

II.Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmidt)

**Einfluß des Endocannabinoidsystems auf die Motilität der glatten
Muskulatur des Ileums von Mäusen (in vitro).**

Alois Stadler

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

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. H.-D. Allescher
	2. Univ.-Prof. Dr. M. Ebert

Die Dissertation wurde am 02.09.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.03.2010 angenommen.

Meinen Eltern gewidmet

1.	Einleitung	5
2.	Material und Methoden	7
2.1.	Versuchstiere	7
2.2.	Versuchsanordnung	8
2.3.	Versuchsdurchführung	9
2.3.1.	Einfluß von Agonisten oder Antagonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen	9
2.3.2.	Einfluß von Agonisten oder Antagonisten auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen	11
2.3.3.	Einfluß von Agonisten in der Gegenwart von Antagonisten auf elektrisch oder pharmakologisch induzierte Kontraktionen	12
2.3.4.	Einfluß des CB1-Agonisten WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen....	12
2.4.	Datenauswertung	13
2.5.	Verwendete Substanzen	15
2.6.	Auswertung und Statistik	16
3.	Ergebnisse	17
3.1.	Einfluss von Cannabinoidagonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen	17
3.1.1.	Anandamid	17
3.1.2.	WIN 55,212-2	19
3.1.3.	ACEA.....	21
3.1.4.	Vergleich der Cannabinoidagonisten.....	23

Inhaltsverzeichnis

3.2.	Einfluss des CB1R-Antagonisten SR 141716A auf elektrisch induzierte Kontraktionen	26
3.3.	Einfluss des Vanilloidrezeptoragonisten Capsaicin und des Vanilloidrezeptorantagonisten Capsazepin auf elektrisch induzierte Kontraktionen	28
3.4.	Einfluss von CBR-Agonisten Anadamide, ACEA und WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 14176A.....	31
3.4.1.	Anandamid	31
3.4.2.	WIN 55,212-2	33
3.4.3.	ACEA.....	35
3.5.	Einfluß von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen des Ileums der WT- und KO-Maus	36
3.6.	Einfluß von Apamin 10^{-6} M auf die Wirkung des CB1R-Antagonisten SR141716A.....	38
3.7.	Einfluß von Apamin 10^{-6} M auf die Wirkung des CBR-Agonisten WIN 55,212-2	40
3.8.	Einfluß von WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Bedingungen	42
3.9.	Einfluß des CBR-Agonisten Anandamid und des CB1R-Antagonisten SR141716A auf pharamkologisch induzierte Kontraktionen	43
3.9.1.	Anandamid	43
3.9.2.	SR141716A	44
4.	Allgemeine Diskussion	46
4.1.	Intestinale Motilität.....	46
4.1.2.	Regulation der intestinalen Motilität.....	46

4.2.2.	Einfluß des extrinsischen autonomen Nervensystem.....	50
4.2.	Cannabinoide	52
4.2.1.	Geschichte	52
4.2.2.	Der CB1-Rezeptor	54
4.2.3.	Der CB2-Rezeptor	55
4.2.4.	Signaltransduktion von CB1- und CB2-Rezeptor	56
4.2.4.1.	Regulation der Adenylatzyklase	57
4.2.4.2.	Regulation von Ionenkanälen	59
4.2.4.3.	Regulation von intrazellulären Ca ²⁺ -Übergängen.....	60
4.2.4.4.	Regulation der NO-Synthetase.....	61
4.2.5.	Agonisten des CB1-Rezeptors	62
4.2.6.	Antagonisten an Cannabinoidrezeptoren	65
4.2.7.	Inaktivierung der Endocannabinoide	66
4.2.8.	Cannabinoide als Agonisten an Vanilloidrezeptoren	68
4.2.9.	Cannabinoide als Agonisten an non-CB1, non-CB2 Rezeptoren	72
4.2.9.1.	CB2-ähnliche Cannabinoidrezeptoren.....	72
4.2.9.2.	SR141716A-sensitive, non-CB1, non-CB2, non-vanilloid Rezeptoren	72
4.2.9.3.	Anandamid- und WIN55,212-2 - sensitive Rezeptoren.....	73
4.2.10.	Einfluss von Cannabinoiden auf den Gastrointestinaltrakt	74
4.2.10.1.	Hemmung der cholinergen Übertragung	75

4.2.10.2.	Einfluss auf die non-adrenerge, non-cholinerge (NANC-) Übertragung.....	77
5.	Spezielle Diskussion	80
5.1.	Einfluß der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur	80
5.2.	Einfluß des CB1R-Antagonisten SR141716A auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der.....	83
5.3.	Einfluß des TRPV1-Rezeptor-Agonisten Capsaicin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur.....	84
5.4.	Einfluss von CBR-Agonisten Anadamide, ACEA und WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 141716A.....	85
5.5.	Einfluss von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur.....	87
5.6.	Einfluß des endogenen CBR-Agonisten Anandamid und des CB1R-Antagonisten SR141716A auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen.....	88
5.7.	Einfluß des endogenen CBR-Agonisten WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen.....	89
6.	Zusammenfassung.....	90
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	94
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	101
9.	Literaturverzeichnis.....	103
10.	Danksagung.....	138
11.	Lebenslauf.....	139

1. Einleitung

Als Cannabinoide wurden ursprünglich Mitglieder einer Klasse von „typischen C₂₁-Verbindungen“ bezeichnet, die in der Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. (L.: Taxonomie nach Carl von Linné (1707-1778)) vorkommen (Razdan, 1986). Medizinische Eigenschaften wurden bereits vor mehreren tausend Jahren in der chinesischen und persischen Medizin beobachtet. Extrakte von *Cannabis* fanden vor 100 Jahren in den USA Anwendung bei gastrointestinalen Schmerzen, Gastroenteritiden und Diarrhoe. Weiterhin gibt es in letzter Zeit Fallberichte, die auf eine positive Wirkung bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen hinweisen. Die wichtigste der genannten C₂₁-Verbindungen ist Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), die für viele der pharmakologischen Wirkungen verantwortlich ist.

Bindungsstelle für Δ^9 -THC sind zum einem die beiden bereits bekannten Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2, zum anderen muss aufgrund der gegenwärtigen Studienlage von weiteren Cannabinoid-Rezeptoren ausgegangen werden, deren Identifizierung aber noch nicht gelungen ist. Nachdem diese Rezeptoren kloniert wurden, konnten in kurzer Folge auch endogene Liganden für diese Rezeptoren gefunden werden. Aufgrund dessen war es auch notwendig, die oben genannte Definition insofern zu erweitern, dass alle Verbindungen, die zu einer Bindung an Cannabinoidrezeptoren fähig sind, als Cannabinoide bezeichnet werden. Nach Identifizierung des endogenen Cannabinoidsystems entwickelte sich ein reges Interesse an den physiologischen und potenziell pathophysiologischen Wirkungen der Cannabinoide.

Bereits die Verteilung der Cannabinoid-Rezeptoren und der Endocannabinoide läßt vorsichtige Rückschlüsse über ihre mögliche natürliche Funktion zu. CB1-Rezeptoren befinden sich vor allem auf Nervenzellen im Gehirn und Rückenmark, aber auch in anderen Geweben, wie zum Beispiel in Blutgefäßen, dem Herzen, den Hoden, der Milz und Neuronen des Gastrointestinaltraktes. CB2-Rezeptoren finden sich dagegen vor allem auf Zellen des Immunsystems wie etwa auf weißen Blutkörperchen und scheinen eine Rolle bei der Modulation von Immunfunktionen zu spielen. Die

natürliche Funktion der über die CB1-Rezeptoren vermittelten Effekte scheint dagegen sehr vielfältig zu sein und ist Gegenstand intensiver Forschungen. Durch verschiedenen Arbeiten konnte bereits nachgewiesen werden, dass Cannabinoide einen hemmenden Effekt auf die Motilität des Gastrointestinaltraktes besitzen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß des Cannabinoidsystems auf die Motilität der glatten Muskulatur des Ileums der Maus untersucht werden. Die Versuche wurden mit Organstreifen genetisch nativer Mäuse ($CB_1^{+/+}$) und konstitutioneller $CB_1^{-/-}$ Mäuse durchgeführt.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- Können elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur sowohl der $CB_1^{+/+}$ -Maus, als auch der $CB_1^{-/-}$ -Maus durch die Zugabe des endogenen Cannabinoidagonisten Anandamid und der synthetischen Agonisten WIN 55,212-2 und Arachydonyl-2'-chloroethylamid (ACEA) beeinflusst werden.
- Kann der selektive CB_1 R-Antagonist SR141716A einen modifizierenden Einfluß auf elektrisch induzierte Kontraktionen ausüben.
- Wird die Wirkung der genannten Cannabinoidagonisten durch den Antagonisten SR141716A aufgehoben.
- Wird das Endocannabinoidsystem durch den Vanilloidrezeptoragonisten Capsaicin bzw. Vanilloidrezeptorantagonisten Capsazepin beeinflusst.
- Kann Apamin, das Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle blockt, die Wirkung des CB-Agonisten WIN 55,212-2 und des CB_1 R-Antagonisten SR141716A beeinflussen.
- Werden pharmakologisch ausgelöste Kontraktionen der glatten Muskulatur durch Anandamid oder SR141716A beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weibliche C57BL/6N (Charles River) Mäuse mit einem Gewicht zwischen 16g und 23g verwendet. Dabei standen konstitutionelle CB₁-defiziente Mäuse (Tiere, denen der CB₁-Rezeptor fehlt (KO-Maus)) und Wildtyp-Mäuse mit intaktem CB₁-Rezeptor zur Verfügung. Die Tiere wurden generiert von Mitarbeitern des Max Planck-Instituts für Psychiatrie München und freundlicherweise für die Versuche überlassen. Eine nach den Versuchen stattfindende Kontrollgenotypisierung gewährleistete eine richtige Einordnung in KO- und Wildtypmaus.

Alle Versuchstiere wurden vor den Experimenten unter standardisierten Bedingungen in einem vollklimatisierten Raum bei künstlichem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Ihre Ernährung bestand aus Trockenfutter und Wasser. 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde das Futter entfernt, während der Zugang zu Wasser weiterhin unbegrenzt vorhanden war.

Unter CO₂-Narkose wurden die Tiere durch zervikale Dekapitation getötet und anschließend die Bauchhöhle durch einen medianen Schnitt eröffnet. Dabei wurde der komplette Dün- und Dickdarm entnommen und in ein Präparationsbad, das einen mit Carbogen oxygenierten Krebs-Ringer Puffer enthielt, überführt. Nach Abpräparation des mesenterialen Fettgewebes wurde für den Versuch das Ileum verwendet. Für die Organentnahme lag eine entsprechende Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

2.2. Versuchsanordnung

Pro Versuchstier wurden aus dem terminalen Ileum sechs ca. 1cm lange Streifen entnommen. Diese wurden an ihren beiden Ende jeweils mit einer Ligatur versehen und das aborale Ende an einen Haken des Elektrodenhalters befestigt. Dieser Elektrodenhalter bestand aus einem Fixationshaken und zwei Platinringelektroden (Abstand voneinander ca. 5mm), durch die der Muskelstreifen geführt wurde.

Der Elektrodenhalter mit den Organstreifen wurde in ein doppelwandiges Bad platziert, das 4 ml Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung (Krebs-Ringer-Solution, KRS) enthielt (NaCl 115,5 mM, MgSO₄ 1,16 mM, NaH₂PO₄ 1,16 mM, Glucose 11,1 mM, NaHCO₃ 21,9mM, CaCl 2,5 mM, KCl 4,16mM). Das Organbad wurde durch einen umgebenden Heizkreislauf auf 37°C gehalten und der Puffer mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Das orale Ende der Organsegmente wurde über eine Ligatur direkt mit dem Kraftwandler (Swegma Force Displacement Transducer SG 4-500, Swegma, Schweden) verbunden. Die Segmente waren derart fixiert, dass entstehende Kräfte in Richtung der longitudinalen Muskulatur registriert wurden. Bei einer Vorspannung von ca. 40 mN wurde das System 30 min. lang equilibriert. Im Anschluß wurde das Organbad dreimal mit KRS gespült und das jeweilige Experiment mit frischem Puffer gestartet. Nach einzelnen Versuchsabschnitten wurde das System jeweils erneut gespült. Über den Kraftwandler wurden die Kontraktionen der Muskelstreifen in elektrische Spannungsänderungen umgewandelt und über einen Verstärker (Hellige, D-Freiburg) mit einem Flachsreiber (Rikadenki Electronics GmbH, D-Freiburg) aufgezeichnet. Jedes Segment wurde für ein einziges Experiment verwendet.

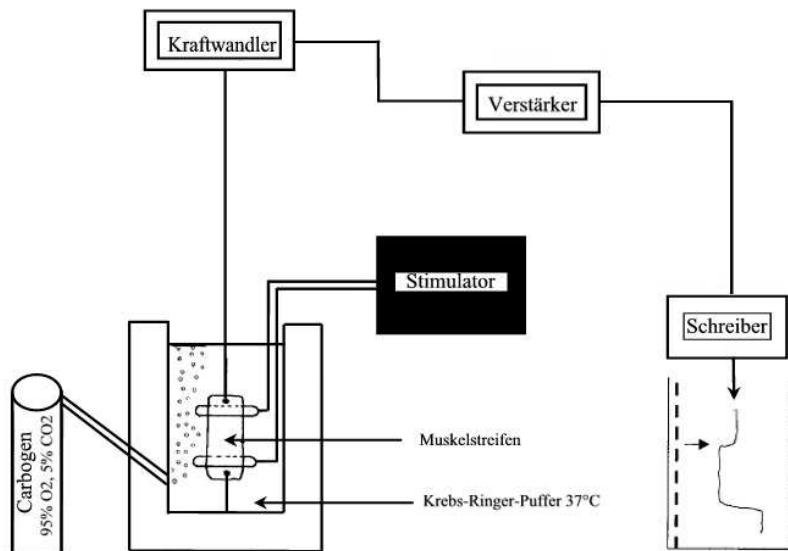


Abb. 1: Schematisierte Darstellung des Versuchsmodell

2.3. Versuchsdurchführung

Es wurden an einem Versuchstag immer zwei Versuche durchgeführt. Dabei handelte es sich stets um das gleiche Versuchs-Setup, das immer für eine Wildtyp- und im Anschluss für eine CB₁-Knock-Out-Maus durchgeführt wurde.

2.3.1. Einfluß von Agonisten oder Antagonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Organbad mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült.

Der Versuch startete mit der dreimaligen Zugabe von Carbachol 10^{-6} M, das eine entsprechende Kontraktion der Muskelstreifen zur Folge hatte und nach einer Minute Verweildauer im Organbad durch frische Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung ausgespült wurde. Zwischen den einzelnen Zugaben wurde das Organbad noch jeweils zweimal gespült. Nach der dritten Zugabe und anschließendem dreimaligen Spülen wurde das System für 10 Minuten equilibriert.

Nun folgte die elektrische Feldstimulation (EFS). Dabei wurden die Muskelstreifen dem elektrischen Stimulus in absteigenden Frequenzen bei einer Spannung von 40 V und einer Pulsdauer von 1ms im Abstand von einer Minute für jeweils 10 Sekunden ausgesetzt. Begonnen wurde mit der Frequenz von 16 Hz, gefolgt von 8 Hz, 4 Hz und 2 Hz.

Nachdem in diesem Schritt die Referenzwerte ohne Zugabe stimulierender oder inhibierender Agentien gewonnen wurden, folgte schließlich die Zugabe der jeweils zu testenden Agonisten oder Antagonisten des CB1, CB2 oder TPRV1-Rezeptors. Dies geschah in entsprechenden Verdünnungsreihen, wobei mit der kleinsten Konzentration, i.d.R. 10^{-9} M, begonnen und bis zur höchsten Konzentration 10^{-4} M gesteigert wurde. Nach der jeweiligen Zugabe der zu untersuchenden Substanz wurde das System zunächst für 20 Minuten inkubiert, bevor in oben dargestellter Weise die elektrische Stimulation erfolgte. Nach der EFS wurde das Organbad dreimal mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült, ehe sich das Procedere in der nächsthöheren Konzentration wiederholte.

Die elektrische Stimulation mit den oben genannten Stimulationsparametern resultiert in einer Kontraktion, die durch cholinerge Neurone vermittelt wird. Vorversuche haben gezeigt, dass diese Form der Kontraktion in Gegenwart von Tetrodotoxin (10^{-6} M) oder Atropin (10^{-6}) vollständig blockiert wurde.

Gemessen wurde jeweils die maximale Kontraktion, die durch den elektrischen Stimulus induziert wurde.

2.3.2. Einfluß von Agonisten oder Antagonisten auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Organbad mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült.

Der Versuch startete mit der dreimaligen Zugabe von Carbachol 10^{-6} M, das eine entsprechende Kontraktion der Muskelstreifen zur Folge hatte und nach einer Minute Verweildauer im Organbad durch frische Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung ausgespült wurde. Zwischen den einzelnen Zugaben wurde das Organbad noch jeweils zweimal gespült. Nach der dritten Zugabe und anschließendem dreimaligen Spülen wurde das System für 10 Minuten equilibriert.

Anstatt durch elektrischen Stimulation wurden die Kontraktionen der Muskelstreifen hier durch Zugabe von Carbachol hervorgerufen. Dieser Agonist der M-Cholinozeptoren wurde kumulativ zugegeben in Abständen von einer Minute, dabei wurde mit der Konzentration 10^{-8} M begonnen, gefolgt von 10^{-7} M, 10^{-6} M bis zu 3×10^{-6} M. Nachdem die höchste Konzentration für eine Minute im Organbad gewesen war, folgte ein dreimaliges Spülen mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung. Der weitere Verlauf des Versuches gestaltete sich wie oben dargestellt, nur dass die elektrische durch die pharmakologische Stimulation ersetzt wurde.

Vereinbarungsgemäß wurde im Rahmen der pharmakologischen Stimulation je die maximale Kontraktion innerhalb der einminütigen alleinigen Verweildauer im Organbad gemessen.

2.3.3. Einfluß von Agonisten in der Gegenwart von Antagonisten auf elektrisch oder pharmakologisch induzierte Kontraktionen

Die Versuchsdurchführung gleicht den beiden oben vorgestellten. Es wurde lediglich vor Zugabe der ansteigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz ein Antagonist in das Organbad pipettiert. Die Konzentration des Antagonisten wurde dabei aus den Ergebnissen der Vorversuche (s.o.) festgelegt.

Nach Zugabe dieser Substanz folgte eine 15-minütige Inkubationszeit, ehe der Agonist des Cannabinoidrezeptors in den ansteigenden Konzentrationen zugegeben wurde.

Bei den Antagonisten handelt es sich um SR141716A, ein selektiver Antagonist des CB1-Rezeptors, Capsazepine, ein Antagonist des TRPV1-Rezeptors, und Apamin, ein Blocker Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle.

2.3.4. Einfluß des CB1-Agonisten R-(+)-WIN 55,212 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen

Die Organstreifen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben präpariert und in das Organbad eingespannt. Bei einer Vorspannung von 40 mN wurde das System zunächst 30 Minuten equilibriert. Zehn Minuten vor Versuchsbeginn wurde das Organbad mit frischer Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung gespült.

Der Versuch startete mit der dreimaligen Zugabe von Carbachol 10^{-6} M, das eine entsprechende Kontraktion der Muskelstreifen zur Folge hatte und nach einer Minute Verweildauer im Organbad durch frische Krebs-Ringer-Bikarbonat-Lösung ausgespült wurde. Zwischen den einzelnen Zugaben wurde das Organbad noch jeweils zweimal gespült. Nach der dritten Zugabe und anschließendem dreimaligen Spülen wurde das System für 10 Minuten equilibriert.

Zunächst erfolgte eine elektrische Stimulation unter „normalen“ Bedingungen. Nach einmaligem Spülen wurden durch Zugabe von Atropin 10^{-6} M und Guanethidin 10^{-5} nicht-adrenerge, nicht-cholinerge Bedingungen hergestellt. Nach 5 Minuten wurde eine EFS unter diesen Bedingungen durchgeführt. Um den Einfluß des CB₁-

Agonisten unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen zu untersuchen, wurden im Folgenden vor der Zugabe des Agonisten (10^{-9} M – 10^{-4} M) stets Atropin und Guanethidin in oben genannten Konzentrationen in das Organbad pipettiert.

2.4. Datenauswertung

Bei der elektrischen Feldstimulation wurde der größte Ausschlag, d.h. die maximale Kontraktion, gemessen. Diese wurde unmittelbar nach Beginn der Stimulation erreicht. Die Kontraktionen, die in Abwesenheit stimulierender oder inhibierender Agentien, induziert wurden, dienten als Referenzwert und entsprachen demnach 100%. Die Ausschläge, die nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen gemessen wurden, wurden dazu in Relation gesetzt (Abb. 2).

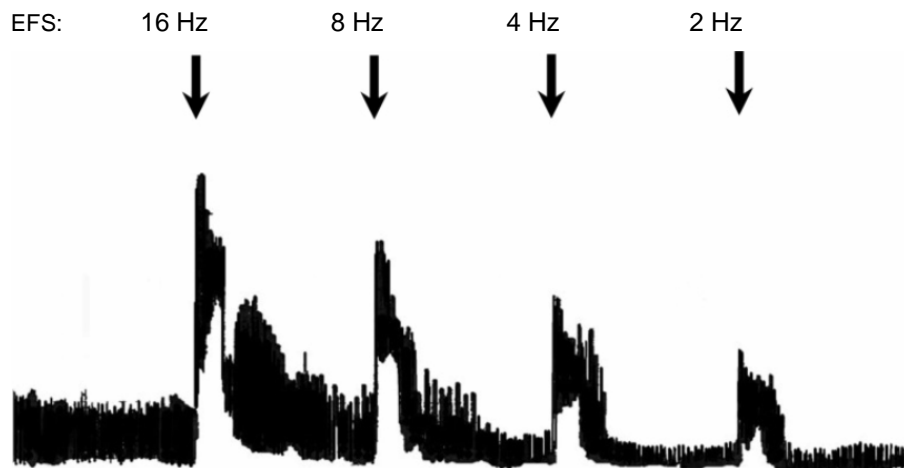


Abb. 2: Darstellung der durch den Flatschreiber aufgezeichneten Kontraktionen, die durch elektrische Stimulation (Frequenz: 16 Hz, 8 Hz, 4 Hz, 2 Hz; Spannung 40 V; Pulsdauer 1 ms; Stimulationsdauer 10 sec.) mit der entsprechenden Frequenz induziert wurden.

Vereinbarungsgemäß wurde bei der Messung der pharmakologisch induzierten Kontraktionen der größte Ausschlag innerhalb einer Minute nach Zugabe der Substanz gemessen. Auch hier wurden die Kontraktionen nach Zugabe der Agonisten und/oder Antagonisten in Bezug gesetzt zu den nativen Kontraktionen.

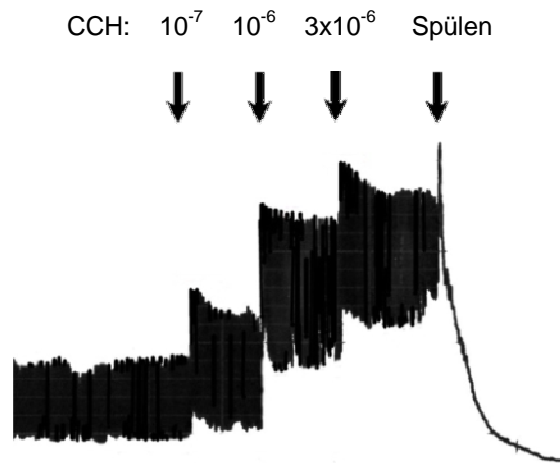


Abb. 3: Darstellung der durch den Flachsreiber aufgezeichneten Kontraktionen, die durch pharmakologische Stimulation mit Carbachol in aufsteigender Konzentration (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} und 3×10^{-6}) Frequenz induziert wurden.

* Keine nachweisbare Kontraktion bei Zugabe Carbachol 10^{-8} .

2.5. Verwendete Substanzen

Tab. 1: Darstellung der verwendeten Substanzen, der Rezeptorbindung, Affinität bzgl. CB₁- und CB₂-Rezeptor und Herstellungsfirma der entsprechenden Substanz (Coutts, 2004).

Substanz	Kategorie	Affinität	Firma
- Anandamid	Endogener CBR-Agonist	K _i (CB1): 543 K _i (CB2): 581-1940	Tocris; Ellisville, USA
- WIN 55,212-2	Nicht-selektiver CBR-Agonist	K _i (CB1): 1,89-123 K _i (CB2): 0,28-16	Biotrend; Köln, Deutschland
- ACEA	Selektiver CB1-Rezeptor Agonist	K _i (CB1): 1,4 K _i (CB2): >2000	Biotrend; Köln, Deutschland
- SR141716A	Selektiver CB1- R Antagonist	K _i (CB1): 1,8-12,3 K _i (CB2): 702-13200	Sanofi Recherche; Montpellier, Frankreich
- Capsazepine	TPRV1-Antagonist		Tocris; Ellisville, USA
- Capsaicin	TPRV1-Agonist		Tocris; Ellisville, USA

Weiterhin wurden folgende Substanzen verwendet: Carbachol, Atropin, Guanethidin, Apamin, Tetrodotoxin (TTX) (alle Sigma, München, Germany);

WIN 55,212-2 wurde in DMSO zur Lösung gebracht, die weitere Verdünnung erfolgte mit NaCl-0,9%. Für SR141716A waren neben einigen Tropfen DMSO wenige Tropfen Tween 80 notwendig, um eine Lösung zu erreichen.

ACEA, Capsazepine, Capsaicin konnten in Ethanol gelöst und mit NaCl-0,9% weiterverdünnt werden.

Die restlichen Substanzen wurden alle in isotonischer NaCl-Lösung gelöst. Die Endverdünnung wurde so gewählt, dass durch die Zugabe von 40 µl mit einer Eppendorf-Pipette die erwünschte Endkonzentration im Organbad erreicht wurde.

In separaten Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Lösungsvehikel per se keinen Effekt auf die elektrisch oder pharmakologisch induzierten Kontraktionen hatten.

2.6. Auswertung und Statistik

Die Daten für 4 Hz und 2 Hz wurden nicht graphisch dargestellt, da für diese beiden Frequenzen kein über den gesamten Versuch stabiles Kontraktionsniveau erzielbar war. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben; n steht für die Anzahl unabhängiger Ergebnisse an verschiedenen Segmenten. Zum Vergleich der Mittelwerte wurden der Student-t-Test für gepaarte und ungepaarte Stichproben und die Varianzanalyse verwendet (Sigmastat 2,0; Jandel Scientific, Erkrath, Germany). Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss von Cannabinoidagonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde der Einfluß von CB-Rezeptor-Agonisten auf Kontraktionen der Organstreifen, die durch elektrische Stimulation (40 V; 16 Hz – 8 Hz – 4 Hz – 2 Hz; 1ms Pulsdauer; 10 sek Stimulation) hervorgerufen wurden, sowohl an WT-Maus als auch an CB1-KO-Maus untersucht. Die Zugabe der zu untersuchenden Substanzen erfolgte dabei in den beschriebenen Verdünnungsreihen, wobei stets mit der niedrigsten Konzentration begonnen wurde.

3.1.1. Anandamid

Der endogene CB-Rezeptor-Agonist Anandamid zeigte sowohl bei der KO-Maus als auch bei der WT-Maus ab der Konzentration von 10^{-5} M eine signifikante Reduktion der durch EFS induzierten Kontraktionen. Dies legt den Schluß nahe, dass diese Wirkung nicht über den CB1-Rezeptor vermittelt ist, da bekanntlich die KO-Maus CBR1-defizient ist.

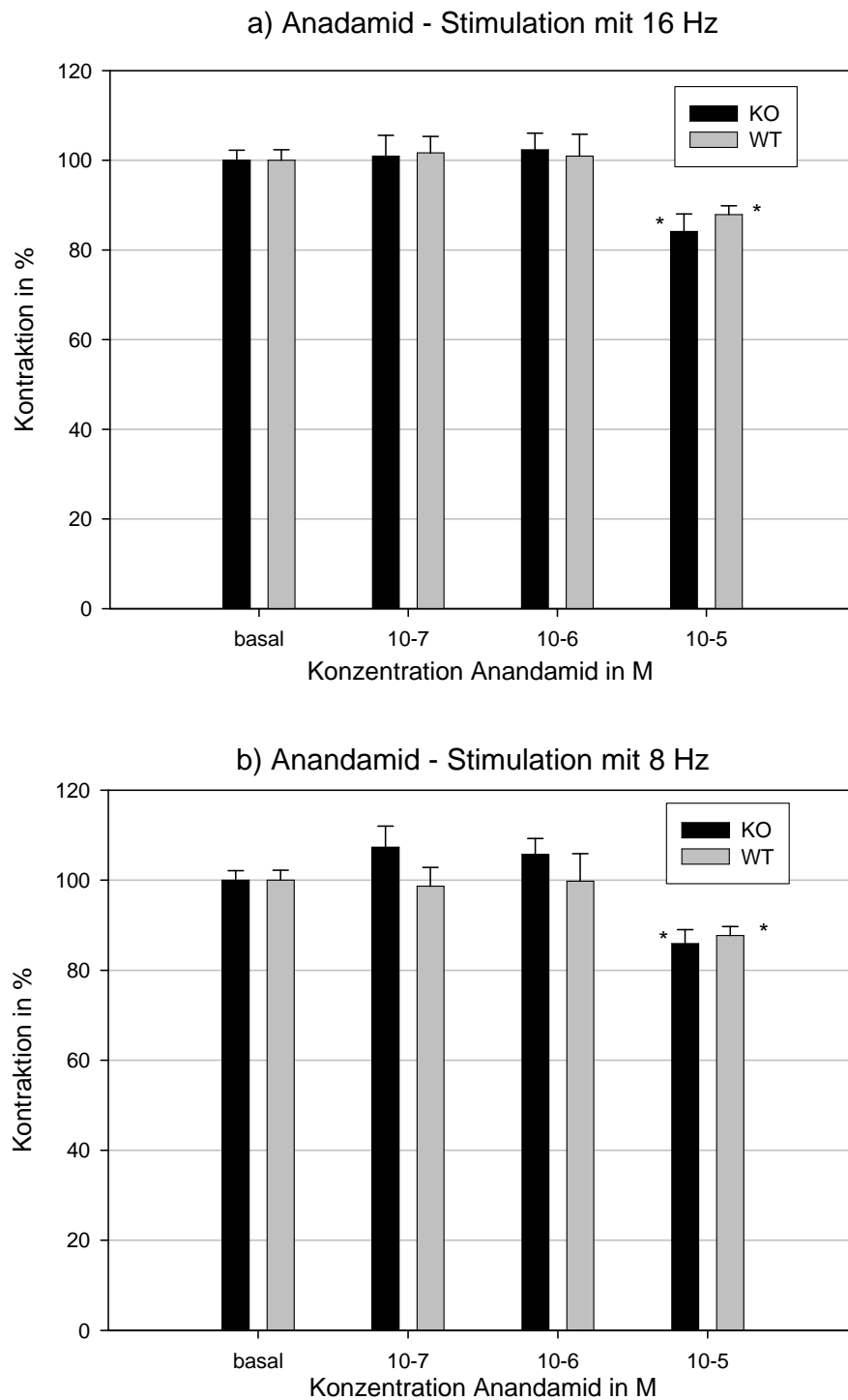


Abb. 4: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten Anandamid in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus. n>9, * = p < 0,05;

a) 16 Hz

b) 8 Hz

Tab. 2: Kontraktionsniveau nach elektrischer Feldstimulation mit 16 Hz bzw. 8 Hz unter Zugabe von Anandamid 10^{-7} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n >9; * = p<0,05 (Kontrolle vs. 10^{-x} M);

EFS Anandamid	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100% ± 2,2	100% ± 2,3	100% ± 2,1	100% ± 2,2
10^{-7} M	100,9 % ± 4,7	101,7 % ± 3,6	107,4 % ± 4,7	98,7 % ± 4,2
10^{-6} M	102,3% ± 3,7	100,9 % ± 4,9	105,7 % ± 3,5	99,8 % ± 6,2
10^{-5} M	84,1 % ± 3,9*	87,9 % ± 2,0*	85.9 % ± 3,2*	87,7 % ± 2,0*

3.1.2. WIN 55,212-2

Im gleichen Versuchssetup wie bei dem endogenen Agonisten Anandamid wurden die Versuche mit dem synthetischen Agonisten WIN 55,212-2 durchgeführt. Wie bereits erwähnt, handelt es sich dabei um einen nicht selektiven CBR-Agonisten, der eine deutlich höhere Affinität zum CB1-Rezeptor aufweist als Anandamid. Die zu erwartende signifikante Reduktion des Kontraktionsniveaus bei Versuchen mit der WT-Maus wurde ab einer Konzentration von 10^{-6} M (8 Hz: 90.00% ± 3.74) nachgewiesen. Dieser Effekt konnte durch die Konzentration 10^{-5} (8 Hz: 85,6 % ± 2,9) gesteigert werden. Auch Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Maus wurden durch WIN 55,212-2 10^{-5} M (8 Hz: 89.2 % ± 3.48) signifikant reduziert.

