

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Das endogene Cannabinoid Anandamid erhöht Cyclooxygenase-2-abhängig den
pulmonalarteriellen Druck in der isolierten Kaninchenlunge**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Florian Kram

aus Schweinfurt

Würzburg, Oktober 2005

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jens A. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. med. N. Roewer

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2006

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern Elisabeth und Erich Kram

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der endogenen Cannabinoide.....	2
1.2	Endogene Cannabinoide beeinflussen das kardiovaskuläre System	5
1.3	Cannabinoide und Lunge	7
1.4	Fragestellung und Zielsetzung.....	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Versuchsmodell der isolierten Kaninchenlunge	9
2.1.1	Versuchsaufbau	10
2.1.2	Versuchsvorbereitung und Vorlauf	13
2.1.3	Präparation.....	14
2.1.4	Kalibrier- und Aufwärmphase	16
2.1.5	Steady – State Phase	17
2.2	Physiologische Messgrößen	18
2.2.1	Messungen der pulmonalarteriellen und linksventrikulären Drucke.....	18
2.2.2	Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$).....	18
2.2.3	Bestimmung der Compliance (C).....	20
2.2.4	Bestimmung der Retention (ΔW).....	21
2.2.5	Bestimmung des pulmonalkapillären Drucks (PCP).....	21
2.2.6	Bestimmung der Gefäßwiderstände (R_a , R_v).....	21
2.2.7	Statistische Methoden.....	23
2.2.8	Standardisierte Stimulation der Kaninchenlungen	23
2.3	Biochemische Analytik	23
2.3.1	Probengewinnung	23
2.3.2	Nachweis der FAAH und Cyclooxygenase-2.....	23
2.4	Verwendete Substanzen.....	24
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Pulmonalarterielle Drucke (PAP).....	25
3.1.1	Anandamidstimulation und Leerversuche	25
3.1.2	Enzyminhibitoren MAFP, Aspirin und Nimesulide	27
3.1.3	Rezeptorblocker SQ 29,548 und SC 19220.....	28
3.2	Pulmonalkapillare Drücke und pulmonale Widerstandsverteilung	31
3.2.1	Pulmonalkapillare Drücke (PCP)	31
3.2.2	Arterielle Widerstände (R_a)	32
3.2.3	Venöse Widerstände (R_v)	34
3.3	Gefäßpermeabilität ($K_{f,c}$), Compliance (C) und Retention (ΔW).....	36
3.4	Nachweis der Fettsäureamidohydrolase (FAAH).....	39
3.5	Nachweis der Cyclooxygenase-2	41
4	Diskussion	42
4.1	Diskussion des Modells	42
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	42
5	Zusammenfassung	49
6	Literaturverzeichnis	51
7	Anhang	0

1 Einleitung

Die verschiedenen Wirkstoffe der Cannabis-Pflanze *Cannabis Sativa* haben eine Vielzahl komplexer Wirkungen. Die psychoaktiven, berauschenden Wirkungen, die durch den Konsum von Haschisch oder Marihuana entstehen, sind seit Jahrtausenden bekannt. Neben der berauschenden Wirkung wurden Cannabinoide bereits im Mittelalter von Ärzten im Nahen Osten vor allem zur antiinflammatorischen und analgetischen Therapie angewendet (1). Auch in Europa wurde Cannabis vom 13. Jahrhundert bis weit ins 19. Jahrhundert immer populärer. Die klassischen Einsatzgebiete waren Asthma und Dysmenorrhoe bis hin zur antispastischen und antikonvulsiven Therapie (2). Die medizinischen Indikationen sind teilweise noch die gleichen wie vor vielen hundert Jahren (3). Neben Forschungsbemühungen zum Therapieansatz darf man jedoch nicht vergessen, dass es sich bei Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) (siehe Abb. 1) um eine Droge handelt, deren Genuss in den meisten Ländern illegal ist. Es kann nach Aufnahme von Δ^9 -THC neben den angestrebten euphorisierenden Wirkungen zu teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen. Die kognitive Leistung kann eingeschränkt werden, so dass Zeitintervalle und Entfernungen nicht mehr abgeschätzt werden können. Psychische Effekte können zu einem amotivationalen Syndrom, Panikreaktionen, Halluzinationen bis hin zu akuten Psychosen führen (4).

Die Entdeckung der Strukturformel und die chemische Isolierung von Δ^9 -THC, der Hauptkomponente der Cannabispflanze, im Jahr 1964 (5) markieren den Beginn der modernen Cannabinoidforschung. Darauf folgte die Entdeckung weiterer Cannabinoide samt Hinweisen zu deren Metabolismus. Heutzutage fokussiert die Forschung nicht nur auf die klassischen psychiatrisch-suchtmedizinischen Aspekte von Δ^9 -THC, sondern auch auf ein Spektrum anderer Krankheitsentitäten. So ist ein positiver Effekt von Cannabinoiden bei Multipler Sklerose belegt (6). Insbesondere auf die Symptome Tremor, Spastik und Schmerzen scheint diese Stoffgruppe lindernd zu wirken (7). In der Therapie des Gewichtsverlusts und der Appetitlosigkeit bei konsumierenden Erkrankungen wie Neoplasien oder AIDS hat das synthetisch gewonnene Δ^9 -THC (Dronabinol[®]) einen festen Platz. Ebenso können Nebenwirkungen einer Chemotherapie,

wie neuropathische Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen gelindert werden. Ein antineoplastischer Effekt konnte z.B. für das Mamma-Carcinom zwar *in-vitro*, jedoch bisher klinisch nicht nachgewiesen werden (8).

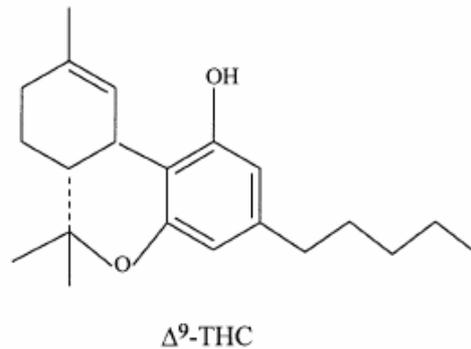


Abbildung 1: Strukturformel des Δ⁹-THC (9)

1.1 Grundlagen der endogenen Cannabinoide

Ein weiterer Meilenstein der Cannabinoidforschung waren Erkenntnisse aus dem Jahre 1988, die die Existenz von spezifischen Rezeptorstrukturen für Cannabinoide (sog. CB-Rezeptoren) nahe legten (10). Wenig später konnte zuerst der sog. CB1-Rezeptor durch Klonierung identifiziert werden (11) (siehe Abb. 2), drei Jahre danach gelang dies auch für den CB2-Rezeptor. Es handelt sich bei diesen Rezeptortypen um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranen Domänen, wobei der CB2-Rezeptor nur 44% Homologie mit dem CB1-Rezeptor aufweist (12).

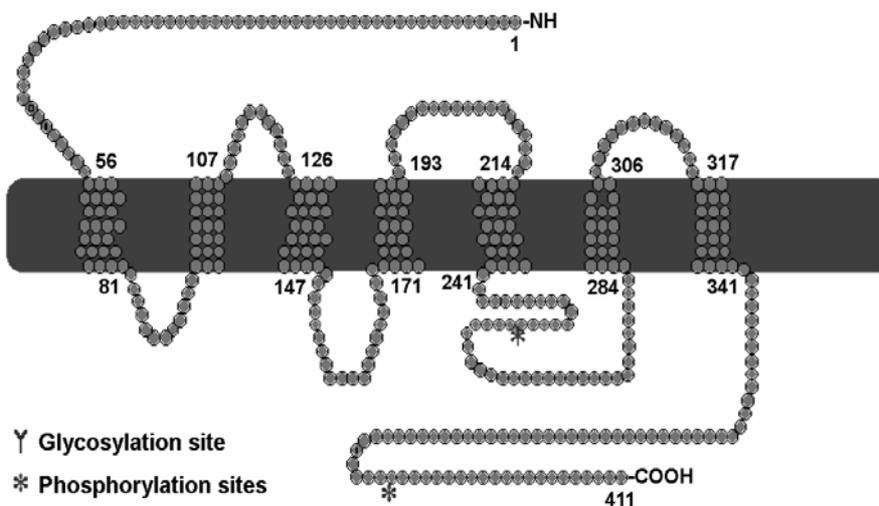


Abbildung 2: Schematische Darstellung des CB1-Rezeptors

Die Aktivierung des CB1-Rezeptors setzt verschiedene Signalwege in Gang. So wird die Aktivität der Adenylatzyklase heruntergefahren und der Calciumeinstrom an N- und P/Q-Calciumkanälen vermindert. Weiterhin werden verschiedene Kaliumkanäle beeinflusst (13). Der CB1-Rezeptor wird hauptsächlich im Gehirn, aber auch in peripheren Geweben exprimiert. Im zentralen Nervensystem findet man hohe Konzentrationen an CB1- Rezeptoren in den Basalganglien, Kleinhirn, Hippocampus und afferenten Anteilen des Rückenmarks. Im Gegensatz dazu wird der CB2-Rezeptor überwiegend auf Immunzellen gefunden (14,15).

Neben der Forschung an pflanzlichen Cannabinoiden war man auch auf der Suche nach körpereigenen Liganden für Cannabinoid-Rezeptoren. Dabei entdeckte man die endogenen Cannabinoide, Arachidonsäuremetabolite mit unkomplizierter chemischer Struktur. Die Entwicklung von synthetischen, strukturell andersartigen Rezeptoragonisten mit anderen Bindungseigenschaften und veränderter pharmakologischer Wirkung, folgte als logische Konsequenz (16,17). Heutzutage unterteilt man die Cannabinoide in drei Hauptgruppen:

- Pflanzliche Cannabinoide (z.B. Δ^9 -THC)
- Synthetische Cannabinoide (z.B. HU-210, WIN-55212-2)
- Endogene Cannabinoide (z.B. Anandamid, 2-Arachidonyl-Glycerol)

Die zwei Hauptvertreter der endogenen Cannabinoide, die mit Δ^9 -THC vergleichbare biologische Wirkungen zeigen, sind Arachidonylethanolamid (Anandamid) und das 2-Arachidonyl-Glycerol (2-AG) (siehe Abb. 3).

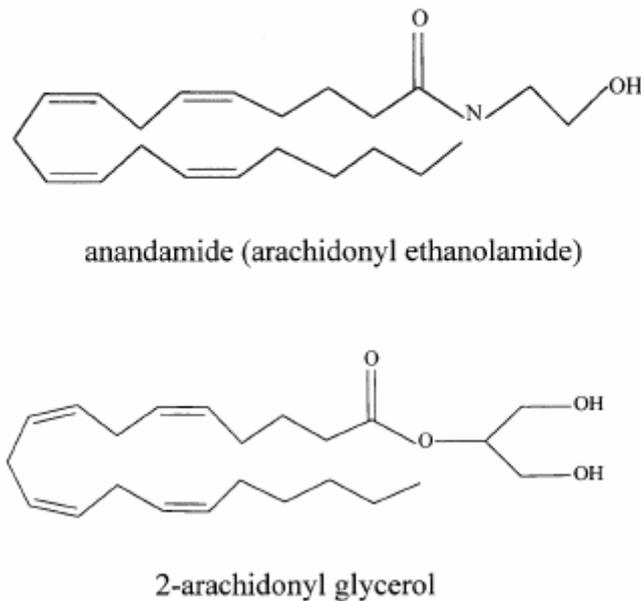


Abbildung 3: Strukturformeln von Anandamid und 2-AG (9)

Zuerst wurde das Fettsäuremetabolit Anandamid aus Schweinehirn isoliert (10), später fand man 2-AG im Hundedarm (18). Die Anandamid-Synthese findet nicht nur in Neuronen, sondern auch in anderen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Thrombozyten und Endothelzellen statt. Die Synthese des CB1-Agonisten Anandamid (Sanskrit, ananda = Glückseligkeit) erfolgt in zwei enzymatischen Schritten. Zuerst wird aus einem Membranphospholipid durch eine calciumabhängige Transacylase N-arachidonylphosphatidylethanolamin gebildet. Dieses Lipid ist Substrat für eine Phosphodiesterase, die Anandamid unter Abspaltung von Phosphorsäure erzeugt (19, 20). Der Abbau kann auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Entweder kommt es zur Inaktivierung durch eine selektive Wiederaufnahme in die Zelle, oder Anandamid wird

hydrolytisch, durch das Enzym Anandamid-Amidohydrolase, in Ethanolamin und Arachidonsäure gespalten (21,22). Der Arachidonsäureester 2-Arachidonylglycerol (2-AG) entsteht, anders als Anandamid, aus Lipidvorstufen, die durch das Enzym Diacylglycerol-Lipase (sn-1 DAG Lipase) gebildet werden (23). Die Degradation des CB1- und CB2 Agonisten erfolgt auf zwei Wegen. Zum einen hydrolysiert die intrazellulär lokalisierte Serin-Hydrolase Monoacylglycerol-Lipase (MGL) 2-AG. Zum anderen kann 2-AG, ebenso wie Anandamid, durch die Fettsäuren-Amidohydrolase abgebaut werden (24,25). Sowohl Anandamid als auch 2-AG, als Hauptvertreter der Endocannabinoide, dienen unter anderem als Substrat für die Cyclooxygenase-2, die verschiedene Prostaganoide generiert (26).

Die Erkenntnisse über Strukturen und Metabolismus von Cannabinoiden und deren Rezeptoren belebten die Forschung. Durch chemische Modifikation konnte Sanofi selektive Antagonisten für den CB1-Rezeptor (z.B. SR141716A) herstellen (16). Wenig später entwickelte Sanofi den CB2-Rezeptorantagonisten (SR144528) (17). Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entwicklung von Knockout-Mäusen, die keine CB1-Rezeptoren (27,28) bzw. keine CB2-Rezeptoren (29) exprimierten. CB1-Rezeptor-knock-out Tiere, weisen eine höhere intrauterine Mortalität auf, können jedoch das gleiche Lebensalter wie ihre Wildtypen ohne Einschränkung der Vitalität und Fertilität erreichen.

Ein neuartiger klinischer Ansatz ist die Anwendung von Cannabinoid-Rezeptorantagonisten in der Therapie der Adipositas. Endogene Cannabinoide scheinen via CB1-Rezeptoren an der zentralen Regulation von Appetit und Nahrungsaufnahme beteiligt zu sein (30). Der CB1-Antagonist SR 141716A (Rimonabant[®]) wird zurzeit in klinischen Phase-III Studien als Mittel zur Reduktion von Appetit und Körpergewicht getestet (31-33).

1.2 Endogene Cannabinoide beeinflussen das kardiovaskuläre System

Die Cannabinoidforschung war lange auf neurologisch-psychiatrische Fragestellungen fokussiert. Interessanterweise war die erste bewiesene pathophysiologische Funktion ein Effekt auf die Blutdruckregulation (34). Endogene Cannabinoide haben komplexe Wirkungen auf das kardiovaskuläre System, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

Diese Wirkungen sind hauptsächlich, aber nicht ausschließlich CB1-Rezeptor vermittelt. Daneben scheinen auch Vanilloid Rezeptoren (35), „Anandamid-Rezeptoren“ (36,37) und Arachidonsäure-Metabolite (38) eine Rolle zu spielen. In verschiedenen Organmodellen fungierten Cannabinoide als starke Vasodilatoren via CB1-Rezeptoren (39). Nach systemischer Gabe bei Ratten folgt eine Blutdruckantwort in drei Phasen: Nach einer kurzen vagal vermittelten Bradykardie mit Hypotonie, kommt es zu einem - einige Sekunden langen - Blutdruckanstieg. Dieser bleibt unbeeinflusst von einer pharmakologischen, bzw. chirurgischen Sympatholyse. Es folgt eine längerandauernde Hypotonie, die durch CB1-Antagonisten inhibierbar ist (40). Die gleiche Wirkung konnte auch durch das metabolisch stabile Anandamid-Derivat R-Methanandamid erzeugt werden. Hieraus ließ sich schließen, dass die Wirkung auf den Blutdruck nicht durch Abbauprodukte Anandamids entsteht. Der hypotensive Effekt von synthetischen Cannabinoiden wie z.B. HU-210 war stärker, als der von endogenen oder pflanzlichen Vertretern. Die Vasodilatation findet in verschiedenen Stromgebieten, vor allem an den Gefäßen von Herz, Niere und Gehirn statt. Zusätzlich kann eine Dilatation der Mesenterialarterien durch endogene, nicht aber durch strukturell differierende synthetische Cannabinoide erreicht werden (41). Bei anderen Tierspezies konnte ebenfalls eine Vasorelaxation diverser Gefäße nachgewiesen werden. Auch die zerebrale Gefäßmuskulatur von Katzen wird durch Anandamidgabe dosisabhängig dilatiert. Der durch CB1-Rezeptoren getriggerte und über Calcium-Kanäle vermittelte Effekt war durch den CB1-Rezeptorantagonisten SR 141716A inhibierbar (39). An Koronararterien von Schafen konnte ebenfalls eine Vasodilatation durch Anandamid gezeigt werden. Allerdings blieb dieser Effekt von der Gabe des CB1-Rezeptorantagonisten SR 141716A unbeeinflusst. Jedoch konnte die Anandamidwirkung durch den Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin und den Fettsäureamidohydrolase-Inhibitor PMSF deutlich reduziert werden (38). Ein weiterer Mechanismus, der die Komplexität der Anandamidwirkung belegt, ist die Aktivierung von Vanilloid-Rezeptoren. Bei diversen Arterien wurde eine Anandamid-induzierte Vasodilatation durch den VR1-Vanilloidrezeptor-Blocker Capsazepin gehemmt (35).

