

Aus der  
Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychosomatik  
Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie  
Neurochemisches Labor I  
der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
(Vorstand: Prof. Dr. Matthias Berger)

Angefertigt unter der Leitung von  
Dr. Bernd Fiebich

Vorgelegt über den  
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie  
am Institut für Tierpathologie  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. W. Schmahl)

**Untersuchungen zur entzündungshemmenden Wirkung von *Cannabis sativa* L.- Extrakten im Modell der Gewebekulturen**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Alexandra Nadig  
aus  
Wiesbaden

München 2008

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Aigner

Tag der Promotion: 18. Juli 2008

Meiner Mutter

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Cannabis sativa als Arzneimittel.....	2
1.1.1.	Geschichtliche der Pflanze Cannabis.....	3
1.1.2.	Botanik der Pflanze Cannabis.....	5
1.1.3.	Chemie und Pharmakologie.....	7
1.1.4.	Cannabinoide und das Endogene Cannabinoidsystem .....	9
1.2.	Phytopharmakologie/ Phytotherapie.....	13
1.3.	. Pflanzenextrakte.....	15
1.4.	Die Entzündung .....	16
1.4.1.	Molekulare Mechanismen der Entzündung .....	16
1.4.2.	Prostaglandine/ Prostaglandin E2 .....	16
1.4.3.	Cyclooxygenase 2 .....	19
1.4.4.	Membrangebundene PGE-Synthase-1 .....	19
1.4.5.	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase-Weg (MAPK) .....	20
1.4.6.	Zytokine .....	22
1.5.	Zielsetzung.....	24
1.5.1.	Fragestellung und Zielsetzung.....	24
2.	Materialien und Methoden.....	25
2.1.	Zellkultur .....	25
2.1.1.	Präparation und Kultivierung von Mikrogliazellen der Ratte .....	25
2.1.2.	Kultivierung der SK-N-SH Neuroblastomazellen .....	26
2.1.3.	Kultivierung der Chondrozyten .....	26
2.1.4.	Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten aus peripherem Vollblut.....	27
2.1.5.	Stimulationsexperimente .....	28
2.1.6.	Extrakte.....	29
2.1.7.	Reinsubstanzen .....	29
2.2.	Western Blot Analyse .....	31
2.2.1.	Proteinmengenbestimmungen.....	31
2.2.2.	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	32
2.2.3.	Semidry-Blotting .....	34
2.2.4.	Immunodetektion .....	35
2.2.5.	Elution/ Mehrfachmarkierung der Membran.....	37
2.2.6.	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	37
2.2.7.	Enzyme-Immuno-Assay (EIA).....	38
2.3.	Reagenzien und Materialien .....	38
3.	Ergebnisse.....	44
3.1.	Cannabis- Extrakte SE11, SE14, SE14h.....	44
3.1.1.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen.....	45
3.1.2.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von LPS- induzierten Mikrogliazellen.....	48
3.1.3.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Monozyten .....	50
3.1.4.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von LPS- induzierten Monozyten .....	52
3.1.5.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die Zytokin Synthese von LPS- induzierten Monozyten .....	53
3.1.6.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten Chondrozyten .....	59

3.1.7.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von IL-1 $\beta$ - induzierten Chondrozyten.....	61
3.1.8.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die PGE2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen.....	62
3.1.9.	Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen.....	64
3.2.	Cannabis Reinsubstanzen - Cannabigerol und Cannabidiol.....	65
3.2.1.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen .....	66
3.2.2.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen .....	67
3.2.3.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Monozyten.....	68
3.2.4.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Monozyten.....	70
3.2.5.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die Zytokin Synthese von LPS-induzierten Monozyten.....	71
3.2.6.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen.....	75
3.2.7.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die COX-2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen.....	76
3.2.8.	Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten Chondrozyten .....	77
4.	Diskussion.....	79
4.1.1.	LPS-induzierte Mikrogliazellen als neuroinflammatorisches Modell und deren Reaktion auf Cannabis .....	79
4.1.2.	Welcher der drei Extrakte ist der Wirksamste? .....	82
4.1.3.	LPS-induzierte Monozyten behandelt mit Cannabis Extrakten.....	84
4.1.4.	IL-1 $\beta$ induzierte Chondrozyten behandelt mit Cannabis Extrakten .....	85
4.1.5.	IL-1 $\beta$ induzierte SK-Zellen behandelt mit Cannabis Extrakten .....	87
4.1.6.	Cannabidiol und Cannabigerol .....	88
4.1.7.	Cannabis und der therapeutische, medizinische Nutzen.....	90
4.1.8.	Cannabinoide in der Tiermedizin?.....	94
5.	Zusammenfassung .....	96
6.	Summary .....	98
7.	Verzeichnisse .....	100
7.1.	Literaturverzeichnis .....	100
7.2.	Abkürzungsverzeichnis.....	114
7.3.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	115
7.3.1.	Abbildungen.....	115
7.3.2.	Tabellen .....	118
8.	Danksagung .....	119

## 1. Einleitung

*Cannabis sativa* L. wird schon seit vielen Jahrtausenden als Heilmittel angewendet, ihre schmerzstillende und abschwellende Wirkung ist in der Arzneimittellehre schon lange bekannt. (Hollister L.E., 1986, Grotenhermen F., 2004).

Viele der bisherigen pharmakologischen Forschungen beschränkten sich in der Hauptsache auf das  $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol (THC). Anwendungsgebiete wie die Multiple Sklerose, das Tourette Syndrom, Epilepsie, Glaukom, Schmerz, der antiemetische Effekt, Nausea und die Appetitstimulation sind bisher oft und gut untersucht worden (Formukong *et al*, 1989; Bakowski *et al*, 1994; Carlini *et al* 1981, Caswell 1992; Clifford 1983; Elsner *et al*, 2001; Doblin *et al*, 1991).

Die Anwendung von Cannabis ist seit Mitte des 20. Jahrhunderts laut Betäubungsmittelgesetz in Deutschland verboten. In einigen anderen Ländern wie z.B. USA und England gibt es weiterhin synthetische Cannabispräparate, deren Wirkung hauptsächlich auf dem Wirkprinzip des THC beruht.

Marinol®, welches in USA erhältlich ist, enthält den Wirkstoff Dronabinol welcher ein teil-synthetisches Derivat des trans-Isomer  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol ist.

In England ist ein synthetisches Cannabinoid erhältlich welches dem natürlichen THC ähnelt (Nabilone®).

Obwohl die Erfahrungen bisher gezeigt haben, dass synthetische THC „Kopien“ nicht annähernd so gut wirken, wie die Pflanze in ihrer Gesamtzusammenstellung und auch deutlich mehr Nebenwirkungen zeigen, gab es bisher nur wenige Untersuchungen, die sich weniger mit dem THC oder einzelner Reinsubstanzen, dafür aber mehr mit der Gesamtzusammenstellung der Pflanze beschäftigten (Grinspoon 2000; Williamson *et al*, 2000; Fairbairn *et al*, 1974; DeWitt *et al*, 1999; McPartland, 2000).

*„Not all the observed effects can be ascribed to THC, and the other constituents may also modulate its action; for example CBD (Cannabidiol) reduces anxiety induced by THC. A standardised extract of the herb may be therefore be more beneficial in practice and clinical trial protocols have been drawn up to assess this.“....“Therefore, it is possible that a standardised extract of the herb, containing known amounts of THC and CBD, and possibly some of the other components, may be more beneficial in practice*

*than a single compound.*” (Elizabeth M. Williamson and Fred J. Evans Cannabinoids in Clinical Practice, Drugs 2000 Dec; 60 (6): 1303-1314)

Somit wurde bisher nie eine verlässliche Studie durchgeführt, die die Verwertbarkeit der Pflanze in der Pharmaindustrie prüfte. Im Jahr 2003 schloss sich ein internationales Konsortium zusammen, welches sich zur Aufgabe machte, eben diese noch ausstehende Studie zu verwirklichen.

Dieses internationale Konsortium, bestehend aus drei kleinen Unternehmen und sechs universitären/staatlichen Einrichtungen aus Europa, versucht nun die Wirksamkeit eines Phytopharmaka gegen Migräne und rheumatische Arthritis zu prüfen.

Die Hauptaufgabe dieses Konsortiums ist es, den europäischen Verbraucher mit einem akzeptablen und effektiven medizinischen Extrakt zu versorgen, der in der Lage ist, chronisch-schmerzvolle und entzündliche Erkrankungen zu behandeln. Es soll ein standardisierter Pflanzenextrakt entwickelt werden, der in seiner Wirkung getestet und mit seinen Inhaltsstoffen reproduzierbar ist.

Der Fokus liegt auf der Verwendung von Pflanzenextrakten aus Cannabis, mit nur einem geringen oder gar minimalen Gehalt (unter 0,3%) an den psychoaktiven Inhaltsstoffen.

Da diese Arbeit im Rahmen des EU-Projektes stattgefunden hat, wird hier das bereits viel studierte THC nicht behandelt. Das Augenmerk liegt hier im Wesentlichen auf der Untersuchung von Cannabis Extrakten, die sehr wenig THC und hauptsächlich nicht-psychoaktive Cannabinoide enthalten.

### ***1.1. Cannabis sativa als Arzneimittel***

*„ Wer Kopfweh und leeres Hirn hat, dem erleichtert der Hanf, wenn er ihn isst, den Kopfschmerz. Den, der aber gesund ist und ein volles Gehirn im Kopfe hat, schädigt er nicht. Wer ein leeres Gehirn hat, dem verursacht der Genuss des Hanfes im Kopf einen Schmerz. Einen gesunden Kopf und ein volles Hirn schädigt er nicht.“*

Hildegard von Bingen

### 1.1.1. Geschichtliche der Pflanze Cannabis

Cannabis oder Hanf zählt zu den ältesten vom Menschen genutzten Pflanzen.

Ursprünglich war Cannabis wahrscheinlich in Zentralasien beheimatet und wird schon seit etwa zehntausend Jahren kultiviert. Die ältesten Dokumente über medizinische Anwendungen stammen aus China und Ägypten. Es gibt auch Hinweise darauf, dass Hanf schon in den „Veden“, den ältesten indischen Schriften, als Heilmittel erwähnt wird. Ein früher Hinweis auf die medizinische Verwendung von Cannabis findet sich in einem Kräuterbuch, das vor 5000 Jahren zur Zeit des chinesischen Kaisers Chen Nung entstand (Grinspoon, 2000) Auch gibt es Überlieferungen aus Persien und Tibet, so soll schon um 500 v. Chr. Cannabis als Anästhetikum angewandt worden sein. (Grotenhermen, 2004)

Im alten Griechenland und in der römischen Welt galt Cannabis als ein vielfältiges Heilmittel und wurde schon in Homers (ca. 8.Jh. v.Chr.) Odyssee beschrieben. Als einer der bedeutendsten antiken Ärzte benutzte Dioskurides Cannabispräparate zur Linderung von Kopf- und Ohrenschmerzen. Der arabische Mediziner Avicenna (980 – 1037 n.Chr.) erwähnte die Pflanze in seinem „Canon medicinae“, dem vollständigsten Werk der Medizin noch bis ins 15. Jahrhundert (Grotenhermen, 2004)

Im mittelalterlichen Europa wurden die Untersuchungen zur Hanfpflanze von der bekannten deutschen Äbtissin Hildegard von Bingen aufgegriffen, die in ihrer Schrift „Physica“ die Wirkungen von Cannabis erläuterte und vor allem auf den lindernden Effekt bei Kopfschmerz sowie bei der Heilung von Wunden hinwies.

1764 wurde im „New English Dispensatory“ dazu geraten, bei Entzündungen Hanfwurzeln aufzulegen. Dieses Verfahren wurde in Osteuropa damals schon sehr lange angewandt (Grinspoon, 2000).

Während des 19. Jahrhunderts etablierte sich Cannabis in der europäischen Medizin. Neue Erkenntnisse über die indische Hanfart „Cannabis indica“ ließen Cannabisprodukte in die westliche Schulmedizin eingehen. Als 1839 der irische Arzt William B. O’Shaughnessy eine umfassende Arbeit über indischen Hanf veröffentlichte, wurde Cannabis zu einer anerkannten Medizinalpflanze. W.B.O’Shaughnessey verabreichte Tieren Cannabis und überzeugte sich so davon, dass es ungefährlich war. Er verwendete Cannabis gegen Tollwut, Rheuma, Epilepsie, Tetanus und gegen Schmerzen. (O’Shaughnessey, 1838-1840).



Schließlich erreichte die Verwendung von Cannabispräparaten in Europa und in den Vereinigten Staaten im letzten Jahrzehnt des 19. Jahrhunderts ihren Höhepunkt. Dies äußerte sich dahingehend, dass sich immer mehr Pharmafirmen der Herstellung von Cannabispräparaten (z.B. „Cannabin“ von der Firma Merck, Darmstadt; siehe Abb.1) widmeten.



*Abb.1: Inserat zum Arzneimittel "Cannabin" der Firma Merck um 1885, Darmstadt*

Zu den häufigsten mit Cannabis behandelten Symptomen galten vor allem Schmerzzustände wie Migräne oder Menstruationskrämpfe. Zwischen 1842 und 1900 machten Cannabispräparate in USA die Hälfte aller verkauften Medikamente aus (Herer, 1993). In Europa und auch in der Schweiz waren zwischen 1850 und 1950 über 100 verschiedene Cannabismedikamente erhältlich (Fankhauser, 1996). Dosierungsschwierigkeiten, paradoxe Wirkungen und die Entwicklung wirksamerer Medikamente führten zu einer Abnahme der Cannabisverschreibungen, noch bevor das Cannabisverbot ihnen ein Ende bereitete (Mikuriya 1973 u. 1982, Springer 1982). So verschwand die Cannabispflanze Mitte des 20. Jahrhunderts fast vollständig aus der Medizin, was hauptsächlich darin begründet war, dass zunehmend chemische Präparate bevorzugt wurden.

Ab 1972 wurden Cannabispräparate dem Betäubungsmittelgesetz (BtMG) unterworfen und somit ein generelles Verbot für die Verwendung von Cannabis hergestellt.

Die moderne Cannabisforschung kommt nun immer häufiger zu der Feststellung, dass Cannabinoide „für gewisse Patienten gerade (...) das Mittel der ersten Wahl darstellen“ (Grotenhermen, 2004) und dass die uns tradierten Kenntnisse bedeutender Ärzte und Kulturen über Cannabiswirkungen ungewöhnlich oft mit den neuen Forschungsergebnissen übereinstimmen (Grotenhermen, 2004).

Aktuell konnte eine MS-Patientin im Sommer 2007 erstmals, seit der Einführung des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) im Jahre 1972, Cannabis legal aus der Apotheke beziehen. Die Bundesopiumstelle hatte ihr eine Genehmigung zum Erwerb und Besitz von Cannabis erteilt. Bis heute sind es vier Patienten in Deutschland, denen diese Ausnahmegenehmigung erteilt wurde.



**Abb.2: "Medicina Antiqua"**  
aus dem 9. Jahrhundert



**Abb.3: Altes Werbeschild aus Deutschland**

### 1.1.2. Botanik der Pflanze Cannabis

Die Hanfpflanze gehört zu der Familie der Cannabaceae (Hanfartige), eine Unterabteilung der Moraceae (Maulbeergewächse). Der nächste Verwandte des Hanfs ist der Hopfen (*Humulus lupulus* L.). Weiter Verwandte sind bisher nicht beschrieben worden (Schultes *et al*, 1975). Heute geht man davon aus, dass Hanf nur aus einer einzigen Art (*Cannabis sativa* L.) besteht, die allerdings in drei Unterarten vorkommt. *Cannabis sativa* spp. sativa als der so genannte Nutzhanf. *Cannabis sativa* spp. indica der Indische Hanf und *Cannabis sativa* spp. spontanea der Ruderalhanf oder Wilde Hanf.

Neuere Untersuchungen (Schultes *et al*, 1975, Emboden 1974 u. 1981,) teilen den Hanf allerdings in drei Arten ein:

1. *Cannabis sativa* Linne; dieser Nutzhanf wächst sehr hoch (bis 4 m) und hat einen dicken, faserhaltigen Stengel. Der Gehalt an psychoaktiven Wirkstoffen ist eher gering, manchmal kaum vorhanden.
2. *Cannabis indica* Lamarck; der Indische Hanf, welcher nur bis zu 1.20 m sehr buschig und faserarm heran wächst. Hier ist der Gehalt an psychoaktiven Stoffen sehr hoch.
3. *Cannabis ruderalis* Janischewsky; der Ruderalhanf ist eine recht kleine Art (60cm), er hat einen leicht faserigen Stengel und ein lockeres Laubwerk mit recht großen Blättern. Der Wirkstoffgehalt bei dieser Art ist im mittleren Bereich anzusiedeln.



*Cannabis indica*. 1. Spitze der blühenden männl. Pflanze 2. Spitze der fruchttragenden weibl. Pflanze 3. Sämling 4. Teilblatt eines großen, eiförmigen Blattes 5. Teil des männl. Blütenstandes mit Knospen und ausgereifter männl. Blüte 6. weibl. Blüten, mit aus dem Deckblatt herausragenden Narben 7. Frucht, in ausdauerndem behaartem Deckblatt eingeschlossen 8. Seitenansicht der Frucht 9. Kantenansicht der Frucht 10. Drüsenhaar mit vielzelligem Schaft 11. Drüsenhaar mit kurzem, einzelligen und unsichtbarem Schaft 12. nichtdrüsiges Haar, daß einen Zystolithen enthält. Zeichnung nach E.W. Smith.

**Abb.4: SMITH E.W; In: SCHULTES Richard Evans, HOFMANN Albert: "Pflanzen der Goetter", Hallwag AG, 2. Aufl., Bern, 1987.**

Alle Hanfarten sind diözisch, d.h. sie bilden männliche und weibliche Blüten auf getrennten Pflanzen aus.

Die verschiedenen Hanfarten oder -variäteten sind sehr variabel und lassen sich kreuzen. Der Hanf ist eine einjährige, durch Samen vermehrte Pflanze. In sonniger Umgebung, auf nährstoff- und wasserreichen Böden gedeiht er besonders gut. Innerhalb einer vier- bis fünfmonatigen Wachstumsperiode erreicht er eine Höhe von bis zu fünf Metern. Wenn die Tage kürzer werden, beginnt er zu blühen. Die Blüten der weiblichen Pflanze enthalten viele Harzdrüsen welche die Cannabinoide hervorbringen.

### **1.1.3. Chemie und Pharmakologie**

Die chemische Zusammensetzung von Cannabis ist recht komplex, aber bereits sehr gut untersucht worden (Lehmann, 1995).

Die Hanfpflanze bildet in unterschiedlichem Maße mit unterschiedlicher Wirkstoffkonzentration ein Harz aus, das besonders an den weiblichen Blütenständen ausgeschieden wird. Untersuchungen zur Chemie von Cannabis begannen im 19. Jahrhundert. Gaoni und Mechoulam ermittelten allerdings erst 1964 die korrekte chemische Struktur von THC. Das reine Harz (Haschisch) erhält vier Hauptkomponenten, die Cannabinoide  $\Delta^1$ -Tetrahydrocannabinol (THC) mit drei Varianten, von denen zwei erst durch die Lagerung des Harzes entstehen, das Cannabidiol (CBD) und das Cannabinol (CBN). CBD ist ein Vorläufer des THC und CBN ist eines seiner Abbauprodukte. Einzig das THC ist für die psychoaktive Wirkung des Hanfes verantwortlich (Murphy u. Bartke, 1992).

Es sind noch die Strukturen weiterer über 60 Cannabinoide mit schwacher oder keiner psychoaktiven Wirkung aufgeklärt worden (Brenneisen, 1986; Ross, 1995; Turner, 1980). Bisher sind noch insgesamt 483 andere Bestandteile isoliert und identifiziert worden. (Grotenhermen, 2004)

Die Cannabisbestandteile können in folgende chemische Klassen eingeteilt werden:

	<b>Chemische Klasse</b>	<b>Bekannt</b>
1	Cannabinoide	66
2	Stickstoffverbindungen	27
3	Aminosäuren	18
4	Proteine, Glykoproteine und Enzyme	11
5	Zucker und verwandte Verbindungen	34
6	Hydrocarbone	50
7	Einfache Alkohole	7
8	Einfache Aldehyde	12
9	Einfache Ketone	13
10	Einfache Säuren	21
11	Fettsäuren	22
12	Einfache Ester und Laktone	13
13	Steroide	11
14	Terpene	120
15	Nichtcannabinoide Phenole	25
16	Flavonoide	21
17	Vitamine	1
18	Pigmente	2
19	Elemente	9
<b>Gesamt</b>		<b>483</b>

*Tab.1: aus Grotenhermen (2004) „Cannabis und Cannabinoide“, Hans Huber Verlag*

#### 1.1.4. Cannabinoide und das Endogene Cannabinoidsystem

Bisher sind in der Pflanze Cannabis fast 70 Cannabinoide gefunden worden. (Ben Amar, 2004) Diesen gemeinsam ist eine trizyklische Struktur bestehend aus einem Phenolring mit einer Pentylgruppe in Metastellung, einem zentralen Pyranring und einem einfach ungesättigten Cyclohexylring (Mechoulam, 1970), sie werden zusammenfassend auch als klassische Cannabinoide bezeichnet.

Tetrahydrocannabinol als das psychoaktive Cannabinoid ist seither gut untersucht worden und war Gegenstand vieler medizinischen Untersuchungen.

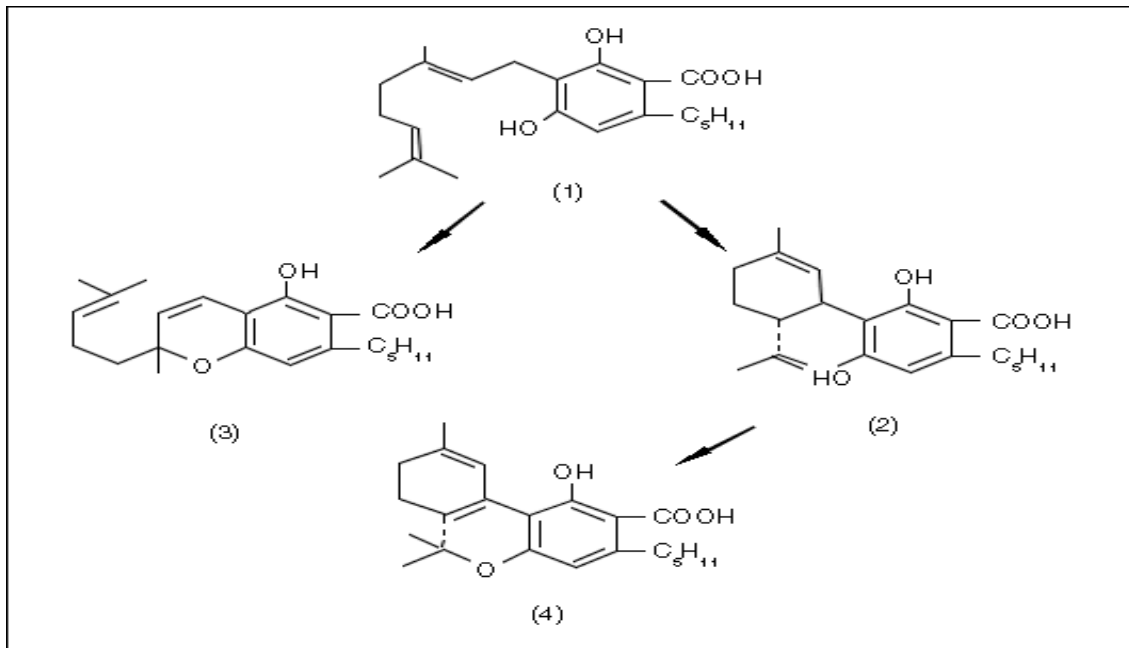
Ein paar nichtpsychoaktive Cannabinoide stehen seit einiger Zeit auch im Interesse der Wissenschaft. So wurde zum Beispiel Cannabidiol (CBD) auf seine medizinisch verwendbare Wirkung untersucht (Williamson *et al*, 2000; Zurier R., 2003; Burstein *et al*, 1992; Malfait *et al*, 2000). Auch das Flavonoid Cannflavin A wurde bereits eingehender untersucht (Barret *et al*, 1985 u. 1984).

Als Cannabinoide wurden ursprünglich nur die „typischen“ C<sub>21</sub>-Verbindungen, die in Cannabis sativa L. vorkommen beschrieben (Razdan, 1986). Modernere Definitionen beschreiben auch andere Strukturen, mit größerer Betonung auf Chemie und Pharmakologie. So werden auch die Strukturen zu den Cannabinoiden gezählt, die an Cannabinoidrezeptoren binden (Grotenhermen, 2004).

Zu diesen Phytocannabinoiden zählen verschieden Subklassen:

- Cannabinoide vom Cannabigeroltyp
- Cannabinoide vom Cannabichromentyp
- Cannabinoide vom Cannabidioltyp
- Cannabinoide vom Delta-9-Tetrahydrocannabinoltyp
- Delta-8-Tetrahydrocannabinol
- Einige weitere Cannabinoide von Cannabinol und Cannabinodioltyp
- Und einige andere Cannabinoide (Cannabicyclooltyp, Cannabielsointyp, Cannabitrioltyp)

Diese Cannabinoide unterscheiden sich durch ihre Struktur voneinander (Grotenhermen, 2004)



**Abb.5: Pate, DW (1994) Chemical ecology of Cannabis. Journal of the International Hemp Association 2: 29, 32-37**

Biosynthese der Cannabinoide: 1= Cannabigerol, 2= Cannabidiol, 3= Cannabichromene, 4= *delta*-9-Tetrahydrocannabinol (THC).18

Im Jahr 1987 beim Cannabis-Kongress in Melbourne (Kanada) demonstrierte Prof. Allyn Howlett von der Saint Louis Universität in Missouri (USA) erstmals, dass einige der Cannabinoid-Wirkungen rezeptorvermittelt sind. Das bedeutet, dass sie über eine Bindung von Cannabinoiden an spezifische Bindungsstellen auf Körperzellen zustande kommen. Diese Bindungsstellen werden Cannabinoid-Rezeptoren genannt

Der menschliche Körper verfügt über spezifische Cannabinoid-Bindungsstellen an der Oberfläche vieler Zelltypen, und er produziert verschiedene Endocannabinoide, Fettsäureabkömmlinge, die an diese Cannabinoid-Rezeptoren (CB) binden und sie aktivieren. Auch die pflanzlichen Cannabinoide binden an eben diese Bindungsstellen. CB-Rezeptoren und Endocannabinoide bilden zusammen das Endocannabinoidsystem. Die zwei bisher beschriebenen Cannabinoidrezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren wurden im zentralen Nervensystem und in vielen peripheren Geweben und Organen nachgewiesen.

Der Cannabinoidrezeptor-1 (CB1) findet sich vorwiegend im Nervensystem. Viele dieser Rezeptoren werden von Enden zentraler und peripherer Nerven exprimiert und hemmen die Freisetzung anderer Neurotransmitter. Somit schützt die Aktivierung der

CB1-Rezeptoren das Nervensystem vor einer Überaktivierung (Grotenhermen, 2006). CB1-Rezeptoren werden in Regionen des Gehirns exprimiert die für Bewegung, Gedächtnis und Schmerzverarbeitung verantwortlich sind.

Der Cannabinoidrezeptor-2 (CB2) findet sich hauptsächlich in den Immunzellen, darunter Leukozyten, Milz und Mandeln. Ihre Funktion ist die Modulation der Freisetzung von Zytokinen, die verantwortlich für Entzündungen und für die Regulation des Immunsystems sind. Substanzen, die die CB2 Rezeptoren aktivieren, zeigen keinerlei psychologische Wirkungen. Daher stehen besonders diese im Interesse der Wissenschaft, mit dem Ziel einer therapeutischen Nutzung.

In tierexperimentellen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass das Endocannabinoidsystem bei Gewebsschädigung infektiöser oder anderer Genese aktiviert wird und neben analgetischen auch antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung entfaltet. Cannabinoide konnten in diesen Experimenten sowohl die erworbene als auch die angeborene Immunität beeinflussen, außerdem modulieren sie sowohl zentrale als auch periphere inflammatorische Prozesse im Nervensystem

Die Arbeitsgruppe um Professor Raphael Mechoulam von der hebräischen Universität in Jerusalem, wies 1992 das erste Endocannabinoid nach und nannte es Anandamid, nach dem Sanskrit-Wort Ananda, das Glückseligkeit bedeutet, und seiner chemischen Struktur, dem Amid.

Im Gehirn dienen Endocannabinoide als Neuromodulatoren, sie sind Abkömmlinge von ungesättigten Fettsäuren. Bisher wurden folgende Endocannabinoide identifiziert:

Anandamid (N-Arachidonylethanolamid), 2-Arachidonoylglycerol (2-AG), 2-Arachidonoylglyceryläther und O-Arachidonoyldopamin. Die am besten untersuchten Stoffe sind Anandamid und 2-AG (Sugiura *et al*, 2002). Beide werden durch den Körper bei Bedarf aus membrangebundenen Vorstufen durch Phospholipase D und C gebildet und können Cannabinoid-Rezeptoren stimulieren. Anandamid und Arachidonoyldopamin (NADA) können zusätzlich an den Vanilloid-Rezeptor binden.

Viele Zelltypen, aber vor allem die Zellen des Immunsystems, können Endocannabinoide bilden. So kurbeln durch ATP stimulierte, purinerge Rezeptoren auf Mikrogliazellen bei entzündlichen Prozessen Calcium-gesteuert die Endocannabinoid-Produktion rapide an (Walter *et al*, 2003), wodurch es zu erhöhten Konzentrationen von



2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) im Hirn und Rückenmark kommt (Baker *et al*, 2001)).

Im gesunden Gewebe besteht die Hauptaufgabe des endogenen Cannabinoidsystems hauptsächlich in der Aufrechterhaltung physiologischer Basisprozesse, was anhand eines konstitutiven Grundgehalts an Endocannabinoiden und an nur geringfügigen Konzentrationsschwankungen des Endocannabinoid-Gehalts belegt werden kann. Dagegen kommt es im Falle pathologischer Veränderungen zu drastischen und gewebespezifischen Veränderungen in den Endocannabinoid-Konzentrationen (Mackie u. Stella, 2006). Im gesunden ZNS sind Endocannabinoide an der Regulation synaptischer Plastizität und damit an der Regulation kognitiver Funktionen und Emotionen beteiligt (Wotjak, 2005). So modulieren sie neuronale Schaltkreise in den entsprechenden Regionen des ZNS. In den Basalganglien und im Cerebellum, Orten hoher CB1 Rezeptor-Dichte, modulieren Endocannabinoide dopaminerge Neurotransmission und üben so Einfluss auf Bewegungskoordination und Körperhaltung beim Menschen aus (Van der Stelt u. Di Marzo, 2003). Darüber hinaus wirken sie in Bereichen des sensorischen und autonomen Nervensystems, so dass Schmerzwahrnehmung, kardiovaskuläre und gastrointestinale Prozesse durch sie reguliert werden können (Iversen u. Chapman, 2002; Randall *et al*, 2002; Di Carlo u. Izzo, 2003). Auch in hypothalamischen Regionen sind Endocannabinoide bei der Regulation unterschiedlicher Regelkreise wie der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt (Kreutz *et al*, 2006). Im Gegensatz zu den im ZNS hauptsächlich am CB1 Rezeptor angreifenden Endocannabinoiden ist die Aktivierung des CB2 Rezeptors häufig eng mit der Modulation der zellulären und humoralen Immunantwort verbunden und besitzt daher eine enorme funktionelle Bedeutung für inflammatorische Prozesse (Klein, 2005).

Eine besondere Rolle spielen Endocannabinoide bei Pathologien des ZNS, bei denen in der Regel ein massiver Verlust von Neuronen zu beobachten ist. In solchen Fällen sind beide Typen von CB Rezeptoren beteiligt. Über die primär neuronenspezifischen CB1 Rezeptoren nehmen Endocannabinoide direkt auf die einzelnen Neurone Einfluss. Der CB2 Rezeptor ist dagegen hauptsächlich auf Mikrogliazellen vorzufinden, einer Zellart, die dem Immunsystem zugehörig ist und bei krankhaften Veränderungen im Gehirn eine zentrale Rolle übernimmt. Über den CB2 Rezeptor können Endocannabinoide somit auch indirekt auf das Überleben von Neuronen und somit auf das Ausmaß des

neuronalen Schadens Einfluss nehmen. Es ist bekannt, dass Endocannabinoide sich hemmend auf die durch den Neurotransmitter Glutamat hervorgerufene erregende (exzitatorische) Neurotransmission auswirken und dadurch einer übermäßigen Aktivierung von Glutamat Rezeptoren entgegenwirken, welche sich schließlich schädlich auf Neurone auswirken könnte (Stella *et al*, 1997; Ameri *et al*, 1999; Misner u. Sullivan, 1999).

Endocannabinoide werden, im Gegensatz zu anderen chemischen Signalsubstanzen, erst bei Bedarf produziert und dann von der Zelle freigegeben.

Sie werden zu anderen biologisch aktiven Substanzen metabolisiert. So entsteht beim Abbau von 2-AG Arachidonsäure und bei der Verstoffwechslung von AEA über die Cyclooxygenase Prostaglandin E2, die beide proinflammatorische Mediatoren darstellen (Chang *et al*, 2001).

## ***1.2. Phytopharmakologie/ Phytotherapie***

Die Geschichte der Phytotherapie wurzelt in der Vorgeschichte der Menschheit, als unsere Ahnen begannen, bestimmte Pflanzen zur Behandlung verschiedener Störungen zu verwenden. Die Phytotherapie ist der Ursprung der Pharmakologie, noch heute ist ein großer Anteil der Arzneien pflanzlichen Ursprungs. Die meisten Medikamente werden mittlerweile synthetisch hergestellt, dennoch gibt es noch immer Stoffe, die aus Pflanzen gewonnen werden oder ihnen zumindest nachgeahmt werden. Im Gegensatz zur Pharmakologie, bei der die Extraktion einzelner Reinsubstanzen im Vordergrund steht, arbeitet die Phytotherapie mit Stoffgemischen ganzer Pflanzenteile oder sogar mehrerer verschiedener Pflanzen.

Sie kann als Verfahren zur Behandlung von kranken Menschen und Tieren mittels pflanzlichen Arzneimitteln (Extrakte aus Arzneidrogen als Vielstoffgemische) beschrieben werden. Sie wird sowohl in der naturwissenschaftlich begründeten Medizin (Schulmedizin) als auch in der Komplementärmedizin eingesetzt und ist sowohl in der Hausarztmedizin wie auch bei Spezialisten (z.B. Gynäkologie, Gastroenterologie) verbreitet. Die Phytotherapie beinhaltet gewisse schulmedizinische Aspekte etwa hinsichtlich Wirksamkeit, Zweckmäßigkeit und Wirtschaftlichkeit.

---

Daneben beruht sie aber auch auf arzneimitteltherapeutischen Aspekten der traditionellen europäischen Naturheilkunde. Ein Schwerpunkt der Phytotherapie liegt in der Behandlung der chronisch funktionellen Erkrankungen. Der zweite Schwerpunkt umfasst die Therapie beginnender bis mittelschwerer Erkrankungen. Für beide Schwerpunkte erweitert die Phytotherapie das Therapieangebot in der Medizin.