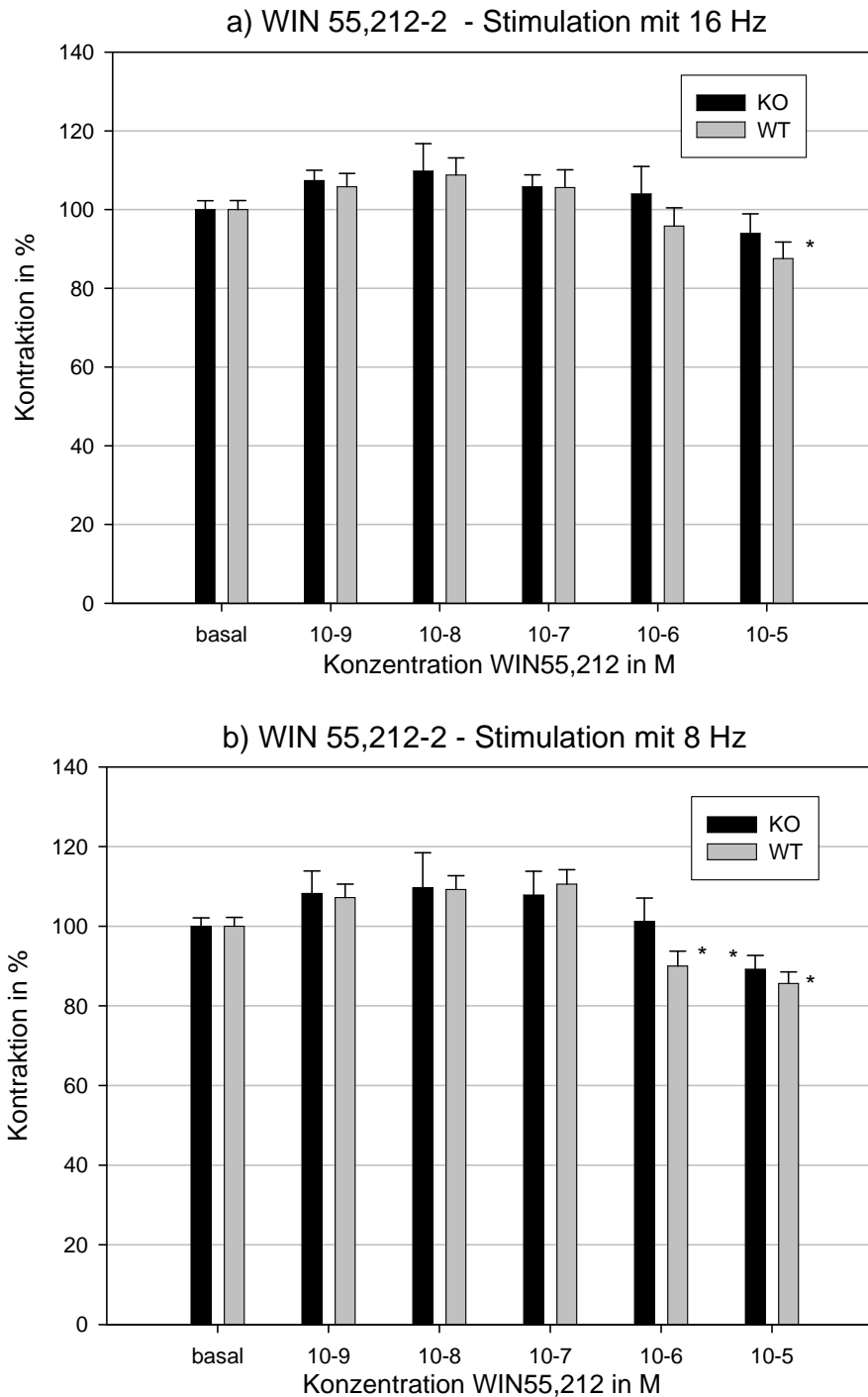


Abb. 5: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten WIN 55,212-2 in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus, n=6, * = p<0,05 (Kontrolle vs. 10^{-x}M); ** = p<0,05 (KO vs. WT);

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Tab. 3: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von WIN 55,212-2 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. $10^{-x}M$);

EFS WIN 55,212-2	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100% ± 2,2	100% ± 2,3	100% ± 2,1	100% ± 2,2
$10^{-9} M$	107,4% ± 2,6	105,8% ± 3,4	108,2% ± 5,6	107,2% ± 3,4
$10^{-8} M$	109,8% ± 6,9	108,8% ± 4,3	109,6% ± 8,8	109,2% ± 3,5
$10^{-7} M$	105,8% ± 3,0	105,6% ± 4,5	107,8% ± 5,9	110,6% ± 3,6
$10^{-6} M$	104,0% ± 6,9	95,8% ± 4,6	101,2% ± 5,8	90,0 % ± 3,7
$10^{-5} M$	94,0% ± 4,9	87,6% ± 4,2*	89,2% ± 3,5*	85,6% ± 2,9*

3.1.3. ACEA

Als letzter CBR-Agonist wurde der Einfluß von ACEA, einem synthetischem Agonisten, der eine sehr große Affinität zu dem CB1-Rezeptor aufweist bei zu vernachlässigender Affinität zum CB2-Rezeptor und somit als CB1-selektiv angesehen werden kann, untersucht.

Die Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der WT-Mäuse wurden ab einer Konzentration von ACEA $10^{-6} M$ signifikant gehemmt (16 Hz: 86,0 % ± 5,4; 8 Hz: 87,6 % ± 7,5). Durch Zugabe von ACEA 10^{-5} konnte das Kontraktionsniveau im Vergleich zu 10^{-6} nur noch unwesentlich vermindert werden (16 Hz: 84,7% ± 5,7; 8 Hz: 86,7 % ± 3,9)

Die Zugabe von ACEA $10^{-5} M$ zu den Organstreifen der KO-Maus führte zu keiner Reduktion der Kontraktion. So zeigte sich im Vergleich KO-Maus zu WT-Maus eine signifikante Hemmung der maximalen Kontraktionen der WT-Maus, die vermutlich über den CB1-Rezeptor gekoppelt sind.

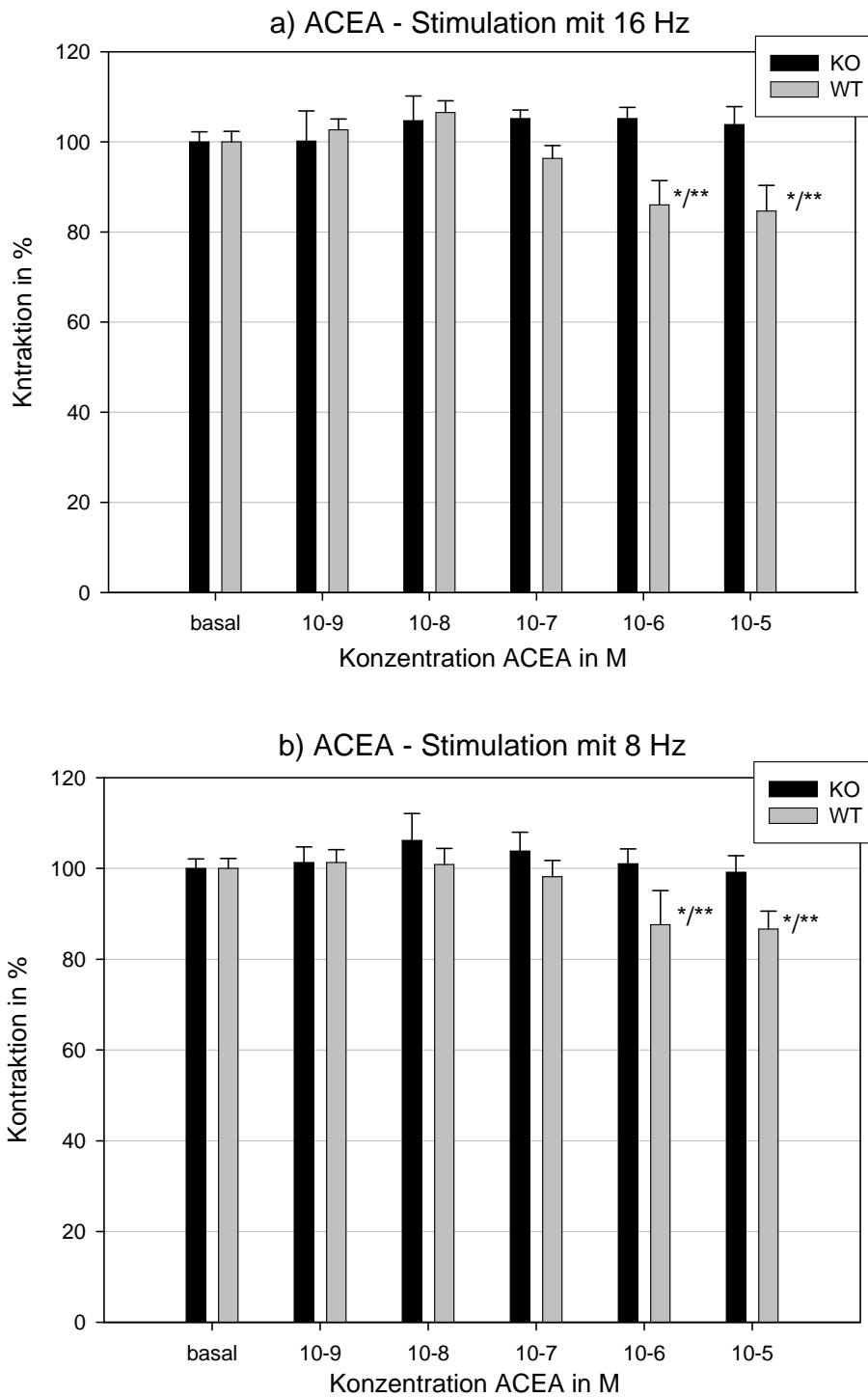


Abb. 6: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (8 Hz). n≥5, * = p<0,05 (Kontrolle vs. 10^{-x}M); ** = p<0,05 (KO vs. WT);

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Tab. 4: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von ACEA 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. 10^{-x} M); ** = $p < 0,05$ (horizontal: KO vs. WT);

EFS ACEA	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100% ± 2,2	100% ± 2,3	100% ± 2,1	100% ± 2,2
10^{-9} M	100,2% ± 6,7	102,7% ± 2,4	101,3% ± 3,4	101,3% ± 2,8
10^{-8} M	104,7% ± 5,5	106,5% ± 2,6	106,2% ± 5,9	100,8% ± 3,6
10^{-7} M	105,2% ± 1,9	96,3 % ± 2,9	103,8% ± 4,1	98,2% ± 3,6
10^{-6} M	105,2% ± 2,5	86,0% ± 5,4 ^{***}	101,0% ± 3,3	87,6 % ± 7,5 ^{***}
10^{-5} M	103,8% ± 3,9	84,7% ± 5,7 ^{***}	99,2% ± 3,6	86,7 % ± 3,9 ^{***}

3.1.4. Vergleich der Cannabinoidagonisten

Der Vergleich des Einflusses der CBR-Agonisten auf die glatte Muskulatur des Ileums der KO-Maus zeigt, dass Anandamid und WIN 55,212-2 in der Konzentration 10^{-5} M zu einer Reduktion der Kontraktion führten. Da diese Hemmung nicht über den CB1-Rezeptor gekoppelt sein kann, müssen hier andere Rezeptoren involviert sein. ACEA konnte als selektiver CB₁R-Agonist in Abwesenheit des CB1-Rezeptors bei der KO-Maus keine hemmende Wirkung auf die maximale, elektrisch induzierte Kontraktion entfalten. Bei der WT-Maus hingegen konnte bei ACEA in der Konzentration 10^{-6} M und 10^{-5} M eine signifikante Hemmung erreicht werden. Bei Anandamid und WIN55,212-2 beobachteten wir eine etwa gleiche Wirkung auf die WT- und die KO-Maus, so dass dem CB₁-Rezeptor eine nur begrenzte Wirkung zugeschrieben werden kann.

Vergleicht man die Wirkung der genannten Agonisten in der Konzentration 10^{-5} M auf die glatte Muskulatur der WT-Maus, so ist die Potenz der untersuchten Substanzen in etwa gleich.

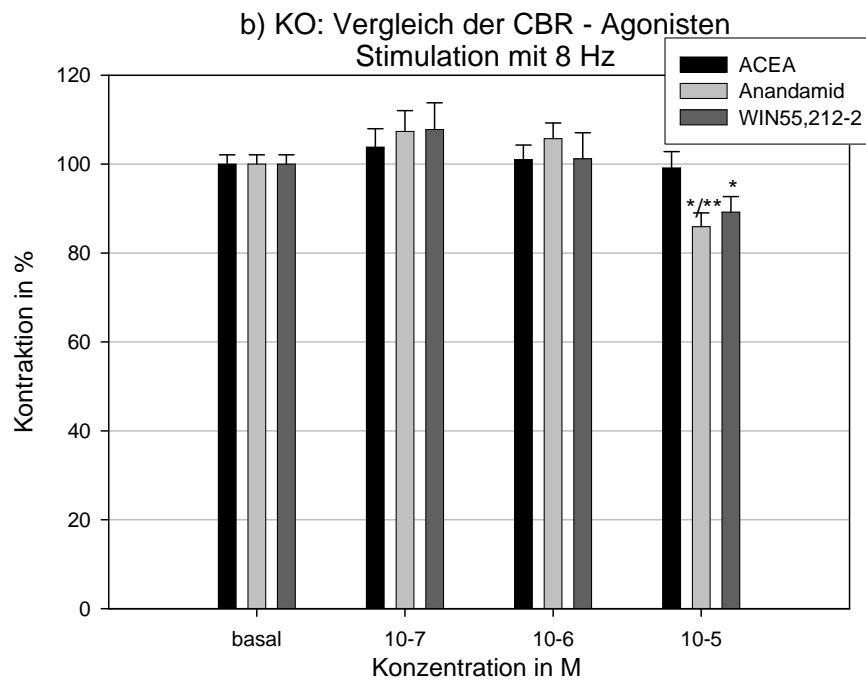
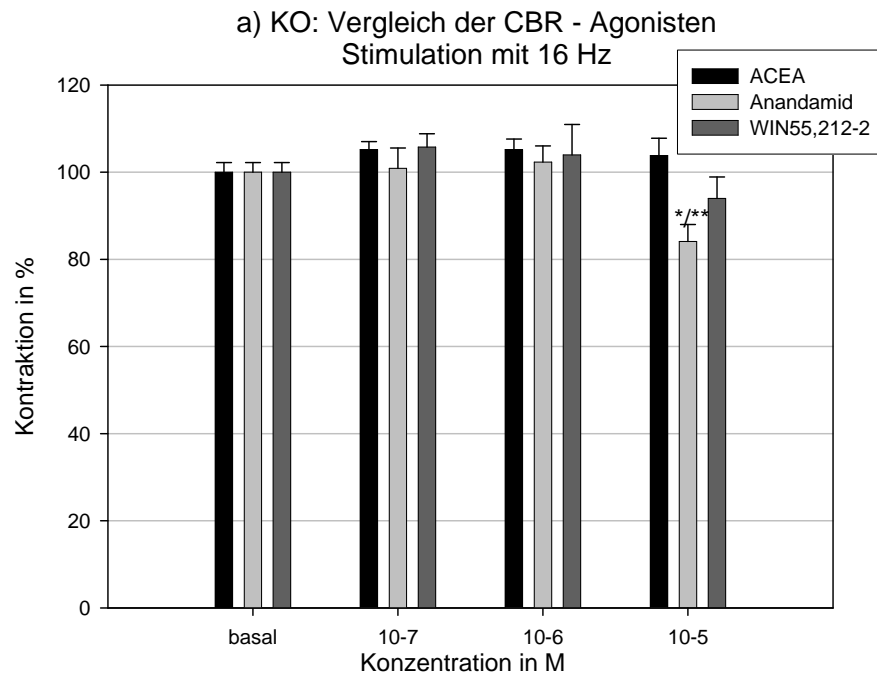


Abb. 7: Vergleich des Einflusses der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Maus. * = $p < 0,05$: Vergleich 10^{-6} M vs. Kontrolle; ** = $p < 0,05$: Vergleich Anandamid vs. ACEA;

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz

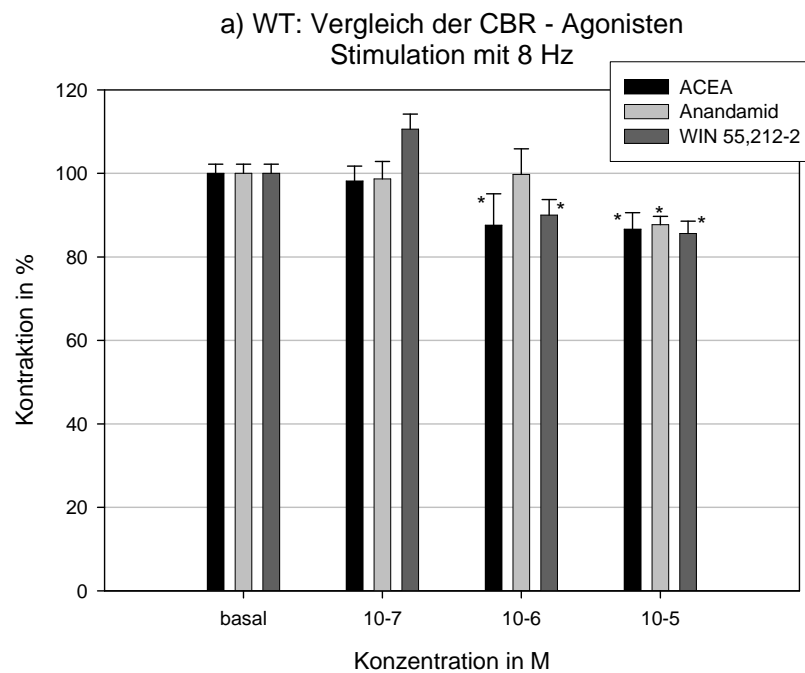
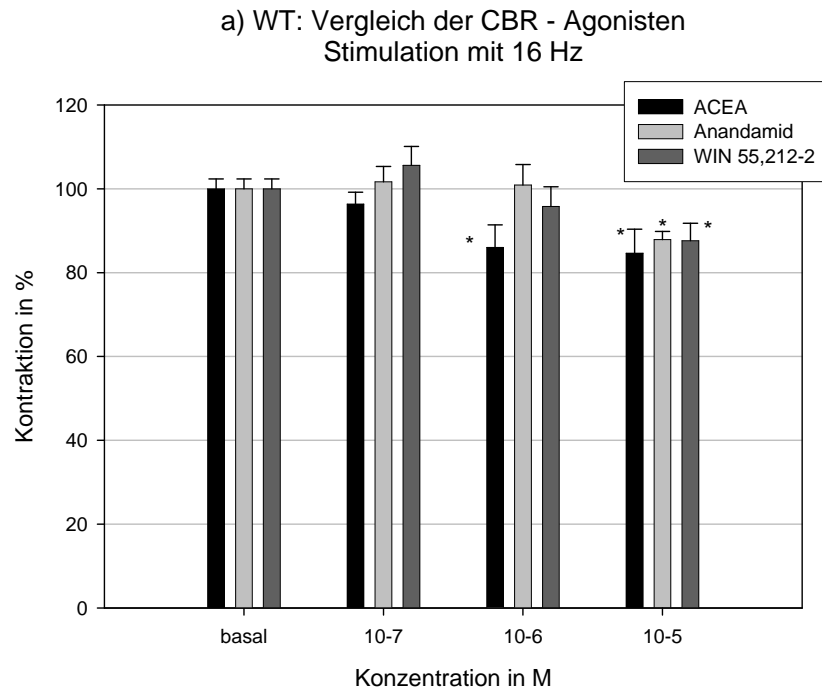


Abb. 8: Vergleich des Einflusses der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Maus; * = $p < 0,05$: Kontrolle vs. 10^{-x} M;

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz

Tab. 5: Vergleich der hemmenden Wirkung der CBR-Agonisten in der Konzentration 10⁻⁵ M; * = p<0,05: Vergleich Anandamid vs. WIN 55,212-2; ** = p<0,05: Vergleich Anandamid vs. ACEA; * = p<0,05 Vergleich WIN 55,212-2 vs. ACEA; n = 5-10;**

EFS Agonist	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
ACEA 10 ⁻⁵ M	103,8% ± 3,9	84,7 % ± 5,7	99,0 % ± 3,6	86,7% ± 3,9
Anandamid10 ⁻⁵ M	84,1 % ± 3,9**	87,9 % ± 1,9	85,9 % ± 3,2**	85,6 % ± 2,9
WIN 55,212-2 10 ⁻⁵ M	94,0 % ± 4,9	87,6 % ± 4,2	89,2 % ± 3,5	87,7 % ± 2,0

3.2. Einfluss des CB₁R-Antagonisten SR 141716A auf elektrisch induzierte Kontraktionen

Der selektive CB₁R-Antagonist SR141716A führte sowohl bei KO- als auch bei WT-Maus zu einer Steigerung der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation. Exemplarisch werden die Daten bei elektrischer Stimulation mit 16 Hz aufgeführt. Dabei war zu beobachten, dass der stimulierende Effekt bei der WT-Maus noch mehr zu Tage trat als bei der KO-Maus. Bei der maximalen Konzentration von 10⁻⁶ M, unter der noch eine Steigerung des Kontraktionsniveaus nachgewiesen werden konnte, war der stimulierende Effekt sowohl bei EFS mit 16 Hz (126,0 % ± 4,6) als auch mit 8 Hz (110,5 % ± 3,0) bei der WT-Maus signifikant im Vergleich zur Kontrolle (p<0,05). Bei der KO-Maus war ebenfalls eine Zunahme des Kontraktionsniveaus zu beobachten (16 Hz: 111,6 % ± 6,8; 8 Hz: 108,1 % ± 7,1), allerdings erreichte diese keine statistische Relevanz.

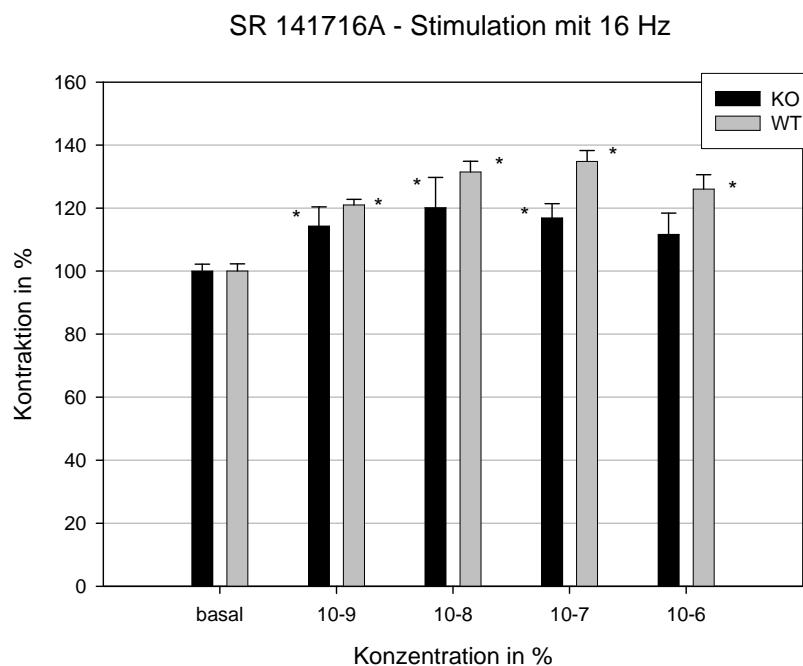


Abb. 9: Darstellung des Einflusses des CB1R-Antagonisten SR141716A in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = $p < 0,05$, $n = 10$.

Tab. 6: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von SR 141716A 10^{-9} bis 10^{-6} in Relation zum Ausgangswert; $n=9$; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (horizontal: KO vs. WT);

EFS \ SR 141716A	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100 % ± 2,2	100 % ± 2,3	100 % ± 2,1	100 % ± 2,2
10^{-9} M	114,3 % ± 6,0*	121,0 % ± 1,8*	113,5 % ± 5,0*	111,5 % ± 4,7*
10^{-8} M	120,2 % ± 9,6*	131,5 % ± 3,4*	107,6 % ± 6,5	121,3 % ± 4,1*
10^{-7} M	116,9 % ± 4,5*	134,8 % ± 3,4*	112,0 % ± 4,0*	115,4 % ± 3,8*
10^{-6} M	111,6 % ± 6,8	126,0 % ± 4,6*	108,1 % ± 7,1	110,5 % ± 3,0*

3.3. Einfluss des Vanilloidrezeptoragonisten Capsaicin und des Vanilloidrezeptorantagonisten Capsazepin auf elektrisch induzierte Kontraktionen

Interaktionen des „Endocannabinoid-“ und des „Endovanilloidsystems“ sind an anderen Modellen vorbeschrieben (Maccarrone, 2000). Daher wurde der Einfluß des TRPV1 (Vanilloid)-Rezeptor-Agonisten Capsaicin und des TRPV1-Rezeptor-Antagonisten Capsazepin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur untersucht.

Dabei zeigte sich, das Capsazepin bis zur Konzentration 10^{-6} M keinen signifikanten Einfluß auf die elektrisch induzierten Kontraktionen der KO- und WT-Maus hatte. Der hemmende Effekt, der durch Zugabe von Capsazepin in der Konzentration 10^{-5} beobachtet werden konnte, muß als unspezifisch angesehen werden.

Durch die Applikation des Vanilloidrezeptoragonisten Capsaicin in den Konzentrationen 10^{-7} M, 10^{-6} M und 10^{-5} M in das Organbad konnte eine signifikante Steigerung der Kontraktionen bei der WT-Maus beobachtet werden. Auch die Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Mäuse wurden in den Konzentrationen Capsaicin 10^{-7} M und 10^{-6} M signifikant gesteigert. Der Vergleich WT-Maus und KO-Maus in der Konzentration 10^{-5} M zeigt signifikant gesteigerte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus (siehe Tabelle 7).

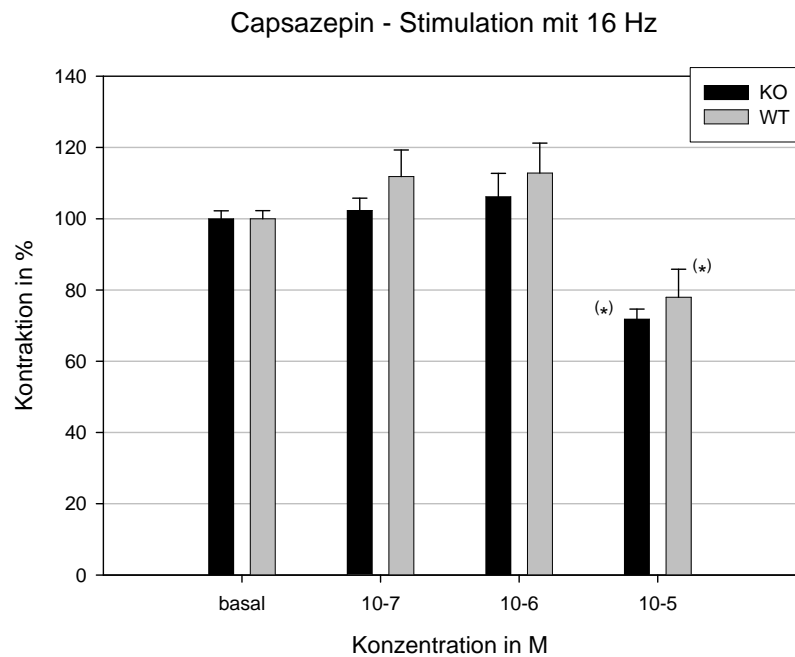


Abb. 10: Darstellung des Einflusses des TPRV₁-Antagonisten Capsazepin in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), n = 6. (*) = p<0,05 .

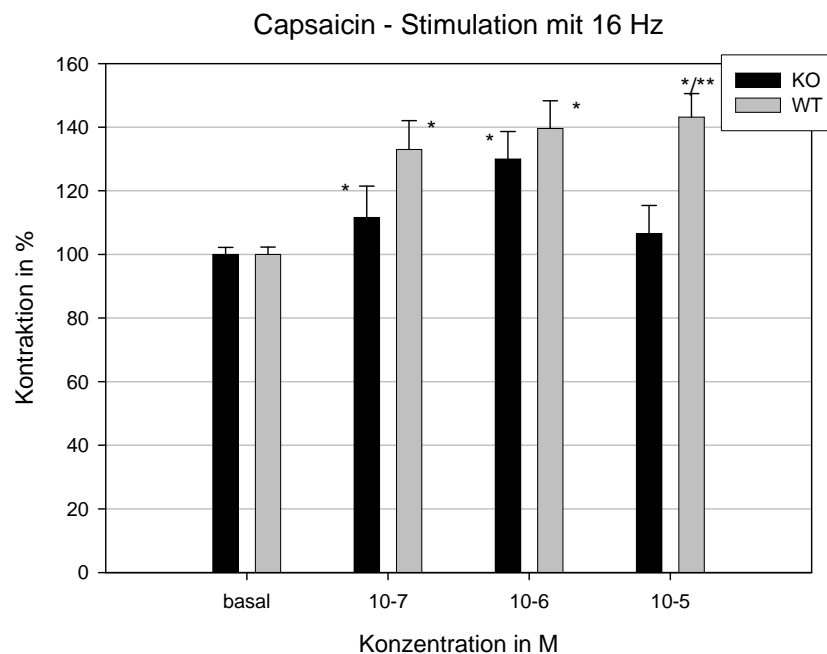


Abb. 11: Darstellung des Einflusses des TPRV₁-Agonisten in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = p<0,05 (in Bezug auf Basalwert), ** = p<0,05 (KO vs. WT), n = 6.

Ergebnisse

Tab. 7: Steigerung der Kontraktion unter Zugabe des TPRV1-Agonisten Capsaicin 10^{-5} M in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (Kontrolle vs. 10^{-x} M); ** = $p < 0,05$ (KO vs. WT)

EFS Capsaicin	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100 % ± 2,2	100 % ± 2,3	100 % ± 2,1	100 % ± 2,2
10^{-7} M	111,6 % ± 9,9	133,0 % ± 9,0*	118,0 % ± 9,6*	132,6 % ± 7,7*
10^{-6} M	130,0 % ± 8,6*	139,6 % ± 8,7*	125,4 % ± 8,4*	142,2 % ± 6,4*
10^{-5} M	106,6 % ± 8,8	143,2 % ± 7,4*/**	109,2 % ± 6,4*	130,7 % ± 5,4*/**

3.4. Einfluss von CBR-Agonisten Anandamid, ACEA und WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR141716A

In dieser Versuchsreihe wurde das Setup derart abgeändert, dass der Einfluß der Agonisten in ansteigender Konzentration in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR141716A in der Konzentration 10^{-6} M untersucht werden konnte. Die Konzentration des Antagonisten wurde entsprechend Abb. 9 gewählt, da hier noch keine unspezifische Rezeptorbindung stattfindet.

3.4.1. Anandamid

Wie zuvor dargestellt, zeigte sich sowohl bei der KO-Maus als auch bei der WT-Maus nach Zugabe von Anandamid 10^{-5} M eine signifikante Reduktion der Kontraktion der glatten Muskulatur. Dieser Effekt konnte weder bei der KO-Maus noch bei der WT-Maus durch den selektiven CB1R-Antagonisten SR141716A antagonisiert werden.

Vielmehr führte bei der WT-Maus die Zugabe von Anandamid 10^{-5} M in Gegenwart von SR141716A 10^{-6} M zu einer signifikanten Reduktion der elektrisch induzierten Kontraktion der glatten Muskulatur der WT-Maus ($71.5\% \pm 3.50$).

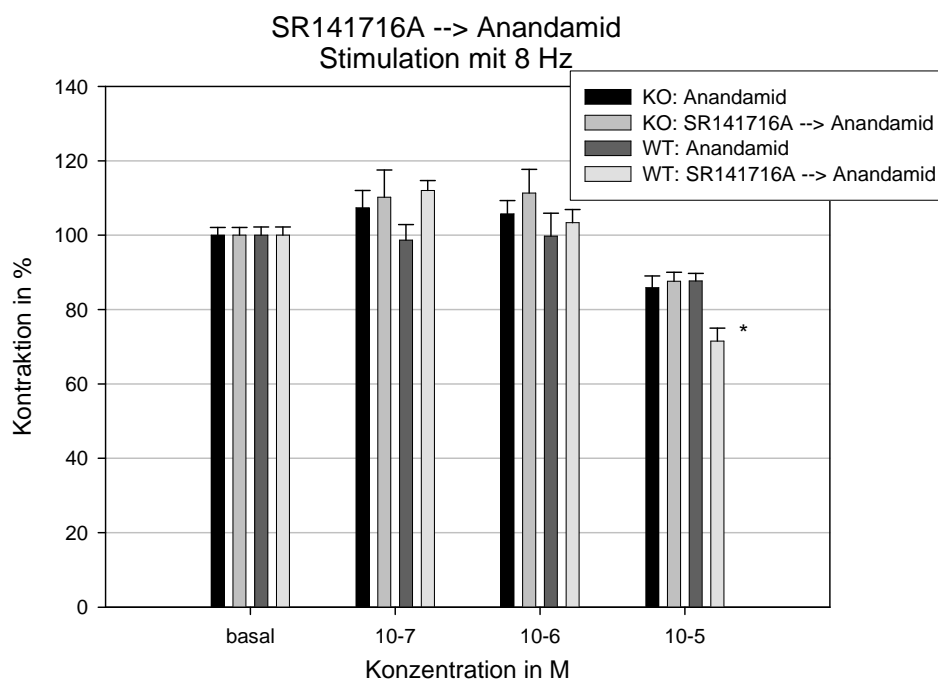


Abb. 12: Darstellung des Einflusses von Anandamid in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz) in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M, * = $p < 0,05$ (Anandamid vs. SR141716A \rightarrow Anandamid), $n=10$.