1.3 Cannabinoide und Lunge

Über die Wirkung von Cannabinoiden auf die pulmonale Strombahn ist recht wenig bekannt. Die Forschungsschwerpunkte zielten primär auf den Effekt von Δ^9 -THC ab. Neben der Erfassung kardiovaskulärer Parameter ging es eher um die Reaktion der glatten Bronchialmuskulatur, als um die pulmonalen Gefäße. Es wurden systemische und topische Anwendung, sowie akute und chronische Effekte studiert (42). Hierzu bediente man sich sowohl gesunder Probanden (43), als auch Patienten mit z.B. chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (44,45). Daneben wurde, damals wie heute, der gewebeschädigende Einfluß durch Δ^9 -THC im Rahmen von Drogenkonsum untersucht (46). Allerdings existieren interessanterweise zwei frühe Studien aus den Jahren 1975/1976, die sich mit der Wirkung von Δ^9 -THC auf die pulmonalen Gefäße befassen. Dies geschah lange vor Kenntnis des Cannabinoidsystems oder spezifischer CB-Rezeptoren. So führte systemische Δ^9 -THC-Gabe zu einer dosisabhängigen Erhöhung des pulmonalen Perfusionsdrucks beim Meerschweinchen. Aus heutiger Sicht überraschend konnte der Effekt durch Aspirin und den Prostaglandin-Antagonisten SC 19220 inhibiert werden (47). Weiterhin wurde gezeigt, dass i.v. Applikation von Δ^9 -THC bei narkotisierten Hunden, neben einer Erniedrigung der Herzfrequenz und des pulmonalen Blutflusses, zu einer deutlichen Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks führte. Bei vagotomierten Tieren zeigte sich jedoch keiner dieser Effekte (48).

Jüngere Studien nach Entdeckung der Endocannabinoide liefern Hinweise auf komplexe Wirkmechanismen der Cannabinoide in der Lunge. Anandamid hat einen dualen Effekt auf die bronchiale Reagibilität von Nagetieren. Es wurden sowohl Inhibierung, als auch Initiation getriggert. Bronchospasmen und Husten, die durch chemische Irritation mit Capsaicin (Extrakt der roten Pfefferschote) hervorgerufen wurden, konnten durch Anandamidgabe verhindert werden. Sobald man aber den bronchokonstriktorischen Einfluss des Vagusnerves durch Vagotomie wegnahm, führte die Gabe von Anandamid zum Bronchospasmus. Beide Effekte wurden durch CB1-Rezeptoren vermittelt, die man an terminalen Axonen in den Luftwegen nachgewiesen hat. Eine lokale Anandamidsynthese im Lungengewebe durch Calcium-Stimulation wurde ebenfalls gezeigt. Weiterhin konnte der Capsaicin-induzierte Bronchospasmus durch den Cannabinoid-Antagonisten SR 141716A verstärkt werden (49). Das endogene Cannabinoid 2-AG wurde mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie in

verschiedenen Geweben der Ratte nachgewiesen. Neben Gehirn, Leber und Niere fand man auch eine substantielle Menge 2-AG im Lungengewebe (50). An Meerschweinchen konnte in *in-vivo* Versuchen gezeigt werden, dass hohe i.v. Dosen Anandamid einen nur minimalen bronchodilatierenden Effekt haben. Allerdings war der Epithelschaden, der mit dem Calcium-Ionophor Calcimycin (A23187) vorbehandelten Lungen geringer, ebenso wie die pulmonale Leukozytose (51). Neben den CB-Rezeptoren scheinen auch die Gruppe der VR1-Vanilloid-Rezeptoren eine gewisse Rolle zu spielen. Anandamid führt zu einer Brochokonstriktion an isolierten Meerschweinchenbronchi via VR1-Rezeptoren (52). Der Effekt von Cannabinoiden auf die Lunge scheint vom Applikationsweg und von der verwendeten Tierspezies abzuhängen. Ein weiterer möglicher Stoffwechselweg, auf dem Endocannabinoide mit der Lunge interagieren können ist der Arachidonsäuremetabolismus.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

In verschiedenen Organmodellen konnte gezeigt werden, dass Cannabinoide den arteriellen Gefäßtonus mindern können. Diese Vasodilatation wird durch CB1 Rezeptoren (39), spezifische Anandamid Rezeptoren (36,37), Vanilloid Rezeptoren oder Arachidonsäure Metabolite vermittelt. Bei anästhesierten Ratten konnte man in *in-vivo* Versuchen den Nachweis erbringen, dass Cannabinoide als potente Vasodilatoren der coronaren, cerebralen und renalen arteriellen Blutgefäße wirken (53).

Wie bereits erwähnt ist über den Effekt der Cannabinoide auf die pulmonalen Gefäße wenig bekannt und die Lunge kann Reaktionsmustern unterliegen, die von der systemischen Regulation differieren. So können Substanzen, die systemisch als Vasodilatoren fungieren in der Lunge zu einer Vasokonstriktion führen - z.B. Bradykinin oder Leukotriene - und umgekehrt können periphere Vasokonstriktoren wie Sauerstoff die pulmonalen Gefäße erweitern.

Die mannigfaltigen Bemühungen ein besseres Verständnis über den Effekt der Cannabinoide zu gewinnen, zielen natürlich auf eine zukünftige klinische Anwendung ab. Die möglichen Nebenwirkungen einer potentiellen systemischen Cannabinoidtherapie auf die Lunge sind noch nicht absehbar. Wenn nun Cannabinoide

ihre erwiesenen gefäßerweiternden Eigenschaften auch an den Lungengefäßen entfalten, birgt dies ein neuartiges Potenzial. Denn eine pulmonalarterielle Dilatation durch Cannabinoide kann einen neuen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der pulmonalen Hypertonie darstellen. Eine neue Substanzgruppe wäre eine Alternative zu der limitierten Palette an pulmonalen Vasodilatoren wie z.B. Prostazyklin, Calcium Antagonisten und Endothelin Antagonisten (54). Das verwendete Modell der isolierten Kaninchenlunge bietet zur Untersuchung der Wirkung von Cannabinoiden auf die Lungengefäße verschiedene Perspektiven. Es können die Richtung und das Ausmaß von Druckveränderungen, wie auch Änderungen des Gefäßwiderstands gemessen werden. Ebenso können Alterationen der Gefäßpermeabilität bestimmt werden. Durch die Injektion von selektiven und unselektiven Agonisten und Antagonisten sowie durch die Entnahme und biochemische Aufbereitung von Perfusat und Lungenproben werden mögliche Stoffwechsel- und Degradationsschritte genauer beleuchtet.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsmodell der isolierten Kaninchenlunge

Bei der Versuchsanordnung handelt es sich um eine isolierte Kaninchenlunge, die perfundiert und ventiliert wird. Hierdurch ergibt sich eine gesonderte Betrachtung des Organs, ohne den Einfluss von sonst vorhandenen metabolischen, humoralen und zentralnervösen Faktoren des Gesamtorganismus. Im Rahmen eines standardisierten Versuchsprotokolls werden verschiedenste physiologische und biochemische Messparameter, die Thema eines eigenen Kapitels sind, bestimmt. In einer modifizierten Form wurde dieses isolierte Organmodell bereits 1912 von Knowlton und Starling beschrieben (55). Seit 1996 ist das Modell der isolierten Kaninchenlunge an der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg etabliert.

2.1.1 Versuchsaufbau

Prinzipiell handelt es sich um ein geschlossenes, extrakorporales Kreislaufsystem, das man in einen zu- und abführenden Abschnitt einteilen kann. Alle Abschnitte des Kreislaufs bestehen aus PVC-freien Schläuchen (TYGON[®], NORTON, Akron USA). Der hinführende Schenkel ist in die Pulmonalarterie eingenäht und versorgt die Lunge mit Nährlösung aus zwei Glasbehältern. Der von der Lunge wegführende Schenkel ist im linksventrikulären Ausflusstrakt des Herz-Lungenpakets eingenäht und transportiert das aus der Pulmonalvene kommende Perfusat wieder zurück in die zwei Vorratsgefäße, wodurch ein geschlossener Kreislauf entsteht. Die zwei voneinander unabhängigen Perfusatbehälter (Glas, 400 ml; Glasgerätebau OCHS, 32170 Bovenden) sind durch zwei Glashähne (FA. BRAND) parallel geschaltet. Je nach Stellung der Hähne einer Verteilerbank (B.BRAUN, 34209 Melsungen) kann man entweder Flüssigkeit in das System einspeisen oder über einen Ablauf verwerfen. Die Zirkulation kommt mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (GAMBRO PP10-1a) zustande. Zur Vermeidung von Embolien durch z.B. Feststoffe oder Luft sind im hinführenden pulmonalarteriellen Schenkel ein Bluttransfusionsfilter (40 µm SQ 40 SE, Pall Biomedizin GmbH, 63303 Dreieich) und eine Blasenfalle zwischengeschaltet. Weiterhin befinden sich an verschiedenen Stellen im gesamten System Dreiwegehähne (B.BRAUN, 34209 Melsungen), die Möglichkeiten zur Injektion von Substanzen, bzw. zur Entlüftung bieten. Der pulmonalvenöse Abfluss erfolgt über ein kaskadenförmiges Leitersystem zurück in die Vorratsbehälter. Durch den temporären Verschluss der unteren Sprosse muss das Perfusat 10 cm höher steigen, um abfließen zu können. Die Erhöhung dieser Wassersäule steigert den pulmonalvenösen Druck bezogen auf den Lungenhilus um einen definierten Wert. Dieser sog. „Hydrostatic Challenge“ wird - unter anderem zur Beurteilung der Gefäßpermeabilität - standardisiert im Rahmen des Versuchsprotokolls durchgeführt. Während des Versuchs hängt die Lunge frei schwebend in einer mit 37°C äquilibrierten feuchten Kammer (Glas, doppelwandig; Glasgerätebau OCHS, 32170 Bovenden) an einem Stativ mit Kraftaufnehmer und Wägezelle (Messkonverter MC3, Hottinger Baldwin Messtechnik, Darmstadt). Die kontinuierliche Gewichtsregistrierung erfolgt nach elektronischer Verstärkung (5 kHz – TF – Messverstärker, Eigenbau) durch einen Mehrkanalschreiber (Servogor 960, BBC GOERZ). Der pulmonalarterielle (PAP)

und pulmonalvenöse (LVP) Druck werden ebenfalls kontinuierlich über dünnlumige Innenkatheter (TYGON[®], NORTON, Akron USA) in der Pulmonalarterie und im linken Ventrikel gemessen und über einen Druckaufnehmer (Combitrans Monitoring-Set, B.BRAUN, 34209 Melsungen) ebenfalls an den Mehrkanalschreiber übertragen. Die doppelten Wände der feuchten Kammer und der Glasbehälter können mit einer Flüssigkeit durchspült werden. Durch einen Wärmeaustauscher (HKB 2219 Multitemp II; BROMMA) in Reihe geschaltet kann man so die zirkulierende Perfusatflüssigkeit nach Wunsch temperieren. Alle Öffnungen im System, die mit der Umwelt in Kontakt stehen, z.B. zum Druckausgleich oder zur Entlüftung waren zum Schutz vor einer bakteriellen Kontamination durch hydrophobe, bakteriendichte Filtereinheiten mit einer Porengröße von 0,2 µm (ReZist 30/0,2; SCHLEICHER+SCHUELL, 37582 Dassel) gesichert. Der schematisch dargestellte Versuchsaufbau ist in Abb. 4 zu sehen, Abb. 5 zeigt ein Foto des verwendeten Modellaufbaus.

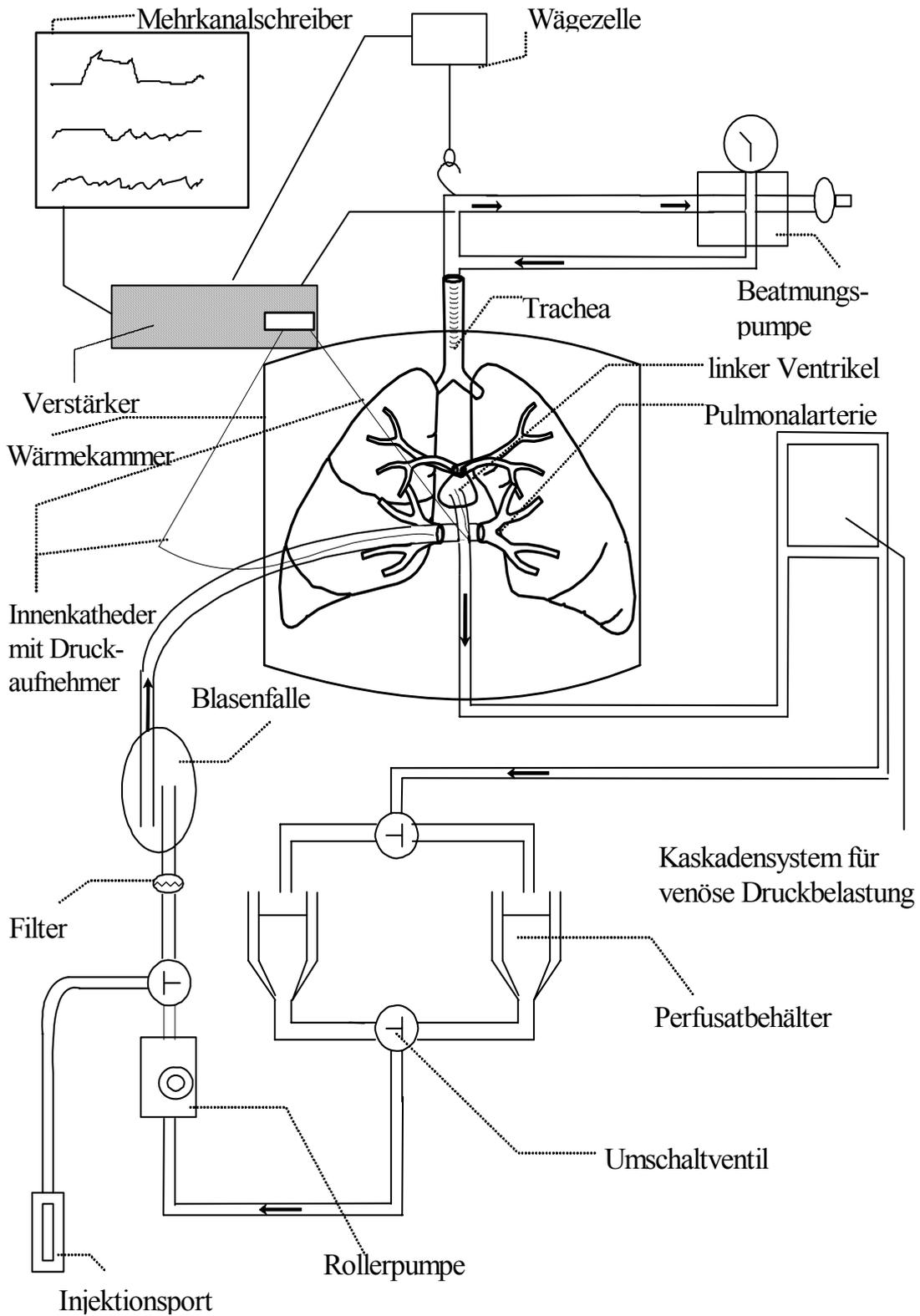


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchaufbaus



Abbildung 5: Modell der isoliert-perfundierten Lunge an der Universität Würzburg

2.1.2 Versuchsvorbereitung und Vorlauf

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen und den Einfluss exogener Faktoren (bakterielle Kontamination etc.) auf das Modell gering zu halten, wird das Zirkulationssystem nach jedem Versuch auseinandergebaut, aufwändig gereinigt und sterilisiert. Dadurch wird eine pyrogenfreie Versuchsdurchführung gewährleistet. In der

Vorbereitungsphase werden die Systemteile installiert, wobei die Ansatzstücke für das Herz- Lungenpaket miteinander kurzgeschlossen werden. Danach werden die Vorratsbehälter und Schläuche mit 0,9 % Kochsalzlösung aus Glasflaschen (FRESENIUS AG, 61346 Bad Homburg) befüllt und das System in mehreren Schritten sorgfältig entlüftet. Sobald die Rollerpumpe den Kreislauf in Gang gebracht hat, wird die zirkulierende Flüssigkeit über die alternierend aufgefüllten und parallel geschalteten Glasbehälter mehrmals ausgetauscht (Gesamtvolumen Spülflüssigkeit: 2 l). In einem erneuten Spülvorgang wird die Kochsalzlösung durch Krebs-Henseleit-Puffer (KHB, SERAG-WIESNER, 95119 Naila) (Zusammensetzung: NaCl 132,8 mM, KCl 5,2 mM, KH₂PO₄ 1,1 mM, NaHCO₃ 24,1 mM, CaCl 2,4 mM, MgPO₄ 1,3 mM, Glucose 240 mg/dl) ersetzt. Die Innenkatheter für die pulmonalarterielle und linksventrikuläre Druckmessung werden entlüftet und arterieller und venöser Schenkel des Perfusionssystems nach Abschalten der Zirkulation mit Kocher-Klemmen (alle Instrumente AESCULAP, Tuttlingen) vor einem versehentlichen Auslaufen während der nachfolgenden Präparation gesichert.

