

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

Direktor: Prof. Dr. med. B. Zwißler

Die Wirkung akuten Konsums einer mäßigen Ethanolmenge auf das Endocannabinoidsystem des Menschen

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

Vorgelegt von
Theresa Gresset
Aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gustav Schelling

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Sabine Marten- Steffens
Priv. Doz. Dr. Markus Backmund

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Matthias Feurerecker
Dr. med. Daniela Hauer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	5
1.1 Das Endocannabinoidsystem	5
1.1.1 Geschichte	5
1.1.2 Die Rezeptoren	6
1.1.3 Endocannabinoide	6
1.1.4 Anandamide und 2- Arachidonoylglycerol	7
1.2 Ethanol und das Endocannabinoidsystem	8
2. ZIELSETZUNG	10
3. MATERIAL UND METHODIK	10
3.1 Studiendesign	10
3.2 Ethik	11
3.3 Endocannabinoidbestimmung	11
3.3.1 Technik der HPLC- Tandem- MS	11
3.3.2 Substanzen	12
3.3.3 Quantifizierung	12
3.3.4 Probenvorbereitung	13
3.3.5 Extraktion	13
3.4 Bestimmung der Alkoholkonzentration im Blutserum	13
3.5 Glukose- Messung im peripheren venösen Blut	14
3.5.1 Probenvorbereitung	14
3.5.2 Glukose- Messung	14
3.6 Verwendete Flüssigkeiten	14
3.7 Statistische Analyse	15
4. ERGEBNISSE	16
4.1 Probanden	16
4.2 Endocannabinoid- Plasmakonzentrationen	17
4.2.1 Rotweineffekt (Gruppe 1)	17
4.2.2 Traubensafteffekt (Gruppe 2)	18
4.2.3 Wassereffekt (Gruppe 3)	19
4.3 Relation zwischen Glukose-, Ethanol- und Endocannabinoidkonzentration im Plasma	19
4.4 Geschlechtsspezifische Effekte	21
5. DISKUSSION	22
6. AUSBLICK	27

7. ZUSAMMENFASSUNG	28
8. LITERATUR	31
9. DANKSAGUNG	39

1. Einleitung

1.1 Das Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem (ECS) wurde Ende der Achtzigerjahre entdeckt (De Petrocellis and Di Marzo 2009). Es ist ein komplexes endogenes Signalsystem, bestehend aus transmembranösen Rezeptoren, endogenen Liganden (Endocannabinoide), spezifischen Proteinen, die bei der Biosynthese und den entsprechenden Abbauprozessen der Endocannabinoide (ECe) mitwirken, und aus den intrazellulären Signalkaskaden, welche durch die ECe beeinflusst werden.

1.1.1 Geschichte

Der Name Endocannabinoid (EC) stammt von der Cannabis- Pflanze (*Cannabis sativa*), die eine lange Tradition als Heilpflanze hat. Das erste Mal wurde Cannabis als Medizin vor über 5000 Jahren in China erwähnt. Dort wurde es gegen Malaria, Darmträgheit, rheumatische Schmerzen sowie bei der Entbindung und, mit Wein gemischt, als Analgetikum empfohlen. Auch in der Antike war den Griechen und Lateinern Cannabis als Heilmittel ein Begriff. So beschrieb der römische Arzt Galen im 2. Jahrhundert n. Chr. neben der „Förderung der Fröhlichkeit“ auch die medizinische Wirkung des Brennesselgewächses. Seit dem 6. Jahrhundert gilt Cannabis als Heilmittel bei Appetitlosigkeit, Asthma oder Migräne und beeinflusste damit die europäische Medizin. Die weltweite Verbreitung der Pflanze im 18. und 19. Jahrhundert beruhte aber auf der Nutzung ihrer Faser zur Textil- und Seilherstellung. Auch zu dieser Zeit ging Cannabis als eines der ersten homöopathischen Arzneimittel in die Geschichte ein und in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts fanden Zubereitungen aus Hanf Eingang in die Arzneibücher sowohl Europas als auch Amerikas. Mitte des 19. Jahrhunderts gehörte Cannabis dank der Arbeit Bernhard Frönmüllers („Klinische Studien über die schlafmachende Wirkung der narkotischen Arzneimittel“) in Westeuropa in jede Hausapotheke, und kurz darauf wurden die ersten fabrikmäßig hergestellten Cannabiszubereitungen auf den Markt gebracht. Gegen Mitte des 20. Jahrhunderts verschwanden die Cannabisprodukte dann aber wieder vollständig vom Markt auf Grund des rasanten Fortschrittes in der Pharmakologie, rechtlicher Einschränkungen und wirtschaftlicher Aspekte. Nun nahm der Gebrauch als Rauschdroge zu, was dazu führte, dass Cannabis 1951 in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz unterstellt wurde. 1964 wurde Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) von Gaoni und Mechoulam als der Stoff identifiziert, der hauptsächlich für die psychoaktive und physiologische Wirkung in Cannabis verantwortlich ist (Gaoni and Mechoulam 1964). Doch erst in den frühen 90er Jahren wurde das Rezeptorsystem gefunden, über das Cannabis seine psychoaktive Wirkung entfaltet. Die Existenz von Cannabinoidrezeptoren legte nahe, dass endogene (körpereigene) Cannabinoide existieren. 1992 entdeckten Wissenschaftler das erste „EC“: anandamide (N-arachidonyl ethanolamine, AEA), benannt nach dem sanskritischen Wort für Glückseligkeit „ananda“. Sie isolierten es aus dem Schweinehirn (Devane et al. 1992). Kurz darauf wurde auch 2- arachidonoylglycerol (2-AG) entdeckt, das von den mittlerweile beschriebenen Endocannabinoiden (ECs) noch mit das bekannteste ist. Diese zu messen und deren Reaktion auf akuten Alkoholkonsum zu untersuchen, ist Thema dieser Arbeit.

Neben den pflanzlichen Cannabinoiden und den ECs existiert noch eine weitere Sorte, die synthetisch hergestellten Cannabinoide, welche für die Schmerztherapie und als Medikamente von der Industrie entwickelt wurden.

1.1.2 Die Rezeptoren

Der erste Beweis für Cannabinoidrezeptoren wurde 1986 gefunden (Howlett et al. 1986). Forscher berichteten, dass Cannabinoide die Akkumulation von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) hemmen, was auf einen Rezeptor- vermittelten Mechanismus hindeutete. Bisher wurden für die EC - Signalwirkung zwei cannabinoide Rezeptoren, Typ 1 oder 2 (CB1, CB2), eindeutig identifiziert. Sie gehören zu der Gruppe der heptahelikalen Gi/Go- Protein gekoppelten Rezeptoren, im speziellen zur Klasse A. Die CB1-Rezeptoren wurden erstmals von Matsuda und Kollegen (Matsuda et al. 1990) identifiziert und befinden sich vorwiegend im zentralen Nervensystem. Jedoch treten sie auch in der Peripherie an sensorischen Nervenendigungen sowie endokrinen Drüsen, Leukozyten, Milz, Herz und einigen Abschnitten des Reproduktions-, Harn- und Gastrointestinaltraktes auf (Pertwee 1997). Sie scheinen eine wesentliche Rolle in der Regulation von Appetit und Essverhalten zu haben (Cota et al. 2003; Ravinet et al. 2004). Dagegen tritt der Typ CB2 hauptsächlich im peripheren Gewebe, wie im Darm und der Leber, auf und wird vorrangig von Zellen des Immunsystems, z. B. Leukozyten, in der Milz und in Tonsillen exprimiert (Pertwee 1997). Dieser wurde erstmals 1993 von Munro (Munro et al. 1993) beschrieben.

Ihre Aktivierung setzt eine Signalkaskade in Gang. So wird u.a. das Enzym Adenylatzyklase gehemmt und folglich die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat erniedrigt (Howlett et al. 1986; Felder et al. 1995). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen CB1- induzierte Veränderungen der Leitfähigkeit verschiedener Ionenkanäle [verminderte Leitfähigkeit für Calcium (Caulfield and Brown 1992; Mackie et al. 1993; Mackie and Hille 1992; Shen et al. 1996), erhöhte Leitfähigkeit für Kalium (Mackie et al. 1992)]. Außerdem konnte je nach Lokalisation sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme der Aktivität der Mitogen- activated protein kinase beobachtet werden (Kola et al. 2005). Die Signalkaskade führt schließlich zu einer Modulation der neuronalen Erregbarkeit (Di Marzo et al. 2004). Im ZNS wirken ECe vorrangig als retrograde Transmitter (Wilson and Nicoll 2001; Piomelli 2003). Nach Depolarisation der Nervenzelle werden sie aus der postsynaptischen Membran freigesetzt, aktivieren CB1- Rezeptoren in der präsynaptischen Membran (Katona et al. 1999; 2001) und inhibieren dadurch die Freisetzung von Neurotransmittern, wie GABA, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat oder Serotonin (Di Marzo et al. 2004).

Es bestehen jedoch auch Hinweise auf die Existenz weiterer Cannabinoidrezeptor- Subtypen (Shire et al. 1995; Di Marzo et al. 2000; Breivogel et al. 2001). Ebenso können andere Rezeptoren im Gehirn und an Gefäßen die Wirkung von ECs vermitteln, wie Vanilloid- Rezeptoren (VR₁) (Zygmunt et al. 1999; Szallasi and Di Marzo 2000; Hillard 2000). Auch binden und aktivieren einige Cannabinoid- Agonisten den G- Protein gekoppelten Rezeptor GPR55 (Baker et al. 2006).

Die bislang bestbeschriebenen ECe sind das AEA und das 2-AG, die als Teil-Agonisten auf beide Rezeptortypen wirken, wobei sich das AEA vornehmlich an den Typ CB1 bindet (Di Marzo 2008; Gonsiorek et al. 2000).

1.1.3 Endocannabinoide

Bis dato wurden mehr als 12 verschiedene ECe beschrieben, die sich in drei Typen einteilen lassen: die Amide, die Glycerole und die Ether (Hanus et al. 2001). Sie werden aus membran- ständigen Phospholipiden gebildet, aus Arachidonsäure. Daher sind sie lipophil und können nicht intrazellulär

in Vesikeln gespeichert werden (Cota and Woods 2005; Pagotto et al. 2006; Bracey et al. 2002). Dies steht im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern, die vor-synthetisiert werden (wie Acetylcholin oder Norepinephrin). Im Gehirn werden sie bei Bedarf von Neuronen gebildet (Matias et al. 2006), freigesetzt, und nachdem sie einen kurzen (Halbwertszeit von Sekunden bis Minuten (De Petrocellis et al. 2004)), starken Effekt hatten, sofort inaktiviert und hydrolysiert (Cota and Woods 2005; Bracey et al. 2002; Ameri 1999). Auf Grund dieses Verhaltens werden sie auch als lokale Neuromodulatoren bezeichnet (Cota and Woods 2005).

Über die funktionelle Bedeutung des ECS ist bisher wenig bekannt. Es scheint eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen zu spielen, einschließlich Nozizeption, Motorik, Gedächtnis und Lernen, Appetit und Essverhalten und im Energiehaushalt (Pagotto et al 2006; Ameri 1999; Di Marzo et al. 1998). Außerdem greifen sie in den endokrinen Haushalt ein, in Gefäßreaktionen, in den Knochenumbau, das Immunsystem und sind unter bestimmten Umständen neuroprotektiv (Correa et al. 2005; van der Stelt and di Marzo 2005; Wang et al. 2006; Idris et al. 2005; de Oliveira et al. 2006; Arenos et al. 2006; Mikics et al. 2006; Guindon et al. 2006).

Es gibt viele Hinweise, dass das ECS zusammen mit dem mesolimbischen Dopamin- System eine wichtige Rolle im endogenen Belohnungssystem spielt (Solinas et al. 2006). Die Stimulation von CB1- Rezeptoren im Nucleus accumbens unterdrückt wahrscheinlich die Glutamat- Aktivität mit daraus folgender Hemmung von GABA- abhängigen Neuronen, welche normalerweise Dopamin- abhängige Neuronen im ventralen Tegmentum hemmen (van der Stelt 2005). ECe können die extrazellulären Konzentrationen von Dopamin erhöhen. Zum Beispiel zeigte Solinas et al, dass bei Ratten die intravenöse Verabreichung von AEA mit erhöhter Dopamin-Aktivität im Nucleus accumbens assoziiert ist.

Viele experimentelle Ansätze , wie z.B. die Hemmung des ECS über Antagonisten oder Stimulation der CB1- Rezeptoren über Agonisten, halfen, die Funktion des Systems zu erschließen. So zum Beispiel war SR141716A (Rimonabant) die erste klinisch getestete Substanz mit Wirkung am CB1- Rezeptor (Rinaldi- Carmona et al. 1994). Sie wurde zur Behandlung der Adipositas entwickelt und hat eine invers agonistische Wirkung am CB1- Rezeptor, das heißt, anders als reine Antagonisten, blockiert sie nicht nur den Effekt des Agonisten, sondern führt zu einer gegenteiligen Wirkung am Rezeptor. Es ist mittlerweile bewiesen, dass Rimonabant zu einer signifikanten Gewichtsabnahme führt und so in die Nahrungsaufnahme des Menschen eingreift (Duarte et al. 2004). Mittlerweile existieren auch klinische Versuche über die Wirkung von Rimonabant auf Craving bei chronischer Alkoholabhängigkeit (Lallemand et al. 2001).

Es gibt Hinweise für eine tonische Aktivität des ECS. Diese wird auf zwei möglich Mechanismen zurückgeführt: auf einen primär aktivierten Zustand einiger EC-Rezeptoren und/ oder auf eine andauernde Freisetzung von ECs. Unter physiologischen Bedingungen ist es je nach Alter und Spezies unterschiedlich aktiviert (Marsicano et al. 2003).