Tab. 8: Vergleich der Wirkung von Anandamid 10^{-5} M bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (exemplarisch 8 Hz), * = $p < 0,05$ (Anandamid vs. SR141716 \rightarrow Anadamid), $n=10$.

Stimulation mit 8 Hz \ Anandamid	Anandamid		
	10^{-5} M	SR141716A 10^{-6} M $\rightarrow 10^{-5}$ M	
KO	85.9 % \pm 3.14	87.63 % \pm 2.38	n = 5
WT	87.7 % \pm 2.02	71.5 % \pm 3.50 *	n = 6

3.4.2. WIN 55,212-2

Nachdem sich WIN 55,212-2 als potentester Agonist gezeigt hatte, sollte als nächstes untersucht werden, ob die hemmende Wirkung auf die glatte Muskulatur des Ileums der WT-Maus durch den selektiven CB1R-Antagonisten SR141716A antagonisiert werden kann. SR141716A wurde dabei stets in der Konzentration 10^{-6} M ins Organbad gegeben. Hier war zu beobachten, dass der hemmende Effekt des Agonisten ($90.0\% \pm 3.74$) in der Konzentration 10^{-6} M etwas vermindert werden konnte ($98.0\% \pm 7,02$), allerdings nicht signifikant. Mit steigender Konzentration von WIN 55,212-2 (10^{-5} M: $85.6\% \pm 2.94$) zeigte sich keine modifizierende Wirkung des Antagonisten ($87,83\% \pm 5,27$).

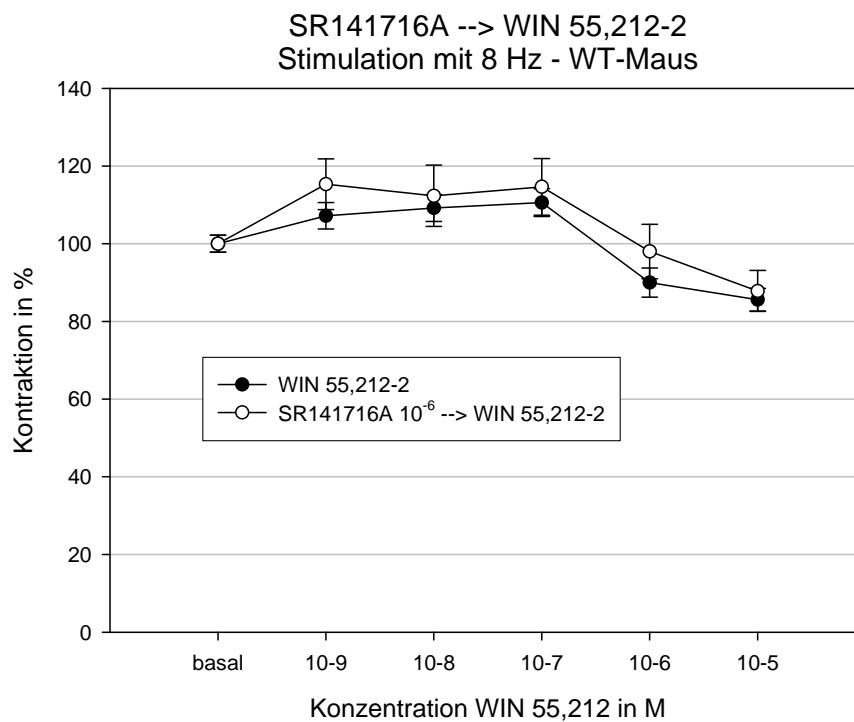


Abb. 13: Darstellung des Einflusses von WIN 55,212-2 in ansteigender Konzentration auf elektrisch (8 Hz) induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus alleine und in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M, n=8.

Tab. 9: Vergleich der Wirkung von WIN 55,212-2 bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus, n=8.

EFS WIN 55,212-2	8 Hz	
	Ohne SR141716A	Mit SR141716A 10^{-6}
basal	100% ± 2,2	100 % ± 2,2
10^{-9} M	107,2% ± 3,4	115,3 % ± 6,5
10^{-8} M	109,2% ± 3,5	112,3 % ± 7,9
10^{-7} M	110,6% ± 3,6	114,6 % ± 7,3
10^{-6} M	90,0 % ± 3,7	98,0 % ± 7,0
10^{-5} M	85,6% ± 2,9	87,8 % ± 5,3

3.4.3. ACEA

Wie in Kapitel 3.1.3. dargestellt, konnte der selektive CB₁R-Agonist ACEA bei der KO-Maus aufgrund des Fehlens des CB₁-Rezeptors keine hemmende Wirkung entfalten.

Folglich war zu erwarten, dass eine Blockade des CB₁-Rezeptors mit SR141716A ebenfalls dazu führt, dass ACEA die durch EFS induzierten Kontraktionen nicht zu hemmen vermag. In Abbildung 14 wird die Wirkung von ACEA alleine und in Gegenwart von SR141716A dargestellt. Es zeigt sich, dass durch die Zugabe von SR141716A 10⁻⁶ M eine signifikante Steigerung der Kontraktionen hervorgerufen wird. Der hemmende Effekt von ACEA 10⁻⁶ und 10⁻⁵ kann durch Zugabe von SR141716A signifikant antagonisiert werden.

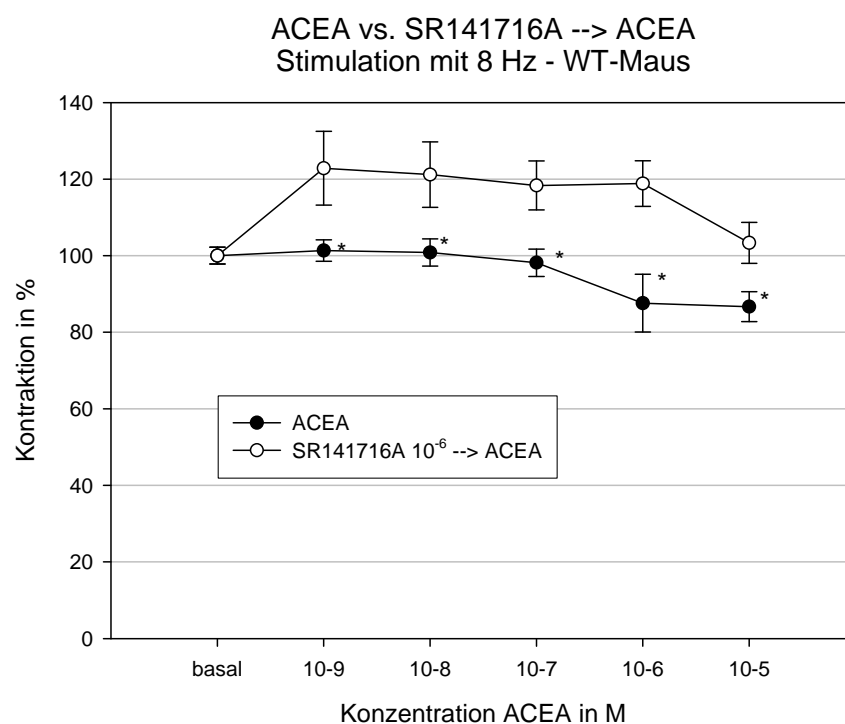


Abb. 14: Darstellung des Einflusses von ACEA in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus (8 Hz) nach alleiniger Zugabe zum Organbad und in Gegenwart des CB₁R-Antagonisten SR141716A 10⁻⁶M; * = p<0,05 ACEA vs. SR141716A → ACEA, n=6.

Tab. 10: Vergleich der Wirkung von ACEA bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus, n=6.

EFS \ ACEA	16 Hz		8 Hz	
	Ohne SR141716A	Mit SR141716A	Ohne SR141716A	Mit SR141716A
basal	100% ± 0,0	100% ± 0,0	100% ± 0,0	100% ± 0,0
10^{-9} M	102,7% ± 2,4	119,0 % ± 4,7	101,3% ± 2,8	122,8 % ± 9,6
10^{-8} M	106,5% ± 2,6	125,7 % ± 7,1	100,8% ± 3,6	121,2 % ± 8,5
10^{-7} M	96,3 % ± 2,9	123,2 % ± 7,5	98,2 % ± 3,6	118,3 % ± 6,4
10^{-6} M	86,0% ± 5,4	118,8 % ± 6,0	87,6 % ± 7,5 ^{*/**}	118,3 % ± 6,0
10^{-5} M	84,7% ± 5,7	106,3 % ± 7,7	86,7 % ± 3,9 ^{*/**}	103,3 % ± 5,4

3.5. Einfluß von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen des Ileums der WT- und KO-Maus

Apamin ist ein aus Bienengift isoliertes Toxin, das als Inhibitor der sogenannten "small conductance" Ca^{++} abhängigen Kaliumkanäle wirkt. Diese K^{+} -Kanäle werden in Gegenwart von ATP oder verwandten Purinen geöffnet. Es wurde sowohl für die KO-Maus als auch für die WT-Maus untersucht, wie elektrisch induzierte Kontraktionen durch die Zugabe von Apamin in ansteigender Konzentration von 10^{-9} M bis 10^{-5} M modifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass schon bei Zugabe von Apamin 10^{-9} M eine signifikante

Steigerung der Kontraktion der WT-Maus im Vergleich zur KO-Maus erreicht werden konnte. Dieser Effekt konnte bis zur Konzentration Apamin 10^{-6} M beobachtet werden.

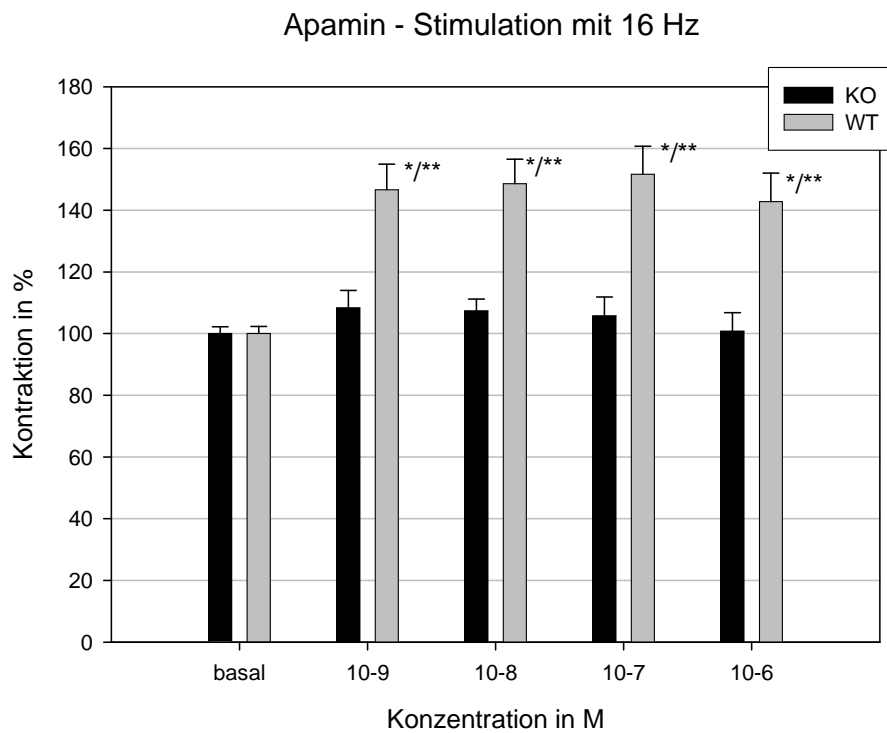


Abb. 15: Darstellung des Einflusses von Apamin in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = Kontrolle vs. Apamin, ** = $p < 0,05$ KO vs. WT, $n=6$;

Tab. 11: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von Apamin 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$: KO vs. WT;

EFS Apamin	16 Hz		8 Hz	
	KO	WT	KO	WT
basal	100% ± 0,0	100% ± 0,0	100% ± 0,0	100% ± 0,0
10^{-9} M	108,4 % ± 5,6	146,6 % ± 8,3*	109,5 % ± 7,8	140,2 % ± 9,0*
10^{-8} M	107,4 % ± 3,8	148,6 % ± 8,0*	113,2 % ± 9,8	160,8 % ± 8,1*
10^{-7} M	105,8 % ± 6,1	151,7 % ± 9,0*	107,4 % ± 8,7	142,4 % ± 9,1*
10^{-6} M	100,8 % ± 6,0	142,8 % ± 8,4*	98,2 % ± 5,1	142,4 % ± 11,9*

3.6. Einfluß von Apamin 10^{-6} M auf die Wirkung des CB1R-Antagonisten SR141716A

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Apamin eine signifikant stimulierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der WT-Maus hat bei nur geringer Wirkung auf KO-Maus, sollte als nächstes zunächst untersucht werden, ob die Wirkung des CB1R-Antagonisten SR141716A durch Apamin beeinflusst werden kann. Dabei zeigt sich, dass es im Vergleich mit Abbildung 9 zu keiner weiteren signifikanten Steigerung der Kontraktionen kommt. Bei einer Blockade der small conductance- K^+ -Kanäle durch Apamin vermag SR141716A keine weitere steigernde Wirkung auf die Kontraktion.

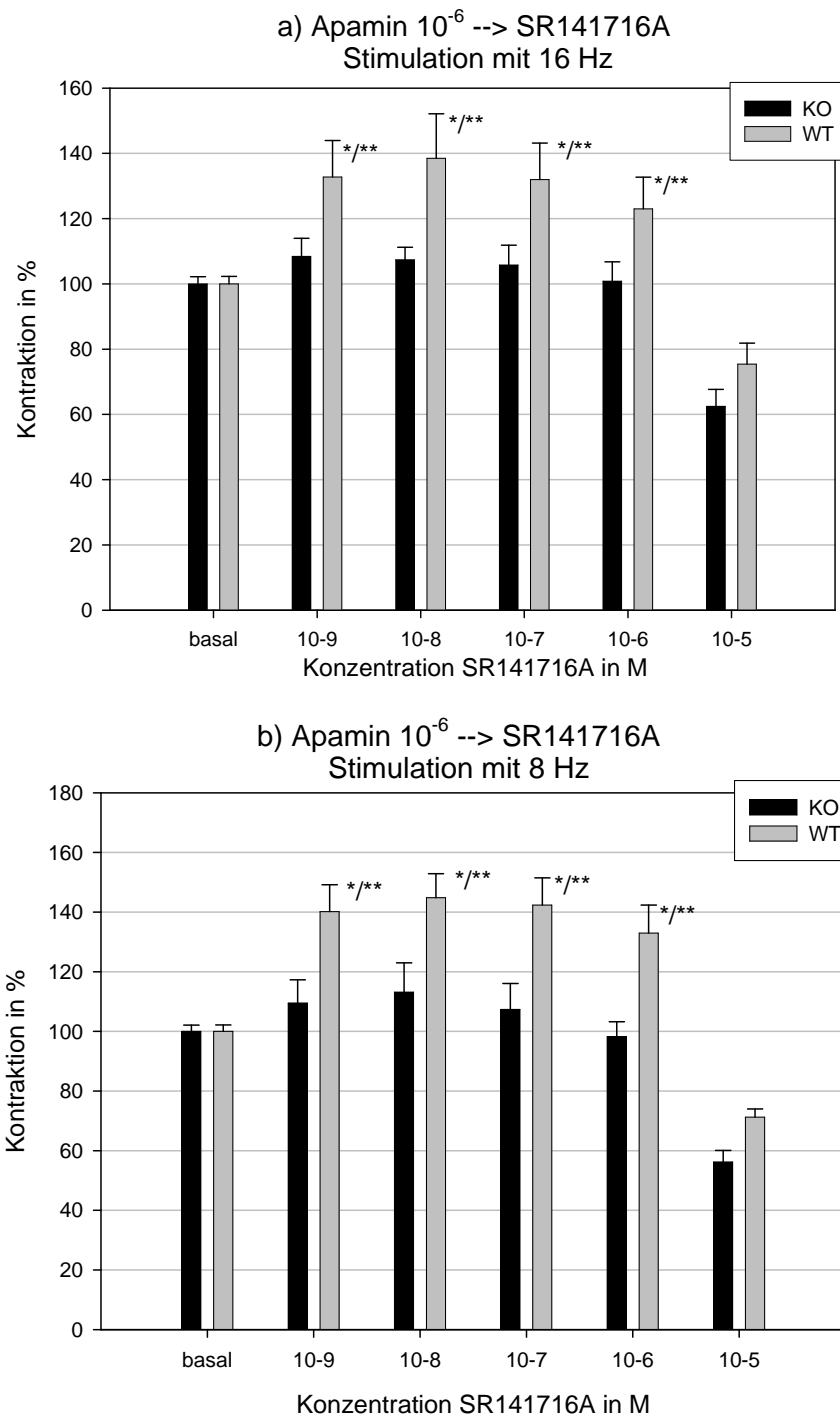


Abb. 16: Darstellung des Einflusses von SR141716A in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz) in Gegenwart des Inhibitors der "small conductance" Ca^{2+} abhängigen Kaliumkanäle Apamin 10^{-7} M; * = $p < 0,05$ basal vs. 10^x , ** = $p < 0,05$ KO vs. WT. a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz, b) 8 Hz, n=6.

3.7. Einfluß von Apamin 10^{-6} M auf die Wirkung des CBR-Agonisten WIN 55,212-2

Bei diesem Versuchssetup wurde die Wirkung des CBR-Agonisten WIN 55,212-2 (10^{-6} M – 10^{-4} M) auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus in Gegenwart des K^+ -Inhibitors Apamin untersucht. Es zeigt sich dabei, dass die Hemmung, die durch alleinige Zugabe von WIN 55,212-2 10^{-5} M (KO: 89.2 % \pm 3.48; WT: 85.6 % \pm 2.94) erreicht wird, durch Apamin 10^{-7} M bei der WT-Maus (102,7 % \pm 4,3) und bei der KO-Maus ganz aufgehoben werden kann. Bei der KO-Maus kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Steigerung der durch elektrische Stimulation induzierten Kontraktionen (KO: 123.2 % \pm 7.68).

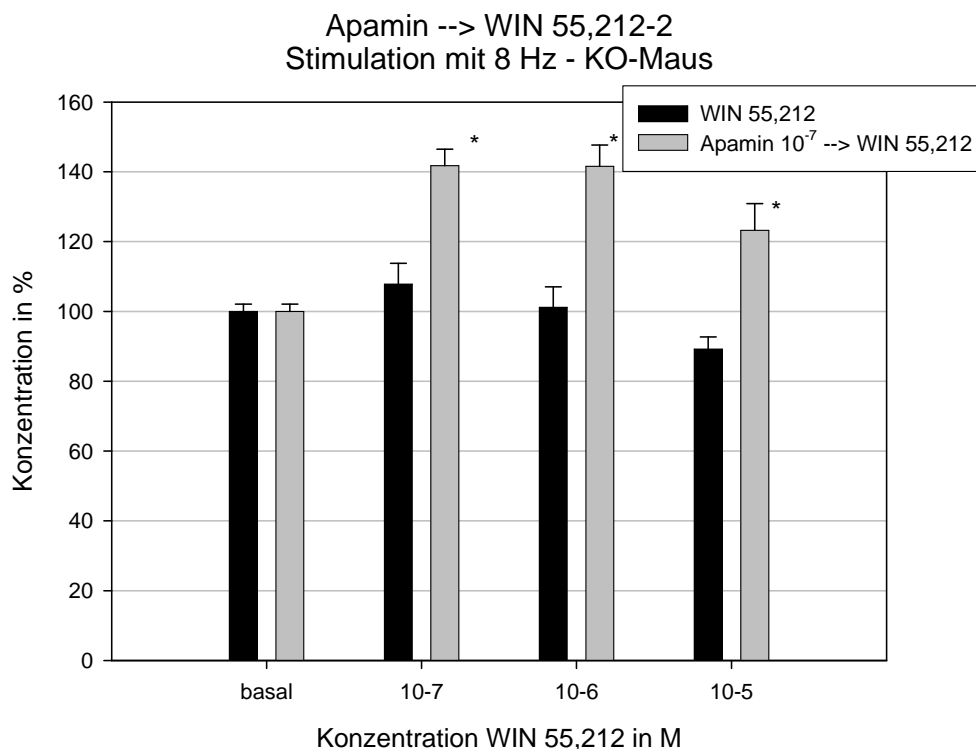


Abb. 17: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212-2 alleine und in Gegenwart von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der KO-Maus, * = $p < 0,05$ WIN 55,212 vs. Apamin \rightarrow WIN 55,212-2, n=6.

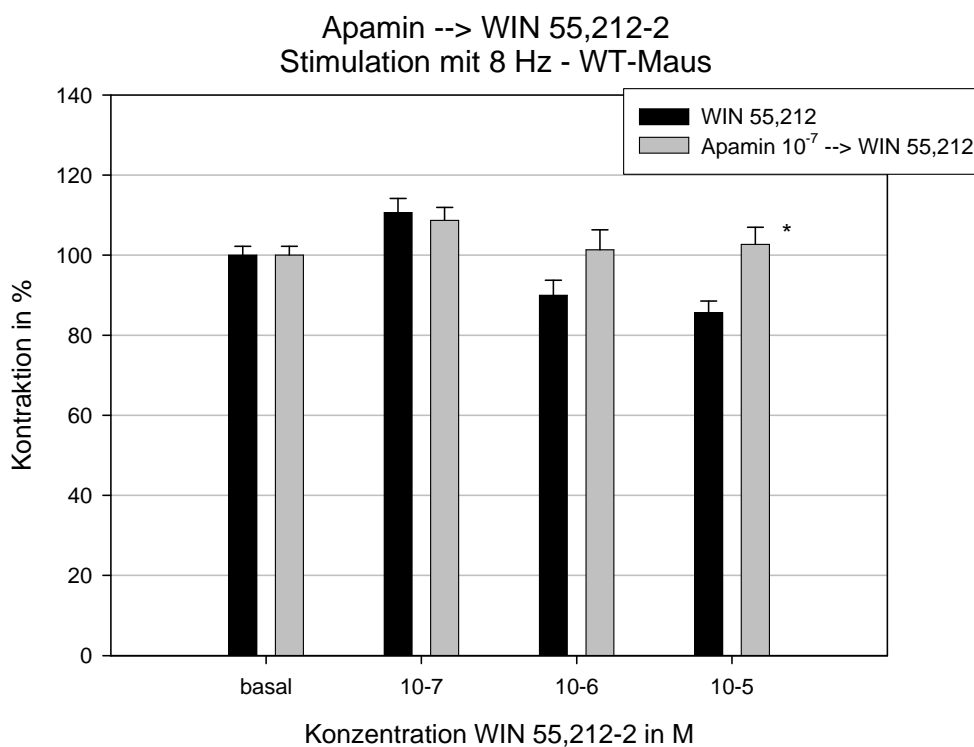


Abb. 18: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212-2 alleine und in Gegenwart von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der WT-Maus, * = $p < 0,05$ WIN 55,212-2 vs. Apamin \rightarrow WIN 55,212-2, n=6.

Tab. 12: Darstellung des Einflusses von Apamin auf die Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen durch WIN 55,212-2; * = $p < 0,05$: WIN 55,212-2 vs. Apamin \rightarrow WIN 55,21-22, n=6.

EFS \ WIN 55,212-2	KO		WT	
	Ohne Apamin	Apamin 10 ⁻⁶	Ohne Apamin	Apamin 10 ⁻⁶
10 ⁻⁶ M	101,2 % \pm 5,8	141,6 % \pm 6,1*	90,0 % \pm 3,7	101,5 % \pm 5,0
10 ⁻⁵ M	89,2 % \pm 3,5	123,2 % \pm 7,7 *	85,6 % \pm 2,9	102,7 % \pm 4,3*

3.8. Einfluß von WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Bedingungen

Kontraktionen, die durch elektrische Stimulation ausgelöst werden, werden durch Freisetzung von Acetylcholin aus enterischen cholinergen Nerven induziert. Es konnte aber auch gezeigt werden (Izzo, 1998), dass in Gegenwart von Atropin (cholinergem Blocker) und Guanethidin (adrenerger Blocker) Kontraktionen durch EFS ausgelöst werden können, die über Tachykinine und deren Rezeptoren vermittelt sind.

Es zeigte sich, dass unter NANC-Bedingungen durch die Zugabe von WIN 55,212-2 10^{-5} M bei der KO-Maus eine stärkere Hemmung (nicht signifikant) erreicht wurde als unter fehlender Blockade cholinergem und adrenerger Rezeptoren.

Bei der WT-Maus war die Hemmung nach Zugabe des CBR-Agonisten geringer (nicht signifikant) als unter „Normalbedingung“.

Auch unter non-adrenergen, non-cholinergen Bedingungen führte WIN 55,212-2 bei der WT-Maus im Vergleich zur KO-Maus zu einer stärkeren, allerdings hier nicht signifikanten Reduktion (KO: 82,8 % \pm 2.94, WT: 72.8 % \pm 8.2) der maximalen Kontraktionen, die durch elektrische Feldstimulation induziert wurden (8Hz).

Tab. 13: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212-2 10^{-5} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter „normalen“ Bedingungen und unter non-adrenergen, non-cholinergen (NANC) Bedingungen. * = $p < 0,05$: KO vs. WT, n=6.

WIN 55,212-2 Stimulation mit 8 Hz	10^{-5} M	Guanethidin 10^{-6} , Atropin $10^{-6} \rightarrow 10^{-5}$ M
KO	89.2 % \pm 3.48	82.8 % \pm 2.94
WT	85.6 % \pm 2.94*	72.8 % \pm 8.2

3.9. Einfluß des endogenen CBR-Agonisten Anandamid und des CB1R-Antagonisten SR141716A auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen

Wie in der Methodik dargestellt, wurden die Kontraktionen in diesem Versuchsetup durch Zugabe von Carbachol, einem Carbaminsäure-Cholinester, hervorgerufen, das als Agonist wie Acetylcholin auf muskarinische Rezeptoren wirkt. Es handelt sich dabei um eine postjunktionale Wirkung.

3.9.1. Anandamid

Anandamid führte weder bei der KO-Maus noch bei der WT-Maus zu einer Hemmung der durch die Zugabe von Carbachol 10^{-6} M ausgelösten Kontraktionen der glatten Muskulatur. Vielmehr kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Kontraktionen vor allem der glatten Muskulatur der WT-Maus (10^{-7} M: $110.5\% \pm 4.14^*$, 10^{-6} M: $120.9\% \pm 8.1^*$), aber auch der KO-Maus (10^{-6} M: $109.7\% \pm 4.17^*$).

Tab. 14: Kontraktionsniveau nach pharmakologischer Stimulation mit CCH 10^{-6} unter Zugabe von Anandamid 10^{-7} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=8; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. 10^{-x} M);

Pharmakologische Stimulation	CCH 10^{-6}	
	KO	WT
Anandamid		
basal	100 % \pm 1,9	100 % \pm 2,2
10^{-7} M	104,7 % \pm 4,8	110,5 % \pm 4,1*
10^{-6} M	109,7 % \pm 4,2*	120,9 % \pm 8,1*
10^{-5} M	99,6 % \pm 4,5	112,4 % \pm 8,6

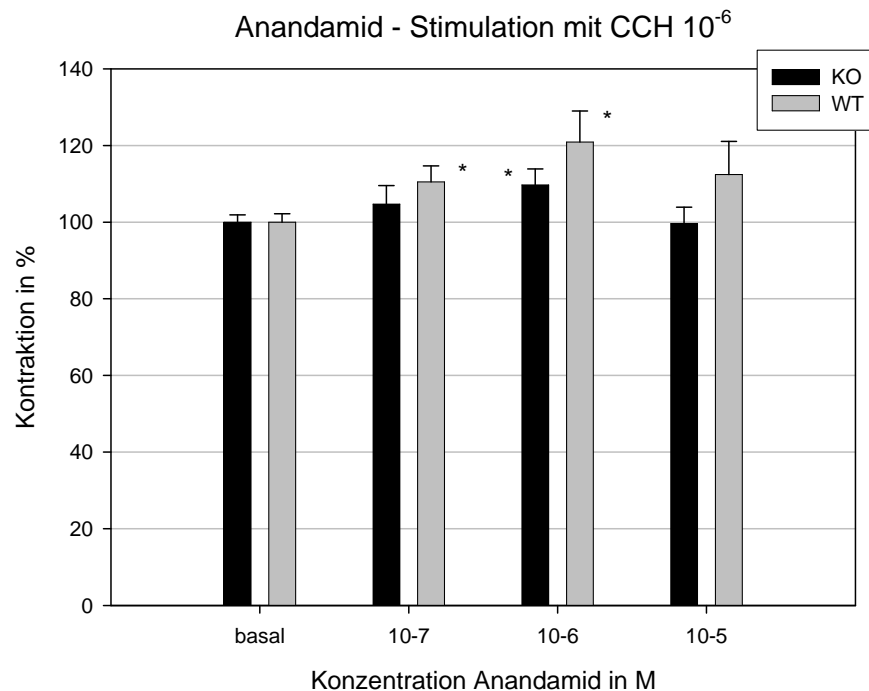


Abb. 19: Einfluß des endogenen CBR-Agonisten Anandamid auf pharmakologisch (Carbachol 10^{-6} M) induzierte Kontraktion. * = $p < 0,05$ basal vs. 10^x M, $n=8$;

3.9.2. SR141716A

Auf elektrisch induzierte Kontraktionen konnte der selektive CB1R-Antagonist SR141716A eine stimulierende Wirkung ausüben. Es sollte nun abschließend noch untersucht werden, ob dieser Effekt auch bei pharmakologisch induzierten Kontraktionen zu beobachten ist.

In der Tat konnte auch hier bei den Organstreifen der WT-Maus eine Steigerung der durch Carbachol-Zugabe ausgelösten Kontraktionen beobachtet werden (10^{-7} M: $147.4\% \pm 15.1^*$, 10^{-6} M: $136.5\% \pm 10.8^*$).

Wie zu erwarten hatte die Zugabe des Antagonisten zu den Organstreifen der Maus mit defizientem CB1-Rezeptor keine signifikante Modifizierung der Kontraktionsantwort zur Folge.

Tab. 15: Kontraktionsniveau nach pharmakologischer Stimulation mit CCH 10^{-6} unter Zugabe von SR141716A 10^{-7} und 10^{-6} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. 10^{-x} M);

Pharmakologische Stimulation	CCH 10^{-6}	
	KO	WT
SR141716A basal	100 % \pm 1,9	100 % \pm 2,2
SR141716A 10^{-7} M	97,4 % \pm 7,4	147,4 % \pm 15,1*
SR141716A 10^{-6} M	107,2 % \pm 7,2	136,9 % \pm 10,8*

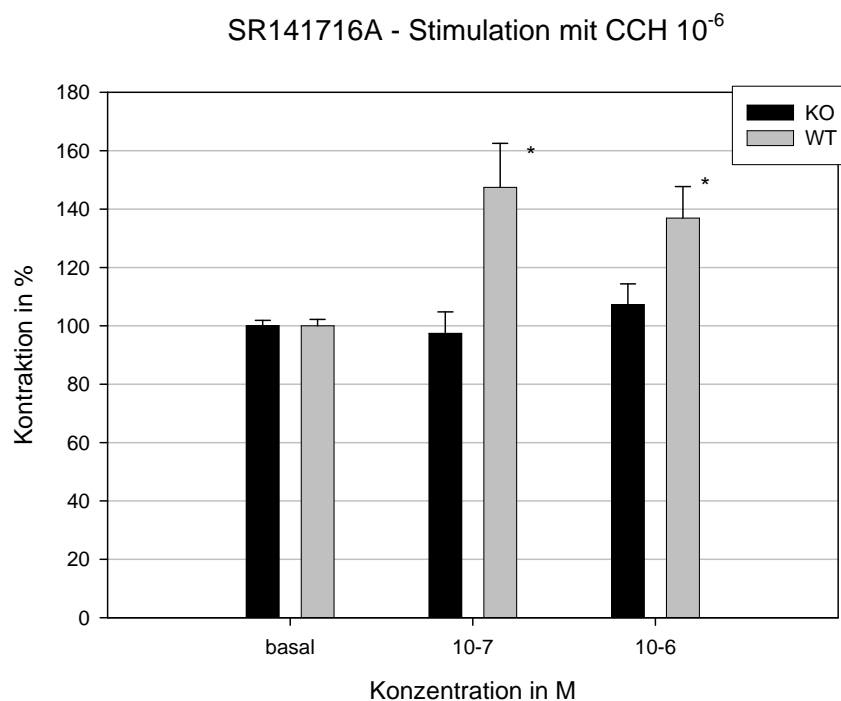


Abb. 20: Einfluß des selektiven CB1R-Antagonisten SR141716A auf pharmakologisch (Carchol 10^{-6} M) induzierte Kontraktionen. * = $p < 0,05$ basal vs. 10^{-x} M; n=6;

4. Allgemeine Diskussion

4.1. Intestinale Motilität

4.1.1. Regulation der intestinalen Motilität

Die intestinale Motilität wird im Wesentlichen lokal durch das enterische Nervensystem reguliert. Es besteht aus einem Netzwerk von Ganglien und verbindenden Nervensträngen, die vom Ösophagus bis zum inneren Analsphinkter reichen. Dabei gliedert sich das Darmnervensystem in den Plexus myentericus (Auerbach), der zwischen longitudinaler und zirkulärer Muskelschicht der Darmwand liegt, und den Plexus submucosus, der sich, wie der Name schon sagt, in der Submukosa befindet (Furness, 1978; Timmermanns, 2001).

Die intestinale Motilität bedarf einer koordinierten Aktivität der enterischen Neurone, welche aufgrund ihrer Form und Morphologie, der chemischen Übertragung, der Vernetzung und ihrer funktionellen Eigenschaften klassifiziert werden können (Wood, 1999; Furness, 1987; Gershon, 1994; Costa, 1996; Schemann, 2001). Costa et al. (1996) und Furness (2000) konnten durch Analyse des ENS im Intestinum des Meerschweinchens mehr als 15 verschiedene Neuronentypen differenzieren.

