

Universität Rostock
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie
Direktorin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

**Der Einfluss von Cannabinoiden auf humane Thrombozyten
und die mikrovaskuläre Thrombogenese
im Ohrmodell der haarlosen Maus**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

vorgelegt von
Daniel Fabian Strüder geboren am 26. Mai 1986 in Neuss

Rostock 2016

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachten: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachten: Prof. Dr. rer. nat. Beat Lutz, Institut für Physiologische Chemie, Universitätsmedizin Mainz

Tag der Einreichung: 15.08.2016

Tag der Verteidigung: 13.02.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 1 -
2	Abstract	- 3 -
3	Glossar	- 5 -
4	Einleitung.....	- 7 -
4.1	Thrombogenese.....	- 7 -
4.1.1	Klinische Bedeutung der Thrombose.....	- 7 -
4.1.2	Physiologie der Hämostase	- 9 -
4.1.3	Primäre Hämostase	- 10 -
4.1.4	Sekundäre Hämostase	- 17 -
4.2	Cannabinoide.....	- 18 -
4.2.1	Geschichte des Cannabis in der Medizin	- 19 -
4.2.2	Klinischer Einsatz von Cannabinoiden	- 20 -
4.2.3	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Cannabinoiden.....	- 23 -
4.2.4	Das endogene Cannabinoidsystem.....	- 24 -
4.3	Der Einfluss von Cannabinoiden auf das Gefäßendothel	- 29 -
4.4	Der Einfluss von Cannabinoiden auf die Thrombozyten.....	- 30 -
5	Zielstellung	- 33 -
6	Material und Methoden.....	- 34 -
6.1	Chemikalien	- 34 -
6.2	<i>In vivo</i> -Versuche	- 35 -
6.2.1	Tiermodell	- 35 -
6.2.2	Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion	- 40 -
6.2.3	Versuchsgruppen.....	- 42 -
6.3	<i>In vitro</i> -Versuche	- 45 -
6.3.1	Blutentnahme und Herstellung des plättchenreichen Plasmas	- 45 -
6.3.2	Durchflusszytometrie	- 47 -
6.4	Statistische Analyse	- 48 -
7	Ergebnisse.....	- 49 -

7.1	<i>In vivo</i> -Versuche	- 49 -
7.1.1	Akute Cannabinoidexposition	- 50 -
7.1.2	Akute Cannabinoidexposition mit Cyclooxygenase-Inhibition	- 51 -
7.1.3	Repetitive Cannabinoidexposition	- 53 -
7.2	<i>In vitro</i> -Versuche	- 55 -
7.2.1	P-Selektin-Expression	- 55 -
7.2.2	Thrombozytenzahl	- 59 -
8	Diskussion	- 61 -
8.1	Diskussion von Material und Methoden	- 61 -
8.1.1	Versuchstiere	- 61 -
8.1.2	Narkose	- 61 -
8.1.3	Ohrmodell der haarlosen Maus	- 62 -
8.1.4	Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion	- 63 -
8.1.5	Durchflusszytometrie	- 66 -
8.1.6	Versuchssubstanzen.....	- 66 -
8.2	Diskussion der Ergebnisse	- 72 -
8.3	Schlussfolgerung	- 85 -
9	Anhang	- 86 -
10	Literaturverzeichnis	- 88 -
11	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	- 104 -
11.1	Abbildungen	- 104 -
11.2	Tabellen.....	- 106 -
12	Lebenslauf.....	- 106 -
13	Danksagung	- 107 -
14	Eidesstattliche Erklärung	- 111 -

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Obwohl Cannabinoide aufgrund ihrer pleiotropen Effekte intensiv erforscht und bereits in der Klinik eingesetzt werden, ist ihre Wirkung auf die Thrombozyten und die Thrombogenese nicht abschließend untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, mit etablierten Methoden *in vitro* und erstmals *in vivo* den Effekt des endogenen Cannabinoids Anandamid (AEA), des phytogenen Cannabinoids Cannabidiol (CBD) und des synthetischen Cannabinoids WIN55,212-2 auf die Thrombogenese zu untersuchen.