1.1.4 Anandamid und 2- Arachidonoylglycerol

Diese Arbeit untersucht AEA und 2- AG, welche die bekanntesten und meist erforschten ECe sind. AEA wird aus Arachidonsäure und Ethanolamin mittels einer spezifischen Phospholipase D und der N-Acyl- Transferase synthetisiert. Dahingegen gibt es für die Synthese von 2- AG aus Arachidonsäure und Glycerol zwei verschiedene Möglichkeiten. Einen Weg über die Phospholipase C und die Diacylglycerollipase, oder über die Phospholipase A1 zusammen mit der Lyso- Phospholipase C.

Der Abbau beider EC erfolgt über die intrazellulären Enzyme Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) und Monoglycerol Lipase (MGL), die jeweils Arachidonsäure von Molekülresten abspalten (Puffenberger 2005), wobei AEA primär über die FAAH mit Hilfe eines Transportenzym „Anandamide- Membran-Transporter (AMT)“ hydrolysiert wird. In- vitro ist 2- AG auch ein ausgezeichnetes Substrat für die FAAH, in vivo allerdings zeigt sich bei FAAH knock-out Mäusen, dass 2- AG nicht in seiner Wirkung verstärkt wird (Lichtmann et al. 2002). Daraus lässt sich schließen, dass 2- AG in vivo vor allem durch die MGL abgebaut wird.

Die wichtigsten Systeme, in die 2- AG und AEA eingreifen, sind das Herz- Kreislaufsystem, insbesondere bei Myokardinfarkt (Maeda et al. 2009), Stressbewältigung/ Depression (Hill et al. 2009), Nahrungsaufnahme, Nozizeption, Onkologie und Neuroprotektion.

1.2 Ethanol und das Endocannabinoidsystem

In der Vergangenheit wurde bereits beschrieben, dass das ECS nicht nur an Prozessen in Zusammenhang mit der Aufnahme von festen Nahrungsmitteln, sondern auch beim Konsum von Flüssigkeiten, insbesondere von Ethanol, beteiligt ist. Die anatomische Verteilung und die Wirkung von ECs im ZNS korrelieren mit den Auswirkungen von Alkoholkonsum auf das Verhalten, inklusive Gedächtnisstörung, Verlangsamung der motorischen Funktionen, Dämpfung der Schmerzwahrnehmung und Hypothermie (Compton et al. 1993; Fadda and Rosetti 1998). Veränderungen des ECS im Gehirn spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Alkoholabhängigkeit und –toleranz (Basavarajappa et al. 1998; Basavarajappa and Hungund 1999). Der Hauptrezeptor für cannabinoide Stoffe im zentralen Nervensystem, CB1, spielt eine wesentliche Rolle in der Regulierung der Ethanolaufnahme. Die Blockierung des CB1-Rezeptors führte zu einer Ausschaltung der Ethanolaufnahme und verringerte bei Nagetieren die akut verstärkenden Wirkungen des Ethanols sowie Ethanol-suchendes Verhalten (Cippitelli et al. 2005; Gessa et al. 2005; Malinen und Hyytia 2008). Eine Stimulation der CB1-Rezeptoren mittels exogener Agonisten führte zu einem erhöhten Ethanolkonsum (Colombo et al. 2002). Man geht sowohl bei akutem, als auch bei chronischem Ethanolkonsum davon aus, dass die Expression der CB1-Rezeptoren sowie die Rezeptorbindung an das G-Protein verändert werden (Rubio et al. 2009). Eine Reihe experimenteller Modelle hat den Einfluss von Ethanol auf die endogenen Liganden des ECS, AEA und 2-AG untersucht. In Zellkulturen wurden nach Ethanolexposition erhöhte AEA- und 2-AG-Werte beobachtet (Basavarajappa et al. 2000; 2003). Bei Tiermodellen hingegen war diese Änderung von der Dauer der Ethanolexposition abhängig. Die AEA- und 2-AG-Werte waren in einigen Gehirnregionen während einer kurzfristigen Ethanolexposition verringert (Rubio et al. 2009; Rubio et al. 2007). Im Gegensatz dazu führte eine chronische Ethanolexposition bei Ratten zu erhöhten AEA- und 2-AG Konzentrationen im ZNS (Gonzalez et al. 2002; Gonzalez et al. 2004), bei Mäusen zu einer daraus folgenden Herunterregulierung der CB1- Rezeptoren und deren Signaltransduktion (Basavarajappa and Hungund 2004).

Auch gibt es Hinweise auf eine genetische Grundlage auf Basis des ECS für exzessiven Alkoholkonsum. So konnte gezeigt werden, dass bei speziell auf Alkoholpräferenz gezüchteten Ratten schon vor erstmaligem Alkoholkonsum die CB1- Rezeptor- Dichte sowie die CB1 mRNA und die EC- Konzentration im Kortex, Hippocampus und Striatum höher waren als bei einer Vergleichsgruppe ohne Alkoholpräferenz (Vinod et al. 2012). In einer weiteren Studie konnte eine

Assoziation zwischen dem CB1- Rezeptor- Gen und der Abhängigkeit von Alkohol oder anderen Substanzen nachgewiesen werden (Marcos et al. 2012).

Im Gegensatz zu zahlreichen experimentellen Belegen, die auf eine wichtige Rolle des ECS bei der Reaktion auf Ethanolwirkungen hinweisen, und trotz des extrem häufigen mäßigen Ethanolkonsums in vielen Bevölkerungsschichten, haben bislang nur sehr wenige Studien die Wirkung von akut verabreichten niedrigen Ethanoldosen auf das ECS bei gesunden Menschen untersucht (Joosten et al. 2010). Wir haben deshalb eine Studie mit Freiwilligen durchgeführt, bei der die Probanden eine mäßige Ethanolmenge in Form von Rotwein konsumierten, und die Wirkung dieser einmaligen Intervention auf die EC-Konzentrationen im Plasma bestimmt. Traubensaft und normales Wasser dienten dabei als Kontrollflüssigkeiten.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss einer akut konsumierten Menge an Rotwein auf die Plasmakonzentration der ECe, AEA und 2-AG untersucht.

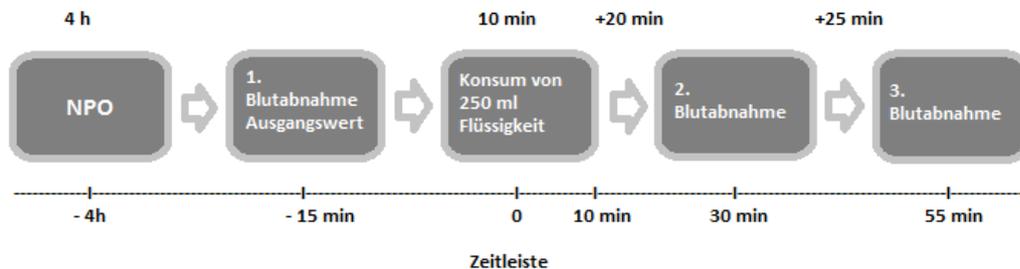
Wir führten eine offene Studie [„open-label study“] durch, um die akuten Wirkungen einer mäßigen Rotweinmenge auf das ECS bei Erwachsenen zu untersuchen, wobei wir eine identische Kalorien- und Flüssigkeitsmenge an Traubensaft oder normalen, d.h. stillen, Wassers als Kontrollintervention nutzten. Wir wollten die Wirkungen von Rotwein mit denen einer verwandten Flüssigkeit mit einem hohen Zucker- und einem sehr niedrigen Ethanolgehalt (Traubensaft) sowie einer weiteren Flüssigkeit mit reiner Mengenwirkung ohne Glukose- oder Ethanolgabe (normales Wasser) vergleichen.

3. Material und Methodik

3.1 Studiendesign

Voraussetzung zur Teilnahme an den Versuchen war das Unterlassen von jeglicher Aufnahme von Flüssigkeit jeweils 4 Stunden und von fester Nahrung 6 Stunden vor Verabreichung des Protokolls. Die Probanden waren somit in diesem Zeitraum nüchtern. Die Flüssigkeitsaufnahme erfolgte am frühen Nachmittag und war in allen Studiengruppen vergleichbar. Um die jeweiligen Ausgangswerte zu erfassen, wurde den Probanden nach Ankunft im Studienzentrum in aufrechsitzender Position Blut in vorgefüllte EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) abgenommen. Die „Rotwein“-Gruppe (Gruppe 1) konsumierte anschließend eine mäßige Ethanolmenge (250 ml Rotwein) innerhalb eines Zeitraums von 10 Minuten (Abbildung 1). Zwanzig Minuten nach Ablauf dieses Zeitraums wurde eine zweite Blutprobe entnommen, während die dritte Blutentnahme 45 Minuten nach der Flüssigkeitsaufnahme erfolgte. Die anderen beiden Studiengruppen unterlagen einem identischen Protokoll, konsumierten jedoch jeweils 250 ml Traubensaft (Gruppe 2) oder normales Wasser (Gruppe 3). Den Probanden war während der Versuchszeit verboten, sich körperlich zu betätigen, und es durfte keine weitere Nahrungs- oder Flüssigkeitsaufnahme erfolgen. Die Blutentnahmen erfolgten durch Punktion einer cubitalen Vene. Dieses Blut wurde sofort nach Abnahme bei 4° C zentrifugiert. Das so entstandene Plasma wurde bei -20° C vorübergehend eingefroren. Die Messung der EC- Konzentration erfolgte wie unter 3.3 beschrieben. Der Blutzucker wurde nach der Hexokinase- Methode bestimmt, wie unter 3.5 erklärt ist. Bei dem Rotwein- Versuch wurde außerdem noch die Alkoholkonzentration im Blutserum gemessen (s. 3.4).

Abbildung 1: Studienprotokoll; NPO = nil per os (4 Std. für Getränke und 6 Std. für feste Nahrung)



3.2 Ethik

Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Ludwig- Maximilians- Universität (Protokoll Nr.: 088-08) genehmigt, und der Datenschutz wurde nach deutschem Recht gewährleistet. Alle Versuchsteilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis zu der Teilnahme.

3.3. Endocannabinoidbestimmung

Wir benutzten für unsere Messungen die Methode zur EC- Messung in peripherem Humanblut, die 2008 von Herrn Prof. Dr. med. M. Vogeser (Institut für Laboratoriumsmedizin der Ludwigs- Maximilians Universität) entwickelt und von uns in Zusammenarbeit mit dem Institut für Dopinganalytik und Sportbiochemie Dresden (Dr. Detlef Thieme) modifiziert wurde. Die Methodik der Messung beruht auf einer Kombination von Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie (HLPC) mit einem massenspektrometrischen Detektionsverfahren (HLPC- Tandem- MS).

3.3.1 Technik der HLPC- Tandem- MS

Ionen- Erzeugung und Ionen- Analyse sind die beiden grundlegenden Prozesse der Massenspektrometrie. Die Ionisation der Analyten erlaubt es, Moleküle im Raum gezielt zu transportieren, zu filter und schließlich zu detektieren (Vogeser 2004). Die Art der Erzeugung und der Analyse der Ionen bei der LC- Tandem- MS unterscheidet sich wesentlich von der seit Jahrzehnten etablierten Methode des Gaschromatographie- Massenspektrometrie (GC- MS). Erst die Entwicklung sogenannter „atmospheric pressure ionisation“ (API) in den 80er- und 90er- Jahren ermöglichte die Koppelung der HLPC als Trenntechnik mit einem massenspektrometrischen Detektionsverfahren, da die direkte Injektion des HPLC- Eluates in das Höchstvakuum des Massenspektrometers technisch nicht zu realisieren ist. Im On- line- Festphasen- Extraktions- HLPC- System, welches für diese Anwendung verwendet wurde, durchläuft die zu untersuchende Probe zunächst eine Extraktionssäule, wobei weniger polare Stoffe reteniert werden. Die zu messenden lipophilen Substanzen werden beim Umschalten der Säulen auf die analytische Säule gelenkt. Durch die sogenannte Elektronenspray- Ionisation (ESI), die meist genutzte Technik der API, wird das HLPC-

Eluat in das Hochvakuum des LC- MS transferiert. Die Ionisation der Zielanalyte erfolgt dabei außerhalb des Vakuumbereichs des Massenspektrometers, indem die mobile Phase der HPLC durch eine feine Kapillare und mit Hilfe eines Stickstoff- Stroms („nebulizer gas“) aerosolisiert wird. Die auf die Spray- Kapillare gelegte Spannung von ca. 3 kV sorgt für eine Übertragung von elektrischer Ladung auf die Tröpfchen des Aerosols. Gleichzeitig wird zur Verdampfung des Eluats in das Aerosol ein sehr hoher Strom heißen Stickstoffs („desolvation gas“ mit 600 l/h bei über 200°C) gelenkt. Durch die Abnahme des Tröpfchendurchmessers übersteigt schließlich die elektrostatische Abstoßung die Oberflächenspannung und die Tröpfchen zerplatzen zu immer kleineren Generationen (sog. Coulomb- Explosion), bis die elektrische Ladung auf einzelne Moleküle in den Tropfen übertragen wird. Auf Grund der gleichsinnigen Ladung der Moleküle kommt es schließlich zur sog. „ion emission“ (Vogeser 2004).

Durch eine Gegenstromspannung wird dann der Gesamtstrom dieser so erzeugten Ionen auf eine feine Eintrittsöffnung des Massenspektrometers gelenkt, passiert einen Bereich eines relativ geringen Vakuums (ca. 10^{-3} Torr) und gelangt schließlich in das Hochvakuum mit ca. 10^{-5} Torr.