Tab. 16: Neuronentypen im enterischen Nervensystem des Meerschweinchen-Dünndarms (Furness, 2000)

Vorkommen	Typ	Lage
Plexus myentericus	• Erregende Motoneurone mit kurzen Fortsätzen	Zirkuläre Muskulatur
	• Erregende Motoneurone mit langen Fortsätzen	Zirkuläre Muskulatur
	• Hemmende Motoneurone mit kurzen Fortsätzen	Zirkuläre Muskulatur
	• Hemmende Motorneurone mit langen Fortsätzen	Zirkuläre Muskulatur
	• Erregende Motoneurone	Longitudinale Muskulatur
	• Aszendierende Interneurone (lokal motorische Reflexe)	Ganglien Plexus myentericus
	• Deszendierende Interneurone (lokal motorische Reflexe)	Ganglien Plexus myentericus
	• Deszendierende Interneurone (wandernder motorischer Komplex)	Ganglien Plexus myentericus
	• Deszendierende Interneurone (sekretorischer Reflex)	Ganglien Plexus myentericus
	• Intrinsisch primär afferente Neurone	Mukosa und Muskulatur
	• Intestinofugale Neurone	Prävertebrale sympathische Ganglien
	Plexus submukosus	• Noncholinerge sekretomotorische/vasodilatatorische Neurone
• Cholinerge sekretomotorische/vasodilatatorische Neurone		Mukosa und submuköse Arteriolen
• Cholinerge sekretomotorische Neurone		Mukosa
• Intrinsisch primär afferente Neurone		Mukosa

Die größten Gruppen unter diesen sind intrinsisch sensorische (primär afferente) Neurone, Interneurone, die innerhalb und zwischen den Plexus Verbindungen herstellen, Motorneurone, sekretomotorische und vasodilatatorische Neurone.

Interneurone und Motorneurone haben ähnliche Eigenschaften, da es sich bei diesen um uniaxonale S- (oder Typ 1-) Neurone mit einem elektrophysiologisch schnellem exzitatorischen Potenzial handelt.

Die intrinsischen sensorischen (primär afferenten) Fasern (IPAN = intrinsic afferent primary neurons) sind multiaxonale AH- (oder Typ 2-) Neurone, die elektrophysiologisch durch ein verlängertes hyperpolarisierendes Nachpotenzial charakterisiert sind (Brookes, 2002; Bornstein, 2004).

Essentiell für eine funktionierende gastrointestinale Motilität ist ein optimal abgestimmtes Zusammenspiel zwischen Regulationsmechanismen, die sowohl erregend als auch hemmend sein können.

Der peristaltische Reflex wurde bereits 1899 von Bayliss und Starling beschrieben, die durch eine lokalisierte Dehnung der Darmwand eine Kontraktion oral und eine Relaxation aboral des Stimulus beobachten konnten. Heute weiß man, dass folgende Mechanismen an der propulsiven Peristaltik beteiligt sind:

- a) ein aufsteigender exzitatorischer Leitungsweg, der IPAN, Inter- und exzitatorische Motorneurone umfasst,
- b) ein absteigender inhibitorischer Leitungsweg, der IPAN und inhibitorische Motorneuronen umfasst,
- c) ein absteigender exzitatorischer Leitungsweg mit IPAN und exzitatorischen Motorneuronen und
- d) ein Leitungsweg in die Zirkumferenz mit IPAN, exzitatorischen und inhibitorischen Motorneuronen

Die exzitatorische Übertragung innerhalb des enterischen Nervensystems kann in zwei Kategorien eingeteilt werden (Furness, 1998; Galligan, 2000): zum einen findet eine schnelle Übertragung über nicotinerge Acetylcholinrezeptoren, P2X Purinozeptoren und 5-HT₃ (Serotonin) - Rezeptoren statt, zum anderen gibt es eine langsame Übertragung sowohl über muskarinerge Acetylcholinrezeptoren als auch über Tachykinin Neurokinin (NK) 1- und Neurokinin (NK) 3-Rezeptoren.

Die exzitatorische Transmission zwischen Motorneuronen und der glatten Muskulatur wird über muskarinerge Acetylcholin- und Tachykinin NK1- und NK2-Rezeptoren vermittelt (Maggi, 1994; Holzer, 1997; Taylor, 1986). Ein geringeres Niveau eines physiologischen Stimulus bevorzugt die cholinerge Komponente der exzitatorischen Übertragung, die über die „interstitiellen Zellen von Cajal“ (ICC) vermittelt zu sein scheint (Beckett, 2002), während höhere Stimulationslevel zu einer Aktivierung der Tachykininkomponente führen (Grider, 1994). Dabei vermögen sowohl NK1- als auch NK2-Rezeptor-Antagonisten diese Wirkung zu hemmen, was auf eine Beteiligung von Substanz P und auch Neurokinin A als Neurotransmitter schließen lässt (Maggi, 1997). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass NK2-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen lokalisiert sind, während NK1-Rezeptoren sich auf ICC befinden. Diese Beobachtung suggeriert neben einem direkten Einfluß auf die glatte Muskulatur auch einen indirekten über ICC (Ward, 2004).

Bei den ICC handelt es sich um Schrittmacherzellen, die ein oszillierendes Membranpotential aufweisen, das elektrisch an die angrenzenden Muskelschichten der glatten Muskulatur übertragen wird. Durch diese als „slow waves“ bezeichneten Potenzialschwankungen erfährt die Erregbarkeit der elektrisch gekoppelten Muskelzellen phasische Variationen, wodurch die kontraktile Aktivität synchronisiert wird (Huizinga, 2000; Ward, 2001).

Hierzu ist es wichtig zu erwähnen, dass die ICC von exzitatorischen und inhibitorischen Motorneuronen innerviert werden und deshalb eine wichtige Funktion in der „Effektorkette“ des ENS zu der glatten Muskulatur darstellen – die ICC sind essentiell für ein funktionierendes intestinales Motilitätsmuster (Chang, 2001).

Der deszendierende inhibitorische Reflex hängt von der Aktivität der inhibitorischen Motorneurone ab. Diese stehen via nicotinerger Acetylcholinrezeptoren und noncholinergere Verbindungen mit IPAN in Verbindung (Costa, 1996; Furness, 2000). Da die inhibitorischen Motoneurone

tonisch aktiv sind, führt eine Hemmung bzw. ein Verlust der Aktivität zu einer tonischen Kontraktion der glatten Muskulatur (Giaroni, 1999).

Während die Zirkulärmuskulatur bei allen bisher untersuchten Spezies sowohl von erregenden als auch von hemmenden Motorneuronen innerviert wird, findet man in der Längsmuskulatur im Dünndarm kleiner Labortiere keine hemmenden Motorneurone (Brookes, 1992). Die Längsmuskulatur relaxiert bei diesen Spezies passiv als Folge einer Kontraktion der Zirkulärmuskulatur. Im Gegensatz dazu scheint die Längsmuskulatur im Kolon dieser Tiere auch durch hemmende Motorneurone des ENS reguliert zu werden und somit aktiv relaxieren zu können. (Stevens, 1999; Spencer, 1998).

Die Aktivierung von inhibitorischen Motorneuronen führt zu einer Hyperpolarisation (i.e. inhibitorisches Junctionspotenzial: IJP) und Relaxation der glatten Muskulatur. In vielen Spezies umfassen die IJPs eine schnelle und eine langsame Komponente. Die schnelle Komponente wird durch ATP (Bian, 2000) oder NO (Dalziel, 1991) vermittelt, während NO, VIP oder PACAP abhängig von der Spezies für die langsame Komponente verantwortlich sind (Kuryama, 1998). Hemmungen, die durch ATP, VIP oder PACAP induziert sind, können durch Apamin, ein Blocker Kalzium-abhängiger Kaliumkanäle, antagonisiert werden, was den Schluß zulässt, dass diese Neurotransmitter eine Muskelrelaxation über Aktivierung spezifischer Rezeptoren mit folgender Ionenkanalaktivierung induzieren (Shuttleworth, 1995).

4.1.2. Einfluß des extrinsischen autonomen Nervensystem

Die extrinsische autonome Innervation des Gastrointestinaltrakts umfasst das sympathische und parasympathische Nervensystem und hat zwei maßgebliche Funktionen (Wood, 1999; Berthoud, 2001):

1. Autonome efferente Leitungsbahnen beteiligen sich an der Regulation der digestiven Funktion durch Koordination der Reflexe in Regionen, die zu weit voneinander entfernt sind, um über das ENS überbrückt zu werden.

2. Außerdem werden Informationen vom ZNS zum Gastrointestinaltrakt gesendet, die es ermöglichen, die digestive Aktivität an den Energie- und Flüssigkeitsbedarf des Körpers anzupassen.

Parasympathische vagale Efferenzen üben trotz der Autonomie des ENS einen modulierenden Einfluß vor allem auf den Plexus myentericus des Ösophagus und Magens aus, weniger hingegen auf den Dünndarm (Berthoud, 2001). Obwohl die Transmission der efferenten Neurone über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren zu einer Exzitation der enterischen Nerven führt, ist die Antwort des Effektors von der Leitungsbahn abhängig, die stimuliert wurde und kann somit inhibitorisch oder exzitatorisch sein (Desai, 1991).

Enterische Ganglien sind auch bevorzugte Ziele von sympathischen efferenten Fasern, obwohl andere Schichten des Gastrointestinaltrakts, wie Sphinktermuskel und submuköse Arteriolen, auch direkt von noradrenergen Axonen versorgt werden. Sympathische Neurone weisen zielspezifische Unterschiede in Ihrer chemischen Kodierung auf, so erreichen noradrenerge Efferenzen, die auch Somatostatin exprimieren, submuköse Ganglien, während Neurone, die zum myenterischen Plexus ziehen, nur Noradrenalin verwenden (Holzer, 2001).

Der sympathische Einfluß auf das ENS führt zu einer Hemmung der digestiven Aktivität, die eher auf eine Störung der exzitatorischen als auf eine Aktivierung der inhibitorischen enterischen Leitungsbahnen zurückzuführen ist (Wood, 1999; Furness, 1987). Der wichtigste Effekt des sympathischen Inputs ist dabei die präsynaptische Hemmung der Transmitterfreisetzung, die für die schnellen und langsamen exzitatorischen Junctionspotenziale verantwortlich sind (De Ponti, 1996; Paton, 1969).

4.2. Cannabinoide

4.2.1. Geschichte

Als Cannabinoide werden die Inhaltsstoffe der Hanfpflanze *Cannabis sativa*, bei der es sich um ein einjähriges Gewächs handelt, bezeichnet. Seit vielen Jahrhunderten werden Hanfpräparate in der Medizin eingesetzt, so dass Hanf eines der am meisten verwendeten Heilpflanzen in den vergangenen Jahrhunderten war. Es zeigte sich sehr bald, dass neben Indikationen, wie Rheumatismus, Starrkrampf, Anästhesie, Tollwut, Cholera, u.v.a auch positive Einflüsse auf den Gastrointestinaltrakt zu beobachten waren. So benutzte bereits der griechische Arzt Galen (2. Jh. nach Chr.) Cannabispräparate zur Behandlung von gastrointestinalen Schmerzen und Flatulenz, genauso wie der Einsatz als Antiemetikum und Antinauseum bereits eine lange Tradition hat (Hornby, 2004).

Nachdem der therapeutische Nutzen von Cannabispräparaten in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts mehr und mehr an Bedeutung verlor, stellte die Isolierung des psychoaktiven Hauptwirkstoffes , Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, der Hanfpflanze die Weichen für eine genauere Untersuchung der Wirkungsweise von Marihuana.

Inzwischen konnten aus *Cannabis sativa* 66 Cannabinoide isoliert werden, wobei das bereits erwähnte Δ^9 -THC und Δ^8 -THC für die Mehrzahl der Cannabis-Effekte verantwortlich sind. Ein weiterer Bestandteil, der in größeren Mengen vorkommt, ist das nicht psychoaktive Cannabinol.

Trotz der Fortschritte in der chemischen Analyse der Cannabinoiden, blieb bis 1988 die molekulare Basis der Aktivität der Cannabinoide unklar. Die Hypothese, dass Δ^9 -THC aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft durch

Störung der Struktur der Phospholipidbestandteile von biologischen Membranen seine pharmakologische Wirkung ausübt und nicht über Rezeptorbindung (Paton, 1975; Pertwee, 1988), wurde erst verworfen, als 1988 ein spezifischer Cannabinoidrezeptor nachgewiesen (Devane, 1988) und 1990 (Matsuda, 1990) geklont werden konnte. Dieser ist heute als CB1-Rezeptor bekannt.

Aufgrund der Kenntnis eines spezifischen Cannabinoidrezeptors war es ab 1990 Ziel, nach einer endogenen Verbindung zu suchen, die an diesem Rezeptor als Mediator fungiert. Dies gelang Devane et. al. (1992), als sie eine Verbindung isolieren konnten, die an dem genannten CB1-Rezeptor bindet: Arachidonoyl ethanolamid (Anandamid).

1992 wurde ein zweiter Cannabinoidrezeptor (CB2) entdeckt, der bisher hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems gefunden wurde (Munro, 1992). Desweiteren konnte 1995 ein weiterer endogener Ligand, der sowohl an den CB1- als auch an den CB2-Rezeptor bindet, beschrieben werden, der als 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) bezeichnet wird.

In den vergangenen Jahren wurden zwei weitere verwandte Endocannabinoide isoliert, namentlich 2-Arachidonoylglycerylether (Noladinether), dessen Affinität zum CB1R sehr viel höher ist als zum CB2R (Hanus, 2001), und schließlich eine Esterverbindung aus Arachidonsäure und Ethanolamin (Virodhamin) (Porter, 2002). Virodhamin ist ein voller Agonist am CB2R, während es am CB1R in vitro als partieller Agonist und in vivo interessanterweise als Antagonist wirkt.

Heute werden die bisher bekannten Cannabinoidrezeptoren und ihre endogenen Liganden auch als „Endocannabinoidsystem“ zusammengefasst.

4.2.2. Der CB1-Rezeptor

CB1-Rezeptoren sind in besonders hoher Konzentration im zentralen Nervensystem zu finden. Unter den verschiedenen Hirnregionen weisen vor allem die Substantia nigra, der Globus pallidus, das Cerebellum, der Hippocampus und der zentrale Kortex eine hohe Dichte an CB1-Rezeptoren auf (Sugiura, 2002). Hier scheint der Rezeptor in die Regulation von Erkennung, Erinnerung, Belohnung, Nahrungsaufnahme und motorischer Aktivität involviert zu sein.

Aber auch in verschiedenen peripheren Organen wird der CB1-Rezeptor exprimiert, wie etwa Lunge, Dick- und Dünndarm, Gebärmutter, Hoden, Samenleiter, Sympathikus-Ganglien, Nebenniere und Harnblase.

In Zusammenhang mit der zugrunde liegenden Arbeit ist in erster Linie die Verteilung der CB1-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt von Interesse.

So konnte im myenterischen Plexus des Meerschweinchendünndarms (Griffin, 1997), im menschlichen Magen und Colon (Shire, 1995) und im Plexus myentericus und submucosus des embryonalen Verdauungstrakt der Ratte (Buckley, 1998) mRNA für den CB1-Rezeptor nachgewiesen werden.

Casu et al. untersuchten die Verteilung von funktionellen CB1-Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt der Maus und stellten dabei fest, dass durch Western Blotting die höchsten Expressionslevel im Magen und Colon beobachtet werden konnten, während die höchste Immunreaktivität in den Ganglien, die dem Magenepithel anliegen, und den Ganglien in den Schichten der glatten Muskulatur, sowohl von Dick- als auch Dünndarm, zu erkennen war (Casu, 2003).

In mehreren anderen Arbeiten konnte eine Immunreaktivität CB1-Rezeptor-immunreaktiver Neurone auch zu dem cholinergen Marker Cholin-Acetyltransferase (ChAT) nachgewiesen. Die Präsenz von CB1-Rezeptoren auf cholinergen Neuronen im GI-Trakt lässt daher auf einen Einfluß des Endocannabinoidsystems auf die cholinerge Erregungsübertragung und den Ionentransport der Mukosa schließen (Kulkarni-Narla, 2000; Coutts, 2002; Pinto, 2002; Tyler, 2000).

Außerdem zeigte sich eine gelegentliche Assoziation mit Substanz P immunreaktiven Neuronen, nicht aber mit VIP oder NOS exprimierenden Zellen (Kulkarni-Narla, 2000).

Dass das Endocannabinoidsystem auch ein großes therapeutisches Potential für den Menschen besitzt, zeigt der funktionelle Nachweis von CB1-Rezeptoren in Longitudinalmuskulatur-Präparationen des Plexus myentericus des menschlichen Ileums und Colons (Manara, 2002).

4.2.3. Der CB2-Rezeptor

Nachdem der CB2-Rezeptor erstmals 1993 in der Milz von Ratten nachgewiesen werden konnte (Munro, 1993), stellte sich anschließend heraus, dass diese Rezeptoren vor allem von Zellen des Immunsystems, beispielsweise Leukozyten, Milz und Tonsillen, exprimiert werden. Es gibt deutlich mehr mRNA für CB2- als für CB1- Rezeptoren im Immunsystem (Pertwee, 1997).

Griffin et al. konnten mRNA für CB2-Rezeptoren im gesamten Darm, jedoch nicht im Myenterischen Plexus des Meerschweinchendünndarms nachweisen, was den Schluß zulässt, dass diese mRNA von sich dort befindenden Makrophagen und anderen Immunzellen stammt (Griffin, 1997).

Obwohl die physiologischen Funktionen der CB2-Rezeptoren schwer zu bestimmen sind, deutet die hohe Expression in B-Leukozyten und natürlichen Killerzellen (Galiegue, 1995) auf eine potentielle immunsuppressive und anti-entzündliche Wirkung von Cannabinoiden hin (Klein, 1998). Dafür spricht auch die Beobachtung, dass über CB2-Rezeptor-Aktivierung und die folgende Signaltransduktion (siehe unten) die Bildung von NO vermindert wird (Coffey, 1996).

Trotz der unterschiedlichen Expression der Cannabinoidrezeptoren gibt es strukturelle Ähnlichkeiten, so sind 44% des Gesamtaufbaus und immerhin 68% der Transmembrankomponente identisch.



Abb. 21: Aufbau des CB1- bzw. CB2-Rezeptors im Vergleich (Janet, 1999)

4.2.4. Signaltransduktion von CB1- und CB2-Rezeptor

Die Aktivierung von CB1- und CB2-Rezeptoren durch Endocannabinoide führt zu einer Modulation von verschiedenen Signalübertragungswegen durch Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen. Es handelt sich bei den Cannabinoidrezeptoren also um G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die Pertussis-Toxin sensibel sind, das heißt, dass deren biologische Antworten durch Vorbehandlung mit Pertussis-Toxin verhindert werden können (Munro, 1993; Felder, 1995).

Trotz dieser Gemeinsamkeit koppeln diese beiden Rezeptoren den Signaltransduktionsweg nicht auf gleiche Weise. Während der CB1-Rezeptor verschiedene Ionenkanäle beeinflusst, kann diese Beobachtung beim CB2-Rezeptor nicht oder nur kaum nachvollzogen werden (Pertwee, 1997). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Rezeptoren an unterschiedliche Subtypen des G-Proteins gekoppelt sind: während die Affinität zu G_i bei beiden Rezeptoren etwa gleich hoch ist, zeigt sich eine 10-fach höhere Affinität des CB1- als des CB2-Rezeptors zu G_o . (Glass M, 1999).

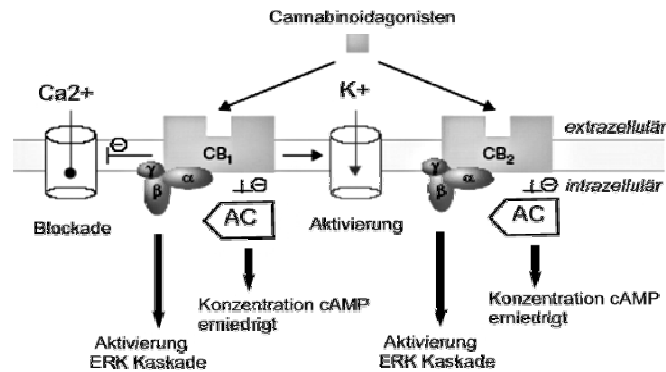


Abb. 22: Signaltransduktion nach Bindung eines Agonisten am CB1- und CB2-Rezeptor. Beide Rezeptoren sind an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt. Dies führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (AC) und zu einer Aktivierung einer Kaskade durch eine extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK). Außerdem werden Ca^{2+} -Kanäle gehemmt, während K^{+} -Kanäle aktiviert werden. Dies führt zu einer Hyperpolarisation und somit verminderter Aktivität (Izzo, 2001).

Im Folgenden soll der Signaltransduktionsweg des CB1-Rezeptors genauer vorgestellt werden.

4.2.4.1. Regulation der Adenylatzyklase

Die erste charakterisierte Antwort der CB1-Rezeptor-Signaltransduktion war die Hemmung der Adenylatzyklase, die für die Bildung von cAMP aus ATP verantwortlich ist (Howlett, 1986). Da diese Antwort durch Pertussistoxin geblockt werden konnte, ordnete man die Signalübertragung der $G_{i/o}$ -Familie zu (Howlett, 1986). Rezeptorbindung führt dabei zu einer Dissoziation der α und β/γ Untereinheiten des G-Proteins und daraufhin zur Hemmung der Adenylatzyklase. Es zeigte sich, dass die Potenz der cannabinoidergen Agonisten die Adenylatzyklase zu regulieren mit der Affinität zum CB1-Rezeptor korreliert (Shim, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass Substanzen (IBMX, Forskolin), die zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führen, den Effekt der Cannabinoidagonisten zu hemmen vermochten, was als Beleg für den regulierenden Einfluss der CB1R-Liganden auf die cAMP-Konzentration angesehen werden kann (Coutts, 1998).

Zusätzlich zu der Hemmung der Adenylatzyklase durch Bindung von Agonisten an dem Rezeptor kann diese unter bestimmten Bedingungen auch stimuliert werden. So konnte bei Pertussistoxin vorbehandelten Zellen eine Akkumulation von cAMP beobachtet werden, die auf Aktivierung des G_s -Proteins in Abwesenheit der funktionellen $G_{i/o}$ -Kopplung basiert (Glass, 1997).

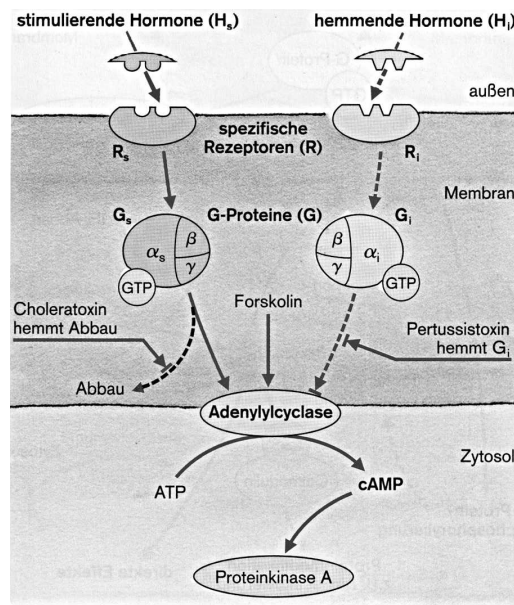


Abb. 23: Darstellung der Regulation der Adenylatzyklase: Nach Rezeptorbindung kommt es zu einer Aktivierung eines stimulierenden (G_s) bzw. inhibierenden (G_i) G-Proteins. Das aktivierte G_s -Protein erhöht, das aktivierte G_i -Protein vermindert die Aktivität der Adenylatzyklase und somit die cAMP-Konzentration (Greger, 1996).

Rhee et al. zeigten, dass die Expression von verschiedenen Isoformen der Adenylatzyklase die unterschiedlichen Adenylatzyklaseaktivitäten verursachen und somit einerseits zu einer Stimulation, andererseits zu einer Hemmung der cAMP-Anhäufung führen können (Rhee, 2002).

4.2.4.2. Regulation von Ionenkanälen

Die Regulation von Ionenkanälen findet über drei verschiedene Signalübertragungswege statt.

1. Ionenkanäle sind direkt über Gi/o-Proteine an den CB1-Rezeptor gekoppelt. So werden „inwardly rectifying“ – Kaliumkanäle (Mackie, 1995) positiv, die spannungsabhängigen Typ-L (Gebremedhin, 1999), Typ-N (Pan, 1996) und Typ P/Q (Mackie et al., 1995) Kalziumkanäle negativ beeinflusst.

Der vor allem durch Blockade der Typ-N Ca^{2+} -Kanäle erreichte verminderte Kalziumeinstrom in die Zelle, könnte zu einer verminderten Freisetzung von Acetylcholin und somit zu einer reduzierten cholinergen Signaltransduktion führen (Coutts, 1998).

2. Typ A- und Typ D-Kaliumkanäle werden positiv über die Hemmung der Proteinkinase A gekoppelt. Wie oben erwähnt führt Rezeptorbindung zunächst zu einer Hemmung der Adenylatzyklase und folglich zu einer verminderten cAMP-Akkumulation. Da die Proteinkinase A cAMP-abhängig ist, kann diese nicht aktiviert werden und somit auch nicht die Phosphorylierung von Kaliumkanälen durchführen, die sie in Abwesenheit von Cannabinoiden katalysiert. Aufgrund der verminderten Phosphorylierung der Kaliumkanäle kommt es zu einem verstärkten Auswärtsstrom von Kalium (Mu, 1999).

3. Anandamid kann Ionenkanäle nicht nur über CB1-Rezeptor Aktivierung, sondern auch direkt beeinflussen. Mehrere Forschergruppen zeigten, dass Anandamid eine direkte, hemmende und nicht kompetitive Wirkung auf Typ-L Kalziumkanäle in Zellmembranen im Gehirn und Herz von Ratten ausübt (Johnson, 1993; Shimasue, 1996).
Desweiteren werden auch Kaliumkanäle unabhängig vom CB1-Rezeptor direkt durch Anandamid beeinflusst. Maingret et al. zeigten,

dass in Kleinhirngewebe und COS-Zellen Säure-sensitive Hintergrund-K⁺-Kanäle (TASK-1) direkt gehemmt werden (Maingret, 2001). TASK-1 gehören zu einer Familie von selektiven K⁺-Kanälen, die verantwortlich sind, das membranöse Ruhepotential aufrecht zu erhalten. Auch spannungsabhängige Shaker-related K⁺-Kanäle werden direkt und nicht G-Protein gekoppelt gehemmt, da diese Hemmung weder durch SR141716A noch durch Pertussistoxin geblockt werden konnte (Poling, 1996).

Dass vor allem Ca²⁺-Kanäle maßgeblich an der Signaltransduktion der Cannabinoide beteiligt sind, konnte durch die Beobachtung bekräftigt werden, dass die extrazelluläre Calciumkonzentration modulierenden Einfluss auf die Cannabinoidwirkung hat. So wurde deren Effekt durch eine verminderte extrazelluläre Ca²⁺-Konzentration verstärkt, während eine erhöhte Konzentration hemmend wirkte (Coutts, 1998).

4.2.4.3. Regulation von intrazellulären Ca²⁺-Übergängen

Cannabinoidagonisten verursachen einen schnellen, transienten Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration. Als zugrunde liegenden Mechanismus vermutet man eine Rezeptor-vermittelte Freisetzung von G_{i/o}βγ Untereinheiten, die die Phospholipase Cβ aktivieren und so zu einer Freisetzung von Inositol-1,4,5-triphasphat (IP₃) führen (Sugiura, 1997).

IP₃ fördert die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Kalziumspeichern (Greger, 1996).

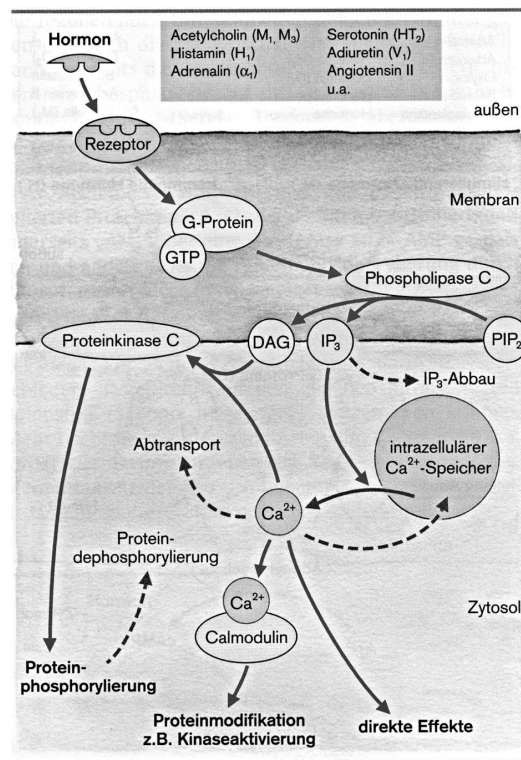


Abb. 24: Regulation von intrazellulären Ca²⁺-Übergängen: Über Rezeptorbindung und folgender G-Proteinaktivierung wird die Phospholipase C aktiviert, was eine Freisetzung von IP₃ zur Folge hat. IP₃ setzt Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern frei (Greger, 1996).

4.2.4.4. Regulation der NO-Synthetase

In mehreren Geweben konnte die Stimulation der NO-Produktion durch Cannabinoide nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass L-Name (Nitro-L-Argininmethylester) diesen Effekt antagonisieren konnte, liegt die Vermutung nahe, dass es einen Signalübertragungsweg geben muss, über den die NO-Synthetase reguliert wird (Prevot, 1998; Howlett, 2002).

4.2.5. Agonisten des CB1-Rezeptors

In den letzten Jahren wurden aufgrund des großen Interesses an den Interaktion, die über Cannabinoidrezeptoren vermittelt werden, eine Reihe an synthetischen Agonisten und Antagonisten hergestellt. Die synthetischen Agonisten werden zusammen mit den oben erwähnten endogenen Agonisten in folgende Klassifikation einbezogen. Man unterscheidet klassische (1), nicht-klassische (2) Cannabinoide, Aminoacylindole (3) und Eikosanoide (4) (Howlett, 2002).

4.2.5.1. Klassische Cannabinoide

Zu den klassischen Cannabinoide zählen die natürlich in der Pflanze *Cannabis sativa* vorkommenden Verbindungen Δ^9 -THC und Δ^8 -THC sowie synthetische Analoga dieser Verbindungen, unter diesen ist die Substanz HU-210 die bekannteste.

Die Affinität dieser Verbindungen zu CB1- und CB2-Rezeptor ist in etwa gleich, die intrinsische Aktivität des synthetischen Analogon hingegen übertrifft die der natürlich vorkommenden Verbindungen (Howlett, 2002).

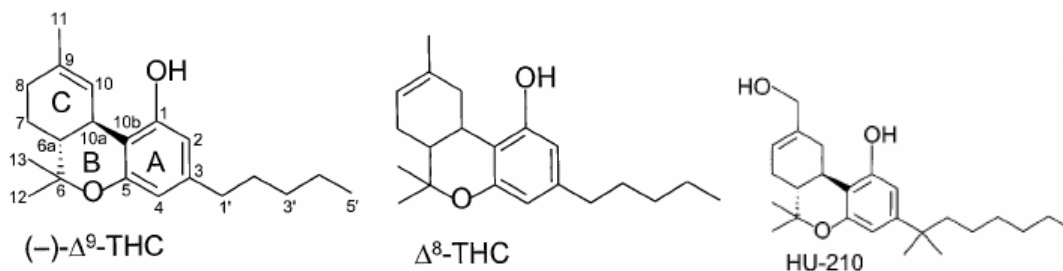


Abb. 25: Strukturformeln der „klassischen“ Cannabinoide Δ^9 -THC, Δ^8 -THC und HU-210.

4.2.5.2 Nicht-klassische Cannabinoide

Die bekannteste Substanz unter den nicht-klassischen Cannabinoiden ist CP-55,940. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem $[H^3]$ CP 55,940 war es

Devane et al. 1988 erst möglich, CB1-Rezeptoren zu entdecken und zu charakterisieren. Mit einer ähnlichen Affinität zu CB1- und CB2-Rezeptor fungiert CP-55,940 als voller Agonist an beiden Rezeptoren und zeigt eine maximale Aktivität, die die Aktivität von vielen anderen Agonisten übertrifft (Howlett, 2002).

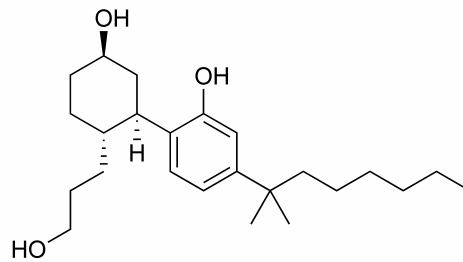


Abb. 26: Strukturformel des „nicht klassischen“ Cannabinoids CP-55,940.

4.2.5.3 Aminoalkylindole

Die wichtigste Verbindung unter den Aminoalkylindole wurde entdeckt als man bei der Entwicklung von strukturellen Analoga von Pravadin, einem NSAR, eine Verbindung (R-(+)-WIN 55,212) fand (Ward, 1991), die weniger eine Hemmung der Cyclooxygenase zur Folge hatte, als vielmehr die Fähigkeit zeigte, an CB1-Rezeptoren zu binden (Eissenstat, 1995).