2.1.3 Präparation

Die Präparation der Kaninchenlunge gliedert sich in mehrere Schritte. Narkoseeinleitung, Intubation, Narkosevertiefung und Präparation. Bei den Versuchstieren handelt es sich um männliche Chinchilla-Bastarde (Fellfarbe: Grau, braun, schwarz, FA. Charles River, 88353 Kißlegg) mit einem Gewicht zwischen 2,2 und 3,2 kg. Eine Genehmigung durch die Ethikkommission lag vor. Nach Anlage eines peripher-venösen Zugangs mit einer Butterfly Kanüle (Venofix S ID 0,5 mm; B.BRAUN) in Lokalanästhesie (Xylocain[®] Pumpspray, ASTRA GmbH, 22876 Wedel) in einer Ohrvene wird 1 ml des Narkosegemisches als Bolus injiziert (sog. „Head drop dose“). Das Narkosegemisch besteht aus 25 mg (S) - Ketamin (KETANEST-S[®] 5 mg/ml, 5 ml Injektionslösung, PARKE-DAVIS GmbH, Berlin) und 88 mg des Tiernarkotikums Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2%, 25 ml Injektionslösung, Bayer, Leverkusen). Nach Rückenlagerung, Fixierung der Extremitäten und Freimachen der Atemwege durch Zug an der Zunge wird das Tier antikoaguliert. Hierzu werden gewichtsadaptiert 1000 IE/kg Körpergewicht Heparin i.v. verwendet (Liquemin[®] N

25000, 5 ml Injektionslösung, HOFFMANN-LAROCHE, 79630 Grenzach-Whylen). Das Gebiet über der Trachea wird mit einem elektrischen Tierhaarschneider rasiert und zwischen Jugulum und Schildknorpel werden 5 ml Lidocain 2% (Xylocain 2%, ASTRA GmbH, 22876 Wedel) als Lokalanästhesie in ein subkutanes Depot injiziert. Das Kaninchen wird nun tracheotomiert und intubiert. Die kontrollierte Beatmung erfolgt durch einen Kleintierrespirator (Rodent Ventilator 7025, UGO BASILE, Comero Italien) mit Raumluft bei einer Frequenz von ca. 30/min. Das Atemzugvolumen beträgt 10 ml/kg Körpergewicht. Nun folgt die weitere Vertiefung der Narkose durch langsame Titration von weiteren 4 ml des Narkosegemisches (0,1 ml/20s) unter Palpation der Herzaktion. Die eigentliche Präparation beginnt mit der Abpräparation der Haut, T-förmig Richtung Thorax und Abdomen am Xyphoid beginnend. Durch einen Schnitt wird die Haut unterhalb des Xyphoids eröffnet und das Xyphoid mit einer Kocherklemme gefasst. Es folgt eine quere Oberbauchlaparatomie. Mit einer gebogenen Pinzette wird der sternale Zwerchfellansatz unterfahren und mit einer Darmklemme gefasst. Der Zwerchfellansatz am Sternum/Xyphoid wird durchtrennt und die Thoraxhöhle unter leichtem Zug an der Darmklemme vorsichtig eröffnet. Durch Einreißen der Pleura kollabiert die Lunge, so dass man das Diaphragma entlang des Rippenbogens abtrennen kann. Dies geschieht optimalerweise ohne die Lunge dabei zu berühren. Ebenso werden die durch das Diaphragma führenden Strukturen, ausser Aorta und Vana Cava, durchtrennt. Das Herz wird nach Eröffnung des vorderen Mediastinums von der Thoraxwand mobilisiert. Der Thorax wird nach Gabe eines weiteren Bolus Narkosegemisches mittels Knochenschere durch eine parasternale Thorakotomie eröffnet. Die Schnittränder der Rippen werden beiderseits durch zwei Klemmen gefasst und aufgespreizt, um Blutungen aus Interkostalarterien zu vermeiden und Lungentraumata durch Rippenspitzen zu verhindern. Der Thymus wird stumpf entfernt und das Perikard vorsichtig eröffnet und entfernt. Die Aorta und Art. pulmonalis werden mit einer Pinzette an ihren Abgängen unterfahren und mit Bindfäden angeschlungen. Nun wird der rechte Ventrikel knapp unter der Klappenebene eröffnet und der vorbereitete pulmonalarterielle Katheter unter minimalem Flow eingebunden und die Herzspitze unter Eröffnung beider Ventrikel abgetrennt. Die Aorta wird ligiert und der Atemluft werden 4% CO₂ beigefügt, da die Peripherie als CO₂-Donator wegfällt. Unter Zug am Tubus wird die Lunge stumpf aus dem Thorax entfernt. Zur weiteren

Präparation wird das Herz- Lungenpaket freischwebend an einem Stativ fixiert. Der rechte Ventrikel wird zu zwei Dritteln entfernt, ebenso die Mitralklappe. Das linke Herzkatheter kann durch verschiedene Füllungszustände Störungen in der Gewichtsregistrierung erzeugen, daher wird es durch eine Bindfadennäht (Mersilene™, ETHICON®) aus dem Kreislauf ausgeschaltet. In den linken Ventrikel wird nun der Anschlussadapter für den pulmonalvenösen Katheter durch eine Tabaksbeutelnaht (Mersilene™, ETHICON®) eingenäht. Jetzt kann die Lunge in die feuchte Kammer, den eigentlichen Versuchsort, gehängt werden. Sie ist freischwingend an der Wägezelle befestigt ohne die Wand zu berühren. Das Ende des pulmonalvenösen Schlauchsystems wird nun an dem eingenähten Adapter befestigt und die Perfusion durch die Pumpe auf 25 ml/min gestellt. Die Perfusatemperatur beträgt 4 °C.

2.1.4 Kalibrier- und Aufwärmphase

Nach Herstellung der Zirkulation wird zuerst Luft, die beim Adaptieren des venösen Schenkels eingedrungen sein kann, durch Aspiration über einen Dreiwegehahn entfernt. Als nächstes werden die Druckaufnehmer über Dreiwegehähne an die Innenkatheter angeschlossen. Diese werden entlüftet und kalibriert, wobei die Lungenhilushöhe als 0 mmHg definiert ist. Bis zu diesem Zeitpunkt beträgt die Temperatur im Wärmeaustauscher, und somit auch in der feuchten Kammer und im Perfusat 4°C. Dadurch wird der Stoffwechsel niedrig gehalten und die Lunge ist während der Präparation geschont. Für den Versuch werden nun die Temperatur und der Perfusatfluss nach einem festgelegten Muster (15°C: 50 ml, 25°C: 75 ml, 35°C: 100 ml) auf die Zielwerte 37°C und 200 ml/min gesteigert. Ebenso wird während der Aufwärmphase in bestimmten Abständen (15°C, 25°C, 37°C, sowie nach jedem Perfusatwechsel) der pH-Wert bestimmt und bei Bedarf durch Veränderung der CO₂-Konzentration im Atemgas innerhalb der Zielgrenzen gehalten (pH: 7,35 – 7,45). Durch diese Versuchsanordnung kann ein nahezu endotoxinfreies Perfusat und Schlauchsystem erreicht werden (56).



Abbildung 6: Konfiguration der arteriellen und venösen Katheter, sowie Trachea und Tubus am Herz-Lungenpaket unter Versuchsbedingungen

2.1.5 Steady – State Phase

Hierbei handelt es sich um eine 45-minütige Periode unter konstanten exogenen Bedingungen bei standardisierter Beatmung und Perfusion. Alle relevanten Parameter sollten sich innerhalb der vorgegebenen Normbereiche bewegen. Zusätzlich sollte der optische Aspekt der Lunge weiß, homogen entblutet sein und darf keine Anzeichen einer Ödembildung oder Atelektasen aufweisen. Weiterhin darf keine Perfusatleckage im Gewebe oder am Schlauchsystem vorhanden sein. Die Lunge sollte während des Aufwärmprozesses Gewicht verloren haben und es sollten sich auch keine spontanen, abrupten Änderungen in der Druck- und Gewichtsregistrierung zeigen. Nur Lungen, die diese Voraussetzungen erfüllten, wurden für das eigentliche Experiment zugelassen.

2.2 Physiologische Messgrößen

2.2.1 Messungen der pulmonalarteriellen und linksventrikulären Drucke

Die Messung der Perfusionsdrücke erfolgt vor und nach der Lungenstrombahn durch klinikübliche Einmaldruckwandler (Combitrans[®] Monitoring-Set, B. BRAUN, 34209 Melsungen, Messbereich: -50 mmHg bis 300 mmHg, Empfindlichkeit: 5µV/V * mmHg) über flüssigkeitsgefüllte Innenkatheter auf Höhe der Art. Pulmonalis, bzw. des linken Ventrikels. Die so ermittelten Drücke werden mit Hilfe eines Mehrkanalschreibers (Servogor 120, BBC Goerz Metrowatt, Nürnberg; Papiervorschub: 2 mm/min, Empfindlichkeit: 1 mm/mmHg) kontinuierlich über die Zeit aufgezeichnet. Durch regelmäßige Nullpunktbestimmungen wird Schreiberungenauigkeiten vorgebeugt.

2.2.2 Bestimmung des kapillären Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$)

Pathophysiologische Grundlagen: Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Fließgleichgewicht zwischen Filtrations- und Reabsorptionsvorgängen in den arteriellen und venösen Abschnitten der Kapillaren sowie den Lymphgefäßen. Bei Störung dieses Gleichgewichts treten Volumenverschiebungen zwischen dem vaskulären und interstitiellen Raum auf. Bei dem $K_{f,c}$ handelt es sich um ein Maß für die Permeabilität der Kapillarwand bei isotonen Lösungen. Dieser Wert wird rechnerisch ermittelt und stellt eine konstante Größe dar. Für das pro Zeiteinheit über die vaskuläre Grenzfläche tretende Volumen I_v gilt folgender Zusammenhang:

$$I_v = K_{f,c} * [(p_a - p_i) - \sigma * (\pi_a - \pi_i)] \quad (1)$$

p_a : hydrostatischer Druck in den Kapillaren

p_i : hydrostatischer Druck der interstitiellen Flüssigkeit

π_a : kolloidosmotischer Druck der Perfusatflüssigkeit

π_i : kolloidosmotischer Druck im Interstitium

σ : Reflektionskoeffizient

Für den Fall eines Ungleichgewichts zwischen Filtration und Reabsorption, d.h. eines nicht isogravimetrischen Zustands, gilt $\sigma = 0$. Somit wäre I_v lediglich proportional der effektiv wirksamen Druckdifferenz Δp zwischen Perfusat und Interstitium. Damit gilt für den $K_{f,c}$:

$$K_{f,c} = \frac{I_v}{\Delta p} \quad (2)$$

Weiterhin ist I_v proportional zu der Gewichtszunahme der Lunge ΔW pro Zeiteinheit Δt und somit eine bekannte Messgröße:

$$I_v = \frac{\Delta W}{\Delta t * \rho} \quad (3)$$

ρ : Perfusatsdichte [$\rho = 1 \text{ g/cm}^3$]

Somit gilt:

$$K_{f,c} = \frac{\Delta W}{\Delta t * \Delta p * \rho} \quad (3) \text{ in } (2)$$

Experimentelle Bestimmung des $K_{f,c}$:

Um den $K_{f,c}$ experimentell zu bestimmen, muss man das Gleichgewicht ($\Delta p = 0$), das sich optimalerweise im Steady-State eingestellt hat, stören. Dies geschieht durch eine definierte Erhöhung der Nachlast der Lunge, also Erhöhung des linksventrikulären und dadurch auch intrakapillären Druckes. Die nachgeschaltete Wassersäule wird im Rahmen eines „Hydrostatic-Challenge“ um $\Delta p = 10 \text{ cm H}_2\text{O}$ für 8 min erhöht (57). Die Folge ist eine Volumenverlagerung von den Lungenkapillaren ins Interstitium bis zum Erreichen eines erneuten Gleichgewichts auf höherem Gewichtsniveau. Die Größe jener

Volumenverschiebung nimmt in Richtung neuem Gleichgewicht in vergleichbaren Zeitintervallen um einen entsprechenden prozentualen Anteil ab. Als Folge ergibt sich für den $K_{f,c}$ eine einer Exponentialfunktion folgende Zeitabhängigkeit:

$$K_{f,c}(t) = K_{f,c} * e^{-k*t} \quad \text{und} \quad K_{f,c}(0) = K_{f,c}$$

e: Basis der natürlichen Logarithmen, $e = 2,718$

k: Proportionalitätsfaktor

Da der als „Compliance“ bezeichnete, durch druckpassive Flüssigkeitsfüllung des pulmonalen Gefäßbettes verursachte, initial überproportional starke Gewichtsanstieg die Bestimmung von $I_v(0)$ als Steigung der Gewichts-Zeit-Kurve zum Zeitpunkt $t=0$ mit einem „Hydrostatic-Challenge“ unmöglich macht, ist es notwendig, $I_v(t)$ zu den Zeitpunkten $t = 3, 4, 5, 6, 7, 8$ min zu ermitteln und nach Logarithmieren der so berechneten Werte für $K_{f,c}(t)$ den $K_{f,c}$ als Steigung einer Regressionsgeraden durch diese Werte zu berechnen (58). Der so ermittelte Wert wird delogarithmiert und auf das Lungenfeuchtgewicht (Wet Weight Lung, WWL) bezogen. Das WWL wird durch folgende Formel aus dem Körpergewicht (Body weight, BW) des Versuchstiers berechnet:

$$WWL = BW * 0,0024 \quad [WWL = g] \quad (59)$$

Für den $K_{f,c}$ ergibt sich die Dimension:

$$[K_{f,c} = cm^3/s * cmH_2O * g]$$

2.2.3 Bestimmung der Compliance (C)

Die Compliance spiegelt die druckpassive Dehnung des pulmonalen Gefäßbettes wider. Dadurch ist sie ein Maß für den vergrößerten intravasalen Flüssigkeitsgehalt der Lunge nach einem „Hydrostatic-Challenge“, also Erhöhung der Wassersäule um 10 cm H₂O.

Der Zahlenwert wird abgeschätzt durch Anlegen einer Tangente an die Gewichts-Zeit-Kurve des „Hydrostatic-Challenge“ bei $t = 2$ min und Extrapolation der gesamten Gewichtszunahme der Lunge von diesem Zeitpunkt zurück auf $t = 0$ min. Der so gefundene Zahlenwert wird auf den Betrag der linksventrikulären Druckerhöhung bezogen (57). Als Dimension von C ergibt sich also:

$$[C = g/cmH_2O]$$

2.2.4 Bestimmung der Retention (ΔW)

Die Differenz des Lungengewichts vor und nach einem Hydrostatic Challenge in [g] wird als Retention ΔW bezeichnet. Sie ist ein Indikator für die irreversible Flüssigkeitseinlagerung ins Lungeninterstitium nach Beendigung der Druckkaskade. Nach Wegnahme der Wassersäule (10 cm H_2O) nähert sich das Gewicht wieder seinem Ausgangswert plus Retention im Sinne einer Exponentialfunktion an. Daher wird der Wert der Retention nicht zu einem fixen Zeitpunkt, sondern nach dem Erreichen des neuen Gleichgewichts bestimmt.

2.2.5 Bestimmung des pulmonalkapillären Drucks (PCP)

Die Messung des pulmonalkapillären Druckes (PCP) erfolgt durch die „Double Occlusion“-Technik. Hierbei werden die prä- und postpulmonalen Abschnitte des Schlauchsystems simultan abgeklemmt und gleichzeitig ein Bypass eröffnet, so dass die Lungenperfusion für 30 Sekunden funktionell ausgeschaltet ist. Eine Druckregistrierung bei beschleunigtem Papiervorschub auf 60 mm/min liefert nun die Drucke des pulmonalen Kapillarbetts (60).

2.2.6 Bestimmung der Gefäßwiderstände (R_a , R_v)

Die Bestimmung der pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Widerstände erfolgt nach dem Ohmschen Gesetz:

$$R = \frac{P_{eff}}{Q} \quad (1)$$

R: Widerstand
p_{eff}: Druckgefälle
Q: Stromstärke

So gilt für R_a:

$$R_a = \frac{P_a - P_{cap}}{Q} \quad (2)$$

R_a: Pulmonalarterieller Widerstand
p_a: Pulmonalarterieller Druck
p_{cap}: Pulmonalkapillärer Druck
Q: Perfusionsgeschwindigkeit (konstant 200ml/min)

Analog gilt für R_v:

$$R_v = \frac{P_{cap} - P_v}{Q} \quad (3)$$

R_v: Pulmonalvenöser Widerstand
p_v: Pulmonalvenöser Druck
p_{cap}: Pulmonalkapillärer Druck
Q: Perfusionsgeschwindigkeit (konstant 200ml/min)

Die Widerstände werden in der Einheit $[Pa * s/ml]$ angegeben.

2.2.7 Statistische Methoden

Alle ermittelten Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte (Standard error of the mean, SEM). Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA ermittelt und wurde angenommen, wenn $p < 0,05$ war.

2.2.8 Standardisierte Stimulation der Kaninchenlungen

Um adäquate Vergleichbarkeit und konstante Versuchsbedingungen zu erreichen, wird nach einem standardisierten Protokoll vorgegangen (Dauer 45 min), das sich an einen erfolgreichen Steady State anschließt und verschiedene Manöver wie z.B. „Hydrostatic-Challenge“ zu definierten Zeitpunkten beinhaltet. Die Injektion der Substanzen erfolgt mittels Pipetten in den Perfusatbehälter. Dabei sind die Stoffe gemäß ihren Endkonzentrationen im Perfusat aliquotiert. Als Lösungsmittel werden Substanzen verwendet, die keinen Eigeneffekt auf die Lunge aufweisen, hierbei handelt es sich um Ethanol (FA Sigma Aldrich, 82024 Taufkirchen).

2.3 Biochemische Analytik

2.3.1 Probengewinnung

Zur weiterführenden biochemischen Aufarbeitung wurden verschiedene Proben ebenfalls nach standardisiertem Ablauf entnommen. Zum einen handelte es sich um Perfusatproben zum anderen um Lungengewebe. Über den Perfusatbehältern war eine Hahnbank installiert, über die jederzeit eine Probenentnahme möglich war. Weiterhin wurde nach Versuchsende eine Probe der Lunge durch Freeze-Clamp-Technik in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2 Nachweis der FAAH und Cyclooxygenase-2

Die Expression der Enzyme FAAH und Cyclooxygenase-2 wurde anhand von vollständiger RNA mittels Reverse Transkriptase – Polymerase-Kettenreaktion (RT-

PCR) nachgewiesen. Die cDNA wurde durch Superscript II[®] (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) generiert. Es wurden folgende PCR-Primer verwendet:

- Kaninchen-GAPDH, als nicht reguliertes Enzym: (202 bp) 5'-AGG TCA TCC ACG ACC ACT TC und 5'-GTG AGT TTC CCG TTC AGC TC.
- Kaninchen-FAAH (301 bp) 5'-GTG GTG CTG ACC CCC ATG CTG G und 5'-TCC ACC TCC CGC ATG AAC CGC AG.
- Kaninchen-COX-2 (159 bp) 5'- TGT GCT CAA ACA GGA GCA TC und 5'-AAA AGC AGC TCT GGG TCA AA.

Als Negativ-Kontrolle wurde keine reverse Transkriptase zugegeben. Alle PCR Produkte wurden ihrer Größe nach auf 2% Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA Banden wurden durch Anfärben des Gels mittels Ethidium-Bromid sichtbar gemacht.

2.4 Verwendete Substanzen

Folgende Substanzen wurden verwendet:

- Anandamid (Arachidonylethanolamid), ein Endocannabinoid (FA Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- MAFP (Methyl-arachidonyl-fluorophosphonat) ein Inhibitor der Fettsäurenamidohydrolase (Tocris/Biotrend, Köln, Deutschland).
- Acetylsalicylsäure, ein unspezifischer Cyclooxygenase-Inhibitor (Firma Bayer, Leverkusen, Deutschland)
- Nimesulide (N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl) methansulfonamid), ein spezifischer Cyclooxygenase-2-Inhibitor (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz)
- SQ 29,548 ([1S-[1 α , 2 α (Z), 3 α , 4 α]]-7-[3-[[2-[(Phenylamino) carbonyl] hydrazino] methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptansäure), ein Thromboxan-Rezeptorantagonist (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz)
- SC 19220 (8-Chloro-dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-10(11H)-carboxyl-säure, 2-acetylhydrazid), ein EP-1-Rezeptorantagonist (Tocris/Biotrend, Köln, Deutschland)

3 Ergebnisse

Bevor das eigentliche Experiment begann, wurde ein Steady-State von 45 Minuten Dauer vorgeschaltet. In dieser Periode wurden die Lungen unstimuliert belassen und mussten stabil in den Messparametern sein, sowie ohne pathologische Gewebeveränderungen (z.B. Ödem, Atelektasen) daraus hervorgehen. Weiterhin wurde die Gabe der verschiedenen Agonisten und Antagonisten in den entsprechenden Dosen weitestgehend randomisiert, um Fehler durch Tierchargen zu minimieren. In Vorversuchen wurde die Dosisfindung durchgeführt, und das Zeitfenster der Wirkung ermittelt ($t= 0$ bis 45 min).