Aus den in der Phytotherapie verwendeten Arzneipflanzen oder Pflanzenteilen (Arzneidroge) werden Extrakte als Wirkstoffe gewonnen und in Form von verschiedenen galenischen Formen wie Tinkturen, Tropfen, Salben, Tees u.a. gebraucht. In der naturheilkundlichen Phytotherapie werden traditionell eher Kombinationen von Arzneipflanzen angewendet. Jüngerer Ursprungs ist die Entwicklung von phytotherapeutischen Monopräparaten, wie sie in Monographien der Kommission E, der ESCOP (European Scientific Cooperation on Phytotherapy) und der WHO gefördert wurden.

Der Begriff Phytotherapie wurde erstmals von dem französischen Arzt Henri Leclerc (1870-1955) in die Wissenschaft eingeführt. Er bezeichnete damit die Wissenschaft von der Behandlung und Vorbeugung von Befindlichkeitsstörungen und Erkrankungen mit Pflanzen, deren Auszügen oder natürlichen Produkten. Das Kuratorium der Gesellschaft für Phytotherapie e.V. hat 1991 folgende Definition festgelegt:

„Phytotherapie ist die Behandlung und Vorbeugung von Krankheiten bis hin zu Empfindungsstörungen durch Pflanzen, Pflanzenteile und deren Zubereitungen. Die Arzneimittel der Phytotherapie werden Phytopharmaka, synonym Phytotherapeutika genannt... Die Phytotherapie ist nicht Alternative, sondern Teil der heutigen naturwissenschaftlich orientierten Medizin. Sie schließt therapeutische Lücken und bietet ergänzende oder adjuvante Möglichkeiten bei der Behandlung und Vorbeugung akuter und chronischer Krankheiten.“

Die Phytopharmakologie ist nur ein Anteil der umfassenden Heilpflanzenkunde, die Phytochemie, Phytopharmazie, und Phytotherapie beinhaltet. Während sich die Phytochemie mit den Inhaltsstoffen der Pflanzen beschäftigt, deren Anliegen es ist die chemische Zusammensetzung zu identifizieren, beschäftigt sich die Phytopharmazie vor allem mit der Droge, d.h. das für die jeweilige Arznei notwendige Ausgangsprodukt. Die Phytopharmakologie ist noch in den Anfängen, zwar beschäftigen sich zunehmend mehr Pharmakologen mit Pflanzeninhaltsstoffen, jedoch wird die spezifische Aufgabe,

die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Mehrstoff- oder Vielstoffgemischen zu untersuchen, kaum praktiziert.

### ***1.3.. Pflanzenextrakte***

Der Weg von der Heilpflanze zu einer Arznei führt immer über die Droge und deren pharmazeutische Zubereitung. In der modernen Phytotherapie ist dies in der Regel der Extrakt. Wichtig ist hierbei die stoffliche und strukturelle Komposition. Gaedcke (1999) bezeichnet den pflanzlichen Extrakt in seiner natürlichen, unveränderten stofflichen Gesamtheit als den eigentlichen Wirkstoff. Sie gliedert die Inhaltsstoffe nach Wirksubstanzen, wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffen, pharmazeutisch relevanten, wirksamkeitsmitbestimmenden Inhaltsstoffen, Leitsubstanzen, Coeffektoren sowie Begleit – und Gerüststoffe.

Ein großes Problem in der Phytopharmakologie stellt die Untersuchung dieser Mehrstoff- oder Vielstoffgemische dar. Es ist heute wichtig Pflanzenextrakte zu produzieren, die in ihrer Wirksamkeit und in ihrer Reproduzierbarkeit standardisiert sind.

Die Standardisierung umfasst alle Maßnahmen, die zu einer reproduzierbaren Qualität der Droge und der daraus hergestellten Extrakte führen. (Weiss, u. Fintelman, 2006). Sind bei einem standardisierten Extrakt wirksamkeitsbestimmende Inhaltstoffe bekannt, können diese in ihrem Gehalt normiert werden. Nach Hefendehl u. Lander (1982) bedeutet diese Normierung „Einstellung eines Drogenpulvers oder Extraktes auf einen festgelegten Normwert mit Angabe des Mindest- und Höchstgehaltes, bezogen auf eine Substanz bzw. Substanzgruppe, die als wirksamkeitsbestimmend gilt.“

Die Angaben über Inhaltsstoffe, Herkunft und Wirkung der im Handel erhältlichen pflanzlichen Präparate sind heute oft noch unvollständig. Daher gibt es Bemühungen, die Sicherheit von Phytopharmaka zu prüfen. Es wurden Institutionen gegründet, welche die Herkunft und Reinheit von Pflanzenextrakten, ihre Transportbedingungen und ihren Gehalt an giftigen Rückständen kontrollieren. Es wird zusätzlich versucht, die Daten aus experimentellen und klinischen Untersuchungen der Heilpflanzen zusammenzuführen. Durch die Schaffung von Standards wird eine Vergleichbarkeit

---

zwischen den Extrakten und den Medikamenten erreicht (Augustin, 2004, Blumenthal, 2003).

## ***1.4. Die Entzündung***

### **1.4.1. Molekulare Mechanismen der Entzündung**

Die Entzündung ist eine Reaktion von lebendem Gewebe auf innere oder äußere Reize, ihre Erscheinungsformen werden zusammen gefasst als Rubor (Rötung), Calor (Wärme), Tumor (Schwellung), Dolor (Schmerz) und Functio Laesa (Funktionsstörung). Dies sind die äußeren, sichtbaren oder fühlbaren Erscheinungsformen. Eine Entzündung geht aber auch einher mit Veränderungen auf molekularer Ebene. Auslösende Stimuli führen über Signalkaskaden zur veränderten Genexpression, wodurch so genannte Entzündungsmediatoren exprimiert werden.

### **1.4.2. Prostaglandine/ Prostaglandin E2**

Prostaglandine sind kurzlebige und lokal wirksame Mediatoren. Sie sind hormonähnliche Eicosanoide und wirken autokrin sowie parakrin und damit lokal am Ort ihrer Synthese. Sie werden hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und aus der Zelle geschleust. Sie sind mitverantwortlich für verschiedene physiologische, sowie für pathologische Prozesse. Zu diesen Prozessen zählen unter anderem Entzündungsreaktionen, Knochenentwicklung und gesteigerte Schmerzempfindlichkeit, sowie die Integrität der Magenschleimhaut, die Nierendurchblutung und die Aggregation der Blutplättchen (Levy, 1997; Smith *et al*, 2000).

Die Synthese der Prostaglandine erfolgt durch Hydrolyse von Membran-Phospholipiden durch die Phospholipase A. Die entstandene freie Arachidonsäure wird durch COX

oxidiert und es entsteht ein instabiles Zwischenprodukt, das Prostaglandin G<sub>2</sub>. Das PGG<sub>2</sub> wird in einem zweiten Schritt durch die Peroxidase Aktivität von COX zu Prostaglandin H<sub>2</sub> umgewandelt. PGH<sub>2</sub> ist das Ausgangsmolekül für verschiedene Prostaglandine und Thromboxane (Smith *et al*, 2000)

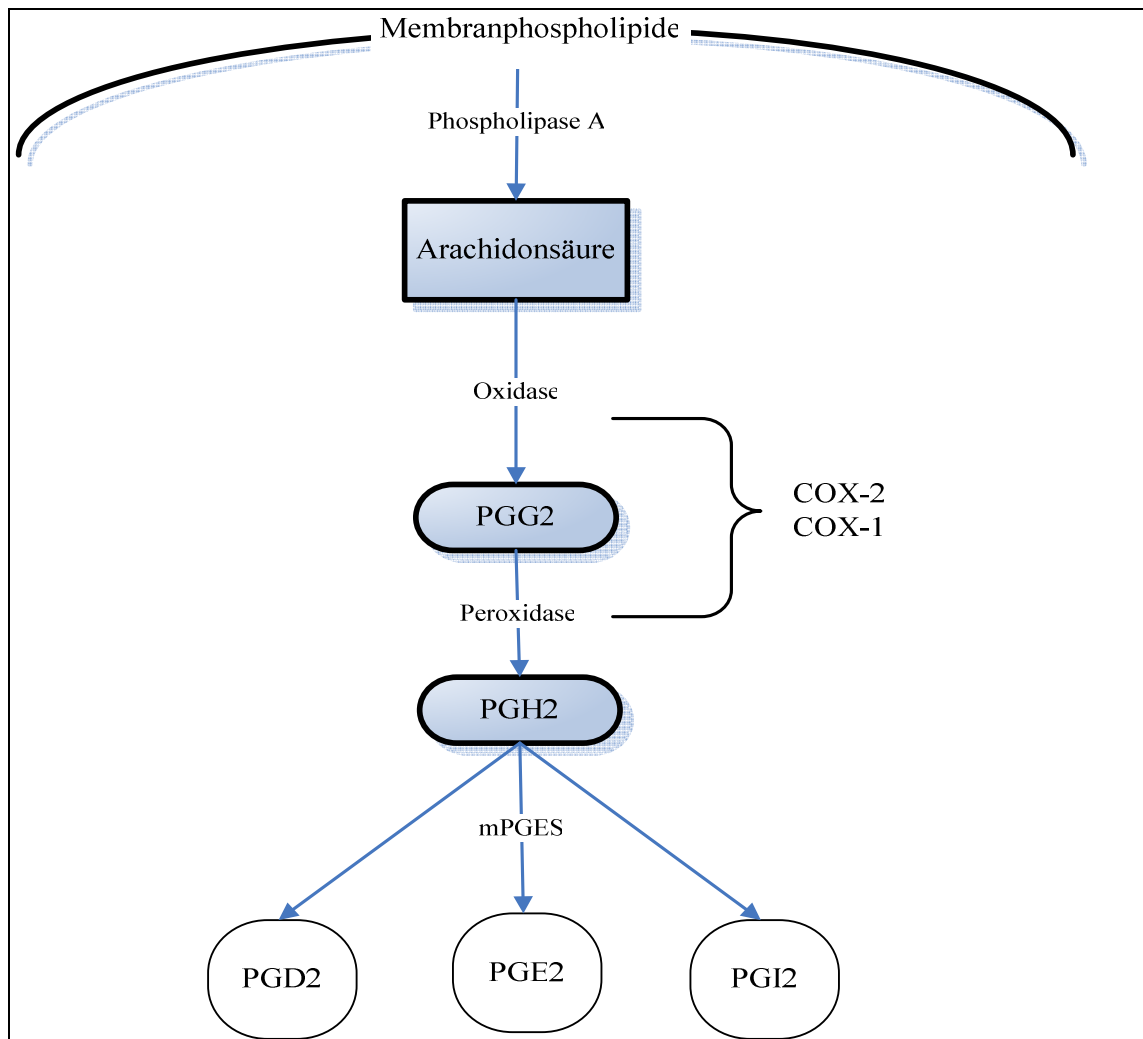
Die spezifischen Rezeptoren der Prostaglandine sind an der Zellmembran lokalisiert. PGE<sub>2</sub> bindet an eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (EP<sub>2-4</sub>). Diese Rezeptoren sind an verschiedene Signaltransduktionswege gebunden (Hata u. Breyer, 2004).

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) stellt eines der wichtigsten Prostaglandine dar. Es ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. PGE<sub>2</sub> hat z.B. eine besondere Bedeutung bei Entzündungsprozessen und rheumatischen Erkrankungen (Robinson *et al*, 1979; Stanczyk *et al*, 2001). Hemmstoffe der Prostaglandinsynthese haben schmerzlindernde und entzündungshemmende Wirkung.

PGE<sub>2</sub> ist weiterhin für das Entstehen von Fieber verantwortlich. Bakterienbestandteile und IL-1 stimulieren das Epithel des Organum vasculosum laminae terminalis (ein Teil des Hypothalamus), dadurch kommt es zu einer Expression von COX-2, was wiederum zu einer gesteigerten PGE<sub>2</sub>-Synthese führt.

Im Magen wirkt PGE<sub>2</sub> schleimhautprotektiv und hemmt die Bildung der Magensäure.

PGE<sub>2</sub> ist zusammen mit PGI<sub>2</sub> das Hauptprostaglandin, welches in das Entzündungsgeschehen involviert ist. Es erhöht die Gefäßpermeabilität (Gewebeschwellung), ist an der Entstehung der Rötung beteiligt und verstärkt den Schmerz (welcher durch andere Entzündungsstoffe wie Bradykinin oder Histamin hervorgerufen wird), indem es nozizeptive Nervenendigungen sensibilisiert.



**Abb.6: Schema der Arachidonsäurekaskade**

Arachidonsäure wird durch Phospholipase A aus Membranphospholipiden freigesetzt, von Cyclooxygenasen (COX) zunächst oxidativ zu Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) zyklisiert und anschließend durch deren Peroxidaseaktivität zu PGH<sub>2</sub> umgesetzt. PGH<sub>2</sub> ist sehr instabil und wird entweder nicht-enzymatisch oder durch verschiedene terminale Prostaglandinsynthasen (z.B. mPGES-1) zu Prostaglandinen reduziert.

### 1.4.3. Cyclooxygenase 2

COX-2 (Cyclooxygenase) ist eine von drei Isoformen des Proteins. Während COX-1 überwiegend generell physiologische Prozesse übernimmt und permanent in der Zelle vorliegt, ist COX-2 eine induzierbare Form, die durch verschiedene Stimulantien aktiviert werden kann. Eine dritte Isoform, COX-3, die eine Splicevariante von COX-1 darstellt, wurde im Gehirn eines Hundes nachgewiesen. Über eine mögliche Funktion von COX-3 im Menschen ist bisher allerdings noch nichts bekannt (Chandrasekharan *et al.*, 2002).

Die Cyclooxygenasen spielen eine Schlüsselrolle bei der Synthese von Prostaglandinen und Thromboxanen aus Arachidonsäure (Herschman, 1996).

Cyclooxygenase-2 wird in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die Induktion der Expression kann durch viele verschiedene Stimulantien angeregt werden. Die Art der Stimulation ist abhängig vom jeweiligen Gewebe. COX-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und kann durch Lipopolysaccharide oder verschiedene Mediatoren der Immunantwort induziert werden.

Die Induktion von COX-2 kann über verschiedene Signalwege erfolgen, die durch unterschiedliche Rezeptoren aktiviert werden. In den meisten Fällen verläuft die weitere Signaltransduktion über einen Signalweg der Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)- Signalwegfamilie.

### 1.4.4. Membrangebundene PGE-Synthase-1

Die mPGES-1 (membrangebundene PGE-Synthase-1) ist eine Synthase, die die Umwandlung von PGH<sub>2</sub> in PGE<sub>2</sub> katalysiert. Zurzeit sind drei solcher Synthesen bekannt, neben der mPGES-1 existieren noch die membrangebundene PGE-Synthase 2 (mPGES-2) (Murakami *et al.*, 2003) und die cytosolische PGE-Synthase (cPGES) (Tanioka *et al.*, 2000). Die mPGES-1 ist funktionell an COX-2 gekoppelt und kann genauso wie COX-2 durch proinflammatorische Stimuli (LPS, IL-1 $\beta$ ) hochreguliert werden (Stichtenoth *et al.*, 2001; Thoren *et al.*, 2000; Korotkova *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass physiologische PGE<sub>2</sub>-Funktionen vorwiegend durch cPGES/mPGES-



2/COX-1 und pathophysiologische PGE<sub>2</sub>-Funktionen durch das mPGES-1/COX-2-System vermittelt werden (Helliwell *et al*, 2004; Murakami *et al*, 2002).

Neueste Studien zeigen auf, dass COX-2 und mPGEs1 nicht unbedingt gekoppelt zu sein scheinen (Pinheiro de Oliveira *et al*, 2008).

#### **1.4.5. Mitogen-aktiviertes Protein Kinase-Weg (MAPK)**

Entzündungen gehen immer einher mit charakteristischen Veränderungen auf molekularer Ebene. Durch auslösende Stimuli kommt es zur Aktivitätsänderung in bestimmten zellulären Signalwegen, die daraufhin zu spezifischen Änderungen des Genexpressionsmusters führen.

Bei mikrobieller Infektion ermöglicht das angeborene Immunsystem die spezifische Erkennung und die schnelle Einleitung einer Immunantwort. Hierbei werden über so genannte Toll-like Rezeptoren (TLR) beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien erkannt. Antigen-präsentierende Zellen des angeborenen Immunsystems werden somit aktiviert. In einer solchen Zelle startet nun die so genannte Signaltransduktionskette, an deren Ende immer die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B steht (Chang *et al*, 2005; Dent *et al*, 2003).

Diese Signaltransduktionskaskade ist eine der wichtigsten intrazellulären Regulatoren von Entzündungsreaktionen, welche durch bakterielle und virale Antigene, Zytokine und durch chemisch-physikalische Noxen aktiviert wird und die Genexpression in den betroffenen Zellen schnell und umfassend ändert. Die MAPK Kaskaden haben wichtige Funktionen bei entzündlichen Prozessen, beispielsweise sind einige von ihnen wichtig für die Regulation der COX-2 Expression in aktivierten Mikroglia Zellen (Akundi *et al*, 2005).

In der Promotorregion von COX-2 finden sich auch Bindesequenzen für Transkriptionsfaktoren (Inoue u. Tanabe, 1998; Yan *et al*, 2002). Ein Signalweg aus der MAPK Signalwegfamilie, über den die Induktion von COX-2 erfolgen kann, ist der ERK-Signalweg (Extracellular-signal Regulated Kinasen).

Die Transkriptionsfaktoren können durch verschiedene Signalwege der MAPK Signalwegfamilie aktiviert werden. Die MAP-Kinasen selber sind kleine Proteinkinasen, welche durch Phosphorylierung aktiviert werden. Am Ende einer

solchen Signalkette steht dann die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, der somit reguliert wird.

Die funktionelle Bedeutung der MAPK ist vielfältig, sie sind beispielsweise an der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung beteiligt. Ihr Schwerpunkt liegt jedoch in der Regulation von Entzündungsmediatoren, ein Großteil der Zytokine wird unter anderem über MAPK gesteuert.

Die einzelnen Kinasen der Signalkaskade können neben ihrer individuellen Bezeichnung in Gruppen eingeteilt werden:

### ***Extracellular-signal Regulated Kinasen (ERK/MAP-Kinase)***

Sie reguliert zelluläre Prozesse, wie z. B. die Proliferation und die Zelldifferenzierung. Sie ist die bestuntersuchte unter den MAP-Kinasen. Die beiden Isoformen ERK1 (p44MAPK) und ERK2 (p42MAPK) werden durch eine Vielzahl von Mitogenen, osmotischen Stress und Zellkontakte sowie durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und im Rahmen viraler Infektionen aktiviert.

### ***Stress-Aktivierte MAP Kinasen***

Ein Teil der zellulären Reaktion auf inflammatorische Zytokine, Toxine und physikalischen Stress wird durch den JNK/SAPK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) und den p38 Protein Kinase Signalweg übermittelt. Apoptose, Transformation, Entwicklung, Aktivierung des Immunsystems, Entzündungsreaktionen und Anpassung an Umgebungsveränderungen gehören zu ihren Aufgaben.

Hierzu gehören:

1. JNK/SAPK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) Ihre Aktivierung führt zur Expression von Genen mit AP-1 Bindestellen (AP-1 Transkriptionsfaktorkomplex) in Promotoren. Unter anderem findet sich auch in der Promotor-Region von COX-2 eine Bindestelle für AP-1 (Davis 1999; 2002; Yang *et al*, 1998). Außerdem haben inflammatorische Zytokine der TNF (tumor necrosis factor) Familie einen starken aktivierenden Effekt auf JNK/SAPK.

## 2. p38

p38 MAP Kinasen sind eine zweite Gruppe Stress-Aktivierter MAP Kinasen. Genauso wie JNK/SAPKs werden p38 MAP Kinasen hauptsächlich durch Stress und inflammatorischen Zytokinen aktiviert. Von der p38-MAPK ist die Produktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  und der COX-2 in Monozyten abhängig, in Entzündungsgeschehen und Immunantwort wird ihr daher eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Neben dieser direkten Zytokinsteuerung sind auch indirekte Wirkungen auf das Entzündungsgeschehen beschrieben worden. So spielt die p38-MAPK eine wesentliche Rolle bei der Regulation der COX-2.

### 1.4.6. Zytokine

Zytokine sind zuckerhaltige Proteine, die regulierende Funktionen auf das Wachstum und die Differenzierung von Körperzellen haben. Viele Zytokine spielen eine wichtige Rolle im immunologischen Geschehen, sie werden dann allgemein als Mediatoren (Entzündungsmediatoren) bezeichnet. Die Zytokine teilen sich in fünf Hauptgruppen auf. Dazu gehören die Interferone, die Interleukine, die Koloniestimulierenden Faktoren, die Tumornekrosefaktoren und die Chemokine. Die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine gehören zu der Gruppe der Interleukine und der Tumornekrosefaktoren:

#### *Interleukin 1- $\beta$*

IL-1 $\beta$  ist ein entzündungsfördernder Signalstoff, er wird hauptsächlich von Monozyten produziert und ist ein zentraler Botenstoff. Wenn Zellen stimuliert werden, z.B. mit LPS, dann steigt die IL-1 $\beta$  Konzentration stark an. Es ist ein hochwirksames Zytokin und bewirkt einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der Thrombozyten, der Akuten-Phase-Proteine und ist für den Anstieg des Fiebers mitverantwortlich. Es triggert in Endothelzellen (über NF- $\kappa$ B) die Transduktion von COX-2 und führt darüber zu einer vermehrten Bildung von PGE2. Außerdem induziert es die Bildung von CD14-Rezeptoren, welche zusammen mit den Toll-like-Rezeptoren, Zielmoleküle für LPS sind (Rivest *et al*, 2000). Durch eine Stimulation der Neurone, die im Hypothalamus

Corticotropin Releasing Hormone (CRH) ausschütten, führt es zu einer Stimulation von ACTH und Kortison bei Entzündungen (Rivest *et al*, 2000). Die Interleukin-6 Freisetzung wird durch IL-1 $\beta$  getriggert. IL-1 $\beta$  kommt im Blut nur in solch geringen Mengen vor, dass eine Messung nur *in vitro* gelingt.

### ***Interleukin-6***

Das IL-6 regelt die Entzündungsreaktion im Organismus, es kann über den MAP-Kinase-Weg die Transkription einiger Zielgene aktivieren (Heinrich *et al*, 2003). Außerdem ist IL-6 ein Aktivator der Akuten-Phase-Proteine und es stimuliert die Lymphozyten. Bei einer Entzündung infiltrieren zunächst neutrophile Granulozyten, sie werden dann ersetzt durch spezifischere Entzündungszellen wie Lymphozyten und mononukleäre Zellen. Hierbei spielt Interleukin-6 eine entscheidende Rolle. Mit dem Grad der Infiltration der neutrophilen Granulozyten steigt die Induktion von IL-6. Es begrenzt die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe und sorgt für eine Infiltration mit Lymphozyten, dies ist der Übergang von der angeborenen Immunantwort zu der erlernten Immunantwort. Des Weiteren ist IL-6 in die Regulation der Apoptose der Leukozyten involviert.

Auf T-Lymphozyten wirkt IL-6 antiapoptotisch, es reguliert ihre Differenzierung, Proliferation und Polarisierung. Monozyten werden durch IL-6 zu Makrophagen differenziert.

### ***Tumornekrosefaktor $\alpha$***

TNF $\alpha$  ist ein Signalstoff des Immunsystems, welcher bei lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist. Er wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet und er regelt die Aktivität verschiedener Immunzellen. Er kann die Apoptose, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen. Er bewirkt über die Ausschüttung von CRH (Corticotropin-releasing Hormon) eine Stimulierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. In der Leber stimuliert er die Bildung der Akuten-Phase-Proteine, auf Makrophagen wirkt er Phagozytose-stimulierend. Auf neutrophile Granulozyten wirkt er migrationsfördernd und in allen Geweben führt er zu einer Aktivitätssteigerung der Cyclooxygenase-2.

## **1.5. Zielsetzung**

Die Aufgabe im Rahmen des EU-Projektes war es, die entzündungshemmende Wirkung von Cannabis anhand drei verschiedener Pflanzenextrakte (mit nur einem sehr geringen Gehalt an THC) zu testen. Ziel war es dabei, unter Einfluss der Pflanzenextrakte die Expression des COX-2-Proteins und die Produktion von PGE2 und der Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) zu studieren. Es sollte herausgefunden werden, welcher der drei Cannabisextrakte die potenteste entzündungshemmende Wirksamkeit im Modell der Gewebekultur hat. Dieser Extrakt sollte dann weiter untersucht werden um festzustellen wo Cannabis in der Zelle seine Wirkung entfaltet.

Zwei Cannabinoide, die Hauptbestandteile der Extrakte waren, wurden darüber hinaus im Einzelnen auf ihre Entzündungshemmende Wirkung untersucht, um herauszufinden in welchem Maße diese für die entzündungshemmende Wirkung der Extrakte verantwortlich sind.

### **1.5.1. Fragestellung und Zielsetzung**

1. Drei Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) sollten auf ihre entzündungshemmende Wirkung getestet werden. Hierfür wurden verschiedene Zellsysteme verwendet.
2. Es sollte für das EU-Projekt der Extrakt gefunden werden, dessen Wirksamkeit in Mikrogliazellen am signifikantesten war.
3. Der effektivste Cannabisextrakt sollte weitergehend in Mikroglia Zellen untersucht werden, um ein tieferes Verständnis über seine Wirkmechanismen auf molekularer Ebene zu erhalten.
4. Es sollten die beiden Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, welche Hauptbestandteile der Extrakte sind, auf ihre entzündungshemmende Wirkung untersucht werden. Hierbei sollte der Einfluss dieser Substanzen, auf die Wirkung der Extrakte, herausgefunden werden.

## **2. Materialien und Methoden**

### ***2.1. Zellkultur***

#### **2.1.1. Präparation und Kultivierung von Mikrogliazellen der Ratte**

Neonatale Sprague Dawley Ratten wurden mit einer Schere dekapitiert, die Köpfe wurden in einer Petrischale auf Eis gesammelt. Die nachfolgenden Schritte wurden an einer sterilen Werkbank mit horizontalem Luftstrom durchgeführt. Das Präparationsbesteck wurde zuvor autoklaviert. Mit einer kleinen Schere wurde die Kalotte vom Foramen magnum in retroaurikulärer Richtung beidseitig aufgeschnitten. Das Schädeldach wurde mit einer Pinzette nach frontal mobilisiert. Mit Hilfe eines kleinen Spatels wurde das Gehirn aus der Schädelgrube gelöst, herausgehoben und in eine mit sterilem eiskaltem PBS befüllte Kulturschale überführt. Unter einem Binokular wurden die Gehirne sorgfältig von Meningen und Gefäßen befreit. Anschließend wurde rostral des Kleinhirns die Pons vom Mittelhirn getrennt und dann das Mittelhirn vom Thalamus abgesetzt. Anschließend wurde der Großhirnkortex von Thalamus und Striatum getrennt. Mittelhirn und Kortex wurden getrennt voneinander in, mit PBS befüllten, sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen auf Eis gesammelt und im Folgenden isoliert behandelt. Nach Ende der Präparation wurden die Falcon-Röhrchen zur weiteren Bearbeitung der Gewebe auf eine sterile Werkbank mit vertikalem Luftstrom (Hera Safe, Heraeus) überführt. Das Gewebe wurde viermal mit PBS gewaschen und durch wiederholtes Aufziehen (ca. 10-mal) in einer 2 ml Pipette homogenisiert. Das Homogenisat wurde durch ein steriles Zellfilter (70µM Porengröße) gefiltert, in Nährmedium (DMEM, 10% FBS (Sigma), Penicillin (159 U/ml), Streptomycinsulfat (76 U/ml) aufgenommen, zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials (60 ml/Großhirn) verdünnt und in Kulturschalen (10 cm Durchmesser, 6ml Zellsuspension/Schale) überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5,5 % CO<sub>2</sub>. Das Nährmedium wurde mit extremer Vorsicht zubereitet um eine LPS Kontamination zu verhindern und wurde zunächst zwei Tage nach der Präparation dann einmal pro Woche gewechselt. Unter LPS-freien Kulturbedingungen siedeln sich in diesen Kulturen die Mikrogliazellen in den Überstand ab („phagocyte-accumulating cultures“). Nach einer

Kultivierungszeit von 2 Wochen bis hin zu 8 Wochen wurden die Kulturschalen wöchentlich geschwenkt, die Zellen, die sich im Überstand sammelten, wurden abgeschöpft und in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) ausgesiedelt. Mikrogliaulturen, die auf diese Weise gewonnen werden, weisen eine sehr hohe Reinheit auf, eine Kontamination mit anderen glialen Zellen ist vernachlässigbar (Gebicke-Haerter *et al*, 1989).

### **2.1.2. Kultivierung der SK-N-SH Neuroblastomazellen**

Die von J.L. Biedler etablierte humane Zelllinie SK-N-SH, wurde über die American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die Zellen entstammen der Knochenmarksmetastase eines Neuroblastoms. SK-N-SH Zellen wurden als Monolayer-Kultur bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 5 % kultiviert. Als Nährmedium diente Earle's MEM, das mit 2mM L-Glutamin, Natrium Pyruvat 1 mM, nicht-essentiellen MEM Aminosäuren 1%, MEM Vitaminen 1%, Penicillin (40 U/ml), Streptomycin (40 µg/ml) und 5% FBS (PAN) substituiert wurde. Die Stammkulturen wurden einmal wöchentlich passagiert und in einem Verhältnis von 1: 4 in neue Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) überführt. Die Passage erfolgte nach einmaligem Waschen der Kulturen mit 10 ml PBS. Durch Zugabe von 3 ml einer Trypsin EDTA Lösung wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst, in 10 ml Nährmedium aufgenommen, durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette weiter dissoziiert und anschließend auf neue Kulturflaschen verteilt. Vor den Stimulationsexperimenten wurden die auf 6well oder 24well Platten ausplattiert.

### **2.1.3. Kultivierung der Chondrozyten**

Verwendet wurden Chondrozyten aus menschlichen Hüftgelenken. Diese humane Zelllinie HCH (Human Hip Joint Chondrocytes) wurden von der Firma PromoCell bezogen. Die Zellen wurden als Monolayer-Kultur bei einer Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% in Zellkulturflaschen kultiviert. Als Nährmedium diente Earle's Minimal Essential Medium (MEM), das mit 1% MEM NEAA (Non Essential Amino Acid), 1% 1 mM Natrium Pyruvat, 0,4% MEM Vitamine, 1% 200 mM L-Glutamin, 0,4% Penicillin/Streptomycin und 10% FBS-Gold (Fetal Bovin Serum)

substituiert wurde. Einmal wöchentlich wurden die Zellen gesplittet, wobei das Nährmedium mit einer sterilen Pipette abgesaugt wurde und die Zellen daraufhin mit 10 ml warmen DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) gewaschen wurden. Danach wurden die Zellen kurz mit 2 ml Trypsin EDTA gespült und für 5 Minuten bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% inkubiert, um sie dann vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml Medium aufgenommen und auf zwei Kulturflaschen mit jeweils 23 ml Medium verteilt. Bis zum erneuten Splitten oder bis zum Ausplattieren wurden die Zellen 5 Tage im Brutschrank kultiviert. Vor dem Stimulationsexperiment mussten die Zellen nochmals gesplittet werden um sie anschließend auf 6well Platten oder 24well Platten auszuplattieren.

#### **2.1.4. Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten aus peripherem Vollblut**

Die Isolierung humaner Monozyten erfolgte aus so genannten „Buffy-Coats“ gesunder Spender. Als Separationsmedium wurden Lymphozytentrennmedium (PAA) verwendet. 25 ml Blut wurde in einem Falcon Röhrchen vorsichtig über 25 ml Lymphozytentrennmedium geschichtet. Dann wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur bei 1800 rpm für 45 Minuten zentrifugiert (Megafuge 3.0 RS). Erythrozyten und Granulozyten lagerten sich so als Sediment auf dem Boden des Röhrchens ab. In der milchigen Interphase, die die Phase von der Plasma Phase trennt, reicherten sich die Lymphozyten an. Diese Lymphozytenschicht wurden vorsichtig mit einer 10 ml Pipette abgesaugt, in ein neues Falcon Röhrchen überführt und in 50 ml warmen PBS suspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 1600 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 50 ml PBS resuspendiert. Dem folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1200 rpm, 10 Minuten). Dieser Waschvorgang zur Entfernung von Zelltrümmern wurde nochmals wiederholt, dann wurde das Lymphozytenpellet in 50 ml Medium (RPMI 1640 angereichert mit 10% Humanserum, MEM Vitaminen 1%, nicht-essentiellen MEM Aminosäuren 1%, Natrium-Pyruvat 1mM, Penicillin (40 U/ml) und Streptomycin (40 µg/ml)) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Anfärben mit Türckscher Lösung (Merck) mit Hilfe der Neubauer- Zählkammer. Die Lymphozyten wurden in einer Zelldichte von 2x10<sup>6</sup>/well einer 24-well Platte ausplattiert; für 6-wells wurde etwa die fünffache Menge verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> trennten



sich die adhärennten Monozyten von den übrigen Lymphozyten. Durch Absaugen des Mediums wurde nun die restliche Lymphozytenfraktion entfernt. Zur weiteren Inkubation wurde Medium mit 1% Humanserum zugefügt. Nach ca. einer Stunde konnte die Stimulation durchgeführt werden.

### **2.1.5. Stimulationsexperimente**

Eine Stunde vor Beginn einer Stimulation wurde das Medium gewechselt. Für Western Blot Experimente wurden die Zellen in 6-well Platten kultiviert, für die Messung des PGE<sub>2</sub>, IL-1, IL-6 und TNF $\alpha$  Gehalts wurden die Zellen in 24-well Platten kultiviert. Die Zugabe eines Inhibitors erfolgte 30 Minuten (Cannabis Extrakte oder Reinsubstanzen) vor der Stimulation. Dabei wurde jeweils die Negativprobe einzig mit dem verwendeten Lösungsmittel (DMSO) und die Positivprobe nur mit dem jeweiligen Stimulans behandelt. Die Extrakte wurden in verschiedenen aufsteigenden Konzentrationen aufgetragen. Die Stimulation erfolgte dann, je nach Zellart, mit Interleukin1- $\beta$  oder mit Lipopolysacchariden (LPS). Mikrogliazellen und Monozyten wurden mit LPS stimuliert, Chondrozyten und SK-Zellen wurden mit IL-1 $\beta$  stimuliert. Diese Stimulation erfolgte dann für 30 Minuten oder 24 Stunden. Nach dieser Zeit wurde das Medium der 6-well Platten abgesaugt und diese dann, bis zur weiteren Behandlung, bei – 80°C eingefroren. Bei den 24-well Platten wurden immer nach 24 Stunden die Überstände abgetragen und diese dann, bis zur weiteren Verwendung, ebenfalls bei – 80°C eingefroren.

#### ***Interleukin 1- $\beta$***

Für die *in vitro* Versuche wurde rekombinant hergestelltes humanes IL-1 $\beta$  (Fa. Roche) verwendet. 1 internationale Einheit (IU) entspricht 20 pg IL-1 $\beta$ . In diesen Versuchen wurden Konzentrationen von 10 U/ml eingesetzt.

#### ***Lipopolysaccharide***

Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), *Salmonella Typhimurium*, Stammlösung (5 mg/ml), in diesem Versuch wurde 10ng/ml eingesetzt

### **2.1.6. Extrakte**

Unter einem Extrakt versteht man die Gesamtheit der mit Hilfe eines bestimmten Lösungsmittels (Extraktionsmittels) gewonnenen Inhaltsstoffe einer Pflanze. Aus ein und derselben Heilpflanze können völlig unterschiedliche Extrakte gewonnen werden, je nachdem, welches Lösungsmittel (beispielsweise Wasser, Alkohol oder Aceton) und welcher Pflanzenteil genutzt wird. Wurzeln können z. B. gänzlich andere Inhaltstoffe aufweisen als Blätter. Je nach Trocknungsgrad wird unterschieden zwischen dem rohen "Fluidextrakt", dem teilweise eingetrockneten "Spissumextrakt" und dem "Trockenextrakt".

