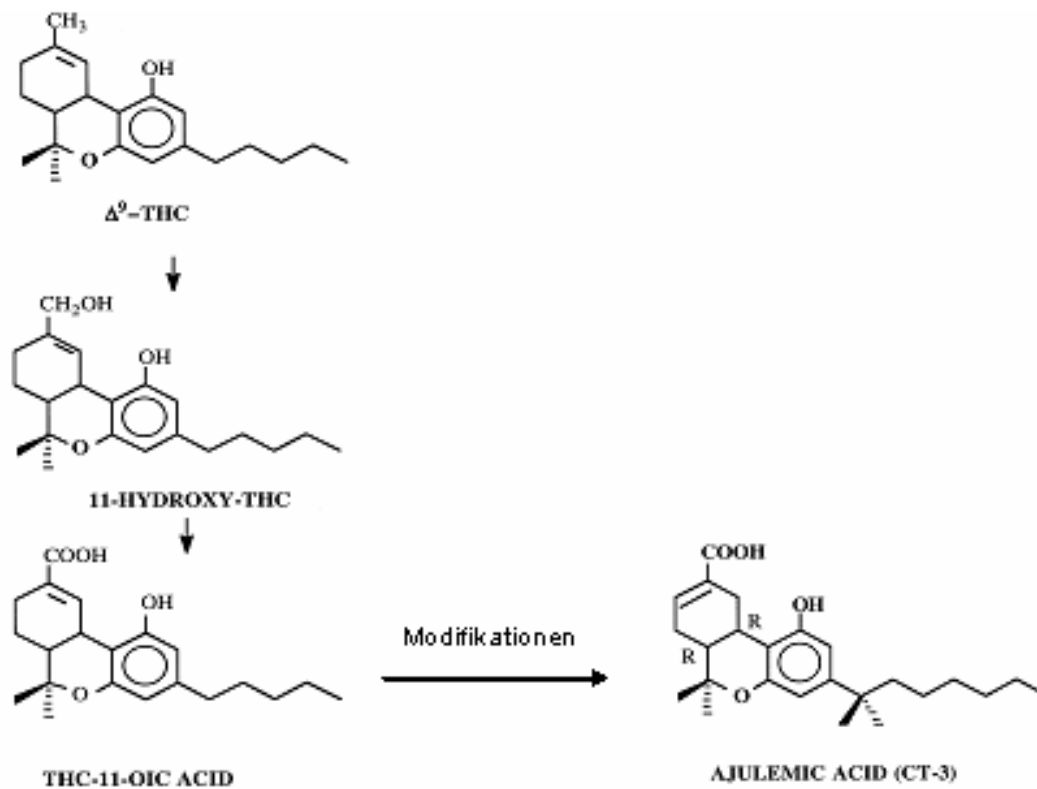


Abbildung 36: Abbauweg von Δ^9 -THC zu THC-11-OIC-Acid und Struktur von Ajulemic Acid (11).

Die ausgebliebene Blockade durch den CB_1 -Antagonisten SR 141716A ist auch zum Teil durch die alleinige Wirkung von SR 141716A zu erklären. Wie gezeigt, bewirkt der CB_1 -Antagonist eine dosisabhängige Reduktion der Amplituden an der Zirkulärmuskulatur der Maus. Eine Wirkungsentfaltung von Ajulemic Acid am CB_1 -Rezeptor bleibt aber aufgrund der Ergebnisse an der Longitudinalmuskulatur zu diskutieren. Dem entgegen stehen die Resultate aus Bindungsstudien an transfizierten Zellkulturen, die den menschlichen CB_1 - bzw. CB_2 -Rezeptor exprimierten. Ajulemic Acid hat mit hoher Affinität an den menschlichen CB_1 - und CB_2 -Rezeptor gebunden (29). Neben dem CB_1 -Antagonisten SR 141716A kam auch

der CB₂-Antagonist AM 630 zum Einsatz, der wegen seiner Lokalisation auf Zellen des Immunsystems erwartungsgemäß keinen blockierenden Effekt auf Ajulemic Acid ausübte.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass mehrere natürliche Cannabinoide der Cannabispflanze inklusive Cannabidiol (CBD) und Δ^9 -THC nicht nur Wechselwirkungen mit Cannabinoid-Rezeptoren aufweisen, sondern auch mit verschiedenen Unterfamilien, so genannter „transienter Rezeptorpotentialkanäle“ (TRP), wie z. B. dem Vanilloid-Typ-1-TRP (TRPV₁) (21). Ein Vertreter der TRPV₁-Antagonisten ist Capsazepine, das in den durchgeführten Versuchen keinen antagonisierenden Effekt auf Ajulemic Acid erwirken konnte.

Zum Ausschluss einer möglichen Beteiligung von Opioid-Rezeptoren an der Wirkung von Ajulemic Acid wurden der ORL₁-Rezeptor-Antagonist (Opioid-Like-Rezeptor) n-phe-Nociceptin und der Opioid-Rezeptor-Antagonist Naloxon (Antagonist an μ -, κ -, δ -Rezeptoren) als mögliche Blocker herangezogen. Eine Blockade konnte mit diesen Substanzen nicht erzielt werden. Mit den Sympathikusblockern Phentolamine (α -Rezeptor-Blocker) und Propranolol (β -Rezeptor-Blocker) konnte ebenfalls keine Wirkungsblockade von Ajulemic Acid erreicht werden.

Vor kurzem wurden zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der Familie der Cannabinoid-Rezeptoren zugeordnet. Der GPR55- und vermutlich auch der GPR119-Rezeptor (G-Protein-coupled-Rezeptor). Beide Rezeptoren konnten im GI-Trakt der Maus nachgewiesen werden. In Zellkulturen konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Cannabinoide an den GPR55-Rezeptor binden und einen intrazellulären Ca⁺⁺ Anstieg bewirken (7). Der GPR119-Rezeptor entblößte sich als mutmaßlicher Cannabinoid-Rezeptor durch die Aktivierung durch Oleoylethanolamid (OEA). OEA ist strukturell dem endogenen Cannabinoid Anandamid ähnlich, bindet aber nicht an CB₁/CB₂-Rezeptoren und ist im wesentlichen an der Regulation von Nahrungsaufnahme und Körpergewicht beteiligt (7). Für beide Rezeptoren sind zurzeit noch keine Antagonisten verfügbar. Eine mögliche Beteiligung dieser Rezeptoren an der Wirkungsentfaltung von Ajulemic Acid kann mit diesem Versuchsmodell nicht geklärt werden.