Um aus dem Gesamtstrom einzelne Ionen zu selektieren, werden Quadrupol- Massenfiter verwendet. Bei diesen sind jeweils vier Metallstäbe parallel angeordnet, an die Radiofrequenzen angelegt werden. Bei einer bestimmten Radiofrequenz geraten alle Ionen, die nicht einer einzigen Ladung- zu- Masse- Ratio entsprechen, seitlich aus dem Quadrupol und werden auf diese Weise emittiert. Das Tandem- Massenspektrometer ist eine Koppelung zweier Quadrupole mit interponierter Kollisionszelle, wodurch unabhängige Scans sowie u. a. das sogenannte „multiple reaction monitoring“ (MRM) ermöglicht werden. Im MRM- Modus ist ein kontrolliert herbeigeführter Zerfallsprozess Grundlage einer hochspezifischen Stoffdetektion. Nach der Passage des ersten Quadrupol werden die auf diese Weise herausgefilterten „Mutterionen“ eines Zielanalyten in eine Kollisionszelle gelenkt, in die ein Inertgas, wie Argon, strömt. Die „Mutterionen“ kollidieren hier mit den Argon- Atomen und werden zu „Tochterionen“ fragmentiert. Der Fragmentenstrom wird nun in das zweite Quadrupol geleitet, um das eigentliche Zielanalyt herauszufiltern. Dieses trifft dann auf einen Ionendetektor, der die ankommenden Ionen in elektrische Zählimpulse verwandelt.

3.3.2 Substanzen

2-AG mit einem Molekulargewicht von 378,55 und einer Reinheit von 98% wurde von Sigma- Aldrich (Deisenhofen, Deutschland; Cat. No. A-8973) hergestellt und in Konzentration von 10 mg/ml in Acetonitril- Soutlion benutzt. Ebenso wurde AEA mit einem Molekulargewicht von 347,5 und einer Reinheit von 98%, in einer Konzentration von 200 mg/ml in Methanol benutzt (Cat. No. A-0580).

Von Sigma synthetisch hergestelltes, stabiles isotoopenmarkiertes AEA und 2- AG dienen als interner Standard. Zum Arbeiten wurden Konzentrationen von 0,02µg/ml in AEA/Ethanol und 0,05 µg/ml 2- AG/Ethanol hergestellt.

3.3.3 Quantifizierung

Für die Kalibrierung innerhalb der analytischen Messreihe wurde reines AEA und reines 2-AG, gelöst in Methanol/Wasser (1/1), in Konzentrationen von 100, 10, 5, 2 oder 1 µg/L verwendet. Diese Kalibratoren werden wie die unbekanntenen Proben exakt gleich bearbeitet.

Auf diese Weise wurden bei allen Blutproben jeweils symmetrische Peaks innerhalb der jeweiligen MRM- Spur registriert. Entweder für AEA und dem Deuterium- markierten AEA oder für 2- AG und dessen deuterisierter Form. Mittels Integration der Peakflächen der jeweiligen zueinander gehörigen Spuren erfolgte die Quantifizierung nach einem Peak- Flächen- Verhältnis. AEA/ AEA-d8 und 2- AG/ 2- AG-d5 wurden proportional zu den jeweiligen Konzentrationen umgerechnet.

Diese Methode ist innerhalb eines Bereiches von 0,1 bis 2 ng/ml für AEA und eines Bereichs von 0,5 bis 10 ng/ml für 2-AG linear. Die untere Nachweisgrenze der Methode (definiert als Signal-/Rauschverhältnis > 4:1) liegt bei 0,025 ng/ml für AEA und 0,33 ng/ml für 2-AG. Da 2-AG rasch zu 1-AG isomerisiert (Vogeser and Schelling 2007), wurde 2-AG als die Summe von 1- und 2- Estern der Arachidonsäure quantifiziert.

3.3.4 Probenvorbereitung

Zur Messung der EC-Konzentrationen wurden vor Flüssigkeitsaufnahme (Ausgangswert) sowie nach 20 und 45 Minuten venöse Blutabnahmen durchgeführt. Jede Blutentnahme erfolgte durch Punktion einer Vene in der Ellenbeuge unter Verwendung von EDTA- Röhrrchen (S- Monovette®, 9 ml K3E von Sarstedt, Numbrecht, Deutschland). Das Blut wurde unverzüglich zur Plasmagewinnung unter 4°C 10 Minuten lang bei 3000 rpm zentrifugiert (Haraeus Varifuge 3.0R). Das Plasma wurde in Eppendorf- Röhrrchen abpipetiert und bei – 80°C für höchstens 2 Wochen gelagert, bis es im Rahmen der Extraktion weiterverarbeitet wurde. Unter diesen Lagerungsbedingungen bleiben EC für eine Dauer von bis zu 6 Monaten stabil (Di Marzo et al. 2009). In der Vergangenheit durchgeführte Experimente haben gezeigt, dass die EC-Synthese in nativen, nicht gekühlten Blutproben auch ex-vivo anhält (Vogeser et al. 2006). Aus diesem Grund wurde die Probe umgehend unter gekühlten Bedingungen bis zur abschließenden Lagerung weiterverarbeitet.

3.3.5 Extraktion

Zur Extraktion von AEA und 2- AG wurden jeweils 500 µl der Plasmaprobe zusammen mit 20 µl Lösung des Internen Standards in 2 ml Polypropylen- Tuben pipettiert und mit 1000 µl tertiären Butylmethylether (MTBE) versetzt. Daraufhin wurde jede Probe 10 Minuten lang bei Raumtemperatur in einen horizontalen Schüttler gestellt und anschließend 6 Minuten lang bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415R). Dadurch grenzte sich eine flüssige Phase ab und dieser Überstand konnte in ein Eppendorf- Röhrrchen überführt werden, um anschließend das MTBE unter Stickstoff abzublasen. Das so entstandene Extrakt wurde in 80 µl Acetonitril und 80 µl Puffer aufgenommen und erneut, nach 5 min im horizontalem Schüttler, für 6 min in die Zentrifuge bei 14000 rpm gestellt. Der nun klar vom Proteinbestand abzugrenzende klare Überstand konnte in HPLC- Fläschchen pipettiert und in den Autosampler gebracht werden.

3.4 Bestimmung der Alkoholkonzentration im Blutserum

Die Alkoholkonzentration im Blutserum wurde mittels enzymatischen UV- Test unter Verwendung einer Ethanoldehydrogenase- Technik (ADH) bestimmt (Olymp AU2700, Beckman Kolter, Krefeld, Deutschland). Das Prinzip beruht darauf, dass Ethanol und NAD⁺ mittels der ADH zu Acetaldehyd und NADH umgesetzt werden.



Da das Gleichgewicht bei dieser Reaktion auf Seiten des Ethanols liegt, wird das Gleichgewicht durch die Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen auf die rechte Seite verschoben. Gemessen wird dann bei einer Wellenlänge von 340 nm mittels UV- Licht das anfallende NADH, welches der Ethanolkonzentration entspricht.

3.5 Glukose- Messung im peripherem venösen Blut

3.5.1 Probenvorbereitung

Da es im venösen Blut innerhalb der ersten Stunde nach Blutentnahme zu einer ca 7 % Abnahme der Glukosekonzentration kommt auf Grund der Glykolyse, wurde das Blut sofort nach Entnahme, ebenso wie die Proben für die EC- Messung, zentrifugiert und das Plasma abpipetiert. Dieses wurde bis zur eigentlichen Messung bei – 80° C eingefroren.

3.5.2 Glukose- Messung

Die Plasma- Glukose wurde nach der Hexokinase- Methode bestimmt (Olymp AU2700, Beckman Kolter, Krefeld, Deutschland). Das Verfahren erfolgte mit Multistandard bekannter Konzentrationen über das Lambert- Beersche Gesetz. Dieses beschreibt den Zusammenhang zwischen der Absorption von Licht und der Konzentration eines absorbierenden Inhaltsstoffs in Flüssigkeiten. In diesem Fall wird die Zunahme der Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm durch den vermehrten Anfall von NADPH gemessen. Die Hexokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glukose durch ATP, wobei Glukose-6-phosphat und ADP entstehen. Anschließend wird ein zweites Enzym, Glukose-6-Phosphatdehydrogenase, als Katalysator der Oxidation von Glukose-6-Phosphat durch NADP⁺ genutzt, wobei NADPH gebildet wird.

Die Bestimmung erfolgt gemäß der Reaktionsgleichung:



Reaktionsschritt 1 wird durch Hexokinase katalysiert, Reaktionsschritt 2 durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

3.6 Verwendete Flüssigkeiten

Für den Traubensaft- Versuch wurde Rabenhorst Traubensaft in 750 ml- Flaschen benutzt. Der verwendete Rotwein war: Barolo vigneto Monvigliero 1996 D.O.C.G. ebenfalls aus 750 ml Flaschen. Das Wasser war Adelholzener still, 500 ml Flaschen. In allen 3 Flüssigkeiten wurde keine EC festgestellt (Messverfahren wie unter 3.3 beschrieben, Tabelle 1).

Tabelle 1: Eigenschaften der verabreichten Flüssigkeiten, bei den AEA- und 2-AG-Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD; *n=2: Messungen wurden in zweifacher Ausführung durchgeführt.

	Rotwein (Gruppe 1)	Traubensaft (Gruppe 2)	Wasser (Gruppe 3)
Marke	Barolo Vigneto Monvigliero ¹	Roter Traubensaft, Rabenhorst ²	Naturrell Adelholzener, still ³
Gesamtzuckergehalt [g/dl]	< 0,8	18,0	-
Glukose [g/dl]		8,1	-
Fruchtzucker [g/dl]		8,3	-
Ethanol [Vol%]	14,0	-	-
Ethanol [g/dl]	11,2	-	-
Ethanol [g/250ml]	28,0	-	-
Kalorien [kcal/dl]	75,0	75,0	-
Kalorien [kcal/250ml]	187,5	187,5	-
Anandamide [ng/ml], n=2*	<0,025 ng/ml ⁴	<0,025 ng/ml ⁴	-
2-AG [ng/ml], n=2*	<0,33 ng/ml ⁴	<0,33 ng/ml ⁴	-

¹Commendatore G. B. Burlotto, Via Umberto I, 9, 12060 Verduno, Italien

²Haus Rabenhorst, Scheurener Str. 4, 53572 Unkel, Deutschland

³Adelholzener Alpenquellen GmbH, St.-Primus-Straße 1 - 5, 83313 Siegsdorf, Deutschland

⁴Diese Konzentrationen befinden sich jeweils um den Faktor >4 für AEA und >12 für 2-AG unter der Nachweisgrenze unserer Methode. Diese Werte werden dementsprechend nur zu Orientierungszwecken aufgeführt, um zu verdeutlichen, dass ein möglicher EC-Inhalt unserer Testflüssigkeiten das ECS im Plasma nicht beeinflusst.

3.7 Statistische Analysen

Die Abweichung der Probanden von der Normalverteilung wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov Tests geprüft. Änderungen hinsichtlich der Parameter (z.B. Plasmaendocannabinoid oder -Glukosekonzentrationen) wurden über die 3 Messpunkte hinweg mittels eines allgemeinen linearen Modells mit Messwiederholungen (RM-ANOVA) analysiert, wobei der Faktor Zeitpunkt als intraindividuelle Variable und der Faktor Gruppe als interindividuelle Variable dienten. In einigen Analysezyklen wurde der Faktor Geschlecht als Kovariable eingesetzt. Kategoriale Variablen wurden mittels des Fishers LSD Tests verglichen.

Das Verhältnis zwischen kontinuierlichen Daten (z.B. Glukose und EC-Konzentrationen im Plasma) wurde quantifiziert, indem Pearsons ‚r‘ für normalverteilte Daten und Spearmans ‚rho‘ für nicht-parametrische Daten berechnet wurde.

Demographische Variablen zwischen den Gruppen wurden mittels ANOVA verglichen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Daten werden als Mittelwert \pm SD angegeben. In den Abbildungen werden die Werte als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Berechnungen wurden mittels PASW Statistik 17.0 und Sigma Plot 11.0, Chicago, Illinois, USA durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Probanden

Die Probanden in allen 3 Gruppen waren gesund und hatten ein durchschnittliches Lebensalter von 35,4 Jahren. 23 Probanden waren weiblich, 32 männlich. Bei allen erhobenen Parametern ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Insgesamt nahmen am Rotwein-Versuch 20 (Geschlecht m/w: 11/9; Alter: $36,3 \pm 7,9$ Jahre; Größe: $1,75 \pm 0,09$ m; Gewicht: $67,6 \pm 11,2$ kg; Body mass index: $22,0 \pm 2,5$), am Traubensaft- Versuch 17 (Geschlecht m/w: 10/7; Alter: $35,3 \pm 8,3$ Jahre; Größe: $1,75 \pm 0,07$ m; Gewicht: $70,2 \pm 10,7$ kg; Body mass index: $22,8 \pm 2,2$) und am Wasser Versuch 18 Personen (Geschlecht m/w: 11/7; Alter: $35,4 \pm 8,5$ Jahre; Größe: $1,76 \pm 0,1$ m; Gewicht: $70,4 \pm 9,2$ kg; Body mass index: $22,7 \pm 2,5$) teil. Keiner der Teilnehmer nahm Medikamente ein und alle Personen wiesen ein normales Trinkverhalten auf, waren also nicht alkoholabhängig. In der Gruppe, in der Rotwein verabreicht wurde, tranken 11 von 20 Teilnehmern täglich Alkohol (Alkoholmenge: $8,65 \pm 9,72$ g/d). Die anderen beiden Gruppen unterschieden sich in dieser Hinsicht nicht (Traubensaftgruppe: 7 von 17; $9,12 \pm 12,4$ g/d; Wassergruppe: 8 von 18; $11,4 \pm 13,6$ g/d). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant ($p = 0,77$, Tabelle 2).

Tabelle 2: Demographische Daten der verschiedenen Gruppen; bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SD; es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet.