Ein Spissumextrakt ist ein stark eingedampfter Flüssigextrakt er wird eingedampft und enthält dann nur noch 4% Flüssigkeit. Diese Zubereitungsform hat den Vorteil, die Heilpflanze mit ihrer ganzen Information, diese aber in hochkonzentrierter Form, in das Präparat einbringen und für den Patienten nutzbar machen zu können.

#### **Die Extrakte SE11 / SE14 / SE14h**

Die Cannabispflanzen für dieses EU-Projekt werden in Spanien gezüchtet und die Extrakte dann in England hergestellt.

Die hier verwendeten Extrakte entstammen zwei verschiedenen Pflanzenzüchtungen. Es wurde hier das ganze blühende Kraut verwendet. Extrakt SE11 enthält 0,2% THC, die Extrakte SE14 und SE14h entstammen einer Pflanze und enthalten 0,3% THC. SE14h wurde nach der Extrahierung erhitzt.

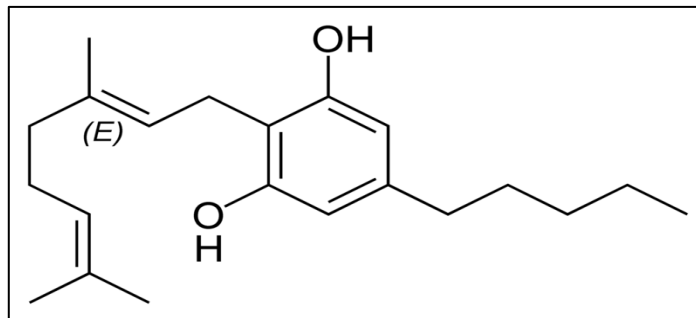
Die in dieser Arbeit verwendeten Extrakte waren Spissumextrakte.

### **2.1.7. Reinsubstanzen**

#### ***Cannabigerol (CBG)***

Als Ausgangsstoff für die Synthese der wichtigsten Cannabinoide dient das CBG, das die Hanfpflanze durch eine Synthese von Geranyl-Pyrophosphat und Olivtolsäure herstellt. Aus CBG werden CBC (Cannabichromen) und CBD (Cannabidiol) synthetisiert. Letzteres dient wiederum als Ausgangsstoff für CBN (Cannabinol) und die

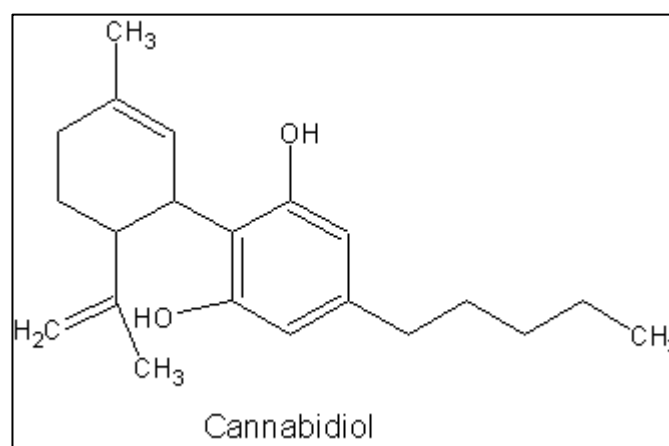
verschiedenen THC-Formen. CBG wirkt sedierend, soll den intraokularen Druck senken sowie antibiotisch wirken (Grotenhermen, 2004).



**Abb.7: Cannabigerol**

### ***Cannabidiol***

Der Gegenspieler des THC ist das Cannabidiol (CBD), das die Wirkung von THC unterdrückt. Es weist sedierende, schlafinduzierende, augeninnendrucksenkende, antiepileptische, entzündungshemmende, Brechreiz hemmende und antidystonische Effekte auf, zeigt verschiedene immunbezogene Wirkungen und antagonisiert die psychotropen Effekte des THC und es wirkt anxiolytisch (Grotenhermen, 2003; Mechoulam *et al*, 2007). CBD bindet nicht die bekannten Cannabinoid-Rezeptoren CB1 und CB2, jedoch blockiert es deren Aktivität über einen ungeklärten Mechanismus (Thomas *et al*, 2007).



**Abb.8: Cannabidiol**

## **2.2. Western Blot Analyse**

Hierfür wurden die stimulierten Zellen der 6-well Platten verwendet. Lyse-Puffer (200 µl/well) wurde auf 95°C erhitzt und dann auf den gefrorenen Zellrasen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden der Zellrasen vom Plattenboden mobilisiert. Nach Überführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß wurde das Zelllysate durch Auf- und Abziehen mit einer Pipette homogenisiert. Dann wurde das Lysat bei 95°C über 5 Minuten inkubiert um freigesetzte Proteinase irreversibel zu inaktivieren. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und eine Bestimmung der Proteinkonzentration wurde durchgeführt.

### **Lyse-Puffer:**

- 42mM Tris-HCL pH 6.8
- 1,3% SDS
- 6,5% Glycerin
- 100µM Orthovanadat

### **2.2.1. Proteinmengenbestimmungen**

Die Messung des Gesamtproteingehalts der Zelllysate erfolgte mit dem BCA Protein Assay Kit, welcher nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurde. Dieser Test basiert auf der Biuret-Reaktion, die mit einer colorimetrischen Nachweismethode gekoppelt ist. Das in der Biuret-Reaktion entstehende  $\text{Cu}^{1+}$  bildet einen Komplex mit zwei Molekülen Bicinchoninic Acid (BCA), dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden kann. Zur Ermittlung einer Standardkurve wurden aufsteigende Konzentrationen einer definierten Bovinen Serum Albumin Lösung (BSA) mitgemessen, anhand dieser die Proteinkonzentrationen der Zelllysate errechnet werden konnten.

### 2.2.2. Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. SDS ist ein anionisches Detergenz, welches mit den hydrophoben Bereichen eines Proteins interagiert. Dabei werden nicht kovalente Bindungen gelöst und das denaturierte Protein wird negativ beladen. Durch die Zugabe eines reduzierenden Agens z.B. DTT werden evtl. vorhandene Disulfidbrücken gelöst. Die so negativ beladenen und denaturierten Proteine wandern im elektrischen Feld zur Anode. In diesen Versuchen wurde ein diskontinuierliches Puffersystem nach Laemmli, (Laemmli, 1970) eingesetzt. Die Proteine wurden demnach zunächst in einem großporigen Sammelgel in einer Bande aufkonzentriert und dann in einem Trenngel in Abhängigkeit des Molekulargewichts aufgetrennt. Die Gele wurden als vertikale Flachbettgele zwischen zwei, zuvor mit Ethanol (70%) und Aceton gereinigte Glasplatten unter Verwendung von 1 mm dicken Abstandshaltern gegossen. Zunächst wurde ein Trenngel gegossen, dabei wurden Gele mit verschiedenen Porengrößen gewählt um die jeweils beste Auftrennung abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins zu erreichen. Verwendet wurden Gele mit einem Vernetzungsgrad von 7,5%, 10% bzw. 12%. Überschichtet wurde das Trenngel mit 1 ml Wasser zur Gewährleistung einer sauberen Phasengrenze. Nach der vollständigen Polymerisation des Geles wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel hergestellt. Dazu wurden 0,91 ml Acrylamid/Bis 30%, 1,75 ml Sammelgelpuffer (4x), 4,27 ml H<sub>2</sub>O, 35 µl Ammoniumsulfat (APS) 10% und 7 µl TEMED in einem Becherglas vermischt und dann über das polymerisierte Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein 1 mm dicker Kamm als Platzhalter für die Ladungstaschen eingeführt. Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels konnte dieser entfernt werden und die Taschen mit Hilfe von Filterpapierstreifen getrocknet werden. Dann erfolgte die Beladung des Gels mit den Zellysaten. Diese wurden zuvor mit 1% DTT und Bromphenolblau versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Es wurden gleiche Mengen Gesamtprotein jeder zu untersuchenden Probe aufgetragen, dabei kamen in Abhängigkeit des Ausgangsmaterials Proteinmengen von 20µg – 30µg zum Einsatz. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker, welcher ein vorgefärbtes Proteingemisch enthielt (Rainbowmarker) eingesetzt. Dieser Marker diente zur Abschätzung des scheinbaren Molekulargewichts der untersuchten Proteine. Die beladenen Taschen wurden mit Elektrophoresepuffer vorsichtig überschichtet, die

Elektrophoreseapparatur wurde zusammengebaut und das obere und untere Basin ebenfalls mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 40 mA, die Laufzeit betrug je nach Maschengröße des Gels 2.5 bis 3 Stunden und konnte an der, durch das zugegebene Bromphenolblau, sichtbaren Lauffront abgeschätzt werden.

**Trenngelpuffer (4x):**

- 1,5 M Tris-HCL pH 8.8
- 0,4% SDS

**Sammelgelpuffer (4x):**

- 0,3 M Tris-HCL pH 6.8
- 0,4% SDS

**Elektrophoresepuffer(10x):**

- 10g SDS
- 144g Glycin
- 30g Tris
- in 1 L dd H<sub>2</sub>O

	<i>Trenngel 7,5%</i>	<i>Trenngel 10%</i>	<i>Trenngel 12%</i>
<i>30% Acrylamid/Methylenbisacrylamid (1:29)</i>	<i>5,625 ml</i>	<i>7,5 ml</i>	<i>9 ml</i>
<i>Trenngelpuffer (4x)</i>	<i>5,625 ml</i>	<i>5,625 ml</i>	<i>5,625 ml</i>
<i>dd H<sub>2</sub>O</i>	<i>11,25 ml</i>	<i>9,375 ml</i>	<i>7,875</i>
<i>Ammoniumpersulfat 10%</i>	<i>0,075 ml</i>	<i>0,075 ml</i>	<i>0,075 ml</i>
<i>TEMED</i>	<i>0,015 ml</i>	<i>0,015 ml</i>	<i>0,015 ml</i>

**Tab. 2: Mischung der Gele in der Gelelektrophorese**

### 2.2.3. Semidry-Blotting

Für eine nachfolgende Proteindetektion in einem immunochemischen Verfahren mussten die Proteine aus dem Elektrophoresegel gelöst werden und auf eine geeignete Oberfläche übertragen werden. Dazu diente eine Polyvinylidene Fluoride (PDVF) Membran mit einer Porengröße von 0.45 µm. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels des Semidry-Blotting Verfahrens, dabei wurden die negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld auf die, der Anode anliegende PDVF Membran, übertragen. Die, der Größe des Gels entsprechend zugeschnittene hydrophobe PDVF Membran wurde zunächst 30 Sekunden in Methanol (100%) geschwenkt um die Oberfläche für wässrige Lösungen benetzbar zu machen und anschließend für 15 Minuten bis einer Stunde in ddH<sub>2</sub>O equilibriert. Nach Ende der Gelelektrophorese wurden die das Gel einfassenden Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt und die Membran luftblasenfrei auf das Gel überführt. Dann wurden Gel und Membran zwischen den mit Transferpuffern getränkten Filterpapieren in die Blotting-Apparatur eingelegt. Die Apparatur wurde beschwert. Für die Dauer von 75 Minuten wurde eine Spannung von 175 mA angelegt. Der Aufbau der Blotting-Apparatur erfolgte wie unten aufgeführt:

**Kathode (-)**  
**6 Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer**  
**Gel**  
**PDVF Trägermembran**  
**3 Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer 2**  
**6 -Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer 1**  
**Anode(+)**

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Taumler bzw. über Nacht bei 4°C in Blockierungs-Lösung (Roti-Block oder Milchpulver) inkubiert um unspezifische Bindungen der Membran abzusättigen.

**Kathodenpuffer**

- 0,04 ε Amino-n-capronsäure
- pH 9,4 (eingestellt mit Anodenpuffer 1)

**Anodenpuffer 2**

- 0,025 M Tris
- pH 10,4

**Anodenpuffer 1**

- 0,3 M Tris
- pH 10,4

**2.2.4. Immunodetektion**

Nach einem 15 minütigen Waschschrift in TBS-T wurden die Membranen für 2 Stunden bei Raumtemperatur bzw. bei 4 °C über Nacht auf einem Taumler mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper (AK) erfolgte entsprechend den Angaben in der Tabelle in TBS-T mit einem BSA Gehalt von 1%.

<i>Primärantikörper (Immunisierungspeptid)</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Dilution</i>	<i>scheinbares Mol WT (kDa)</i>	<i>Gel</i>
<b>anti-COX-2 (M19)</b> C-terminales Peptid der COX-2 der Ratte	Santa Cruz Biotech.	1:500	70 kDa	7,5%
<b>mPGES-1</b>	Cayman	1:500	16 kDa	12%
<b>JNK Total</b>	Cell Signal	1:1000	42/54 kDa	10%
<b>phospho p42/44</b>	Promega	1:5000	42-44 kDa	12%
<b>phospho Akt (S473)</b>	Promega	1:1000	60 kDa	10%
<b>β Aktin</b>	Sigma	1:5000	42 kDa	10%

**Tab. 3: verwendete Primärantikörper**



Die Membranen wurden dann 3 x 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish Peroxidase, HRP) gekoppelten Sekundärantikörper über eine Stunde.

Sekundärantikörper	Hersteller	Quelle	Verdünnung
<b>Anti-Ziegen IgG;</b> HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology	Esel	1:100000
<b>Anti-Kaninchen IgG;</b> HRP konjugiert	Amersham Biosciences	Esel	1: 25000

*Tab. 4: verwendete Sekundärantikörper*

Erneut folgte ein Waschschritt über 3 x 15 Minuten in TBS-T. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mit ECL (Enhanced Chemiluminescence) Western Blotting Reagenz. Diese Chemilumineszenz-Detektionsmethode basiert auf einer von der HRP katalysierten Oxidation von Luminol. Nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand und kehrt dann unter Emission eines Lichtsignals in den Grundzustand zurück. Die Membran wurde nach den Angaben des Herstellers mit der Substratlösung bedeckt und für 1 Minute inkubiert. Dann wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie eingepackt und in einer Filmkassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Autoradiographiefilm aufgelegt. Nach einer, in Abhängigkeit der verwendeten Antikörper bzw. Antikörperverdünnungen variablen Expositionszeit von 30 Sekunden bis zu mehreren Stunden, wurde der Film in einem Röntgenfilmentwickler entwickelt.

**TBS 10x:**

- 60,5 g Tris
- 87,6 g NaCl
- 1L dd H<sub>2</sub>O
- pH 7.5

**TBS-T:**

- 1xTBS
- 0,1 % Tween 20

**2.2.5. Elution/ Mehrfachmarkierung der Membran**

Eine Mehrfachmarkierung der Membran wurde durch Elution der gebundenen Antikörper ermöglicht. Die Membran wurde mit Elutionspuffer bedeckt und in einem auf 70°C erhitztem Wasserbad über 60 Minuten inkubiert. Dann wurde die Membran in Wasser (3-4mal kurz) und in TBS-T (2x 10 min) gewaschen. Eine Wiedermarkierung mittels eines neuen Antikörpers war nun möglich.

**Elutionspuffer:**

- 2,5 mM Tris-HCL, pH 6.7
- 25 SDS
- 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

**2.2.6. Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

Zur quantitativen Bestimmung der IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  Synthesen wurde ein Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) durchgeführt. Die Zellen wurden in 24-well Platten kultiviert, subkonfluente Kulturen wurden mit verschiedenen Substanzen über einen Zeitraum von 24 Stunden behandelt. Die von den Zellen während dieses Zeitraums sezernierten Interleukine konnten dann im Zellüberstand bestimmt werden. Der hier verwendete ELISA basiert auf dem Sandwich-Prinzip.

Eine Polystyren-Mikrotiterplatte wurde 16 h zuvor mit einem monoklonalen anti-IL-6, IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  Antikörper beschichtet (coating). Dann wurde die zu bestimmende Probe auf die beschichtete Platte gegeben. In den Proben vorhandenes Antigen wird von dem Antikörper gebunden, nichtgebundenes Material abgespült.

Ein biotinylierter Zweitantikörper, der gegen ein zweites Epitop des Antigens gerichtet ist, wird zugegeben, anschließend wird nicht gebundener Zweitantikörper durch Waschen entfernt. Streptavidin bindet mit hoher Affinität an Biotin, diese Eigenschaft wird zur Detektion des gebundenen Zweitantikörpers und zur Signalverstärkung genutzt. In dem hier verwendeten Test wurde ein Streptavidin-HRP-Konjugat eingesetzt. Das Enzym HRP katalysiert die Umwandlung eines Substrates in einen

wasserlöslichen Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann. Die gemessene Absorption ist dem Interleukin Gehalt der Probe proportional. Zusätzlich zu den zu bestimmenden Proben, werden Lösungen mit definiertem IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  Gehalt auf die Platte aufgetragen, die zur Erstellung einer Standardkurve dienen. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zellüberstände wurden bis zur Durchführung der Messung bei -80°C gelagert. Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

### **2.2.7. Enzyme-Immuno-Assay (EIA)**

Zur Messung der Prostaglandin E2 (PGE2)-Konzentration in den Zellüberständen wurde ein Prostaglandin E2 Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs) verwendet. Mit diesem Assay kann die Konzentration von PGE2 in Zellkulturen (Überstände) oder anderen biologischen Flüssigkeiten quantitativ bestimmt werden. Es handelt sich um einen kompetitiven Enzym-Immunoassay. Der Assay basiert auf einem Wettbewerb zwischen einer fixen Menge an alkalische Phosphatase gekoppelten PGE2 und der PGE2-Konzentration der Probe um einen monoklonalen Mausantikörper. Die Mikrotiterplatte, die mit Anti-Maus-Antikörpern beschichtet ist, bindet den F<sub>c</sub>-Teil des monoklonalen Mausantikörpers. Sowohl phosphatiertes PGE2 als auch PGE2 der Probe binden nun an den F<sub>ab</sub>-Teil des Mausantikörpers. Das ungebundene Substrat wird entfernt und eine Substratlösung dazugegeben, um die Enzymaktivität zu messen. Bei 405 nm wird die Farbentwicklung gemessen. Die Farbintensität ist invers proportional zur Konzentration des PGE2 der Probe. Der Assay wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt und ausgewertet.

## **2.3. Reagenzien und Materialien**

### **Reagenzien**

30% Acrylamid/Bis (29:1)	Biorad Laboratories, München
Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
b-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt

Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Coelbe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Dithiotreithol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
e-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Earle's Minimal Essential Medium (MEM)	PAA Laboratories, Coelbe
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Coelbe
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Humanserum	PAA Laboratories, Coelbe
L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
MEM Vitamine 100x	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
Methanol	Merck, Darmstadt
Natrium Pyruvat	PAA Laboratories, Coelbe
Natriumacid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natrium-dihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natrium Pyruvat	PAA Laboratories, Coelbe
nicht-essentielle MEM Aminosäuren (100x)	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
Pancoll (human)	PAN Biotech, Aidenbach
PBS Dulbecco's	Cell Concepts, Umkirch
Penicillin 1596 U/mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Prestained Protein MW Marker	peQLab
Roti Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco Life Technologies, Paisley, Schottland
Schwefelsäure, rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Streptomycinsulfat 761 U/mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetramethylethylendiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA Lösung	PAA Laboratories, Coelbe
Tween-20	Serva Electrophoresis GmbH
Ultra Pure H <sub>2</sub> O (U.P. H <sub>2</sub> O)	Biochrom AG, Berlin
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Western Blotting Detektionsreagenz 1+2	GE Healthcare, UK

**Tab. 5: verwendete Reagenzien**

**Stimulantien**

IL-1 $\beta$ (in vitro Experimente)	Roche, Mannheim
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Tab. 6: verwendete Stimulantien****Kommerzielle Kits**

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Prostaglandin E2 Correlate EIA Kit	Assay Designs, Ann Arbor, USA
TNF- $\alpha$ human ELISA Kit	Immunotools, Friesoythe
Human IL-1 $\beta$ ELISA Kit	Sanquin, Amsterdam, Niederlande
ECL-Detection Reagent Kit	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, GB
Human Il-6 ELISA Kit	Immunotools, Friesoythe

**Tab. 7: verwendete kommerzielle Kits****Antikörper**

anti-COX-2 (M19), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-phospho-p38 MAP Kinase, polyklonal	Cell Signalling Technology / New England Biolabs,
JNK Total	Cell Signal
phospho p42/44	Promega
phospho Akt (S473)	Promega
Anti Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
anti-Ziegen IgG, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-Kaninchen IgG, HRP konjugiert	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
mPGEs1	Cayman

**Tab. 8: verwendete Antikörper****Geräte**

Autoklav	Tecnomara, Fernwald
Brutschrank	Forma Scientific Inc., Ohio, USA
Brutschrank B SO60 EC-CO2	Heraeus Instruments, Osterode
Cleanbench HS 18	Hera Safe
ECL-Hyperfilm	GE Healthcare Limited
Elektrophorese Power Supply 600/601	Pharmacia Biotech Ltd., San Francisco, USA
Elektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech Ltd., San Francisco, USA
Elisa Reader	Molecular Device

ELISA-Mikrotiterplatten-Schüttler	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Feinwaage BP 8100	Sartorius AG, Göttingen
Filterpapier = Chromatographypaper 33 MM CHR	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtertips	Starlab GmbH
Flexi wash I Mikroplattenwasher	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Heizblock = Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Immobilion PVDF-Membran	Millipore, Bedford, USA
Lichtmikroskop	Olympus
Megafuge	Heraeus, Osterode
MikroWin Software Version 3.0	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath
Multiwell™ 6-well Zellkulturplatte	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Nunc-Microtiterplatte	Nalge Nunc International, Rochester USA
Röntgenfilmentwickler	Protoc Medizintechnik, Oberstenfeld
Scanner	Biometra, Göttingen
SDS-PAGE-Kammern (SE 400)	Pharmacia Biotech Ltd., San Francisco, USA
Taumler WT	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Video Graphic Printer UP-866 CE	Sony, Köln
Vortexer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Westernblot-System	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale (10 cm) (=Culture dish)	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
Zentrifuge 5415 C/ 5403	Eppendorf, Hamburg

**Tab. 9: verwendete Geräte**

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht ob annähernd THC-freie Cannabisextrakte in verschiedenen Zellsystemen in der Lage sind die PGE2 Synthese zu hemmen. Weiterhin wurde der Wirkmechanismus, der zu einer Hemmung führte, untersucht. Hierzu wurde überprüft, ob eine PGE2 Synthesehemmung enzymatisch, also über eine Enzymblockierung, oder transkriptionell, also über eine gehemmte Expression der Enzyme, stattfindet.

Zusätzlich zu der Untersuchung des Prostaglandin Pathways wurde auch der Effekt von Cannabis auf die Zytokine Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und den Tumornekrosefaktor $\alpha$  untersucht.

#### *3.1. Cannabis- Extrakte SE11, SE14, SE14h*

Es sollten drei Cannabisextrakte auf ihre entzündungshemmende Wirkung untersucht werden. Hierzu wurden Mikroglia, Chondrozyten, Monozyten und SK-N-H-Zellen mit drei unterschiedlichen Cannabis Extrakten (SE11, SE14, SE14h) in unterschiedlich hohen Dosierungen für 30 min vorstimuliert. Danach wurde dem mit Cannabisextrakt vorstimulierten Medium, je nach Zellart, LPS oder IL-1 $\beta$  zugegeben. Beide Stimulantien setzen einen reizenden Stimulus und fördern somit eine Entzündungsreaktion in der einzelnen Zelle. In der Zelle laufen dann Entzündungskaskaden ab und sie produziert verschiedene Entzündungsmediatoren, wie beispielsweise Prostaglandine, welche dann gemessen werden können. Pro Versuch wurden jeweils eine Negativkontrolle (neg = keine Stimulation) sowie eine Positivkontrolle (alleinige Stimulation mit LPS oder IL-1 $\beta$ ) mitgeführt. Das Medium wurde nach 30 min oder 24 Stunden abgenommen und somit die Stimulation gestoppt, anschließend wurden die Proben im Enzyme-Immuno-Assays (EIA), wie bei den Methoden beschrieben, analysiert.

Von den Western Blots wurden jeweils mindestens drei unabhängige Stimulationen und Versuche durchgeführt. Dabei wurden nur die Ergebnisse verwertet, die in jedem der drei Versuche reproduzierbar waren. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Proteinmenge in jeder Spur, wurde zusätzlich das  $\beta$ -Aktin (Housekeeping-gene) untersucht, welches

in fast jeder Zelle in gleicher Menge vorkommt. Gleichmäßige Aktin Banden bedeuten somit, dass bei der Applikation in die Gelelektrophorese immer die gleiche Menge Protein im Versuch eingesetzt wurden. Von den EIAs wurden jeweils mindestens fünf bis acht unabhängige Stimulationen und Versuche durchgeführt.

### **3.1.1. Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen**

Im Rahmen des EU-Projektes bezieht sich die Fragestellung des Freiburger Projektes, auf den Indikationsbereich Migräne und den damit zusammenhängenden entzündlichen Prozessen. Daher liegt das Hauptinteresse auf der Wirkung der Extrakte in Mikrogliazellen, einem in vitro Zell-Modell der Migräne. Mikrogliazellen werden durch alle Schädigungen und pathologischen Veränderungen, darunter neuroentzündliche Prozesse, aktiviert. Durch die Zugabe eines Lipopolysaccharids bakteriellen Ursprungs lässt sich eine Entzündung simulieren. Eine Vorstimulierung mit Cannabisextrakten und das anschließende Messen des PGE2 Gehaltes mittels EIA konnte dann die Wirkung der Extrakte auf diesen Parameter aufzeigen.

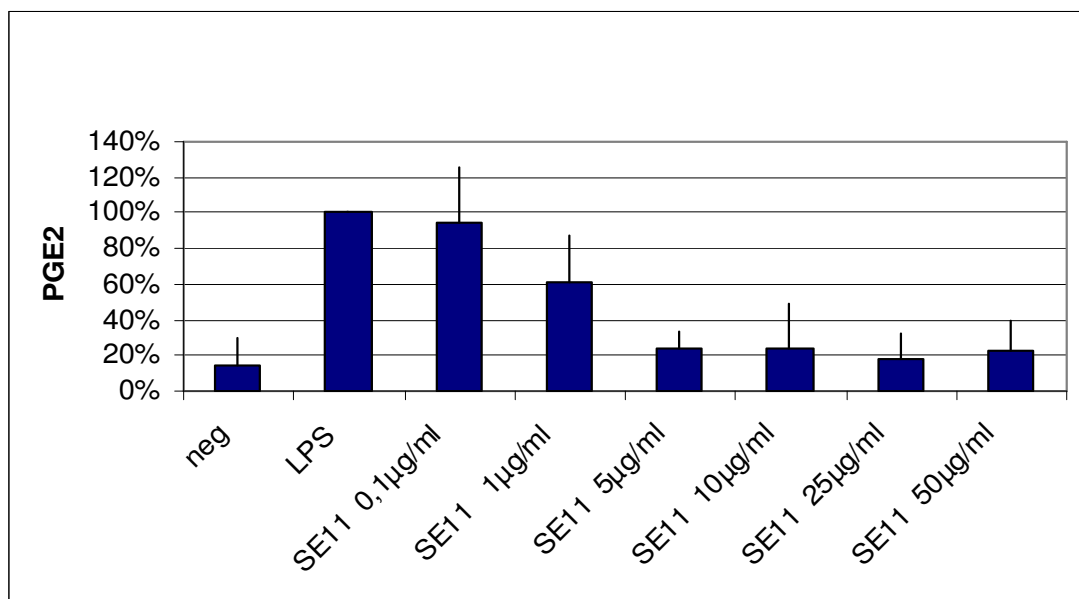
Mikrogliazellen wurden für 30 Minuten mit den Cannabisextrakten vorstimuliert, diese wurden in aufsteigender Dosierung (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) verwendet. In die Kontrolle wurde weder ein Stimulans noch ein Extrakt zugegeben, lediglich das Lösungsmittel (DMSO), in welchem die Cannabis Extrakte gelöst waren, wurde in diese Negativkontrolle (neg) pipetiert. Hier ist ein kaum zu verzeichnender PGE2 Gehalt erkennbar. Diese Kontrolle ist nötig um den Zustand der nicht stimulierten Zellen zu untersuchen. Die Positivkontrolle hingegen enthält LPS, um die Induzierbarkeit der Zellen zu überprüfen. Ein starker Anstieg von PGE2 zeigt hier die Funktionstüchtigkeit der Zellen.

Nach der 30 minütigen Vorstimulation wurden die Zellen mit LPS über 24 Stunden stimuliert. Dann wurde mit einem EIA der PGE2 Gehalt im Überstand bestimmt. Diese Untersuchung wurde jeweils acht Mal durchgeführt. Mit sechs verschiedenen Mikroglia Kulturen.



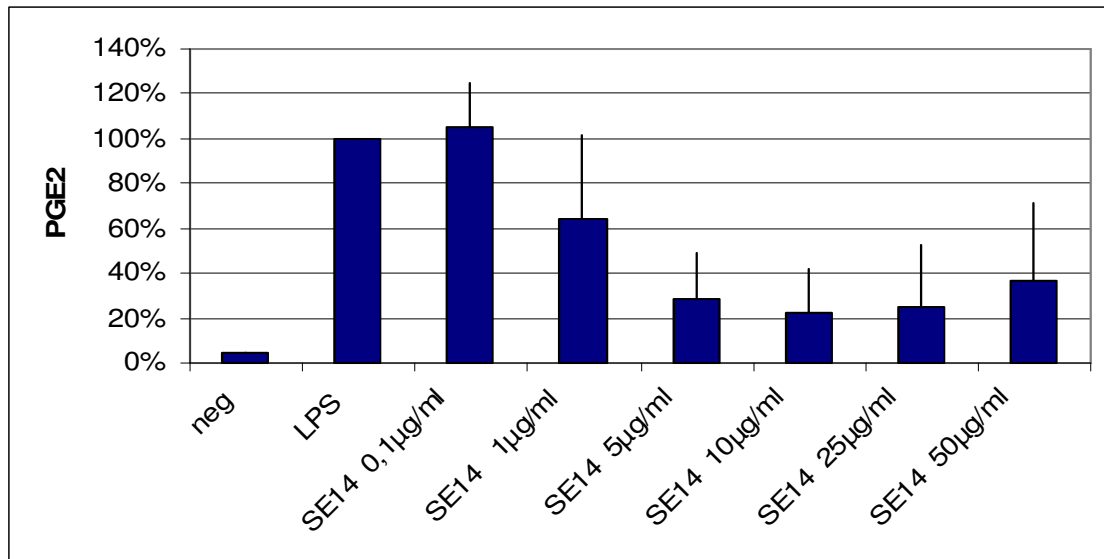
Bei allen drei Extrakten ist eine deutliche Hemmung der PGE2 Konzentration mit steigender Dosierung der Cannabisextrakte zu erkennen.

Wie in den Abbildungen 8-10 gezeigt hemmen die Extrakte SE11, SE14 und SE14h die LPS-induzierte PGE2 Freisetzung. Die Inhibition beginnt mit 1 µg/ml und erreicht ihr Maximum bei 5 – 10 µg/ml. Bei den Extrakten SE14 und SE14h ist ab einer Konzentration von 50 µg/ml ein leichter Anstieg der PGE2 Freisetzung zu verzeichnen.



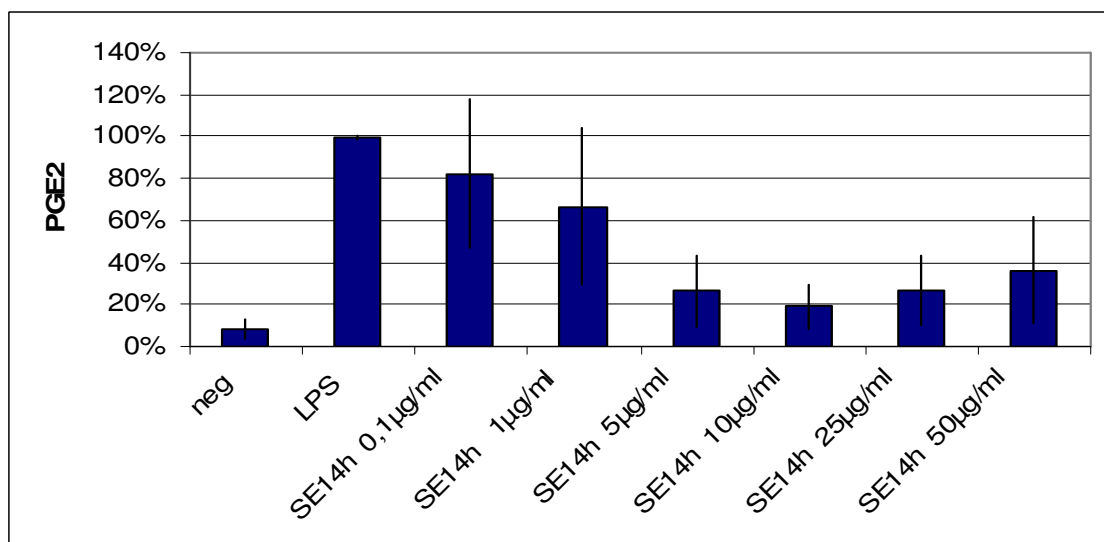
**Abb.9: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen**

Die Mikroglia wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24 h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen.



**Abb.10: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen**

Die Mikroglia wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24 h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

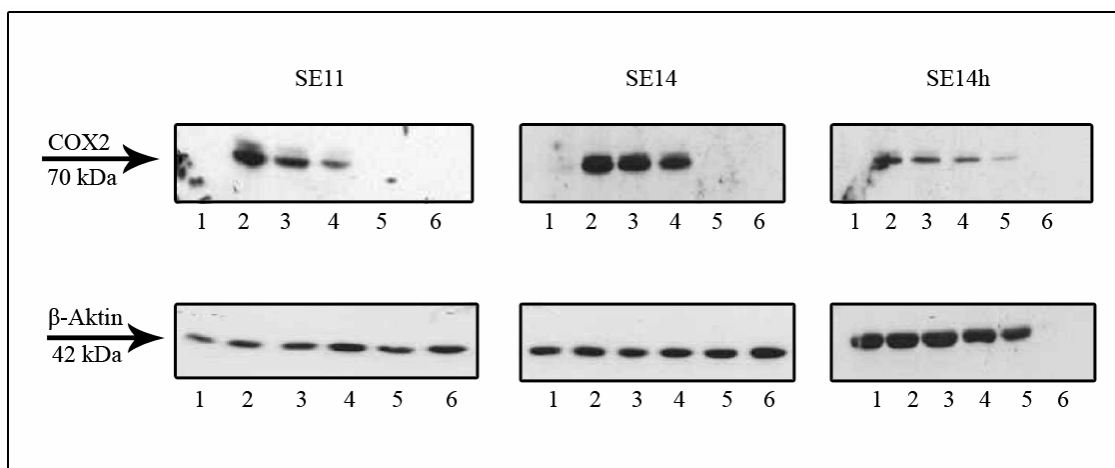


**Abb.11: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen**

Die Mikroglia wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24 h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

### 3.1.2. Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen

Nachdem eine Hemmung der LPS-induzierten PGE<sub>2</sub> Synthese durch die Cannabisextrakte nachweisbar war, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, ob sich die Hemmung der PGE<sub>2</sub> Freisetzung auf transkriptioneller oder auf enzymatischer Ebene abspielt. Hierzu wurden Western Blots durchgeführt. Zunächst sollte die Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Proteinsynthese untersucht werden. Auch hier wurde ein Teil der Zellen, für eine Negativkontrolle (neg), gar nicht behandelt und ein weiterer Teil, für eine Positivkontrolle, nur mit dem Stimulans (LPS) behandelt. Wie in Abbildung 11 gut zu erkennen ist, reduzieren alle drei Cannabisextrakte im Western-Blot die COX-2 Proteinmenge. In der ersten Bande ist kein Signal zu erkennen, das heißt, dass in den unbehandelten Zellen kein Cyclooxygenase-2 Protein nachweisbar ist. Die Positivkontrolle hingegen (Bande 2) zeigt eine deutliche Induktion der COX-2 Protein-Produktion. Mit steigender Extrakt dosierung wird die COX-2 Synthese gehemmt. Der Vergleich der COX-2 Banden mit den  $\beta$ Aktin-Banden zeigt, dass bei Extrakt SE14h in der höchsten Dosierung (50  $\mu$ g/ml) offensichtlich kein Protein mehr vorhanden ist. Die Extrakte SE11 und SE14 zeigen schon ab 1  $\mu$ g/ml eine Hemmung und ab 25  $\mu$ g/ml ist kein COX-2 mehr sichtbar.