R-(+)-WIN 55,212 zeigt eine hohe Affinität zu beiden Cannabinoidrezeptoren, wobei eine leichte Selektivität zugunsten des CB2-Rezeptors und eine hohe relative intrinsische Aktivität sowohl an CB1- als auch an CB2-Rezeptoren zu beobachten ist (Pertwee, 1999).

Es konnte nachgewiesen werden, dass R-(+)-WIN 55,212 auf eine andere Weise am CB1-Rezeptor bindet als die klassischen und nicht-klassischen Cannabinoide, wenngleich es weiterhin möglich ist, andere Cannabinoide von ihrer Bindungsstelle am Rezeptor zu verdrängen (Pertwee, 1997).

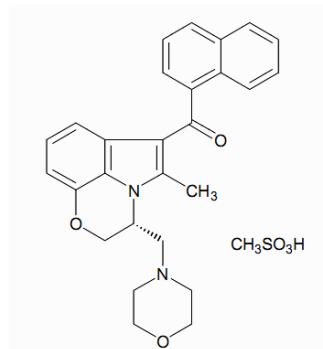


Abb. 27: Strukturformel des Aminoalkylindols R-(+)-WIN 55,212 (WIN 55,212-2).

4.2.5.4 Eikosanoide

Zu dieser Gruppe gehören die bisher bekannten endogenen Cannabinoide Anandamid, 2-AG und Noladinether. Außerdem können synthetische cannabinoide Liganden subsumiert werden, die durch strukturelle Modifikation des Anandamid-Moleküls entstanden sind, wie z.B. (+)-Methanandamid (Khanolkar, 1996), ACEA (Arachidonyl-2'-chloroethylamid) und ACPA (Arachidonylcyclopylamid) (Hillard, 1999). Anandamid wirkt am CB1-Rezeptor als partieller Agonist und zeigt am CB2-Rezeptor eine geringere relative intrinsische Aktivität als am CB1-Rezeptor (Pertwee, 1999).

Der zweite endogene Ligand 2-AG ist ein Agonist an beiden Cannabinoidrezeptoren mit einer etwas höheren Affinität zum CB1-Rezeptor (Sugiura, 1997). Die relative intrinsische Aktivität übertrifft die von Anandamid (Pertwee, 1999).

Noladinether unterscheidet sich von den beiden anderen Endocannabinoiden durch die sehr viel höhere CB1-Rezeptor-Affinität. Jedoch ist die relative intrinsische Aktivität im Vergleich zu den beiden anderen viel schwächer (Hanus, 2001).

Durch die strukturellen Modifikationen des Anandamid-Moleküls konnten erstmals CB1-selektive Agonisten entwickelt werden. Die relative intrinsische Aktivität der synthetischen Eikosanoide übertrifft die von Anandamid (Hillard, 2002).

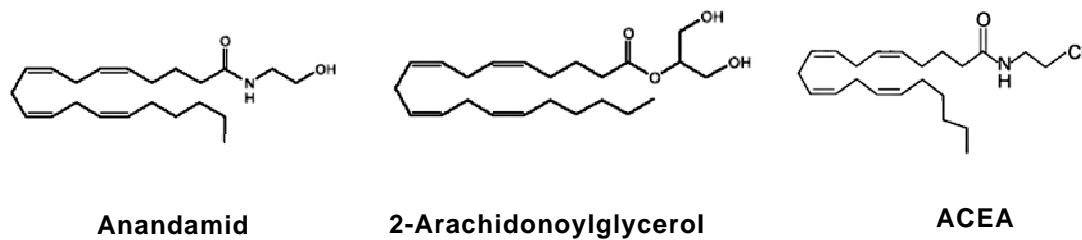


Abb. 28: Strukturformeln der Eicosanoide Anandamid, 2-AG und ACEA.

4.2.6. Antagonisten an Cannabinoidrezeptoren

Die beiden wichtigsten Antagonisten an den CB-Rezeptoren sind SR141716A (CB1) und SR144528 (CB2) (Rinaldi-Carmona, 1995).

SR141716A wurde 1994 erstmals synthetisiert (Sanofi) (Rinaldi-Carmona 1994) und kann als potenter CB1-selektiver Ligand betrachtet werden. Es gibt inzwischen eine Reihe an Arbeiten (Ross, 1999; Coutts, 2000), die darauf hinweisen, dass dieser Antagonist per se Effekte ausüben kann, die kontrovers zu den agonistischen Wirkungen sind. Es gibt dafür zwei potentielle Erklärungen: zum einen könnte es einen endogenen Tonus der Cannabinoide geben, die dabei durch SR141716A von ihrer Bindungsstelle verdrängt werden, zum anderen könnte SR141716A selbst als inverser Agonist fungieren.

SR141716A scheint dabei aber eine größere Potenz in seiner antagonistischen als in seiner invers cannabinomimetischen Wirkung zu haben (Acquas, 2000; Sim-Selley, 2001). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass SR141716A an zwei verschiedenen Stellen am CB1-Rezeptor binden kann, nämlich einerseits an der Stelle, an der die Agonisten binden und andererseits an eine weitere Stelle, an der es seine invers-agonistische Wirkung entfalten kann. Es ist nun so, dass SR141716A eine größere Affinität zu der Bindungsstelle der Agonisten hat und deswegen auch seine antagonistische Wirkung größer ist (Sim-Selley, 2001).

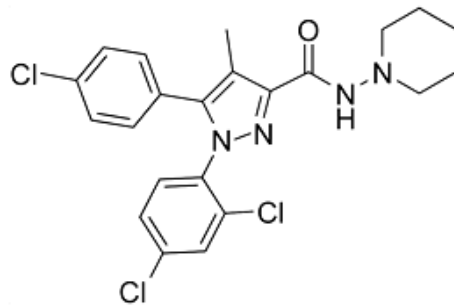


Abb. 29: Strukturformel des selektiven CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A

4.2.7. Inaktivierung der Endocannabinoide

Nachdem Endocannabinoide auf einen Stimulus in den Extrazellulärraum freigesetzt werden, folgt eine schnelle Deaktivierung durch Wiederaufnahme in die Zelle und enzymatische Hydrolyse.

Aufgrund ihrer lipophilen Struktur können Endocannabinoide durch die Plasmamembran hindurch diffundieren, falls ein ausreichend großer Diffusionsgradient besteht. Da die intrazelluläre Wiederaufnahme sehr rasch stattfindet, muß diese durch kontrollierbare und selektive Mechanismen unterstützt werden.

Nach jetzigem Kenntnisstand sind es im Wesentlichen folgende beiden Mechanismen, die die Wiederaufnahme der Cannabinoiden in die Zelle katalysieren.

Zunächst werden Endocannabinoide, z.B. Anandamid und 2-AG, über ein selektives Temperatur- und Na⁺-abhängiges Transportprotein in die Zelle aufgenommen. Dieses Protein wird als Anandamid-Membran-Transporter (AMT) bezeichnet (Maccarrone, 2000; Beltramo, 1997). Mehrere Arbeiten (Fezza, 2002; Huang, 2002) lassen den Schluss zu, dass die zelluläre Aufnahme aller Cannabinoiden über diesen Mechanismus vermittelt wird.

Intrazellulär wird die Konzentration rasch durch Hydrolyse reduziert und somit der Diffusionsgradient aufrechterhalten. Verantwortlich für die schnelle Hydrolyse von Anandamid ist die FAAH (fatty acid amid hydrolase), für die

Hydrolyse von 2-AG ebenfalls die FAAH und zusätzlich die MAGL (Monoacylglycerollipase) (Di Marzo, 2001; Sugiura, 2002;).

Die Mechanismen des Endocannabinoidkatabolismus sind aus pharmakologischer Sicht von besonderer Bedeutung, da man durch Beeinflussen der einzelnen Reaktionswege die extrazelluläre Konzentration steigern und damit eventuell bestimmte Krankheiten positiv beeinflussen kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die entstehenden Abbauprodukte (v.a. Arachidonsäure) selbst pharmakologisch aktiv sind.

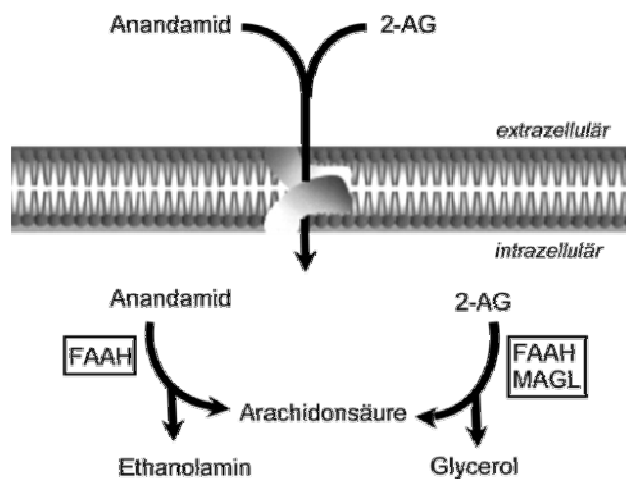


Abb. 30: Darstellung der Endocannabinoiden-Inaktivierung: Über ein Transportprotein werden Endocannabinoide in Zelle aufgenommen. Hier erfolgt Hydrolyse durch FAAH (Anandamid und 2-AG) und MAGL (2-AG) (Giufriada, 2001).

4.2.8. Cannabinoide als Agonisten an Vanilloidrezeptoren

Von mehreren Forschungsgruppen konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass Anandamid nicht nur über Cannabinoidrezeptoren wirkt, sondern auch über Vanilloidrezeptoren. Während ACEA ebenfalls als Ligand für Vanilloidrezeptoren dient (Baker, 2004), konnte für WIN 55,212-2 diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden (Ross, 2001).

Die Vanilloidrezeptoren (VR1) gehören zur Familie der TRP-Proteine (transient receptor potential (TRP) channels) und werden hauptsächlich von primären afferenten Nervenfasern exprimiert (Ross, 2003). So wurde der ehemalige Terminus VR1-Rezeptor durch TRPV1-Rezeptor ersetzt.

Diese vanilloiden (TRPV1-) Rezeptoren werden durch Stimuli wie Hitze und niedrigem pH-Wert, aber auch durch Capsaicin aktiviert, welches als der scharfe Hauptbestandteil des roten Pfeffer (*Capsicum* sp.) bekannt ist.

Da diese Rezeptoren nicht-slektive Kationenkanäle sind, führt deren Aktivierung zu einem schwachen Netto einwärts gerichteten Kationenstrom (Ramsey, 2006), der vor allem zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Die Bindungsstelle der Vanilloidrezeptorliganden scheint auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran zu liegen, da eine Hemmung des Anandamid-Membran-Transporters (AMT) zu einer Abschwächung der Anandamid-, nicht aber der Capsaicin-induzierten Antwort führt, wohingegen eine Hemmung des intrazellulären hydrolytischen Abbaus von Anandamid dessen Wirkung verstärkte, aber keinen Einfluß auf die Capsaicin-vermittelte Antwort hatte (De Petrocellis, 2001).

Anandamid, das strukturelle Gemeinsamkeiten mit Capsaicin besitzt, kann als endogener Ligand sowohl am CB1- und CB2-Rezeptor als auch am TRPV1-Rezeptor angesehen werden (Zygmunt, 1999; Smart, 2000), wobei eine 15-20fach höhere Potenz an den Cannabinoid- als an TRPV-Rezeptoren zu beobachten ist (Smart, 2000).

Dabei ist allerdings erwähnenswert, dass unter pathologischen Bedingungen, wie etwa Entzündungen, die Potenz an TRPV-Rezeptoren bis auf das 10-fache gesteigert werden kann, was auf eine dramatische Steigerung der TRPV1-Expression (Yiangou,2001), einen sinkenden pH-Wert und steigende Temperatur (Olah, 2001) zurückzuführen ist.

Aufgrund der unterschiedlichen Affinität scheint Anandamid unter physiologischen Bedingungen in niedrigeren Konzentrationen inhibitorische Aktionen über den CB1-Rezeptor, in höheren Konzentrationen exzitatorische Aktionen über den Vanilloidrezeptor zu vermitteln (Szoke, 2000; Morisset, 2001).

Obwohl Anandamid eine geringe intrinsische Aktivität am TRPV1-Rezeptor besitzt, kann es in Geweben mit einer hohen Rezeptordichte als voller Agonist wirken, während es in Geweben mit niedriger Dichte als partieller Agonist fungiert (Ross, 2003; Andersson, 2002). Dies hat wichtige physiologische Auswirkungen, da ein partieller Agonist die Wirkung eines vollen endogenen Agonisten abschwächen kann. Mit N-Arachidonyldopamin (NADA) wurde ein voller Agonist mit hoher intrinsischer Aktivität am TRPV1-Rezeptor entdeckt (Huang, 2002).

Aber auch die Abbauprodukte der Arachidonsäure (12-Hydroperoxyeicosatetraenylsäure, 5-Hydroeicosatetraenylsäure und Leucotrien B₄), die durch Metabolisierung von Anandamid entstehen, fungieren als Liganden am Vanilloidrezeptor (Ross, 2003).

Inzwischen gibt es Arbeiten, die den Einfluss von Anandamid und 2-AG auf die TRPV1-Rezeptoren des Dünndarms, v.a. des Ileums, belegen:

So zeigten McVey et al. 2003, dass intraluminale Gabe von Anandamid und 2-AG zu einer Entzündung des Ileum der Ratte führte, die durch Vorbehandlung mit dem TRPV1-Rezeptor-Antagonisten Capsazepin verhindert werden konnte, nicht aber durch Cannabinoidrezeptorantagonisten. Die entzündliche Reaktion wurde dabei durch die Freisetzung von Substanz P (SP) vermittelt, da eine Vorbehandlung mit SP- (Neurokinin (NK)-1-) Rezeptor Antagonisten die

Entzündung verhindern konnte. Diese Ergebnisse demonstrierten, dass Anandamid und 2-AG primäre sensorische Neuronen über TRPV1-Rezeptoren stimulieren, um Substanz P freizusetzen, die zu entzündlichen Veränderungen führt (McVey, 2003).

In einer anderen Arbeit (Mang, 2001) wurde der Einfluss von Anandamid auf Longitudinalmuskulatur - Präparationen des Myenterischen Plexus des Meer-schweinchens untersucht. Anandamid erhöhte dabei die basale Acetylcholin (ACh)-Freisetzung und den Muskeltonus auf eine Capsazepin-sensitive Weise. Die vermehrte Freisetzung von ACh wird vermutlich auch hier über eine TRPV1-Rezeptor gekoppelte Freisetzung von Tachykininen und deren NK1- und NK3 –Rezeptor Aktivierung gekoppelt.

Es scheint aber auch direkte Interaktionen des Endocannabinoid- und des Endovanilloidsystems zu geben, so führt CB1R-Aktivierung durch Anandamid zu einer Abschwächung der ebenfalls durch Anandamid vermittelten TRPV1-Rezeptor-Aktion (Maccarrone, 2000).

Andererseits zeigten Premkumar & Ahern, dass Anandamid den Vanilloidrezeptor vermutlich über die Proteinkinase C aktiviert, da eine Hemmung der Proteinkinase C zu einer reduzierten Anandamid-Antwort und zu einer Hemmung einer direkten TRPV1-Rezeptor Aktivierung durch Capsaicin führte (Premkumar, 2000).

Neben der Proteinkinase C hat auch die Proteinkinase A eine zentrale Rolle in der Regulation der Balance zwischen Cannabinoid- und Vanilloidrezeptoraktivierung inne. Der TRPV1-Rezeptor wird durch die Proteinkinase A phosphoryliert, was zu einer größeren Sensibilität und somit zu einer erleichterten Aktivierbarkeit führt. Wie oben dargestellt, hemmt der über den CB1-Rezeptor vermittelte Signaltransduktionsweg über eine Reduktion der cAMP-Konzentration eben diese Proteinkinase A (Herrmann, 2003).

Diese komplexen und noch nicht vollständig aufgeklärten Regulations-Mechanismen sollen an dieser Stelle noch mal veranschaulicht werden:

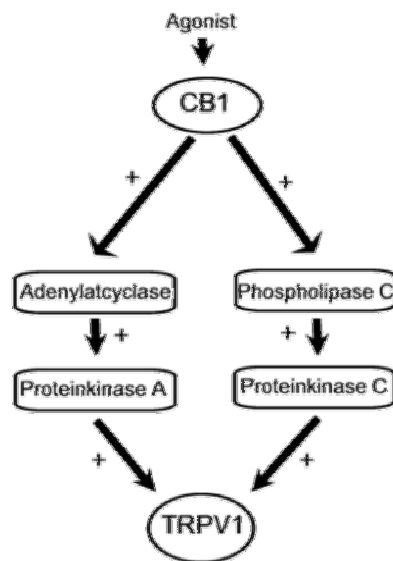


Abb. 31: Darstellung der Interaktion des Endocannabinoid- und des Endovallinoidsystems: Durch Aktivierung des CB1-Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C. Über Aktivierung der Proteinkinasen A und C kommt es zu einer Sensibilitätssteigerung des TRPV1-Rezeptors.

Ahluwalia et al. zeigten, dass eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors zu einer Freisetzung von Endocannabinoiden führt, welche daraufhin durch eine CB1-Rezeptor gekoppelt Aktion die TRPV1-Rezeptor vermittelte Freisetzung von Neuropeptiden hemmen.

Es gibt mehrere Hinweise (Ross, 2001; Ralevic, 2001) dafür, dass Cannabinoidrezeptoren konstitutiv aktiv sind und dadurch einen tonischen hemmenden Effekt auf TRPV1-Rezeptoren ausüben. Dies erklärt auch die steigernde Wirkung von inversen Agonisten am CB1R auf TRPV1-Rezeptor Aktivierung (Ross, 2001).

4.2.9. Cannabinoide als Agonisten an non-CB₁, non-CB₂ Rezeptoren

4.2.9.1. CB₂-ähnliche Cannabinoidrezeptoren

Die Existenz eines SR144528 (CB₂-Antagonist)-sensitiven, non-CB₂ Cannabinoidrezeptors wurde erstmals von Calignano et al. (1998) postuliert. Ihre Hypothese basierte auf der Beobachtung, dass Palmitylethanolamid, das weder zu CB₁- noch zu CB₂-Rezeptoren signifikante Affinität besitzt, bei Mäusen antinozizeptive Effekte besitzt, die durch SR144528 antagonisiert werden können. Da diese Substanz aber keine Aktivität in Versuchen zeigte, bei denen die Antinozizeption über Vanilloidrezeptoren vermittelt wird, konnte bewiesen werden, dass es sich bei dem „CB₂-ähnlichen“ Rezeptor nicht um einen Vanilloidrezeptor handelt (Calignano, 2001).

Ein weiterer Beweis für die Existenz solcher Rezeptoren konnte auch für den Vas deferens an Mäusen erbracht werden (Griffin, 1997).

4.2.9.2. SR141716A-sensitive, non-CB₁, non-CB₂, non-vanilloid Rezeptoren

Es gibt mehrere Hinweise, dass die Mesenterialarterien von Ratten und Mäusen Rezeptoren exprimieren, die nur von wenigen (i.e. Anandamid, Methanandamid) der bekannten Cannabinoidagonisten, nicht jedoch von WIN 55,212-2 (siehe unten) aktiviert werden. Die Hypothese, es handelt sich weder um CB₁- noch um CB₂-Rezeptoren, belegt die Tatsache, dass der relaxierende Effekt der beiden Substanzen auf vorkontrahierte Mesenterialarterien auch in CB₁^{-/-}-Knockout und CB₁^{-/-}/CB₂^{-/-} doppel-Knockout Mäusen weiterhin zu beobachten ist (Jarai, 1999).

Dieser non-CB₁, non-CB₂ Rezeptor kann durch SR141717A antagonisiert werden, wenngleich mit einer geringeren Potenz als der CB₁-Rezeptor.

Da der Vanilloidrezeptorantagonist Capsazepin die angesprochene Relaxation nicht reduzieren konnte, war der TRPV1-Rezeptor nicht beteiligt (Jarai, 1999).

In diesem Versuchsschema war die Anandamid-induzierte vasale Relaxation sowohl bei Mesenterialarterien mit intaktem Endothel als auch in Arterien mit abpräpariertem Endothel erkennbar. SR141716A war nur bei intaktem Endothel in der Lage, hemmend auf die Relaxation Einfluß zu nehmen. Diese Beobachtung spricht zu einem dafür, dass mindestens zwei Mechanismen involviert sind, um die vorkontrahierten Gefäße zu relaxieren, und zeigt zum anderen, dass die SR141716A-sensitiven, non-CB1, non-CB2 Rezeptoren auf dem Endothel der Mesenterialarterien und auf der glatten Muskulatur lokalisiert sind (Kunos, 2000).

Inzwischen gibt es auch Hinweise, dass im Dünndarm von Meerschweinchen ebenfalls solche Rezeptoren zu finden sind. Anandamid verhinderte hier die durch Elektrostimulation ausgelöste Freisetzung von Acetylcholin und die folgende Kontraktion in MPLM-Präparationen des Ileum. Diese Wirkung von Anandamid konnte zwar auch durch SR141716A abgeschwächt werden, aber nicht mit der gleichen Potenz als am CB1-Rezeptor. CB2-Rezeptor- und TRPV1-Rezeptorantagonisten hatten keinen Einfluß (Mang, 2001).

4.2.9.3. Anandamid- und (+)-R-WIN55,212-sensitive Rezeptoren

Ein weiterer Rezeptorentyp, der sich von den oben beschriebenen unterscheidet wurde von Di Marzo et al. (2000) und Breivogel et al. (2001) beschrieben. Es handelt sich dabei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der im Gehirn von Mäusen zu finden ist und nur durch Anandamid und (+)-R-WIN 55,212-2 aktiviert werden kann. Dass es sich hier um einen neuen Rezeptor handelt, zeigt die Fähigkeit des Rezeptors, auch in CB1^{-/-}-Mäusen durch die beiden genannten Liganden, jedoch nicht durch andere Cannabinoidagonisten aktivierbar zu sein.

Im Gegensatz zu dem zuletzt vorgestellten Rezeptor ist dieser nicht SR141716A-sensibel, da die radioaktiv markierten Substanzen [H3]R-WIN 55,212-2 und [H3]SR141716A unterschiedliche Bindungstellen zeigten.

Auch Vanilloidrezeptoren als potentielle Bindungsstellen für diese Liganden kommen hier nicht in Betracht, da diese nicht G-Protein gekoppelt sind.

Zusammenfassend lässt sich dieser Rezeptorentyp von dem "CB2-ähnlichen" Rezeptor aufgrund seiner Aktivierbarkeit durch Anandamid und WIN55,212-2 und von dem SR141716A-sensitiven aufgrund der Aktivierbarkeit durch WIN 55,212-2 und der fehlenden Sensitivität gegenüber SR141716A unterscheiden.

4.2.10. Einfluss von Cannabinoiden auf den Gastrointestinaltrakt

Mit dem zunehmenden Interesse, das der Cannabisforschung in den letzten Jahren zu Teil wurde, erkannte man, dass es ein sehr großes Spektrum an potentiellen therapeutischen Angriffspunkten für Cannabinoide bzw. deren Antagonisten gibt. So ist inzwischen klar, dass das Endocannabinoidsystem an Regulationsmechanismen von Psyche und Wahrnehmung, der Kognition, des Nervensystems, des kardiovaskulären Systems, des Auges, des respiratorischen Systems, des Immunsystems und der Embryonalentwicklung beteiligt ist.

Neben diesen vielfältigen Einflüssen gibt es in der Literatur zahlreiche Hinweise, dass Cannabinoide auch auf unterschiedliche Weise auf den Gastrointestinaltrakt Einfluss nehmen. Substanzen, die an Cannabinoidrezeptoren wirken, modifizieren hier nicht nur die Sekretion und Motilität, sondern haben auch antinozizeptive und antihyperalgische Eigenschaften (Pertwee, 2001; Izzo, 2001).

Im Folgenden werden die durch Cannabinoide vermittelten Wirkungen auf die intestinale Motilität dargestellt.

Bereits lange zurück liegende Studien zeigten, dass Δ^9 -THC die Transitzeit im Dünndarm von Nagetieren verlangsamt (Shook, 1989). Mit der Isolierung und Synthetisierung von Agonisten und Antagonisten der Cannabinoidrezeptoren war es nun möglich, die zugrunde liegenden Mechanismen genauer zu charakterisieren.

4.2.10.1. Hemmung der cholinergen Übertragung

Elektrische Feldstimulation von MPLP-Präparationen (MPLP: Longitudinalmuskulatur-Präparationen des Plexus myentericus) des Meerschweinchenileums führt zu einer kontraktile Antwort, die durch die Freisetzung von Acetylcholin aus enterischen cholinergen Nerven vermittelt wird. Cannabinoidagonisten sind in der Lage, diese Antwort zu blockieren bzw. abzuschwächen, wobei dieser hemmende Effekt durch den CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A kompetitiv antagonisiert werden kann (Pertwee, 1996; Coutts, 1997; Mang, 2001), was auf eine Beteiligung von CB1-Rezeptoren hindeutet. Die durch CB1-Agonisten induzierte Hemmung ist auf eine verringerte Freisetzung von Acetylcholin aus enterischen Nerven zurückzuführen und somit eine präjunktionale Wirkung.

- Dies wurde durch die Beobachtung bekräftigt, dass Anandamid Kontraktionen, die durch exogenes Acetylcholin hervorgerufen wurde, nicht modifizieren konnte (Pertwee, 1995+1996). Da exogenes Acetylcholin Kontraktionen auslöst, die über muskarinerge, direkt auf der glatten Muskulatur befindliche Rezeptoren vermittelt werden, muß von einer präjunktionalen Lokalisation der CB1-Rezeptoren ausgegangen werden. Weitere Substanzen, von denen bekannt ist, dass sie postjunktionale Wirkungen auf die glatte Muskulatur des Dünndarms haben, wie z.B. Indomethacin, Substanz P und Methazolin, konnten ebenfalls von CB1-Agonisten nicht in ihrer Wirkung beeinflusst werden (Heinemann, 1999; Mang, 2001; Lynn, 1994).
- Im Gegensatz zu Anandamid ist Δ^9 -THC fähig, die kontraktile Antwort auf 5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin) und γ -Aminobuttersäure zu reduzieren. Diese beiden Substanzen wirken präjunktional und führen zu einer Freisetzung von Acetylcholin (Pertwee, 1991).

- Zusätzlich gibt es auch elektrophysiologische Hinweise, die darauf hindeuten, dass die CB1-Rezeptoren präjunktional auf myenterischen Neuronen liegen und so die cholinerge Transmission beeinflussen:
 - In zellulären Ableitungen in myenterischen Neuronen des Meerschweinchenileums reduzierten CP55940 und WIN 55,212-2 die Amplituden der schnellen, Acetylcholin-vermittelten Komponente des exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) auf eine SR141716A-sensitive Weise. WIN 55,212-2 war außerdem in der Lage, die Amplitude der langsamen (NANC-vermittelten) Komponente des EPSP zu reduzieren (Lopez-Redondo, 1997).
 - In elektrophysiologische Untersuchungen des Colons von Wildtyp- und CB1-Rezeptor-Knockout-Mäusen verminderten die CB1-Agonisten Anandamid und WIN 55,212-2 signifikant elektrisch induzierte schnelle (cholinerge) „exzitatorische junctionale Potentiale“ (EJP) in Wildtyp-Mäusen, während EJPs in CB1-KO-Mäusen unverändert blieben. Der Effekt in den WT-Mäusen konnte durch SR141716A antagonisiert werden. Die fehlende Wirkung in den CB1-KO-Mäusen lässt auf eine alleinige Beteiligung von CB1-Rezeptoren an der hemmenden Wirkung der Cannabinoidagonisten am Colon schließen (Storr, 2004), während im Ileum auch Vanilloidrezeptoren beteiligt zu sein scheinen (siehe unten).
- Elektrisch ausgelöste Kontraktionen der MPLM von Meerschweinchen und Menschen, die durch Cannabinoidagonisten gehemmt werden konnten, wurden durch Tetrodotoxin, einem natürlichen Na⁺-Kanal-Blocker, geblockt. Dies impliziert eine Freisetzung von kontraktile Transmittern und nicht eine direkte Stimulation der glatten Muskulatur (Manara, 2002).
- Auch immunhistochemische und molekularbiologische Verfahren belegen eine präjunktionale Lokalisation (Buckley 1998; Anavi-Goffer, 2000; Casu, 2003).

Zahlreiche funktionelle Studien belegen, dass CB1-Agonisten bedeutend an der Regulation der cholinergen Transmission involviert sind.

Izzo et al. demonstrierten, dass die hemmende Wirkung von Anandamid auf cholinerg vermittelte Kontraktionen der zirkulären Muskulatur des Meerschweinchen durch Apamin aufgehoben werden konnte. Apamin ist ein Hemmer von „small conductance“ Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen, die in der Gegenwart von ATP geöffnet werden. Somit scheint es möglich, dass Anandamid ATP oder ein anderes verwandtes Purin freisetzt.

Während die cholinerge Transmission auf eine ähnliche Weise durch Interaktion von Cannabinoiden mit Vanilloid- und non-CB1,non-CB2 Rezeptoren beeinflusst wird (siehe entsprechende Kapitel), spielen Opiodrezeptoren und α -Adrenozeptoren keine Rolle, da weder der Opiodrezeptor-Antagonist Naloxon noch die α -Adrenoceptor-Antagonisten Yohimbin (α_2) und Phentolamin ($\alpha_1+\alpha_2$) den inhibitorischen Effekt der Cannabinoide beeinflussen konnten (Pertwee,1997; Izzo,1998).

4.2.10.2. Einfluss auf die non-adrenerge, non-cholinerge (NANC-) Übertragung

- Hemmung der exzitatorischen Übertragung

Neben Acetylcholin gibt es noch weitere exzitatorische Substanzen im enterischen Nervensystem, wie Serotonin (5-HT) und Tachykinine (Olsson, 2001; Furness, 1987).

In der zirkulären Muskulatur des Meerschweinchenileums wurde auch in Gegenwart von Atropin (anti-cholinerg) und Guanethidin (anti-adrenerg) durch elektrische Stimulation eine kontraktile Antwort hervorgerufen, die somit auf der Freisetzung von Tachykininen aus postganglionären Neuronen basiert. Auch in diesem Versuchsschema vermochten die beiden CB-Agonisten Anandamid und WIN55,212-2 diese non-adrenerge, non-cholinerge Antwort auf eine SR141716A-sensitive Weise zu

reduzieren. Dabei scheinen die CB-Agonisten auch hier präjunktional zu wirken, da Kontraktionen, die durch Zugabe von Substanz P hervorgerufen wurden, nicht modifiziert werden. Interessanterweise blieb unter NANC-Bedingungen die Zugabe von Apamin ohne Folgen auf die inhibitorische Wirkung der Cannabinoide (Izzo, 1998).

Einen zusätzlichen Beleg für diese Hypothese lieferten elektrophysiologische Untersuchungen, die einen hemmenden Effekt von WIN 55,212-2 auf die langsame, nichtcholinerge Komponente der EPSP erkennen ließen (Lopez-Redondo, 1997).

Eine andere neurohumorale Substanz, die stimulierend wirkt und deren Aktivität ebenfalls durch CB1-Agonisten beeinflusst wird, ist Adenosin. Eine Stimulation des CB1-Rezeptors führt dabei zu einer Hemmung der elektrisch induzierten Freisetzung von Adenosin in MPLM-Präparationen (Begg, 2002).

Auf glatten Muskelzellen gibt es zwei verschiedene Adenosinrezeptoren, von denen der erste eine Kontraktion (A_1), der zweite eine Relaxation (A_2) bewirkt. Bei gleichzeitiger Aktivierung ist aufgrund der größeren Potenz von A_1 netto eine Kontraktion zu verzeichnen (Hansen, 2003).

So kann also über eine Hemmung der Adenosinfreisetzung die kontraktile Antwort auf elektrische Stimulation abgeschwächt werden.

- Aktivierung der inhibitorischen Übertragung

In der Regulation der Motilität des Dünndarms spielen neben exzitatorischen auch inhibitorische Signalübertragungswege eine bedeutende Rolle. Wie oben eingehend erläutert sind dabei verschiedene Neurotransmitter involviert.

Heinemann et al. (1999) zeigten in Peristaltikversuchen am Ileum des Meerschweinchens, dass die hemmende Wirkung von Methanandamid durch Apamin geblockt und durch L-NAME (Inhibitor der NO-Synthetase) abgeschwächt werden konnte und folgerten daraus, dass der CB1-

Rezeptor eine Aktivierung der inhibitorischen Signaltransduktion durch Freisetzung eines Apamin-sensitiven Transmitters und NO vermittelt. Diese Gruppe postuliert, dass die Wirkung über den CB1-Rezeptor vermittelt wird. Versuche an der Trachea des Meerschweinchens zeigten ebenfalls, dass WIN 55,212-2 die NO-vermittelte Komponente der non-adrenergen, non-cholinergen relaxierenden Antwort auf EFS potenzieren konnte. Allerdings geschah dies über einen Mechanismus, der nicht über den CB1- oder CB2-Rezeptor gekoppelt ist, sondern über einen anderen non-CB1, non-CB2 – Rezeptor (Nieri, 2003).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen konnten Storr et al. (2004) eine signifikante Hemmung der schnellen IJPs (inhibitorisches Junctionspotential) im Mäusekolon durch WIN 55,212-2 nachweisen. Dieser inhibitorische Effekt auf die non-adrenerge, non-cholinerge, inhibitorische neuronale Übertragung scheint über den CB1-Rezeptor vermittelt zu sein, da er SR141716A-sensibel ist und in CB1-defizienten Mäusen nicht zu beobachten ist.