	Rotwein (Gruppe 1, n=20)	Traubensaft (Gruppe 2, n=17)	Wasser (Gruppe 3, n=18)	p- Werte
Geschlecht (m/w)	11/9	10/7	11/7	0,93
Alter (J)	$36,3 \pm 7,9$	$35,3 \pm 8,3$	$35,4 \pm 8,5$	0,92
Größe (M)	$1,75 \pm 0,09$	$1,75 \pm 0,07$	$1,76 \pm 0,1$	0,90
Gewicht (Kilogramm)	$67,6 \pm 11,2$	$70,2 \pm 10,7$	$70,4 \pm 9,2$	0,65
Body Mass Index	$22,0 \pm 2,5$	$22,8 \pm 2,2$	$22,7 \pm 2,5$	0,51

4.2 Endocannabinoid- Plasmakonzentrationen

Die RM-ANOVA-Analyse zeigte signifikante intraindividuelle Änderung bezüglich der EC-Plasmakonzentrationen über die Zeit (Typ III Quadratsumme = 0,02, F = 3,6, p = 0,03 für AEA und Typ III Quadratsumme = 27,9; F = 17,9; p < 0,01 für 2-AG) mit einer signifikanten Interaktion zwischen Zeitpunkt und Gruppen. (Typ III Quadratsumme = 0,04, F = 4,0; p < 0,01).

4.2.1 Rotweineffekt (Gruppe 1)

Sowohl die AEA-, als auch die 2-AG-Werte verringerten sich 20 Minuten nach Zufuhr von Rotwein (AEA-Ausgangswert $0,23 \pm 0,12$ ng/ml auf $0,18 \pm 0,07$ ng/ml; p < 0,01 und 2-AG-Ausgangswert von $6,68 \pm 4,13$ ng/ml auf $5,49 \pm 3,22$ ng/ml, p = 0,01). Fünfundvierzig Minuten nach der Weinaufnahme blieb der AEA-Wert, verglichen mit dem nach 20 Minuten gemessenen Wert, annähernd unverändert, während der 2-AG-Wert weiter signifikant sank (auf $4,98 \pm 3,39$ ng/ml; p < 0,01 verglichen mit der Konzentration nach 20 Minuten – Abbildung 2).

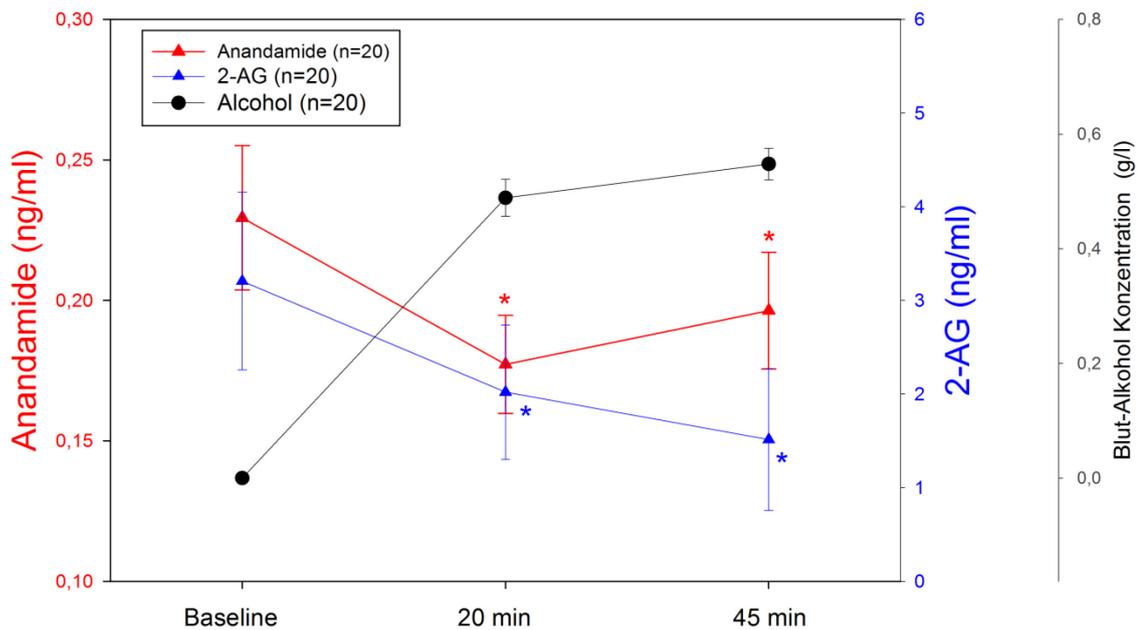


Abbildung 2: Endocannabinoid Plasmakonzentrationen und Ethanolkonzentration in der Rotweingruppe (Gruppe 1, *p < 0,05 verglichen mit dem Ausgangswert, RM-ANOVA, mit Holm-Sidak post-hoc Test, Mittelwerte \pm SEM).

4.2.2 Traubensafteffekt (Gruppe 2)

Die AEA- und 2-AG-Plasmawerte blieben im Beobachtungszeitraum im Vergleich zu den Ausgangskonzentrationen nahezu unverändert, (AEA-Ausgangswert = $0,22 \pm 0,13$ ng/ml vs. $0,21 \pm 0,11$ ng/ml nach 45 min; 2-AG-Ausgangswert $3,15 \pm 1,83$ ng/ml vor Traubensaftaufnahme vs. $2,78 \pm 1,21$ ng/ml 45min danach; Abbildungen 3 und 4).

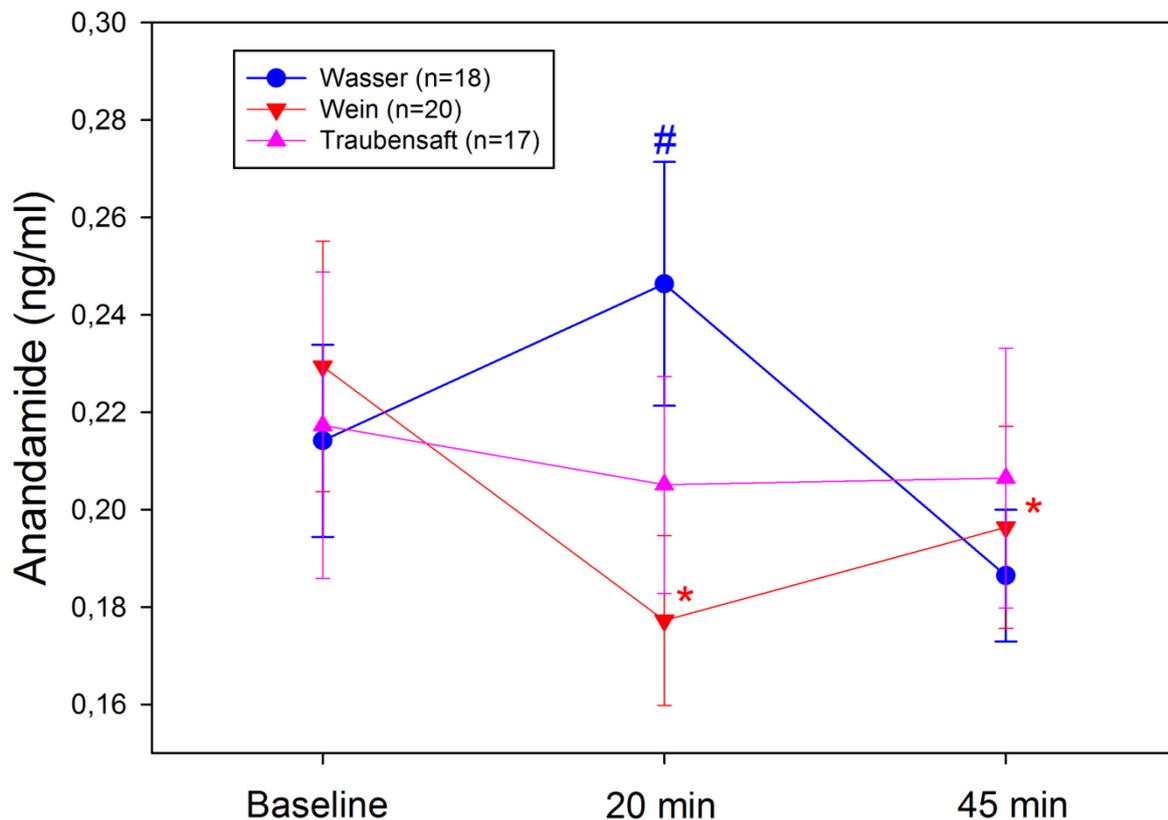


Abbildung 3: AEA-Werte in den verschiedenen Gruppen; * $p < 0,05$ im Vergleich zu den Ausgangswerten in der Rotweingruppe, # $p < 0,01$ verglichen mit den Werten nach 45 Minuten nach Wasseraufnahme. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM.

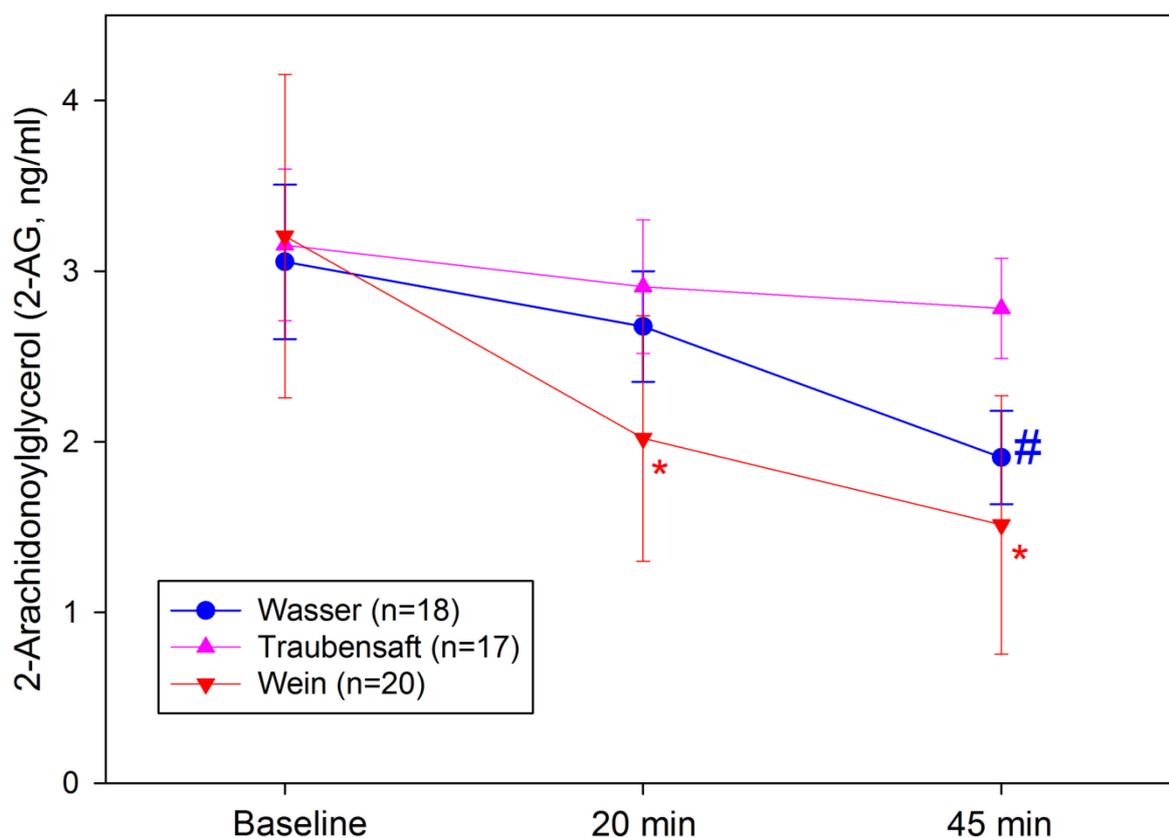


Abbildung 4: Vergleich der 2-AG-Werte in den einzelnen Gruppen. * $p \leq 0,013$ signifikante Abnahme der 2-AG-Werte im Vergleich zu den Ausgangswerten in der Rotweingruppe (Gruppe 1); # $p < 0,01$, im Vergleich zu den Ausgangswerten nach Wasseraufnahme (Gruppe 3). Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm SEM.

4.2.3 Wassereffekt (Gruppe 3)

Die Wasseraufnahme hatte keine signifikanten Wirkungen auf die AEA-Plasmawerte, die AEA-Ausgangskonzentrationen lagen bei $0,21 \pm 0,08$ ng/ml, nach 20 Minuten bei $0,25 \pm 0,10$ ng/ml und nach 45 Minuten bei $0,19 \pm 0,06$; $p = 0,13$). Ebenso wenig wurden signifikante Änderungen nach 20 Minuten, nachdem die Teilnehmer das Wasser getrunken hatten, beobachtet. Die 2-AG-Konzentrationen nach 20 Minuten lagen bei $2,7 \pm 1,4$ ng/ml im Vergleich zum Ausgangswert $3,1 \pm 1,9$ ng/ml. Nach 45 Minuten wurde ein weiterer Abfall der 2-AG-Konzentrationen auf $1,91 \pm 1,16$ ng/ml beobachtet und, verglichen mit den Ausgangswerten, das statistische Signifikanzniveau erreicht ($p < 0,01$); (Abbildung 3 und 4).

4.3 Relation zwischen Glukose-, Ethanol- und Endocannabinoidkonzentrationen im Plasma

Rotweinkonsum führte zu einem signifikanten Anstieg der Alkoholkonzentration im Plasma (auf $0,49 \pm 0,14$ g/l nach 20 Minuten; $p < 0,01$ und $0,55 \pm 0,12$ g/l nach 40 Minuten; $p < 0,01$ (Tabelle 3 und Abbildung 2). Die erhöhten Alkoholkonzentrationen im Plasma gingen mit einer signifikanten Verringerung der Blutglukosewerte nach 20 Minuten einher (von $93,3 \pm 13,8$ mg/dl, auf $83,9 \pm 12,9$ mg/dl; $p < 0,01$), die während des Beobachtungszeitraums generell auf erniedrigtem Niveau blieben. Nach Traubensaftkonsum (Gruppe 2) erhöhten sich die Blutglukosewerte signifikant (von $88,2 \pm 10,0$

mg/dl auf $123,1 \pm 17,3$ mg/dl; $p < 0,01$), bevor sie nach 45 Minuten wieder auf das Ausgangsniveau absanken. Die Blutglukosekonzentrationen in der Wassergruppe (Gruppe 3) änderten sich nicht (Tabelle 3).