**Abb.12: Inhibition der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Mikrogliazellen durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1  $\mu$ g/ml, Bande 4 = 10  $\mu$ g/ml, Bande 5 = 25  $\mu$ g/ml, Bande 6 = 50  $\mu$ g/ml.

Um nun zu untersuchen welche Signaltransduktionskaskade der LPS-induzierten COX-2 Expression beeinflusst wird, wurde die Aktivität verschiedener Proteinkinasen untersucht. Dabei wurden Antikörper verwendet, die den phosphorylierten und damit aktivierten Zustand der Kinasen anzeigt. Es wurden die JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase), p38, phospho Akt (keine Kinase) und p42/44 untersucht.

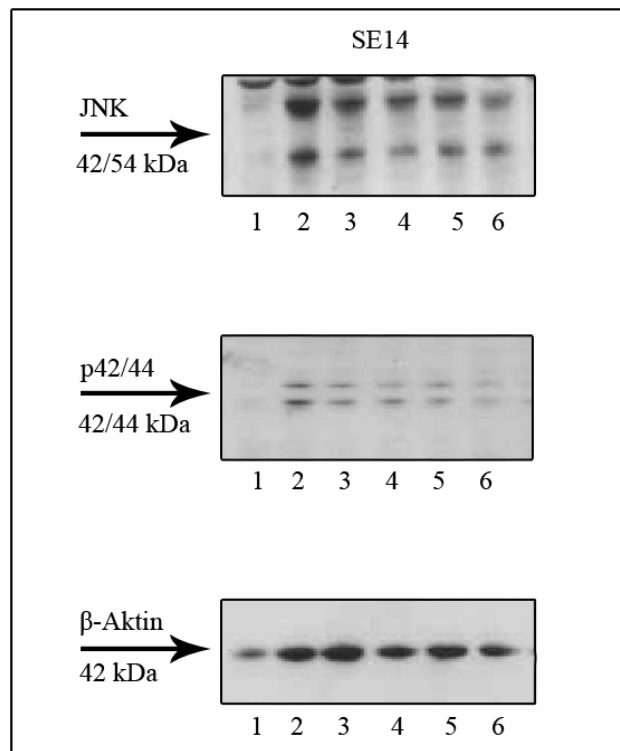
Außerdem wurde noch iNOS (induzierbare NO-Synthase), welche durch LPS induziert wird, untersucht. Das von ihr produzierte Stickstoffmonoxid dient z.B. den Makrophagen zur Immunabwehr.

Für diese Versuche wurde nur noch Extrakt SE14 verwendet, da von den beiden anderen Extrakten nicht genügend zur Verfügung stand. Außerdem zeigten schon die vorhergegangenen Untersuchungen, dass sich hier keiner der Extrakte in seiner Wirkung signifikant hervorheben lässt.

Extrakt SE14 zeigte in LPS-induzierten Mikroglia keine Wirkung auf die Kinasen p38, phospho Akt und INOS.

Die Kinasen JNK (c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/ stress-activated protein kinase) und die p42/44 Kinase welche zum ERK/MAPK Weg gehört, wurden in LPS-induzierten Mikrogliazellen durch den Cannabisextrakt SE14 gehemmt (Abbildung 12).

Stimulation mit LPS führt zu einer Phosphorylierung von Kinasen, in diesem Fall von JNK und ERK. Wie in Abb. 12 zu erkennen, werden diese bereits ab einer Extrakt dosierung von 1 µg/ml inhibiert.



**Abb.13: Cannabisextrakt SE14 inhibiert in LPS-induzierten Mikroglia die Kinasen JNK und p42/44**

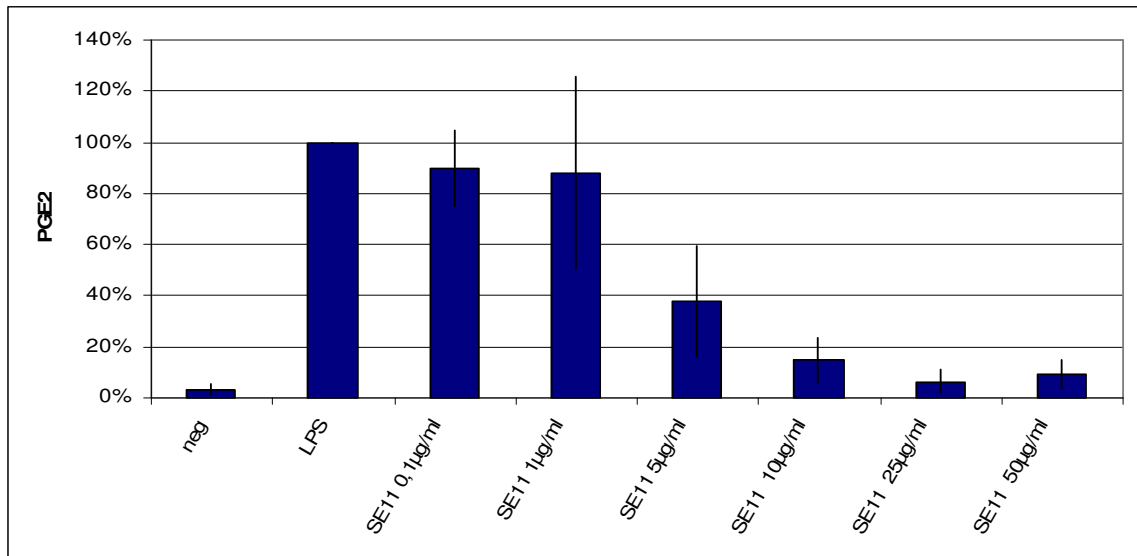
Beeinflussung der LPS-induzierten p42/44 ERK/MAPK und der JNK durch den Extrakt SE14  
Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1 µg/ml, Bande 4 = 10 µg/ml, Bande 5 = 25 µg/ml, Bande 6 = 50 µg/ml.

### **3.1.3. Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Monozyten**

Erst wurde untersucht, ob die Cannabisextrakte auch in Monozyten eine Hemmung der LPS-induzierten PGE2 Konzentration bewirken. Diese Untersuchung wurde insgesamt 7-8mal durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 6 verschiedene Buffy-Coates verwendet und 9 Stimulationen durchgeführt.

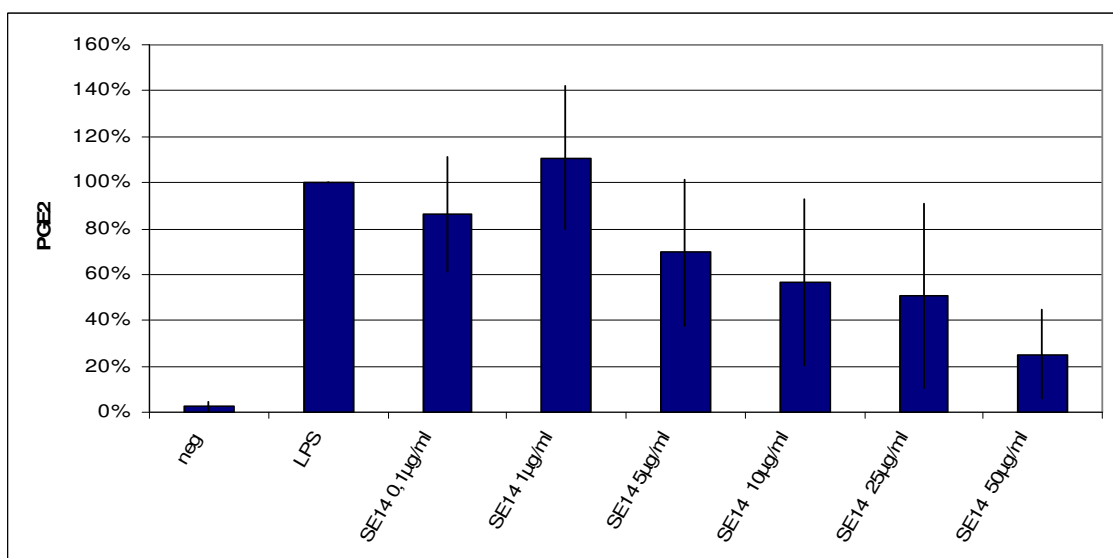
Auch in den Monozyten zeigen die Cannabisextrakte eine PGE2 Synthese hemmende Wirkung. Extrakt SE11 zeigt hier eine deutliche Hemmung ab 5 µg/ml. Der PGE2 Gehalt nimmt mit steigender Cannabis Dosierung gleichmäßig ab. Das Maximum

der Inhibition ist bei 25 µg/ml erreicht. Extrakt SE14 zeigt auch ab 5 µg/ml eine erste deutliche Hemmung, sein Maximum liegt bei 50 µg/ml. Extrakt SE14h zeigt ebenfalls eine erste deutliche Hemmung der PGE2 Synthese bei 5 µg/ml. Seine Maximale Hemmung liegt bei 25 µg/ml.



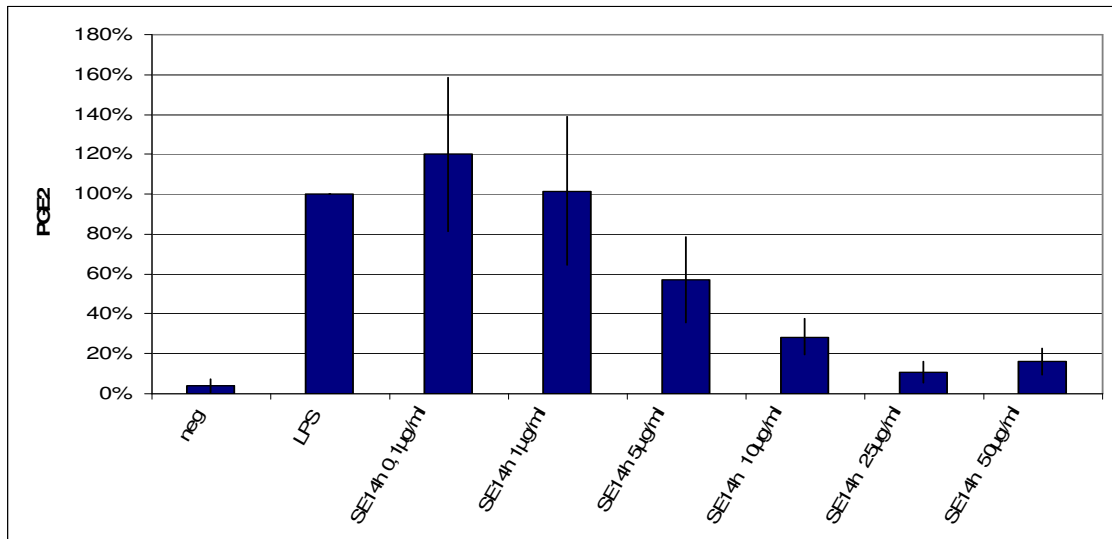
**Abb.14: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen.



**Abb.15: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen.



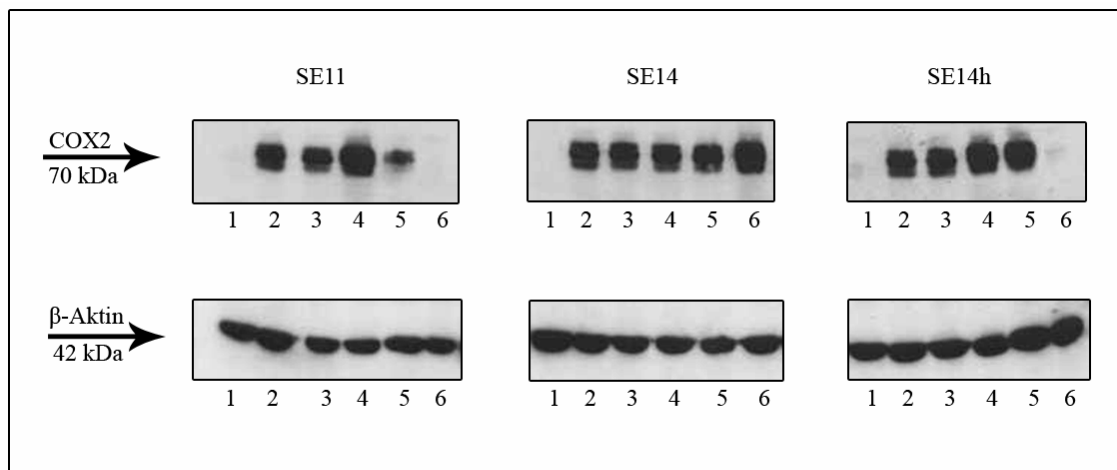
**Abb.16: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen.

### 3.1.4. Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Monozyten

Um auch bei den Monozyten den Wirkmechanismus der PGE2 Hemmung zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Es wurde die Beeinflussung der COX-2 Synthese durch die Cannabisextrakte getestet. Dabei wurden mindestens drei Western Blots durchgeführt und es wurden drei unterschiedliche Buffy-Coates verwendet.

In den Monozyten lässt sich keine eindeutige Inhibition der COX-2 ausmachen. Die Extrakte SE11 und SE14h zeigen bei 10 µg/ml eine Induktion. Ab 25 µg/ml ist bei Extrakt SE11 eine Hemmung zu erkennen. Extrakt SE14h zeigt auch bei 25 µg/ml eine Induktion. Die fehlende Bande in der höchsten Konzentration bei den Extrakten SE11 und SE14h deutet in diesem Falle auf eine komplette Hemmung hin. Dies lässt sich durch die vorhandenen Aktin Banden feststellen. Es lässt sich bei Monozyten eher eine Tendenz zu einer Induktion der COX-2 erkennen.



**Abb.17: Reaktion der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Monozyten durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1 µg/ml, Bande 4 = 10 µg/ml, Bande 5 = 25 µg/ml, Bande 6 = 50 µg/ml.

### 3.1.5. Wirkung der Cannabisextrakte auf die Zytokin Synthese von LPS-induzierten Monozyten

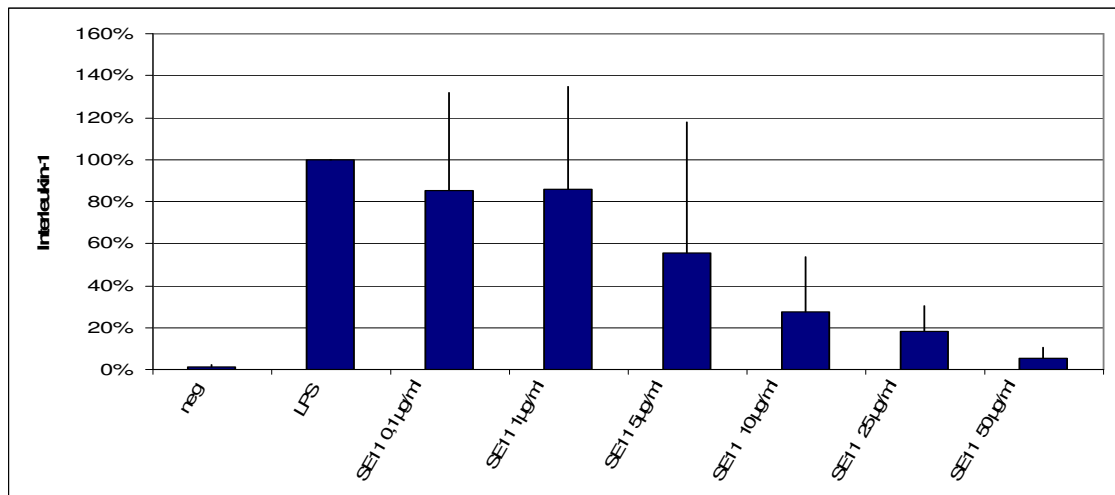
Anschließend zu diesen Versuchen wurden LPS-induzierte und mit Cannabisextrakten inkubierte Monozyten auf ihren Gehalt an Interleukin-1, Interleukin-6 und dem Tumornekrosefaktor $\alpha$  im Überstand, mittels Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA) untersucht.



### Interleukin -1 $\beta$

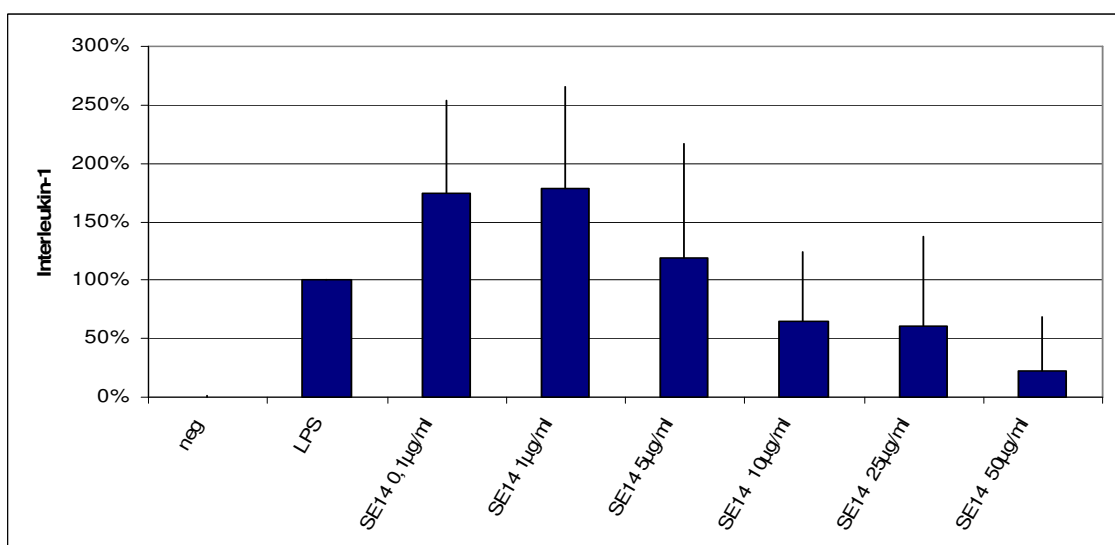
Wie in Abb. 17-19 zu erkennen ist hemmen alle drei Cannabisextrakte die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten.

Die erste signifikante hemmende Wirkung ist bei den Extrakten bei 10  $\mu\text{g/ml}$  zu verzeichnen. Mit steigender Dosierung der Extrakte sinkt der IL-1 Gehalt weiter. Hier lässt sich ein leichter Anstieg der IL-1 bei den niedrigen Extraktdosierungen erkennen.



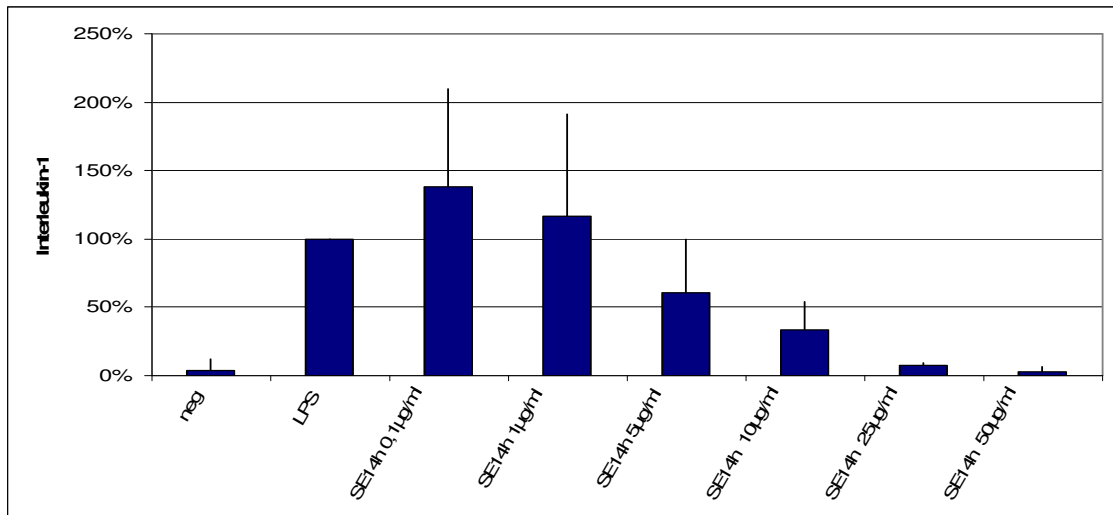
**Abb.18: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10  $\text{ng/ml}$ ) stimuliert und nach 24h wurde der IL-1 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.



**Abb.19: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10 ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-1 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

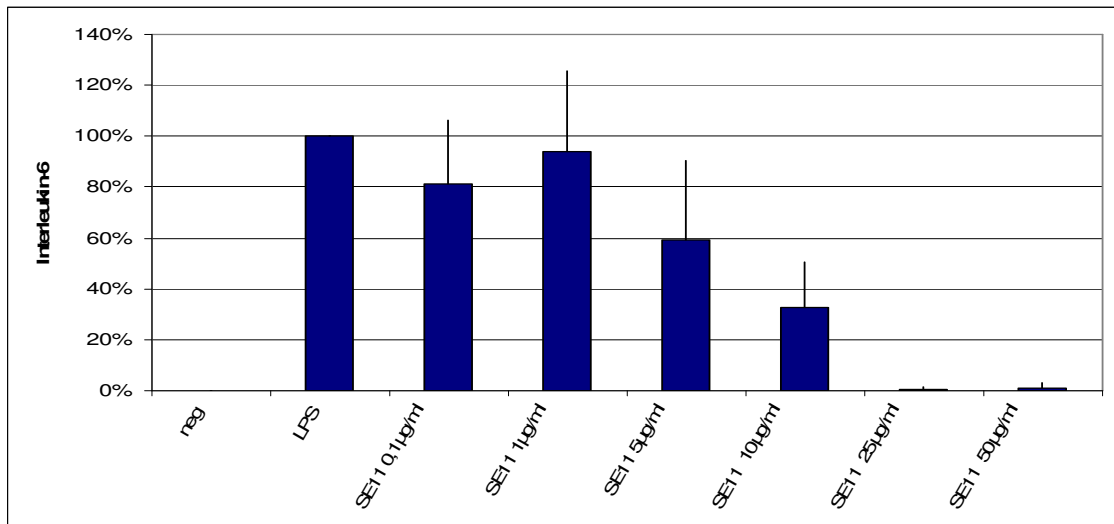


**Abb.20: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10 ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-1 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

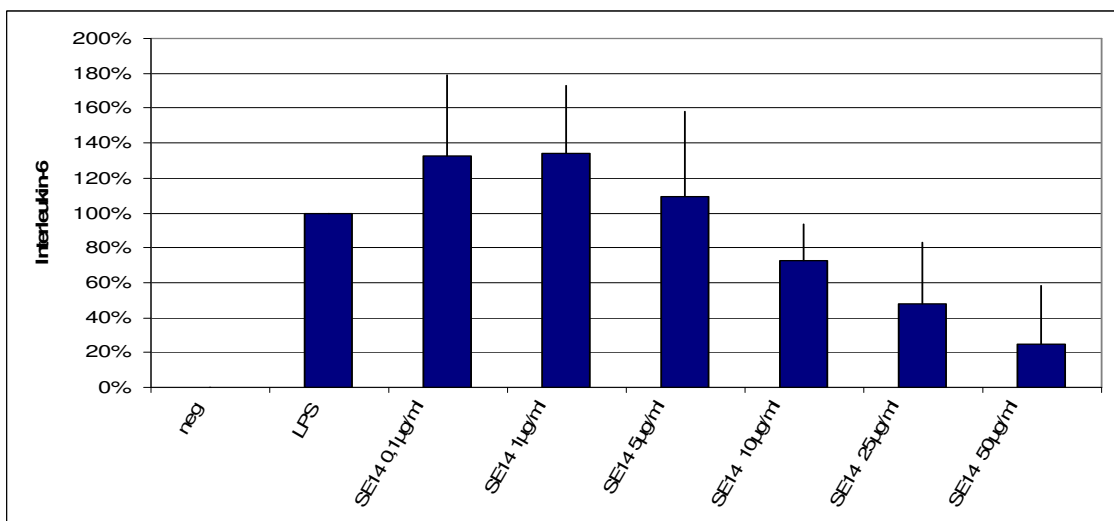
### Interleukin-6

Auch IL-6 wird durch die Extrakte gehemmt. Eine erste deutliche Hemmung des Interleukin-6 ist ab einer Extraktdosierung von 10 µg/ml zu sehen. Extrakt SE11 und SE14h zeigen dann nochmals ein deutliches Absinken der IL-6 Konzentration bei den nächst höheren Extraktdosierungen (25 µg/ml, 50 µg/ml). Bei einer Inkubation der Monozyten mit Extrakt SE14h kann in diesen beiden Dosierungen keinerlei IL-6 mehr gemessen werden.



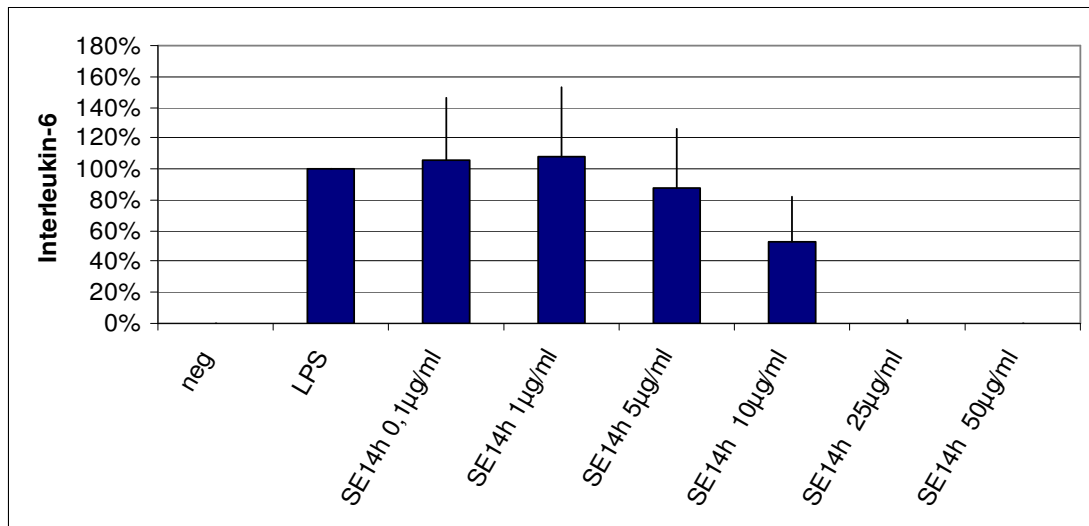
**Abb.21: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-6 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.



**Abb.22: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-6 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

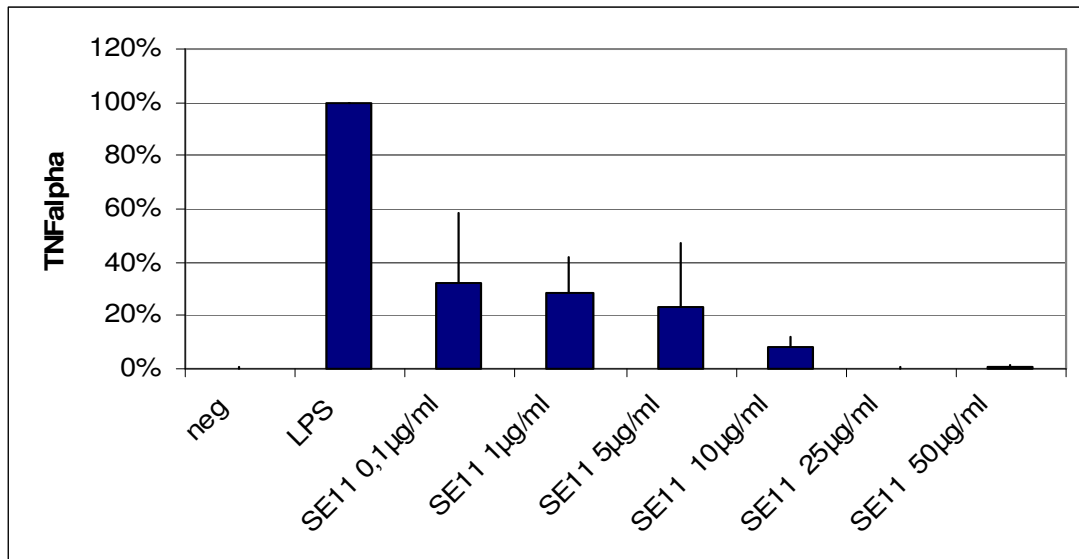


**Abb.23: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-6 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

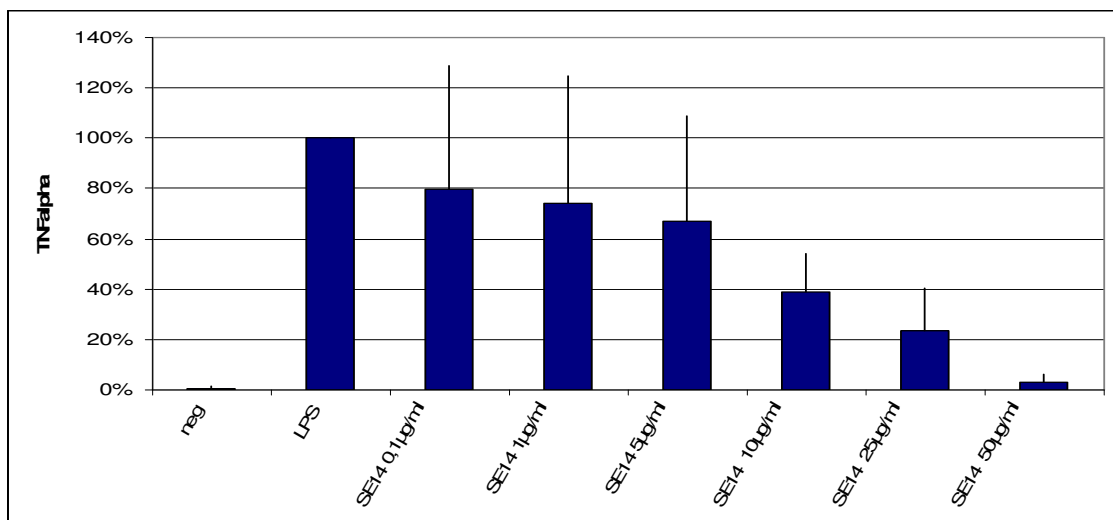
### **Tumornekrosefaktor $\alpha$**

Bei der Messung des TNF $\alpha$  sind die Ergebnisse sehr unterschiedlich. Die Extrakte SE11 und SE14h zeigen schon bei 0,1 µg/ml eine starke Hemmung des TNF $\alpha$ , wohingegen Extrakt SE14 eine langsame aber stetige Abnahme des TNF $\alpha$  aufzeigt und erst ab 10 µg/ml eine deutliche Hemmung zu erkennen ist. Eine signifikante Inhibition des TNF $\alpha$  lässt sich bei Extrakt SE14 in den Dosierungen 25 µg/ml und 50 µg/ml darstellen.



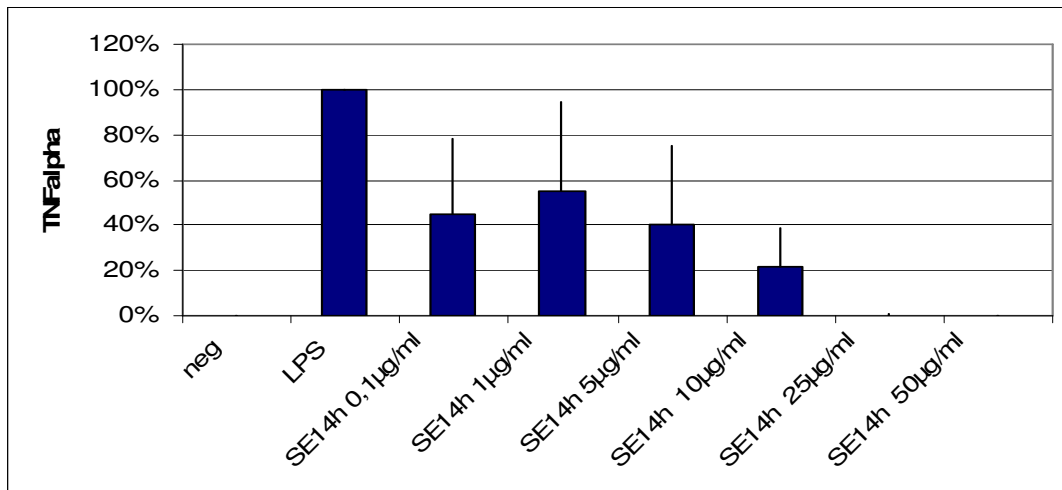
**Abb.24: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor-Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der TNFalpha Gehalt aus dem Überstand im EILISA gemessen



**Abb.25: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor-Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der TNFalpha Gehalt aus dem Überstand im EILISA gemessen



**Abb.26: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor-Synthese in Monozyten**

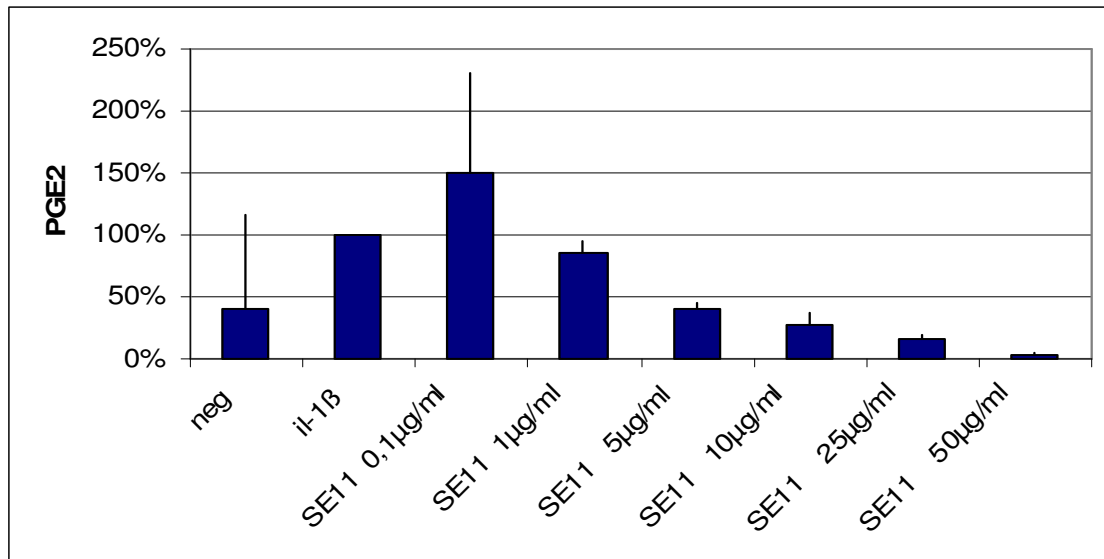
Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der TNFalpha Gehalt aus dem Überstand im EILISA gemessen

### 3.1.6. Wirkung der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten Chondrozyten

Weiterhin wurden die Extrakte auf ihre Wirkung auf die PGE2 Synthese an Chondrozyten untersucht. Diese Versuche wurden jeweils fünfmal durchgeführt. Es wurden zwei verschiedenen Zell-Linien und Stimulationen verwendet.