6.5 Peristaltischer Reflex

In dem *in vitro* Modell zum Peristaltischen Reflex wurde der Einfluss von Cannabinoiden auf die elektrisch ausgelösten ascendierenden Kontraktionen untersucht. Ausgewertet wurden die Parameter „zeitliche Latenz“, „Amplitudengröße“ und „Area under the curve“ (AUC) der Kontraktion. Die Latenz wurde als Zeitspanne zwischen Beginn der Stimulation und Start der Kontraktionsantwort definiert und repräsentierte das zeitliche Fortschreiten des Peristaltischen Reflexes durch die daran beteiligten Interneurone. Die Amplitudengröße und die AUC – als Ausdruck der Kraft der Kontraktionsantworten – spiegelte die Beteiligung der bekannterweise präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptoren an den finalen Motoneurone wider. Aus früheren Experimenten anhand eines ähnlichen Versuchsmodells zum Peristaltischen Reflex stammt der Nachweis, dass die durch die Elektrische Feldstimulation ausgelösten Kontraktionen neuronal und cholinerg vermittelt sind (102). Nach Zugabe von Tetrodotoxin bzw. Atropin konnten mittels Elektrischer Stimulation keine Kontraktionen mehr ausgelöst werden.

In den durchgeführten Experimenten reduzierte der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 dosisabhängig die Amplituden und die AUC der elektrisch induzierten Kontraktionen und führte zu einer Verlängerung der Latenz. Der CB₁-Antagonist SR 141716A blockierte alle Effekte von WIN 55,212-2 und führte seinerseits neben der Verkürzung der Latenz zu einer Vergrößerung der Amplituden und der AUC. Diese Ergebnisse lassen erkennen, dass die Effekte von WIN 55,212-2 über den CB₁-Rezeptor vermittelt sind und sowohl die Interneurone als auch die finalen Motoneurone durch die genannten Cannabinoide beeinflusst werden. Wie bereits in den vorher diskutierten Organbaduntersuchungen gesehen, spiegeln sich auch hier die zu den Cannabis-Agonisten gegenteiligen Effekte von SR 141716A wider, sichtbar in der größeren Kraftentwicklung nach elektrischer Stimulation. Untersuchungen von Yüce et al., in denen in einem Zwei-Kammer-Modell die Wirkung des CB₁-Antagonisten AM 251 und des endogenen Cannabis-Agonisten Anandamid auf die ascendierenden Kontraktionen des Peristaltischen Reflexes am Dünndarm von Ratten getestet wurden, ergaben ähnliche Resultate (102). Der CB₁-Antagonist AM 251 führte nach Elektrischer Feldstimulation zu vergrößerten Amplituden und AUCs, während der Agonist Anandamid dosisabhängig gegenteilige Effekte bewirkte. Eine signifikante Änderung der Latenz konnte hier allerdings nicht

nachgewiesen werden, was zu den erarbeiteten Ergebnissen im Gegensatz steht und deren Ursachen in den strukturellen Unterschieden der beiden Antagonisten zu suchen sind. In einem anderen Modell zum Peristaltischen Reflex, das die intraluminale Perfusion zur Auslösung von aszendierenden Kontraktionen nutzte, konnte die eingeschränkte Kontraktilität nach Zugabe des Agonisten Methanandamid anhand des Anstiegs des intraluminalen Druckes nachgewiesen werden (39). An isolierten Ileum-Segmenten des Meerschweinchens wurde ein erhöhter Entleerungsdruck während der Entleerungsphase des Peristaltischen Reflexes durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A und ein erniedrigter Entleerungsdruck durch den CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 induziert (51).

Die Ergebnisse der Versuche mit Ajulemic Acid spiegeln eine relativ geringe Einflussnahme auf den Ablauf des Peristaltischen Reflexes wider. Sie erscheint im Vergleich zu den Resultaten mit WIN 55,212-2 nicht sehr imposant, da wesentliche Veränderungen der Latenz, der Amplitude und der AUC erst ab einer hohen Konzentration von 1 µM auftreten. Bis zu dieser Konzentration sind die Versuchszahlen statistisch unverändert zur Kontrolle, d. h. die Substanz Ajulemic Acid übt zunächst keine Wirkung aus. Die Kurven beim Blockadeversuch von Ajulemic Acid durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A zeigten bis zu der Konzentration von 1 µM gleichsinnige Veränderungen wie bei alleiniger Zugabe dieses Antagonisten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von Ajulemic Acid auf den Peristaltischen Reflex nicht durch den CB₁-Rezeptor vermittelt wird.

6.6 Dünndarmtransit

Der in vivo Versuch zum Dünndarmtransit der Maus überträgt die Erkenntnisse der in vitro Versuche. Das Cannabinoid Ajulemic Acid führte zu einer dosisabhängigen Reduktion der Dünndarmpassage. Der Blockadeversuch von Ajulemic Acid durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A verlief negativ. Wie bereits in den in vitro Versuchen gezeigt, ist der CB₁-Rezeptor nicht an der Wirkungsvermittlung von Ajulemic Acid beteiligt. Das Modell zum Dünndarmtransit ist das Standardmodell zur Bestimmung des Dünndarmtransits, wird aber zunehmend zurückhaltend eingesetzt, weil sehr viele Versuchstiere benötigt werden. Dennoch gibt es zahlreiche

Ergebnisse, die für dieses Modell belegen, dass Cannabinoide einen hemmenden Einfluss auf die Motilität des Dünndarms ausüben. So konnte gezeigt werden, dass der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 einen hemmenden Einfluss auf den Dünndarmtransit ausübt und durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A blockiert werden konnte. SR 141716A, alleine appliziert, führte zu einer dosisabhängigen Beschleunigung des Transits (13;49). Dieser gegenteilige Effekt war auch in den in vitro Versuchen zu beobachten, beispielsweise sichtbar in den Vergrößerungen der Amplituden nach Elektrischer Feldstimulation. Der prokinetische Effekt spricht dafür, dass ein endogener „Cannabinoid-Tonus“, der für gewöhnlich die Aktivität der intestinalen Propulsion inhibiert, durch CB₁-Antagonisten antagonisiert wird.