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse, so kann man zusammenfassen, dass es zwar mittlerweile große Fortschritte bei der Erforschung des Wirkmechanismus der Cannabinoide gibt, viele Zusammenhänge aber noch unklar sind und einer weiteren intensiven Untersuchung bedürfen.

5. Spezielle Diskussion

5.1. Einfluß der Cannabinoidrezeptoragonisten Anandamid, WIN 55,212 und ACEA auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der CB1^{+/+} - und CB1^{-/-} - Maus

Durch elektrische Feldstimulation ausgelöste Kontraktionen werden durch die Freisetzung von Acetylcholin aus enterischen cholinergen Neuronen vermittelt, da diese durch Zugabe von Atropin oder TTX in das Organbad blockiert werden können. Sie sind also neuronal und cholinerg vermittelt. Wie von mehreren Autoren übereinstimmend dargestellt, können derartige Kontraktionen durch Cannabinoidagonisten und –antagonisten beeinflusst werden. So wurde in mehreren Arbeiten eine hemmende Wirkung der Cannabinoidagonisten festgestellt (Roth, 1978; Pertwee 1996; Coutts, 1997). Es konnte dabei auch gezeigt werden, dass es sich bei der modifizierenden Wirkung um eine präjunktionale Aktion handeln muß, da Kontraktionen, die durch Zugabe von exogenem Acetylcholin, i.e. Carbachol, ausgelöst wurden, weder hemmend noch stimulierend beeinflusst wurden. Carbachol entfaltet seine Wirkung direkt an glatten Muskelzellen, indem es Muskarinrezeptoren aktiviert (Johnson, 1987).

Immunhistochemische Untersuchungen belegten, dass eine hohe Immunreaktivität aber auch in der glatten Muskulatur des Dünndarms von Mäusen zu finden war (Casu, 2003) und dass CB1R-immunreaktive Neurone eine zusätzliche Immunreaktivität zu dem cholinergen Marker ChAT exprimieren, was für unsere Versuche von Bedeutung war, da man aufgrund dieser Untersuchungen von einem modulierenden Einfluß des Endocannabinoidsystems auf die cholinerge Neurotransmission des Dünndarms ausgehen kann.

Die als erstes durchgeführte Versuchsreihe untersuchte den Einfluß der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA in unterschiedlichen

Konzentrationen auf elektrisch induzierte Kontraktionen. Dabei besitzen diese Agonisten eine unterschiedliche Affinität zum CB1-Rezeptor: ACEA kann als CB1-selektiv angesehen werden, während WIN 55,212-2 als nicht selektiver CB1R-Agonist eine größere Affinität aufweist als Anandamid, das in etwa eine gleiche Affinität zum CB1- und CB2-Rezeptor besitzt.

Die Zugabe von Anandamid 10^{-5} M zu den Organstreifen der $CB1^{+/+}$ - und $CB1^{-/-}$ - Mäuse führte je zu einer signifikanten Hemmung der durch EFS ausgelösten Kontraktionen. Diese ist für beide Genotypen nur unwesentlich unterschiedlich (KO: $85,9\% \pm 3,14$; WT: $87,7\% \pm 2,02$). Davon ausgehend, dass bei der $CB1^{-/-}$ - Maus der CB1-Rezeptor fehlt, muss zumindest hier die Hemmung der Kontraktion über einen Rezeptor vermittelt werden, der nicht der CB1-Rezeptor ist.

In Mesenterialarterien von Ratten und $CB1^{-/-}/CB2^{-/-}$ doppel-Knockout Mäusen (Jarai, 1999) wurden bereits Rezeptoren gefunden, die von Anandamid aktiviert werden können. Derartige Rezeptoren wurden auch im Dünndarm des Meerschweinchens beschrieben, deren Aktivierung die Freisetzung von Acetylcholin nach elektrischer Stimulierung vermindern. Die antagonistische Potenz von SR141716A zeigte sich dabei im Vergleich zur Wirkung am CB1-Rezeptor vermindert. Dies könnte auch dadurch erklärt werden, dass Anandamid sowohl am CB1-Rezeptor als auch an dem non-CB1, non-CB2 – Rezeptor wirkt und SR141716A nur die Wirkung am CB1-Rezeptor hemmt (Mang, 2001). Im Folgenden sei dieser Rezeptortyp non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ I genannt.

Eine Beteiligung eines inzwischen mehrfach beschriebenen non-CB1, non-CB2 – Rezeptors muss auch bei unseren Versuchen an der KO-Maus vermutet werden.

Ein anderer Rezeptorentyp könnte ebenfalls für die beschriebene Hemmung mitverantwortlich sein. Dieser wurde von Di Marzo et al. und Breitvogel et al. im Gehirn von Mäusen entdeckt. Es handelt sich dabei um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der nur durch Anandamid und WIN 55,212-2 aktiviert werden kann, wobei SR141716A keine antagonistische Wirkung besitzt (non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ II).

Die gegenwärtige Studienlage lässt noch keinen eindeutigen Schluß zu, über welchen der genannten non-CB1, non-CB2 – Rezeptoren (Typ I oder Typ II) der inhibierende Effekt von Anandamid bei der KO-Maus vermittelt ist.

Betrachtet man die Ergebnisse der Versuche mit dem Cannabinoidagonisten WIN 55,212-2, so können die Wirkungen auch hier nicht alleine durch den CB1-Rezeptor erklärt werden:

In der Konzentration 10^{-5} M konnte sowohl bei der $CB1^{-/-}$ - Maus (Restplateau: $89,2\% \pm 3,48$) als auch bei der $CB1^{+/+}$ - Maus ($85,9 \pm 2,94$) eine signifikante Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktion nachgewiesen werden. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss auch hier der Einfluß eines Rezeptors, der sich vom CB1-Rezeptor unterscheidet, angenommen werden. Es könnte sich dabei um den non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ II handeln. Dafür spricht auch, dass der selektive CB1-Rezeptorantagonist SR 141716A die Hemmung, die durch Anandamid und WIN 55,212-2 in der Konzentration 10^{-5} M erreicht wurde, nicht modifizieren konnte.

Der Einfluss des selektiven CB1R-Agonisten ACEA auf elektrisch induzierte Kontraktionen entsprach den Erwartungen. In der Konzentration 10^{-5} M konnte kein hemmender Effekt ($99,17\% \pm 3,63$) bei den Organstreifen der $CB1^{-/-}$ - Maus beobachtet werden. Dies war zu erwarten, da der CB1-Rezeptor als Angriffspunkt für ACEA fehlt.

Bei der $CB1^{+/+}$ - Maus hingegen kam es in der gleichen Konzentration zu einer signifikanten Hemmung (16 Hz: $84,7\% \pm 5,7$; 8 Hz: $86,67\% \pm 3,92$), die folglich über den CB1-Rezeptor gekoppelt ist.

Vergleicht man den Einfluss der untersuchten Agonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der $CB1^{-/-}$ - Maus, so zeigt sich, dass nur Anandamid 10^{-5} M und WIN 55,212-2 10^{-5} M einen hemmenden Effekt bewirken können, während ACEA 10^{-5} M erwartungsgemäß keine Wirkung hat. Die Hemmung bei Anandamid und WIN 55,212-2 ist über non-CB1, non-CB2 – Rezeptoren vermittelt, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden. Mit GPR55 und GPR 119 wurden inzwischen zwei neue Cannabinoidrezeptoren

charakterisiert (Brown, 2007). Inwiefern diese Rezeptoren in die Regulationsmechanismen der intestinalen Motilität involviert, ist derzeit noch nicht klar und wird sicherlich Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5.2. Einfluß des CB1R-Antagonisten SR141716A auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der CB1^{+/+} - und CB1^{-/-} - Maus

SR141716A wurde als erster selektiver CB1R-Antagonist synthetisiert (Rinaldi-Carmona 1994). Eine Reihe von Publikationen zeigte, dass dieser Ligand per se Effekte auf die glatte Muskulatur des Darms ausübt. Beschrieben wurden dabei antagonistische Wirkungen bei einem endogenen Tonus der Cannabinoiden oder Wirkungen als inverser Agonist mit separater Bindungsstelle am CB1-Rezeptor.

In den vorliegenden Versuchen konnte eine weitgehend signifikante Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionen sowohl der CB1^{-/-} - Maus als auch der CB1^{+/+} - Maus durch die Zugabe von SR141716A (10^{-9} M – 10^{-6} M) beobachtet werden. Der Effekt auf die glatte Muskulatur der CB1^{+/+} - Maus entspricht den Ergebnissen, die bisher publiziert wurden. Dass allerdings auch bei der CB1^{-/-} - Maus eine stimulierende Wirkung nachgewiesen wurde, suggeriert auch hier den Einfluß eines Rezeptors, der sich von dem bekannten CB1-Rezeptor unterscheidet.

Der oben beschriebene Rezeptortyp (non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ I), der für die Wirkung von Anandamid verantwortlich sein könnte, besitzt auch eine Sensitivität zu SR141716A, wenn auch mit geringerer Potenz als der CB1-Rezeptor. Es ist daher denkbar, dass eine Bindung von SR141716A an diesen Rezeptortyp auch in Abwesenheit des CB1-Rezeptors zu einer Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionen führen kann. Dies haben wir an der KO-Maus gezeigt.

5.3. Einfluß des TRPV1-Rezeptor-Agonisten Capsaicin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der CB1^{+/+} - und CB1^{-/-} - Maus

Die Bindung von Capsaicin an den TRPV1-Rezeptor führt zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und in Folge zu einer gesteigerten Kontraktibilität. In mehreren Arbeiten wurde eine Interaktion des Endovanilloid- und des Endocannabinoidsystems beschrieben (Maccarrone, 2000; Remkumar, 2000).

Um zu charakterisieren, ob derartige TRPV1-Effekte an der CB1^{-/-} - Maus verstärkt sind, z.B. im Rahmen von Kompensationsmechanismen, haben wir Untersuchungen mit dem TRPV1-Agonist Capsaicin durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass durch die Zugabe des Vanilloidrezeptoragonisten eine Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionen der glatten Muskulatur sowohl der CB1^{-/-} - Maus als auch der CB1^{+/+} - Maus erreicht wurden. Allerdings war dieser Effekt bei der CB1^{-/-} - Maus stärker ausgebildet. Wie von Ahluwalia et al. dargestellt, könnte durch die Aktivierung des TRPV1-Rezeptors eine Freisetzung von Endocannabinoiden erfolgen, welche durch eine CB1-Rezeptor gekoppelte Reaktion die Wirkung von Capsaicin abschwächt. Dies könnte eine Erklärung für die größere Steigerung bei der CB1^{-/-} - Maus sein.

Andererseits wird auch ein tonisch hemmender Effekt auf TRPV1-Rezeptoren durch CB-Rezeptoren erwogen. Bei Fehlen des CB1-Rezeptors würde dieser hemmende Effekt entfallen und eine stärkere Steigerung zur Folge haben.

Zusammenfassend stellen wir fest, dass TRPV1-vermittelte Mechanismen bei den KO-Mäusen stärker ausgeprägt sind.

5.4. Einfluss von CBR-Agonisten Anandamide, ACEA und WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 14176A

Durch Zugabe des selektiven CB1R-Antagonisten SR141716A 10^{-6} M in das Organbad wurde untersucht, ob die oben dargestellte Wirkung der Cannabinoidagonisten modifiziert werden kann. Die Konzentration 10^{-6} M wurde entsprechend den oben dargestellten Versuchen ausgewählt, weil hier die größte Konzentration bei noch spezifischer Wirkung erreicht wurde.

Der Effekt von Anandamid auf die CB1^{-/-} - Maus konnte durch die Zugabe des selektiven CB1R-Antagonisten nicht signifikant beeinflusst werden. Geht man davon aus, dass die Hemmung, die durch Anandamid erreicht wird, über einen non-CB1-Rezeptor vermittelt wird, kann man an dieser Stelle postulieren, dass dieser Rezeptor keine antagonistische Wirkung durch SR141716A erfährt, also nicht SR141716A-sensitiv ist und somit dem non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ II entspricht.

Interessanterweise führte die gleichzeitige Zugabe von SR141716A und Anandamid in das Organbad bei der CB1^{+/+} - Maus zu einer signifikant stärkeren Hemmung der elektrisch induzierten Kontraktionen als durch alleinige Zugabe von Anandamid. Diese synergistische Wirkung bleibt insbesondere vor dem Hintergrund, dass SR141716A alleine bei den CB1^{-/-} - Tieren tonuserhöhend wirkt, unklar.

Aufgrund der Ergebnisse, die durch die alleinige Zugabe von WIN 55,212 zum Organbad gewonnen wurden, wurde oben eine Beteiligung zweier unterschiedlicher Rezeptorentypen diskutiert: zum einen der bekannte CB1-Rezeptor, zum anderen ein non-CB1, WIN 55,212-2-sensitiver Rezeptor. Die Hypothese der unterschiedlichen Bindungsstellen des CB-Agonisten und einer dosisabhängigen Aktivierung kann auch in diesem Versuchsssetup bei gleichzeitiger Zugabe von WIN55,212-2 und SR141716A bekräftigt werden.

So zeigte sich, dass die Hemmung, die durch Zugabe von WIN 55,212-2 10^{-6} M zu den Organstreifen der CB1^{+/+} - Maus erreicht wurde, durch SR141716A 10^{-6} M deutlich reduziert werden konnte, während die Hemmung durch WIN 55,212-2 10^{-5} M weitgehend unverändert blieb. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass WIN 55,212-2 in kleinerer Konzentration zunächst über den CB1-Rezeptor wirkt, weshalb hier die Wirkung durch Zugabe des CB1R-Antagonisten aufgehoben werden kann. Erst ab einer Konzentration WIN 55,212-2 $>10^{-5}$ M wird ein anderer Rezeptor (non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ II) aktiviert, der durch SR141716A nicht beeinflusst wird und somit nicht dem CB1-Rezeptor entspricht.

Die hemmende Wirkung des selektiven CB1R-Agonisten ACEA auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur konnte erwartungsgemäß durch die Zugabe des selektiven CB1R-Antagonisten zu dem Organbad aufgehoben werden. Durch die Selektivität der beiden Substanzen scheint hier tatsächlich die Bindungsstelle am CB1-Rezeptor gleich zu sein, weshalb bei Zugabe des Antagonisten zu einer Verdrängung des Agonisten von der Bindungsstelle kommt und schließlich sogar zu einer invers agonistischen Wirkung.

5.5. Einfluss von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der Maus

Nachdem Pinto et al. (2002) zeigten, dass die hemmende Wirkung von Anandamid auf cholinerg vermittelte Kontraktionen der zirkulären Muskulatur des Meerschweinchens durch Apamin aufgehoben wird, wird für den Ablauf der Anandamid-Wirkung eine Freisetzung von ATP oder eines verwandten Purins diskutiert. ATP führt zu einer Öffnung von „small conductance“ Ca^{2+} -abhängigen K^{+} -Kanälen, die durch Apamin geblockt werden.

Aufgrund dieser Kenntnisse wurde der Einfluß von Apamin zunächst per se auf elektrisch induzierte Kontraktion, anschließend der Einfluß auf die Wirkung des CB1R-Antagonisten SR141716A und des CBR-Agonisten WIN 55,212-2 untersucht.

Die alleinige Zugabe von Apamin zu den Organstreifen bewirkte eine signifikante Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionen der CB1^{+/+} - Maus, während bei der CB1^{-/-} - Maus interessanterweise kein wesentlicher Einfluß zu erkennen war. Um die invers agonistische Wirkung von SR141716A zu erklären, wurde von mehreren Autoren suggeriert, dass es einen endogenen Tonus der Cannabinoide gibt, der kontinuierlich zu einer Erregung der CB1-Rezeptoren führt. Zieht man diese Hypothese heran, könnte man auch die exzitatorische Wirkung von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der CB1^{+/+} - Maus erklären. So könnte tatsächlich ein gewisser endogener Tonus der Cannabinoiden zu einer CB1-Rezeptoraktivierung führen, wodurch ATP bzw. ein dem ATP verwandtes Purin freigesetzt wird. Dadurch würde eine tonische Hemmung entstehen, die durch Apamin, das die K⁺-Kanäle blockiert, die durch ATP geöffnet werden, aufgehoben werden kann.

Zu dieser Vermutung passt auch die Beobachtung, dass sich die Zunahme der Höhe Kontraktionen, die durch Zugabe von SR141716A zu den Organbädern erreicht werden kann, durch zusätzliche Applikation von Apamin nicht steigern lässt.

Die Untersuchung des Einflusses von Apamin auf die hemmende Wirkung von WIN 55,212-2 läßt auf eine wichtige Rolle der Apamin-sensitiven Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle in der Signaltransduktion der involvierten WIN 55,212-2-sensitiven CB-Rezeptoren schließen. Es zeigt sich nämlich, dass die hemmende Wirkung von WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen sowohl bei CB1^{-/-} - Maus als auch bei CB1^{+/+} - Maus aufgehoben werden kann.

Faßt man die zuletzt diskutierten Ergebnisse zusammen, so scheint sowohl der CB1-Rezeptor als auch der non-CB1, non-CB2 –Rezeptor Typ II, der durch WIN 55,212-2 aktiviert werden kann, bei Aktivierung ATP oder ein ähnliches Purin

freizusetzen, das durch Öffnung von K⁺-Kanälen zu einer Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der Maus führt.

5.6. Einfluß des endogenen CBR-Agonisten Anandamid und des CB1R-Antagonisten SR141716A auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen

Wie bereits mehrfach erwähnt, wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Wirkungen, die über Cannabinoidrezeptoren vermittelt werden, um präjunktionale Aktionen handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass pharmakologisch mit Carbachol induzierte Kontraktionen durch Zugabe von Anandamid nicht beeinflusst werden konnten. Dies gilt sowohl für CB1^{-/-} - als auch für CB1^{+/+} -Mäuse.

Durch die Zugabe von Anandamid konnte eine Steigerung der Kontraktionen erreicht werden. Da eine Beteiligung des Endocannabinoidsystems bei diesem Effekt unwahrscheinlich ist, könnte hier eine Interaktion mit dem Endovanilloidsystem zugrunde liegen. Anandamid könnte aufgrund seiner strukturellen Gemeinsamkeiten mit Capsaicin zu einer Aktivierung des TRPV1-Rezeptors führen, wodurch es über eine Freisetzung von Tachykininen zur Aktivierung von NK1- und NK3-Rezeptoren kommt und schließlich zur Freisetzung von Acetylcholin. Die genaue Charakterisierung dieser Mechanismen war aber nicht Ziel dieser Arbeit.

SR141716A konnte bei der CB1^{-/-} - Maus keinen Einfluß auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur hervorrufen. Hingegen wurde eine Steigerung der durch Carbachol ausgelösten Kontraktionen bei der CB1^{+/+} -Maus beobachtet. Eine direkte Wirkung auf das Endovanilloidsystem durch SR141716A wie bei Anandamid ist sehr unwahrscheinlich, so dass letztlich dieser Effekt als unklar angesehen werden muß. Zu denken wäre eine Hemmung bei einem bestehenden Tonus endogener Cannabinoiden durch SR141716A am CB1-

Rezeptor, der zu einer geringeren Hemmung des Endovanilloidsystems führt. Dadurch würde eine Steigerung der pharmakologisch induzierten Kontraktion zu erklären sein. Diese Hypothesen sind allerdings sehr spekulativ und bedürfen sicherlich weiterer eingehender Untersuchungen.

5.7. Einfluß des endogenen CBR-Agonisten WIN 55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Cannabinoidagonist WIN 55,212-2 auch unter nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Bedingungen zu einer Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen bewirkt (Izzo, 1998; Begg, 2002; Storr, 2004).

Die dabei zugrunde liegenden Regulationsmechanismen können zu einer Hemmung die exzitatorische Komponente oder zu einer Aktivierung der inhibitorischen Komponente führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erwartungsgemäß nachgewiesen werden, dass WIN 55,212-2 eine signifikante Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen unter non-adrenergen (Guanethidin) und non-cholinergen (Atropin) Bedingungen bewirkt.

Dieser Effekt war bei den CB1^{+/+} - und bei den CB1^{-/-} gleichermaßen ausgeprägt, so dass auch hier die Wirkung vermutlich über den non-CB1, non-CB2 – Rezeptors Typ II vermittelt wird. Allerdings ist es auch möglich, dass der hemmende Effekt bei der CB1^{+/+} – Maus überwiegend über den CB1-Rezeptor vermittelt wird, während es bei der konstitutionellen CB1^{-/-} – Maus aufgrund von Kompensationsmechanismen zu einer vermehrten Expression des non-CB1, non-CB2 – Rezeptors Typ II kommt und bei dessen Aktivierung zu einer ähnlich starken Wirkung wie am CB1-Rezeptor.

Eine genauere Untersuchung, ob die exzitatorische oder inhibitorische Komponente beeinflusst wurde, war nicht Gegenstand dieser Arbeit.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß des Endocannabinoidsystems auf die Motilität der glatten Muskulatur des Ileums untersucht. Die Versuche wurden an intakten Ileum-Präparationen von Wildtyp- und CB1-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt. Zu den untersuchten Cannabinoidrezeptoragonisten zählten Anandamid (endogen), WIN 55,212-2 und ACEA (beide synthetisch). Als selektiven CB1-Rezeptorantagonist verwendeten wir SR141716A.

Um Interaktionen des Endocannabinoidsystems mit dem Endovanilloidsystems zu beobachten, verwendeten wir außerdem Capsaicin, ein TRPV1-Rezeptoragonist.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt.

1.) Einfluß der CB-Rezeptoragonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums.

Bei der WT-Maus konnten sowohl die beiden nicht selektiven CB1-Rezeptoragonisten Anandamid und WIN 55,212-2 als auch der selektive CB1-Rezeptoragonist ACEA eine signifikante Hemmung des maximalen Kontraktionsniveaus nach elektrischer Feldstimulation bewirken.

Bei der CB1^{-/-} - Maus hingegen wurde dies nur durch Anandamid und WIN 55,212-2 erreicht, während ACEA ohne Effekt blieb. Die fehlende Wirkung von ACEA war hier zu erwarten, da es als selektiver Agonist keine Bindungsstelle findet.

Die Hemmung der beiden anderen Agonisten muß über einen anderen Cannabinoidrezeptor (non-CB1, non-CB2 – Rezeptor) vermittelt sein.

Die Potenz der einzelnen Agonisten war bei der CB1^{+/+} - Maus in etwa gleich, bei der CB1^{-/-} - Maus erzielten Anandamid und WIN 55,212-2 eine etwa gleiche Wirkung.

2.) Einfluß des CB-Rezeptorantagonisten SR141716A auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums

SR141716A konnte sowohl bei der CB1^{+/+} - als auch bei der CB1^{-/-} - Maus das maximale Kontraktionsniveau anheben. Während dieser Effekt bei der WT-Maus über eine Aktivierung des CB1-Rezeptors erklärt werden kann, ist bei der KO-Maus eine Aktion über einen SR141716A sensitiven non-CB1, non-CB2 –Rezeptor (non-CB1, nonCB2 – Rezeptor Typ I) zu vermuten.

3.) Einfluß der CB-Rezeptoragonisten auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums in Gegenwart von SR141716A

Der hemmende Effekt von ACEA bei der CB1^{+/+} - Maus konnte erwartungsgemäß durch SR141716A signifikant antagonisiert und damit die selektive Wirkung am CB1-Rezeptor verifiziert werden.

Die Wirkung der beiden anderen CB-Rezeptoragonisten wurde sowohl bei der CB1^{+/+} - als auch bei der CB1^{-/-} - Maus durch den selektiven CB1-Rezeptorantagonisten nicht beeinflusst. Dadurch wurde die zuvor genannte Hypothese eines involvierten non-CB1, non-CB2 – Rezeptors bekräftigt. Da SR141716A keinerlei modifizierende Wirkung ausüben konnte, handelt es sich um einen non-SR141716A sensitiven, non-CB1, non-CB2 – Rezeptor (non-CB1, non-CB2 – Rezeptor Typ II).

4.) Einfluß des TRPV1-Agonisten Capsaicin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums

Sowohl bei der CB1^{+/+} - als auch bei der CB1^{-/-} - Maus wurde nach Zugabe von Capsaicin ein Steigerung des maximalen Kontraktionsniveaus beobachtet, allerdings war der Effekt bei der KO-Maus stärker ausgeprägt. Wie bereits von anderen Autoren berichtet, besteht eine Interaktion des Endocannabinoid- und des Endovannilloidsystems mit hemmenden Effekt einer CB1 - Rezeptoraktivierung auf die Capsaicinwirkung.

5.) Einfluß von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums

Apamin führte zu einer signifikanten Steigerung der elektrisch induzierten Kontraktionen bei der WT-Maus im Vergleich zur KO-Maus. Wir schließen daraus eine wesentliche Beteiligung von ATP oder einem verwandtem Purin in der Signaltransduktion des CB1-Rezeptors. Andererseits konnte durch Apamin der hemmende Effekt von WIN55,212-2 auf elektrisch induzierte Kontraktionen bei der KO-Maus antagonisiert werden. In der Signaltransduktion des non-CB1, non-CB-2 – Rezeptors Typ II scheint somit auch die Öffnung von small conductance Ca^{2+} - abhängigen K^+ -Kanälen durch Freisetzung von ATP ein wesentliches Element zu sein.

6.) Einfluß des CB-Rezeptoragonisten Anandamid und des CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A auf pharmakologisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums

Erwartungsgemäß führte die Zugabe von Anandamid bei allen Tieren zu keiner Hemmung der pharmakologisch induzierten Kontraktion, da es sich hier um eine postjunktionale Aktion handelt.

SR141716A blieb bei der KO-Maus ohne Effekt. Bei der WT-Maus hingegen konnte eine Steigerung des Kontraktionsniveaus festgestellt werden. Dies könnte durch eine SR141716A vermittelte Hemmung am CB1-Rezeptor bei einem bestehenden Tonus endogener Cannabinoide erklärt werden.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Rezeptorbindung der Cannabinoidagonisten und des Antagonisten SR141716A.

	CB1 ^{+/+} -Maus	CB1 ^{-/-} -Maus
ACEA (Agonist)	CB1-Rezeptor	Keine Wirkung
Anandamid (Agonist)	non-CB1, non-CB2-Rezeptor II CB1-Rezeptor	non-CB1, non-CB2-Rezeptor II
WIN 55,212 (Agonist)	non-CB1, non-CB2-Rezeptor II CB1-Rezeptor	non-CB1, non-CB2-Rezeptor II
SR141716A (Antagonist)	non-CB1, non-CB2-Rezeptor I CB1-Rezeptor	non-CB1, non-CB2-Rezeptor I

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluß des Endocannabinoidsystems auf die Motilität des Dünndarms bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Wirkungen über verschiedene Rezeptorentypen vermittelt werden. Eine weitere Charakterisierung der einzelnen Rezeptoren und der Signaltransduktionswege ist wichtig, da eine pharmakologische Beeinflussung des Endocannabinoidsystems ein Erfolg versprechender Angriffspunkt für eine Reihe von gastroenterologischen Erkrankungen des Menschen darstellt, wie zum Beispiel chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Durchfälle, Reizdarmsyndrom und auch Erbrechen und Übelkeit.

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Schematisierte Darstellung des Versuchsmodells

Abb. 2: Darstellung der durch den Flachsreiber aufgezeichneten Kontraktionen, die durch elektrische Stimulation (Frequenz: 16 Hz, 8 Hz, 4 Hz, 2 Hz; Spannung 40 V; Pulsdauer 1 ms; Stimulationsdauer 10 sec.) induziert wurden.

Abb. 3: Darstellung der durch den Flachsreiber aufgezeichneten Kontraktionen, die durch pharmakologische Stimulation mit Carbachol in aufsteigender Konzentration (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} und 3×10^{-6}) induziert wurden.

* Keine nachweisbare Kontraktion bei Zugabe Carbachol 10^{-8} .

Abb. 4: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten Anandamid in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus. $n > 9$, * = $p < 0,05$;

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Abb. 5: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten WIN 55,212-2 in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus, $n = 6$, * = $p < 0,05$ (Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (KO vs. WT);

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Abb. 6: Darstellung des Einflusses des CBR-Agonisten ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (8 Hz). $n \geq 5$, * = $p < 0,05$ (Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (KO vs. WT);

- a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,
- b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Abb. 7: Vergleich des Einflusses der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Maus.

- a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,
- b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Abb. 8: Vergleich des Einflusses der CBR-Agonisten Anandamid, WIN 55,212-2 und ACEA in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der KO-Maus.

- a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz
- b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz

Abb. 9: Darstellung des Einflusses des CB1R-Antagonisten SR1414716 in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = $p < 0,05$, $n = 10$.

Abb. 10: Darstellung des Einflusses des TPRV1-Antagonisten Capsazepin in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), $n = 6$.

Abb. 11: Darstellung des Einflusses des TPRV1-Agonisten in aufsteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = $p < 0,05$ (in Bezug auf Basalwert), ** = $p < 0,05$ (KO vs. WT), $n = 6$

Abb. 12: Darstellung des Einflusses von Anandamid in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz) in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M, * = $p < 0,05$ (Anandamid vs. SR141716 → Anandamid).

Abb. 13: Darstellung des Einflusses von WIN 55,212 in ansteigender Konzentration auf elektrisch (8 Hz) induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus alleine und in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M.

Abb. 14: Darstellung des Einflusses von ACEA in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus (8 Hz) nach alleiniger Zugabe zum Organbad und in Gegenwart des CB1R-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M; * = $p < 0,05$ ACEA vs. SR141716 → ACEA.

Abb. 15: Darstellung des Einflusses von Apamin in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz), * = Kontrolle vs. Apamin, ** = $p < 0,05$ KO vs. WT, n=6;

Abb. 16: Darstellung des Einflusses von SR141716 in ansteigender Konzentration auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (16 Hz) in Gegenwart des Inhibitors der "small conductance" Ca^{++} abhängigen Kaliumkanäle Apamin 10^{-7} M; * = $p < 0,05$ basal vs. 10^x , ** = $p < 0,05$ KO vs. WT.

a) Elektrische Stimulation mit 16 Hz,

b) Elektrische Stimulation mit 8 Hz.

Abb. 17: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212 alleine und in Gegenwart von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der KO-Maus, * = $p < 0,05$ WIN 55,212 vs. Apamin → WIN 55,212

Abb. 18: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212 alleine und in Gegenwart von Apamin auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur des Ileums der WT-Maus, * = $p < 0,05$ WIN 55,212 vs. Apamin → WIN 55,212

Abb. 19: Einfluß des endogenen CBR-Agonisten Anandamid auf pharmakologisch (Carbachol 10^{-6} M) induzierte Kontraktion. * = $p < 0,05$ basal vs. 10^x M;

Abb. 20: Einfluß des selektiven CB1R-Antagonisten SR141716 auf pharmakologisch (Carbachol 10^{-6} M) induzierte Kontraktionen. * = $p < 0,05$ basal vs. 10^x M; n=6;

Abb. 21: Aufbau des CB1- bzw. CB2-Rezeptors im Vergleich (Janet, 1999)

Abb. 22: Signaltransduktion nach Bindung eines Agonisten am CB1- und CB2-Rezeptor. Beide Rezeptoren sind an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt. Dies führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase (AC) und zu einer Aktivierung einer Kaskade durch eine extrazellulär signalregulierte Kinase (ERK). Außerdem werden Ca^{2+} -Kanäle gehemmt, während K^+ -Kanäle aktiviert werden. Dies führt zu einer Hyperpolarisation und somit verminderter Aktivität (Izzo, 2001).

Abb. 23: Darstellung der Regulation der Adenylatzyklase: Nach Rezeptorbindung kommt es zu einer Aktivierung eines stimulierenden (G_s) bzw. inhibierenden (G_i) G-Proteins. Das aktivierte G_s -Protein erhöht, das aktivierte G_i -Protein vermindert die Aktivität der Adenylatzyklase und somit die cAMP-Konzentration (Silbernagl, 1996).

Abb. 24: Regulation von intrazellulären Ca^{2+} -Übergängen: Über Rezeptorbindung und folgender G-Proteinaktivierung wird die Phospholipase C aktiviert, was eine Freisetzung von IP3 zur Folge hat. IP3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei (Silbernagl, 1996).

Abb. 25: Strukturformeln der „klassischen“ Cannabinoide Δ^9 -THC, Δ^8 -THC und HU-210.

Abb. 26: Strukturformel des „nicht klassischen“ Cannabinoids CP-55,940.

Abb. 27: Strukturformel des Aminoalkylindols R-(+)-WIN 55,212.

Abb. 28: Strukturformeln der Eicosanoide Anandamid, 2-AG und ACEA.

Abb. 29: Strukturformel des selektiven CB1-Rezeptorantagonisten SR141716A.

Abb. 30: Darstellung der Endocannabinoiden-Inaktivierung: Über ein Transportprotein werden Endocannabinoide in Zelle aufgenommen. Hier erfolgt Hydrolyse durch FAAH (Anandamid und 2-AG) und MAGL (2-AG) (Giufriada, 2001).

Abb. 31: Darstellung der Interaktion des Endocannabinoid- und des Endovallinoidsystems: Durch Aktivierung des CB1-Rezeptors kommt es zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase und der Phospholipase C. Über Aktivierung der Proteinkinasen A und C kommt es zu einer Sensibilitätssteigerung des TRPV1-Rezeptors.

Tab. 1: Darstellung der verwendeten Substanzen, der Rezeptorbindung, Affinität bzgl. CB₁- und CB₂-Rezeptor und Herstellungsfirma der entsprechenden Substanz (Coutts, 2004).