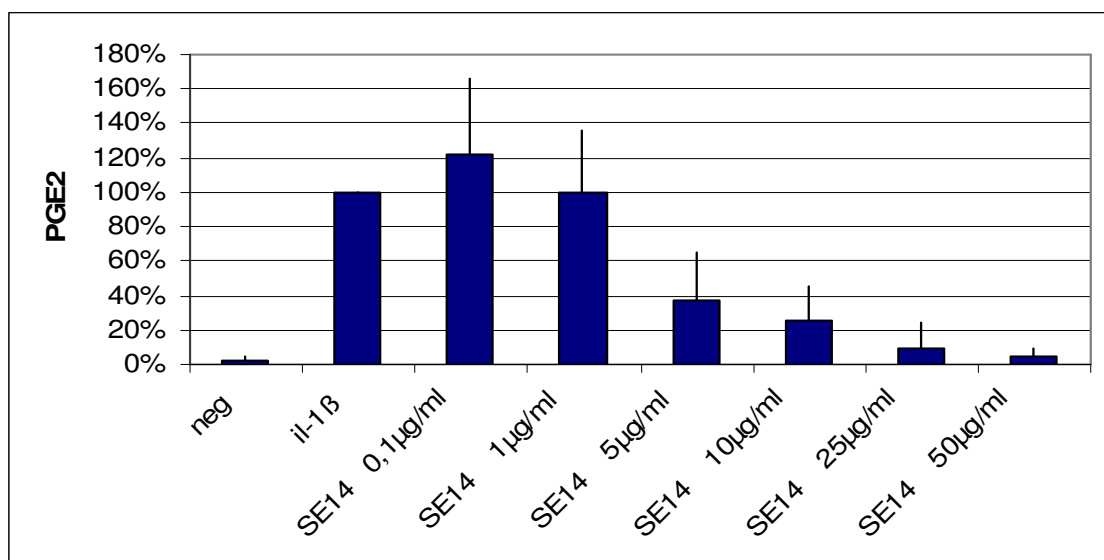
Die Extrakte bewirken auch in den Chondrozyten eine Hemmung der PGE2 Synthese. Alle drei Extrakte zeigen eine signifikante Inhibition der PGE2 ab einer Dosierung von 5 µg/ml. Mit steigender Extrakt dosierung nimmt die PGE2 immer weiter ab, somit ist hier das Maximum bei 50 µg/ml.

In den Chondrozyten konnte außerdem ein Anstieg der PGE2 in den niedrigen Extrakt dosierungen (0,1 µg/ml) ausgemacht werden.



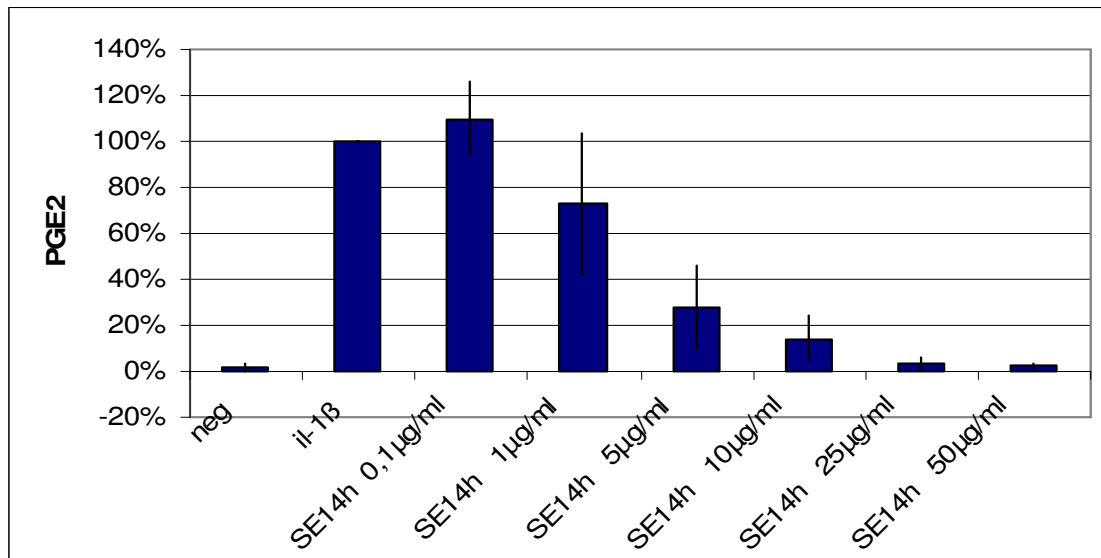
**Abb.27: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten**

Die Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



**Abb.28: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten**

Die Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



**Abb.29: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten**

Die Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

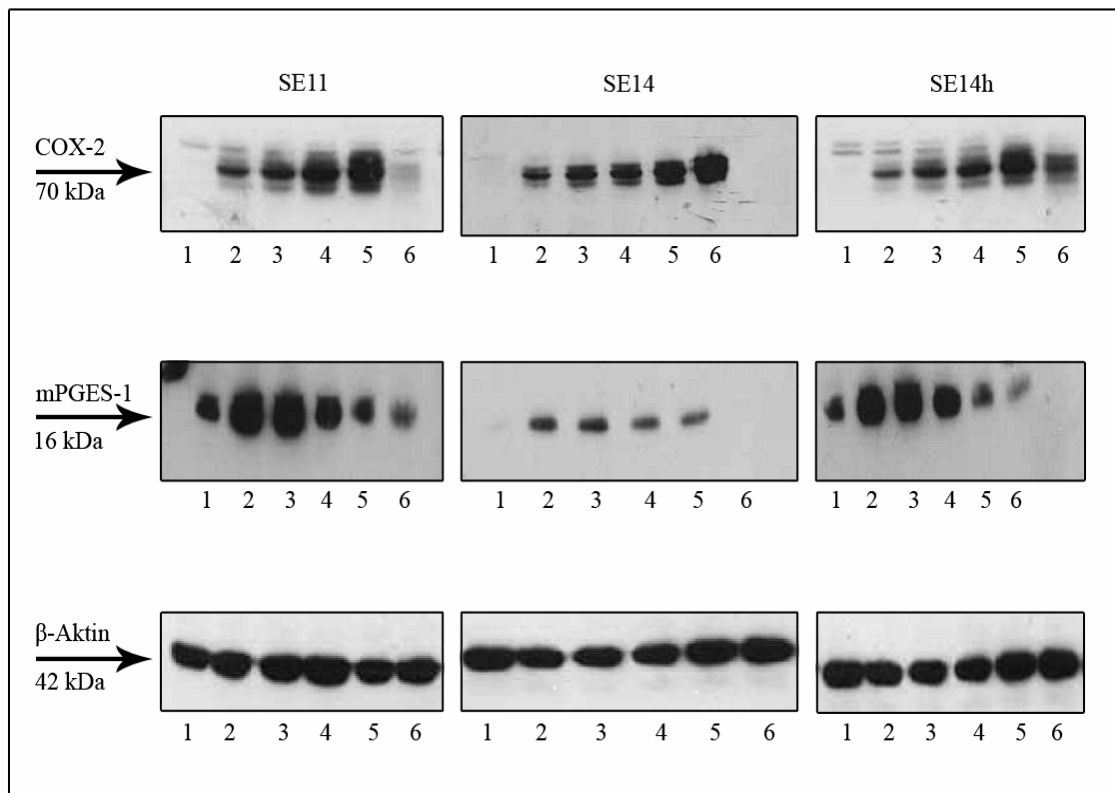
### 3.1.7. Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von IL1- $\beta$ - induzierten Chondrozyten

Auch hier wurden, um die Protein-Ebene zu untersuchen, Western Blots (COX-2) durchgeführt. Diese wurden ebenfalls dreimal angefertigt. Es war jeder Versuch zweimal reproduzierbar.

Im Versuch mit den Chondrozyten ist eine eindeutige Steigerung der IL-1 $\beta$  induzierten COX-2 Synthese mit ansteigender Konzentration der Cannabisextrakte zu erkennen. Da somit die PGE2 Hemmung nicht über die Regulation der COX-2 Synthese läuft, wurde nun eine zweite Western Blot Untersuchung gemacht. Diesmal wurde mPGES-1 als Antikörper verwendet. mPGES-1 ist eine PGE-Synthase, die den Schritt von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> synthetisiert. Hat also die PGE<sub>2</sub> Hemmung nicht über eine Regulation der COX-2 stattgefunden, so besteht die Möglichkeit, dass diese durch eine Hemmung der mPGES-1 reguliert wird. Dies konnte im Versuch mit den Chondrozyten bestätigt



werden. Alle drei Extrakte bewirken eine Inhibition der IL-1 $\beta$  induzierten mPGES-1 Synthese. Die IL-1 induzierte COX-2 Synthese wird dagegen in den Chondrozyten nicht gehemmt sondern eher verstärkt.

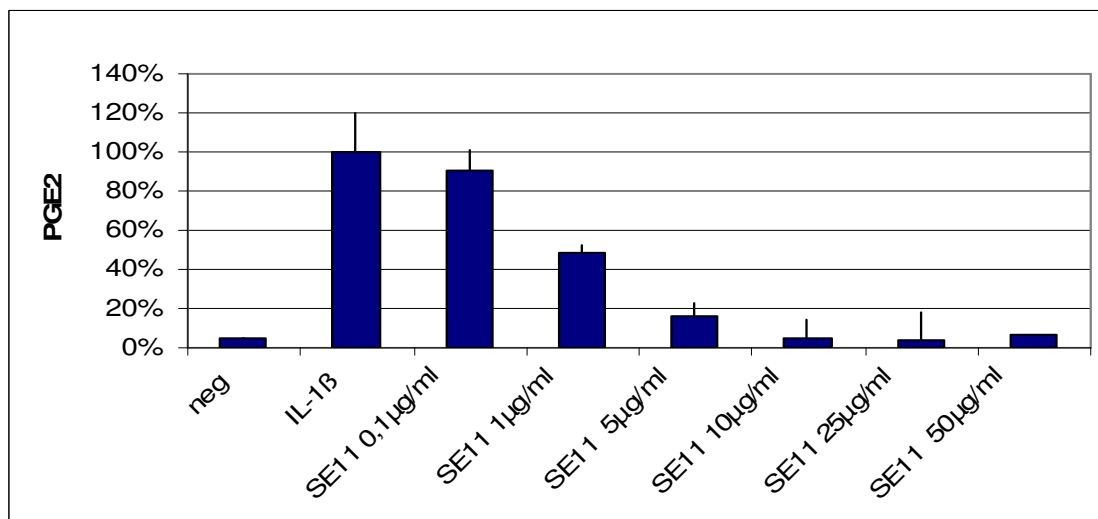


**Abb.30: Inhibition der IL-1 $\beta$  induzierten mPGES1 Synthese in Chondrozyten durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot, bei gleichzeitiger Expression der COX-2 Synthese durch Cannabisextrakte**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1  $\mu$ g/ml, Bande 4 = 10  $\mu$ g/ml, Bande 5 = 25  $\mu$ g/ml, Bande 6 = 50  $\mu$ g/ml.

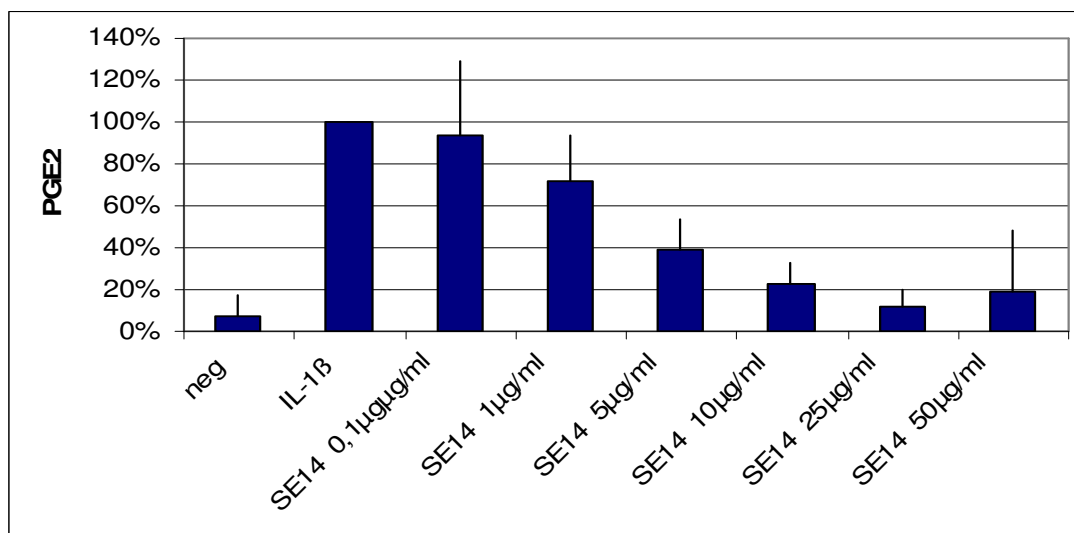
### 3.1.8. Wirkung der Cannabisextrakte auf die PGE2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen

Auch in den SK-Zellen zeigen die drei Cannabisextrakte eine deutliche Hemmung der PGE2 Konzentration. Die Extrakte SE14 und SE14h zeigen ihre erste signifikante Hemmung bei 5  $\mu$ g/ml. Ein Maximum wird bei 25  $\mu$ g/ml erreicht. Bei Extrakt SE11 lässt sich eine erste signifikante Hemmung schon bei 1  $\mu$ g/ml ausmachen.



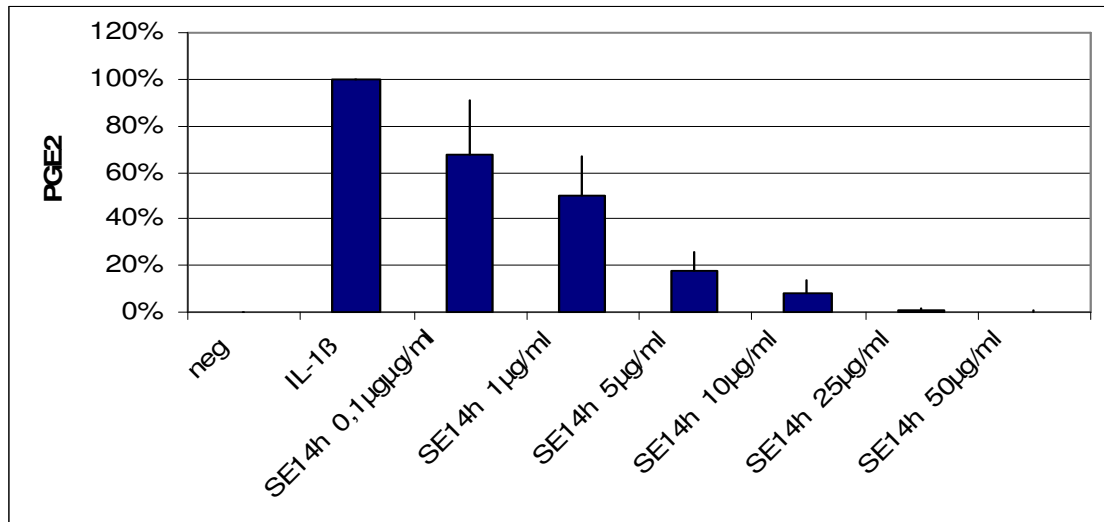
**Abb.31: Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen**

Die SK-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE11 in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



**Abb.32: Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen**

Die SK-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14 in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



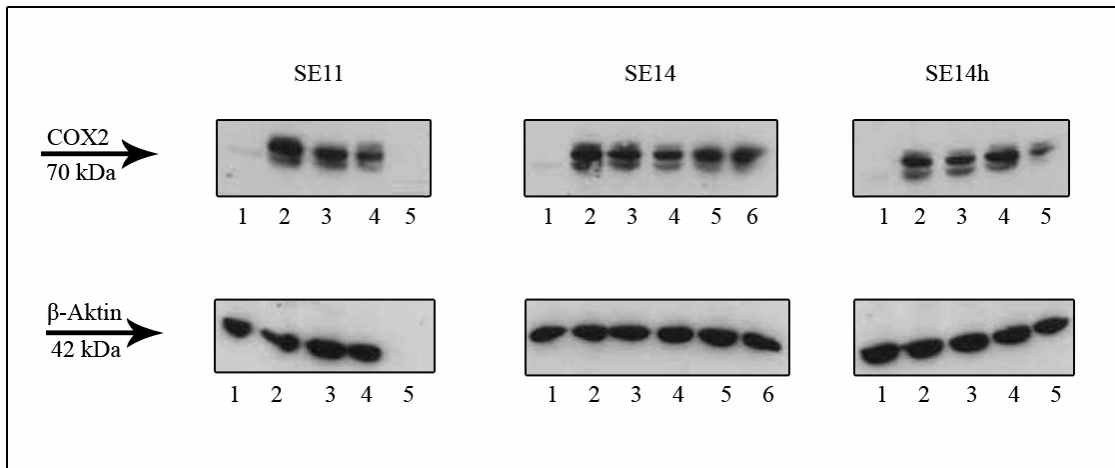
**Abb.33: Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen**

Die SK-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit dem Cannabisextrakt SE14h in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

### 3.1.9. Wirkung der Cannabisextrakte auf die COX-2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen

Um auch hier den Wirkmechanismus der PGE2-Synthese-Hemmung durch die Cannabisextrakte besser einschätzen zu können, wurden entsprechend Western Blots mit dem Antikörper COX-2 durchgeführt.

In den IL-1 $\beta$  induzierten SK-N-H Zellen konnte in den Extrakten ab 10  $\mu$ g/ml eine Hemmung aufzeigen. Die Ergebnisse waren allerdings nicht sehr eindeutig. Im diesem Falle wurden aus zeitlichen Gründen keine Wiederholungen angefertigt.



**Abb.34: Reaktion der IL-1 $\beta$  induzierten COX-2 Synthese in SK-N-H Zellen durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot**

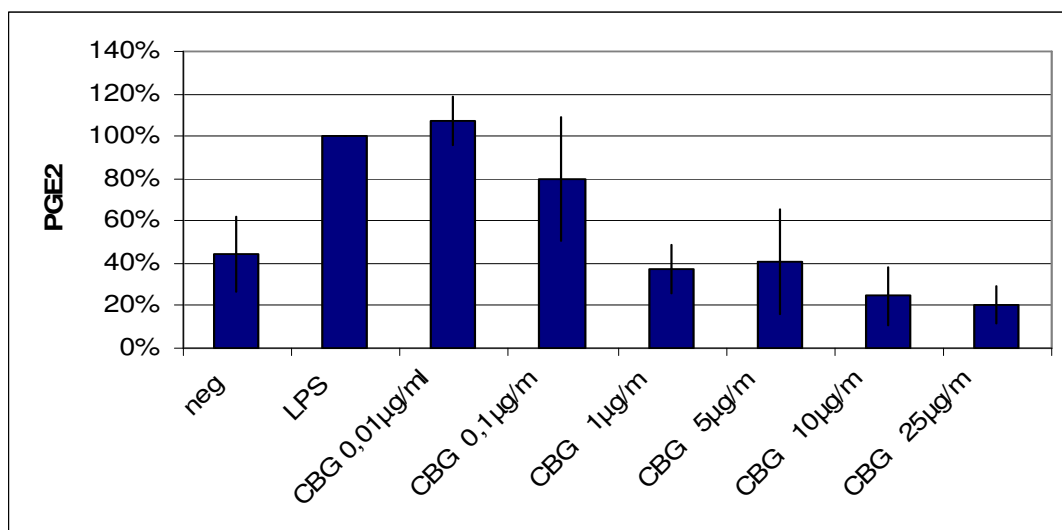
Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 4 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 5 = 25  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 6 = 50  $\mu\text{g/ml}$ . Da hier bereits in der Proteinbestimmung, bei Extrakt SE11 und Extrakt SE14h, die Menge des Proteins der mit 50  $\mu\text{g/ml}$  behandelten Zellen so gering war, konnten diese Proteine nicht mehr für die Gelelektrophorese verwendet werden.

### 3.2. Cannabis Reinsubstanzen - Cannabigerol und Cannabidiol

Nachdem der entzündungshemmende Effekt der Cannabisextrakte und sein Weg über die PGE2 Hemmung, zellenabhängig entweder über die COX-2 oder die mPGES-1 Synthese-Hemmung, belegt war, stellte sich nun die Frage welcher der Hauptkomponenten der Extrakte mit für diesen Effekt zuständig ist. So wurden zwei Reinsubstanzen, die in großen Mengen in den Extrakten vorhanden sind, ebenfalls an allen Zellen getestet. Es wurden Cannabigerol (CBG) und Cannabidiol (CBD) untersucht.

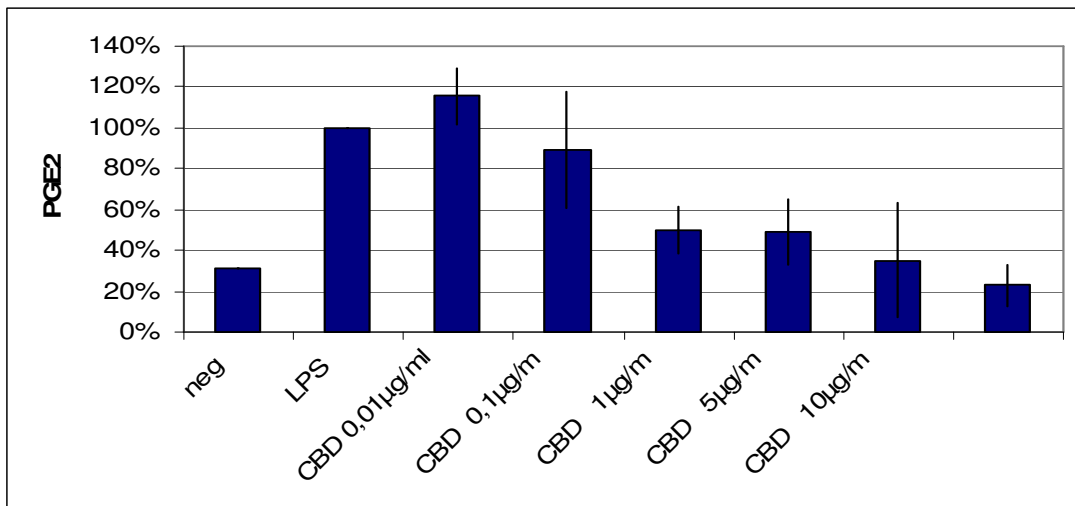
### 3.2.1. Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen

Auch Cannabigerol und Cannabidiol hemmen die LPS-induzierte PGE2 Produktion in Mikroglia. Hier konnte, ähnlich der Wirkung auf Chondrozyten, eine Zunahme der PGE2 Konzentration bei dem niedrigsten Cannabinoidgehalt festgestellt werden. Ab einer Cannabinoiddosis von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  konnte eine Inhibition der PGE2 Synthese ausgemacht werden. Ab einer Dosis von 1  $\mu\text{g/ml}$  ist eine signifikante Hemmung zu erkennen.



**Abb.35: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen**

Die Mikrogliazellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



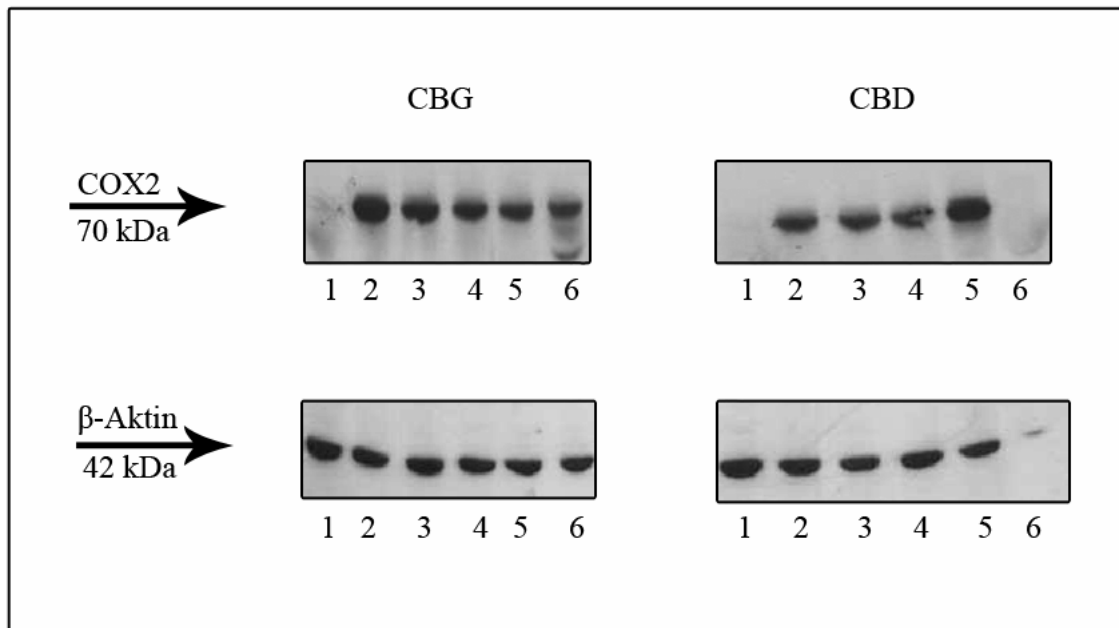
**Abb.36: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen**

Die Mikrogliazellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

### 3.2.2. Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Mikrogliazellen

Um hier den Wirkmechanismus der PGE2 Synthesehemmung zu bestimmen, wurden Westen Blots durchgeführt. Es wurde die COX-2 Synthese nach Stimulation mit den Cannabinoiden getestet.

Im Falle der Western Blot Untersuchung waren die Ergebnisse, der Reinsubstanzen, nicht so aussagekräftig wie die Ergebnisse der Extrakte. Cannabigerol zeigte eine leichte Hemmung der COX-2 Synthese, Cannabidiol zeigte auch in allen Wiederholungen keine eindeutige Reaktion, aber eher eine verstärkte COX-2 Synthese.



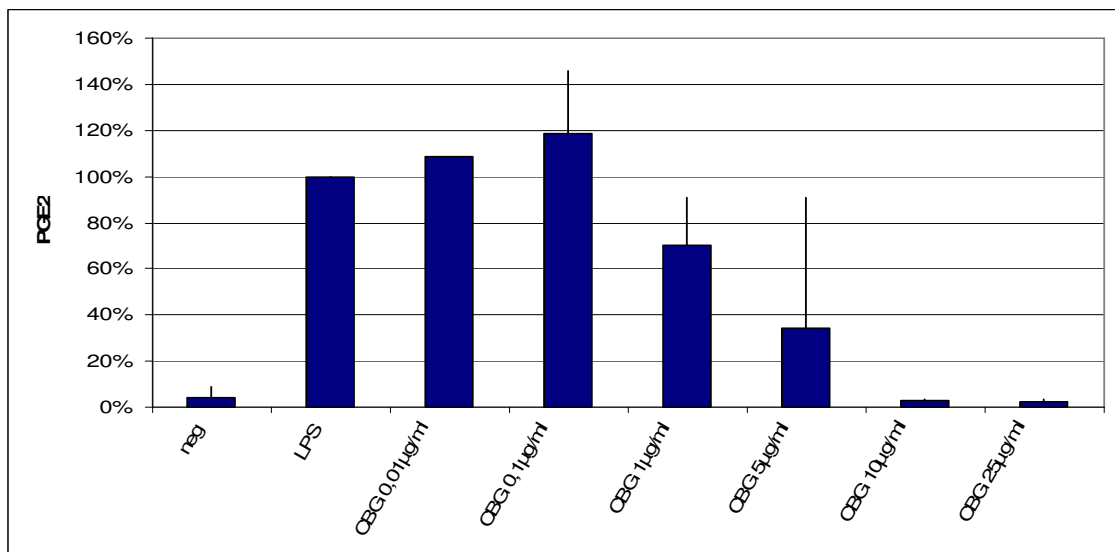
**Abb.37: Reaktion der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Mikroglia durch Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, im Western Blot**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1 µg/ml, Bande 4 = 10 µg/ml, Bande 5 = 25 µg/ml, Bande 6 = 50 µg/ml. CBG zeigt eine Hemmung der COX-2 Synthese.

### 3.2.3. Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von LPS-induzierten Monozyten

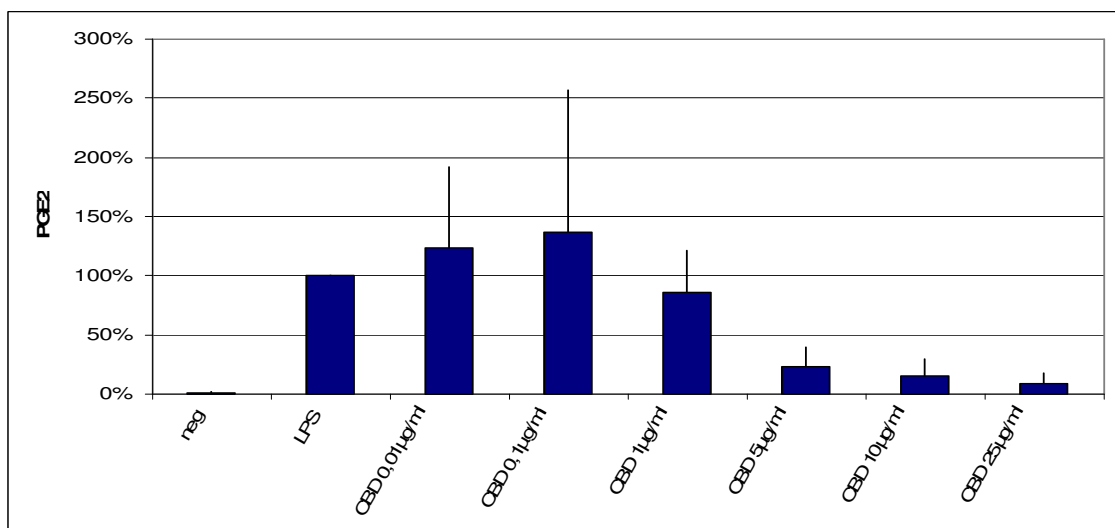
Nun wurden die beiden Cannabinoide CBG und CBD auch auf Monozyten untersucht. Zunächst wurde ein Enzyme-Immuno-Assay durchgeführt um den Gehalt an PGE2 in LPS-induzierten und mit Cannabinoiden inkubierten Monozyten zu messen.

Die Cannabinoide CBG und CBD inhibieren in LPS-stimulierten Monozyten die PGE2 Produktion. Allerdings ist auch hier, ähnlich den Chondrozyten, ein Anstieg der PGE2 Konzentration in den niedrigeren Dosierungen der Cannabinoide zu erkennen. Nach der Positivkontrolle steigt die PGE2 Konzentration bei 0,01 µg/ml erstmals an, bei der nächst höheren Dosierung (0,1 µg/ml) ist dann nochmals ein Anstieg zu erkennen. Erst ab einem Gehalt von 1 µg/ml CBG und CBD ist ein deutlicher Abfall der PGE2 Konzentration festzustellen. Dann aber sinkt der PGE2 Gehalt sehr schnell und kontinuierlich ab. Eine signifikante Hemmung ist ab einer Dosierung von 5 µg/ml bei beiden Cannabinoiden zu sehen.



**Abb.38: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



**Abb.39: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten**

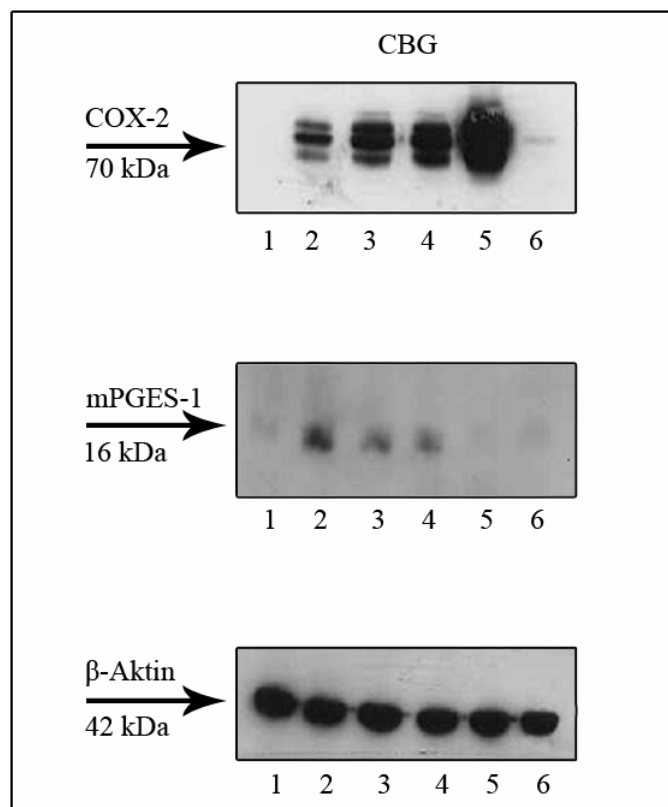
Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



### 3.2.4. Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die COX-2 Synthese von LPS-induzierten Monozyten

Nachdem im EIA eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese bewiesen werden konnte, wurden Western Blots durchgeführt, um die Ansatzebene dieser Hemmung zu erklären.

Einzig CBG zeigte hier eine deutliche Reaktion. Es wurde die COX-2 nicht inhibiert, sondern es kommt zu einer weiteren Erhöhung des COX-2 Proteinspiegel. Um hier nun wieder den Weg der PGE<sub>2</sub> Hemmung genauer zu untersuchen, wurde wieder die Wirkung der Cannabinoide auf die mPGES-1 Synthese untersucht. Es konnte eine Induktion der COX-2 und eine Inhibition der mPGES-1 Synthese, bei gleichzeitiger Hemmung von PGE<sub>2</sub>, nachgewiesen werden.



**Abb.40: Expression der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Monozyten durch Cannabigerol im Western Blot, bei gleichzeitiger Inhibition der mPGES1 durch Cannabigerol**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1 µg/ml, Bande 4 = 10 µg/ml, Bande 5 = 25 µg/ml, Bande 6 = 50 µg/ml.