Für den Einfluss von Cannabinoiden auf den physiologischen Tonus der Dünndarmmotilität sprechen auch Daten aus vergleichenden Versuchen zum Dünndarmtransit an CB₁^{+/+}- und CB₁^{-/-}-Mäusen. In den CB₁^{-/-}-Mäusen zeigte sich ein signifikant beschleunigter Dünndarmtransit im Vergleich zu den CB₁^{+/+}-Wildtyp-Mäusen (102).

6.7 Kolon-Expulsion

Die Versuche zur Kolon-Expulsion waren als in vivo Modell als Ergänzung zu den in vitro Versuchen angedacht. Neben dem Vorkommen von CB₁-Rezeptoren im Dünndarm sind diese auch in hohem Maße im Rektum nachgewiesen worden (12). Diese Art der Motilitätsversuche ist ebenfalls etabliert und standardisiert durchführbar. Der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 zeigte seine Wirkung in der Verlängerung der Expulsionszeit (49). Der CB₁-Antagonist SR 141716A konnte diesen Effekt vollständig blockieren und beschleunigte bei alleiniger Gabe die Passagezeit signifikant. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Pinto et al., die die gleichen Versuche an einem anderen Stamm von Mäusen durchführte (76).

Auch Ajulemic Acid bewirkte eine dosisabhängige Verzögerung der Expulsion der in das Rektum eingeführten Glaskugel. Entgegen den in vitro Versuchen und den in vivo Transitversuchen konnte diese Wirkung aber durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A aufgehoben werden. Dies belegt, dass die Wirkungen von Ajulemic

Acid auf die Kolon-Expulsion zumindest teilweise über den CB₁-Rezeptor vermittelt werden.

Zielführender – nicht zuletzt zur Erklärung der Ergebnisse mit den Substanzen Ajulemic Acid und SR 141716A – ist die Diskussion über die möglichen Hauptmechanismen dieses Versuchsmodells. Sowohl die „mentale Bereitschaft“ der Versuchstiere zur Expulsion der Glaskugel als auch der Einfluss des Schließmuskels samt der anteiligen Willkürmotorik müssen bei der Untersuchung der Entleerungsfunktion des Rektums mit berücksichtigt werden. Sicherlich spielt auch die Rektumsensitivität eine Rolle, denn die eingeführte Glaskugel stellt einen adäquaten Reiz dar, so dass die Ergebnisse aus dem komplexeren Expulsionsmodell nicht direkt mit denen des Peristaltischen Reflexes vergleichbar oder mit Motilitätseffekten alleine erklärbar sind. In Untersuchungen zur Beteiligung von Cannabinoid- Rezeptoren an der (Hyper-) Sensitivität des Rektums von Ratten unter basalen und artifiziell inflammatorischen Bedingungen konnte der Einfluss von Cannabinoiden gezeigt werden. Ein in das Rektum eingeführter Ballon wurde nach und nach druckkontrolliert aufgeblasen. Parallel dazu wurde der Druck im Darm gemessen, der mit zunehmendem Ballondruck nachweislich anstieg. Mittels Elektroden, die in die schrägen Bauchmuskeln der Ratten implantiert wurden, konnte die elektrische Aktivität bzw. die Anzahl an Kontraktionen dieser Muskeln bei unterschiedlichen Ballondrücken gemessen werden. Der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 und der CB₂-Agonist JWH 015 bewirkten im Vergleich zur Kontrolle bei steigenden Ballondrücken nach intraperitonealer Injektion eine signifikante Reduktion der Anzahl an Muskelkontraktionen sowohl unter basalen Konditionen als auch nach der Induktion einer Kolitis durch Trinitrobenzensuslphonsäure (TNBS). Die Effekte von WIN 55,212-2 konnten durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A blockiert werden, der alleine appliziert zu einer vermehrten Anzahl von Muskelkontraktionen führte. JWH 015 konnte durch den CB₂-Antagonisten SR 144528 antagonisiert werden, zeigte aber nach alleiniger Injektion keine Wirkung auf die abdominellen Muskelkontraktionen (81). Der CB₁-Rezeptor scheint eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Darmsensitivität zu spielen und könnte in diesem Zusammenhang möglicher Wirkort für Ajulemic Acid sein.

Dieses Versuchsmodell wird keinesfalls eindeutig einer der erwähnten Funktionen zuzuschreiben sein, aber es ist offenkundig, dass in diesem Modell, das die

Entleerungsfunktion untersucht, der Motilitätsanteil dem Anschein nach der geringste ist und die Sensitivität bzw. die mentale Bereitschaft eher die bedeutenden.

7 Zusammenfassung

In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Modulation am CB₁-Rezeptor die Motilität des Dünndarms von Maus und Ratte *in vitro* und *in vivo* beeinflusst werden kann. Der etablierte CB₁-Agonist WIN 55,212-2 führte in Experimenten an isolierten Dünndarm-Muskelstreifen von Maus und Ratte nach elektrischer Stimulation zu signifikanten Reduktionen der nachweislich neuronal und cholinerg vermittelten Kontraktionsantworten zirkulärer und longitudinaler Muskulatur. Diese Effekte auf die Neurotransmission konnten durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A an der Longitudinalmuskulatur beider Tierspezies aufgehoben werden und belegten somit den CB₁-gekoppelten Wirkungsmechanismus. SR 141716A entfaltete seine antagonistischen Effekte auch bei alleiniger Zugabe durch ein Ansteigen der Kontraktionsamplituden an der Longitudinalmuskulatur von Maus und Ratte und bewirkte an der Zirkulärmuskulatur dosisabhängig einen Abfall der Amplituden im Sinne einer invers agonistischen Wirkung. Das neue nicht liquorgängige Cannabinoid Ajulemic Acid agierte als Cannabis-Agonist, konnte aber durch den CB₁-Antagonisten SR 141716A nicht blockiert werden und verdeutlichte nicht zuletzt durch die Ergebnisse an der Rattenmuskulatur seine bis dato ungeklärte Rezeptorzugehörigkeit. Auch nach Anwendung von Antagonisten verschiedener Gruppen, wie den CB₂-, TRPV₁-, μ -, ORL₁-, α - und β -Rezeptoren, konnte ein solcher Nachweis nicht erbracht werden. Zwei Rezeptoren, der GPR55- und der GPR119-Rezeptor, die seit kurzem der Familie der Cannabinoid-Rezeptoren zugeschrieben werden, könnten aufgrund der erzielten Ergebnisse und nach Ausschluss der etablierten CB₁- und CB₂-Rezeptoren als Angriffspunkte für Ajulemic Acid dienen. Dies bleibt aber bis auf weiteres spekulativ.