Die Ausgangswerte der 2-AG-Konzentrationen vor Einnahme der Prüfpräparate korrelierten positiv mit den Plasmaglukosewerten ($r = 0,43$, $p < 0,01$, $n = 55$). Demgegenüber fand sich keine signifikante Korrelation zwischen den Glukosekonzentrationen im Blut und dem AEA-Ausgangswerten ($r = 0,17$, $p = 0,22$, $n = 55$).

In der Rotweingruppe fand sich zu beiden Messzeitpunkten (20 bzw. 40 min) schwache, aber positive Korrelationen zwischen den EC- und den Blutglukosewerten ($r \geq 0,42$, $p < 0,05$).

Nach Wasseraufnahme bestand zwischen der Glukosekonzentration und den AEA-Werten bei Minute 20 ($r = -0,51$, $p = 0,02$) eine negative Korrelation, ohne signifikante Korrelation nach 40 Minuten. An diesem Messpunkt korrelierten die 2-AG-Werte positiv mit den Blutglukosekonzentrationen ($r = 0,56$, $p = 0,02$), ohne Korrelation nach 20 Minuten.

In der Traubensaftgruppe wurden kein signifikanter Zusammenhang zwischen Blutglukose- und EC-Werten beobachtet.

Wir konnten zu keiner Zeit eine signifikante Korrelation zwischen Alkoholkonzentrationen und EC-Werten im Plasma nachweisen.

Tabelle 3: Ethanol- und Glukosewerte im Plasma; die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt; Vergleich von Daten in jeder Gruppe mit Ausgangswerten * $p < 0,05$, RM-ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test.

Gruppe	Zeitpunkt	Glukose im Blut (mg/dl)	Plasma-Ethanol-Konzentration (g/l)
Rotwein (n=20)	Ausgangswert	93,25 \pm 13,84	0,00 \pm 0,00
	Minute 20	83,90 \pm 12,93*	0,49 \pm 0,14*
	Minute 45	83,32 \pm 10,74*	0,55 \pm 0,12*
Traubensaft (n=17)	Ausgangswert	88,24 \pm 10,00	-
	Minute 20	123,12 \pm 17,28*	-
	Minute 45	89,00 \pm 12,81	-
Wasser (n=18)	Ausgangswert	91,61 \pm 12,74	-
	Minute 20	90,00 \pm 9,40	-
	Minute 45	89,72 \pm 8,02	-

4.4 Geschlechtsspezifische Effekte

Wenn der Faktor Geschlecht als Kovariable in die RM-ANOVA-Analyse miteinbezogen wurde, zeigte das Modell eine signifikante Wirkung zwischen den Faktoren 2-AG, Gruppe und Geschlecht (Typ III Quadratsumme = 87,5, $F = 5,7$, $p = 0,02$). Bei weiblichen Testpersonen zeigte sich nach Rotweinkonsum ein starker Trend zu niedrigeren 2-AG-Werten als bei männlichen Teilnehmern (4,14 \pm 2,77 ng/ml im Vergleich zu 6,59 \pm 3,25 ng/ml, $p = 0,09$ nach 20 Minuten und 3,53 \pm 2,11 ng/ml im Vergleich zu 6,17 \pm 3,84 ng/ml nach 45 Minuten, $p = 0,08$). Zwischen dem Faktor Geschlecht und AEA-Werten wurde keine Interaktion beobachtet (Daten nicht gezeigt). Frauen hatten signifikant höhere Alkoholkonzentrationen im Plasma als männliche Studienteilnehmer (0,59 \pm 0,081 g/l im Vergleich zu 0,41 \pm 0,14 g/l; $p < 0,01$ nach 20 Minuten und 0,61 \pm 0,087 g/l im Vergleich zu 0,49 \pm 0,12 g/l, $p = 0,04$ nach 45 Minuten).

5. Diskussion

Unsere Studie hat gezeigt, dass der rasche Konsum von 250 ml Rotwein die AEA- und 2-AG-Werte im Plasma signifikant verringert. Demgegenüber beeinflusste der Konsum einer identischen Menge an Wasser nur die 2-AG-Konzentrationen, und Traubensaft hatte keine Auswirkung auf beide ECe. Folglich führte nur Rotwein zu einer Abnahme beider EC-Konzentrationen im Plasma. Weder die zugrundeliegenden Mechanismen, noch die möglichen biologischen Konsequenzen dieser Effekte sind derzeit bekannt. Es ist jedoch von Interesse anzumerken, dass das ECS bei Patienten mit Übergewicht und erhöhtem Risiko für ein metabolisches Syndrom aktiviert ist, und dass Patienten, die an koronarer Herzerkrankung (KHK) leiden, ebenfalls ein aktiviertes ECS mit erhöhten Plasma EC-Konzentrationen aufweisen (Sugamura et al. 2009). Die regelmäßige Einnahme mäßiger Ethanolmengen ist demgegenüber mit einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Weiterhin finden sich bei Patienten, die regelmäßig geringe Mengen an Alkohol zu sich nehmen, auch erniedrigte Werte multipler Biomarker, die auf eine KHK hindeuten und die Folge einer generalisierten Entzündungsreaktion im Rahmen einer Atherosklerose sind, wie zum Beispiel Lipide (LDL, HDL, Triglyceride..), Entzündungszeichen (CRP, Leukozyten, TNF α ..), Marker der endothelialen Zellfunktion (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül) und Hormone, die bei Adipositas eine Rolle spielen (Leptin, Adiponectin) (Brien et al. 2011; Ronksley et al. 2011). Man könnte folglich spekulieren, dass einige der schützenden Wirkungen von geringem bis mäßigen Ethanolkonsum bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen durch eine Wirkung auf das ECS vermittelt werden. Diese Überlegungen werden durch die Tatsache untermauert, dass eine Einschränkung der EC-Signalwirkung bei übergewichtigen Menschen mittels des inversen CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant zahlreiche positive Effekte auf Triglyzeride, High-Density Lipoproteinwerte, die Glukosetoleranz und andere Risikofaktoren für KHK im Plasma hat (Pacher 2009). Rimonabant wurde allerdings 2008 vom europäischen Markt genommen und in den USA aufgrund eines erhöhten Depressionsrisikos nie zugelassen (Mitchell and Morris 2007). Dies weist darauf hin, dass das ECS auch hierbei eine wichtige Rolle spielt. Alkoholmissbrauch ist ein signifikanter und möglicherweise sogar kausaler Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression (Boden and Fergusson 2011). Patienten mit Depression zeigen weiterhin verringerte Plasma- EC-Konzentrationen (Hügel et al. 2009). Auch mit Angsterkrankungen ist Alkoholmissbrauch oft gepaart. So wurde in einer Studie an Mäusen der Effekt von LY2183240, einem neuen EC-Wiederaufnahmehemmer, auf Angst- und Alkoholsuchtverhalten untersucht. Es wurde gezeigt, dass die wiederholte Gabe des Medikaments bei alkoholabhängigen Mäusen das Angstverhalten reduzierte, nicht aber bei der Kontrollgruppe (Powers et al. 2010). Das ECS könnte somit eine wichtige Rolle im komplizierten Verhältnis zwischen Alkoholkonsum, KHK und dem Risiko für Angst- oder Depressionserkrankungen spielen. Bei diesen Überlegungen handelt es sich allerdings lediglich um eine Hypothese und es bedarf in jeden Fall zusätzlicher experimenteller und klinischer Studien. Unsere Erkenntnisse könnten jedoch Ansätze für weitere Untersuchungen liefern.

Unseres Wissens nach gibt es keine beim Menschen durchgeführte Studie, die den Einfluss einer schnellen und einmaligen Zufuhr einer mäßigen Ethanolmenge auf das ECS untersucht hätte. Joosten (Joosten et al. 2010) berichtete über den Einfluss einer mäßigen Ethanolaufnahme auf die AEA-Plasmakonzentration im Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme während eines Beobachtungszeitraums von drei Wochen. In dieser Studie wurden ausschließlich weibliche

Probanden untersucht, die 60 Minuten vor einer Mahlzeit eine Dose Bier (13 g Ethanol) zu sich nahmen. Eine zweite Dose (13 g Ethanol) tranken die Probanden dann während des Mittagessens. Die Kontrollgruppe folgte dem gleichen Protokoll mit alkoholfreiem Bier (<0,1g Ethanol). Die Alkoholaufnahme lag bei ungefähr 26 g. Am ersten und letzten Tag der Studie wurden die AEA-Plasmawerte bestimmt. Die AEA-Werte fielen im Studienzeitraum, es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, die alkoholfreies Bier und die Bier mit Alkohol zu sich nahmen. Das Problem dieser Studie sind die vielen Einflussvariablen, wie das Fastenregime, die relativ langsame Einnahme des Ethanols, die niedrige Ethanolmenge sowie die gleichzeitige Nahrungsaufnahme, welche die gesamten Studienergebnisse beeinflusst haben könnten (Jesudason and Wittert 2008). Im Gegensatz dazu waren unsere Probanden nüchtern und konsumierten eine höhere Ethanolmenge in einem kürzeren Zeitraum (10 min).

Es gibt keine sonstigen Studien, im Rahmen derer die isolierte Wirkung von Ethanol auf die EC- Werte bei Menschen untersucht wurden. Folglich können unsere Erkenntnisse nur mit Untersuchungen bei Nagetieren oder mit in-vitro Experimenten verglichen werden. Bei Ratten führte die akute Ethanolaufnahme zu einer Verringerung der AEA-Werte in einigen Gehirnregionen und im peripheren Gewebe (Ferrer et al. 2007). Basavarajappa, der Ethanol ausgesetzte SK-H-SH Zellen untersuchte, berichtete von zunächst (24 h) ebenfalls erniedrigten AEA- Werten, welche daraufhin aber anstiegen und bei 72 h ihren höchsten Wert erreichten (Basavarajappa and Hungund 1999). Diese früheren experimentellen Daten stimmen größtenteils mit unseren Erkenntnissen überein. Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie eine erhöhte AEA- Synthese Aktivität im Hypothalamus eine Stunde nach intragastraler Applikation von Ethanol gemessen (Rettori et al. 2007).

Zusätzlich zu einer Abnahme der AEA-Werte stellten wir nach Rotweinkonsum eine signifikante Abnahme der 2-AG-Konzentrationen im Plasma bei unseren Freiwilligen fest. Dies wird bestätigt durch Erkenntnisse von Rubio et al. (Rubio et al. 2007), die ebenfalls nach Ethanolaufnahme eine Verringerung von 2-AG zentral im Hypothalamus, der Amygdala und signifikant im präfrontalen Kortex festgestellt haben.

Bedingt dadurch, dass wir in unserer Studie lediglich die periphere EC-Aktivität untersuchen konnten, die nicht notwendigerweise die zentrale EC-Signalübertragung reflektiert, unterliegt unsere Studie zahlreichen Einschränkungen. Vieles spricht jedoch dafür, dass die EC-Aktivität in peripheren kernhaltigen Blutzellen mit Veränderungen der zentralen EC- Signalwirkung einhergeht. Dies könnte auch die Anwendung peripherer EC- Konzentrationen als Biomarker für bestimmte neuropsychiatrische Störungen, wie Parkinson, Multiple Sklerose oder Depressionen (Centonze et al. 2008), ermöglichen.

Zusätzlich zu den ethanolbedingten Veränderungen der EC- Plasmakonzentrationen haben wir mittels Traubensaft die akute Wirkung einer oralen Glukosezufuhr auf die AEA- und 2-AG- Werte bestimmt. Im Gegensatz zu Rotwein führte Traubensaft zu einem signifikanten Anstieg der Blutglukosewerte nach 20 Minuten, während die EC- Konzentration im Plasma auf fast unverändertem Niveau blieb. Zahlreiche Studien haben die Wirkung des CB1-Rezeptorantagonisten Rimonabant auf die Glukosetoleranz mittels eines oralen Glukosetoleranztests untersucht (Scheen et al. 2006); über die akuten Wirkung einer Glukosezufuhr auf das ECS ist jedoch wenig bekannt. Vor kurzem wurde im Rahmen von Experimenten mit Ratten davon berichtet, dass verschiedene Zuckerarten die mRNA-Expression der Enzyme, die am Abbau und an der Synthese von AEA und von 2-AG im Hypothalamus beteiligt sind, beeinflussen. Da in diesen Untersuchungen aber lediglich die

mRNA- Expression gemessen wurde, können keine Aussagen hinsichtlich der Enzymaktivitäten bei der EC-Synthese oder dem -abbau gemacht werden. Dennoch wurde spekuliert, dass die zirkulierenden AEA- und 2-AG- Werte durch Glukoseaufnahme vermutlich nicht beeinflusst oder nur gering verändert werden (Erlanson-Albertsson and Lindqvist 2010). Man nimmt an, dass es sich beim ECS um ein schnell reagierendes Lipid- Signal System handelt, was keinen ausreichenden Niederschlag in der mRNA-Expression findet. Diese Überlegungen decken sich mit unseren Erkenntnissen, die ebenfalls keinen signifikanten Effekt einer Glukosezufuhr auf die EC-Konzentration nachweisen konnten.