3.1 Pulmonalarterielle Drucke (PAP)

3.1.1 Anandamidstimulation und Leerversuche

Unter Basisbedingungen lagen der Ausgangsdruck aller Lungen ($n=46$) im Steady-State, also von $t= -45$ bis 0 min, bei $5 \pm 0,2$ mmHg. In den Kontrollversuchen wurde nur das Lösungsmittel (500 μ l Ethanol 100 %) der Wirksubstanzen verwendet, das wie auch schon aus anderen Versuchsreihen bekannt, keinen Einfluss auf die Messparameter hat. Es zeigten sich lediglich minimale Druckschwankungen und der maximale PAP ($n=6$) lag bei $6,3 \pm 0,9$ mmHg nach $6,6 \pm 4,7$ min, was sich nicht merklich vom Ausgangsdruck unter Basisbedingungen unterscheidet. Die Injektion von Anandamid konnte den pulmonalarteriellen Druck (PAP) dosisabhängig erhöhen. Eine Gabe von 0,5 μ mol/l Anandamid ($n=6$) führte nach $8,1 \pm 0,3$ min zu einem maximalen PAP von $10,6 \pm 1,4$ mmHg. Der Druckanstieg kam gegen Ende des Versuchsprotokolls wieder auf Normalwerte zurück ($PAP_{(30\text{min})}=4,7 \pm 0,6$ und $PAP_{(45\text{min})}=4,5 \pm 0,5$ mmHg). Eine Konzentration von 1 μ mol/l Anandamid ($n=5$) bewirkte eine stärkere Druckreaktion. Bei $8,5 \pm 0,5$ min betrug der maximale PAP $21,1 \pm 3,5$ mmHg. Auch hier wurde gegen Versuchsende wieder Normaldruck erreicht ($PAP_{(30\text{min})}=6,4 \pm 0,5$ und $PAP_{(45\text{min})}=5,7 \pm 0,6$ mmHg). Noch deutlicher fiel der Druckanstieg bei einer Dosis von 5 μ mol/l Anandamid ($n=6$) aus. Der maximale PAP erreichte bei $8,8 \pm 0,7$ min Werte von $25,2 \pm 3,7$ mmHg. Nur diese hohe Dosierung von 5 μ mol/l Anandamid zeigte einen

prolongierten Effekt, welcher sich jedoch nicht signifikant von den Kontrollgruppen unterscheidet ($PAP_{(30\text{min})}=14,6 \pm 1,9$ und $PAP_{(45\text{min})}=8,6 \pm 2,0$ mmHg). Höher gewählte Konzentrationen von Anandamid führten zu exzessiven Druckentgleisungen, die einen Versuchsabbruch zur Folge hatten. Das Zeitfenster des Druckanstiegs bei den gewählten Dosierungen unterschied sich praktisch nicht voneinander ($0,5/1,0/5,0 \mu\text{mol/l}$: $8,1 \pm 0,3/8,5 \pm 0,5/8,8 \pm 0,7$ min). Die pulmonalarteriellen Reaktionen der Kontrollgruppe und nach Anandamidgabe sind in der folgenden Abb. 7 graphisch dargestellt. Zur Veranschaulichung der Anandamidwirkung sind in Abb. 8 die relativen Druckanstiege (ΔPAP_{max}) in einem Balkendiagramm aufgetragen. Auch hier imponiert die dosisabhängige PAP Erhöhung bei Anandamid $0,5 \mu\text{M}$ um $6,1 \pm 1,1$ mmHg, Anandamid $1 \mu\text{M}$ um $15,6 \pm 3,8$ mmHg und Anandamid $5 \mu\text{M}$ um $19,9 \pm 3,4$ mmHg. In der Kontrollgruppe betrug der ΔPAP_{max} lediglich $1 \pm 0,3$ mmHg.

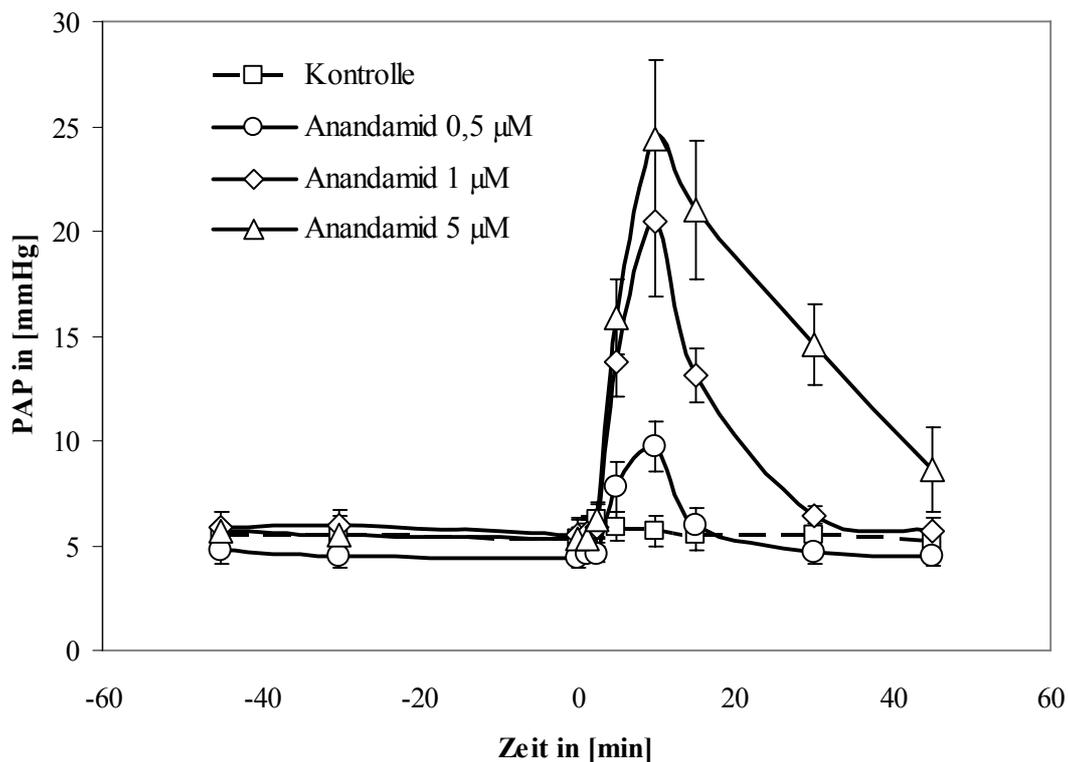


Abbildung 7: Dosis-Wirkungskurve von Anandamid $0,5 \mu\text{mol/l}$ ($n=6$), $1,0 \mu\text{mol/l}$ ($n=5$), $5 \mu\text{mol/l}$ ($n=6$) und Kontrolle ($n=6$)

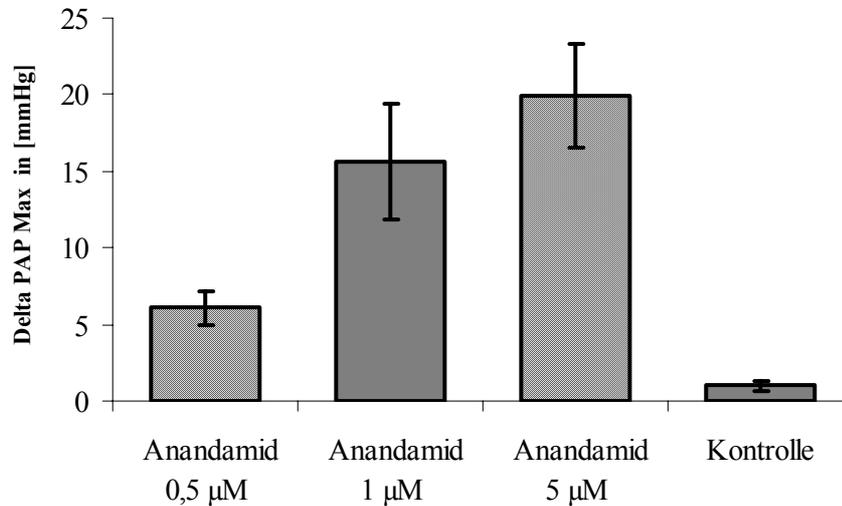


Abbildung 8: Δ PAP_{max} von Anandamid 0,5 µmol/l (n=6), 1,0 µmol/l (n=5), 5 µmol/l (n=6) und Kontrolle (n=6)

3.1.2 Enzyminhibitoren MAFP, Aspirin und Nimesulide

Der nächste Schritt bestand darin, das Anandamid-abbauende Enzym Fettsäuren-Amidohydrolase zu blockieren. Hierzu wurde der potente, irreversible FAAH-Blocker MAFP (Methyl-arachidonyl-fluorophosphonat) (n=3) in einer Konzentration von 100 nmol/l verwendet. Nach der Voraugabe von MAFP ins Perfusat wurden 5 µmol/l Anandamid dazugegeben. Die Drucksteigerung durch Anandamid wurde nahezu vollständig inhibiert. Der maximale PAP betrug lediglich $4,3 \pm 0,4$ mmHg bei $11,0 \pm 1,9$ min. Ebenso hat eine Vorbehandlung der Lunge mit 100 µmol/l des unspezifischen Cyclooxygenase Inhibitors Aspirin (n=5) zu einem Ausbleiben des Anandamideffektes geführt. Der maximale PAP war $5,4 \pm 0,5$ bei $8,1 \pm 2,0$ min. Durch die Verwendung des spezifischen Cyclooxygenase-2 Blockers Nimesulide (N-(4-Nitro-2-phenoxyphenyl) methansulfonamid) wurde versucht, den Abbauweg von Anandamid genauer aufzuklären. Auch unter Gabe von 10 µmol/l Nimesulide (n=3) konnten 5 µmol/l Anandamid keinen Druck entfalten. Bei $3,3 \pm 0,3$ min stieg der maximale PAP auf

7,1 ± 1,2 mmHg. Die Effekte der Enzyminhibitoren MAFP, Aspirin und Nimesulide sind in Form vom relativen Druckanstieg ($\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$) in Abb. 9 graphisch dargestellt. Als Referenzwert ist zusätzlich der $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ von 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid aufgetragen. Die Werte der drei Enzyminhibitoren unterschieden sich statistisch nicht voneinander. Nach Gabe von MAFP betrug der relative Druckanstieg durch Applikation von 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid lediglich $0,5 \pm 0,2\text{mmHg}$. Unter Gabe von Aspisol und 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid lag der $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ bei nur $0,7 \pm 0,1\text{mmHg}$, nach Anwendung von Nimesulide und 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid kam es zu einem $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ von $1,4 \pm 0,4\text{mmHg}$.

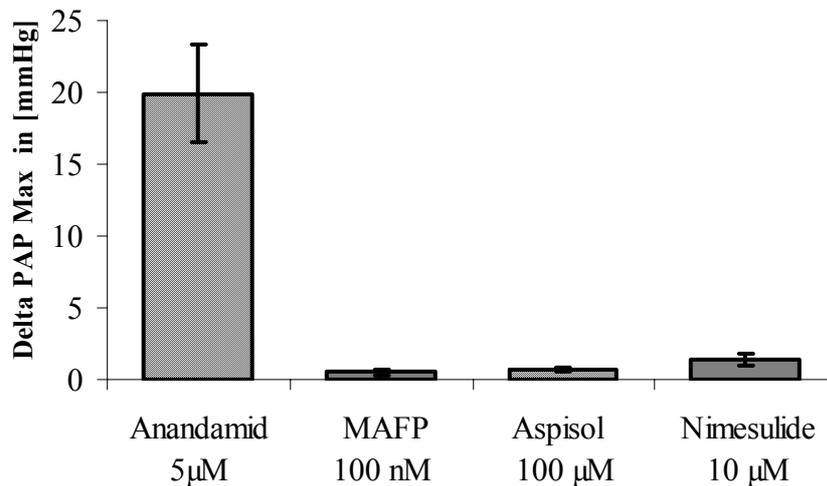


Abbildung 9: $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ von Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=6), MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=3), Aspisol 100 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=5), und Nimesulide 10 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=3)

3.1.3 Rezeptorblocker SQ 29,548 und SC 19220

Da die in 3.1.2 beschriebenen Ergebnisse nahe legen, dass COX-Produkte für den Druckanstieg verantwortlich sind, wurde als erstes versucht, Thromboxan als möglichen pulmonalen Vasokonstriktor zu hemmen. Trotz der Voraussage von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ des Thromboxan-Rezeptorblockers SQ 29,548 ([1S-[1 α , 2 α (Z), 3 α , 4 α]]-7-[3-[[2-

[(Phenylamino) carbonyl] hydrazino] methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptansäure), konnte 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid seine volle Wirkung entfalten. Die Injektion von 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid erzielte unter Vorausgabe von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ SQ 29,548 ($n=6$) einen maximalen PAP von $26,4 \pm 3,6$ mmHg bei $12,9 \pm 0,7$ min (Vgl. 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid: $25,2 \pm 3,7$ mmHg bei $8,8 \pm 0,7$ min). Auch gegen Versuchsende wurde der Basisdruck nicht mehr erreicht ($\text{PAP}_{(30\text{min})}=19,0 \pm 3,6$ und $\text{PAP}_{(45\text{min})}=12,2 \pm 2,7$ mmHg). Eine weitere Gruppe von COX-Produkten, die mit der pulmonalen Strombahn interagiert, sind Prostaglandine z.B. durch Prostaglandin-E2 via EP1-Rezeptoren. Dies wurde durch Gabe des EP1-Rezeptorantagonisten SC 19220 (8-Chloro-dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-10(11H)-carboxylsäure, 2-acetylhydrazid) getestet. Die Vorausgabe von 100 $\mu\text{mol/l}$ SC 19220 ($n=6$) hat den Anandamideffekt deutlich, signifikant vermindert. Der maximale PAP erreichte $13,5 \pm 3,1$ mmHg bei $10,2 \pm 1,0$ min (Vgl. 5 μM Anandamid: $25,2 \pm 3,7$ mmHg bei $8,8 \pm 0,7$ min). Gegen Ende des Experiments wurden wieder Normaldrücke erreicht ($\text{PAP}_{(30\text{min})}=7,6 \pm 1,1$ und $\text{PAP}_{(45\text{min})}=5,5 \pm 0,6$ mmHg). Allerdings konnte SC 19220 den PAP-Anstieg nur teilweise, und nicht wie MAFP, Aspirin und Nimesulide vollständig verhindern. Im Folgenden sind die pulmonal-arteriellen Druckverhältnisse unter Gabe von SQ 29,548 mit 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid und SC 19220 mit 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid in Abb. 10 graphisch dargestellt. Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ und die Kontrollgruppe dienen als Referenzwerte. In Abb. 11 sind die entsprechenden Werte für $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ abgebildet. Hierbei erreichte SQ 29,548 mit 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid einen $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ von $20,3 \pm 3$ mmHg, also einen mit alleiniger Gabe von Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ vergleichbaren Wert. Die Vorausgabe von SC 19220 vor 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid erbrachte einen $\Delta\text{PAP}_{\text{max}}$ von $8,4 \pm 2,9$ mmHg.

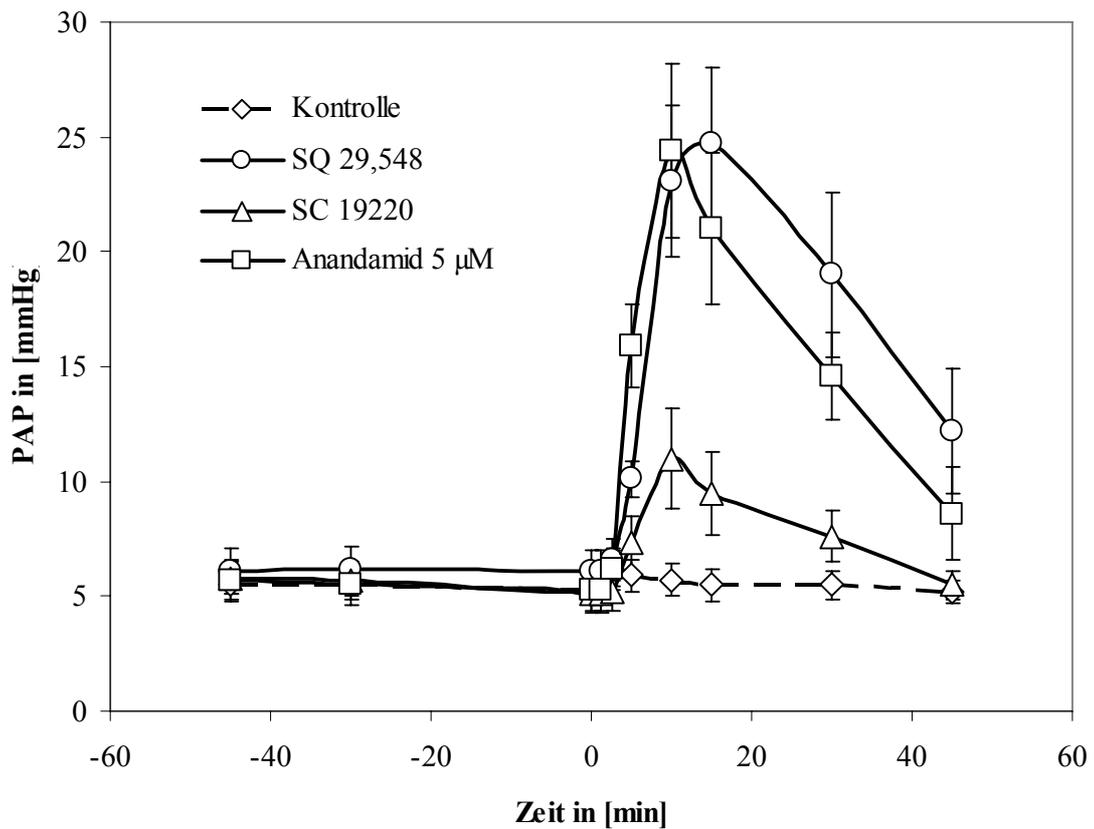


Abbildung 10: Dosis-Wirkungskurven von SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6), SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6), Anandamid 5 µmol/l (n=6) und Kontrolle (n=6).