Die bei Elektrischer Feldstimulation an der Longitudinalmuskulatur auftretende zweite bzw. „langsame“ Komponente der Kontraktionsantworten, die tachykinerg vermittelt wird, wurde durch die Testsubstanzen in analoger Art und Weise verändert.

In einem weiterem Organbadmodell zur Untersuchung des myenterischen Anteils des Peristaltischen Reflexes stellte sich heraus, dass Cannabinoide nicht nur an finalen Motoneurone, sondern auch an Interneurone Einfluss auf die Neurotransmission ausüben. Dabei erwiesen sich WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid

als hemmend und SR 141716A als fördernd auf den Ablauf des Peristaltischen Reflexes.

Das in vivo Versuchsmodell zum Dünndarmtransit an Mäusen überträgt die in vitro gewonnenen Erkenntnisse. Der CB₁-Agonist WIN 55,212-2 verzögerte und der CB₁-Antagonist SR 141716A beschleunigte die Dünndarm-Passage einer oral zugeführten, nicht resorbierbaren Markersubstanz. Ajulemic Acid erwies sich als propulsionshemmend und konnte durch SR 141716A nicht in seiner Wirkung antagonisiert werden.

Das abschließende in vivo Modell zur Glaskugel-Expulsion bei Mäusen demonstrierte den Einfluss von Cannabinoiden auf das Kolon. Eine in das Rektum eingeführte Glaskugel wurde von den Versuchstieren nach i. p. Injektion von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid verzögert und nach SR 141716A beschleunigt ausgeschieden. Entgegen den Erwartungen waren nicht nur die Effekte von WIN 55,212-2, sondern auch die von Ajulemic Acid durch SR 141716A blockierbar. Das führte zu weiteren Überlegungen hinsichtlich der Rezeptorzugehörigkeit von Ajulemic Acid bzw. möglicher Mechanismen, die durch die eingeführte Glaskugel in Gang gesetzt werden. Neben der Motilität sind auch beispielsweise die Rektumsensitivität und die Bereitschaft zur Darmentleerung wesentliche Untersuchungsziele dieses Versuchsmodells.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass sowohl agonistische und antagonistische Liganden am CB₁-Rezeptor Möglichkeiten zur Behandlung von Motilitätsstörungen am Dick- und Dünndarm bieten. Ajulemic Acid könnte eine bedeutende Alternative zu den bekannten Cannabinoiden darstellen, da es CB₁-Rezeptor unabhängig die Motilität beeinflusst und es sich durch das Fehlen von zentralen Nebenwirkungen auszeichnet. Ein klinischer Einsatz bei Motilitätsstörungen lässt sich derzeit nur vorsichtig avisieren, da klinische Studien zu Ajulemic Acid noch ausstehen. Es erscheint aber mit Ajulemic Acid erstmals überlegenswert.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen der Längsmuskulatur von Maus und Ratte..... 7
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen der zirkulären Muskulatur von Maus und Ratte. Der grau hinterlegte Bereich stellt – im Vergleich zu Abbildung 1 – die im vorausgegangenen Text beschriebenen Unterschiede/abweichenden Platzierungen der Elektroden und der Dünndarmstreifen dar..... 8
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen des Peristaltischen Reflexes 2 cm und 4 cm oral der Stimulationselektrode. 11
- Abbildung 5: Kontraktionsantworten der longitudinalen Muskulatur der Maus bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert. 20
- Abbildung 6: Kontraktionsantworten der zirkulären Muskulatur der Maus bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert. 21
- Abbildung 7: Kontraktionsantworten der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert. 21
- Abbildung 8: Kontraktionsantworten der zirkulären Muskulatur der Ratte bei aufsteigenden Frequenzen von 1 Hz bis 50 Hz. Die ausgewählten Frequenzen sind grau schraffiert. 22
- Abbildung 9: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin (TTX) und Atropin auf die Kontraktionsantwort der longitudinalen Muskulatur der Maus bei 10 Hz und 50 Hz. 23
- Abbildung 10: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der zirkulären Muskulatur der Maus bei 10 Hz und 20 Hz. 24
- Abbildung 11: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei 10 Hz und 20 Hz. 24
- Abbildung 12: Die Abbildung zeigt die Wirkung von Tetrodotoxin und Atropin auf die Kontraktionsantwort der zirkulären Muskulatur der Ratte bei 20 Hz und 50 Hz. 25

Abbildung 13: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 26

Abbildung 14: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 27

Abbildung 15: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 28

Abbildung 16: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 29

- Abbildung 17: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 30
- Abbildung 18: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 31
- Abbildung 19: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 32
- Abbildung 20: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 10 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 33