Tab. 2: Kontraktionsniveau nach elektrischer Feldstimulation mit 16 Hz bzw. 8 Hz unter Zugabe von Anandamid 10^{-7} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n >9; * = p < 0,05 (Kontrolle vs. 10^{-x} M);

Tab. 3: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von WIN 55,212 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. $10^{-x}M$);

Tab. 4: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von ACEA 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (horizontal: KO vs. WT);

Tab. 5: Vergleich der hemmenden Wirkung der CBR-Agonisten in der Konzentration 10^{-5} M; * = $p < 0,05$: Vergleich Anandamid vs. WIN 55,212; ** = $p < 0,05$: Vergleich Anandamid vs. ACEA; *** = $p < 0,05$ Vergleich WIN 55,212 vs. ACEA; n = 5-10;

Tab. 6: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von SR 141716 10^{-9} bis 10^{-6} in Relation zum Ausgangswert; n=x; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (horizontal: KO vs. WT);

Tab. 7: Steigerung der Kontraktion unter Zugabe des TPRV1-Agonisten Capsaicin 10^{-5} M in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (Kontrolle vs. $10^{-x}M$); ** = $p < 0,05$ (KO vs. WT)

Tab. 8: Vergleich der Wirkung von Anandamid 10^{-5} M bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT- und KO-Maus (exemplarisch 8 Hz), * = $p < 0,05$ (Anandamid vs. SR141716→Anandamid).

Tab. 9: Vergleich der Wirkung von WIN 55,212 bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus.

Tab. 10: Vergleich der Wirkung von ACEA bei alleiniger Zugabe zum Organbad und nach vorheriger Inkubation mit dem CBR-Antagonisten SR 141716 10^{-6} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen der glatten Muskulatur der WT-Maus.

Tab. 11: Kontraktionsniveau nach elektrischer Stimulation mit 16 bzw. 8 Hz unter Zugabe von Apamin 10^{-9} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$: KO vs. WT;

Tab. 12: Darstellung des Einflusses von Apamin auf die Hemmung elektrisch induzierter Kontraktionen durch WIN 55,212; * = $p < 0,05$: WIN 55,212 vs. Apamin → WIN 55,212.

Tab. 13: Vergleich des Einflusses von WIN 55,212 10^{-5} M auf elektrisch induzierte Kontraktionen unter „normalen“ Bedingungen und unter non-adrenergen, non-cholineren (NANC) Bedingungen. * = $p < 0,05$: KO vs. WT.

Tab. 14: Kontraktionsniveau nach pharmakologischer Stimulation mit CCH 10^{-6} unter Zugabe von Anandamid 10^{-7} bis 10^{-5} in Relation zum Ausgangswert; n=8; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. 10^{-x} M);

Tab. 15: Kontraktionsniveau nach pharmakologischer Stimulation mit CCH 10^{-6} unter Zugabe von SR 141716 10^{-7} und 10^{-6} in Relation zum Ausgangswert; n=6; * = $p < 0,05$ (vertikal: Kontrolle vs. 10^{-x} M);

Tab. 16: Neuronentypen im enterischen Nervensystem des Meerschweinchen-Dünndarms (Furness, 2000)

Tab. 17: Zusammenfassung der Rezeptorbindung der Cannabinoid-agonisten und -antagonisten.

8. Abkürzungsverzeichnis

ACEA	Arachidonyl-2`-chloroethylamid
ACPA	Arachidonylcyclopylamid
2-AG	2-Arachidonoylglycerol
AMT	Anandamid-Membran-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBR	Cannabinoidrezeptor
CCH	Carbachol
ChAT	Cholin-Acetyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid
KO-Maus (CB1 ^{-/-})	Knockout-Maus
EFS	Elektrische Feldstimulation
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
EJP	Exzitatorisches junktionales Potential
ENS	Enterisches Nervensystem
FAAH	Fatty acid amid hydrolase
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ICC	Interstitielle Zellen von Cajal
IJP	Inhibitorisches junktionales Potential
IPAN	Intrinsic afferent primary neurons
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-methylester
MAGL	Monoacylglycerollipase
MPLP	Longitudinalmuskulatur-Präparationen des Plexus myentericus
NANC	Nicht-adrenerg, nicht-cholinerg
NK	Neurokinin
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
n.s.	nicht signifikant
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating peptide
SEM	Standard error of the mean

Abkürzungsverzeichnis

TASK1	TWIK-related acid-sensitive potassium channel 1
Δ^9 -THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
TTX	Tetrodotoxin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
VR	Vanilloidrezeptoren
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WT-Maus(CB1 ^{+/+})	Wildtyp-Maus

9. Literaturverzeichnis

1. Ahluwalia,J., Yaqoob,M., Urban,L., Bevan,S., Nagy,I. Activation of capsaicin-sensitive primary sensory neurones induces anandamide production and release, *J. Neurochem.* 84 (2003) 585-591.
2. Al-Hayani,A., Wease,K.N., Ross,R.A., Pertwee,R.G., Davies,S.N. The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice, *Neuropharmacology* 41 (2001) 1000-1005.
3. Anavi-Goffer,S., McKay,N.G., Ashford,M.L., Coutts,A.A. Vanilloid receptor type 1-immunoreactivity is expressed by intrinsic afferent neurones in the guinea-pig myenteric plexus, *Neurosci. Lett.* 319 (2002) 53-57.
4. Anavi-Goffer,S., Coutts,A.A. Cellular distribution of vanilloid VR1 receptor immunoreactivity in the guinea-pig myenteric plexus, *Eur. J. Pharmacol.* 458 (2003) 61-71.
5. Andersson,D.A., Adner,M., Hogestatt,E.D., Zygmunt,P.M. Mechanisms underlying tissue selectivity of anandamide and other vanilloid receptor agonists, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 705-713.
6. Baker,C.L., McDougall,J.J. The cannabinomimetic arachidonyl-2-chloroethylamide (ACEA) acts on capsaicin-sensitive TRPV1 receptors but not cannabinoid receptors in rat joints, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 1361-1367.
7. Baskfield,C.Y., Martin,B.R., Wiley,J.L. Differential effects of delta9-tetrahydrocannabinol and methanandamide in CB1 knockout and wild-type mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 86-91.
8. Bates,M.D. Development of the enteric nervous system, *Clin. Perinatol.* 29 (2002) 97-114.

9. Beckett,E.A., Horiguchi,K., Khoji,M., Sanders,K.M., Ward,S.M. Loss of enteric motor neurotransmission in the gastric fundus of SI/SI(d) mice, *J. Physiol* 543 (2002) 871-887.
10. Begg,M., Baydoun,A., Parsons,M.E., Molleman,A. Signal transduction of cannabinoid CB1 receptors in a smooth muscle cell line, *J. Physiol* 531 (2001) 95-104.
11. Begg,M., Molleman,A., Parsons,M. Modulation of the release of endogenous gamma-aminobutyric acid by cannabinoids in the guinea pig ileum, *Eur. J. Pharmacol.* 434 (2002) 87-94.
12. Begg,M., Dale,N., Llaudet,E., Molleman,A., Parsons,M.E. Modulation of the release of endogenous adenosine by cannabinoids in the myenteric plexus-longitudinal muscle preparation of the guinea-pig ileum, *Br. J. Pharmacol.* 137 (2002) 1298-1304.
13. Begg,M., Pacher,P., Batkai,S., Osei-Hyiaman,D., Offertaler,L., Mo,F.M., Liu,J., Kunos,G. Evidence for novel cannabinoid receptors, *Pharmacol. Ther.* 106 (2005) 133-145.
14. Berthoud,H.R., Patterson,L.M., Zheng,H. Vagal-enteric interface: vagal activation-induced expression of c-Fos and p-CREB in neurons of the upper gastrointestinal tract and pancreas, *Anat. Rec.* 262 (2001) 29-40.
15. Bian,X., Bertrand,P.P., Bornstein,J.C. Descending inhibitory reflexes involve P2X receptor-mediated transmission from interneurons to motor neurons in guinea-pig ileum, *J. Physiol* 528 (2000) 551-560.
16. Bisogno,T., Hanus,L., De Petrocellis,L., Tchilibon,S., Ponde,D.E., Brandi,I., Moriello,A.S., Davis,J.B., Mechoulam,R., Di,M., V , Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 845-852.

17. Bisogno,T., MacCarrone,M., De Petrocellis,L., Jarrahian,A., Finazzi-Agro,A., Hillard,C., Di,M., V , The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 1982-1989.
18. Bjarnason,I., Takeuchi,K., Bjarnason,A., Adler,S.N., Teahon,K. The G.U.T. of gut, *Scand. J. Gastroenterol.* 39 (2004) 807-815.
19. Bornstein,J.C., Costa,M., Grider,J.R. Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility, *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1 (2004) 34-38.
20. Breivogel,C.S., Childers,S.R. The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors, *Neurobiol. Dis.* 5 (1998) 417-431.
21. Breivogel,C.S., Griffin,G., Di,M., V, Martin,B.R. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain, *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 155-163.
22. Brookes,S.J., Song,Z.M., Steele,P.A., Costa,M. Identification of motor neurons to the longitudinal muscle of the guinea pig ileum, *Gastroenterology* 103 (1992) 961-973.
23. Brookes,S.J., D'Antona,G., Zagorodnyuk,V.P., Humphreys,C.M., Costa,M. Propagating contractions of the circular muscle evoked by slow stretch in flat sheets of guinea-pig ileum, *Neurogastroenterol. Motil.* 13 (2001) 519-531.
24. Brown,A.J. Novel cannabinoid receptors, *Br. J. Pharmacol.* 152 (2007) 567-575.
25. Brown,D.R., Green,B.T., Kulkarni-Narla,A., Poonyachoti,S., Townsend,D. Pharmaconeuroimmunology in the intestinal tract: opioid and cannabinoid receptors, enteric neurons and mucosal defense, *Adv. Exp. Med. Biol.* 493:197-205. (2001) 197-205.
26. Buckley,N.E., Hansson,S., Harta,G., Mezey,E. Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat, *Neuroscience* 82 (1998) 1131-1149.

27. Buckley,N.E., McCoy,K.L., Mezey,E., Bonner,T., Zimmer,A., Felder,C.C., Glass,M., Zimmer,A. Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor, *Eur. J. Pharmacol.* 396 (2000) 141-149.
28. Buckley,N.E. The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 309-318.
29. Bukoski,R.D., Batkai,S., Jarai,Z., Wang,Y., Offertaler,L., Jackson,W.F., Kunos,G. CB(1) receptor antagonist SR141716A inhibits Ca(2+)-induced relaxation in CB(1) receptor-deficient mice, *Hypertension* 39 (2002) 251-257.
30. Burdyga,G., Lal,S., Varro,A., Dimaline,R., Thompson,D.G., Dockray,G.J. Expression of cannabinoid CB1 receptors by vagal afferent neurons is inhibited by cholecystokinin, *J. Neurosci.* 24 (2004) 2708-2715.
31. Calignano,A., La Rana,G., Makriyannis,A., Lin,S.Y., Beltramo,M., Piomelli,D. Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid, *Eur. J. Pharmacol.* 340 (1997) R7-R8.
32. Calignano,A., La,R.G., Giuffrida,A., Piomelli,D. Control of pain initiation by endogenous cannabinoids, *Nature* 394 (1998) 277-281.
33. Calignano,A., La,R.G., Loubet-Lescoulie,P., Piomelli,D. A role for the endogenous cannabinoid system in the peripheral control of pain initiation, *Prog. Brain Res.* 129 (2000) 471-482.
34. Capasso,R., Izzo,A.A., Fezza,F., Pinto,A., Capasso,F., Mascolo,N., Di,M., V , Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 945-950.

-
35. Carai,M.A., Colombo,G., Gessa,G.L. Rapid tolerance to the intestinal prokinetic effect of cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR 141716 (Rimonabant), *Eur. J. Pharmacol.* 494 (2004) 221-224.
 36. Casu,M.A., Porcella,A., Ruiu,S., Saba,P., Marchese,G., Carai,M.A., Reali,R., Gessa,G.L., Pani,L. Differential distribution of functional cannabinoid CB1 receptors in the mouse gastroenteric tract, *Eur. J. Pharmacol.* 459 (2003) 97-105.
 37. Chang,I.Y., Glasgow,N.J., Takayama,I., Horiguchi,K., Sanders,K.M., Ward,S.M. Loss of interstitial cells of Cajal and development of electrical dysfunction in murine small bowel obstruction, *J. Physiol* 536 (2001) 555-568.
 38. Christopoulos,A., Wilson,K. Interaction of anandamide with the M(1) and M(4) muscarinic acetylcholine receptors, *Brain Res.* 915 (2001) 70-78.
 39. Coffey,R.G., Snella,E., Johnson,K., Pross,S. Inhibition of macrophage nitric oxide production by tetrahydrocannabinol in vivo and in vitro, *Int. J. Immunopharmacol.* 18 (1996) 749-752.
 40. Colombo,G., Agabio,R., Lobina,C., Reali,R., Gessa,G.L. Cannabinoid modulation of intestinal propulsion in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 344 (1998) 67-69.
 41. Coruzzi,G., Adami,M., Coppelli,G., Frati,P., Soldani,G. Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anaesthetized rat, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360 (1999) 715-718.
 42. Costa,M., Furness,J.B. Somatostatin is present in a subpopulation of noradrenergic nerve fibres supplying the intestine, *Neuroscience* 13 (1984) 911-919.

43. Costa,M., Furness,J.B., Humphreys,C.M. Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 332 (1986) 79-88.
44. Costa,M., Brookes,S.J. The enteric nervous system, *Am. J. Gastroenterol.* 89 (1994) S129-S137.
45. Costa,M., Brookes,S.J., Steele,P.A., Gibbins,I., Burcher,E., Kandiah,C.J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum, *Neuroscience* 75 (1996) 949-967.
46. Costa,M., Brookes,S.J., Hennig,G.W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system, *Gut* 47 Suppl 4 (2000) iv15-iv19.
47. Coutts,A.A., Pertwee,R.G. Inhibition by cannabinoid receptor agonists of acetylcholine release from the guinea-pig myenteric plexus, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 1557-1566.
48. Coutts,A.A., Pertwee,R.G. Evidence that cannabinoid-induced inhibition of electrically evoked contractions of the myenteric plexus--longitudinal muscle preparation of guinea-pig small intestine can be modulated by Ca²⁺ and cAMP, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 76 (1998) 340-346.
49. Coutts,A.A., navi-Goffer,S., Ross,R.A., MacEwan,D.J., Mackie,K., Pertwee,R.G., Irving,A.J. Agonist-induced internalization and trafficking of cannabinoid CB1 receptors in hippocampal neurons, *J. Neurosci.* 21 (2001) 2425-2433.
50. Coutts,A.A., Irving,A.J., Mackie,K., Pertwee,R.G., Anavi-Goffer,S. Localisation of cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity in the guinea pig and rat myenteric plexus, *J. Comp Neurol.* 448 (2002) 410-422.
51. Coutts,A.A., Izzo,A.A. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids: an update, *Curr. Opin. Pharmacol.* 4 (2004) 572-579.

-
52. Cravatt,B.F., Lichtman,A.H. Fatty acid amide hydrolase: an emerging therapeutic target in the endocannabinoid system, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 469-475.
 53. Croci,T., Manara,L., Aureggi,G., Guagnini,F., Rinaldi-Carmona,M., Maffrand,J.P., Le Fur,G., Mukenge,S., Ferla,G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1393-1395.
 54. Croci,T., Landi,M., Galzin,A.M., Marini,P. Role of cannabinoid CB1 receptors and tumor necrosis factor-alpha in the gut and systemic anti-inflammatory activity of SR 141716 (rimonabant) in rodents, *Br. J. Pharmacol.* 140 (2003) 115-122.
 55. Daigo,Y., Takayama,I., Ponder,B.A., Caldas,C., Ward,S.M., Sanders,K.M., Fujino,M.A. Differential gene expression profile in the small intestines of mice lacking pacemaker interstitial cells of Cajal, *BMC. Gastroenterol.* 3 (2003) 17.
 56. Dalziel,H.H., Thornbury,K.D., Ward,S.M., Sanders,K.M. Involvement of nitric oxide synthetic pathway in inhibitory junction potentials in canine proximal colon, *Am. J. Physiol* 260 (1991) G789-G792.
 57. Darmani,N.A. The potent emetogenic effects of the endocannabinoid, 2-AG (2-arachidonoylglycerol) are blocked by delta(9)-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (2002) 34-42.
 58. De Petrocellis,L., Harrison,S., Bisogno,T., Tognetto,M., Brandi,I., Smith,G.D., Creminon,C., Davis,J.B., Geppetti,P., Di,M., V , The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase, *J. Neurochem.* 77 (2001) 1660-1663.
 59. De,P.F., Giaroni,C., Cosentino,M., Lecchini,S., Frigo,G. Adrenergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility: from basic science to clinical applications, *Pharmacol. Ther.* 69 (1996) 59-78.

60. Desai,K.M., Zembowicz,A., Sessa,W.C., Vane,J.R. Nitroergic nerves mediate vagally induced relaxation in the isolated stomach of the guinea pig, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 88 (1991) 11490-11494.
61. Devane,W.A., Dysarz,F.A., III, Johnson,M.R., Melvin,L.S., Howlett,A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain, Mol. Pharmacol. 34 (1988) 605-613.
62. Devane,W.A., Breuer,A., Sheskin,T., Jarbe,T.U., Eisen,M.S., Mechoulam,R. A novel probe for the cannabinoid receptor, J. Med. Chem. 35 (1992) 2065-2069.
63. Di Carlo,G., Izzo,A.A. Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications, Expert. Opin. Investig. Drugs 12 (2003) 39-49.
64. Di Marzo, Bisogno,T., De Petrocellis,L. Endocannabinoids: new targets for drug development, Curr. Pharm. Des 6 (2000) 1361-1380.
65. Di Mazro, V, Bisogno,T., De Petrocellis,L. Anandamide: some like it hot, Trends Pharmacol. Sci. 22 (2001) 346-349.
66. Di Marzo, V, Griffin,G., De Petrocellis,L., Brandi,I., Bisogno,T., Williams,W., Grier,M.C., Kulasegram,S., Mahadevan,A., Razdan,R.K., Martin,B.R. A structure/activity relationship study on arvanil, an endocannabinoid and vanilloid hybrid, J. Pharmacol. Exp. Ther. 300 (2002) 984-991.
67. Di Marzo, V , Endocannabinoids in the new millennium, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 66 (2002) 91-92.
68. Di Marzo, V, De Petrocellis,L., Fezza,F., Ligresti,A., Bisogno,T. Anandamide receptors, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 66 (2002) 377-391.
69. Di Marzo, V, Blumberg,P.M., Szallasi,A. Endovanilloid signaling in pain, Curr. Opin. Neurobiol. 12 (2002) 372-379.

-
70. Di Tomaso,E., Cadas,H., Gaillet,S., Beltramo,M., Desarnaud,F., Venance,L., Piomelli,D. Endogenous lipids that activate cannabinoid receptors. Formation and inactivation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 407 (1997) 335-340.
 71. Dmitrieva,N., Berkley,K.J. Contrasting effects of WIN 55212-2 on motility of the rat bladder and uterus, *J. Neurosci.* 22 (2002) 7147-7153.
 72. Duran,M., Laporte,J.R., Capella,D. [News about therapeutic use of Cannabis and endocannabinoid system], *Med. Clin. (Barc.)* %20;122 (2004) 390-398.
 73. Eissenstat,M.A., Bell,M.R., D'Ambra,T.E., Estep,K.G., Haycock,D.A., Olefirowicz,E.M., Ward,S.J. Aminoalkylindoles (AAIs): structurally novel cannabinoid-mimetics, *NIDA Res. Monogr* 105 (1990) 427-428.
 74. Eissenstat,M.A., Bell,M.R., D'Ambra,T.E., Alexander,E.J., Daum,S.J., Ackerman,J.H., Gruett,M.D., Kumar,V., Estep,K.G., Olefirowicz,E.M., . Aminoalkylindoles: structure-activity relationships of novel cannabinoid mimetics, *J. Med. Chem.* 38 (1995) 3094-3105.
 75. Elphick,M.R., Egertova,M. The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling, *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356 (2001) 381-408.
 76. Felder,C.C., Joyce,K.E., Briley,E.M., Mansouri,J., Mackie,K., Blond,O., Lai,Y., Ma,A.L., Mitchell,R.L. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors, *Mol. Pharmacol.* 48 (1995) 443-450.
 77. Felder,C.C., Glass,M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 179-200.
 78. Fernandez,J.R., Allison,D.B. Rimonabant Sanofi-Synthelabo, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5 (2004) 430-435.

79. Fernando,S.R., Pertwee,R.G. Evidence that methyl arachidonyl fluorophosphonate is an irreversible cannabinoid receptor antagonist, *Br. J. Pharmacol.* 121 (1997) 1716-1720.
80. Fezza,F., Bisogno,T., Minassi,A., Appendino,G., Mechoulam,R., Di,M., V , Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues, *FEBS Lett.* 513 (2002) 294-298.
81. Fowler,C.J. Possible involvement of the endocannabinoid system in the actions of three clinically used drugs, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 59-61.
82. Franklin,A., Parmentier-Batteur,S., Walter,L., Greenberg,D.A., Stella,N. Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility, *J. Neurosci.* 23 (2003) 7767-7775.
83. Freund,T.F., Katona,I., Piomelli,D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling, *Physiol Rev.* 83 (2003) 1017-1066.
84. Fride,E. Endocannabinoids in the central nervous system--an overview, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) 221-233.
85. Fujita,A., Takeuchi,T., Jun,H., Hata,F. Localization of Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK3, in fibroblast-like cells forming gap junctions with smooth muscle cells in the mouse small intestine, *J. Pharmacol. Sci.* 92 (2003) 35-42.
86. Furness,J.B., Costa,M. Distribution of intrinsic nerve cell bodies and axons which take up aromatic amines and their precursors in the small intestine of the guinea-pig, *Cell Tissue Res.* 188 (1978) 527-543.
87. Furness,J.B., Kunze,W.A., Bertrand,P.P., Clerc,N., Bornstein,J.C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine, *Prog. Neurobiol.* 54 (1998) 1-18.

-
88. Furness, J.B. Types of neurons in the enteric nervous system, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 (2000) 87-96.
 89. Galiegue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carriere, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le, F.G., Casellas, P. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations, *Eur. J. Biochem.* 232 (1995) 54-61.
 90. Galligan, J.J., LePard, K.J., Schneider, D.A., Zhou, X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system, *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 (2000) 97-103.
 91. Galve-Roperh, I., Rueda, D., Gomez, d.P., Velasco, G., Guzman, M. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor, *Mol. Pharmacol.* 62 (2002) 1385-1392.
 92. Gebremedhin, D., Lange, A.R., Campbell, W.B., Hillard, C.J., Harder, D.R. Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current, *Am. J. Physiol* 276 (1999) H2085-H2093.
 93. Germano, M.P., D'Angelo, V., Mondello, M.R., Pergolizzi, S., Capasso, F., Capasso, R., Izzo, A.A., Mascolo, N., De Pasquale, R. Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 363 (2001) 241-244.
 94. Gershon, M.D. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13 Suppl 2 (1999) 15-30.
 95. Gershon, M.D. The enteric nervous system: a second brain, *Hosp. Pract. (Minneap.)* 34 (1999) 31-8, 41.

96. Giaroni,C., De,P.F., Cosentino,M., Lecchini,S., Frigo,G. Plasticity in the enteric nervous system, *Gastroenterology* 117 (1999) 1438-1458.
97. Giuffrida,A., Beltramo,M., Piomelli,D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298 (2001) 7-14.
98. Glass,M., Felder,C.C. Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor, *J. Neurosci.* 17 (1997) 5327-5333.
99. Glass,M., Brotchie,J.M., Maneuf,Y.P. Modulation of neurotransmission by cannabinoids in the basal ganglia, *Eur. J. Neurosci.* 9 (1997) 199-203.
100. Glass,M., Northup,J.K. Agonist selective regulation of G proteins by cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors, *Mol. Pharmacol.* 56 (1999) 1362-1369.
101. Glass,M. The role of cannabinoids in neurodegenerative diseases, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 25 (2001) 743-765.
102. Glass,M., van,D.A., Blakemore,C., Hannan,A.J., Faull,R.L. Delayed onset of Huntington's disease in mice in an enriched environment correlates with delayed loss of cannabinoid CB1 receptors, *Neuroscience* 123 (2004) 207-212.
103. Gomez,R., Navarro,M., Ferrer,B., Trigo,J.M., Bilbao,A., Del,A., I, Cippitelli,A., Nava,F., Piomelli,D., Rodriguez,d.F. A peripheral mechanism for CB1 cannabinoid receptor-dependent modulation of feeding, *J. Neurosci.* 22 (2002) 9612-9617.
104. Goutopoulos,A., Makriyannis,A. From cannabis to cannabinergics: new therapeutic opportunities, *Pharmacol. Ther.* 95 (2002) 103-117.
105. Greder, R. Die Zelle als Grundbaustein. In: "Lehrbuch der Physiologie", Klinker,R., Silbernagl,S., Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 1996, 2.Auflage, 31-36.

-
106. Green,B.T., Calvin,A., O'Grady,S.M., Brown,D.R. Kinin-induced anion-dependent secretion in porcine ileum: characterization and involvement of opioid- and cannabinoid-sensitive enteric neural circuits, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305 (2003) 733-739.
 107. Grider,J.R. Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility, *J. Nutr.* 124 (1994) 1334S-1339S.
 108. Grider,J.R., Bonilla,O.M. Differential expression of substance P, somatostatin, and VIP in neurons from cultured myenteric ganglia, *Am. J. Physiol* 267 (1994) G322-G327.
 109. Griffin,G., Fernando,S.R., Ross,R.A., McKay,N.G., Ashford,M.L., Shire,D., Huffman,J.W., Yu,S., Lainton,J.A., Pertwee,R.G. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals, *Eur. J. Pharmacol.* 193:339 (1997) 53-61.
 110. Grotenhermen,F. Cannabinoids in pain management. Cannabinoid receptor agonists will soon find their place in modern medicine, *BMJ* 323 (2001) 1250-1251.
 111. Grotenhermen,F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 327-360.
 112. Grotenhermen,F. Pharmacology of cannabinoids, *Neuroendocrinol. Lett.* 25 (2004) 14-23.
 113. Guo,J., Ikeda,S.R. Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons, *Mol. Pharmacol.* 65 (2004) 665-674.
 114. Hansen,M.B. Small intestinal manometry, *Physiol Res.* 51 (2002) 541-556.
 115. Hansen,M.B. The enteric nervous system II: gastrointestinal functions, *Pharmacol. Toxicol.* 92 (2003) 249-257.

116. Hansen,M.B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility, *Physiol Res.* 52 (2003) 1-30.
117. Hanus,L., Abu-Lafi,S., Fride,E., Breuer,A., Vogel,Z., Shalev,D.E., Kustanovich,I., Mechoulam,R. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98 (2001) 3662-3665.
118. Heinemann,A., Shahbazian,A., Holzer,P. Cannabinoid inhibition of guinea-pig intestinal peristalsis via inhibition of excitatory and activation of inhibitory neural pathways, *Neuropharmacology* 38 (1999) 1289-1297.
119. Hermann,H., De Petrocellis,L., Bisogno,T., Schiano,M.A., Lutz,B., Di,M., V , Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response, *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2003) 607-616.
120. Hillard,C.J., Manna,S., Greenberg,M.J., DiCamelli,R., Ross,R.A., Stevenson,L.A., Murphy,V., Pertwee,R.G., Campbell,W.B. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB1), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289 (1999) 1427-1433.
121. Hillard,C.J. Biochemistry and pharmacology of the endocannabinoids arachidonylethanolamide and 2-arachidonylglycerol, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 61 (2000) 3-18.
122. Holzer,P., Schluet,W., Maggi,C.A. Ascending enteric reflex contraction: roles of acetylcholine and tachykinins in relation to distension and propagation of excitation, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264 (1993) 391-396.
123. Holzer,P., Holzer-Petsche,U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation, *Pharmacol. Ther.* 73 (1997) 219-263.

-
124. Holzer,P., Holzer-Petsche,U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function, *Pharmacol. Ther.* 73 (1997) 173-217.
 125. Holzer,P., Schicho,R., Holzer-Petsche,U., Lippe,I.T. The gut as a neurological organ, *Wien. Klin. Wochenschr.* 113 (2001) 647-660.
 126. Hornby,P.J., Prouty,S.M. Involvement of cannabinoid receptors in gut motility and visceral perception, *Br. J. Pharmacol.* 141 (2004) 1335-1345.
 127. Howlett,A.C., Qualy,J.M., Khachatryan,L.L. Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs, *Mol. Pharmacol.* 29 (1986) 307-313.
 128. Howlett,A.C., Mukhopadhyay,S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol, *Chem. Phys. Lipids* 108 (2000) 53-70.
 129. Howlett,A.C., Mukhopadhyay,S. Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol, *Chem. Phys. Lipids* 108 (2000) 53-70.
 130. Howlett,A.C. The cannabinoid receptors, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:619-31. (2002) 619-631.
 131. Howlett,A.C., Barth,F., Bonner,T.I., Cabral,G., Casellas,P., Devane,W.A., Felder,C.C., Herkenham,M., Mackie,K., Martin,B.R., Mechoulam,R., Pertwee,R.G. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors, *Pharmacol. Rev.* 54 (2002) 161-202.
 132. Huang,C.C., Chen,Y.L., Lo,S.W., Hsu,K.S. Activation of cAMP-dependent protein kinase suppresses the presynaptic cannabinoid inhibition of glutamatergic transmission at corticostriatal synapses, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 578-585.
 133. Huizinga,J.D., Robinson,T.L., Thomsen,L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells, *Neurogastroenterol. Motil.* 12 (2000) 3-9.

134. Hungund,B.L., Basavarajappa,B.S., Vadasz,C., Kunos,G., Rodriguez,d.F., Colombo,G., Serra,S., Parsons,L., Koob,G.F. Ethanol, endocannabinoids, and the cannabinoidergic signaling system, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 565-574.
135. Inui,A. Emesis, appetite, and endocannabinoids, *Gastroenterology* 123 (2002) 655-656.
136. Izzo,A.A., Mascolo,N., Borrelli,F., Capasso,F. Excitatory transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of cannabinoid CB1 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 124 (1998) 1363-1368.
137. Izzo,A.A., Mascolo,N., Capasso,R., Germano,M.P., De Pasquale,R., Capasso,F. Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360 (1999) 221-223.
138. Izzo,A.A., Mascolo,N., Pinto,L., Capasso,R., Capasso,F. The role of cannabinoid receptors in intestinal motility, defaecation and diarrhoea in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 384 (1999) 37-42.
139. Izzo,A.A., Borrelli,F., Capasso,F., Capasso,R., Pinto,L., Cristoni,A., Mascolo,N. Contractile effect of (+)-glaucine in the isolated guinea-pig ileum, *Eur. J. Pharmacol.* 377 (1999) 215-218.
140. Izzo,A.A., Mascolo,N., Borrelli,F., Capasso,F. Defaecation, intestinal fluid accumulation and motility in rodents: implications of cannabinoid CB1 receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359 (1999) 65-70.
141. Izzo,A.A., Mascolo,N., Capasso,F. Marijuana in the new millennium: perspectives for cannabinoid research, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 281-282.
142. Izzo,A.A., Mascolo,N., Capasso,F. Forgotten target for marijuana: the endocannabinoid system in the gut, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 372-373.

-
143. Izzo,A.A., Pinto,L., Borrelli,F., Capasso,R., Mascolo,N., Capasso,F. Central and peripheral cannabinoid modulation of gastrointestinal transit in physiological states or during the diarrhoea induced by croton oil, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 1627-1632.
144. Izzo,A.A., Mascolo,N., Tonini,M., Capasso,F. Modulation of peristalsis by cannabinoid CB(1) ligands in the isolated guinea-pig ileum, *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 984-990.
145. Izzo,A.A., Fezza,F., Capasso,R., Bisogno,T., Pinto,L., Iuvone,T., Esposito,G., Mascolo,N., Di,M., V, Capasso,F. Cannabinoid CB1-receptor mediated regulation of gastrointestinal motility in mice in a model of intestinal inflammation, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 563-570.
146. Izzo,A.A., Mascolo,N., Capasso,F. The gastrointestinal pharmacology of cannabinoids, *Curr. Opin. Pharmacol.* 1 (2001) 597-603.
147. Izzo,A.A., Capasso,F., Costagliola,A., Bisogno,T., Marsicano,G., Ligresti,A., Matias,I., Capasso,R., Pinto,L., Borrelli,F., Cecio,A., Lutz,B., Mascolo,N., Di,M., V , An endogenous cannabinoid tone attenuates cholera toxin-induced fluid accumulation in mice, *Gastroenterology* 125 (2003) 765-774.
148. Izzo,A.A. Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 1201-1202.
149. Izzo,A.A., Camilleri,M. Cannabinoids in intestinal inflammation and cancer, *Pharmacol. Res.*(2009).
150. Jagerovic,N., Hernandez-Folgado,L., Alkorta,I., Goya,P., Navarro,M., Serrano,A., Rodriguez,d.F., Dannert,M.T., Alsasua,A., Suardiaz,M., Pascual,D., Martin,M.I. Discovery of 5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-3-hexyl-1h-1,2,4-triazole, a novel in vivo cannabinoid antagonist containing a 1,2,4-triazole motif, *J. Med. Chem.* %20;47 (2004) 2939-2942.