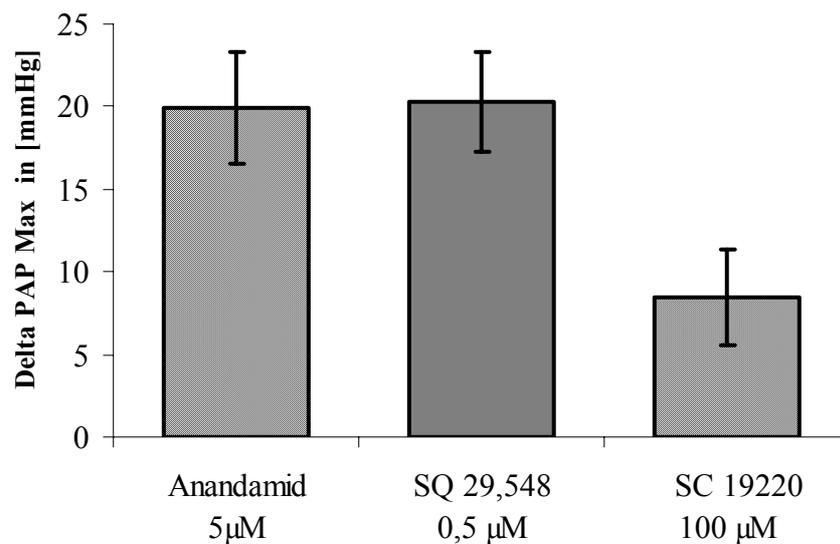


Abbildung 11: Δ PAP_{max} von Anandamid 5 µmol/l (n=6), SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6), SC 19220 100µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6)

3.2 Pulmonalkapillare Drücke und pulmonale Widerstandsverteilung

3.2.1 Pulmonalkapillare Drücke (PCP)

Der pulmonalkapillare Druck wurde mit der „Double-Occlusion“ Methode bestimmt. Durch funktionelle Herausnahme der Lunge aus dem Perfusionskreislauf mittels Bypass lässt sich der Druck im Kapillarbett messen. Der Basisdruck aller Lungen (n=46) vor Stimulation im Steady-State, gemessen bei t=-30 min, lag bei $2,9 \pm 0,1$ mmHg. Unter Stimulation wurde der PCP zu den Zeitpunkten t=15 min, sowie am Versuchsende bei t=45 min ermittelt. In der Kontrollgruppe lagen die Werte bei $PCP_{(15)} 2,8 \pm 0,3$ mmHg. Die pulmonalkapillaren Drücke bei t=15 min, also nach Stimulation, zeigten hingegen unterschiedliche Werte. Der $PCP_{(15)}$ von $0,5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid lag im Bereich der Kontrollgruppe, jedoch wirkte sich die Gabe von Anandamid $1 \mu\text{mol/l}$ mit einem $PCP_{(15)}$ von $4,0 \pm 0,1$ mmHg und $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid mit einem $PCP_{(15)}$ von $4,4 \pm 0,3$ mmHg auf das kapillare Gefäßbett aus (Vgl. $PCP_{(15)}$ Kontrolle: $2,8 \pm 0,3$ mmHg). Mit steigender Anandamiddosis erhöhte sich auch der $PCP_{(15)}$ signifikant gegenüber der Kontrolle. Die Gruppe der Antagonisten (MAFP, Aspisol, Nimesulide und SC 19220) war durchweg ohne Effekt auf den $PCP_{(15)}$. Die Werte lagen im Bereich der Kontrolle und unterschieden sich signifikant von ihrem Referenzwert Anandamid $5 \mu\text{mol/l}$. Die einzige Ausnahme bildet SQ 29,548 dessen, Wert ($PCP_{(15)} 5,4 \pm 0,5$ mmHg) sich - analog zum PAP - nicht signifikant von einer alleinigen $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamidgabe ($PCP_{(15)} 4,4 \pm 0,3$ mmHg) unterscheidet. Am Versuchsende war der $PCP_{(45)}$ von Anandamid $1 \mu\text{mol/l}$ erhöht, alle anderen Stoffe differierten nicht signifikant von den Basisdrücken. Es findet also eine gewisse Interaktion zwischen Endocannabinoiden und dem Kapillarbett statt, jedoch ist der Haupteffekt eher präkapillar zu sehen. In der folgenden Tabelle 1 sind alle pulmonal-kapillaren Drücke zusammengefasst.

Pulmonalkapillarer Druck (PCP) in [mmHg]

	PCP _(15min)	PCP _(45min)
Kontrolle (n=6)	2,8 ± 0,3	2,8 ± 0,1
Anandamid 0,5 µM (n=6)	3,0 ± 0,4	2,9 ± 0,3
Anandamid 1 µM (n=5)	4,0 ± 0,1**	3,5 ± 0,2*
Anandamid 5 µM (n=6)	4,4 ± 0,3**	3,2 ± 0,2
MAFP + Anandamid 5 µM (n=3)	2,1 ± 0,4††	2,4 ± 0,6
Aspisol + Anandamid 5 µM (n=5)	2,8 ± 0,4††	3,1 ± 0,2
Nimesulide + Anandamid 5 µM (n=3)	2,4 ± 0,1††	2,7 ± 0,1
SQ 29,548 + Anandamid 5 µM (n=6)	5,4 ± 0,5	3,4 ± 0,4
SC 19220 + Anandamid 5 µM (n=6)	3,1 ± 0,3††	2,9 ± 0,1

Tabelle 1: PCP-Werte von Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 µmol/l, MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), Aspisol 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=5), Nimesulide 10 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6) und SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6). * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle und † p<0,05, †† p<0,01 vs. Anandamid 5 µmol/l.

3.2.2 Arterielle Widerstände (R_a)

Der arterielle Widerstand wurde im Rahmen des „Double-Occlusion“ Manövers berechnet und wird in [$Pa * s/ml$] angegeben. Analog zum PCP wurden die Werte zu den Zeiten t=-30 min, 15 min und 45 min bestimmt. Die Basiswerte aller Versuche (n=46) zu t=-30 min betragen $189,7 \pm 21,2 Pa * s/ml$. Die arteriellen Widerstände der Kontrollgruppe bei t=15 min waren $219,8 \pm 60,1 Pa * s/ml$ und t=45 min $195,6 \pm 53,7 Pa * s/ml$. Nach Applikation von 0,5 µmol/l Anandamid kam es zu keiner signifikanten Änderung des arteriellen Widerstandes. Die Gabe von 1 µmol/l Anandamid führte zu einer deutlichen Erhöhung des R_a um R_{a(15)} $730 \pm 97,9 Pa * s/ml$,

wobei am Versuchende wieder Ausgangswerte erreicht waren ($R_{a(45)}$ $180,1 \pm 34,3 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$). Noch deutlicher fiel die R_a -Steigerung bei der Applikation von $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid aus. Hierbei erreichte der $R_{a(15)}$ $1332 \pm 254,8 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$ und der Effekt hielt bis an das Ende des Experiments mit $R_{a(45)}$ $386,3 \pm 162,4 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$ an. Beide Dosierungen unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Die höchsten R_a -Werte wurden unter der Konstellation $0,5 \mu\text{mol/l}$ SQ $29,548$ und $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid mit einem $R_{a(15)}$ $1554 \pm 253,1 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$ erreicht. Auch hier kam es zu einem prolongierten Effekt mit $R_{a(45)}$ $546,7 \pm 177,7 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$. Es besteht allerdings kein signifikanter Unterschied zur alleinigen Gabe von $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid als Referenzwert. Die Versuchsreihen, die mit einer deutlichen PAP Steigerung einhergehen, weisen auch hohe arterielle Widerstände auf. Bei den übrigen Versuchen mit Enzyminhibitoren und Rezeptorblockern ergaben sich signifikante Unterschiede zur alleinigen $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamidgabe. Die Drucke waren deutlich niedriger und lagen auf dem Niveau der Kontrolle. In Bezug auf die Werte bei $t=45$ min ergaben sich keine relevanten Unterschiede. Die arteriellen Widerstände sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Pulmonal-Arterieller Widerstand R_a in [Pa * s/ml]

	$R_{a(15min)}$	$R_{a(45min)}$
Kontrolle (n=6)	219,8 ± 60,1	195,6 ± 53,7
Anandamid 0,5 µM (n=6)	179,6 ± 37	141,5 ± 41,1
Anandamid 1µM (n=5)	730 ± 97,9*	180,1 ± 34,3
Anandamid 5µM (n=6)	1332 ± 254,8**	386,3 ± 162,4
MAFP + Anandamid 5 µM (n=3)	166,2 ± 52,8†	88,4 ± 40,2
Aspisol + Anandamid 5µM (n=5)	173,7 ± 11,8††	122,2 ± 20,7
Nimesulide + Anandamid 5µM (n=3)	278,7 ± 128,1†	241,2 ± 138,7
SQ 29,548 + Anandamid 5µM (n=6)	1554,4 ± 253,1	546,7 ± 177,7
SC 19220 + Anandamid 5µM (n=6)	868 ± 361,4†	203,7 ± 48

Tabelle 2: Widerstand $R_{a(15)}$ und $R_{a(45)}$ von Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 µmol/l, MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), Aspisol 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=5), Nimesulide 10 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6) und SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6). * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle und † p<0,05, †† p<0,01 vs. Anandamid 5 µmol/l.

3.2.3 Venöse Widerstände (R_v)

Auch die venösen Widerstände wurden durch das „Double-Occlusion“ Manöver ermittelt. Die Basiswerte bei t=-30 min aller Lungen im Steady-state (n=46) waren $64,7 \pm 4,6 Pa * s/ml$. In der Kontrollgruppe erreichte der $R_{v(15)}$ $50,0 \pm 9,7 Pa * s/ml$ und $R_{v(45)}$ $56,3 \pm 6,9 Pa * s/ml$. Nach Gabe von 1 µmol/l Anandamid steigt der $R_{v(15)}$ auf $119,0 \pm 8,2 Pa * s/ml$ wobei der Effekt nicht bis zum Ende ($R_{v(45)}$ $67,5 \pm 10,7 Pa * s/ml$) bestand. Bei 5 µmol/l Anandamid fiel der $R_{v(15)}$ mit $184,9 \pm 39,6 Pa * s/ml$ höher aus, aber ebenso ohne prolongierte Wirkung ($R_{v(45)}$ $70,8 \pm 17,3 Pa * s/ml$). Beide Werte unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Der höchste R_v wurde nach

Gabe von 0,5 $\mu\text{mol/l}$ SQ 29,548 und 5 $\mu\text{mol/l}$ Anandamid mit einem $R_{v(15)}$ $297,5 \pm 26,2 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$ erzielt. Hierbei war der $R_{v(45)}$ ($70,8 \pm 17,3 \text{ Pa} \cdot \text{s/ml}$) bis zum Ende der Versuchs erhöht. Alle übrigen venösen Widerstände bei $t=15$ und 45 min unterscheiden sich nicht signifikant von ihren jeweiligen Referenzwerten. Die Werte für $R_{v(15)}$ und $R_{v(45)}$ sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Pulmonal-Venöser Widerstand R_v in [$\text{Pa} \cdot \text{s/ml}$]

	$R_{v(15\text{min})}$	$R_{v(45\text{min})}$
Kontrolle (n=6)	$50,9 \pm 9,7$	$56,3 \pm 6,9$
Anandamid 0,5 μM (n=6)	$72,4 \pm 17$	$48,3 \pm 16,9$
Anandamid 1 μM (n=5)	$119 \pm 8,2^{**}$	$67,5 \pm 10,7$
Anandamid 5 μM (n=6)	$184,9 \pm 39,6^{**}$	$70,8 \pm 17,3$
MAFP + Anandamid 5 μM (n=3)	$128,6 \pm 80,4$	$64,3 \pm 16,1$
Aspisol + Anandamid 5 μM (n=5)	$77,2 \pm 23,5$	$70,8 \pm 10,9$
Nimesulide + Anandamid 5 μM (n=3)	$69,7 \pm 14,2$	$75 \pm 14,2$
SQ 29,548 + Anandamid 5 μM (n=6)	$297,5 \pm 26,2^\dagger$	$112,6 \pm 33,7$
SC 19220 + Anandamid 5 μM (n=6)	$90,1 \pm 19,4$	$86,8 \pm 10,9$

Tabelle 3: Pulmonalvenöse Widerstände $R_{v(15)}$ und $R_{v(45)}$ von Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 $\mu\text{mol/l}$, MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=3), Aspisol 100 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=5), Nimesulide 10 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=3), SQ 29,548 0,5 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=6) und SC 19220 100 $\mu\text{mol/l}$ und Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$ (n=6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle und † $p < 0,05$, ‡ $p < 0,01$ vs. Anandamid 5 $\mu\text{mol/l}$.

3.3 Gefäßpermeabilität ($K_{f,c}$), Compliance (C) und Retention (ΔW)

Als Marker für die Durchlässigkeit des Kapillarbetts wurden die Werte des kapillaren Filtrationskoeffizienten ($K_{f,c}$) betrachtet. Dieser wurde einmal im Steady-State bei $t = -15$ min und während der Versuchsphase bei $t = 30$ min bestimmt. In den Steady-States unterschieden sich die $K_{f,c}$ -Werte nicht signifikant von den jeweiligen Referenzgruppen Kontrolle und $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid. In der Experimentalphase war lediglich der $K_{f,c}$ unter Gabe von SC 19220 $100 \mu\text{mol/l}$ und Anandamid $5 \mu\text{mol/l}$ signifikant höher gegenüber alleiniger Gabe von Anandamid $5 \mu\text{mol/l}$. Ansonsten gab es keinerlei signifikante Veränderungen bei $t = 30$ min in Bezug auf den $K_{f,c}$.

Ebenso differieren die Werte für die Compliance (C), also dem Maß der druckpassiven Dehnung der Kapillaren, nur geringfügig voneinander. Sowohl in den Steady-States bei $t = -15$ min, als auch in der Experimentalphase bei $t = 30$ min, gab es keine signifikanten Unterschiede zu den Vergleichsgruppen Kontrolle und $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid.

Durch die Retention (ΔW) wurde die irreversible Einlagerung von Flüssigkeit ins Interstitium z.B. durch Druck oder erhöhte Gefäßpermeabilität registriert. In Übereinstimmung mit dem $K_{f,c}$ kam es in den Steady-States nicht zu vermehrten Flüssigkeitseinlagerungen im Vergleich zur Kontrolle bzw. $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid. Zusätzlich hätte eine exzessive Flüssigkeitseinlagerung, als nicht erreichtes Qualitätsmerkmal, in der Vorphase zur experimentellen Eliminierung dieses Organs geführt. Lediglich in den Versuchsreihen mit dem Thromboxan-Rezeptorantagonisten SQ 29,548 $0,5 \mu\text{mol/l}$ mit Anandamid $5 \mu\text{mol/l}$ kam es in der Versuchsphase $t = 30$ min zu einer deutlichen, signifikanten Erhöhung von ΔW .

Nach Stimulation mit $5 \mu\text{mol/l}$ Anandamid lagen alle drei Parameter ($K_{f,c}$, C und ΔW) immer noch im Bereich der Ausgangswerte. In der Zusammenschau der Daten ist es nahe liegend, dass das Kapillarnett nicht durch Anandamid oder einen der anderen Stoffe beeinflusst wird. Die relevanten Druckveränderungen scheinen sich zum größten Teil, aber nicht ausschließlich präkapillar abzuspielen. Die Daten für $K_{f,c}$, C und ΔW sind in den Tabellen 4, 5 und 6 dargestellt.

Kapillarer Filtrationskoeffizient $K_{f,c}$ in $[10^{-4} * s^{-1} * cmH_2O^{-1} * g^{-1}]$

	Steady-State (-15min)	Experiment (30min)
Kontrolle (n=6)	1,23 ± 0,01	1,26 ± 0,15
Anandamid 0,5 µM (n=6)	1,26 ± 0,19	1,46 ± 0,22
Anandamid 1µM (n=5)	1,03 ± 0,07	1,3 ± 0,29
Anandamid 5µM (n=6)	1,25 ± 0,21	1,56 ± 0,25
MAFP + Anandamid 5 µM (n=3)	2,12 ± 0,61	1,58 ± 0,07
Aspisol + Anandamid 5 µM (n=5)	1,43 ± 0,21	1,32 ± 0,23
Nimesulide + AEA 5 µM (n=3)	1,17 ± 0,26	2,11 ± 0,33
SQ 29,548 + Anandamid 5 µM (n=6)	1,98 ± 0,26	4,01 ± 1,26
SC 19220 + Anandamid 5 µM (n=6)	2 ± 0,48	2,85 ± 0,38 [†]

Tabelle 4: $K_{f,c(-15)}$ und $K_{f,c(30)}$ Werte von Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 µmol/l, MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), Aspisol 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=5), Nimesulide 10 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6) und SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6). * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle und [†] p<0,05, ^{††} p<0,01 vs. Anandamid 5 µmol/l.

Pulmonale Compliance C in [g/cmH₂O]

	Steady-State (-15min)	Experiment (30min)
Kontrolle (n=6)	0,4 ± 0,02	0,41 ± 0,02
Anandamid 0,5 µM (n=6)	0,47 ± 0,04	0,46 ± 0,04
Anandamid 1µM (n=5)	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,03
Anandamid 5µM (n=6)	0,45 ± 0,02	0,4 ± 0,02
MAFP + Anandamid 5 µM (n=3)	0,49 ± 0,08	1,93 ± 1,59
Aspisol + Anandamid 5 µM (n=5)	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,02
Nimesulide + Anandamid 5 µM (n=3)	0,45 ± 0,02	0,42 ± 0,02
SQ 29,548 + Anandamid 5 µM (n=6)	0,42 ± 0,04	0,39 ± 0,04
SC 19220 + Anandamid 5 µM (n=6)	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,02

Tabelle 5: Compliance C₍₋₁₅₎ und C₍₃₀₎ für Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 µmol/l, MAFP 100nmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), Aspisol 100µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=5), Nimesulide 10µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), SQ 29548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6) und SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6). * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle und † p<0,05, †† p<0,01 vs. Anandamid 5 µM.