- Abbildung 21: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „langsame“ Komponente der longitudinalen Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 μ M) + WIN 55,212-2 bzw. Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 μ M) + Ajulemic Acid; n = 6. 34
- Abbildung 22: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 20 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 35
- Abbildung 23: Die Abbildung zeigt den Einfluss von WIN 55,212-2 und Ajulemic Acid (beide alleine und nach Blockadeversuch durch SR 141716A (1 μ M)) und SR 141716A auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Ratte bei einer Frequenz von 50 Hz. SR 141716A nimmt bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirkt in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die SR 141716A-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 36
- Abbildung 24: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ajulemic Acid alleine und nach Zugabe folgender Rezeptorblocker (beteiligter Rezeptor und applizierte Konzentration in Klammern): SR 141716A (CB₁, 1 μ M), AM 630 (CB₂, 1 μ M), Capsazepine (TRPV₁, 10 μ M), n-Phe-Nociceptin (ORL₁, 1 μ M), Naloxone (μ , κ , δ , 1 μ M) und Phentolamine (α , 1 μ M) + Propranolol (β , 1 μ M) auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 10 Hz. Die einzelnen Rezeptorblocker nehmen bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirken in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die Blocker-Zugabe (1 μ M) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle (in der Abbildung als Ant. = Antagonist bezeichnet). Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle (Ant.) \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; n = 8. 37

- Abbildung 25: Die Abbildung zeigt den Einfluss von Ajulemic Acid alleine und nach Zugabe folgender Rezeptorblocker (beteiligter Rezeptor und applizierte Konzentration in Klammern): SR 141716A (CB₁, 1 µM), AM 630 (CB₂, 1 µM), Capsazepine (TRPV₁, 10 µM), n-Phe-Nociceptin (ORL₁, 1 µM), Naloxone (µ, κ, δ, 1 µM) und Phentolamine (α, 1 µM) + Propranolol (β, 1 µM) auf die „schnelle“ Komponente der zirkulären Muskulatur der Maus bei einer Frequenz von 20 Hz. Die einzelnen Rezeptorblocker nehmen bei Zugabe in dieser Konzentration Einfluss auf die Muskelkontraktionen und bewirken in den Blockadeversuchen Abweichungen vom 100%-Ausgangswert. Deswegen dienen die durch die Blocker-Zugabe (1 µM) ermittelten Werte in den Blockadeversuchen als Kontrolle (in der Abbildung als Ant. = Antagonist bezeichnet). Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle (Ant.) ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 8..... 38
- Abbildung 26: Dargestellt sind repräsentative Aufzeichnungen der aszendierenden Reflexantworten 2 cm und 4 cm oral der Stimulation unter dem Einfluss von kumulativ steigenden Konzentrationen von WIN 55,212-2..... 39
- Abbildung 27: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Latenz der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Latenzen. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 40
- Abbildung 28: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Amplitude der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 41
- Abbildung 29: Einfluss von WIN 55,212-2 auf die Fläche unter der Kurve (AUC = Area under the curve) der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Flächen unter der Kurve. Ab einer Konzentration von 10 µM waren keine Kontraktionen mehr nachweisbar. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6. 41
- Abbildung 30: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Latenz der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Latenzen. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6 44
- Abbildung 31: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Amplitude der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6 45

- Abbildung 32: Einfluss von Ajulemic Acid auf die Fläche unter der Kurve (AUC) der aszendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall der Amplituden. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 6$ 45
- Abbildung 33: Einfluss des Cannabinoids Ajulemic Acid alleine und SR 141716A (0,62 mg/kg KG) + Ajulemic Acid in aufsteigenden Konzentrationen auf den Dünndarmtransit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; $n = 8$ 47
- Abbildung 34: Einfluss des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2, des CB₁-Antagonisten SR 141716A, und SR 141716A (1 mg/kg/KG) + WIN 55,212-2 in aufsteigenden Konzentrationen auf die Kolon-Expulsionszeit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Minuten verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A (1 mg/kg/KG) + WIN 55,212-2; $n = 8$ 49
- Abbildung 35: Einfluss des Cannabinoids Ajulemic Acid alleine und SR 141716A (1 mg/kg/KG) + Ajulemic Acid in aufsteigenden Konzentrationen auf die Kolon-Expulsionszeit der Maus. Angegeben sind die Mittelwerte in Minuten verglichen mit der Kontrolle \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrolle; # = $p < 0,05$ für Ajulemic Acid gegen SR 141716A (1 mg/kg/KG) + Ajulemic Acid; $n = 9$ 50
- Abbildung 36: Abbauweg von Δ^9 -THC zu THC-11-OIC-Acid und Struktur von Ajulemic Acid 67

9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Ausgewählte Frequenzen zur bestmöglichen Darstellung und Wiederholbarkeit der „schnellen“ und der „langsamen“ Komponente der longitudinalen und zirkulären Muskulatur von Maus und Ratte. 20
- Tabelle 2: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB₁-Antagonisten SR 141716A auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; n = 6..... 42
- Tabelle 3: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB₁-Antagonisten SR 141716A (100 nM) und des CB₁-Agonisten WIN 55,212-2 auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # = p < 0,05 für WIN 55,212-2 gegen SR 141716A + WIN 55,212-2; n = 6..... 43
- Tabelle 4: Die Tabelle zeigt den Einfluss des CB₁-Antagonisten SR 141716A (100 nM) und des Cannabinoids Ajulemic Acid auf die Latenz, die Amplitude und die Fläche unter der Kurve der ascendierenden Kontraktionen 2 cm und 4 cm oral der Stimulation. Angegeben sind die Mittelwerte in Prozent verglichen mit der Kontrolle ± SEM. * = p < 0,05; ** = p < 0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # = p < 0,05 für Ajulemic Acid gegen SR 141716A + Ajulemic Acid; n = 6..... 46