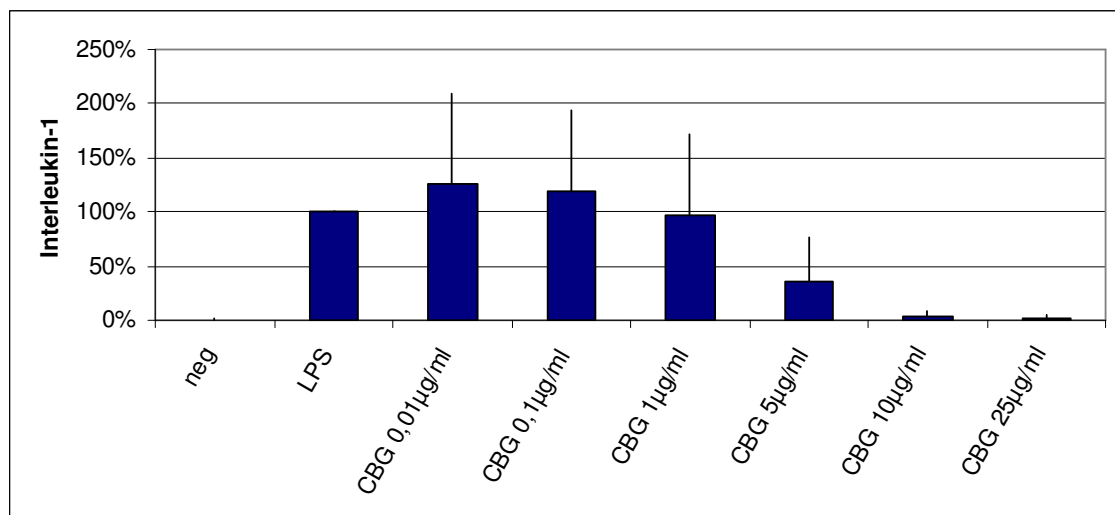
### 3.2.5. Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die Zytokin Synthese von LPS-induzierten Monozyten

Hier sollte die Wirkung der einzelnen Cannabinoide auf die Synthese der Zytokine, Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und den Tumornekrosefaktor $\alpha$ , untersucht werden.

Dazu wurden mit den Überständen aus LPS-induzierten Monozyten ELISAs durchgeführt.

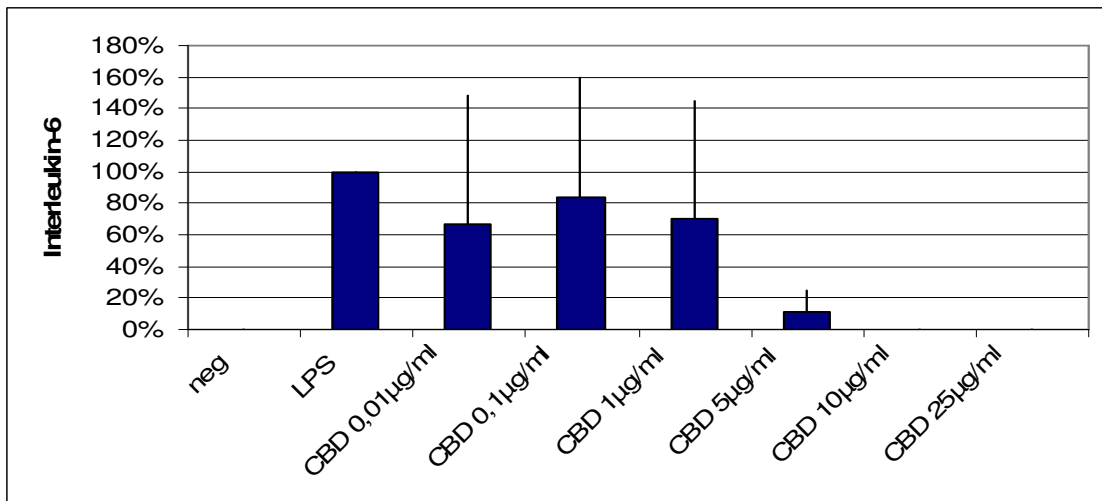
#### Interleukin -1 $\beta$

Cannabigerol und Cannabidiol inhibieren die IL-1 Synthese, auch hier ist ein Anstieg der IL-1 $\beta$  Konzentration bei den niedrigeren Dosierungen an CBG und CBD zu verzeichnen. CBG zeigt einen ersten Abfall der PGE2 Synthese ab einem Gehalt von 5  $\mu\text{g/ml}$ , CBD ab einen Gehalt von 1  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abb.41: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-1 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

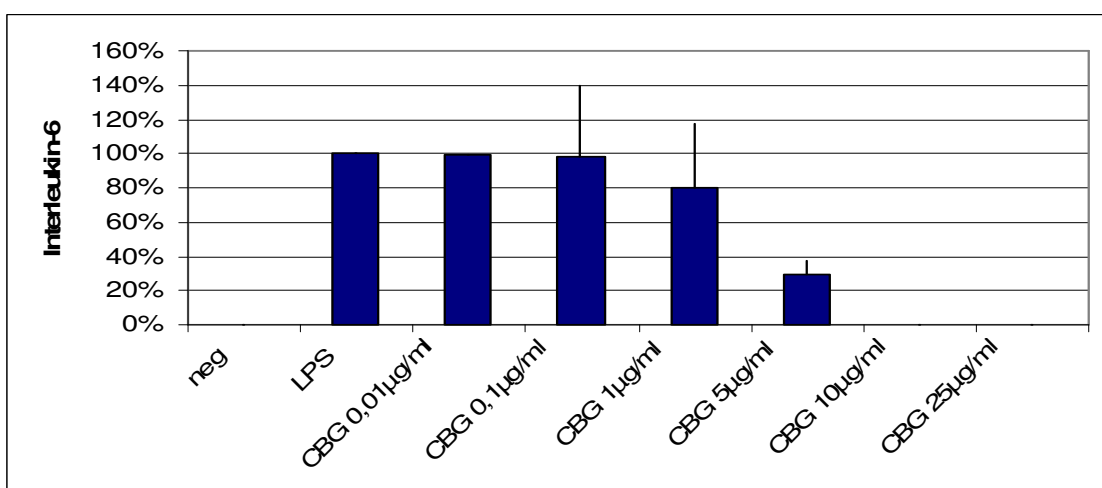


**Abb.42: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-1 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen.

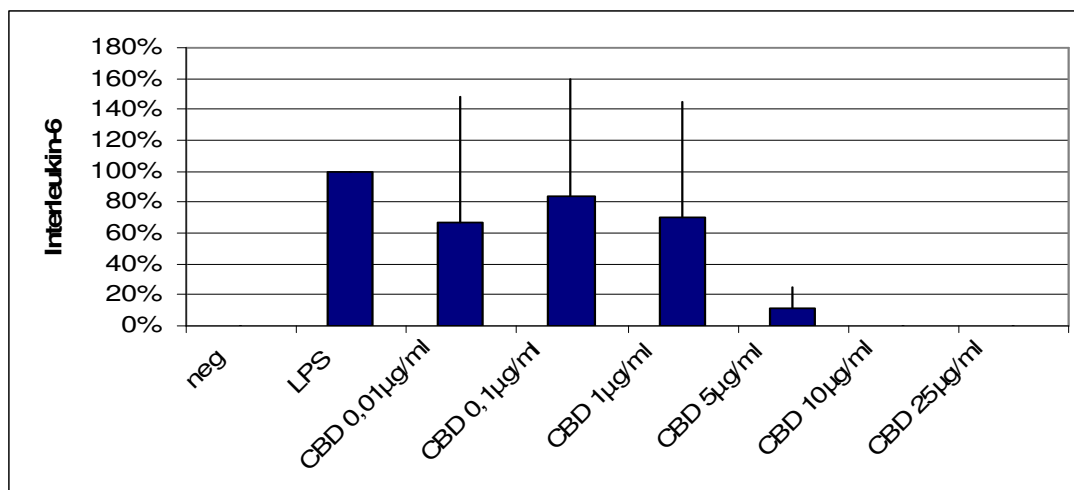
### Interleukin-6

Cannabigerol und Cannabidiol zeigen erst ab einem Gehalt von 5 µg/ml eine deutliche Inhibition der Interleukin-6 Synthese.



**Abb.43: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-6 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen

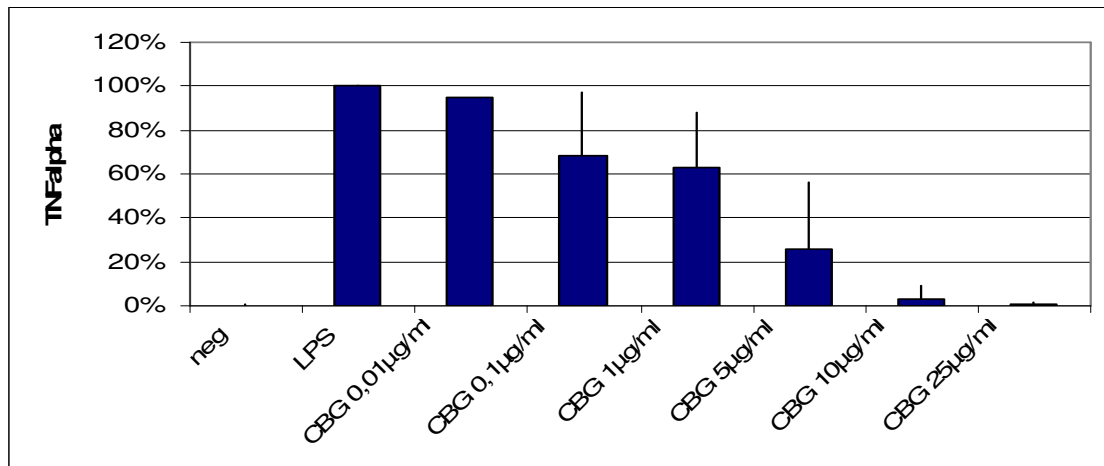


**Abb.44: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der IL-6 Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen

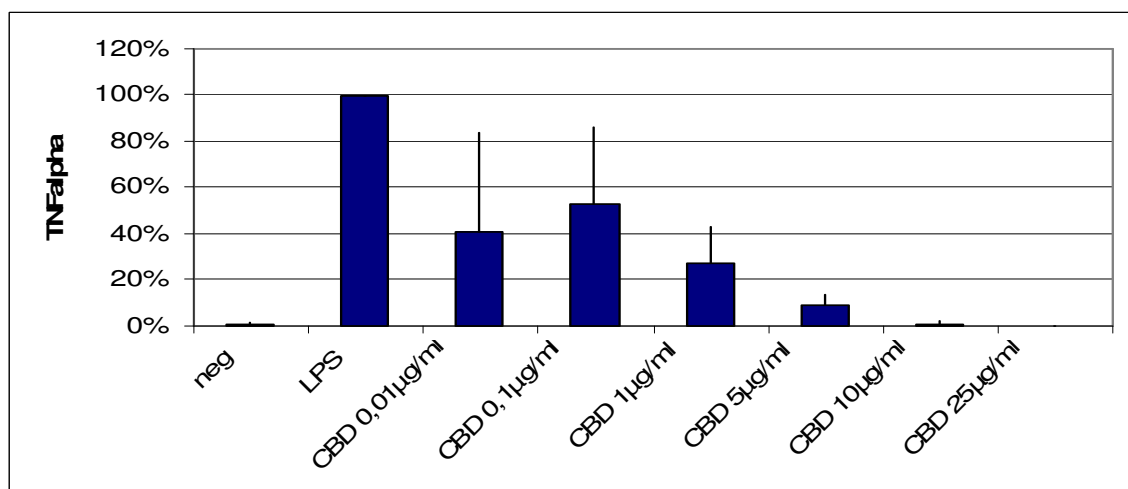
### **Tumornekrosefaktor $\alpha$**

Cannabidiol zeigt hier gleich bei 0,1 µg/ml eine starke Hemmung der LPS-induzierten PGE2 Synthese. Ein solch signifikanter Abfall ist bei Cannabigerol erst ab 5 µg/ml zu erkennen. Beide Cannabinoide hemmen dosisabhängig die PGE2 Synthese.



**Abb.45: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor-Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der TNFalpha Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen



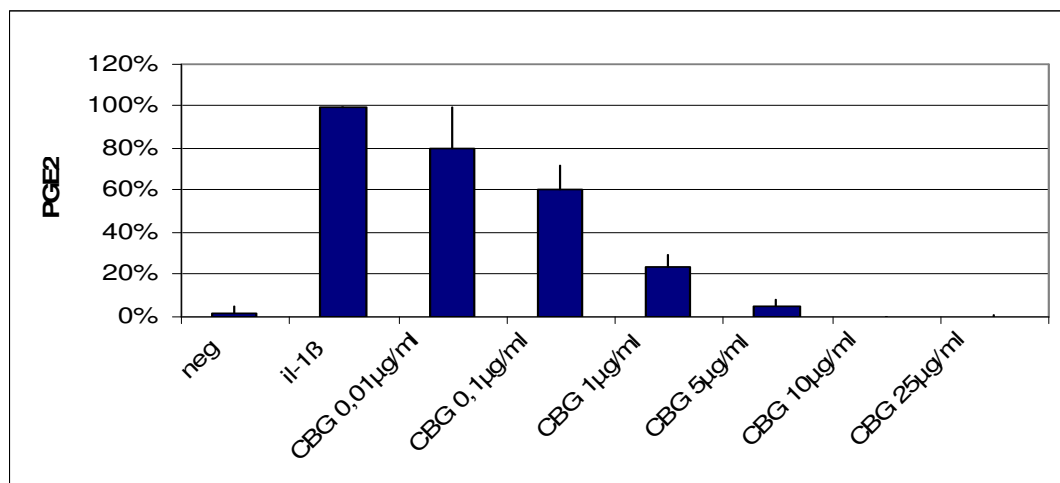
**Abb.46: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor-Synthese in Monozyten**

Die Monozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit LPS (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der TNFalpha Gehalt aus dem Überstand im ELISA gemessen

### 3.2.6. Wirkung der Cannabinoide, Cannabidiol und Cannabigerol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen

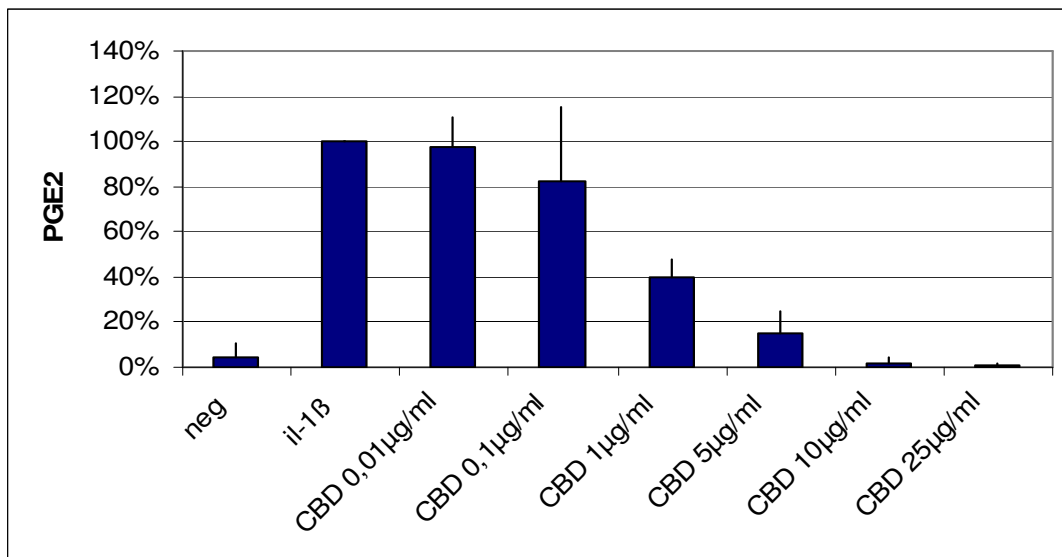
Die Wirkung von Cannabigerol und Cannabidiol wurden ebenfalls in SK-Zellen untersucht.

Auch in den SK-Zellen konnte eine deutliche Hemmung der IL-1 induzierten PGE2 Freisetzung, durch Cannabigerol und Cannabidiol, verzeichnet werden. Eine signifikante Hemmung der PGE2 Synthese ist ab 1  $\mu\text{g/ml}$  zu sehen.



**Abb.47: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen.**

Die SK-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen



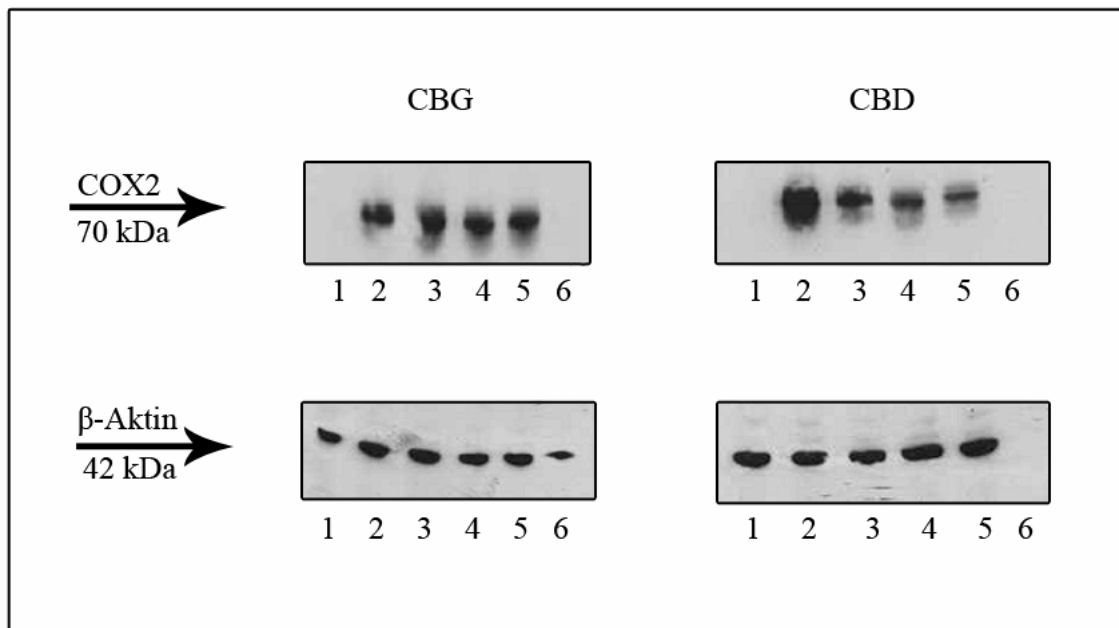
**Abb.48:** Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen

Die SK-Zellen wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen

### 3.2.7. Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die COX-2 Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten SK-N-H Zellen

Es wurden Western Blots angefertigt, um zu untersuchen auf welcher Ebene die PGE2 Synthesehemmung durch Cannabinoide in den SK-Zellen erfolgte.

Eine eindeutige Hemmung der COX-2 konnte hier nur bei dem Cannabidiol festgestellt werden. Cannabigerol zeigte auch in weiteren Versuchen keine Reaktion.



**Abb.49: Inhibition der IL-1 $\beta$  induzierten COX-2 Synthese in SK Zellen durch Cannabidiol im Western Blot. Keine eindeutige Reaktion bei Cannabigerol**

Bande 1 entspricht der Negativkontrolle (neg), Bande 2 der Positivkontrolle, gefolgt von Cannabisextrakten in aufsteigenden Konzentrationen. Bande 3 = 1  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 4 = 10  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 5 = 25  $\mu\text{g/ml}$ , Bande 6 = 50  $\mu\text{g/ml}$ .

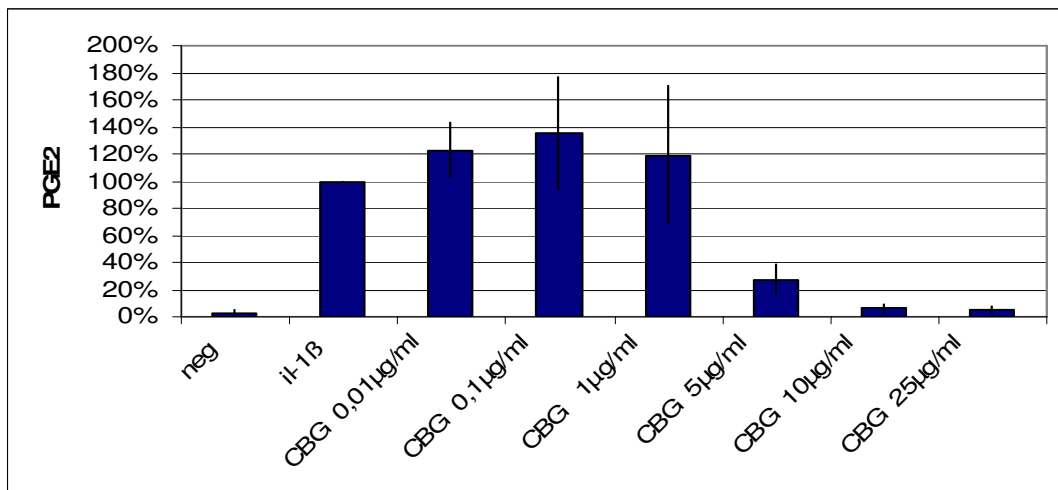
### 3.2.8. Wirkung der Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, auf die Prostaglandin E2-Synthese von IL-1 $\beta$ induzierten Chondrozyten

Die Wirkung der Cannabinoide CBG und CBD wurden auf IL-1 $\beta$  induzierten Chondrozyten untersucht. Zunächst wurde wieder die Reaktion der Cannabinoide auf die PGE2 Freisetzung, mittels Enzyme-Immuno-Assay ermittelt.

Es zeigt sich eine Dosis-abhängige Hemmung der IL-1 induzierten PGE2 Synthese bei Cannabidiol.

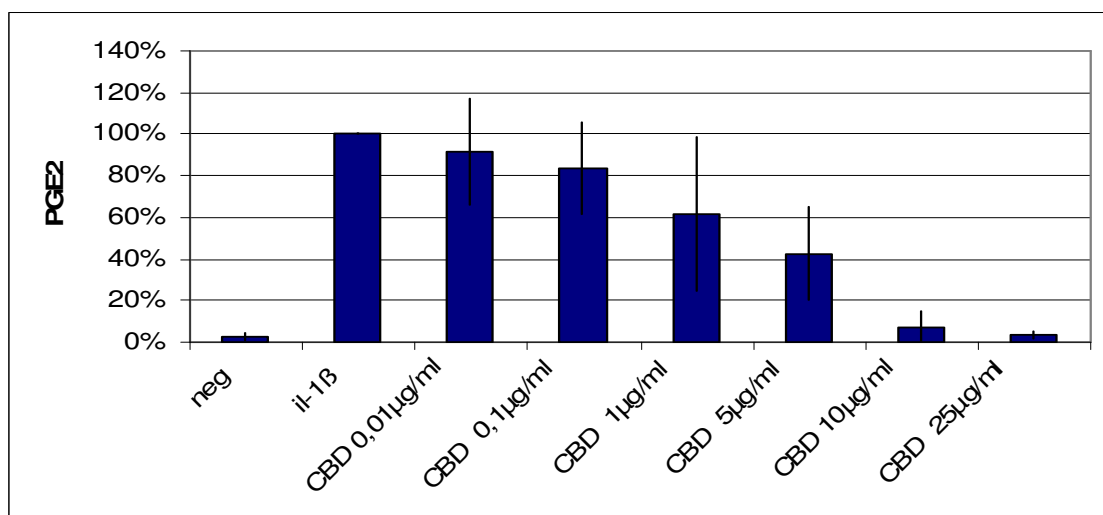
Cannabigerol hingegen zeigt einen signifikanten hemmenden Effekt erst ab 5  $\mu\text{g/ml}$ .





**Abb.50: Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die IL-1 $\beta$  induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten**

Die Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabigerol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen. Eine signifikante Inhibition der PGE2 Synthese ist erst ab 5  $\mu$ g/ml zu sehen.



**Abb.51: Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten**

Die Chondrozyten wurden über einen Zeitraum von 30 Minuten mit Cannabidiol in aufsteigenden Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 25  $\mu$ g/ml und 50  $\mu$ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden sie mit IL-1 $\beta$  (10ng/ml) stimuliert und nach 24h wurde der PGE2 Gehalt aus dem Überstand im EIA gemessen. Eine signifikante Inhibition der PGE2 Synthese ist erst ab 5  $\mu$ g/ml zu sehen.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte, im Rahmen des EU-Projektes, die entzündungshemmende Wirkung von Cannabisextrakten, die wenig bis kaum THC enthielten, untersucht werden. Es wurden drei unterschiedlich behandelte Cannabisextrakte auf Mikroglia, Monozyten, Chondrozyten und SK-Zellen untersucht. Außerdem wurden Cannabigerol und Cannabidiol, zwei Hauptinhaltsstoffe der Extrakte, ebenfalls an den genannten Zellen untersucht.

### 4.1.1. LPS-induzierte Mikrogliazellen als neuroinflammatorisches Modell und deren Reaktion auf Cannabis

Das Konsortium dieses EU-Projektes hat es sich zur Aufgabe gemacht einen standardisierten Extrakt zu entwickeln, der in der Lage ist entzündliche Prozesse zu unterbinden. Hierbei liegt das Hauptaugenmerk auf den beiden bedeutsamen Volkskrankheiten Migräne und Rheuma. Im Bezug auf den Therapiekomplex Migräne, der im Neurochemischen Labor der Uniklinik Freiburg Thema ist, sind besonders die Untersuchungen an den Mikroglia Zellen von Interesse. Mikroglia sind ein hervorragendes Zellmodell für zentralnervöse Erkrankungen mit entzündlichem Hintergrund, wie z.B. die Migräne. Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert die Mikroglia und generiert einen inflammatorischen Zustand. Es führt in primären Mikrogliazellen der Ratte zu einem Anstieg der iNOS (induzierbare NO-Synthase) auf mRNA- und Proteinlevel (Fiebich B.L. *et al*, 1998) und zu einer deutlichen mikroglialen Induktion von COX-2 mRNA und Protein, während die COX-1 konstitutionell vorliegt und durch LPS unbeeinflusst bleibt (Bauer M.K. *et al*, 1997). Die COX-2-Induktion durch LPS geht einher mit einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kB und wird z.B. durch beispielsweise Dexamethason, einen NF-kB-Inhibitor, gehemmt (Bauer M.K. *et al*, 1997). LPS stimuliert außerdem die mikrogliale PGE2-Produktion (Minghetti L. u. Levi G., 1995; Bauer M.K. *et al*, 1997).

In dieser Arbeit konnte nun aufgezeigt werden, dass die Cannabis Extrakte die LPS-induzierten Entzündungsprozesse hemmt. Sowohl die LPS-induzierte PGE2 Synthese wird durch die verwendeten Cannabisextrakte gehemmt, als auch die COX-2 Synthese. Die Versuche an den Mikrogliazellen zeigen bei allen drei Extrakten eine gute

Inhibition der PGE2 Synthese. Auch die COX-2 Synthese wird mit zunehmender Extrakt dosierung gehemmt. Somit konnte gezeigt werden, dass die PGE2 Synthese auf Transkriptioneller Ebene, durch eine Synthesehemmung der COX-2, gestoppt wird. Durch weitere Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass sich dieser Effekt bis in die transkriptionelle Ebene verfolgen lässt. Eine Hemmung der JNK und der p42/44 Kinasen deuten darauf hin, dass die Cannabisextrakte die MAPK Pathways beeinflussen und somit ihre Wirkung noch vor dem Zellkern und somit noch vor der Transkription zu finden ist.

Um auf Cannabinoide adäquat reagieren zu können, müssen Mikrogliazellen mit Cannabinoidrezeptoren ausgestattet sein. Tatsächlich besitzen sie funktionell aktive CB1- und CB2 Rezeptoren (Facchinetti *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2003). In einer Studie von Walter (2003) konnte aufgezeigt werden, dass im Falle einer neuronalen Entzündung Mikrogliazellen durch 2-AG (2-Arachidonylglycerol), einem Endocannabinoid, zur Migration angeregt werden. Diese Mikrogliazellen verschlimmern dann die Zellschäden indem sie proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$ , exprimieren (Kreutzberg *et al.*, 1996, Becher *et al.*, 2000). Die Reaktion der 2-AG auf die Mikrogliazellen wird über den CB2 Rezeptor reguliert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass pflanzliche nichtpsychoaktive Cannabinoide, wie Cannabidiol und Cannabinol, antagonistisch auf den CB2 Rezeptor wirken. Somit können diese Cannabinoide eine Migration der Mikrogliazellen verhindern.

Die Aktivierung des CB2 Rezeptors auf Mikrogliazellen hemmt an Orten neuronaler Schädigung deren Migration und Freisetzung von Zytokinen, wodurch Cannabinoide über die Regulation der Mikrogliazellen indirekt auf das Überleben von Neuronen positiv Einfluss nehmen (Klegeris *et al.* 2003; Walter *et al.* 2003). Generell weisen verschiedene Untersuchungen an Mäusen auf neuroprotektive Eigenschaften des Phytocannabinoids THC und der Endocannabinoide AEA und 2-AG hin (Panikashvili *et al.*, 2001; Mechoulam *et al.*, 2002; Marsicano *et al.*, 2003).

Puffenbarger (2000) hat zudem herausgefunden, dass THC die IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  Produktion in LPS-stimulierten Rattenmikroglia hemmt.

Es gibt bereits Hinweise auf einen Immunmodulierenden Effekt von Antagonisten und Agonisten der CB1- Rezeptoren (Cabral G.A. u. Marciano-Cabral F., 2005). So zeigen beispielsweise Antagonisten des CB1 Rezeptor eine hemmende Wirkung auf die Produktion von iNOS.

Die Ansicht, Cannabis schädige das menschliche Immunsystem und verschlechtere die Abwehrlage insbesondere bei AIDS-Patienten, entspricht nicht mehr neueren wissenschaftlichen Erkenntnissen. Sprach man in den 80er Jahren noch von Immunsuppression, bezeichnet man das vielschichtige Phänomen inzwischen als „Immunmodulation“, da auch immunstimulierende Eigenschaften von Cannabis entdeckt wurden. Einige Untersuchungen ermittelten eine günstige Beeinflussung des Verhältnisses von Helfer- und Suppressor-Lymphozyten (CD4/CD8-Quotient) bei Gesunden durch Cannabiskonsum (Wallace *et al*, 1988).

Interessant sind auch die Ergebnisse von Gertsch *et al* (2004), hier konnte gezeigt werden, dass Alkylamide der Pflanze Echinacea in menschlichen Monozyten die TNF $\alpha$  mRNA- Expression durch Bindung an CB2 Rezeptoren modulieren.

Insgesamt lassen die zellbiologischen Untersuchungen eine immunmodulatorische Wirkung von Endocannabinoiden klar erkennen. Zusammengefasst kann vermutet werden, dass Endocannabinoide und pflanzliche Cannabinoide durch Chemotaxis Immunzellen zum Ort einer Schädigung locken und aktivieren, dabei aber gleichzeitig deren gewebeschädliche Überaktivierung verhindern. Zusätzlich regulieren Immunzellen ihrerseits die lokalen Gewebekonzentrationen von Endocannabinoiden durch Synthese und Abbau.

Cannabinoidrezeptor-1 wird auf Mikrogliazellen von Schnecken, Mäusen und Ratten gefunden, allerdings wird er nicht auf humanen Mikrogliazellen exprimiert (Stella, 2004). Auf humanen Mikrogliazellen konnten bisher nur CB2 Rezeptoren gefunden werden. Analog zu den Makrophagen in der Peripherie wird die Expression des CB2 Rezeptors auf Mikrogliazellen im ZNS stark vom örtlichen Gehalt an inflammatorischen Mediatoren beeinflusst. So verstärken entzündliche Veränderungen und damit einhergehend ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins Interferon (IFN)-gamma die CB2 Rezeptor Expression (Carlisle *et al*, 2002).

Neben dem Vorkommen diverser CB Rezeptor Typen sind Mikrogliazellen auch in der Lage, Endocannabinoide zu produzieren und diese gezielt freizusetzen. So setzen Mikrogliazellen ungefähr 20-mal mehr Endocannabinoide frei als Neurone oder Astrozyten (Walter *et al*, 2003).

Schon Walter und Stella (2004) haben die positiven Effekte der Cannabinoide auf Mikrogliazellen und deren Hemmung der proinflammatorischen Mediatoren und der Hemmung der Mikroglia migration beschrieben. Die Hemmung der

---

proinflammatorischen Mediatoren konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, außerdem konnte hier erstmals gezeigt werden, dass diese Effekte auch durch Pflanzenextrakte in ihrer Gesamtzusammenstellung erzeugt werden können. Alle drei Cannabisextrakte zeigen hier einen PGE2-Synthesehemmenden Effekt und eine Hemmung der COX-2 Synthese auf dem MAPK-Signaltransduktionsweg in Mikrogliazellen. Auch konnte hiermit gezeigt werden, dass zu diesem therapeutisch bedeutsamen Effekt nicht einzig das THC von Nöten ist. Die hier angewendeten Extrakte enthalten einen so minimalen Gehalt an THC, so dass sie nicht unter das Betäubungsmittelgesetz fallen würden. Somit wäre eine therapeutische Nutzung eventuell ohne rechtliche Einschränkungen möglich.

Ein Interessanter Aspekt dieser Ergebnisse ist der, dass die Cannabis Extrakte die PGE2 Synthese nicht enzymatisch, also über eine Blockierung der COX-2 (wie es NSAIDS machen), zu hemmen scheint, sondern dass es sich hierbei um eine transkriptionelle Hemmung handelt. Hier wird die Synthese der COX-2 bereits auf dem MAPK Signaltransduktionsweg gestoppt, eine Beeinflussung anderer an der COX-2 Expression beteiligten Signaltransduktionswege ist aber zusätzlich nicht auszuschließen.

Es gibt bereits Arbeiten, die sich mit der Hemmung der Prostaglandinsynthese durch Cannabinoide beschäftigten (Burstein *et al*, 1973; Formukong *et al*, 1988), allerdings gibt es seither keine Studie die standardisierte Pflanzenextrakte untersuchte. Bisher lag das Interesse bei synthetischen Einzelkomponenten, einzelnen Cannabinoiden oder anderen Bestandteilen der Pflanze Cannabis, wie beispielsweise die ajulemische Säure. (Burstein, 2005).

#### **4.1.2. Welcher der drei Extrakte ist der Wirksamste?**

Die Frage nach dem wirksamsten Extrakt ließ sich nicht eindeutig klären, da alle drei Extrakte eine hemmende Wirkung auf die PGE2 Synthese und auf die COX-2 Synthese hatten. Anhand der Graphiken der PGE2 EIAs lässt sich keine der Cannabisextrakte hervorheben. Während die Extrakte SE14 und SE14h bei zunehmender Konzentration wieder zu einem leichten Anstieg des PGE2 Gehaltes führen, ist die Hemmung bei

Extrakt SE11 bis zu den höheren Dosierungen einheitlicher. Wenn man sich die Prozentzahlen der PGE2 Konzentrationen vergleichend bei allen Extrakten und deren Dosierungen ansieht erkennt man folgendes:

<b>Extrakt</b>	<b>SE11</b>	<b>SE14</b>	<b>SE14h</b>
LPS	100%	100%	100%
0,1µg/ml	~90%	~105%	~81%
1µg/ml	~60%	~62%	~62%
5µg/ml	~20%	~29%	~22%
10µg/ml	~21%	~21%	~19%
25µg/ml	~19%	~25%	~22%
50µg/ml	~21%	~39%	~39%

**Tab.10: PGE2 Synthese in LPS-induzierten und mit Cannabisextrakten inkubierten Mikrogliazellen.**

Die Prozentangaben beziehen sich auf die PGE2 Konzentration im Überstand der LPS-induzierten Mikroglia

Die Extrakte SE14 und SE14h hemmen, abgesehen von dem geringen Anstieg bei SE14 im Bereich von 0,1 µg/ml, besonders in den niedrig dosierten Bereichen die PGE2 Synthese in relativ signifikanten Schritten. In den Bereichen 1 µg/ml bis 5 µg/ml ist bei allen Extrakten eine starke Hemmung der PGE2 Synthese zu erkennen. Ab den höher dosierten Bereichen (10-50 µg/ml) ist nur noch bei Extrakt SE11 ein weiterer Abfall des PGE2 zu sehen. Die stärkste Inhibition von PGE2 ist in den niedrig dosierten Bereichen der Extrakte SE14 und SE14h zu erkennen.