Retention ΔW in [g]

	Steady-State	Experiment
Kontrolle (n=6)	2,33 ± 0,18	3,02 ± 1,07
Anandamid 0,5 µM (n=6)	1,75 ± 0,32	2,3 ± 0,42
Anandamid 1µM (n=5)	1,45 ± 0,28*	1,74 ± 0,47
Anandamid 5µM (n=6)	1,93 ± 0,47	2,65 ± 0,48
MAFP + Anandamid 5 µM (n=3)	2,92 ± 0,77	1,84 ± 0,53
Aspisol + Anandamid 5 µM (n=5)	2,02 ± 0,28	2,11 ± 0,38
Nimesulide + Anandamid 5 µM (n=3)	2,06 ± 0,83	3,64 ± 0,78
SQ 29,548 + Anandamid 5 µM (n=6)	2,51 ± 0,23	7,99 ± 2,31 [†]
SC 19220 + Anandamid 5 µM (n=6)	2,46 ± 0,62	3,22 ± 0,37

Tabelle 6: Ergebnistabelle $\Delta W_{(SS)}$ und $\Delta W_{(Exp)}$ für Kontrolle, Anandamid 0,5/1/5 µmol/l, MAFP 100 nmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), Aspisol 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=5), Nimesulide 10 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=3), SQ 29,548 0,5 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6) und SC 19220 100 µmol/l und Anandamid 5 µmol/l (n=6). * p<0,05, ** p<0,01 vs. Kontrolle und [†] p<0,05, ^{††} p<0,01 vs. Anandamid 5 µmol/l.

3.4 Nachweis der Fettsäureamidohydrolase (FAAH)

Der RNA-Nachweis des Enzyms FAAH erfolgte mittels RT-PCR. Die Versuche wurden dreimal mit qualitativ gleichem Ergebnis wiederholt. Als nicht reguliertes Referenzenzym wurde Glyceraldehyd-3-Phosphodehydrogenase (GAPDH) verwendet. Als positive Kontrolle diente Nierengewebe der Ratte, in dem die FAAH bekanntermaßen vorkommt (61).

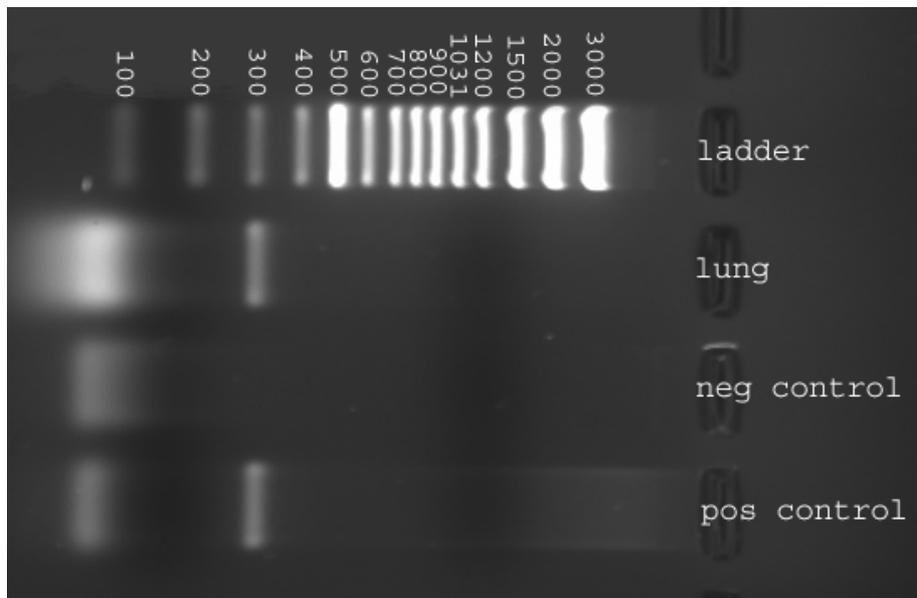


Abbildung 12: Nachweis der FAAH-RNA in Lungengewebe

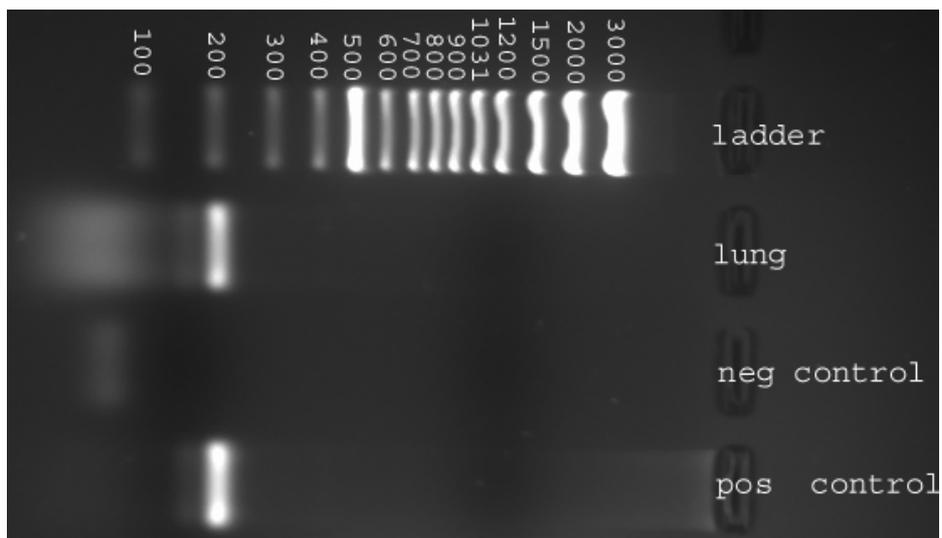


Abbildung 13: Nachweis der GAPDH-RNA als Kontrolle

3.5 Nachweis der Cyclooxygenase-2

Die RNA des Enzyms Cyclooxygenase-2 wurde analog zur FAAH mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Experimente wurden dreimal mit gleichem Ergebnis wiederholt. Als Positive Kontrolle diente Nierengewebe der Ratte (61).

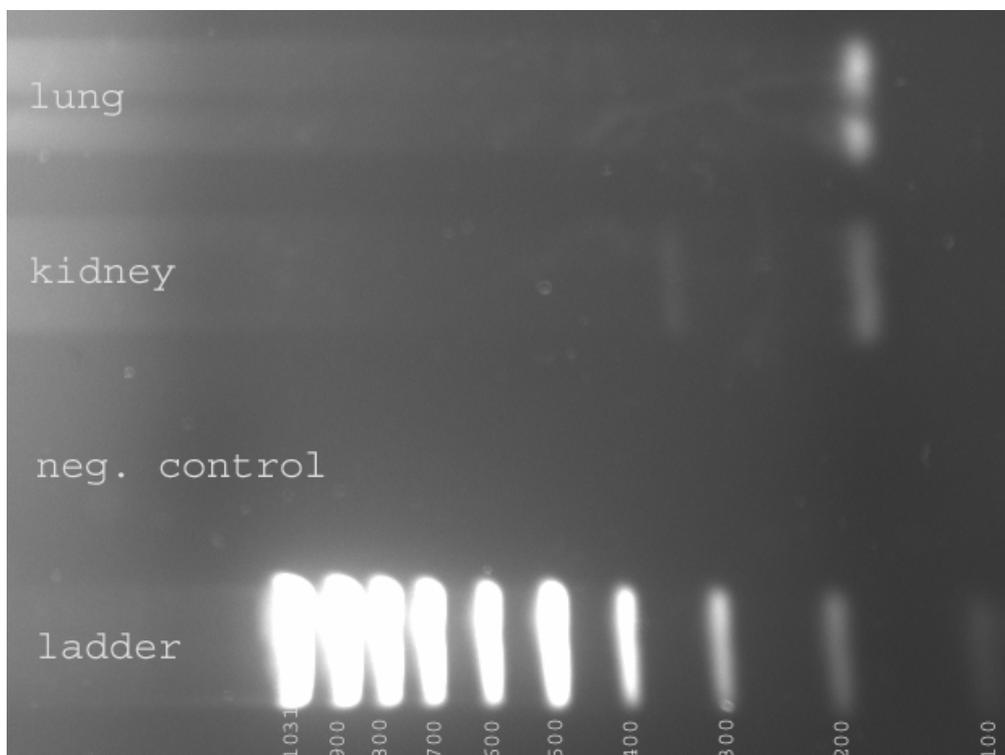


Abbildung 14: Nachweis der COX-2-RNA in der Kaninchenlunge und Niere als Kontrolle

4 Diskussion

4.1 Diskussion des Modells

Das Modell der isolierten Kaninchenlunge ist eine anerkannte und etablierte Methode zur Erforschung der Pathophysiologie der pulmonalen Zirkulation. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, am isolierten Organ physiologische Reaktionen zu beobachten. Dabei kann man den Einfluss von neuronalen, endokrinen und hämatogenen Faktoren ausschalten oder kontrollieren. Verschiedene Werte (z.B. PAP, ΔW) können direkt, „real-time“ gemessen werden. Andere Parameter (z.B. PCP, $K_{f,c}$) werden indirekt durch Berechnung bestimmt. Sowohl das Puffermedium, als auch das Lungenparenchym können biochemisch aufgearbeitet werden. Die Möglichkeiten dieses Modells sind aber auch limitiert. So können Ergebnisse und Reaktionen nicht immer ohne weiteres einem bestimmten anatomischen Abschnitt, also Parenchym oder Gefäßsystem zugeordnet werden. Trotz ausgiebiger Spülung der Lunge mit Perfusatlösung kann ein Vorhandensein von wandständigen Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen) nicht vollständig ausgeschlossen werden. Diese können unter Umständen inflammatorische oder vasoaktive Mediatoren sezernieren. Die Präparation und Isolation der Lunge per se können eigenständige Aktivierungskaskaden triggern. Der Einfluss solcher Reaktionen wird durch das Vorschalten eines Steady-States vermindert, kann jedoch niemals vollständig ausgeschaltet werden. Zeitlich ist die Haltbarkeit der Lunge auf einige Stunden begrenzt – Langzeitversuche sind nicht möglich. Die Entkoppelung von der zentral-vegetativen Steuerung kann sowohl ein Vorteil, als auch ein unbekannter Störfaktor sein (62).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Zugabe von Anandamid ins Perfusat führte zu einer deutlichen, dosisabhängigen Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks. Analog zum PAP verhielten sich die pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Widerstände. Auch der im Kapillarbett gemessene Druck stieg unter Anandamidgabe leicht an. Die Parameter, die eine Interaktion bzw. Schädigung des Kapillarbets nahe legen, blieben durchweg unbeeinflusst. Eine Umlagerung von Flüssigkeit ins Interstitium durch „Capillary Leak“

oder vermehrte Filtration fand nicht statt. Vielmehr handelt es sich um eine hauptsächlich präkapillare Reaktion, wahrscheinlich auf arteriolärer Ebene. Es kam nicht, wie eigentlich erwartet, zu einer Senkung der Druckwerte. Die Ausgangshypothese, dass eine pulmonalarterielle Relaxation durch Cannabinoidagonisten vermittelt wird, trat nicht ein.

Weiterhin besitzen endogene Cannabinoide einen anderen Abbauweg als pflanzliche oder synthetische Cannabinoide; sie werden durch eine enzymatisch vermittelte Hydrolyse in die Stoffe Ethanolamin und Arachidonsäure gespalten. Dies geschieht über das Enzym Anandamid-Amidohydrolase oder auch Fettsäuren-Amidohydrolase (FAAH) genannt (63). Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in der Degradation von Anandamid. So konnte gezeigt werden, dass in FAAH deletierten (-/-) knock-out Mäusen die zerebrale Anandamidkonzentration 15-fach höher ist als beim Wildtyp. Die Konzentrationserhöhung sorgte für eine Reihe von Symptomen wie Hypomotilität, Analgesie, Catalepsie und Hypothermie (64). Durch die Hydrolyse verlieren die Endocannabinoide allerdings ihre cannabimimetische, also CB-Rezeptor abhängige, Wirkung. Verschiedene Derivate der FAAH fungieren als Inhibitoren dieses Enzyms, ein unspezifischer Blocker der FAAH ist der Serin-Proteaseninhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Deutlich spezifischer ist der in dieser Arbeit verwendete potenteste, irreversible FAAH-Inhibitor Methyl-arachidonyl-fluorophosphonat (MAFP)(65). Eine Voraugabe von MAFP ins Perfusat konnte den Anandamideffekt vollständig blockieren, d.h. es ist anzunehmen, dass Abbauprodukte Anandamids ihre Wirkung an der Kaninchenlunge entfalten. Sowohl die PAP-Werte, als auch die übrigen Parameter unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach dem physiologischen Vorhandensein der FAAH generell und insbesondere im Lungengewebe. Die Verteilung der FAAH ist bei der Ratte sehr gut dokumentiert, hierbei fanden sich die höchsten RNA Konzentrationen in der Leber und im Intestinal-Trakt und nur geringe Mengen in der Lunge (66,67). Bei Mäusen fand man nur vernachlässigbare Konzentrationen in der Lunge (68). Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) physiologische Konzentrationen an FAAH-RNA in Kaninchenlungen nachgewiesen werden. Dieses ist die Grundvoraussetzung für den vermuteten Mechanismus.

Wenn nun Anandamid durch die FAAH hydrolysiert wird, können die dabei entstandenen Arachidonsäureprodukte über Lipooxygenasen zu Leukotrienen und Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HETE) umgewandelt werden. Daneben kann Anandamid auch direkt durch z.B. gereinigte 12- bzw. 15-Lipooxygenasen in vitro verstoffwechselt werden (69-71). Andererseits können die aus Anandamid gewonnenen Metabolite auch als Substrate für Cyclooxygenasen dienen. Als Stoffwechselprodukte entstehen dadurch Prostaglandine, Thromboxane und Prostazykline (72). Eine Voraussage des unspezifischen Cyclooxygenaseinhibitors Acetylsalicylsäure hat den Anandamideffekt vollständig verhindert. Ebenso konnte sich nach Injektion des spezifischen Cyclooxygenase-2-Inhibitors Nimesulide keine Anandamidwirkung entfalten. Sowohl bei Aspisol[®], als auch bei Nimesulide unterschieden sich sämtliche Parameter nicht von den Kontrolllungen. Diese Tatsache unterstützt die These, dass die Substanzen, die diese Druckerhöhung vermitteln, Stoffwechselprodukte der Cyclooxygenase-2 sind. Analog zum Enzym FAAH stellt sich die Frage nach dem physiologischen Vorkommen der Cyclooxygenase-2. Die Expression der Cyclooxygenase-1 gehört zur konstitutiven, keiner Stimulation unterliegenden Grundausstattung der meisten Gewebe. Im Gegensatz dazu kann man in den wenigsten Fällen eine basale Cyclooxygenase-2-Expression finden. Eine Ausnahme bilden nur die Nieren und bestimmte Areale im zentralen Nervensystem (73). Eine niedrige Basalsekretion fand man im Colonepithel und in peribronchialen Drüsen, hohe Konzentrationen hingegen wurden in aktivierten Immunzellen, atheromatösen Plaques und neoplastischen Epithelzellen detektiert (74). Generell ist über die Cyclooxygenase-2 Expression in der Lunge wenig bekannt. Interessanterweise konnte man Cyclooxygenase-2 in der Pulmonalarterie von adulten Kaninchen nachweisen (75). Im Falle der isolierten Lunge wurde mittels RT-PCR die Expression von Cyclooxygenase-2 nachgewiesen. Die Konzentration im Lungengewebe war sogar höher als im Referenzorgan Niere.

Wichtige Metabolite der Cyclooxygenase-2 sind Prostaglandine. Besonders der Subtyp Prostaglandin-E2 spielt eine zentrale Rolle. Humane rekombinante Cyclooxygenase-2 ist in der Lage, Anandamid als Substrat zu verwenden und zu dem Stoffwechselprodukt Prostaglandin-E2-Ethanolamid umzubauen (76). Man unterscheidet insgesamt vier verschiedene Prostaglandinrezeptor-Subtypen (EP-1, EP-2, EP-3, EP-4), die je nach Tierspezies, konstitutiver Verteilung und verwendetem Prostanoid komplexe

Wirkungen aufweisen. Der EP-1-Rezeptor führt zu einer Calcium-vermittelten Konstriktion im Vas deferens und in der glatten Muskulatur des Ileums. (77,78). An EP-1-Rezeptor-deletierten Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass PGE₂ via EP-1-Rezeptoren sowohl Schmerz, als auch einen systemischen Blutdruckanstieg vermittelt (79). Der EP-3-Rezeptor vermittelt unter anderem eine pulmonalarterielle Konstriktion. Isolierte Ringe humaner Pulmonalarterien lassen sich durch EP-3-Rezeptoragonisten kontrahieren (80). Weiterhin konnte durch Stimulation mit spezifischen EP-3-Agonisten (ONO-AE-248) eine Kontraktion humanen pulmonalarteriellen Gewebes ausgelöst werden (81). Bei Hunden wirken 8-iso-PGE₂ und 8-iso-PGF₂α als starke Konstriktoren der Pulmonalvene, an der Pulmonalarterie entfalten sie nur eine geringe Wirkung (82). Im Gegensatz dazu ist 8-iso-PGE₂ der potenteste Vasokonstriktor an der Pulmonalarterie von Schweinen. Der Effekt wird über Thromboxan-A₂ selektive Prostanoid-Rezeptoren (TP) vermittelt (83). Ein weiteres Stoffwechselprodukt der Cyclooxygenase-2 ist Thromboxan. Eine pulmonale Vasokonstriktion kann auch über spezifische Thromboxan-Rezeptoren ausgelöst werden (84). Hingegen scheinen EP-2 und EP-4-Rezeptoren zumindest im großen Kreislauf vasodilatatorisch zu wirken. Die systemische Infusion von PGE₂ in Wildtypmäuse hat einen vasodepressorischen Effekt, bei EP-2 deletierten (-/-) knock-out Mäusen führt die Infusion zu einem systemischen Blutdruckanstieg (85).