10 Referenzen

- (1) Altaf MA, Sood MR. The nervous system and gastrointestinal function. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14: 87-95.
- (2) Auerbach L. Ueber einen plexus gangliosis myogastricus. *Jahresberichte der schlesischen Gesellschaft für vaterländische Kultur* 1863; 40: 103-4.
- (3) Bayliss W, Starling EH. The movements and innervation of small intestine. *J Physiol Lond* 1899; 24: 99-143.
- (4) Benarroch EE. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007; 69: 1953-7.
- (5) Blumberg RS. Crohn disease. *JAMA* 2008; 300: 439-40.
- (6) Breivogel CS, Griffin G, Di M, V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 155-63.
- (7) Brown AJ. Novel cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 567-75.
- (8) Burstein S. Ajulemic acid (IP-751): synthesis, proof of principle, toxicity studies, and clinical trials. *AAPS J* 2005; 7: E143-E148.
- (9) Burstein SH. Ajulemic acid (CT3): a potent analog of the acid metabolites of THC. *Curr Pharm Des* 2000; 6: 1339-45.
- (10) Burstein SH, Hull K, Hunter SA, Latham V. Cannabinoids and pain responses: a possible role for prostaglandins. *FASEB J* 1988; 2: 3022-6.
- (11) Burstein SH, Karst M, Schneider U, Zurier RB. Ajulemic acid: A novel cannabinoid produces analgesia without a "high". *Life Sci* 2004; 75:1513-22.
- (12) Casu MA, Porcella A, Ruiu S, Saba P, Marchese G, Carai MA, Reali R, Gessa GL, Pani L. Differential distribution of functional cannabinoid CB₁ receptors in the mouse gastroenteric tract. *Eur J Pharmacol* 2003; 459: 97-105.
- (13) Colombo G, Agabio R, Lobina C, Reali R, Gessa GL. Cannabinoid modulation of intestinal propulsion in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 344: 67-9.
- (14) Costa B, Colleoni M, Conti S, Trovato AE, Bianchi M, Sotgiu ML, Giagnoni G. Repeated treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 reduces both hyperalgesia and production of pronociceptive mediators in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 4-8.
- (15) Costa M, Furness JB. The peristaltic reflex: an analysis of the nerve pathways and their pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1976; 294: 47-60.

- (16) Coutts AA, Brewster N, Ingram T, Razdan RK, Pertwee RG. Comparison of novel cannabinoid partial agonists and SR141716A in the guinea-pig small intestine. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 645-52.
- (17) Coutts AA, Pertwee RG. Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1557-66.
- (18) Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9371-6.
- (19) D'Argenio G, Valenti M, Scaglione G, Cosenza V, Sorrentini I, Di Marzo V. Up-regulation of anandamide levels as an endogenous mechanism and a pharmacological strategy to limit colon inflammation. *FASEB J* 2006; 20: 568-70.
- (20) De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Pelckmans PA. Study on the cyclic GMP-dependency of relaxations to endogenous and exogenous nitric oxide in the mouse gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 88-96.
- (21) De Petrocellis L, Vellani V, Schiano-Moriello A, Marini P, Magherini PC, Orlando P, Di Marzo V. Plant-derived cannabinoids modulate the activity of transient receptor potential channels of ankyrin type-1 (TRPA1) and melastatin type-8 (TRPM-8). *J Pharmacol Exp Ther* 2008 19; 325: 1007-15.
- (22) Deutsch DG, Ueda N, Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 201-10.
- (23) Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterisation of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34: 605-13.
- (24) Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 1992; 258: 1946-9.
- (25) Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR. Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* 2000; 75: 2434-44.
- (26) Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10819-24.
- (27) Drossman DA, Whitehead WE, Camilleri M. Irritable bowel syndrome: a technical review for practice guideline development. *Gastroenterology* 1997; 112: 2120-37.

- (28) Duncan M, Davison JS, Sharkey KA. Review article: endocannabinoids and their receptors in the enteric nervous system. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 667-83.
- (29) Dyson A, Peacock M, Chen A, Courade JP, Yaqoob M, Groarke A, Brain C, Loong Y, Fox A. Antihyperalgesic properties of the cannabinoid CT-3 in chronic neuropathic and inflammatory pain states in the rat. *Pain* 2005; 116:129-37.
- (30) Earleywine M. *Understanding Marijuana: A new look at the scientific evidence*. Oxford: Oxford University Press; 2002; p. 11-12.
- (31) Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 443-50.
- (32) Fichera M, Cruciani G, Bianchi A, Musumarra G. A 3D-QSAR study on the structural requirements for binding to CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors. *J Med Chem* 2000; 43: 2300-9.
- (33) Furness JB, Bornstein JC, Kunze WA, Bertrand PP, Kelly H, Thomas EA. Experimental basis for realistic large-scale computer simulation of the enteric nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23: 786-92.
- (34) Germano MP, D'Angelo V, Mondello MR, Pergolizzi S, Capasso F, Capasso R, Izzo AA, Mascolo N, De Pasquale R. Cannabinoid CB₁-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 363: 241-4.
- (35) Gifford AN, Ashby CR, Jr. Electrically evoked acetylcholine release from hippocampal slices is inhibited by the cannabinoid receptor agonist, WIN 55212-2, and is potentiated by the cannabinoid antagonist, SR 141716A. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 1431-6.
- (36) Grider JR, Foxx-Orenstein AE. Mediators and regulation of peristalsis. *Curr Opin Gastroenterol* 1999; 15: 22-5.
- (37) Grinspoon L. The future of medical marijuana. *Forsch Komplementarmed* 1999; 6 Suppl 3: 40-3.
- (38) Grinspoon L, Bakalar JB. Marijuana as medicine. A plea for reconsideration. *JAMA* 1995; 273: 1875-6.
- (39) Heinemann A, Shahbazian A, Holzer P. Cannabinoid inhibition of guinea-pig intestinal peristalsis via inhibition of excitatory and activation of inhibitory neural pathways. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1289-97.
- (40) Hillsley K, Schemann M, Grundy D. Alpha-adrenoreceptor modulation of neurally evoked circular muscle responses of the guinea pig stomach. *J Auton Nerv Syst* 1992; 40: 57-62.