Fasst man die Erkenntnisse dieser Studie zusammen, müssen einige weitere neuroendokrine Aspekte thematisiert werden. ECe wurden bei übergewichtigen Menschen eingehend untersucht und einige Studien haben Zusammenhänge zwischen vollwertigen Mahlzeiten und den EC- Werten aufgezeigt. Die Nahrungsmittelaufnahme führt zu einer Verringerung der peripheren EC- Konzentration. (Gatta-Cherifi et al. 2011; Matias et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden für normal- und übergewichtige Individuen nach einem hyperinsulinämischen- euglykämischen Clamp- Versuch (Infusion von der Menge an Insulin, die für einen normalen Blutzuckerwert erforderlich ist) gefunden (Di Marzo et al. 2009). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Insulin die AEA-Werte verringerte, und dass mäßige Alkoholmengen die Insulinempfindlichkeit erhöhten (Lazarus et al. 1997). Dies könnte zu der moderaten Abnahme der Blutglukosewerte passen, die in unserer Studie nach Rotweinkonsum beobachtet wurde. In unserer Studie wurde eine positive Wechselbeziehung zwischen AEA-Plasmakonzentration und Blutglukose-Werten gezeigt. So ging eine Verringerung der Blutglukosewerte mit niedrigeren AEA-Werten einher. Wie zuvor bereits erwähnt, sind erhöhte AEA-Plasmakonzentrationen möglicherweise atherogen (Sugamura et al. 2009). Man könnte folglich annehmen, dass das ECS eine Rolle bei der oben erwähnten protektiven Wirkung von mäßigem Alkoholkonsum auf das kardiovaskuläre Risiko spielt (di Tomaso et al. 1996; Ronksley et al. 2011). Diese komplizierte Interaktion macht jedoch definitiv weitere Untersuchungen erforderlich. Interessanterweise zeigte die Traubensaft-Gruppe in unserer Studie nach Flüssigkeitskonsum keine signifikante Verringerung der EC- Werte, obwohl die Kalorienaufnahme von 187,5 kcal hätte ausreichen müssen, um eine Insulinantwort auszulösen. Da keine Insulinwerte gemessen wurden, kann nur spekuliert werden, dass die Insulinwerte zu niedrig waren, um eine Abnahme der EC- Werte auszulösen, oder dass der Abstand von 4 Stunden zwischen einer Mahlzeit und dem Experiment nicht ausreichend war.

Während beim Insulin - wie oben beschrieben - Kortisol und auch Ghrelin eine wichtige Rolle spielen, wurden für das ECS auch andere neuroendokrine Interaktionen beschrieben (Bermudez-Silva et al. 2011). So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Alkoholgabe auch zu einer Abnahme der Ghrelin-Werte führt (Zimmermann et al. 2007). Wie diese Hormone im Einzelnen aufeinander wirken und zu einem Alkoholeffekt beitragen, ist im Verlauf weiterer Studien zu untersuchen.

Über den Grund für den Abfall der 2- AG Konzentration nach Wassergabe lässt sich nur spekulieren. Vielleicht ist dies im Zusammenhang mit dem Sättigungsgefühl zu sehen. Hypothetisch könnte man annehmen, dass durch die Magenwanddehnung als Folge des Wasserkonsums die 2- AG-Konzentration abnimmt, um zentral ein Sättigungsgefühl zu erzeugen. Bei Traubensaft hingegen könnte dieser Effekt wegen der von der enthaltenen Glukose ausgelösten, zusätzlichen Signalwirkung ausbleiben, was zu einem verstärkten Konsum zuckerhaltiger Getränke Anlass geben könnte.

Es wird angenommen, dass das ECS eine Hauptfunktion in der Interaktion von physischen Reaktionen und der gastrointestinalen Funktion übernimmt. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regelung der Energiebalance, der Nahrungsmittelaufnahme und der Appetitsteuerung im Gehirn und im peripheren Umfeld (Di Marzo et al. 2001; Di Marzo et al. 1998; Matias and Di Marzo 2007). Offenbar befinden sich sowohl CB1- und CB2-Rezeptoren, als auch ECe im Verdauungstrakt (Sanger 2007). CB1-Rezeptoren treten ebenso in den Neuronen des enterischen Nervensystems auf, während ein Auftreten von CB2-Rezeptoren auf Entzündungszellen im Gastrointestinaltrakt beschrieben wurde (Di Marzo and Izzo 2006). Dennoch ist bislang wenig über die Rolle des ECS bei der Steuerung der gastrischen Funktion und der Magenentleerung beim Menschen bekannt. Das ECS könnte als ein wesentlicher Regler bei der Darm-Gehirn-Interaktion fungieren. So gibt es Hinweise darauf, dass das ECS über den Vagus-Nerv die Nahrungsaufnahme beeinflusst (Di Marzo and Matias 2005). Der Vagus-Nerv verbindet den Gastrointestinal Trakt mit der Medulla oblongata und den Kernen des Hirnstamms, die unmittelbar in die Kontrolle des Sättigungsgefühls involviert sind. Das Dünndarmhormon Cholezystokinin (CCK) wird während der Nahrungsaufnahme ausgeschüttet und interagiert mit spezifischen CCK Rezeptoren am afferenten Ende des Nervus vagus (Cota and Woods 2005). Von da aus wird die Information über vagale Axone weitergeleitet und endet schließlich am Hypothalamus, wo sie zusammen mit anderen Signalen zur Reduktion der Nahrungsaufnahme führt. Studien haben gezeigt, dass die Expression von CB1 Rezeptor mRNA in vagalen afferenten Neuronen, die zum Dünndarm führen, bei nach ad lib gefütterten Ratten abnahm, während bei Ratten unter Nahrungskarenz die Expression ansteigt (Burdyga et al. 2004). Werden solche Ratten erneut gefüttert oder wird ihnen CCK gegeben, sinkt der Spiegel von CB1 Rezeptor mRNA wieder. Das heißt, das Sättigungsgefühl durch CCK ist assoziiert mit verminderter EC-Aktivität.

Von Interesse ist auch der mögliche Einfluss der Art des alkoholischen Getränkes. Wein besteht zu 80- 85% aus Wasser und zu 15- 20% aus anderen Inhaltsstoffen (Tabelle 4). Diese Inhaltsstoffe sind abhängig von Rebsorte, Jahrgang, Klimafaktoren, Reifegrad der Trauben, Bodenart, Düngung und der Art der Weinbereitung. Hunderte verschiedene Pflanzenstoffe finden sich im Wein. Man fasst sie unter dem Überbegriff „Polyphenole“ zusammen. Sie stammen aus Beerenhaut, Fruchtfleisch, Stängeln und Kernen. Ihnen gilt in der Forschung bereits ein großes Interesse. Man sagt ihnen eine antioxidative Wirkung nach, sie sollen Cholesterin senken, die Thrombozytenaggregation hemmen und gefäßerweiternd wirken, folglich kardioprotektiv wirken (Pace- Asciak et al. 1995; Goldberg et al. 1999). Außerdem wirken offenbar einige Polyphenole gegen Krebs (Soleas et al. 2002).

Tabelle 4: Verschiedene Inhaltsstoffe von Wein in g/l abhängig von Rebsorte, Jahrgang, Klimafaktoren, Reifegrad der Trauben, Bodenart, Düngung und der Art der Weinbereitung.

Inhaltsstoffe	g/l
Wasser	800
Ethanol	50-130
Mehrwertige Alkohole (z.B. Glycerin)	6-24
Kohlenhydrate (z.B. Zucker)	1-250
Säuren	4-10
Mineralstoffe und Spurenelemente	1,8-2,5
Aromastoffe	0,8-1,2
Vitamine (wasserlöslich)	0,4-0,7
Eiweiß/ Stickstoffverbindungen	0,3-1,0
Methanol und höhere Alkohole	0,2-0,8
Kolloide	0,15-1,0
Aldehyde	0,01-0,1
Phenolische Substanzen	0,2-2,5

Quelle: Steurer, R 1995 Steurers Weinhandbuch, Ueberreuter

6. Ausblick

Gerade in einer Gesellschaft mit steigender Prävalenz von metabolischen Störungen und Herzkrankgefäßerkrankungen nimmt die Bedeutung der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze stetig zu, so dass auch in dieser Hinsicht das ECS von großem Interesse ist. Inwieweit der tägliche Konsum einer geringen Menge an Ethanol tatsächlich in dieses System eingreift, muss über weitere Studien eingehender beleuchtet werden. Von Interesse ist hier auch, welchen Effekt die Zusammensetzung des konsumierten alkoholischen Getränkes hat, und inwieweit der von uns beobachtete Effekt von Rotwein auf das ECS tatsächlich durch dessen Alkoholgehalt vermittelt wird. Auch den im Rotwein enthaltenen Polyphenolen wird eine cardioprotektive Wirkung nachgesagt. Inwieweit diese einen Einfluss auf das ECS haben, wurde nach meinem Wissen noch in keiner Studie untersucht. Polyphenole sind beispielweise ebenfalls in der Apfelbeere oder im Saft des Granatapfels enthalten. Dies könnte einen Ansatz für weitere Studien darstellen. Obwohl Rotwein rein summarisch mehr Polyphenole enthält, zeigen Studien, dass auch manche Weißweine ähnlich cardioprotektiv wirken können wie Rotwein (Dudley et al. 2008; Cui et al. 2002). Die Senkung von kardiovaskulären Erkrankungen bei moderatem Alkoholkonsum rangiert, je nach Studie, im Bereich von 20-40% (Paul et al. 2012). Bei einigen Studien ist die Risikosenkung gleich für Wein, Bier und Liquör (Mukamal et al. 2005; Gaziano et al. 1999), bei anderen ist die Risikosenkung durch Rotwein deutlich ausgeprägter als bei anderen Alkoholika. Erklärt wird dies durch den synergistischen Effekt von Ethanol und Polyphenolen (Tousoulis et al. 2008; Chiva-Blanch et al. 2012). Wenn nun der in Rotwein enthaltende Ethanol tatsächlich für die Verringerung der EC-Werte im Plasma verantwortlich ist, sollte dies auch durch reinen Ethanol zu verifizieren sein.

7. Zusammenfassung

Das ECS, im wesentlichen bestehend aus den G- Protein gekoppelten Rezeptoren CB1 und CB2, den sog. ECE und der nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskade, ist ein wichtiges physiologisches Regulationssystem. AEA und 2-AG stellen die wichtigsten und am besten erforschten ECE dar. In Struktur und Wirkung ähneln sie dem in der Cannabispflanze enthaltenen THC. Im Gegensatz dazu haben sie aber eine sehr kurze Halbwertszeit. Sie werden nach Bedarf gebildet, freigesetzt und nach einem kurzen, starken Effekt umgehend inaktiviert. Dies steht im Gegensatz zu klassischen Neurotransmittern. Sie scheinen eine Rolle bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu spielen. So unter anderem bei der Kontrolle des Energiegleichgewichts, des Glucose- und Lipidstoffwechsels, bei Sucht- und Depressionserkrankungen sowie bei Herz-Kreislaufkrankungen, dem metabolischen Syndrom und der Adipositas. Insbesondere ist bekannt, dass bei Patienten mit Atherosklerose und KHK das ECS aktiviert ist und auch eine wichtige pathophysiologische Rolle bei diesen Krankheitsbildern spielt.

In unserer Studie wurde in einem sehr vereinfachten Ansatz der Effekt des Konsums einer mäßigen Rotweinmenge auf das ECS untersucht. Dies deshalb, weil es die oben erwähnten Hinweise dafür gibt, dass das ECS eine wichtige Rolle bei Suchterkrankungen, wie der Alkoholabhängigkeit, und bei der KHK spielt und der regelmäßige Genuss kleiner Mengen Rotweins möglicherweise einen protektiven Effekt bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen hat. Zudem war über den Effekt einer akuten Alkoholfuhr auf das periphere ECS nichts bekannt. Als Kontrollinterventionen dienten in unsere Studie Wasser (reiner Volumeneffekt) und Traubensaft (hohe Glukosezufuhr bei identischer Kalorienmenge). Es wurden drei Gruppen gebildet, die nach dem gleichen Protokoll die jeweilige Flüssigkeit in gleicher Menge (250 ml) zu sich nahmen. Bei den Probanden erfolgten in festen Zeitabständen (vor Aufnahme der Testsubstanzen sowie 20 und 40 min später) Blutentnahmen. Aus den Blutproben wurden dann die Plasmakonzentrationen der ECE, AEA und 2-AG mittels einer eigens dafür entwickelten Methodik bestimmt, die auf einer Kombination von Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem massenspektrometrischen Detektionsverfahren (HPLC- Tandem- MS) beruht. Zusätzlich erfolgte eine Messung der Blutalkohol- und Glukosekonzentration aus allen entnommenen Proben.

Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich demographischer Variablen wie Lebensalter, Geschlechtsverteilung oder Body-Mass Index. Unsere Studie zeigt, dass der schnelle Konsum von 250 ml Rotwein einen signifikanten Abfall der EC- Plasmakonzentration bewirkte, wobei sowohl die AEA-, als auch die 2-AG- Werte 20 min nach dem Rotweinkonsum signifikant abfielen (AEA: von $0,23 \pm 0,12$ ng/ml auf $0,18 \pm 0,07$ ng/ml; $p < 0,01$ und 2-AG: von $6,68 \pm 4,13$ ng/ml auf $5,49 \pm 3,22$ ng/ml; $p = 0,01$). Nach 45 min blieb der AEA- Wert annähernd unverändert zum 20 min- Wert, dahingegen fiel der 2- AG-Wert weiterhin signifikant ab (auf $4,98 \pm 3,39$ ng/ml; $p < 0,01$). Die Alkoholkonzentration stieg an (bis max $0,55 \pm 0,12$ g/l) und ging mit einer signifikanten Verringerung der Blutglukose nach 20 min einher (von $93,25 \pm 13,84$ mg/dl bis $83,90 \pm 12,93$ mg/dl; $p < 0,05$). Bei weiblichen Testpersonen der Rotweingruppe zeigte sich eine starke Tendenz zu niedrigeren 2- AG- Werten ($4,14 \pm 2,77$ ng/ml im Vergleich zu $6,59 \pm 3,25$ ng/ml, $p = 0,09$ nach 20 min und $3,53 \pm 2,11$ ng/ml zu $6,17 \pm 3,84$ ng/ml, $p = 0,08$ nach 45 min) und signifikant höhere Alkoholkonzentrationen als bei männlichen Teilnehmern ($0,59 \pm 0,081$ g/l im Vergleich zu $0,41 \pm 0,14$ g/l; $p < 0,01$ nach 20 min und $0,61 \pm 0,087$ g/l im Vergleich zu $0,49 \pm 0,12$ g/l, $p = 0,04$ nach 45 min).