Der Druckanstieg durch Anandamid in dem Modell der isolierten Kaninchenlunge ist COX-2 sensibel. Es wurde daher versucht Rezeptoren zu antagonisieren, die mit Stoffwechselprodukten der COX-2 interagieren. Der synthetische Thromboxan Rezeptorantagonist SQ 29,548 konnte den pulmonalarteriellen Druckanstieg durch Anandamid nicht verhindern. Eine Voraugabe des Blockers hatte im Gegensatz zu MAFP, ASS und Nimesulide keinen Einfluss auf die Druckentwicklung. Der spezifische Prostanoid EP-1-Rezeptorantagonist SC 19220 hingegen konnte die Vasokonstriktion durch Anandamid deutlich reduzieren. Im Gegensatz zu den verwendeten Cyclooxygenase-Blockern konnte SC 19220 den Druckanstieg deutlich, aber nicht vollständig inhibieren. Da Prostaglandin-E₂ mit allen vier EP Rezeptorsubtypen (EP-1, EP-2, EP-3, EP-4) interagiert, ist von einer vielschichtigen Wirkung auszugehen (77,78). Da ein spezifischer EP-1-Antagonist die Anandamidwirkung nicht total blockieren konnte, sollte man natürlich in Erwägung

ziehen, dass auch andere Rezeptoren oder Mediatoren involviert sind. In der folgenden Abbildung ist ein Schema aufgezeigt, welchen Mechanismus einer anandamid-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion die von uns gewonnenen experimentellen Daten nahelegen.

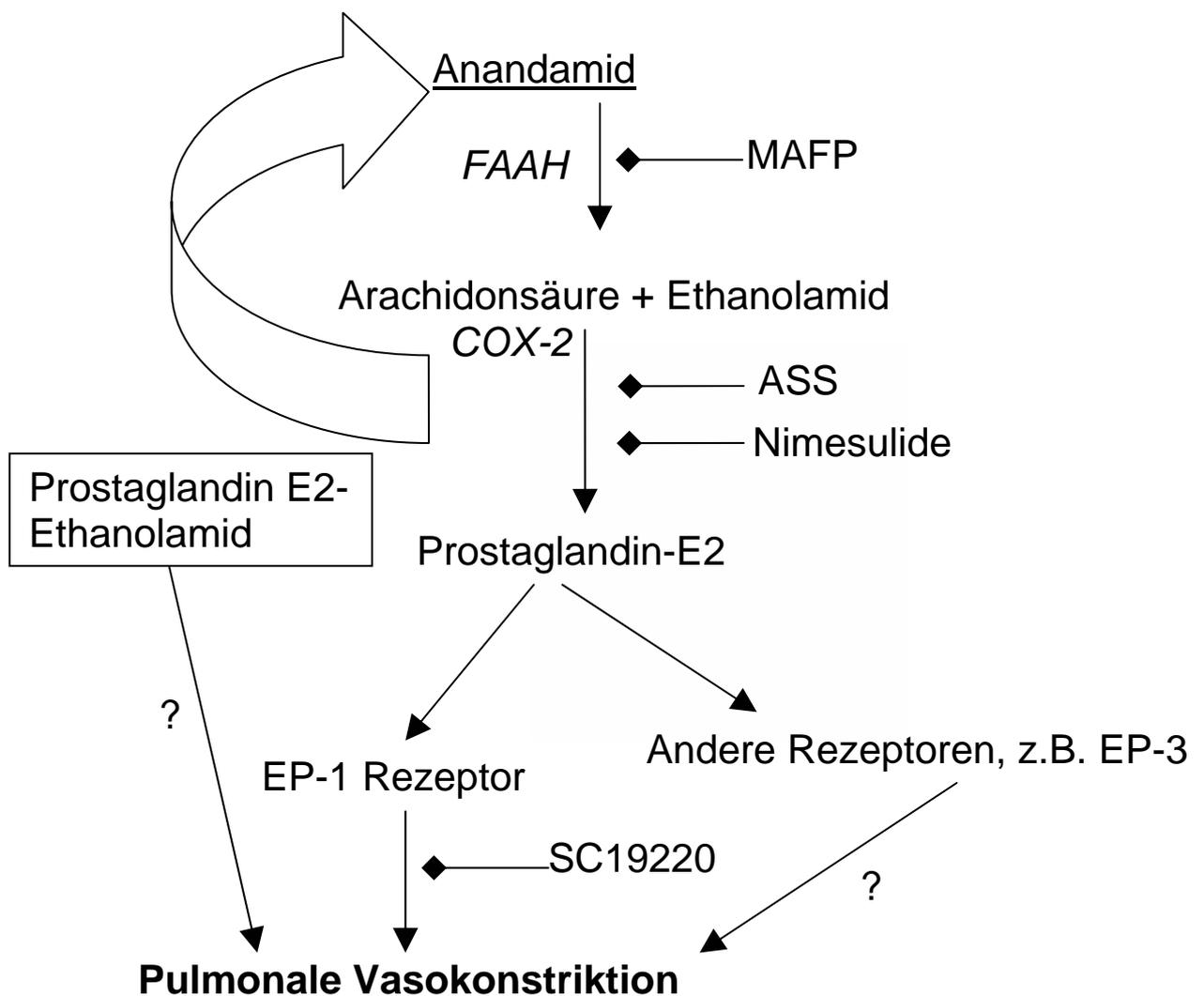


Abbildung 15: Schema zur Wirkweise des Endocannabinoids Anandamid in der Kaninchenlunge

In jüngster Vergangenheit wurde ein weiterer Stoffwechselweg definiert, in dem Endocannabinoide direkt durch oxidative Metabolisierung der Cyclooxygenase-2 verstoffwechselt werden. Die Cyclooxygenase-1 spielt hierbei keine Rolle. Anandamid und 2-AG werden durch Phospholipasen aus der Zellmembran gewonnen, und durch eine direkte Oxygenierung durch COX-2 entstehen die Prostanoidvorstufen Glycerolester (PGH₂-G) und Glycerolethanolamid (PGH₂-EA). Aus ihnen wird eine Vielzahl von Isomeren der Prostanoidgruppen I, D und E gebildet, deren biologische Bedeutung noch nicht klar definiert ist. Die Hauptendprodukte sind PGE₂, PGD₂ und PGF₂α (86). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass Prostaglandin-E₂-Ethanolamid an der Meerschweinchentrachea konstriktorische Eigenschaften hat und diese EP-1-Rezeptor-vermittelt sind (87). Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde auch durch eine andere Arbeitsgruppe ein konstriktorisches Effekt an der Meerschweinchentrachea durch Anandamid nachgewiesen. Der synthetische Cannabinoidrezeptoragonist HU-210, der keine strukturelle Ähnlichkeit mit Anandamid besitzt, konnte diesen Effekt nicht reproduzieren. Eine Hemmung durch CB₁-Blocker konnte den Anandamideffekt nicht verhindern, jedoch war die Konstriktion durch den FAAH-Blocker PMSF und den unspezifischen Cyclooxygenasehemmer Indomethacin inhibierbar (88).

Die biologische Bedeutung der Endocannabinoide für die Lunge ist noch nicht klar, sie sind aber an der intrinsischen Regulation der bronchialen Reagibilität beteiligt (49). Das Vorkommen von Anandamid in den Luftwegen von Nagetieren wurde qualitativ nachgewiesen (49), ebenso gibt es detaillierte Erkenntnisse zur Lokalisation von Endocannabinoiden im zentralen Nervensystem von Nagetieren (89,90).

Der Nachweis substantieller Mengen von Endocannabinoiden der Lunge gelang bisher für 2-AG bei der Ratte (50). Eine chemische Analyse durch kombinierte Gaschromatographie/Massenspektrometrie konnte Anandamid bei der Ratte nur in nicht quantifizierbaren Mengen nachweisen (91). Ein sinnvoller Schritt die biologische Bedeutung der endogenen Cannabinoide besser zu begreifen, war der Nachweis von Endocannabinoiden mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie aus Proben unserer Kaninchenlungen durch Mitglieder unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer anderen Forschungsarbeit. Es konnte das konstitutive Vorhandensein physiologisch relevanter Mengen an Anandamid und 2-AG gezeigt werden (92,93).

Diese Studie war ursprünglich darauf ausgerichtet, eine neue Substanzklasse an Vasodilatoren der pulmonalen Strombahn zu finden. Interessanterweise kam es zu einer Vasokonstriktion nach Injektion von Endocannabinoiden, die durch die Fettsäuren-Amidohydrolase abgebaut werden. Unsere Erkenntnisse könnten zu einem besseren Verständnis der pulmonalen Hypertonie unter bestimmten pathophysiologischen Konstellationen beitragen. Lipopolysaccharide (LPS), integrale Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, spielen eine wichtige Rolle in der Induktion von Sepsis und akut-entzündlichen Lungenveränderungen. LPS aktivieren die Endocannabinoidproduktion in Makrophagen. Neben klassischen Sepsismediatoren wie Tumor-Nekrosefaktor alpha und Interleukin 1B konnte man Anandamid als parakrinen Botenstoff nachweisen. In LPS aktivierten Makrophagen konnte man im Vergleich zur Kontrollgruppe Anandamid in physiologisch relevanten Konzentrationen nachweisen (94). Zusätzlich zu der bis zu 10-fachen Erhöhung der Anandamidkonzentration durch LPS konnte eine Stimulation der Anandamid regulierenden Enzyme gezeigt werden. Es kommt zu einer Aktivierung der synthetisierenden Faktoren wie N-Acetyltransferase und Phospholipase D. Aber auch die Anandamid abbauenden Enzyme, wie die FAAH, werden stimuliert (95). In einem anderen Modell einer isoliert perfundierten Kaninchenlunge wurde durch Injektion von LPS eine verstärkte Expression der Prostaglandin G/H Synthase erreicht. Als Folge kam es zu einer vermehrten Mobilisierung von Arachidonsäuren und Bildung von Thromboxan, was in eine pulmonale Hypertonie mündete (96).

Die Wirkungen von endogenen Cannabinoiden und Prostanoiden sind in hohem Maße von der Substanz, Spezies und Art des Gewebes abhängig (82,83), daher sollten weiterführende Forschungen durchgeführt werden. Ein Ansatz hierfür ist die Erforschung der Prostanoid-Ethanolamide oder auch „Prostamide“ genannt. Diese Stoffgruppe, die unter anderem die Substanzen PGE2-ethanolamid, PGD2-ethanolamid und PGI2-ethanolamid umfasst, scheint eine Brückenfunktion zwischen dem Endocannabinoidsystem und dem Prostanoidsystem darzustellen. Weiterhin wird die Existenz einer neuartigen Klasse von Rezeptoren diskutiert (97,98).

Bezogen auf das Modell der isoliert-perfundierten Kaninchenlunge gibt es, was die weiterführenden Untersuchungen angeht, einige Ansätze einer weiteren Arbeitsgruppe am gleichen Modell. Hierbei stand die Wirkung der endogenen Cannabinoide im

Vergleich zu pflanzlichen (z.B. THC) und synthetischen (z.B. HU-210) Cannabinoidagonisten auf die pulmonale Strombahn im Vordergrund, sowie der Effekt von spezifischen CB1-Rezeptorblockern. Außerdem hat man, wie bereits oben erwähnt, das konstitutive Vorhandensein von Endocannabinoiden in der Kaninchenlunge durch Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachgewiesen, um eine artifizielle, unphysiologische Stimulation auszuschließen (92,93). Die Wirkung von anderen Prostanoid-Rezeptorblockern auf Anandamidgabe ist ebenso von Interesse. Bei einem möglichen therapeutischen Einsatz von Endocannabinoiden in anderen Organsystemen sollte man die hier gefundenen und diskutierten Nebenwirkungen in der Pulmonalarterie bedenken. Strukturell veränderte, stoffwechselstabile Derivate hingegen lassen diese Nebenwirkung nicht erwarten, da letztere ja nur durch Abbauprodukte und Cannabinoid-Rezeptor unabhängig entstehen.

5 Zusammenfassung

Die Wirkstoffe der Cannabis-Pflanze, die sog. Cannabinoide, können in vielen medizinischen Bereichen therapeutisch angewendet werden. Neben den eher unerwünschten psychotropen Effekten werden verschiedene Organsysteme komplex beeinflusst. Bei neurologisch-psychiatrischen Krankheitsbildern (z.B. Schizophrenie) oder zur Appetit- und Gewichtssteigerung werden Cannabinoidderivate heutzutage klinisch eingesetzt.

Inzwischen sind Synthese und Abbauwege der endogenen Cannabinoide bekannt. Deutliche, aber komplexe Wirkungen entfalten die Endocannabinoide am kardiovaskulären System. Sie vermitteln Bradykardie und Hypotonie hauptsächlich durch CB1-Rezeptoren. In verschiedenen Stromgebieten wirken sie als Vasodilatoren. Die Effekte der endogenen Cannabinoide auf die Lunge sind ebenfalls komplex. Auf die glatte Muskulatur der Bronchien wirken sie sowohl exzitatorisch, als auch inhibitorisch.

Über die Wirkung auf die pulmonale Strombahn ist wenig bekannt, daher war es die Zielsetzung dieser Arbeit, die Effekte der endogenen Cannabinoide auf die pulmonalen Gefäße in dem Modell der isoliert-perfundierten Kaninchenlunge genauer zu studieren. Das endogene Cannabinoid Anandamid hat den pulmonalarteriellen Druck deutlich und

dosisabhängig erhöht. Dieser Effekt war durch Hemmung des Enzyms Fettsäuren-Amidohydrolase vollständig inhibierbar. Auch der unspezifische Cyclooxygenasehemmer Aspisol[®] und der spezifische Cyclooxygenase-2 Hemmer Nimesulide konnten den Druckanstieg durch Anandamid verhindern. Das physiologische Vorkommen der Enzyme FAAH und COX-2 in der Kaninchenlunge wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Der Thromboxan-Rezeptorantagonist SQ 29,548 hatte keinerlei Effekt auf die Anandamidwirkung. Jedoch konnte der spezifische EP1-Rezeptorantagonist SC 19220 den Effekt von Anandamid deutlich, jedoch nicht vollständig senken.

Der Schluss liegt nahe, dass es sich bei den Anandamid-Effekten um eine FAAH- und COX-2 abhängige Reaktion handelt. Eine direkte oxidative COX-2 Wirkung scheint auch möglich zu sein. Somit wirken Endocannabinoide in der Kaninchenlunge unerwarteterweise vasokonstriktorisch. Dieser Effekt ist unabhängig von der Aktivierung der klassischen Cannabinoid-Rezeptoren, sondern vielmehr das Ergebnis von Stoffwechselprodukten, welche nach Abbau Anandamids anfallen.

6 Literaturverzeichnis

1. Lozano, I. (2001) The therapeutic use of Cannabis sativa in Arabic medicin. *Journal of Cannabis Therapeutics* 1, 64-70
2. Baker, D., Pryce, G., Giovannoni, G., and Thompson, A. J. (2003) The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2, 291-298
3. Kalant, H. (2001) Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag* 6, 80-91
4. Kumar, R. N., Chambers, W. A., and Pertwee, R. G. (2001) Pharmacological actions and therapeutic uses of cannabis and cannabinoids. *Anaesthesia* 56, 1059-1068
5. Gaoni, Y., and Mechoulam, R. (1964) Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Am Chem Soc* 86, 1646-1647
6. Carlini, E. A. (2004) The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans. *Toxicol* 44, 461-467
7. Pertwee, R. G. (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 95, 165-174
8. Hall, W., Christie, M., and Currow, D. (2005) Cannabinoids and cancer: causation, remediation, and palliation. *Lancet Oncol* 6, 35-42
9. Wagner, J. A., Varga, K., and Kunos, G. (1998) Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. *J Mol Med* 76, 824-836
10. Devane, W. A., Dysarz, F. A., 3rd, Johnson, M. R., Melvin, L. S., and Howlett, A. C. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613
11. Matsuda, L. A., Lolait, S. J., Brownstein, M. J., Young, A. C., and Bonner, T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564
12. Munro, S., Thomas, K. L., and Abu-Shaar, M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65
13. Pertwee, R. G. (1999) Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem* 6, 635-664

-
14. 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., and Pertwee, R. G. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54, 161-202
 15. Howlett, A. C. (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 619-631
 16. Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Heaulme, M., Shire, D., Calandra, B., Congy, C., Martinez, S., Maruani, J., Neliat, G., Caput, D., and et al. (1994) SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor. *FEBS Lett* 350, 240-244
 17. Rinaldi-Carmona, M., Barth, F., Millan, J., Derocq, J. M., Casellas, P., Congy, C., Oustric, D., Sarran, M., Bouaboula, M., Calandra, B., Portier, M., Shire, D., Breliere, J. C., and Le Fur, G. L. (1998) SR 144528, the first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284, 644-650
 18. 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., and et al. (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90
 19. Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C., and Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372, 686-691
 20. Hillard, C. J., and Campbell, W. B. (1997) Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid. *J Lipid Res* 38, 2383-2398
 21. Bisogno, T., Maurelli, S., Melck, D., De Petrocellis, L., and Di Marzo, V. (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 272, 3315-3323
 22. Giuffrida, A., Beltramo, M., and Piomelli, D. (2001) Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 7-14

-
23. Bisogno, T., Howell, F., Williams, G., Minassi, A., Cascio, M. G., Ligresti, A., Matias, I., Schiano-Moriello, A., Paul, P., Williams, E. J., Gangadharan, U., Hobbs, C., Di Marzo, V., and Doherty, P. (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163, 463-468
 24. Dinh, T. P., Kathuria, S., and Piomelli, D. (2004) RNA interference suggests a primary role for monoacylglycerol lipase in the degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Mol Pharmacol* 66, 1260-1264
 25. Saario, S. M., Savinainen, J. R., Laitinen, J. T., Jarvinen, T., and Niemi, R. (2004) Monoglyceride lipase-like enzymatic activity is responsible for hydrolysis of 2-arachidonoylglycerol in rat cerebellar membranes. *Biochem Pharmacol* 67, 1381-1387
 26. Kozak, K. R., Crews, B. C., Morrow, J. D., Wang, L. H., Ma, Y. H., Weinander, R., Jakobsson, P. J., and Marnett, L. J. (2002) Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonoylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. *J Biol Chem* 277, 44877-44885
 27. Zimmer, A., Zimmer, A. M., Hohmann, A. G., Herkenham, M., and Bonner, T. I. (1999) Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5780-5785
 28. Ledent, C., Valverde, O., Cossu, G., Petitet, F., Aubert, J. F., Beslot, F., Bohme, G. A., Imperato, A., Pedrazzini, T., Roques, B. P., Vassart, G., Fratta, W., and Parmentier, M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* 283, 401-404
 29. Buckley, N. E., McCoy, K. L., Mezey, E., Bonner, T., Zimmer, A., Felder, C. C., and Glass, M. (2000) Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB(2) receptor. *Eur J Pharmacol* 396, 141-149
 30. Di Marzo, V., Goparaju, S. K., Wang, L., Liu, J., Batkai, S., Jarai, Z., Fezza, F., Miura, G. I., Palmiter, R. D., Sugiura, T., and Kunos, G. (2001) Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 410, 822-825
 31. Black, S. C. (2004) Cannabinoid receptor antagonists and obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 389-394