- (41) Holdcroft A, Smith M, Jacklin A, Hodgson H, Smith B, Newton M, Evans F. Pain relief with oral cannabinoids in familial Mediterranean fever. *Anaesthesia* 1997; 52: 483-6.
- (42) Hornby PJ, Prouty SM. Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 1335-45.
- (43) Hosking RD, Zajicek JP. Therapeutic potential of cannabis in pain medicine. *Br J Anaesth* 2008; 101: 59-68.
- (44) Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 161-202.
- (45) Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 1986; 29: 307-13.
- (46) Irvine EJ. Quality of life of patients with ulcerative colitis: past, present, and future. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 554-65.
- (47) Izzo AA, 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* 2003; 125: 765-74.
- (48) Izzo AA, 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* 1998; 124: 1363-8.
- (49) Izzo AA, Mascolo N, Borrelli F, Capasso F. Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB₁ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359: 65-70.
- (50) Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 597-603.
- (51) Izzo AA, Mascolo N, Tonini M, Capasso F. Modulation of peristalsis by cannabinoid CB(1) ligands in the isolated guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 984-90.
- (52) Izzo AA, Pinto L, Borrelli F, Capasso R, Mascolo N, Capasso F. Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1627-32.
- (53) Karst M, Salim K, Burstein S, Conrad I, Hoy L, Schneider U. Analgesic effect of the synthetic cannabinoid CT-3 on chronic neuropathic pain: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1757-62.
- (54) Kimball ES, Schneider CR, Wallace NH, Hornby PJ. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by

- dextran sulfate sodium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G364-G371.
- (55) Kogan NM, Mechoulam R. Cannabinoids in health and disease. *Dialogues Clin Neurosci* 2007; 9: 413-30.
- (56) Kumar RN, Chambers WA, Pertwee RG. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia* 2001; 56: 1059-68.
- (57) Landi M, Croci T, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Manara L. Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 2002; 450: 77-83.
- (58) Langley JN, Anderson HK. The Innervation of the Pelvic and adjoining Viscera: Part II. The Bladder. Part III. The External Generative Organs. Part IV. The Internal Generative Organs. Part V. Position of the Nerve Cells on the Course of the Efferent Nerve Fibres. *J Physiol* 1895; 19: 71-139.
- (59) Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K. GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2699-704.
- (60) Mascolo N, Izzo AA, Ligresti A, Costagliola A, Pinto L, Cascio MG, Maffia P, Cecio A, Capasso F, Di Marzo V. The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice. *FASEB J* 2002; 16: 1973-5.
- (61) Massa F, Marsicano G, Hermann H, Cannich A, Monory K, Cravatt BF, Ferri GL, Sibaev A, Storr M, Lutz B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation. *J Clin Invest* 2004; 113: 1202-9.
- (62) Massa F, Storr M, Lutz B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract. *J Mol Med* 2005; 83: 944-54.
- (63) Mathison R, Ho W, Pittman QJ, Davison JS, Sharkey KA. Effects of cannabinoid receptor-2 activation on accelerated gastrointestinal transit in lipopolysaccharide-treated rats. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 1247-54.
- (64) McConalogue K, Furness JB. *Gastrointestinal neurotransmitters*. Baillieres Clin Endocrinol Metab 1994; 8: 51-76.
- (65) Mechoulam R, Gaoni Y. The absolute configuration of delta-1-tetrahydrocannabinol, the major active constituent of hashish. *Tetrahedron Lett* 1967; 12:1109-11.
- (66) Meissner G. Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8 1857; 364-6.
- (67) Muccioli GG. Blocking the cannabinoid receptors: drug candidates and therapeutic promises. *Chem Biodivers* 2007; 4: 1805-27.
- (68) Ong WY, Mackie K. A light and electron microscopic study of the CB₁ cannabinoid receptor in the primate spinal cord. *J Neurocytol* 1999; 28: 39-45.

- (69) Patel PN, Pathak R. Rimonabant: a novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64: 481-9.
- (70) Pertwee RG. Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors. *Pharmacol Ther* 1997; 74: 129-80.
- (71) Pertwee RG. Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859-67.
- (72) Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 1-51.
- (73) Pertwee RG. GPR55: a new member of the cannabinoid receptor clan? *Br J Pharmacol* 2007; 152: 984-6.
- (74) Petitet F, Donlan M, Michel A. GPR55 as a new cannabinoid receptor: still a long way to prove it. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67: 252-3.
- (75) Pinto L, Capasso R, Di CG, Izzo AA. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 333-41.
- (76) Pinto L, Izzo AA, Cascio MG, Bisogno T, Hospodar-Scott K, Brown DR, Mascolo N, Di Marzo V, Capasso F. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice. *Gastroenterology* 2002; 123: 227-34.
- (77) Ringel Y, Sperber AD, Drossman DA. Irritable bowel syndrome. *Annu Rev Med* 2001; 52: 319-38.
- (78) Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 2007; 152: 1092-101.
- (79) Salim K, Schneider U, Burstein S, Hoy L, Karst M. Pain measurements and side effect profile of the novel cannabinoid ajulemic acid. *Neuropharmacology* 2005; 48: 1164-71.
- (80) Samson MT, Small-Howard A, Shimoda LM, Koblan-Huberson M, Stokes AJ, Turner H. Differential roles of CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors in mast cells. *J Immunol* 2003; 170: 4953-62.
- (81) Sanson M, Bueno L, Fioramonti J. Involvement of cannabinoid receptors in inflammatory hypersensitivity to colonic distension in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 949-56.
- (82) Sawzdargo M, Nguyen T, Lee DK, Lynch KR, Cheng R, Heng HH, George SR, O'dowd BF. Identification and cloning of three novel human G protein-coupled receptor genes GPR52, PsiGPR53 and GPR55: GPR55 is extensively expressed in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 64: 193-8.
- (83) Schemann M, Grundy D. Electrophysiological identification of vagally innervated enteric neurons in guinea pig stomach. *Am J Physiol* 1992; 263: G709-G718.