In den beiden Kontrollgruppen änderte sich der AEA- Wert nicht signifikant (Traubensaftgruppe: AEA von $0,22 \pm 0,13$ ng/ml auf $0,21 \pm 0,11$ ng/ml nach 45 min; Wassergruppe: AEA von $0,21 \pm 0,08$ ng/ml auf $0,19 \pm 0,06$ ng/ml nach 45 min). In der Wasser- Gruppe fiel nach 45 min der 2-AG- Wert signifikant ab (von $3,1 \pm 1,9$ ng/ml auf $1,91 \pm 1,16$ ng/ml; $p < 0,01$). Folglich führte nur der Rotweinkonsum zu einer Abnahme beider EC- Konzentrationen im Plasma. Die Blutglukosewerte erhöhten sich nach Traubensaftkonsum, wie erwartet, bevor sie nach 45 min wieder auf das Ausgangsniveau absanken (von $88,24 \pm 10,00$ mg/dl auf $123,12 \pm 17,28$ mg/dl nach 20 min und auf $89,00 \pm 12,81$ mg/dl nach 45 min). In der Wasser- Gruppe zeigten sich keine Veränderungen der Blutglukosekonzentration (von $91,61 \pm 12,74$ mg/dl auf $90,00 \pm 9,40$ mg/dl nach 20 min und auf $89,72 \pm 8,02$ mg/dl nach 45 min).

Dieser Versuch weist evtl. darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Rotweinkonsum (EC- Konzentration senkend), dem metabolischen Syndrom und Herzkranzgefäßerkrankungen (EC- Konzentrationen erhöht) besteht. Man könnte spekulieren, dass die ECe tatsächlich eine Mitursache der protektiven Wirkung von Rotweinkonsum auf das Herz- Kreislauf- System sind. Die regelmäßige Einnahme mäßiger Ethanolmengen ist mit einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert. Die Vermutung, dass das ECS dabei eine Rolle spielt, wird durch die Tatsache bestärkt, dass der inverse CB1- Rezeptor- Agonist Rimonabant bei übergewichtigen Menschen zahlreiche positive Effekte auf Risikofaktoren für eine KHK im Plasma hat. Andererseits wurde Rimonabant wegen eines erhöhtem Depressionsrisiko vom Markt genommen, und die Assoziation zwischen Depression-/ Angst- und Suchterkrankungen ist schon seit langem bekannt. Alkoholmissbrauch ist ein signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung einer Depression und Patienten mit einer depressiven Erkrankung zeigen verminderte Plasma- EC- Werte.

Zusätzlich zu den ethanolbedingten Veränderungen des ECS haben wir mittels Traubensaft (equikalorisch) die akute Wirkung einer Glukosezufuhr untersucht. Auch darüber ist noch wenig bekannt. Nach unserem Ergebnis zeigen sich keine Reaktionen im ECS, obwohl die Blutglukose in der Traubensaftgruppe nach 20 min signifikant anstieg. Erwartet hätten wir, dass das durch den Glukosereiz ausgeschüttete Insulin die AEA- Konzentration senken würde. Die fehlende Reaktion könnte entweder an einer zu geringen Insulinausschüttung auf den Glukosereiz hin liegen, oder daran, dass es sich bei dem ECS um ein schnelles Signalsystem handelt.

In unserer Studie zeigte sich nach Rotweinkonsum eine moderate Abnahme der Blutglukosewerte, die mit niedrigeren AEA- Werte einherging. Diese Beobachtung könnte damit zusammenhängen, dass mäßige Alkoholmengen die Insulinempfindlichkeit erhöhen und Insulin die AEA- Werte verringert. Erhöhte AEA- Werte sind möglicherweise atherogen. Auch diese komplexen Interaktionen könnten einer zur kardioprotektiven Wirkung des ECS beitragen.

Von Interesse ist auch der Abfall der 2-AG- Konzentration nach Wasserzufuhr. Spekulativ ist dieser durch ein, durch die Magenwanddehnung ausgelöstes, Sättigungssignal zu erklären, das bei zuckerhaltigen Getränken ausbleibt (Insulinmechanismus) und zu erhöhtem Konsum dieser führt. Das ECS könnte als ein wesentlicher Regler bei der Darm- Gehirn- Interaktion fungieren.

Zusammenfassend haben wir gezeigt, dass allein der akute Konsum einer mäßigen Rotweinmenge zu einer Abnahme beider peripher gemessenen EC- Konzentrationen führt. Dahingegen zeigte sich nach Traubensaftkonsum (equikalorisch) keinerlei Veränderung des ECS und nach Wasserkonsum ein alleiniger Abfall der 2- AG- Konzentration. Dies führte zu den Hypothesen, dass das ECS eine

Mitursache der protektiven Wirkung von mäßigem Rotweinkonsum auf das Herz- Kreislauf- System darstellt und einen wesentlichen Anteil an der Interaktion zwischen Darm und Gehirn hat. Außerdem lässt sich darüber spekulieren, dass das ECS eine Rolle bei der Assoziation zwischen Depression-/ Angst- und Suchterkrankung spielt. Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Eine Einschränkung dieser Arbeit stellt die Tatsache dar, dass wir nur peripher die EC- Aktivität gemessen haben und davon ausgingen, dass diese mit zentralen Veränderungen zusammenhängt. Wenn dies zutrifft, könnten periphere EC- Konzentrationen als Biomarker für bestimmte neuropsychiatrische Störungen angewendet werden. Auch welche Rolle andere Inhaltsstoffe von Rotwein, wie z. B. Polyphenole, denen eine kardioprotektive Wirkung nachgesagt wird, einen Einfluss auf unsere Studienergebnisse haben, ist in weiteren Studien zu untersuchen.

8. Literatur

- Ameri, A (1999) The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* **58**, 315-348.
- Arenos, JD, Musty, RE and Bucci, DJ (2006) Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and memory. *Eur J Pharmacol* **539**, 177-183.
- Baker, D, Pryce, G, Davies, WL and Hiley, CR (2006) In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 1-4.
- Bari, M, Battista, N, Fezza, F, Gasperi, V and Maccarrone, M (2006) New insights into endocannabinoid degradation and its therapeutic potential. *Mini Rev Med Chem* **6**, 257-268.
- Basavarajappa, BS, Cooper, TB and Hungund, BL (1998) Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Research* **793**, 212-218.
- Basavarajappa, BS and Hungund, BL (1999) Chronic ethanol increases the cannabinoid receptor agonist anandamide and its precursor N-arachidonoylphosphatidyl-ethanolamine in SK-N-SH cells. *J Neurochem* **72**, 522-528.
- Basavarajappa, BS and Hungund, BL (2004) Role of the Endocannabinoid system in the development of tolerance to alcohol. *Alcohol and Alcoholism* **40**, **1**, 15-24.
- Basavarajappa, BS, Saito, M, Cooper, TB and Hungund, BL (2000) Stimulation of cannabinoid receptor agonist 2-arachidonylglycerol by chronic ethanol and its modulation by specific neuromodulators in cerebellar granule neurons. *Biochim Biophys Acta* **1535**, 78-86.
- Basavarajappa, BS, Saito, M, Cooper, TB and Hungund, BL (2003) Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol* **466**, 73-83.
- Bermudez-Silva, FJ, Cardinal, P and Cota, D (2012) The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol* **26**(1), 114-124.
- Boden, JM and Fergusson, DM (2011) Alcohol and depression. *Addiction* **106**, 906-914.
- Bracey, MH, Hanson, MA, Masuda, KR, Stevens RC and Cravatt, BF (2002) Structural adaptations in a membrane enzyme that terminates endocannabinoid signaling. *Science* **298**, 1793-1796.
- Breivogel, CS, Griffin, G, Di Marzo, V and Martin, BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* **60**, 155-163.
- Brien, SE, Ronksley, PE, Turner, BJ, Mukamal, KJ and Ghali, WA (2011) Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. *BMJ* **342**, d636.
- Burdyga, G, Lal, S, Varro, A, Dimaline, R, Thompson, DG and Dockray, GJ (2004) Expression of cannabinoid CB1 receptor by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin. *J Neurosci* **24**, 2708-2715.

- Caulfield, MP and Brown, DA (1992) Cannabinoid receptor agonists inhibit Ca current in NG108-15 neuroblastoma cells via a pertussis toxin- sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* **106**, 231-232.
- Centonze, D, Battistini, L and Maccarrone, M (2008) The endocannabinoid system in peripheral lymphocytes as a mirror of neuroinflammatory diseases. *Curr Pharm Des* **14**, 2370-2342.
- Chiva- Blanch, G, Urpi- Sarda, M, Llorach, R, Rotches- Ribalta, M, Guillen, M, Casas, R, Arranz, S, Valderas- Martinez, P, Portoles, O, Corella, D et al. (2012) Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis. A randomized clinical trial. *AM J Clin Nutr* **95**, 326-334.
- Cippitelli, A, Bilbao, A, Hansson, AC *et al.* (2005) Cannabinoid CB1 receptor antagonism reduces conditioned reinstatement of ethanol-seeking behavior in rats. *Eur J Neurosci* **21**, 2243-2251.
- Colombo, G, Serra, S, Brunetti, G, Gomez, R, Melis, S, Vacca, G, Carai, MM, Gessa, L (2002) Stimulation of voluntary ethanol intake by cannabinoid receptor agonists in ethanol-preferring sP rats. *Psychopharmacology (Berl)* **159**, 181-187.
- Compton, DR, Rice, KC, De Costa, BR, Razdan, RK, Melvin, LS, Johnson, MR and Martin, BR (1993) Cannabinoid structure- activity relationships: correlation of receptor binding and in vivo activities. *J Pharmacol Exp Therapeutics* **265**, 218-226.
- Correa, F, Mestre, L, Molina- Holgado, E et al. (2005) The role of the cannabinoid system on immune modulation: therapeutic implications on CNS inflammation. *Mini Rev Med Chem* **5**, 671-675.
- Cota, D, Marsicano, G, Tschop, M et al. (2003) The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis. *J Clin Invest* **112**, 423-431.
- Cota, D and Woods, S (2005) The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy homeostasis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* **12**, 338-351.
- Cui, J, Tosaki, A, Bertelli, AA, Bertelli, A, Maulik, N and Das, DK (2002) Cardioprotection with white wine. *Drugs Exp Clin Res* **28(1)**, 1-10.
- De Oliveira Alvares, L, Genro, BP, Vaz Breda, R, Pedroso, MF, Da Costa, JC and Quillfeldt, JA (2006) AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long- term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* **1075**, 60-67.
- De Petrocellis, L, Cascio, MG and di Marzo, V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* **141**, 765-774.
- De Petrocellis, L and Di Marzo, V (2009) An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **23**, 1-15.
- Devane, WA, Hanus, L, Breuer, A, Pertwee, RG, Stevenson, LA, Griffin, G, Gibson, D, Mandelbaum, A, Etinger, A and Mechoulam, R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946-1949.
- Di Marzo, V (2008) Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat Rev Drug Discov* **7**, 438-455.

- Di Marzo, V, Bifulco, M and De Petrocellis, L (2004) The Endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 771-784.
- Di Marzo, V, Breivogel, CS, Tao, Q, Bridgen, DT, Razdan, RK, Zimmer, AM, Zimmer, A and Martin, BR (2000) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non- CB1, non- CB2 receptor- mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem* **75**, 2434-2444.
- Di Marzo, V, Goparaju, SK, Wang, L *et al.* (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* **410**, 822-825.
- Di Marzo, V and Izzo, AA (2006) Endocannabinoid overactivity and intestinal inflammation. *Gut* **55**, 1373-1376.
- Di Marzo, V and Matias, I (2005) Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* **8**, 585-589.
- Di Marzo, V, Melck, D, Bisogno, T and De Petrocellis, L (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci* **21**, 521-528.
- Di Marzo, V, Verrijken, A, Hakkarainen, A *et al.* (2009) Role of insulin as a negative regulator of plasma endocannabinoid levels in obese and nonobese subjects. *Eur J Endocrinol* **161**, 715-722.
- Di Tomaso, E, Beltramo, M and Piomelli, D (1996) Brain cannabinoids in chocolate. *Nature* **382**, 677-678.
- Duarte, C, Alonso, R, Bichet, N, Cohen, C, Soubrie, P and Thiebot, MH (2004) Blockade by the cannabinoid CB1 receptor antagonist, rimonabant (SR141716), of the potentiation by quinelorane of food- primed reinstatement of food- seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **29**, 911-920.
- Dudley, JI, Lekli, I, Mukherjee, S, Das, M, Bertelli, AA and Das, DK (2008) Does white wine qualify for french paradox? Comparison of the cardioprotective effects of red and white wine and their constituents: resveratrol, tyrosol and hydroxytyrosol. *J Agric Food Chem* **56(20)**, 9362-9373.
- Erlanson-Albertsson, C and Lindqvist, A (2010) Fructose affects enzymes involved in the synthesis and degradation of hypothalamic endocannabinoids. *Regul Pept* **161**, 87-91.
- Fadda, F and Rosetti, ZL (1998) Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* **56**, 385-431.
- Felder, CC, Joyce, KE, Briley, EM, Mansouri, J, Mackie, K, Blond, O, Lai, Y, Ma, AL and Mitchell, RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol* **48**, 443-450.
- Ferrer, B, Bermudez-Silva, FJ, Bilbao, A *et al.* (2007) Regulation of brain anandamide by acute administration of ethanol. *Biochem J* **404**, 97-104.
- Gaoni, Y and Mechoulam, R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J AM Chem Soc* **86**, 1646-1647.