-
32. Fernandez, J. R., and Allison, D. B. (2004) Rimonabant Sanofi-Synthelabo. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 430-435
 33. Van Gaal, L. F., Rissanen, A. M., Scheen, A. J., Ziegler, O., and Rossner, S. (2005) Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk factors in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study. *Lancet* 365, 1389-1397
 34. Wagner, J. A., Varga, K., Ellis, E. F., Rzigalinski, B. A., Martin, B. R., and Kunos, G. (1997) Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 390, 518-521
 35. Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Hogestatt, E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400, 452-457
 36. Wagner, J. A., Varga, K., Jarai, Z., and Kunos, G. (1999) Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. *Hypertension* 33, 429-434
 37. 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., and Kunos, G. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14136-14141
 38. Grainger, J., and Boachie-Ansah, G. (2001) Anandamide-induced relaxation of sheep coronary arteries: the role of the vascular endothelium, arachidonic acid metabolites and potassium channels. *Br J Pharmacol* 134, 1003-1012
 39. Gebremedhin, D., Lange, A. R., Campbell, W. B., Hillard, C. J., and Harder, D. R. (1999) Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 276, H2085-2093
 40. Varga, K., Lake, K. D., Huangfu, D., Guyenet, P. G., and Kunos, G. (1996) Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension* 28, 682-686
 41. Wagner, J. A., Hu, K., Bauersachs, J., Karcher, J., Wiesler, M., Goparaju, S. K., Kunos, G., and Ertl, G. (2001) Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 38, 2048-2054

-
42. Vachon, L., FitzGerald, M. X., Solliday, N. H., Gould, I. A., and Gaensler, E. A. (1973) Single-dose effects of marihuana smoke. Bronchial dynamics and respiratory-center sensitivity in normal subjects. *N Engl J Med* 288, 985-989
 43. Tashkin, D. P., Shapiro, B. J., and Frank, I. M. (1973) Acute pulmonary physiologic effects of smoked marijuana and oral 9 -tetrahydrocannabinol in healthy young men. *N Engl J Med* 289, 336-341
 44. Abboud, R. T., and Sanders, H. D. (1976) Effect of oral administration of delta-tetrahydrocannabinol on airway mechanics in normal and asthmatic subjects. *Chest* 70, 480-485
 45. Tashkin, D. P., Reiss, S., Shapiro, B. J., Calvarese, B., Olsen, J. L., and Lodge, J. W. (1977) Bronchial effects of aerosolized delta 9-tetrahydrocannabinol in healthy and asthmatic subjects. *Am Rev Respir Dis* 115, 57-65
 46. Tashkin, D. P. (2001) Airway effects of marijuana, cocaine, and other inhaled illicit agents. *Curr Opin Pulm Med* 7, 43-61
 47. Kaymakcalan, S., and Turker, R. K. (1975) The evidence of the release of prostaglandin-like material from rabbit kidney and guinea-pig lung by (minus)-trans-delta9-tetrahydrocannabinol. *J Pharm Pharmacol* 27, 564-568
 48. Jandhyala, B. S., Malloy, K. P., and Buckley, J. P. (1976) Effects of acute administration of delta9-tetrahydrocannabinol on pulmonary hemodynamics of anesthetized dogs. *Eur J Pharmacol* 38, 183-187
 49. Calignano, A., Katona, I., Desarnaud, F., Giuffrida, A., La Rana, G., Mackie, K., Freund, T. F., and Piomelli, D. (2000) Bidirectional control of airway responsiveness by endogenous cannabinoids. *Nature* 408, 96-101
 50. Kondo, S., Kondo, H., Nakane, S., Kodaka, T., Tokumura, A., Waku, K., and Sugiura, T. (1998) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through CA2+-dependent and -independent mechanisms. *FEBS Lett* 429, 152-156
 51. Stengel, P. W., Rippy, M. K., Cockerham, S. L., Devane, W. A., and Silbaugh, S. A. (1998) Pulmonary actions of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor agonist, in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 355, 57-66

-
52. De Petrocellis, L., Harrison, S., Bisogno, T., Tognetto, M., Brandi, I., Smith, G. D., Creminon, C., Davis, J. B., Geppetti, P., and Di Marzo, V. (2001) The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 77, 1660-1663
 53. Wagner, J. A., Jarai, Z., Batkai, S., and Kunos, G. (2001) Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid CB(1) receptors. *Eur J Pharmacol* 423, 203-210
 54. Galie, N., Torbicki, A., Barst, R., Dartevelle, P., Haworth, S., Higenbottam, T., Olschewski, H., Peacock, A., Pietra, G., Rubin, L. J., Simonneau, G., Priori, S. G., Garcia, M. A., Blanc, J. J., Budaj, A., Cowie, M., Dean, V., Deckers, J., Burgos, E. F., Lekakis, J., Lindahl, B., Mazzotta, G., McGregor, K., Morais, J., Oto, A., Smiseth, O. A., Barbera, J. A., Gibbs, S., Hoeper, M., Humbert, M., Naeije, R., and Pepke-Zaba, J. (2004) Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 25, 2243-2278
 55. Knowlton, F. P., Starling, E. H. (1912) The influence of variations in temperature and blood pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *The Journal of Physiology* 44, 206-219
 56. Grimminger, F., Wahn, H., Kramer, H. J., Stevens, J., Mayer, K., Walmrath, D., and Seeger, W. (1995) Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 268, H2252-2259
 57. Richardson, P. D., Granger, D. N., and Taylor, A. E. (1979) Capillary filtration coefficient: the technique and its application to the small intestine. *Cardiovasc Res* 13, 547-561
 58. Gaar, K. A., Jr., Taylor, A. E., Owens, L. J., and Guyton, A. C. (1967) Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. *Am J Physiol* 213, 910-914
 59. Seeger, W., Walmrath, D., Menger, M., and Neuhof, H. (1986) Increased lung vascular permeability after arachidonic acid and hydrostatic challenge. *J Appl Physiol* 61, 1781-1789

-
60. Townsley, M. I., Korthuis, R. J., Rippe, B., Parker, J. C., and Taylor, A. E. (1986) Validation of double vascular occlusion method for P_{c,i} in lung and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 61, 127-132
 61. Miyataka, M., Rich, K. A., Ingram, M., Yamamoto, T., and Bing, R. J. (2002) Nitric oxide, anti-inflammatory drugs on renal prostaglandins and cyclooxygenase-2. *Hypertension* 39, 785-789
 62. Seeger, W., Walmrath, D., Grimminger, F., Rosseau, S., Schutte, H., Kramer, H. J., Ermert, L., and Kiss, L. (1994) Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol* 233, 549-584
 63. Ueda, N., and Yamamoto, S. (2000) Anandamide amidohydrolase (fatty acid amide hydrolase). *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61, 19-28
 64. Cravatt, B. F., Demarest, K., Patricelli, M. P., Bracey, M. H., Giang, D. K., Martin, B. R., and Lichtman, A. H. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9371-9376
 65. Deutsch, D. G., Omeir, R., Arreaza, G., Salehani, D., Prestwich, G. D., Huang, Z., and Howlett, A. (1997) Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol* 53, 255-260
 66. Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83-87
 67. Katayama, K., Ueda, N., Kurahashi, Y., Suzuki, H., Yamamoto, S., and Kato, I. (1997) Distribution of anandamide amidohydrolase in rat tissues with special reference to small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1347, 212-218
 68. Watanabe, K., Ogi, H., Nakamura, S., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yoshimura, H., and Yamamoto, I. (1998) Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. *Life Sci* 62, 1223-1229
 69. Ueda, N., Yamamoto, K., Yamamoto, S., Tokunaga, T., Shirakawa, E., Shinkai, H., Ogawa, M., Sato, T., Kudo, I., Inoue, K., and et al. (1995) Lipoxygenase-catalyzed oxygenation of arachidonylethanolamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochim Biophys Acta* 1254, 127-134

-
70. Ueda, N., Yamamoto, K., Kurahashi, Y., Yamamoto, S., Ogawa, M., Matsuki, N., Kudo, I., Shinkai, H., Shirakawa, E., and Tokunaga, T. (1995) Oxygenation of arachidonylethanolamide (anandamide) by lipoxygenases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23, 163-165
71. Hampson, A. J., Hill, W. A., Zan-Phillips, M., Makriyannis, A., Leung, E., Eglen, R. M., and Bornheim, L. M. (1995) Anandamide hydroxylation by brain lipoxygenase:metabolite structures and potencies at the cannabinoid receptor. *Biochim Biophys Acta* 1259, 173-179
72. Burstein, S. H., Rossetti, R. G., Yagen, B., and Zurier, R. B. (2000) Oxidative metabolism of anandamide. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 61, 29-41
73. Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., and Isakson, P. (1997) Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol* 400A, 167-170
74. Koki, A., Khan, N. K., Woerner, B. M., Dannenberg, A. J., Olson, L., Seibert, K., Edwards, D., Hardy, M., Isakson, P., and Masferrer, J. L. (2002) Cyclooxygenase-2 in human pathological disease. *Adv Exp Med Biol* 507, 177-184
75. Belik, J., Karpinka, B., and Hart, D. A. (2000) Pulmonary and systemic vascular tissue collagen, growth factor, and cytokine gene expression in the rabbit. *Can J Physiol Pharmacol* 78, 400-406
76. Yu, M., Ives, D., and Ramesha, C. S. (1997) Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 272, 21181-21186
77. Coleman, R. A., Smith, W. L., and Narumiya, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46, 205-229
78. Botella, A., Delvaux, M., Fioramonti, J., Frexinós, J., and Bueno, L. (1993) Stimulatory (EP1 and EP3) and inhibitory (EP2) prostaglandin E2 receptors in isolated ileal smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 237, 131-137
79. Stock, J. L., Shinjo, K., Burkhardt, J., Roach, M., Taniguchi, K., Ishikawa, T., Kim, H.-S., Flannery, P. J., Coffman, T. M., McNeish, J. D., and Audoly, L. P.

-
- (2001) The prostaglandin E2 EP1 receptor mediates pain perception and regulates blood pressure. *J. Clin. Invest.* 107, 325-331
80. Qian, Y. M., Jones, R. L., Chan, K. M., Stock, A. I., and Ho, J. K. (1994) Potent contractile actions of prostanoid EP3-receptor agonists on human isolated pulmonary artery. *Br J Pharmacol* 113, 369-374
81. Norel, X., de Montpreville, V., and Brink, C. (2004) Vasoconstriction induced by activation of EP1 and EP3 receptors in human lung: effects of ONO-AE-248, ONO-DI-004, ONO-8711 or ONO-8713. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 74, 101-112
82. Janssen, L. J., Premji, M., Netherton, S., Coruzzi, J., Lu-Chao, H., and Cox, P. G. (2001) Vasoconstrictor actions of isoprostanes via tyrosine kinase and Rho kinase in human and canine pulmonary vascular smooth muscles. *Br J Pharmacol* 132, 127-134
83. Janssen, L. J., and Tazzeo, T. (2002) Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 1060-1066
84. Jones, R. L., Qian, Y., Wong, H. N., Chan, H., and Yim, A. P. (1997) Prostanoid action on the human pulmonary vascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24, 969-972
85. Zhang, Y., Guan, Y., Schneider, A., Brandon, S., Breyer, R. M., and Breyer, M. D. (2000) Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E(2) receptors. *Hypertension* 35, 1129-1134
86. Kozak, K. R., Prusakiewicz, J. J., and Marnett, L. J. (2004) Oxidative metabolism of endocannabinoids by COX-2. *Curr Pharm Des* 10, 659-667
87. Ross, R. A., Craib, S. J., Stevenson, L. A., Pertwee, R. G., Henderson, A., Toole, J., and Ellington, H. C. (2002) Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 900-907
88. Andersson, D. A., Adner, M., Hogestatt, E. D., and Zygmunt, P. M. (2002) Mechanisms underlying tissue selectivity of anandamide and other vanilloid receptor agonists. *Mol Pharmacol* 62, 705-713

-
89. Wang, L., Liu, J., Harvey-White, J., Zimmer, A., and Kunos, G. (2003) Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1393-1398
90. Patel, S., Rademacher, D. J., and Hillard, C. J. (2003) Differential regulation of the endocannabinoids anandamide and 2-arachidonylglycerol within the limbic forebrain by dopamine receptor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 880-888
91. Yang, H. Y., Karoum, F., Felder, C., Badger, H., Wang, T. C., and Markey, S. P. (1999) GC/MS analysis of anandamide and quantification of N-arachidonoylphosphatidylethanolamides in various brain regions, spinal cord, testis, and spleen of the rat. *J Neurochem* 72, 1959-1968
92. Wolf, J. (2005) Hämodynamische Auswirkungen synthetischer, pflanzlicher und endogener Cannabinoide im Modell der isolierten Kaninchenlunge. In der Medizinischen Klinik, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
93. Wahn, H., Wolf, J., Kram, F., Frantz, S., and Wagner, J. A. (2005) The Endocannabinoid Arachidonyl Ethanolamide (Anandamide) Increases Pulmonary Arterial Pressure via Cyclooxygenase-2 Products in Isolated Rabbit Lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*
94. Varga, K., Wagner, J. A., Bridgen, D. T., and Kunos, G. (1998) Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *Faseb J* 12, 1035-1044
95. Liu, J., Batkai, S., Pacher, P., Harvey-White, J., Wagner, J. A., Cravatt, B. F., Gao, B., and Kunos, G. (2003) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 278, 45034-45039
96. Delong, P., O'Sullivan, M. G., Huggins, E., Hubbard, C. L., and McCall, C. (1999) Bacterial lipopolysaccharide induction of the prostaglandin G/H synthase 2 gene causes thromboxane-dependent pulmonary hypertension in rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 493-499
97. Matias, I., Chen, J., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ligresti, A., Fezza, F., Krauss, A. H., Shi, L., Protzman, C. E., Li, C., Liang, Y., Nieves, A. L., Kedzie,

-
- K. M., Burk, R. M., Di Marzo, V., and Woodward, D. F. (2004) Prostaglandin ethanolamides (prostamides): in vitro pharmacology and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 309, 745-757
98. Weber, A., Ni, J., Ling, K. H., Acheampong, A., Tang-Liu, D. D., Burk, R., Cravatt, B. F., and Woodward, D. (2004) Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analyzed by HPLC with tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 45, 757-763

7 Anhang

Publikationen und Vorträge zur vorliegenden Promotion:

Veröffentlichungen:

Wahn H., Wolf J., Kram F., Frantz S., Wagner JA.,
The Endocannabinoid Arachidonyl Ethanolamide (Anandamide) Increases Pulmonary
Arterial Pressure via Cyclooxygenase-2 Products in Isolated Rabbit Lungs.
Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005: p. 00718.2005.

Vorträge:

1) Wolf J, Kram F, Wahn H, Wagner JA

Endogenous cannabinoids increase pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2
products in isolated rabbit lungs.

IACM Kongress 12.-13.9.2003, Köln

2) Kram F, Wolf J

Endogene Cannabinoide erhöhen den pulmonal-arteriellen Druck in isolierten
Kaninchenlungen

5. Würzburger Promomed Kongress 16.-17. Januar 2004, Würzburg

3) Wagner JA, Wolf J, Kram F, Frantz S, Wahn H

Endogene Cannabinoide erhöhen den pulmonalarteriellen Druck in isolierten
Kaninchenlungen durch Cyclooxygenase-2-Produkte.

*70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 15.4.-17.4.2004,
Mannheim*

4) Wagner JA, Wolf J, Kram F, Frantz S, Wahn H

Endogenous Cannabinoids Increase Pulmonary Arterial Pressure via Cyclooxygenase-2
Products in Isolated Rabbit Lungs

European Society of Cardiology Congress 3.-7.9.2005, Stockholm, Sweden

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. Jens A. Wagner für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung und die schnellen Korrekturen. Durch die Zusammenarbeit mit ihm wurde die Lust auf die Medizin immer wieder aufs Neue geweckt. Seine Förderung ging weit über das wissenschaftliche Arbeiten hinaus.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. med. Hans Wahn für die freundschaftliche Betreuung und Einarbeitung in das Versuchsmodell zusammen mit Herrn Florian Finter und Henning Kaufmann. Katja Wagners und Monica Hymers Gastfreundschaft war großartig und hat auch einen wesentlichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch für die jederzeit tatkräftige Unterstützung bei der Labororganisation und biochemischen Analytik durch die Mitarbeiter Helga Wagner, Charlotte Dienesch, Marko Abesser und Lisa Bauer, sowie Dr. med. Stefan Frantz für die konstruktiven Ratschläge.

Bei Herrn Jürgen Wolf möchte ich mich bedanken für die gemeinsamen unterhaltsamen Stunden im Labor und die schöne Zeit in Würzburg, die mir immer in guter Erinnerung bleiben wird. Für die frühe Förderung möchte ich mich bei Dr. med. Claus-Peter Maier bedanken.

Meine Frau verdient großen Dank für das Verständnis und die Geduld, die sie für mich aufgebracht hat und welche ich so oft strapaziert habe. Schließlich danke ich meinen Eltern Elisabeth und Erich Kram, die mir stets ihre volle Unterstützung zuteil werden ließen. Durch ihr Vertrauen in mich haben sie mir das alles erst ermöglicht.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Florian Kram
Geburtsdatum: 13.09.1977
Geburtsort: Schweinfurt
Familienstand: Verheiratet

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule Schwebheim
1988 – 1997 Conrad-Celtis-Gymnasium Schweinfurt
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

10/97 – 8/98 Wehrdienst in der 1. Gebirgsdivision
4/99 Rettungssanitäterprüfung

Studium

11/98 – 4/05 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
5/05 Abschluss mit dem 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

4/04 – 3/05 Praktisches Jahr am Klinikum Aschaffenburg in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Anästhesiologie
11/04 – 1/05 Innere Medizin am Gil-Hospital der Gachon Medical School in Incheon, Korea

Beruf:

07/05 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Klinikum Aschaffenburg

Sprachen: Latein, Englisch, Französisch und Koreanisch