- (84) Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Caput D, Ferrara P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* 1995; 270: 3726-31.
- (85) Sibaeve A, Massa F, Yüce B, Marsicano G, Lehr HA, Lutz B, Göke B, Allescher HD, Storr M. CB₁ and TRPV₁ receptors mediate protective effects on colonic electrophysiological properties in mice. *J Mol Med* 2006; 84: 513-20.
- (86) Storr M, Gaffal E, Saur D, Schusdziarra V, Allescher HD. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 67-76.
- (87) Storr M, Sibaeve A, Marsicano G, Lutz B, Schusdziarra V, Timmermans JP, Allescher HD. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G110-G117.
- (88) Storr M, Yüce B, Göke B. Perspectives of cannabinoids in gastroenterology. *Z Gastroenterol* 2006; 44: 185-91.
- (89) Storr MA, Keenan CM, Emmerdinger D, Zhang H, Yüce B, Sibaeve A, Massa F, Buckley NE, Lutz B, Göke B, Brand S, Patel KD, Sharkey KA. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB(1) and CB (2) receptors. *J Mol Med* 2008; 86: 925-36.
- (90) Storr MA, Yüce B, Andrews CN, Sharkey KA. The role of the endocannabinoid system in the pathophysiology and treatment of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 857-68.
- (91) Takeuchi T, Fujinami K, Goto H, Fujita A, Taketo MM, Manabe T, Matsui M, Hata F. Roles of M2 and M4 muscarinic receptors in regulating acetylcholine release from myenteric neurons of mouse ileum. *J Neurophysiol* 2005; 93: 2841-8.
- (92) Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 83: 393-411.
- (93) Tyler K, Hillard CJ, Greenwood-Van Meerveld B. Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB₁ receptor-mediated in rats. *European Journal of Pharmacology* 2000; 409: 207-11.
- (94) Van Gaal LF, Rissanen AM, Scheen AJ, Ziegler O, Rossner S. Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 2005; 365: 1389-97.
- (95) Vann RE, Cook CD, Martin BR, Wiley JL. Cannabimimetic properties of ajulemic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 678-86.
- (96) Vemuri VK, Janero DR, Makriyannis A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2008; 93: 671-86.

- (97) Wang J, Ueda N. Role of the endocannabinoid system in metabolic control. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 1-10.
- (98) Wood JD. Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1994; 48: 17-29.
- (99) 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* 2005; 129: 437-53.
- (100) Wright KL, Duncan M, Sharkey KA. Cannabinoid CB(2) receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. *Br J Pharmacol* 2007; 153: 263-70.
- (101) Xie S, Furjanic MA, Ferrara JJ, McAndrew NR, Ardino EL, Ngondara A, Bernstein Y, Thomas KJ, Kim E, Walker JM, Nagar S, Ward SJ, Raffa RB. The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB₁ receptor antagonism--or inverse agonism--as potential obesity treatment and other therapeutic use. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32: 209-31.
- (102) Yüce B, Sibaev A, Broedl UC, Marsicano G, Göke B, Lutz B, Allescher HD, Storr M. Cannabinoid type 1 receptor modulates intestinal propulsion by an attenuation of intestinal motor responses within the myenteric part of the peristaltic reflex. *Neurogastroenterol Motil* 2007; 19: 744-53.

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Markus, Kemmer
Geb.-Dat./-Ort	08.01.1976, München
Familienstand	ledig, keine Kinder
Konfession	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schul- und Berufsausbildung

09/82 – 08/86	Grundschule an der Plinganserstraße, München
09/86 – 07/95	Theresien-Gymnasium, München
10/97 – 09/00	Ausbildung zum exam. Krankenpfleger an der Stiftsklinik Augustinum, München

Hochschulausbildung

10/02 – 09/04	LMU München, Studium der Humanmedizin, vorklinischer Abschnitt
09/04	Ärztliche Vorprüfung
10/04 – 09/08	LMU München, Studium der Humanmedizin, klinischer Abschnitt
10/08 – 12/08	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen

03/05	II. Medizinische Klinik des Klinikum Großhadern, München (Gastroenterologie)
09/05	Klinik für Anästhesiologie des Klinikum Großhadern, München
03/06	II. Medizinische Klinik des Klinikum Großhadern, München (Gastroenterologie)
06/07	Allgemeinarztpraxis D. Dölcker, München

Praktisches Jahr

08/07 – 12/07	LMU, Urologische Klinik und Poliklinik Großhadern (Urologie)
12/07 – 03/08	LMU, Medizinische Klinik und Poliklinik II Großhadern (Innere Medizin)
03/08 – 07/08	LMU, Chirurgische Klinik und Poliklinik Großhadern (Chirurgie)

Berufliche Tätigkeiten

10/95 – 03/97	Rettungsdiensthelfer beim BRK München (Zivildienst und hauptberufliche Tätigkeit)
04/97 – 08/97	Hauptberuflicher Rettungssanitäter beim BRK München
10/00 – 04/05	Klinikum rechts der Isar: Krankenpfleger auf der toxikologischen Intensivstation (ab 10/02 Teilzeittätigkeit)
04/05 – 10/05	Dozententätigkeit am Zentrum für Naturheilkunde, München

11/05 – 01/07	Dozententätigkeit am Artemis Heilpraktiker Lehrinstitut, München
05/07 – 05/08	Teilzeittätigkeit als Werkstudent in der Schlafklinik ProSomno, München

12 Danksagung

Meine Ausführungen zum Dissertationsthema sind beendet. Dies ist Anlass, mich ganz besonders bei Prof. Dr. med. Burkhard Göke zu bedanken, der mir die Möglichkeit erbot, auf dem Gebiet der Neurogastroenterologie forschen zu dürfen.

Für die Überlassung des Themas, die optimale Betreuung in allen Belangen während der gesamten Zeit der Doktorarbeit, für die vertrauensvolle Integration in seine Arbeitsgruppe und sein Ideenreichtum gilt mein großer Dank PD Dr. med. Martin Storr.

Sehr in der Verpflichtung stehe ich Dr. med. Andrei Sibaev gegenüber für seine professionelle Anleitung und Unterstützung bei der Laborarbeit, der Versuchsplanung und der Auswertung der Daten. Ich konnte stets von seiner großen Erfahrung und seinem umfassenden Wissen profitieren, wobei ich seine humorvolle Art in der Wissensvermittlung sehr positiv und auch hilfreich in kritischen Situationen empfunden habe. - Dr. Birol Yüce, der mir immer Ansprechpartner war und mir jederzeit mit Rat und Tat bei Fragestellungen und Problemlösungen hinsichtlich der Labortätigkeit und der Erstellung der Dissertation zur Seite stand, zolle ich großen Dank.

Einen ebenso trefflichen Beistand erhielt ich durch Ralf Heigermoser (cand. med.), der mir durch den Aufbau der neuen Stimulatorbox die Versuchsdurchführungen erleichterte.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Eltern für ihre ausdauernde Begleitung, ihre finanzielle Unterstützung und ihre Bereitschaft, meine Entscheidungen mit zu tragen.