Nach der Messung des PGE2 Gehaltes wurden Western Blots durchgeführt, um die Ansatzstelle der Extrakte zu bestimmen. Im Westen Blot konnte bei allen drei Extrakten eine Hemmung der Cyclooxygenase-2 verzeichnet werden.

Für die weitere Versuchsdurchführung wurde dann nur noch der Extrakt SE14 verwendet, da die beiden anderen Extrakte nicht in ausreichender Menge vorhanden waren. Außerdem waren anhand der EIAs und der Western Blots bereits kaum Unterschiede in der Wirksamkeit der einzelnen Extrakte zu erkennen.

---

Es ist nicht möglich, bei den hier durchgeführten Versuchen, einen Extrakt hervorzuheben. Alle drei Extrakte zeigen hier eine gleich gute Wirksamkeit.

#### **4.1.3. LPS-induzierte Monozyten behandelt mit Cannabis Extrakten**

Der Extrakt SE11 lässt im EIA eine stetige Hemmung der PGE2 Synthese erkennen. Extrakt SE14 fällt bei 1 µg/ml aus der Reihe, wobei trotzdem tendenziell ein Abfall der PGE2 Konzentration zu sehen ist. Allerdings ist hier der Abfall nicht so signifikant wie bei Extrakt SE11. Der Cannabis Extrakt SE14h zeigt ebenfalls eine starke Hemmung und einen steilen Abfall der PGE2 Konzentration. Allerdings gibt es auch hier erst einen Anstieg bei den niedrigeren Extrakt dosierungen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml)

Mit stimulierten Monozyten wurden dann Western Blots durchgeführt um die Angriffsstelle der PGE2 Hemmung zu finden. Die Ergebnisse hier waren nicht eindeutig und es ließ sich eher eine Induktion der COX-2 ausmachen. Hier wäre nun von Interesse, ob sich die PGE2 Hemmung über einen anderen Weg innerhalb der Synthese erklären lässt. Interessant wäre hier, aufgrund der anderen Ergebnisse, eine Untersuchung der mPGES-1 Synthese.

Bereits Klegeris *et al* (2003) haben beobachtet, dass Cannabinoide in LPS-stimulierten Monozyten eine Verminderung der Zytokinausschüttung verursachen. Dies geschieht über eine CB2 Rezeptorvermittelte Reaktion. Monozyten tragen sowohl CB1 als auch CB2 Rezeptoren, wobei hier die CB2 Rezeptoren in deutlicher Überzahl vorhanden sind.

Untersuchungen zum endogenen Cannabinoidsystem der Monozyten wurden bisher vor allem im Bezug auf kardiologische Fragestellungen gemacht. So konnte festgestellt werden, dass Monozyten im hämorrhagischen und septischen Schock in der Lage sind Endocannabinoide, vor allem 2-AG und Anandamid, zu exprimieren. Welche dann zu einer Aktivierung peripherer CB1 Rezeptoren führen und damit zu einer schockassoziierten Hypotonie (Wagner *et al*, 1997; Varga *et al*, 1998).

Die eindeutige Hemmung der Zytokinausschüttung, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, könnte in Zukunft ein weiteres Forschungsfeld darstellen. Es ist bekannt das proinflammatorische Zytokine bei Entzündungsschmerz und neuropathischem Schmerz

eine Rolle spielen. Daher sind therapeutische Strategien zur Zytokinhemmung in dieser Hinsicht von Interesse.

#### **4.1.4. IL-1 $\beta$ induzierte Chondrozyten behandelt mit Cannabis Extrakten**

In bisherigen Zellstudien mit Knorpelzellen untersuchten britische Forscher die Wirkungen zweier synthetischer Cannabinoide auf den Abbau von Knorpelbestandteilen, der durch Interleukin-1 $\alpha$  verursacht worden war. Interleukin-1 ist ein Protein, das an Entzündungen beteiligt ist. Die Cannabinoide schützten die Knorpelstruktur vor dem Abbau, eine Wirkung, die möglicherweise durch Cannabinoidrezeptoren vermittelt war (Mbvundula *et al*, 2006).

Andere Studien in Bezug auf Arthritis und Rheuma konnten zeigen, dass Cannabinoide eine potentielle Wirksamkeit aufzeigen. Die bereits seit den 80er Jahren bekannte Suppression der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine wie z.B. IL-1, IL-6, IL-12 und TNF $\alpha$  macht die Cannabinoide zu potentiellen Therapeutika bei chronisch entzündlichen Erkrankungen. Bei der rheumatoiden Arthritis spielen solche Immunreaktionen eine wichtige Rolle. Insbesondere TNF $\alpha$  ist ein wichtiger Faktor für die Erkrankung, die zur Gelenksdestruktion, Funktionsverlust und Schmerzen führt. In einem Tiermodell konnte aufgezeigt werden, dass Mäuse mit induzierter Arthritis, bei oraler Aufnahme von Cannabidiol (CBD) eine wesentliche klinische Verbesserung der Symptome zeigen. Sowohl in vivo als auch in Zellkulturen von Synovialzellen der CBD- behandelten Mäuse war die Konzentration von TNF $\alpha$  signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Vergleichbare Ergebnisse erzielte HU-320, ein synthetisches Cannabinoid (Kress *et al*, 2007).

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit wurden an menschlichen Chondrozyten durchgeführt und es wurde die Wirkung der Cannabisextrakte auf verschiedene Entzündungsmediatoren untersucht.

Im EIA zeigt sich nach einem Anstieg der PGE2 Konzentration in den niedrigen Extrakt-Dosierungen (0,1  $\mu$ g/ml und 1  $\mu$ g/ml) ein signifikanter Abfall der PGE2



Konzentration, bei allen drei Extrakten. So konnte gezeigt werden, dass die Extrakte auch in den Chondrozyten die PGE<sub>2</sub> Synthese hemmen.

Die Western Blot Untersuchung ergab eine gesteigerte Expression der COX-2 mit ansteigender Dosierung aller drei Extrakte. Um den Wirkmechanismus der PGE<sub>2</sub> Hemmung zu untersuchen wurden alle drei Extrakte im Western Blot auf mPGES-1 untersucht. Hier zeigte sich eine Hemmung der mPGES-1, was bedeutet, dass die Hemmung der PGE<sub>2</sub> in den Chondrozyten nicht über die Cyclooxygenaseaktivität läuft, sondern über eine transkriptionelle Hemmung der mPGES-1 Synthese. Dies bedeutet dass die PGE<sub>2</sub> Synthese im Schritt von PGH<sub>2</sub> zu PGE<sub>2</sub> gehemmt wird. Cyclooxygenasen katalysieren die Oxygenierung in einer Zwei-Stufen-Reaktion der Arachidonsäure zum PGH<sub>2</sub>, welches als Substrat gewebsspezifischer Prostaglandin Synthesen dient (Smith *et al*, 2000). Diese setzen PGH<sub>2</sub> in prinzipiell fünf biologisch aktive Prostaglandine, Prostaglandin-H<sub>2</sub>, Prostaglandin-I<sub>2</sub> (Prostacyclin), Prostaglandin-F<sub>2</sub>, Prostaglandin-D<sub>2</sub>, Prostaglandin-E<sub>2</sub> und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) um. Die gebildete PG-Menge einer Zelle ist abhängig von der Expression der individuellen PG Synthesen (TXAS, PGDS, PGES, PGF-S und PGI-S), die entsprechend ihrer Reaktionsprodukte bezeichnet werden. Von der glutathionabhängigen PGE-Synthase werden die drei Isoformen cytoplasmatische (c)PGES, membran-assoziierte (m)PGES-1 sowie mPGES-2 unterschieden (Lazarus *et al*, 2002; Tanikawa *et al*, 2002; Tanioka *et al*, 2000). Ähnlich wie COX-2 ist auch die mPGES-1 Expression induzierbar, denn mPGES-1 wird sowohl mit COX-2 als auch mit COX-1 koexprimiert (Schneider *et al*, 2004; Murakami *et al*, 2000). Während cPGES mit COX-1 assoziiert ist, bleibt die Kopplung der mPGES-2 bislang noch unklar (Bosetti *et al*, 2004).

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse dieser Arbeit von beachtlicher Bedeutung. Eine mPGES-1 Synthesehemmung könnte ein interessanter Ansatzpunkt zur entzündungshemmenden Therapie darstellen. Besonders da die nicht selektiven COX –Hemmer, ebenso wie die selektiven COX-2-Hemmer bisher einige unerwünschte Nebenwirkungen hervorbrachten. Man ging bisher davon aus, dass COX-2-Inhibitoren bedeutend weniger Nebenwirkungen verursachen als die unselektiven COX-Inhibitoren, wie z.B. Acetylsalicylsäure, die zusätzlich die COX-1 und damit auch physiologischen Funktionen blockieren. Diese Annahme für selektive COX-2-Inhibitoren gilt heute als überholt, da auch die COX-2 im ZNS, in den Reproduktionsgeweben, in der Niere und in den Blutgefäßen konstitutiv exprimiert wird. Zum anderen spielt die COX-2 eine wichtige Rolle in der Wundheilung, wodurch zum Beispiel die Abheilung von Magen-

Ulzera bei Einnahme von COX-2-Inhibitoren verzögert wird. COX-2-Inhibitoren sind zwar besser verträglich als nicht selektive COX-Inhibitoren, aber doch nicht frei von Nebenwirkungen. Die meisten der COX-2 Inhibitoren (die so genannten Coxibe) sind heute vom Markt genommen worden. 2004 wurde das, zunächst viel versprechende, erste Coxibe Rofecoxib (Vioxx®) vom Markt genommen. In einer Studie zeigte sich nach 18 Monaten eine nahezu verdoppelte Rate an Herz-Kreislaufkrankung (insbesondere Herzinfarkten, instabiler Angina Pectoris und Schlaganfällen) im Vergleich zu einer Behandlung mit Placebo.

Unter dieser Betrachtung ist die Zelltyp-abhängige Reaktion von Cannabis recht interessant, vor allem in Bezug auf die mPGES-1 Hemmung und damit auf eine eventuelle Alternative zu den bisherigen Angriffspunkten in die Prostaglandinsynthese.

#### **4.1.5. IL-1 $\beta$ induzierte SK-Zellen behandelt mit Cannabis Extrakten**

Der EIA der Extrakte zeigt in allen drei Fällen einen steilen Abfall der PGE<sub>2</sub> Synthese. Auch die Western Blot Untersuchung zeigt eine Hemmung der COX-2 Synthese. Somit kann auch in den SK-Zellen der entzündungshemmende Effekt über eine Hemmung der Cyclooxygenase Synthese mit folgender PGE<sub>2</sub> Hemmung erklärt werden. SK-N-SH Zellen entstammen einer humanen Neuroblastom-Zelllinie aus Knochenmarksmetastasen. Das heißt, es sind Tumorzellen die von Neuroblasten ausgehen. Bekannt ist, dass die Endocannabinoide Anandamid (Arachidonylethanolamid) und das 2-Arachidonylglycerol zentral aus postsynaptischen Neuronen freigesetzt werden. Sie können dann zum präsynaptischen Axonterminal diffundieren und dort transmitterfreisetzungshemmende CB<sub>1</sub>-Rezeptoren aktivieren (Di Marzo *et al*, 1998; Wilson, 2002). Die Lokalisation des CB<sub>1</sub>-Rezeptors im ZNS wurde mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien (Herkenham *et al*, 1990, 1991) und Immunohistochemie geklärt (Pettit *et al*, 1998; Tsou *et al*, 1998; Ong, 1999). CB<sub>1</sub>-Rezeptoren werden unter anderem im cerebralen Cortex gefunden und in sehr großer Dichte auch im extrapyramidal-motorischen System.

Selbstverständlich muss darauf hingewiesen werden, dass diese Experimente mit einer Neuroblastom-Zelllinie durchgeführt wurden, was für die Erkenntnisse aus diesen

---

Versuchen bedeutet, dass sie natürlich nicht ohne weiteres auf normale Neuronen oder gar Situationen in vivo übertragbar sind. Da aber insgesamt alle Experimente, mit allen Zelltypen, zur deutlichen Inhibition der proinflammatorischen Mediatoren führten, lassen sich auch diese Versuche gut in die Ergebnisse mit einbeziehen. Auch die Kenntnis über das Vorhandensein von CB1-Rezeptoren in Neuronen und deren Wirkungsweise, soweit bekannt, lassen die Versuche mit den SK-N-H Zellen in diesem Zusammenhang interessant erscheinen.

#### **4.1.6. Cannabidiol und Cannabigerol**

Nachdem der entzündungshemmende Effekt der Cannabisextrakte und sein Weg über die PGE2 Hemmung, zellenabhängig entweder über die COX-2 oder die mPGES-1 Synthese-Hemmung, belegt war stellte sich nun die Frage welcher der Hauptkomponenten der Extrakte für diesen Effekt in welchem Maße zuständig war.

Auch die beiden Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, zeigen in allen Zellsystemen eine Hemmung der PGE2 Synthese. In Mikroglia und SK-Zellen zeigen beide Cannabinoide eine signifikante Hemmung bei 1 µg/ml. In den Monozyten und Chondrozyten ist eine ausgeprägte Hemmung der PGE2 Synthese ab 5 µg/ml. Die Zytokine, IL-1, IL-6 und TNFα, werden in LPS-stimulierten Monozyten von beiden Cannabinoiden ab einer Dosierung von 5 µg/ml signifikant gehemmt.

Der Western Blot der Mikrogliazellen ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Am ehesten ließ sich bei Cannabigerol eine Hemmung der COX-2 ausmachen. Cannabidiol zeigte eher einen leichten Anstieg der COX-2. Hier wäre eine Untersuchung der mPGES-1 von Interesse.

In den Monozyten wurde COX-2 im Western Blot von CBG induziert, CBD lieferte hier keine verwertbaren Ergebnisse. Eine Messung der mPGES-1 ergab eine Hemmung bei CBG, was bedeuten könnte, dass die Hemmung der PGE2 Synthese von CBG mPGES-1 vermittelt ist und nicht über eine COX-2 Synthesehemmung abläuft.

Die SK-Zellen zeigten im Western Blot eine eindeutige Hemmung von COX-2 nur bei CBD.

Alles in allem, lassen sich die Ergebnisse der Untersuchungen der Reinsubstanzen nicht einheitlich zusammenfassen. Das Cannabidiol war bereits einige Male Bestandteil

wissenschaftlicher Forschungen. Von Interesse waren hierbei seine antagonisierende Wirkung auf das THC und auch seine antiinflammatorische Wirkung (Formukong *et al*, 1988; Burstein *et al*, 1973; Williamson *et al*, 2000; Zurier, 2003). Auch seine medizinische Wirkung war schon einige Male Thema. Neuerdings gibt es immer mehr Untersuchungen, angeregt auch durch die Erforschung des Endogenen Cannabinoidsystems, die sich insbesondere für das Wirkpotential der Cannabinoide interessieren. So gibt es nicht nur Hinweise auf deren schmerzstillende Wirkung, den Einsatz bei Spasmen oder Depressionen, sondern auch bei Tumoren. Es gibt beispielsweise Hinweise auf die Wirksamkeit der Cannabinoide (insbesondere CBD) bei Gliomen (Velasco *et al*, 2004).

Sativex®, ein Arzeneispray welches synthetisches THC und CBD enthält ist in Kanada zugelassen und wird bei Multipler Sklerose bei Schmerzen und bei Neuropathien angewendet.

Es tauchen derzeit immer mehr Untersuchungen auf, die sich mit möglichen Einsatzgebieten von Cannabinoiden beschäftigen. Mehrmals wurde allerdings von den verschiedensten Wissenschaftlern darauf hingewiesen, dass wohl das Zusammenwirken aller Bestandteile der Pflanze Cannabis, zu einer besser Wirkung und Verträglichkeit führt (Grinspoon, 1995; Ben Amar, 2006; Zurier, 2003; Williamson *et al*, 2000, Grotenhermen, 2004).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass die Reinsubstanzen zwar entzündungshemmende Wirkungen zeigen, die Extrakte hingegen aber viel signifikantere Ergebnisse liefern. Die Ergebnisse der Extrakte sind deutlich einheitlicher und zuverlässiger als die der einzelnen Cannabinoide. Die unterschiedliche Reaktion der COX-2 auf die Cannabinoide ist ein Beispiel hierfür. Die Ergebnisse der Reinsubstanzen variieren hier zu stark, wodurch sich kein wirklich einheitliches Schema erkennen lässt. Es ist also gut möglich, dass sich hier ein in der Phytotherapie bekanntes Phänomen erkennen lässt. So hat sich in der Vergangenheit schon oft gezeigt, dass standardisierte Pflanzenextrakte, also Vielstoffgemische, eine bessere Wirksamkeit hatten, als die Präparate, die nur einen Reinwirkstoff der entsprechenden Pflanze enthielten. Außerdem zeigen diese Extrakte häufig weniger Nebenwirkungen.

Als bedenklich wird allerdings allgemein das Unwissen über die verschiedenen Einzelbestandteile der Pflanze und deren Wirkungsweisen, angesehen. Viele Indikationen benötigen eine Therapie mit einem definierten und Isolierten Reinwirkstoff. Im Rahmen einer phytotherapeutischen Behandlung allerdings, die sich

gut zur Prävention oder zur Behandlung oder Unterstützung von chronischen Erkrankungen eignet, können standardisierte Pflanzenextrakte eine gute Alternative darstellen.

#### **4.1.7. Cannabis und der therapeutische, medizinische Nutzen**

Hanf wird schon seit vielen Jahrtausenden vom Menschen genutzt. Er war schon immer Heil- Nutz und Rauschpflanze. Lange Zeit war seine medizinische Nutzung ein völlig normaler Bestandteil unserer Gesellschaft. Bis Mitte des 19. Jahrhunderts war Cannabis auch in deutschen Apotheken erhältlich. Durch Missbrauch, Fehlinformationen und Politik rückte die Nutzpflanze Hanf immer mehr in ein schlechtes Licht. Seit damals verschob sich die Wahrnehmung der Heilpflanze Hanf aufgrund ihrer psychoaktiven und halluzinogenen Eigenschaften zur Wahrnehmung als illegaler Droge.

Außerdem war die fehlende Standardisierung medizinischer Cannabiszubereitungen auch einer der wesentlichen Gründe, möglicherweise der wichtigste Grund für das Verschwinden der Cannabismedikamente aus den Apotheken Europas und Nordamerikas.

Mitte der siebziger Jahre gab es die ersten klinischen Studien mit THC, in denen man mögliche therapeutische Wirkungen untersuchte, wie seine Wirksamkeit bei Erbrechen und Übelkeit im Rahmen einer Krebschemotherapie, den appetitanregenden Effekt oder die Senkung des Augeninnendrucks beim Glaukom (grüner Star). Dieser ersten Welle der modernen Cannabisforschung folgte etwa zwanzig Jahre später die zweite, noch größere Welle, die erneut durch eine grundlegende Entdeckung ausgelöst worden war. Ende der achtziger Jahre und Anfang der neunziger Jahre wurde das körpereigene Cannabinoidsystem entdeckt, das aus spezifischen Bindungsstellen für Cannabinoide und körpereigenen Bindungsstoffen besteht.

Einige Wissenschaftler wendeten sich nun dem Hanf und seinen überlieferten Heilanwendungen wieder zu. Heute besteht wieder ein großes Interesse an Cannabis, nicht nur als Heilpflanze sondern auch als erneuerbare Rohstoffpflanze z.B. für die Faserherstellung (Stoffe und Papier). Lange Zeit lag das Hauptaugenmerk hinsichtlich seiner therapeutischen Qualitäten einzig auf dem psychoaktivem Cannabinoid THC.

Die Wirksamkeit von THC innerhalb eines großen Indikationsgebietes, war nun bewiesen und wurde von Pharmaunternehmen aufgenommen. Sie stellten von nun an synthetische oder halbsynthetische Derivate des THC her. Seine Indikationsgebiete sind vielseitig und betreffen meist schwerwiegende Erkrankungen.

So ist in Deutschland beispielsweise Dronabinol (Marinol®), ein teil-synthesitsches Derivat von Delta-9-Tetrahydrocannabinol, für bestimmte Indikationen zur Anwendung erlaubt. Hierbei handelt es sich um die Behandlung von Schmerzzuständen, neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und um eine antiemetische Behandlung innerhalb einer Chemotherapie bei Krebspatienten. Außerdem senkt es den Augeninnendruck. In Deutschland ist somit der medizinische Gebrauch von Cannabis in engen Grenzen zulässig; bei Vorliegen eines „Notstands“ wie z.B. einer schweren Krankheit, wenn der Erfolg einer Cannabistherapie laut einem richtungweisenden Urteil des Oberlandesgerichts Karlsruhe vom 24. Juni 2004 „nicht ganz unwahrscheinlich“ ist. Gleichzeitig bleiben der Anbau und die medizinische Nutzung von Cannabis jedoch illegal. Ärzte dürfen seit 1998 den Cannabiswirkstoff Dronabinol auf einem Betäubungsmittelrezept verschreiben. Pharmaprodukte auf Cannabis-Basis, wie z.B. *Marinol* (Dronabinol) aus den USA oder die Erzeugnisse der Frankfurter Firma *THCPharm GmbH*, sind jedoch teuer und werden von den Krankenkassen selten übernommen

Ein anderes, vollsynthetisches Derivat von THC ist Nabilon. Es wird hauptsächlich zur Behandlung von Anorexie und Kachexie bei HIV- und Aidspatienten eingesetzt, aber auch als Antiemetikum bei Übelkeit und Erbrechen unter Zytostatika bzw. Bestrahlungstherapie im Rahmen einer Krebstherapie.

Ein weiteres Präparat welches aus Extrakten von Cannabis gewonnen wird, enthält THC und CBD in großen Mengen, es heißt Sativex® und ist in Kanada zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen bei Multipler Sklerose zugelassen.

Ein recht neues Präparat ist das Rimonabant (Acomplia®), es hemmt Cannabinoidrezeptoren und wird zur Therapie von Adipositas und bei Fettstoffwechselstörungen angewendet.

Neuere THC oder Cannabinoidderivate, die z.T. noch untersucht werden, sind das Dexanabinol (HU-210), welches 800mal stärker wirken soll als THC aber völlig ohne psychoaktive Wirkung ist. Es ist ein nichtpsychotroper THC-Abkömmling und ist in den letzten Jahren umfangreich in Tierstudien untersucht worden. Er schützt Nervenzellen wirksam gegen Folgen einer verminderten Durchblutung oder

Sauerstoffversorgung. Dexanabinol weist Eigenschaften eines NMDA-Rezeptorantagonisten (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor) auf und ist ein neuer Hemmer der TNF $\alpha$ -Produktion. Dexanabinol könnte somit zur Behandlung von Gehirnschäden verwendet werden, die in der Folge von Schädelverletzungen und beim Schlaganfall auftreten (Zalish u. Lavie, 2003; Achiron *et al*, 2000).

Außerdem ist die ajulemische Säure, ein synthetisches Analogon zu einem THC Metaboliten, aufgrund ihrer entzündungshemmenden Wirkung ins Interesse der Wissenschaft gerückt (Burstein, 2005).

Ganz allmählich und hervorgebracht durch solche wissenschaftliche Studien, bekommt die Pflanze Cannabis wieder einen ganz anderen Stellenwert. Es ist nicht mehr nur das Thema der Rauschdroge sondern vielmehr das Erkennen ihres Nutzen, das sich langsam wieder einstellt.

Viele Wissenschaftler, die sich mit dem medizinischen Einsatz von Cannabis oder deren synthetische Derivate beschäftigten, haben festgestellt, dass erfahrungsgemäß unterschiedliche Meinungen zu der Anwendungsart bestehen.

So zeigt sich dass, nicht zuletzt durch das noch immer bestehende „Schlechte Image“ von Cannabis, einige Ärzte, Therapeuten und auch Patienten ein standardisiertes, synthetisches Präparat bevorzugen.

*„Ein weiteres Beispiel mag erläutern, wie beim Thema Cannabis bestimmte Begriffe mit Vorstellungen und Emotionen assoziiert sind. Es war den zuständigen USamerikanischen Behörden in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts wichtig, dass Dronabinol im Medikament Marinol synthetisch hergestellt und nicht aus der Pflanze extrahiert wird. So konnte Marinol leichter auch von Personen emotional akzeptiert werden, für die Cannabiskonsum selbst dann ein Übel darstellte, wenn der Konsum medizinischen Zwecken diente.“*

*(Grotenhermen, 2004)*

Im Laufe der Geschichte der Cannabisforschung gab es oft Hinweise darauf, dass sich die Wirksamkeit und der therapeutische Nutzen dieser Pflanze nicht auf Einzelsubstanzen oder synthetische Derivate beschränken lassen (Williamson *et al*, 2000; Zurier R, 2003). Erfahrungsberichte Cannabis-nutzender Patienten und derer die ein synthetisches Derivat erhielten, zeigen auf, dass das Nebenwirkungspotential bei Anwendung der Pflanze selber, nicht so hoch ist wie bei der Anwendung synthetischer Derivate.

Ein anderer Aspekt ist ein Wirtschaftlicher, heute müssen Medikamente rigorose, teure und langwierige Tests durchlaufen, um die Zulassung von der zuständigen Behörde zu bekommen. Auf eine Pflanze hingegen kann kein Patent gelegt werden, was bedeutet dass eine Nutzung standardisierter Pflanzenextrakte die kostengünstigere Alternative wäre.

Unter allen diesen Gesichtspunkten, setzte sich das EU-Konsortium zum Ziel einen standardisierten Extrakt zu finden, der klare Aussagen in Studien möglich macht und der die Grundlage schafft für eine neue Generation von Medikamenten auf der Basis von Cannabis.

Die in dieser Arbeit verwendeten Cannabisextrakte, waren standardisierte Extrakte mit einem minimalen Gehalt an THC. Insofern sind die Ergebnisse in vielerlei Hinsicht von Interesse. Zum einen konnte gezeigt werden, dass für den entzündungshemmenden Effekt nicht alleine das THC verantwortlich ist und dass ein Vielstoffgemisch von Cannabis signifikante und bedeutsame Ergebnisse liefern konnte.

Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeit ist auch, die Ansatzstelle der Hemmung von PGE<sub>2</sub>. Anders als die NSAIDs scheint Cannabis die COX-2 nicht zu blockieren, sondern ihre Synthese zu stoppen somit findet hier eine Hemmung des PGE<sub>2</sub> Pathways auf transkriptioneller Ebene statt.

Die Hemmung der mPGES-1 Synthese ist ein weiteres sehr interessantes Ergebnis dieser Arbeit. Zukünftig könnte eine Hemmung der mPGES-1 Synthese ein spannendes Gebiet für weitere Forschung sein. Eine Hemmung der mPGES-1 würde ganz spezifisch und sehr selektiv in den PGE<sub>2</sub> Pathway eingreifen, ohne schon vorherige Enzyme zu blockieren oder deren Synthese zu hemmen, die im Organismus noch weitere physiologische Bedeutung haben, wie z.B. COX-2 und seine anderen Produkte wie das Thromboxan.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die bereits bestehenden Studien zum Thema „Cannabis als Medizin“ zeigen viel versprechende Ansätze auf, die sicher noch weiter zu verfolgen sind. Cannabis ist, trotz ihres noch immer schlechten Rufes, eine Heilpflanze die sicher viele Möglichkeiten der medizinischen Nutzung bringen kann.

*„Der größte Vorteil von Cannabis als Medikament ist seine ungewöhnliche Sicherheit. Das Verhältnis von tödlicher zu wirksamer Dosis beträgt nach Schätzungen anhand von Tierversuchsdaten bei oraler Aufnahme 20.000 zu 1, mindestens jedoch 1.000 zu 1. Es*



---

*gibt keinen zuverlässigen Hinweis für den Tod eines Menschen durch Marihuana-Konsum. Cannabis hat den Vorteil, keine physiologischen Funktionen zu stören oder Organe zu schädigen, wenn es in therapeutischer Dosierung eingenommen wird."*

(Dr. med. Franjo Grotenhermen, Hanf als Medizin)

Entscheidend für die Entwicklung ist, dass Hanf wieder in das Bewusstsein der Menschen rückt, als Pflanze mit einem Doppelleben, aber auch als ein Rohstoff mit viel Potential darüber hinaus.

#### **4.1.8. Cannabinoide in der Tiermedizin?**

Seit einigen Jahren zeichnet sich in der Tiermedizin, genau wie in der Humanmedizin, ein Trend in Richtung „Alternative Heilmethoden“ ab. Besitzer von kranken Tieren fragen immer mehr nach alternativen- oder naturheilkundlichen Therapien und sind an einer so genannten „Sanften Medizin“ interessiert. Somit erfreut sich auch die Phytotherapie immer größerer Beliebtheit. Allerdings darf dabei nicht vergessen werden, dass die Phytotherapie keineswegs immer nur „sanfte Medizin“ ist. Auch wenn sie ursprünglich ein wichtiger Bestandteil aller traditionellen medizinischen Systeme war, so ist sie ein gleichberechtigter Bestandteil der heutigen Medizin. Es besteht heute der Anspruch, auf Phytotherapeutika die gleichen Wissenschaftsmethoden wie auf synthetische Arzneimittel anzuwenden und somit die Phytotherapie als integralen Bestandteil einer modernen Pharmakotherapie zu betrachten. Auch wenn Phytotherapeutika häufig geringere Nebenwirkungen aufzeigen, und gut verträglich sind so sind sie doch hochpotente Arzneimittel und sollten auch als solche angesehen werden.

Nicht zuletzt entstanden auch die Arzneimittel der so genannten Westlichen Schulmedizin ursprünglich der Pflanzenheilkunde.

In der Geschichte der Tiermedizin wurden Heilpflanzen schon immer angewendet. Eine regelrechte Tiermedizin entstand, als militärische Erfolge von gesunden Pferden abhingen. Die alten „Stallmeister“ legten ihre Kenntnisse schriftlich nieder und begründeten so die moderne Tiermedizin. Nicht zuletzt hatten Heilpflanzen in diesen frühen Schriften für die Behandlung kranker Pferde einen großen Stellenwert. So taucht z.B. die Verwendung von Hanf schon in der pferdeheilkundlichen Handschrift des

Joachim Christoph Zachen aus dem 18. Jahrhundert auf. Hier wird die therapeutische Anwendung von Hanfsamen und Hanföl bei verschiedensten Indikationen beschrieben (Henn A., 1999).

Bisherige Studien in Bezug auf Cannabis und seine Anwendung an Tieren bezogen sich immer auf eine mögliche Toxizität der Pflanze für den Menschen (Janczyk *et al*, 2004). Cannabis als Therapeutikum hat in der Tiermedizin keine Bedeutung mehr.

Betrachtet man allerdings die Ergebnisse dieser Arbeit und auch sonstige schon bestehende Publikationen, so öffnet sich doch ein Feld, das auch tiermedizinisch interessant werden könnte.

Besonders die hier gefundene Hemmung der mPGES-1 Synthese könnte zukünftig einen Ansatz in der entzündungshemmenden Therapie darstellen.

Tiermedizinisch ist dies deshalb relevant, da in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte, dass der Gehalt an THC nicht ausschlaggebend für die Wirkung zu sein scheint.

Auch in Bezug auf die gerade heute immer mehr aufkommenden selektiven COX-2 Hemmer in der Tiermedizin. Coxibe, die allmählich immer mehr aus der Humanmedizin, aufgrund ihrer nicht zu verachtenden Nebenwirkungen, verschwinden, kommen jetzt immer häufiger in der Tiermedizin zum Einsatz.

So könnte Cannabis zukünftig auch für die Tiermedizin ein nicht uninteressantes Phytotherapeutikum darstellen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte im Rahmen eines EU-Projektes die entzündungshemmende Wirkung von Cannabisextrakten, die wenig bis kaum THC enthielten, untersucht werden. Hierzu wurden drei unterschiedlich hergestellte Cannabisextrakte an verschiedenen Zellmodellen (Mikroglia, Chondrozyten, SK-N-H-Zellen und Monozyten) mittels Enzyme-Immuno-Assay, Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay und Western Blot untersucht.

Es wurden die Wirkungen der Cannabisextrakte auf die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese, die Cyclooxygenase-2 -Protein-Synthese und auf die Freisetzung der Zytokine Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und den Tumornekrosefaktor- $\alpha$  untersucht.

Erstmals wurden in dieser Arbeit standardisierte Pflanzenextrakte mit sehr niedrigem THC Gehalt (< 0,3%) auf ihre entzündungshemmende Wirkung überprüft.

Die Versuche an den Mikrogliazellen zeigten bei allen drei Extrakten eine eindeutige Inhibition der PGE<sub>2</sub> Synthese. Auch die COX-2 Protein-Synthese wurde mit zunehmender Extraktdosierung gehemmt. Somit konnte gezeigt werden, dass die PGE<sub>2</sub> Synthese auf der Basis eines verminderten COX-2 Proteinspiegels blockiert wird. Durch weitere Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass sich dieser Effekt bis in die transkriptionelle Ebene verfolgen ließ. Indem eine Hemmung der JNK und der p42/44 Kinasen festgestellt wurde, war nun der Beweis für einen Angriff von Cannabis innerhalb des MAPK-Signaltransduktionsweges erbracht. Es wird die Prostaglandin Hemmung nicht enzymatisch (über eine Enzymblockierung, wie durch NSAIDs) sondern transkriptionell (über eine Synthesehemmung des Enzyms COX-2) vermittelt.

Alle drei Extrakte zeigten außerdem einen deutlich hemmenden Effekt auf die PGE<sub>2</sub> Synthese in Chondrozyten, Monozyten und SK-N-H-Zellen.

Hinsichtlich des Mechanismus der PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung gab es zellspezifische Abweichungen. So konnte in den Chondrozyten keine Hemmung der COX-2 Synthese ausgemacht werden. Hier scheint die PGE<sub>2</sub>-Hemmung über eine Inhibition der mPGES-1 reguliert zu werden. Hingegen verlief die PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung in den übrigen Zellen über eine Hemmung der COX-2 Protein Synthese.

Auch die Produktion von Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6 und dem TNF $\alpha$  wurde in Monozyten durch alle drei Cannabisextrakte gehemmt.

Es wurden zwei einzelne Cannabinoide (Cannabigerol, Cannabidiol), die in größerer Menge in den Extrakten vorhanden waren, in den Zellmodellen untersucht.

Eine PGE<sub>2</sub>-Synthesehemmung wurde bei einer Behandlung der Zellen mit Cannabigerol (CBG) und Cannabidiol (CBD) in jedem Versuch bestätigt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen hinsichtlich einer COX-2 Synthesehemmung, waren bei den Reinsubstanzen nicht einheitlich.

In den Mikrogliazellen konnte CBG eine leichte Hemmung der COX-2 Synthese aufzeigen. In den Monozyten zeigte CBG eine Hemmung der mPGES-1 bei einer vermehrten Synthese der COX-2. In den SK-N-H-Zellen konnte eine Inhibition der COX-2 durch das CBD nachgewiesen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass beide Cannabinoide zwar für den entzündungshemmenden Effekt mitverantwortlich sind, dass aber der Extrakt, der ein Vielstoffgemisch von Cannabis darstellt, in seiner Wirkung deutlichere und reproduzierbarere Ergebnisse brachte.

Dieses Ergebnis deckt sich mit dem, schon oft in der Literatur erwähnten Hinweis darauf, dass sich Cannabis in seiner Gesamtzusammensetzung als pharmakologisch deutlich wirksamer herausstellt.