- Gatta-Cherifi, B, Matias, I, Vallee, M, Tabarin, AMarsicano, G, Piazza, PV, Cota, D (2011) Simultaneous postprandial deregulation of the orexigenic endocannabinoid anandamide and the anorexigenic peptide YY in obesity. *Int J Obes (Lond)* **36(6)**, 880-885.
- Gaziano, JM, Hennekens, CH, Godfried, SL, Sesso, HD, Glynn, RJ, Breslow, JL and Buring, JE (1999) Type of alcoholic beverage and risk of myocardial infarction. *Am J Cardiol* **83**, 52-57.
- Gessa, GL, Serra, S, Vacca, G, Carai, MA and Colombo, G (2005) Suppressing effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR147778, on alcohol intake and motivational properties of alcohol in alcohol-preferring sP rats. *Alcohol Alcohol* **40**, 46-53.
- Goldberg, DM, Soleas, GJ and Levesque, M (1999) Moderate alcohol consumption: the gentle face of janus. *Clin Biochem* **7**, 505-518.
- Gonsiorek, W, Lunn, C, Fan, X, Narula, S, Lundell, D and Hipkin, RW (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* **57**, 1045-1050.
- Gonzalez, S, Cascio, MG, Fernandez-Ruiz, J, Fezza, F, Di Marzo, V and Ramos, JA (2002) Changes in endocannabinoid contents in the brain of rats chronically exposed to nicotine, ethanol or cocaine. *Brain Res* **954**, 73-81.
- Gonzalez, S, Valenti, M, de Miguel, R *et al.* (2004) Changes in endocannabinoid contents in reward-related brain regions of alcohol-exposed rats, and their possible relevance to alcohol relapse. *Br J Pharmacol* **143**, 455-464.
- Guindon, J, De Lean, A and Beaulieu, P (2006) Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. *Pain* **121**, 85-93.
- Hanus, L, Abu-Lafi, S, Fride, E, Breuer, A, Vogel, Z, Shalev, DE, Kustanovich, I and Mechoulam, R (2001) 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 3662-3665.
- Hill, MN, Miller, GE, Carrier, EJ, Gorzalka, BB and Hillard, CJ (2009) Circulating endocannabinoids and N-acyl ethanolamines are differentially regulated in major depression and following exposure to social stress. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 1257-1268.
- Hillard, CJ (2000) Endocannabinoids and vascular Function. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 27-32.
- Howlett, AC, Qualy, JM and Khachatrian, LL (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylat cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* **29**, 307-313.
- Idris, AI, van 't Hof, RJ, Greig, IR, Ridge, SA, Baker, D, Ross, RA, Ralston, SH (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med* **11**, 774-779.
- Jesudason, D and Wittert, G (2008) Endocannabinoid system in food intake and metabolic regulation. *Curr Opin Lipidol* **19**, 344-348.

Joosten, MM, Balvers, MG, Verhoeckx, KC, Hendriks, HF and Witkamp, RF (2010) Plasma anandamide and other N-acyl ethanolamines are correlated with their corresponding free fatty acid levels under both fasting and non-fasting conditions in women. *Nutr Metab (Lond)* **7**, 49.

Katona, I, Rancz, EA, Acsady, L, Ledent, C, Mackie, K, Hajos, N and Freund, TF (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci* **21**, 9506-9518.

Katona, I, Sperlagh, B, Sik, A, Kafalvi, A, Vizi, ES, Mackie, K and Freund, TF (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* **19**, 4544-4558.

Kola, B, Hubina, E, Tucci, SA et al. (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **280**, 257-268.

Lallemant, F, Soubrie, PH and De Witte, PH (2001) Effects of CB1 cannabinoid receptor blockade on ethanol preference after chronic ethanol administration. *Alcohol Clin Exp Res* **25**, 1317-1323.

Lazarus, R, Sparrow, D and Weiss, ST (1997) Alcohol intake and insulin levels. The Normative Aging Study. *American journal of epidemiology* **145**, 909-916.

Lichtmann, AH, Hawkins, EG, Griffin, G and Cravatt, BF (2002) Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 73-79.

Mackie, K, Devane, WA and Hille, B (1993) Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* **44**, 498-503.

Mackie, K and Hille, B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **89**, 3825-3829.

Mackie, K, Lai, Y, Westenbroeck, R and Mitchell, R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* **15**, 6552-6561.

Maeda, N, Osanai, T, Kushibiki, M, Fujiwara, T, Tamura, Y, Oowada, S et al. (2009) Increased serum anandamide level at ruptured plaque site in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* **23(3)**, 351-357.

Malinen, H and Hyytia, P (2008) Ethanol self-administration is regulated by CB1 receptors in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in alcohol-preferring AA rats. *Alcohol Clin Exp Res* **32**, 1976-1983.

Marcos, M, Pastor, I, De La Calle, C, Barrio-Real, L, Laso, FJ and González-Sarmiento, R (2012) Cannabinoid receptor 1 gene is associated with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **36(2)**, 267-271.

Marsicano, G, Goodenough, S, Monory, K et al. (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**, 84-88.

- Matias, I, Bisogno, T and Di Marzo, V (2006) Endogenous cannabinoids in the brain and peripheral tissues: regulation of their levels and control of food intake. *Int J Obes (Lond)* **30(Suppl 1)**, S7-S12.
- Matias, I and Di Marzo, V (2007) Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab* **18**, 27-37.
- Matias, I, Gonthier, MP, Orlando, P *et al.* (2006) Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**, 3171-3180.
- Matsuda, LA, Lolait, SJ, Brownstein, MJ, Young, AC and Bonner, TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561-564.
- Mechoulam, R, Ben-Shabat, S, Hanus, L, *et al.* (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* **50**, 83-90.
- Mikics, E, Dombi, T, Barsvari, B *et al.* (2006) The effects of cannabinoids on contextual conditioned fear in CB1 knockout and CD1 mice. *Behav Pharmacol* **17**, 223-230.
- Mitchell, PB and Morris, MJ (2007) Depression and anxiety with rimonabant. *The Lancet* **370**, 1671-1672.
- Mukamal, KJ, Maclure, M, Muller, JE and Mittleman, MA (2005) Binge drinking and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* **112**, 3839- 3845.
- Munro, S, Thomas, KL and Abu-Shaar, M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* **365**, 61-65.
- Pace-Asciak, CR, Hahn, S, Diamandis, EP, Soleas, G and Goldberg, DM (1995) The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* **235(2)**, 207-219.
- Pacher, P (2009) Cannabinoid CB1 receptor antagonists for atherosclerosis and cardiometabolic disorders: new hopes, old concerns? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 7-9.
- Pagotto, U, Marsicano, G, Cota, D, Lutz, B and Pasquali, R (2006) The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* **27**, 73-100.
- Paul, A, Cahill, Eileen, M Redmond (2012) Alcohol and cardiovascular disease- Modulation of vascular cell function. *Nutrients* **4(4)**, 297-318.
- Pertwee, RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* **74**, 129-180.
- Piomelli, D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat Rev Neurosci* **4**, 873-884.
- Powers, MS, Barrenha, GD, Mlinac, NS, Barker, EL and Chester, JA (2010) Effects of the novel endocannabinoid uptake inhibitor, LY2183240, on fear-potentiated startle and alcohol-seeking behaviors in mice selectively bred for high alcohol preference. *Psychopharmacology* **212(4)**, 571-583.

Puffenbarger, RA (2005) Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**, 625-631.

Ravinet Trillou, C, Delogorge, C, Menet, C, Arnone, M and Soubrie, P (2004) CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**, 640-648.

Rettori, V, Fernandez-Solari, J, Prestifilippo, JP, Mohn, C, De Laurentiis, A, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein, M, Elverdin, JC and McCann, SM (2007) Endocannabinoids in TNF- α and ethanol actions. *Neuroimmunomodulation* **14**, 188-192.

Rinaldi-Carmona, M, Barth, F, Heaulme, M, Shire, D, Calandra, B, Congy, C, Martinez, S, Maruani, J, Neliat, G, Caput, D, Ferrara, P, Soubrie, P, Breliere, JC and Le Fur, GL (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* **350**, 240-244.

Ronksley, PE, Brien, SE, Turner, BJ, Mukamal, KJ and Ghali, WA (2011) Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* **342**, d671.

Rubio, M, de Miguel, R, Fernandez-Ruiz, J, Gutierrez-Lopez, D, Carai, MA and Ramos, JA (2009) Effects of a short-term exposure to alcohol in rats on FAAH enzyme and CB1 receptor in different brain areas. *Drug Alcohol Depend* **99**, 354-358.

Rubio, M, McHugh, D, Fernandez-Ruiz, J, Bradshaw, H and Walker, JM (2007) Short-term exposure to alcohol in rats affects brain levels of anandamide, other N-acyl ethanolamines and 2-arachidonoyl-glycerol. *Neurosci Lett* **421**, 270-274.

Sanger, GJ (2007) Endocannabinoids and the gastrointestinal tract: what are the key questions? *Br J Pharmacol* **152**, 663-670.

Scheen, AJ, Finer, N, Hollander, P, Jensen, MD and Van Gaal, LF (2006) Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* **368**, 1660-1672.

Shen, M, Piser TM, Seybold, VS and Thayer, SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* **16**, 4322-4334.

Shire, D, Carillon, C, Kaghad, M, Calandra, B, Rinaldi-Carmona, M, Le Fur, G, Caput, D and Ferrara, P (1995) An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *J Biol Chem* **270**, 3726-3731.

Soleas, GJ, Grass, L; Josephy, PD, Goldberg, DM and Diamandis, EP (2002) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem* **35(2)**, 119-124.

Solinas, M, Justinova, Z, Goldberg, SR and Tanda, G (2006) Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem* **98**, 408-419.

Steurer, R (1995) Steurers Weinhandbuch, *Ueberreuter*.

Sugamura, K, Sugiyama, S, Nozaki, T *et al.* (2009) Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation* **119**, 28-36.

Sugiura, T, Kondo, S, Sukagawa, A *et al.* (1995) 2-Arachinodiyglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res commun* **215**, 89-97.

Szallasi, A and Di Marzo, V (2000) New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci* **23**, 491-497.

Tousoulis, D, Ntarladimas, I, Antoniadis, C, Vasiliadou, C, Tentolouris, C, Papageorgiou, N, Latsios, G and Stefanadis, C (2008) Acute effects of different alcoholic beverages on vascular endothelium, inflammatory markers and thrombolysis system. *Clin Nutr* **27**, 594- 600.

Van der Stelt, M and Di Marzo, V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med* **7**, 37-50.

Van der Stelt, M, Trevisani, M, Vellani, V *et al.* (2005) Anandamide acts as an intracellular messenger amplifying Calcium influx via TRPV1 channels. *Embo J* **24**, 3026-3037.

Vinod, KY, Maccioni, P, Garcia- Gutierrez, MS, Femenia, T, Xie, S, Carai, MA, Manzanares, J, Cooper, TB, Hungund, BL and Colombo, G (2012) Innate difference in the endocannabinoid signaling and its modulation by alcohol consumption in alcohol- preferring sP rats. *Addict Biol* **17(1)**, 62-75.

Vogeser, M (2004) Anwendung der HPLC- Tandem- Massenspektrometrie in der klinischen Chemie. *J LabMed* **28**, 195-204.

Vogeser, M, Hauer, D, Christina Azad, S, Huber, E, Storr, M and Schelling, G (2006) Release of anandamide from blood cells. *Clin Chem Lab Med* **44**, 488-491.

Vogeser, M and Schelling, G (2007) Pitfalls in measuring the endocannabinoid 2-arachidonoyl glycerol in biological samples. *Clin Chem Lab Med* **45**, 1023-1025.

Wang, H, Dey, SK and Maccarrone, M (2006) Jekyll and Hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. *Endoc Rev* **27**, 427-448.

Wilson, RI and Nicoll, RA (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signaling at hippocampal synapses. *Nature* **410**, 588-592.

Zimmermann, US, Buchmann, A, Steffin, B, Dieterle, C and Uhr, M (2007) Alcohol administration acutely inhibits ghrelin secretion in an experiment involving psychosocial stress. *Addiction biology* **12**, 17-21.

Zygmunt, PM, Petersson, J, Andersson, DA, Chuang, H, Sorgard, M, Di Marzo, V, Julius, D and Hogestatt, ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452-457.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Gustav Schelling danke ich sehr für die Überlassung des spannenden Themas dieser Arbeit sowie für die immer freundliche Unterstützung und ausdauernde Geduld.

Außerdem bin ich Fr. Dr.med. Daniela Hauer und Herrn Dr. med. Matthias Feuerecker Dank schuldig, sowohl für die konstruktive Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Versuche, als auch für die wertvollen Ratschläge und Hilfen bei der statistischen Auswertung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktorantinnen- Kollegin und Freundin, Frau Simone Lassas, für die vielen fruchtbaren Gespräche und ihre Unterstützung bei der Laborarbeit.

Herzlichen Dank an die Mitarbeiter des Forschungslabors der Klinik für Anästhesie der LMU, insbesondere Frau Marion Hörl für ihre unverzichtbare Hilfe bei der Durchführung der Endocannabinoidmessung.

Meiner Familie danke ich sehr für ihre Unterstützung und dafür, dass sie immer wieder Kraft und Motivation im richtigen Moment gaben. Danke dafür, dass sie immer ein Ohr für mich hatten und zu ehrlicher Kritik bereit waren.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich, Theresa Gresset, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Die Wirkung akuten Konsums einer mäßigen Ethanolmenge auf das Endocannabinoidsystem des Menschen“

selbständig verfasst, mich, außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Ort, Datum

Theresa Gresset, Doktorandin