151. Joy,J.E., Watson,S.J., Benson,J.A. Marijuana and Medicin. Assessing the Science Base. Editors: Division of Neuroscience and Behavioral Health, Institute of Medicin, National Academy Press, Washington,D.C., 1999.
152. Jarai,Z., Wagner,J.A., Varga,K., Lake,K.D., Compton,D.R., Martin,B.R., Zimmer,A.M., Bonner,T.I., Buckley,N.E., Mezey,E., Razdan,R.K., Zimmer,A., Kunos,G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96 (1999) 14136-14141.
153. Johnson,D.E., Heald,S.L., Dally,R.D., Janis,R.A. Isolation, identification and synthesis of an endogenous arachidonic amide that inhibits calcium channel antagonist 1,4-dihydropyridine binding, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 48 (1993) 429-437.
154. Johnson,P.J., Bornstein,J.C., Burcher,E. Roles of neuronal NK1 and NK3 receptors in synaptic transmission during motility reflexes in the guinea-pig ileum, Br. J. Pharmacol. 124 (1998) 1375-1384.
155. Kagaya,M., Lamb,J., Robbins,J., Page,C.P., Spina,D. Characterization of the anandamide induced depolarization of guinea-pig isolated vagus nerve, Br. J. Pharmacol. 137 (2002) 39-48.
156. Kellow,J.E. Principles of motility and sensation testing, Gastroenterol. Clin. North Am. 32 (2003) 733-50, ix.
157. Keren,O., Sarne,Y. Multiple mechanisms of CB1 cannabinoid receptors regulation, Brain Res. 980 (2003) 197-205.
158. Khanolkar,A.D., Palmer,S.L., Makriyannis,A. Molecular probes for the cannabinoid receptors, Chem. Phys. Lipids 108 (2000) 37-52.
159. Kishimoto,S., Gokoh,M., Oka,S., Muramatsu,M., Kajiwara,T., Waku,K., Sugiura,T. 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into

-
- macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 24469-24475.
160. Klein,T.W., Newton,C., Friedman,H. Cannabinoid receptors and immunity, *Immunol. Today* 19 (1998) 373-381.
161. Klein,T.W., Newton,C., Friedman,H. Cannabinoid receptors and the cytokine network, *Adv. Exp. Med. Biol.* 437 (1998) 215-222.
162. Kojima,S., Sugiura,T., Waku,K., Kamikawa,Y. Contractile response to a cannabimimetic eicosanoid, 2-arachidonoylglycerol, of longitudinal smooth muscle from the guinea-pig distal colon in vitro, *Eur. J. Pharmacol.* 444 (2002) 203-207.
163. Konturek,S.J., Konturek,J.W., Pawlik,T., Brzozowski,T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake, *J. Physiol Pharmacol.* 55 (2004) 137-154.
164. Krowicki,Z.K., Moerschbaecher,J.M., Winsauer,P.J., Digavalli,S.V., Hornby,P.J. Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits gastric motility in the rat through cannabinoid CB1 receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 371 (1999) 187-196.
165. Kulkarni-Narla,A., Brown,D.R. Localization of CB1-cannabinoid receptor immunoreactivity in the porcine enteric nervous system, *Cell Tissue Res.* 302 (2000) 73-80.
166. Kumar,R.N., Chambers,W.A., Pertwee,R.G. Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids, *Anaesthesia* 56 (2001) 1059-1068.
167. Kunos,G. The discovery of endogenous cannabinoids, *Brain Res. Bull.* 50 (1999) 359-360.
168. Kunos,G., Jarai,Z., Batkai,S., Goparaju,S.K., Ishac,E.J., Liu,J., Wang,L., Wagner,J.A. Endocannabinoids as cardiovascular modulators, *Chem. Phys. Lipids* 108 (2000) 159-168.

169. Kuriyama,H., Kitamura,K., Itoh,T., Inoue,R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels, *Physiol Rev.* 78 (1998) 811-920.
170. Lagalwar,S., Bordayo,E.Z., Hoffmann,K.L., Fawcett,J.R., Frey,W.H. Anandamides inhibit binding to the muscarinic acetylcholine receptor, *J. Mol. Neurosci.* 13 (1999) 55-61.
171. Lan,R., Gatley,J., Lu,Q., Fan,P., Fernando,S.R., Volkow,N.D., Pertwee,R., Makriyannis,A. Design and synthesis of the CB1 selective cannabinoid antagonist AM281: a potential human SPECT ligand, *AAPS. PharmSci.* 1 (1999) E4.
172. Lan,R., Liu,Q., Fan,P., Lin,S., Fernando,S.R., McCallion,D., Pertwee,R., Makriyannis,A. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 769-776.
173. Landi,M., Croci,T., Rinaldi-Carmona,M., Maffrand,J.P., Le Fur,G., Manara,L. Modulation of gastric emptying and gastrointestinal transit in rats through intestinal cannabinoid CB(1) receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 450 (2002) 77-83.
174. Lay,L., Angus,J.A., Wright,C.E. Pharmacological characterisation of cannabinoid CB(1) receptors in the rat and mouse, *Eur. J. Pharmacol.* 391 (2000) 151-161.
175. Ligresti,A., Bisogno,T., Matias,I., De Petrocellis,L., Cascio,M.G., Cosenza,V., D'argenio,G., Scaglione,G., Bifulco,M., Sorrentini,I., Di,M., V , Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth, *Gastroenterology* 125 (2003) 677-687.
176. Lopez-Redondo,F., Lees,G.M., Pertwee,R.G. Effects of cannabinoid receptor ligands on electrophysiological properties of myenteric neurones of the guinea-pig ileum, *Br. J. Pharmacol.* 122 (1997) 330-334.

-
177. Lyford,G.L., Farrugia,G. Ion channels in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3 (2003) 583-587.
178. Lynn,A.B., Herkenham,M. Localization of cannabinoid receptors and nonsaturable high-density cannabinoid binding sites in peripheral tissues of the rat: implications for receptor-mediated immune modulation by cannabinoids, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 (1994) 1612-1623.
179. Maccarrone,M., Salvati,S., Bari,M., Finazzi,A. Anandamide and 2-arachidonoylglycerol inhibit fatty acid amide hydrolase by activating the lipoxygenase pathway of the arachidonate cascade, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278 (2000) 576-583.
180. Maccarrone,M., De,F.M., Bari,M., Klinger,F., Siracusa,G., Finazzi-Agro,A. Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 2991-2997.
181. Maccarrone,M., Bari,M., Lorenzon,T., Bisogno,T., Di,M., V, Finazzi-Agro,A. Anandamide uptake by human endothelial cells and its regulation by nitric oxide, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13484-13492.
182. Mackie,K., Lai,Y., Westenbroek,R., Mitchell,R. Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor, *J. Neurosci.* 15 (1995) 6552-6561.
183. MacNaughton,W.K., Van Sickle,M.D., Keenan,C.M., Cushing,K., Mackie,K., Sharkey,K.A. Distribution and function of the cannabinoid-1 receptor in the modulation of ion transport in the guinea pig ileum: relationship to capsaicin-sensitive nerves, *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 286 (2004) G863-G871.
184. Maggi,C.A., Zagorodnyuk,V., Giuliani,S. Specialization of tachykinin NK1 and NK2 receptors in producing fast and slow atropine-resistant neurotransmission to the circular muscle of the guinea-pig colon, *Neuroscience* 63 (1994) 1137-1152.

185. Maggi,C.A., Catalioto,R.M., Criscuoli,M., Cucchi,P., Giuliani,S., Lecci,A., Lippi,A., Meini,S., Patacchini,R., Renzetti,A.R., Santicioli,P., Tramontana,M., Zagorodnyuk,V., Giachetti,A. Tachykinin receptors and intestinal motility, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 75 (1997) 696-703.
186. Maingret,F., Patel,A.J., Lazdunski,M., Honore,E. The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1, *EMBO J.* 20 (2001) 47-54.
187. Manara,L., Croci,T., Guagnini,F., Rinaldi-Carmona,M., Maffrand,J.P., Le Fur,G., Mukenge,S., Ferla,G. Functional assessment of neuronal cannabinoid receptors in the muscular layers of human ileum and colon, *Dig. Liver Dis.* 34 (2002) 262-269.
188. Mancinelli,R., Fabrizi,A., Del Monaco,S., Azzena,G.B., Vargiu,R., Colombo,G.C., Gessa,G.L. Inhibition of peristaltic activity by cannabinoids in the isolated distal colon of mouse, *Life Sci.* 69 (2001) 101-111.
189. Mang,C.F., Erbelding,D., Kilbinger,H. Differential effects of anandamide on acetylcholine release in the guinea-pig ileum mediated via vanilloid and non-CB1 cannabinoid receptors, *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 161-167.
190. Martin,B.R. Identification of the endogenous cannabinoid system through integrative pharmacological approaches, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 790-796.
191. Martin,B.R., Jefferson,R.G., Winckler,R., Wiley,J.L., Thomas,B.F., Crocker,P.J., Williams,W., Razdan,R.K. Assessment of structural commonality between tetrahydrocannabinol and anandamide, *Eur. J. Pharmacol.* 435 (2002) 35-42.
192. Mascolo,N., Izzo,A.A., Ligresti,A., Costagliola,A., Pinto,L., Cascio,M.G., Maffia,P., Cecio,A., Capasso,F., Di,M., V , The endocannabinoid system and the molecular basis of paralytic ileus in mice, *FASEB J.* 16 (2002) 1973-1975.

-
193. Massa,F., Marsicano,G., Hermann,H., Cannich,A., Monory,K., Cravatt,B.F., Ferri,G.L., Sibaev,A., Storr,M., Lutz,B. The endogenous cannabinoid system protects against colonic inflammation, *J. Clin. Invest* 113 (2004) 1202-1209.
 194. Massa,F., Storr,M., Lutz,B. The endocannabinoid system in the physiology and pathophysiology of the gastrointestinal tract, *J. Mol. Med.* 83 (2005) 944-954.
 195. Massa,F., Sibaev,A., Marsicano,G., Blaudzun,H., Storr,M., Lutz,B. Vanilloid receptor (TRPV1)-deficient mice show increased susceptibility to dinitrobenzene sulfonic acid induced colitis, *J. Mol. Med.* 84 (2006) 142-146.
 196. Matsuda,L.A., Lolait,S.J., Brownstein,M.J., Young,A.C., Bonner,T.I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA, *Nature* 346 (1990) 561-564.
 197. Matsuda,L.A., Bonner,T.I., Lolait,S.J. Cannabinoid receptors: which cells, where, how, and why?, *NIDA Res. Monogr* 126 (1992) 48-56.
 198. McAllister,S.D., Glass,M. CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) 161-171.
 199. McVey,D.C., Schmid,P.C., Schmid,H.H., Vigna,S.R. Endocannabinoids induce ileitis in rats via the capsaicin receptor (VR1), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304 (2003) 713-722.
 200. Mechoulam,R., Devane,W.A., Breuer,A., Zahalka,J. A random walk through a cannabis field, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40 (1991) 461-464.
 201. Mechoulam,R., Ben Shabat,S., Hanus,L., Ligumsky,M., Kaminski,N.E., Schatz,A.R., Gopher,A., Almog,S., Martin,B.R., Compton,D.R., . Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors, *Biochem. Pharmacol.* 50 (1995) 83-90.

202. Milla,P.J. The physiology of gastrointestinal motility, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 32 Suppl 1 (2001) S3-S4.
203. Morisset,V., Ahluwalia,J., Nagy,I., Urban,L. Possible mechanisms of cannabinoid-induced antinociception in the spinal cord, *Eur. J. Pharmacol.* 429 (2001) 93-100.
204. Mu,J., Zhuang,S.Y., Hampson,R.E., Deadwyler,S.A. Protein kinase-dependent phosphorylation and cannabinoid receptor modulation of potassium A current (IA) in cultured rat hippocampal neurons, *Pflugers Arch.* 439 (2000) 541-546.
205. Mukhopadhyay,S., Shim,J.Y., Assi,A.A., Norford,D., Howlett,A.C. CB(1) cannabinoid receptor-G protein association: a possible mechanism for differential signaling, *Chem. Phys. Lipids* 121 (2002) 91-109.
206. Munro,J. Pathophysiology of obesity, *Lancet* 340 (1992) 848-849.
207. Munro,S. Signal transduction meets the secretory pathway, *Curr. Biol.* 2 (1992) 633-635.
208. Nakatsuka,T., Chen,H.X., Roper,S.N., Gu,J.G. Cannabinoid receptor-1 activation suppresses inhibitory synaptic activity in human dentate gyrus, *Neuropharmacology* 45 (2003) 116-121.
209. Nieri,P., Martinotti,E., Testai,L., Martinelli,C., Breschi,M.C. Effects of cannabinoids on non-adrenergic non-cholinergic-mediated relaxation in guinea-pig trachea, *Eur. J. Pharmacol.* 475 (2003) 115-118.
210. Nocerino,E., Amato,M., Izzo,A.A. Cannabis and cannabinoid receptors, *Fitoterapia* 71 Suppl 1:S6-12. (2000) S6-12.

-
211. Offertaler,L., Mo,F.M., Batkai,S., Liu,J., Begg,M., Razdan,R.K., Martin,B.R., Bukoski,R.D., Kunos,G. Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor, *Mol. Pharmacol.* 63 (2003) 699-705.
212. Olah,Z., Karai,L., Iadarola,M.J. Anandamide activates vanilloid receptor 1 (VR1) at acidic pH in dorsal root ganglia neurons and cells ectopically expressing VR1, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 31163-31170.
213. Olsson,C., Holmgren,S. The control of gut motility, *Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol* 128 (2001) 481-503.
214. Palmer,S.L., Thakur,G.A., Makriyannis,A. Cannabinergic ligands, *Chem. Phys. Lipids* 121 (2002) 3-19.
215. Pan,X., Ikeda,S.R., Lewis,D.L. Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system, *Mol. Pharmacol.* 49 (1996) 707-714.
216. Paton,W.D., Vizi,E.S. The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip, *Br. J. Pharmacol.* 35 (1969) 10-28.
217. Paton,W.D. Pharmacology of marijuana, *Annu. Rev. Pharmacol.* 15 (1975) 191-220.
218. Pertwee,R.G. The central neuropharmacology of psychotropic cannabinoids, *Pharmacol. Ther.* 36 (1988) 189-261.
219. Pertwee,R.G., Fernando,S.R., Nash,J.E., Coutts,A.A. Further evidence for the presence of cannabinoid CB1 receptors in guinea-pig small intestine, *Br. J. Pharmacol.* 118 (1996) 2199-2205.
220. Pertwee,R.G., Fernando,S.R., Griffin,G., Ryan,W., Razdan,R.K., Compton,D.R., Martin,B.R. Agonist-antagonist characterization of 6'-cyanohept-2'-yne- Δ^8 -

- tetrahydrocannabinol in two isolated tissue preparations, *Eur. J. Pharmacol.* 315 (1996) 195-201.
221. Pertwee,R.G. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors, *Pharmacol. Ther.* 74 (1997) 129-180.
222. Pertwee,R.G. Pharmacological, physiological and clinical implications of the discovery of cannabinoid receptors, *Biochem. Soc. Trans.* 26 (1998) 267-272.
223. Pertwee,R.G. Cannabis and cannabinoids: pharmacology and rationale for clinical use, *Forsch. Komplementarmed.* 6 Suppl 3:12-5. (1999) 12-15.
224. Pertwee,R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands, *Curr. Med. Chem.* 6 (1999) 635-664.
225. Pertwee,R.G. Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors, *Life Sci.* 65 (1999) 597-605.
226. Pertwee,R.G. Medical uses of cannabinoids: the way forward, *Addiction* 94 (1999) 317-320.
227. Pertwee,R.G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands, *Curr. Med. Chem.* 6 (1999) 635-664.
228. Pertwee,R.G. Cannabinoid receptor ligands: clinical and neuropharmacological considerations, relevant to future drug discovery and development, *Expert. Opin. Investig. Drugs* 9 (2000) 1553-1571.
229. Pertwee,R.G. Cannabinoids and the gastrointestinal tract, *Gut* 48 (2001) 859-867.
230. Pertwee,R.G., Ross,R.A. Cannabinoid receptors and their ligands, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) 101-121.

-
231. Pinto,L., Izzo,A.A., Cascio,M.G., Bisogno,T., Hospodar-Scott,K., Brown,D.R., Mascolo,N., Di,M., V, Capasso,F. Endocannabinoids as physiological regulators of colonic propulsion in mice, *Gastroenterology* 123 (2002) 227-234.
232. Pinto,L., Capasso,R., Di Carlo,G., Izzo,A.A. Endocannabinoids and the gut, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) 333-341.
233. Piomelli,D., Giuffrida,A., Calignano,A., Rodriguez,d.F. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs, *Trends Pharmacol. Sci.* 21 (2000) 218-224.
234. Piomelli,D. The molecular logic of endocannabinoid signalling, *Nat. Rev. Neurosci.* 4 (2003) 873-884.
235. Poling,J.S., Rogawski,M.A., Salem,N., Jr., Vicini,S. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits Shaker-related voltage-gated K⁺ channels, *Neuropharmacology* 35 (1996) 983-991.
236. Porter,A.C., Felder,C.C. The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention, *Pharmacol. Ther.* 90 (2001) 45-60.
237. Porter,A.C., Sauer,J.M., Knierman,M.D., Becker,G.W., Berna,M.J., Bao,J., Nomikos,G.G., Carter,P., Bymaster,F.P., Leese,A.B., Felder,C.C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 1020-1024.
238. Porter,A.C., Sauer,J.M., Knierman,M.D., Becker,G.W., Berna,M.J., Bao,J., Nomikos,G.G., Carter,P., Bymaster,F.P., Leese,A.B., Felder,C.C. Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (2002) 1020-1024.

239. Pozzi,O., Misiano,P., Clark,G.D., Visentin,L. Antagonism between the anti-inflammatory activity of the cannabinoid WIN 55212-2 and SR 141716A, *Pharmacology* 69 (2003) 158-163.
240. Premkumar,L.S., Ahern,G.P. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C, *Nature* 408 (2000) 985-990.
241. Prevot,V., Rialas,C.M., Croix,D., Salzet,M., Dupouy,J.P., Poulain,P., Beauvillain,J.C., Stefano,G.B. Morphine and anandamide coupling to nitric oxide stimulates GnRH and CRF release from rat median eminence: neurovascular regulation, *Brain Res.* 790 (1998) 236-244.
242. Ralevic,V., Kendall,D.A., Jerman,J.C., Middlemiss,D.N., Smart,D. Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 424 (2001) 211-219.
243. Ralevic,V., Kendall,D.A., Randall,M.D., Smart,D. Cannabinoid modulation of sensory neurotransmission via cannabinoid and vanilloid receptors: roles in regulation of cardiovascular function, *Life Sci.* 71 (2002) 2577-2594.
244. Ralevic,V. Cannabinoid modulation of peripheral autonomic and sensory neurotransmission, *Eur. J. Pharmacol.* 472 (2003) 1-21.
245. Ralevic,V., Jerman,J.C., Brough,S.J., Davis,J.B., Egerton,J., Smart,D. Pharmacology of vanilloids at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 143-151.
246. Ramsey,I.S., Delling,M., Clapham,D.E. An introduction to TRP channels, *Annu. Rev. Physiol* 68 (2006) 619-647.
247. Reggio,P.H., Basu-Dutt,S., Barnett-Norris,J., Castro,M.T., Hurst,D.P., Seltzman,H.H., Roche,M.J., Gilliam,A.F., Thomas,B.F., Stevenson,L.A., Pertwee,R.G., Abood,M.E.

- The bioactive conformation of aminoalkylindoles at the cannabinoid CB1 and CB2 receptors: insights gained from (E)- and (Z)-naphthylidene indenes, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 5177-5187.
248. Reggio,P.H. Endocannabinoid structure-activity relationships for interaction at the cannabinoid receptors, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 66 (2002) 143-160.
249. Reiche,D., Schemann,M. Mucosa of the guinea pig gastric corpus is innervated by myenteric neurones with specific neurochemical coding and projection preferences, *J. Comp Neurol.* 410 (1999) 489-502.
250. Rhee,M.H., Kim,S.K. SR144528 as inverse agonist of CB2 cannabinoid receptor, *J. Vet. Sci.* 3 (2002) 179-184.
251. Rinaldi-Carmona,M., Barth,F., Heaulme,M., Shire,D., Calandra,B., Congy,C., Martinez,S., Maruani,J., Neliat,G., Caput,D., . SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor, *FEBS Lett.* 350 (1994) 240-244.
252. Rinaldi-Carmona,M., Barth,F., Heaulme,M., Alonso,R., Shire,D., Congy,C., Soubrie,P., Breliere,J.C., Le,F.G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist, *Life Sci.* 56 (1995) 1941-1947.
253. Ross,R.A., Brockie,H.C., Fernando,S.R., Saha,B., Razdan,R.K., Pertwee,R.G. Comparison of cannabinoid binding sites in guinea-pig forebrain and small intestine, *Br. J. Pharmacol.* 125 (1998) 1345-1351.
254. Ross,R.A., Gibson,T.M., Brockie,H.C., Leslie,M., Pashmi,G., Craib,S.J., Di,M., V, Pertwee,R.G. Structure-activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens, *Br. J. Pharmacol.* 132 (2001) 631-640.

255. Roth,S.H. Stereospecific presynaptic inhibitory effect of delta9-tetrahydrocannabinol on cholinergic transmission in the myenteric plexus of the guinea pig, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 56 (1978) 968-975.
256. Sacerdote,P., Massi,P., Panerai,A.E., Parolaro,D. In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55, 940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors, *J. Neuroimmunol.* 109 (2000) 155-163.
257. Sanders,K.M., Koh,S.D., Ward,S.M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract, *Annu. Rev. Physiol* 68 (2006) 307-343.
258. Schemann,M., Reiche,D., Michel,K. Enteric pathways in the stomach, *Anat. Rec.* 262 (2001) 47-57.
259. Schlicker,E., Kathmann,M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 565-572.
260. Schmidt,P.T., Holst,J.J. Tachykinins in regulation of gastric motility and secretion, *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) 579-588.
261. Senior,K. Endogenously produced cannabinoids and liver cirrhosis, *Lancet* 358 (2001) 42.
262. Shim,J.Y., Collantes,E.R., Welsh,W.J., Subramaniam,B., Howlett,A.C., Eissenstat,M.A., Ward,S.J. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of the cannabimimetic (aminoalkyl)indoles using comparative molecular field analysis, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 4521-4532.
263. Shimasue,K., Urushidani,T., Hagiwara,M., Nagao,T. Effects of anandamide and arachidonic acid on specific binding of (+) -PN200-110, diltiazem and (-) - desmethoxyverapamil to L-type Ca²⁺ channel, *Eur. J. Pharmacol.* 296 (1996) 347-350.

-
264. Shire,D., Carillon,C., Kaghad,M., Calandra,B., Rinaldi-Carmona,M., Le,F.G., Caput,D., Ferrara,P. An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 3726-3731.
265. Shook,J.E., Dewey,W.L., Burks,T.F. The central and peripheral effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on gastrointestinal transit in mice, *NIDA Res. Monogr* 67 (1986) 222-227.
266. Shook,J.E., Burks,T.F. Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249 (1989) 444-449.
267. Shuttleworth,C.W., Keef,K.D. Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission, *Regul. Pept.* 56 (1995) 101-120.
268. Sibaevev,A., Massa,F., Yuce,B., Marsicano,G., Lehr,H.A., Lutz,B., Goke,B., Allescher,H.D., Storr,M. CB1 and TRPV1 receptors mediate protective effects on colonic electrophysiological properties in mice, *J. Mol. Med.* 84 (2006) 513-520.
269. Sim-Selley,L.J., Brunk,L.K., Selley,D.E. Inhibitory effects of SR141716A on G-protein activation in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.* 414 (2001) 135-143.
270. Smart,D., Gunthorpe,M.J., Jerman,J.C., Nasir,S., Gray,J., Muir,A.I., Chambers,J.K., Randall,A.D., Davis,J.B. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1), *Br. J. Pharmacol.* 129 (2000) 227-230.
271. Soffer,E.E. Small bowel motility: ready for prime time?, *Curr. Gastroenterol. Rep.* 2 (2000) 364-369.
272. Spencer,N.J., Bywater,R.A., Klemm,M.F. Effects of sympathetic nerve stimulation on membrane potential in the circular muscle layer of mouse distal colon, *Neurogastroenterol. Motil.* 10 (1998) 543-552.

273. Stevens,R.J., Publicover,N.G., Smith,T.K. Induction and organization of Ca²⁺ waves by enteric neural reflexes, *Nature* 399 (1999) 62-66.
274. Storr,M., Gaffal,E., Saur,D., Schusdziarra,V., Allescher,H.D. Effect of cannabinoids on neural transmission in rat gastric fundus, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 80 (2002) 67-76.
275. Storr,M., Sibaev,A., Marsicano,G., Lutz,B., Schusdziarra,V., Timmermans,J.P., Allescher,H.D. Cannabinoid receptor type 1 modulates excitatory and inhibitory neurotransmission in mouse colon, *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 286 (2004) G110-G117.
276. Storr,M., Yuce,B., Goke,B. [Perspectives of cannabinoids in gastroenterology], *Z. Gastroenterol.* 44 (2006) 185-191.
277. Storr,M. TRPV1 in colitis: is it a good or a bad receptor?--a viewpoint, *Neurogastroenterol. Motil.* 19 (2007) 625-629.
278. Storr,M.A., Sharkey,K.A. The endocannabinoid system and gut-brain signalling, *Curr. Opin. Pharmacol.*(2007).
279. Storr,M.A., Keenan,C.M., Emmerdinger,D., Zhang,H., Yuce,B., Sibaev,A., Massa,F., Buckley,N.E., Lutz,B., Goke,B., Brand,S., Patel,K.D., Sharkey,K.A. Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors, *J. Mol. Med.* 86 (2008) 925-936.
280. Sugiura,T., Waku,K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors, *Chem. Phys. Lipids* 108 (2000) 89-106.
281. Sugiura,T., Waku,K. 2-arachidonoylglycerol: an endogenous cannabinoid receptor agonist, *World Rev. Nutr. Diet.* 88:200-6. (2001) 200-206.
282. Sugiura,T., Waku,K. Cannabinoid receptors and their endogenous ligands, *J. Biochem.* 132 (2002) 7-12.

-
283. Szallasi,A. Vanilloid (capsaicin) receptors in health and disease, *Am. J. Clin. Pathol.* 118 (2002) 110-121.
284. Szoke,E., Balla,Z., Csernoch,L., Czeh,G., Szolcsanyi,J. Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurones, *Neuroreport* 11 (2000) 1949-1952.
285. Taylor,G.S., Bywater,R.A. Antagonism of non-cholinergic excitatory junction potentials in the guinea-pig ileum by a substance P analogue antagonist, *Neurosci. Lett.* 63 (1986) 23-26.
286. Thomson,A.B., Keelan,M., Thiesen,A., Clandinin,M.T., Ropeleski,M.J., Wild,G. Small bowel review: part I, *Can. J. Gastroenterol.* 14 (2000) 791-816.
287. Thomson,A.B., Keelan,M., Thiesen,A., Clandinin,M.T., Ropeleski,M., Wild,G.E. Small bowel review: normal physiology part 2, *Dig. Dis. Sci.* 46 (2001) 2588-2607.
288. Timmermans,J.P., Hens,J., Adriaensen,D. Outer submucous plexus: an intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans, *Anat. Rec.* 262 (2001) 71-78.
289. Tyler,K., Hillard,C.J., Greenwood-Van Meerveld,B. Inhibition of small intestinal secretion by cannabinoids is CB1 receptor-mediated in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 409 (2000) 207-211.
290. Ueda,N., Goparaju,S.K., Katayama,K., Kurahashi,Y., Suzuki,H., Yamamoto,S. A hydrolase enzyme inactivating endogenous ligands for cannabinoid receptors, *J. Med. Invest* 45 (1998) 27-36.
291. Van Der,S.M., Di,M., V , Endovanilloids. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1827-1834.

292. Van Sickle,M.D., Oland,L.D., Ho,W., Hillard,C.J., Mackie,K., Davison,J.S., Sharkey,K.A. Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret, *Gastroenterology* 121 (2001) 767-774.
293. Vasquez,C., Navarro-Polanco,R.A., Huerta,M., Trujillo,X., Andrade,F., Trujillo-Hernandez,B., Hernandez,L. Effects of cannabinoids on endogenous K⁺ and Ca²⁺ currents in HEK293 cells, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 81 (2003) 436-442.
294. Vigna,S.R. Cannabinoids and the gut, *Gastroenterology* 125 (2003) 973-975.
295. Vogalis,F., Zhang,Y., Goyal,R.K. An intermediate conductance K⁺ channel in the cell membrane of mouse intestinal smooth muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 1371 (1998) 309-316.
296. Ward,S.M., Beckett,E.A., Wang,X., Baker,F., Khoyi,M., Sanders,K.M. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons, *J. Neurosci.* 20 (2000) 1393-1403.
297. Ward,S.M., Sanders,K.M. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation, *Anat. Rec.* 262 (2001) 125-135.
298. Ward,S.M., Sanders,K.M., Hirst,G.D. Role of interstitial cells of Cajal in neural control of gastrointestinal smooth muscles, *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 1 (2004) 112-117.
299. Wood,J.D., Alpers,D.H., Andrews,P.L. Fundamentals of neurogastroenterology, *Gut* 45 Suppl 2 (1999) II6-II16.
300. Yan,M.S., Lian,M.L., Huang,J.S. [Cannabinoids, cannabinoid receptor and immune response], *Sheng Li Ke. Xue. Jin. Zhan.* 31 (2000) 261-264

301. Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N.H., Chan, C.L., Knowles, C., Williams, N.S., Anand, P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel, *Lancet* 357 (2001) 1338-1339.
302. Yuce, B., Sibaev, A., Broedl, U.C., Marsicano, G., Goke, B., Lutz, B., Allescher, H.D., Storr, M. Cannabinoid type 1 receptor modulates intestinal propulsion by an attenuation of intestinal motor responses within the myenteric part of the peristaltic reflex, *Neurogastroenterol. Motil.* 19 (2007) 744-753.
303. Zizzo, M.G., Mule, F., Serio, R. Interplay between PACAP and NO in mouse ileum, *Neuropharmacology* 46 (2004) 449-455.
304. Zygmunt, P.M., Petersson, J., Andersson, D.A., Chuang, H., Sorgard, M., Di, M., V, Julius, D., Hogestatt, E.D. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide, *Nature* 400 (1999) 452-457.
305. Zygmunt, P.M., Andersson, D.A., Hogestatt, E.D. Delta 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol activate capsaicin-sensitive sensory nerves via a CB1 and CB2 cannabinoid receptor-independent mechanism, *J. Neurosci.* 22 (2002) 4720-4727

10. Danksagung

Bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. H.D. Allescher, möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die Aufnahme und Integration in seine Arbeitsgruppe und für seine Unterstützung der Arbeit bedanken.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. M. Storr für seine gewissenhafte Anleitung, wissenschaftliche Betreuung und seine ständige Bereitschaft mir mit Rat und Tat beizustehen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Classen und Herrn Prof. Dr. V. Schusdziarra für die freundliche Bereitstellung der technischen Einrichtungen.

Danke auch an Herrn Dr. Andrei Sibaev und Herrn J. Zimmermann für ihre freundliche, humorvolle und kompetente Unterstützung im Labor.

Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts München, Herrn Univ.-Prof. Dr. Beat Lutz, Herrn Ph.D. Giovanni Marsicano, Frau Annika Daschner, Frau Alexandra Rippl und Frau Barbara Wölfel für die Generierung und freundliche Überlassung der Versuchstiere bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für ihre selbstlose Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung und meiner Freundin Nadine dafür, dass es sie in meinem Leben gibt.

11. Lebenslauf:

Name: Alois Stadler
 Geburtsdatum: 15.12.1976 in Aidenbach
 Adresse: Herrenstraße 7, 94469 Deggendorf:
 Eltern: Dipl. Ing. (FH) Alois Stadler i.R.
 Inge Stadler, geborene Hartl, Hausfrau.

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Schulverband Künzing/Gergweis
 1987 – 1996 Gymnasium Vilshofen

Studium

11/1996 – 10/1997 Studium an der Universität Regensburg:
 Lehramt Gymnasium Biologie/Chemie

11/1997 – 10/1999 Studium an der Universität Regensburg:
 Humanmedizin (Vorklinik)
 16.09.1999 Ärztliche Vorprüfung

10/1999 – 11/2004 Studium an der Technischen Universität München
 Humanmedizin (Klinik)
 22.03.2001 1. Staatsexamen
 21.03.2003 2. Staatsexamen
 11.11.2004 3. Staatsexamen

04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr
 1. Terial: Diag. Radiologie,
 Prof. Dr. Rummeny, TU München.
 2. Terial: Innere Medizin (Gastroenterologie),
 Prof. Dr. Schmid, TU München.
 Innere Medizin (Hämatologie/Onkol.),
 Prof. Dr. Peschel, TU München.
 3. Terial: Unfallchirurgie,
 Prof. Dr. Siewert, TU München.

Ärztliche Tätigkeit

03/2005 – 06/2006 Assistenzarzt am Klinikum Deggendorf, Abteilung für
 Unfallchirurgie und Orthopädie,
 Prof. Dr. med P. Schandelmaier.

Seit 07/2006 Assistenzarzt am Klinikum Deggendorf, II.Medizinische
 Klinik: Innere Medizin, Gastroenterologie, Hämato-/
 Onkologie, Endokrinologie, Diabetologie, Infektiologie.
 Prof. Dr. med S. Wagner.