Als weiteren, neuen Aspekt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für eine entzündungshemmende Wirkung das THC nicht alleine zuständig ist. Extrakte mit einem sehr geringen Gehalt an THC liefern eindeutige und interessante Ergebnisse, hinsichtlich einer entzündungshemmenden Wirkung und deren möglicher therapeutischer Nutzung.

## 6. Summary

In this study, which is a part of a project of the European Union, the anti-inflammatory effects of extracts of *Cannabis sativa* L. with a very low content of THC, were examined. Three varying extracts of cannabis were studied by the use of different cell models (microglia, chondrocytes, SK-N-H cells and monocytes) and their effects were analysed by enzymes immuno assay, enzyme linked immunosorbent assay and western blot. The proteins of interest were prostaglandin E2, cyclooxygenase- 2 and the cytokines interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumornecrosisfactor- $\alpha$ . For the first time standardized plant extracts with very low THC content (below 0.3%) were tested on their anti-inflammatory effects.

The investigations on the microglia cells have shown a clear inhibition of the PGE2 synthesis with all three extracts. Also the COX-2 synthesis has been increasingly restrained depending on the used dosages of the extract. Thus it could be propounded that the PGE2 synthesis, based on a decreased level of cyclooxygenase, has been blocked. By further investigations it was possible to point out, that this effect was traceable into the transcriptional level. As an inhibition of the JNK and the p42/44 kinases was determined, the evidence for an attack of cannabis within the MAPK cell signalling pathway could be supported. In this particular case the prostaglandin pathway is not interrupted enzymatically (by enzyme blocking as for example in NSAIDs) but its interruption seems to be transcriptionally.

In addition all three extracts have shown a clearly restraining effect on the PGE2 synthesis in chondrocytes, monocytes and SK-N-H cells.

Regarding the mechanism of the PGE2-synthesis inhibition, there were specific deviations in the different cell types. In chondrocytes no inhibition of the COX-2 could be constituted. In this particular case the PGE2 inhibition seems to be adjusted over an inhibition of the mPGES-1. Whereas the inhibition of PGE2 synthesis in the remaining cell types takes place with an inhibition from COX-2 protein.

Also the production of interleukin-1, interleukin-6 and the TNF $\alpha$  has been restrained in monocytes by all three extracts.

Two single cannabinoids (Cannabigerol and Cannabidiol), which the extract contains in higher abundances, were examined in all the present cell types.

A PGE2 inhibition was confirmed by a treatment of the cells with CBG and CBD in every test. The results of the western blot examinations, with regard to a COX2 synthesis blocking, were not uniform; in this case the CBG showed a slight inhibition of the COX2 synthesis in microglia cells.

In monocytes, CBG has shown an inhibition of the mPGES-1 synthesis and an increased synthesis of the COX-2. In the SK-N-H cells an inhibition of the COX-2 by the CBD was shown.

Hence it was possible to demonstrate that, although both cannabinoids are partly responsible for the anti-inflammatory effects, the whole plant extract may contain other unidentified active components as well. While the extract represents a number of substances, its effect is much more distinct and more reproducible than the effect of the individual substances. This coincides with the conclusions in other studies, that cannabis proves considerably more effective in its complete composition.

As a broader, new aspect it could be shown that the THC is not sole responsible for an anti-inflammatory effect. Extracts with a very low content of THC provide a clear and interesting results with regard to an anti-inflammatory effect and its possible therapeutically use.

## 7. Verzeichnisse

### 7.1. Literaturverzeichnis

- Achiron A., Miron S., Lavie V., Maqalit R., Biegon A., (2000)**  
Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis.  
*J Neuroimmunol* **3;102(1)**:26-31
- Akundi R.S., Candelario-Jalil E., Hess S., Hüll M., Lieb K., Gebicke-Haerter P.J., Fiebich B.L., (2005)**  
Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-activated primary rat microglia.  
*Glia* **51**:199-208
- Ameri A., Wilhelm A., Simmet T., (1999)**  
Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices.  
*Br J Pharmacol.* **126**:1831-1839.
- Augustin M., Hoch Y., (2004)**  
Einführung in die Phytotherapie. In: Augustin M., Hoch Y. (Hg.) Phytotherapie bei Hauterkrankungen.  
*Urban und Fischer, München, S.1-7*
- Baker D., Pryce G., Croxford J.L., (2001)**  
Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model.  
*FASEB J.* **15**:300-302
- Bakowski M.T., (1994)**  
Advances in anti-emetic therapy.  
*Cance. Treat. Rev* **11**:237-56
- Barret M.L., Gordon D., Evans F.J., (1985)**  
Isolation from Cannabis sativa L. of cannflavin - a novel inhibitor of prostaglandin production.  
*Biochem Pharmacol* **34**:2019-2024
- Barret M.L., Scutt A.M., Evans F.J., (1986)**  
Cannflavin A and B, prenylated flavones from Cannabis sativa L. *Experientia* **42**:452-453
- Bauer M.K., Lieb K., Schulze-Osthoff K., Berger M., Gebicke-Haerter P.J., Bauer J., Fiebich B.L., (1997)**  
Expression and regulation of cyclooxygenase-2 in rat microglia.  
*Eur J Biochem* **243**:726-731

- Ben Amar M.,** (2006)  
Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential.  
*J Ethnopharmacol* **05**:1-25
- Ben Amar, M.;** (2004)  
Pharmacology du cannabis et synthese des analyses des principaux comites d'experts. In: Ben Amar, M.;Cannabis. Drogues, Sante et Societe, Montreal, pp. 9- 60, [www.drogues-sante-societe.org](http://www.drogues-sante-societe.org)
- Bergstroem S., Danielsson H, Samuelsson B.,** (1964)  
The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid  
Prostaglandins and Related Factors 32.  
*Biochim Biophys Acta*, **90**:207-210
- Blumenthal M** (2003)  
Introduction. In: Blumenthal M, Hall T, Goldberg A, Kunz T, Dinda K (eds.)  
The ABC Clinical Guide to Herbs.  
American Botanical Council, Austin, pp.xvii-xxi
- Bos C.L., Richel D.J., Ritsema T., Peppelenbosch M.P. and Versteeg H.H.** (2004)  
Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction.  
*Int J Biochem Cell Biol* **36 (7)**:1187-1205
- Bosetti F., Langenbach R., Weerasinghe G.R.,** (2004)  
Prostaglandin E2 and microsomal prostaglandin E synthase-2 expression are decreased in the cyclooxygenase-2-deficient mouse brain despite compensatory induction of cyclooxygenase-1 and Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase A2.  
*J.Neurochem.* **91**:1389-97
- Brenneisen R,** (1995)  
Cannabis sativa – Aktuelle Pharmakologie und Klinik  
*Jahrbuch des Europäischen Kollegiums für Bewußtseinsstudien*:191-198
- Burstein S.,** (2005)  
Ajulemic acid (IP-751): synthesis, proof of principle, toxicity studies, and clinical trials.  
*Aaps J* **7**:E143-148
- Burstein, S.H., Audette, C.A., Breuer, A., Devane, W.A., Colodner, S., Doyle, S.A., Mechoulam, R.,** (1992)  
Synthetic nonpsychotropic cannabinoids with potent antiinflammatory, analgesic, and leukocyte anti-adhesion properties.  
*J Med Chem* **35**:3135-3141
- Cabral GA, Marciano-Cabral F,** (2005)  
Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance.  
*J of Leukocyte Biology* (**78**):1192-1197
-



- 
- Carlini E.A., Cunha J.A., (1981)**  
Hypnotic and anti epileptic effect of cannabidiol.  
*J.Clin. Pharmacol* (21):417-24
- Carlisle S.J., Marciano-Cabral F., Staab A., Ludwick C., Cabral G.A., (2002)**  
Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage- like cells in relation to cell activation.  
*Int Immunopharmacol.* 2:69-82.
- Caswell A., (1992)**  
Marijuana as medicine  
*J.Med. Aust.* (156):497-98
- Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L. (2002)**  
COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13926-13931
- Chang Y.H., Lee S.T., Lin W.W., (2001)**  
Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids.  
*J Cell Biochem* 81:715-723
- Chang, M. S., Chen, B. C., Yu, M. T., Sheu, J. R., Chen, T. F. & Lin, C. H. (2005)**  
Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-kappaB, but not p38 MAPK, pathways  
*Cell signalling* 17(3):299-310
- Clifford D.B., (1983)**  
Tetrahydrocannabinol for tremor in multiple sclerosis  
*Ann.Neurol* 665-71
- Dai Lu V., Vemuri K., Duclos R.I., Makriyannis A., (2003)**  
The Cannabinergic System as a Target for Anti-inflammatory Therapies Prospects for Cannabinoids as Anti-inflammatory Agents.  
*Journal of Cellular Biochemistry* 88:462-466
- Davis, R. J. (1999)**  
Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase  
*Biochem Soc Symp* 64:1-12
- Dent P., Yacoub A., Fisher P. B., Hagan M. P., Grant S., (2003)**  
MAPK pathways in radiation responses.  
*Oncogene* 22: 5885-5896
- DeWitt H., Wachtel S., (1999)**  
Comparison of whole plant marijuana in human volunteers  
*Symposium on the Cannabinoids* (6):18-20
-

- 
- Di Carlo G., Izzo A.A., (2003)**  
Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications.  
*Expert Opin Investig Drugs*. **12**:39-49
- Di Marzo V., (2006)**  
A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired  
by the work of British scientists.  
*Trends Pharmacol Sci* **27(3)**:134-140
- DiMarzo V., Melck D., Bisogno T., DePetrocellis L., (1998)**  
Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with  
neuromodulatory action.  
*Trends Neurosci* **21**:521-528
- Doblin R.E., Kleiman M.A., (1991)**  
Marijuana as antiemetic medicine: a survey of oncologists experience and  
attitude.  
*J.Clin. Oncol* (**9**):1314-9
- Elsner F., Radbruch L., Sabatowski R., (2001)**  
Tetrahydrocannabinol zur Therapie chronischer Schmerzen.  
*Der Schmerz* (**3**):200-204
- Emboden W. A., (1974)**  
Cannabis- A Polytypic Genus.  
*Economic Botany* (**28**): 204-310
- Emboden W. A., (1981)**  
The Genus Cannabis and the correct use of taxonomic categories.  
*Journal of psychoactive drugs* (**13**):15-21
- Evguenii V., Berdyshev B., Boichot E., Germain N., Allain N., Anger J.P., Lagente  
V., (1997)**  
Influence of fatty acid ethanolamides and D9-tetrahydrocannabinol on  
cytokine and arachidonate release by mononuclear cells.  
*Europ J Pharmacol* **330**:231-240
- Facchinetti F., Del Giudice E., Furegato S., Passarotto M., Leon A., (2003)**  
Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cell stimulated  
with lipopolysaccharide.  
*Glia* **41**:161-168
- Fairbairn J.W., Hindmarch I., Simic S., Tylden E., (1974)**  
Cannabinoid content of some English reefer  
*Nature* (**249**):277-8
- Fankhauser M., (1996)**  
Haschisch als Medikament.  
*Dissertation, Universität Bern*
-

- 
- Fiebich B.L., Butcher R.D., Gebicke-Haerter P.J., (1998)**  
Protein kinase C-mediated regulation of nitric oxide synthase expression in cultured microglia cells.  
*J Neuroimmunol* **92**: 170-178
- Formukong E.A., Evans A.T., Evans F.J., (1989)**  
The medicinal uses of cannabis and its constituents.  
*Phytoth Res* (**6**): 212-31
- Gaedcke S., (1999)**  
Ist die Qualität pflanzlicher Extrakte angemessen gesichert?  
*ZTP* **20**: 254-263
- Gaoni Y., Mechoulam R., (1964)**  
Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish.  
*J Am Chem Soc* **86**: 1646-1647
- Gebicke-Haerter P.J., Bauer J., Schobert A., Northoff H., (1989)**  
Lipopolysaccharide free conditions in primary astrocyte cultures allow growth and isolation of microglial cells.  
*J Neurosci* **9**:183-94
- Gertsch J., Schoop R., Kuenzle U., Suter A., (2004)**  
Alkylamides (alkamides) from Echinacea modulate tumor necrosis factor $\alpha$  mRNA expression in human monocytes/macrophages via the cannabinoid type 2 (CB2) receptor.  
*FEBS Lett.* **577**:563-569
- Grinspoon L., (1995)**  
Marihuana die verbotene Medizin.  
*Zweitausendeins Verlag*
- Grotenhermen F., (2004)**  
Cannabis und Cannabinoide  
*Huber Verlag, Bern*
- Hata A. N., Breyer R. M., (2004)**  
Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.  
*Pharmacol Ther* **103**:147-166
- Hefendehl F. W., Lander C., (1982)**  
Qualitätssicherung pflanzlicher Arzneimittel- Anforderungen bei der Zulassung.  
Aus: **Hanke G.,** Qualität pflanzlicher Arzneimittel. *Paperback APV*
- Heinrich P.C., Behrmann I., Haan S., Hermanns H.M., Müller-Newen G., Schaper F., (2003)**  
Principles of Interleukin (IL)-6-type signalling and its regulation.  
*Biochem J* **374**:1-20
-

- 
- Helliwell R.J., Adams L.F., Mitchell M.D.,** (2004)  
Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis.  
*Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **70 (2):**101-113
- Henn A.,** (1999)  
Über die pferdeheilkundliche Handschrift des Joachim Christoph Zachen aus dem 18. Jahrhundert nebst einer Würdigung des Georg Simon Winter von Adlersflügel.  
*Dissertation Berlin*
- Herer J.,** (1993)  
Die Wiederentdeckung der Nutzpflanze Hanf.  
*Cannabis Marihuana, Frankfurt a.M.* Verlag Zweitausendeins
- Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C.,** (1990)  
Cannabinoid rezeptor localisation in brain.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **87:**1932-1936
- Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., de Costa B.R., Rice K.C.,** (1991)  
Charakterization and localisation of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.  
*J Neurosci* **11:**563-583
- Herschman, H. R.** (1996)  
Prostaglandin synthase 2.  
*Biochim Biophys Acta* **1299,** 125-140
- Hollister L. E.,** (1986)  
Health Aspects of Cannabis.  
*Pharmacological Review* **28(1):** 1-20
- Inoue H., Tanabe T.,** (1998)  
Transcriptional role of the nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethason of cyclooxygenase-2 in U937 cells  
*Biochem Biophys Res Commun* **244:**143-148
- Iversen L., Chapman V.,** (2002)  
Cannabinoids: a real prospect for pain relief?  
*Curr Opin Pharmacol.* **2:**50-55
- Jakobsson P.J., Thoren S., Morgenstern R. and Samuelsson B;** (1999)  
Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* (**13**):7220-7225
- Janczyk P., Donaldson C.W., Gwaltney S.,** (2004)  
Two hundred and thirteen cases of marijuana toxicoses in dogs.  
*Vet Hum Toxicol* **46(1):**19-21
-

- Jiang W., Zhang Y., Xiao L., Van Cleemput J., Ji S.P., Bai G., Zhang X., (2005)**  
Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects.  
*J Clin Invest* **115(11)**:3104-3116
- Klegeris A., Bissonette C.J., McGeer P.L., (2003)**  
Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor.  
*Br J Pharmacol.* **139**:775-786.
- Klein T.W., (2005)**  
Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics.  
*Nat Rev Immunol.* **5**:400-411
- Konanz S., (2006)**  
Immunmodulation durch Delta-9-Tetrahydrocannabinol in der perioperativen Schmerztherapie.  
*Diss Med Fakultät Ulm*
- Korotkova M., Westman M., Gheorghe K.R., af Klint E., Trollmo C., Ulfgren A.K., Klareskog L. and Jakobsson P.J. (2005)**  
Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway.  
*Arthritis* **52 (11)**:3439-3447
- Kress H.G., Kraft B., (2007)**  
Pflanzliche Cannabinoide, möglicher Stellenwert bei rheumatischen Erkrankungen.  
*Rheuma Plus* **6 (2)** aus: Ärzte Woche online
- Kreutz S., Korf H.W., Schubert-Zsilavec M., (2006)**  
Selective cannabinoid receptor antagonists.  
*Pharm Unserer Zeit.* **35**:512-520
- Kreutzberg G.W., (1996)**  
Microglia: a sensor for pathological events in the CNS.  
*Trends Neurosci.* **19**:312-318
- Laemmli U.K., (1970)**  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature* **227**: 680-5
- Lazarus M., Munday C.J., Eguchi N., Matsumoto S., Killian G.J., Kubata B.K., Urade Y., (2002)**  
Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs.  
*Endocrinology* **143**:2410-9
-

- 
- Lehmann T.**, (1995)  
Chemische Profilierung von Cannabis sativa L.  
*Dissertation, Pharmazeutisches Institut Universität Bern*
- Levy G. N.**, (1997)  
Prostaglandin H synthases, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and colon cancer.  
*Faseb J 11*: 234-247
- Liu L.L., Wartmann M., Lin A.Y., Knopf J., Seth A., Davis R.J.**, (1993)  
cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase.  
*Cell 72*: 269
- Liu W., Reinmuth N., Stoeltzing O., Parikh A.A., Tellez C., Williams S., Jung Y.D., Fan F., Takeda A., Akagi M., Bar-Eli M., Gallick G.E., Ellis L.M.**, (2003)  
Cyclooxygenase-2 is upregulated by interleukin-1 beta in human colorectal cancer cells via multiple signaling pathways.  
*Cancer Res 63*: 3632-3636
- Mackie K., Devane W.A., Hille B.**, (1993)  
Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells.  
*Mol Pharmacol 44*:498-503
- Mackie K., Stella N.**, (2006)  
Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players.  
*AAPS J. 8*:E298-306
- Malfait A.M., Gallily R., Sumariwalla P.F.**, (2000)  
The nonpsychoactive Cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis.  
*Proc Nat Acad Sci USA 97*:9561-9566
- Maresz K., Carrier E. J., Ponomarev E.D., Cecilia J., Dittel H., Dittel B.N.**, (2005)  
Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to In a mammatory stimuli.  
*Journal of Neurochemistry 95*:437-445
- Martin W. J.**, (1999)  
Basic Mechanism of Cannabinoid-Induced Analgesia,  
*IASP Newsletter*
- Mathre M. L.**, (1998)  
Cannabis in medical practice.  
*McFarland&Company, North Carolina*
- Mbvundula E.C., Bunning R.A., Rainsford K.D.**, (2006)  
Arthritis and cannabinoids: HU-210 and Win-55,212-2 prevent IL-alpha induced matrix degradation in bovine articular chondrocytes in-vitro.  
*J Pharm Pharmacol 58(3)*:351-358
-

- 
- McPartland J.**, (2000)  
Advantages of polypharmaceutical herbal Cannabis compared to single-ingredient, synthetic tetrahydrocannabinol.  
*Bioresource Hemp*, Aus: Presentation for Nova-Institute "Online-Proceedings"
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO**, (2007)  
Cannabidiol-Recent Advances.  
*Chemistry&Biodiversity* **(8)**:1678-1692
- Mechoulam R.**, (1970)  
Marihuana chemistry.  
*Science* **168**: 1159-1166
- Mikuriya T.H.**, (1973)  
Marijuana.  
*Medical papers* 1839-1972. Oakland CA
- Mikuriya T.H.**, (1982)  
Die Bedeutung des Cannabis in der Geschichte der Medizin.  
Aus : **Burian W., Eisenbach-Stangl I.**, Haschisch : Prohibition oder Legalisierung. Beltz, Weinheim
- Minghetti L., Levi G.**, (1995)  
Induction of biosynthesis by bacterial lipopolysaccharide and isoprostol in rat microglia cultures.  
*J Neurochem* **65**: 2690-2689
- Misner D.L., Sullivan J.M.**, (1999)  
Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons.  
*J Neurosci.* **19**:6795-6805
- Mitchell V.,Aslan S., Safae S., Vaughan C.W.**, (2005)  
Effect of the Cannabinoid ajulemic acid on rat models of neuropathic and inflammatory pain.  
*Neuroscience Letters* **382**: 231-235
- Murakami M., Nakashima K., Kamei D., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Ohmiya Y., Watanabe K;** (2003)  
Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2.  
*J Biol Chem* **278 (39)**:37937-37947
- Murakami M., Nakatani Y., Tanioka T., Kudo I.**, (2002)  
Prostaglandin E synthase.  
*Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**:383-399
-

- 
- Murakami M., Naraba H., Tanioka T., Semmyo N., Nakatani Y., Kojiima F., Ideka T., Fueki M., Ureno A., Oh S., Kudo I., (2000)**  
Regulation of prostaglandinE2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase2.  
*J Biol. Chem.* **275**:32783-92
- Murphy L., Andrzej B., (1992)**  
Marijuana/Cannabinoids: Neurobiology and Neurophysiology.  
*Boca Raton: CRC Press*
- O'Shaughnessey W.B., (1838-1840)**  
On the Preparations of the Indian Hemp, or Gunjah (*Cannabis indica*): The Effects on tehe Animal System in Health, and their utility in the treatment of Tetanus and other convulsive disease.  
*Transaction of the Medical and Physical Society of Bengal (1838-1840)*:421-461
- Ong WY, Mackie K, (1999)**  
A light and electron microscopic study of the CB1 cannabinoid receptor in primate brain.  
*Neurosci* **92**:1177-1191
- Pertwee R., (2005)**  
Cannabinoids.  
*Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*
- Pettit D.A.D., Harrison M.P., Olson J.M., Spencer R.F., Cabral G.A., (1998)**  
Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid rezeptor in rat brain.  
*J Neurosci Res* **51**:391-402
- Pinheiro de Oliveira A.C., Candelario-Jalil E., Bhatia H.S., Lieb K., Hüll M., Fiebich B.L., (2008)**  
Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> synthase expression in activated primary rat microglia: Evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2  
*Glia (noch im Druck)*
- Puffenbarger R.A., Boothe A.C., Cabral G.A., (2000)**  
Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells.  
*Glia.* **29**:58-69.
- Ramos J. A., Gonzales S., Sagredo O., Gomez-Ruiz M., Fernandez-Ruiz J., (2005)**  
Therapeutic Potential of the Endocannabinoid System in the Brain.  
*Mini Rev Med Chem*,**5**(7):609-617
- Randall M.D., Harris D., Kendall D.A., Ralevic V., (2002)**  
Cardiovascular effects of cannabinoids.  
*Pharmacol Ther.* **95**:191-202
-



- 
- Razdan R.K.**, (1986)  
Structure-activity relationship in cannabinoids.  
*Pharmacol Rev* (38):75-149
- Rivest S., Lacroix S., Vallières L., Nadeau S., Zhang J., Laflamme N.**, (2000)  
How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli.  
*Proc Soc Exp Biol Med* 223(1):22-38
- Robinson, D.R., Dayer, J.M., and Krane, S.M.** (1979)  
Prostaglandins and their regulation in rheumatoid inflammation.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 332:279-94
- Rosch S., Ramer R., Brune K., Hinz B.**, (2005)  
Prostaglandin E(2) induces cyclooxygenase-2 expression in human non-pigmented ciliary epithelial cells through activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases.  
*Biochem Biophys Res Commun* 338:1171-1178
- Ross S. ElSohly MA.**, (1995)  
Constituents of Cannabis sativa L. A review of the natural constituents.  
*Zagazig J Pharm Sci.* 4 (2): 1-10
- Russo E.**, (1998)  
Cannabis for migraine treatment: the once and future prescription? An historical and scientific review.  
*Pain* 76: 3-8
- Schneider A., Zhang Y., Zhang M., Lu W.J., Rao R., Fan X., Redha R., Davis L., Breyer R., Harris R., Guan Y., Breyer M.D.**, (2004)  
Membrane-associated PGESynthase-1 (mPGES-1) is coexpressed with both COX1 and COX2 in the kidney.  
*Kidney Int.* 65:1205-13
- Schultes, R.E., William M. Klein, Timothy Plowman, Tom E. Lockwood;** (1975)  
Cannabis: An Example of Taxonomic Neglect.  
*Cannabis and Culture:* 21-38
- Smith W. L., DeWitt D. L., Garavito R. M.**, (2000)  
Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology.  
*Annu Rev Biochem* 69:145-182
- Springer A.**, (1982)  
Zur Kultur- und Zeitgeschichte des Cannabis.  
*Aus* : **Burian W., Eisenbach-Stangl I.**, Haschisch : Prohibition oder Legalisierung. Beltz, Weinheim
-

- 
- Stanczyk J., Kowalski M.L.,** (2001)  
The role of cyclooxygenase and prostaglandins in the pathogenesis of rheumatoid arthritis.  
*Pol.Merkuriusz.Lek.***11**:438-443.
- Stella N.,** (2004)  
Cannabinoid signaling in glia cells.  
*Glia* **48**:267-277
- Stichtenoth D.O., Thoren S., Bian H., Peters-Golden M., Jakobsson P.J., Crofford L.J.,** (2001)  
Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells.  
*J Immunol* **167** (1):469-474
- Subbaramaiah, K., Norton, L., Gerald, W. & Dannenberg, A. J** (2002)  
Cyclooxygenase- 2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3.  
*J Biol Chem* **277**, 18649-18657
- Sugiura T., Kobayashi Y., Oka S., Waku K.,** (2002)  
Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance.  
*Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**:173-92
- Susanne Kreutz, Marco Koch, Chalid Ghadban, Horst-Werner Korf, Faramarz Dehghani;** (2006)  
Cannabinoids and neuronal damage: Differential effects of THC, AEA and 2-AG on activated microglial cells and degenerating neurons in excitotoxically lesioned rat organotypic hippocampal slice cultures.  
*Exper Neurology* **203**(1):246-257
- Tanikawa N., Ohmiya Y., Ohkubo H., Hashimoto K., Kangawa K., Kojima M., Ito S., Watanabe K.,** (2002)  
Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase.  
*Biochem.Biophys.Res. Commun.***291**:884-9
- Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M. and Kudo I.** (2000)  
Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis.  
*J Biol Chem* **275** (42):32775-32782
- Thomas A., Baillie G.L., Phillips A.M., Razdan R.K., Ross R.A., Pertwee R.G,** (2007)  
Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonist in vitro.  
*British J of Pharmacology* (150):613-623
-

- 
- Thoren S., Jakobsson P.J;** (2000)  
Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4.  
*Eur J Biochem* **267** (21):6428-6434.
- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M.,** (1998)  
Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system.  
*Neurosci* **83**:393-411
- Turner C.E., ElSohly M.A., Boeren E.,** (1980)  
Constituent of Cannabis sativa L. A review of the natural constituents.  
*J Nat Prod* (2):169-234
- Van der Stelt M., Di Marzo V.,** (2003)  
The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders.  
*Eur J Pharmacol.* **480**:133-150
- Varga K., Wagner J.A., Bridgen D.T., Kunos G.,** (1998)  
Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension.  
*Faseb J* **12**:1035-1044
- Velasco G., Galve-Roperh I., Sanchez C., Blazquez C., Guzman M.,** (2004)  
Hypothesis. Cannabinoid therapy for the treatment of gliomas?  
*Neuropharmacology* **47**(3):315-323
- Wagner J.A., Varga K., Ellis E.F., Rzigalinski B.A., Martin B.R., Kunos G.,**(1997)  
Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock.  
*Nature* **390**:518-521
- Wallace J.M., Tashkin D.P., Oishi J.S., Barbers R.G.** (1988)  
Peripheral blood lymphocyte subpopulations and mitogen responsiveness in tobacco and marijuana smokers.  
*J Psychoact Drugs*, **20**: 9-14
- Walter L., Franklin A., Wittling A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K., Stella N.,** (2003)  
Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration.  
*J Neurosci* **23**:1398-1405
- Walter L., Stella N.,** (2004)  
Cannabinoids and neuroinflammation.  
*British J Pharmacol* **141**:775-785
-

- Weiss R.F., Fintelmann V.,** (2006)  
Lehrbuch der Phytotherapie,  
*Hippokrates Verlag*
- Williamson E.M., Evans F.J.,** (2000)  
Cannabinoids in Clinical Practice.  
*Drugs* **60 (6):** 1303-1314
- Wilson R.I., Nicoll R.A.,** (2002)  
Endocannabinoid signaling in the brain.  
*Science* **296:**678-688
- Wotjak C.T.,** (2005)  
Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality.  
*Mini Rev Med Chem.* **5:**659-670
- Xie W., Shipman J.G., Roberson D.L., Eriksen R.L., Simmons D.L.,** (1991)  
Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing.  
*Proc Natl Acad Sci* (**88**):2692
- Yan, X., Wu Xiao, C., Sun, M., Tsang, B. K. & Gibb, W.** (2002)  
Nuclear factor kappa B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1beta.  
*Biol Reprod* **66,** 1667-1671
- Yang S. H., Whitmarsh A. J., Davis, R. J., Sharrocks A. D.,** (1998)  
Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1.  
*Embo J* **17:**1740-1749
- Zalish M., Lavie V.,** (2003)  
Dexanabinol (HU-211) has a beneficial effect on axonal sprouting and survival af  
*Vision Res* **43:**237-242
- Zurier R.B.,** (2003)  
Prospects for Cannabinoids as Anti-inflammatory Agents.  
*Journal of Cellular Biochemistry* (**88**):462-466

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AEA	Arachidonyldopamin
AK	Antikörper
AP 1	activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	bovines Serumalbumin
CB1	Cannabinoid Rezeptor 1
CB2	Cannabinoid Rezeptor 2
CBD	Cannabidiol
CBG	Cannabigerol
CD 14	CD14 Rezeptor (CD von Cluster of differentiation)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
dd	doppel destiliert
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure (engl.: ethylene diamine tetracetic acid)
EIA	Enzyme-Immunsorbent Assay
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EP 1-4	Prostaglandin E Rezeptor 1-4
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
FBS	Fetal Bovine Serum
G-Protein	heterotrimeres GTP-bindendes Protein
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
IL-1 $\beta$ / 6	Interleukin-1 $\beta$ / 6
JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-aktivierte Protein Kinase
MEM	Minimal Essential Medium
mPGEs1	membrangebundene Prostaglandin Synthase 1
NaCl	Natrium Chlorid
NADA	Anandamid
NF-kB	Nukleärer Faktor kappa B
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin 2
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
SDS-	
PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE11	Cannabisextrakt SE11
SE14	Cannabisextrakt SE14
SE14h	Cannabisextrakt SE14h
SK-N-SH	Human neuroblastoma cell line

---

TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THC	Tetrahydrocannabinol
TLR	Toll-like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

### **7.3. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen**

#### **7.3.1. Abbildungen**

Abb.1:	Inserat zum Arzneimittel "Cannabin" der Firma Merck um 1885, Darmstadt	4
Abb.2:	„Medicina Antiqua“ aus dem 9.Jahrhundert	5
Abb.3:	Altes Werbeschild aus Deutschland	5
Abb.4:	Smith E.W; In: Schultes Richard Evans, Hofmann Albert: "Pflanzen der Goetter", Hallwag AG, 2. Aufl., Bern, 1987	6
Abb.5:	Pate, DW (1994) Chemical ecology of Cannabis. Journal of the International Hemp Association 2: 29, 32-37	10
Abb.6:	Schema der Arachidonsäurekaskade	18
Abb.7:	Cannabigerol	30
Abb.8:	Cannabidiol	30
Abb.9:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen	46
Abb.10:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen	47
Abb.11:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen	47
Abb.12:	Inhibition der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Mikrogliazellen durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot	48
Abb.13:	Cannabisextrakt SE14 inhibiert in LPS-induzierten Mikroglia die Kinasen JNK und p42/44	50
Abb.14:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten	51

---

---

Abb.15:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten	51
Abb.16:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten	52
Abb.17:	Reaktion der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Monozyten durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot	53
Abb.18:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	54
Abb.19:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	54
Abb.20:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	55
Abb.21:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten	56
Abb.22:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	56
Abb.23:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	57
Abb.24:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor- Synthese in Monozyten	58
Abb.25:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor- Synthese in Monozyten	58
Abb.26:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor- Synthese in Monozyten	59
Abb.27:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten	60
Abb.28:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten	60
Abb.29:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten	61
Abb.30:	Inhibition der IL-1 $\beta$ induzierten mPGEs1 Synthese in Chondrozyten durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot, bei gleichzeitiger Expression der COX-2 Synthese durch Cannabisextrakte	62

---

---

Abb.31:	Der Cannabisextrakt SE11 inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen	63
Abb.32:	Der Cannabisextrakt SE14 inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen	63
Abb.33:	Der Cannabisextrakt SE14h inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen	64
Abb.34:	Reaktion der IL-1 $\beta$ induzierten COX-2 Synthese in SK-N-H Zellen durch Cannabisextrakte (SE11, SE14, SE14h) im Western Blot	65
Abb.35:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen	66
Abb.36:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Mikrogliazellen	67
Abb.37:	Reaktion der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Mikroglia durch Cannabinoide, Cannabigerol und Cannabidiol, im Western Blot	68
Abb.38:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten	69
Abb.39:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte PGE2 Synthese in Monozyten	69
Abb.40:	Expression der LPS-induzierten COX-2 Synthese in Monozyten durch Cannabigerol im Western Blot, bei gleichzeitiger Inhibition der mPGEs1 durch Cannabigerol	70
Abb.41:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	71
Abb.42:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-1 Synthese in Monozyten	72
Abb.43:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten	72
Abb.44:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Interleukin-6 Synthese in Monozyten	73
Abb.45:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor- Synthese in Monozyten	74
Abb.46:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die LPS-induzierte Tumornekrosefaktor- Synthese in Monozyten	74
Abb.47:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen.	75

---



---

Abb.48:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE2 Synthese in SK-N-H Zellen	76
Abb.49:	Inhibition der IL-1 $\beta$ induzierten COX-2 Synthese in SK Zellen durch Cannabidiol im Western Blot. Keine eindeutige Reaktion bei Cannabigerol	77
Abb.50:	Das Cannabinoid Cannabigerol inhibiert die IL-1 $\beta$ induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten	78
Abb.51:	Das Cannabinoid Cannabidiol inhibiert die IL-1 $\beta$ -induzierte PGE2 Synthese in Chondrozyten	78

### 7.3.2. Tabellen

Tab.1:	Inhaltsstoffe in Cannabis sativa L. aus Grotenhermen (2004) „Cannabis und Cannabinoide“, Hans Huber Verlag	8
Tab.2:	Mischung der Gele in der Gelelektrophorese	33
Tab.3:	verwendete Primärantikörper	35
Tab.4:	verwendete Sekundärantikörper	36
Tab.5:	verwendete Reagenzien	38-39
Tab.6:	verwendete Stimulantien	39
Tab.7:	verwendete kommerzielle Kits	40
Tab.8:	verwendete Antikörper	40
Tab.9:	verwendete Geräte	40-41
Tab.10:	PGE2 Synthese in LPS-induzierten und mit Cannabisextrakten inkubierten Mikrogliazellen	83

## **8. Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Herr Dr. Bernd Fiebich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, seinen jederzeit gewährten, fachlichen Rat und seine freundliche, persönliche Unterstützung und Motivation bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Ganz herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. W. Schmahl für die Übernahme und Vorlage der Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Brigitte Günther, Frau Ulrike Goetzinger-Berger und Antonio De Pinheiro für ihren fachlichen Rat und die freundliche Unterstützung bei der Laborarbeit, sowie an das ganze freundliche Laborteam für das nette Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön an meinen lieben Patrick, der mich immer unterstützt und immer für mich da ist. Danke!

Mein herzlichster Dank gilt meiner Mutter und Günter Debus, die mir durch ihre großzügige Unterstützung ermöglichen, meine Ziele zu verwirklichen.