Material & Methoden: Der Einfluss von Anandamid, Cannabidiol und WIN55,212-2 auf die venuläre Thrombogenese wurde intravitalmikroskopisch im Ohr der haarlosen Maus untersucht. Die Cannabinoidbehandlung wurde einmalig oder an drei aufeinander folgenden Tagen durch i.p.-Injektion der Cannabinoide durchgeführt. Die Thrombosen wurden phototoxisch durch Blaulicht-Epi-Illumination des i.v.-applizierten Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Dextran induziert. Um eine Wirkung von Anandamid und seiner Metabolite unterscheiden zu können, wurde die Degradation von Anandamid zu Thromboxan A₂ durch unspezifische Hemmung der Cyclooxygenase mit Indomethacin inhibiert.

In vitro wurde durchflusszytometrisch die P-Selektin-Expression als Aktivitätsmarker humaner Thrombozyten in plättchenreichem Plasma gemessen. Ruhende Thrombozyten wurden nach Cannabinoidbehandlung untersucht oder im Anschluss an die Cannabinoidbehandlung mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid stimuliert und dann analysiert.

Ergebnisse: Anandamid, nicht aber WIN55,212-2 und Cannabidiol, beschleunigte *in vivo* signifikant die venuläre Thrombogenese nach akuter Exposition im Vergleich zur Vehikelgruppe. Co-Medikation der Versuchstiere mit Indomethacin neutralisierte den prothrombogenen Effekt von Anandamid. Die Behandlung der Versuchstiere mit den

Cannabinoiden über drei Tage mit 24 Stunden Abstand zur Thromboseinduktion beeinflusste die Gefäßverschlusszeit hingegen nicht im Vergleich zur Vehikelgruppe.

In vitro aktivierte Anandamid in hohen Konzentrationen ruhende Thrombozyten. Allerdings verminderte Anandamid auch die Aktivität von TRAP-stimulierten Thrombozyten. Es kam zusätzlich zu einer Reduktion der Thrombozytenzahl. WIN55,212-2 und Cannabidiol beeinflussten die Thrombozytenaktivität nicht.

Schlussfolgerung: Akute Behandlung mit dem endogenen Cannabinoid Anandamid bewirkt *in vivo* einen Cyclooxygenase-abhängigen prothrombogenen Effekt. *In vitro* scheint Anandamid die Thrombozytenaktivität konzentrationsabhängig durch einen zytotoxischen Effekt zu beeinflussen. Eine Behandlung mit dem phytogenen Cannabinoid Cannabidiol und dem synthetischen Cannabinoid WIN55,212-2 hatte keinen Einfluss auf die Thrombogenese und die Thrombozytenaktivität.

2 Abstract

Purpose: Although cannabinoids are well studied for their pleiotropic actions, their effects on platelet activity and thrombosis are still a matter of debate. The present study therefore analyzed the impact of the endocannabinoid anandamide, the phytocannabinoid cannabidiol and the synthetic cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 on platelet activity *in vitro* and thrombogenesis for the first time *in vivo*.

Methods: The effects of anandamide, cannabidiol and WIN55,212-2 on venular thrombosis were studied in the ear of hairless mice. Cannabinoid treatment was performed intraperitoneally either once or repetitive by a once-daily administration for three days prior to thrombus induction. Thrombosis was induced photochemically using light/dye exposure. To assess the role of cyclooxygenase metabolites in the putative action of anandamide, *in vivo* studies likewise included a combined administration of anandamide with the nonselective cyclooxygenase inhibitor indomethacin.

In vitro, the effect of the three cannabinoids on human platelet activation was studied by means of P-selectin expression using flow cytometry. Therefore, platelets were analysed under resting or thrombin receptor activating peptide (TRAP)-stimulated conditions, both after cannabinoid treatment alone and after TRAP stimulation and subsequent cannabinoid exposure. Finally, platelet count was assessed after treatment with high concentrations of anandamide.

Results: Anandamide, but not cannabidiol and WIN55,212-2, significantly accelerated thrombus growth after one-time treatment as compared to vehicle control. Co-administration with indomethacin neutralized this effect. However, thrombogenesis was not altered by prolonged treatment with the cannabinoids. *In vitro*, anandamide was shown to elicit a concentration-dependent activation of resting human platelets. However, at higher concentrations anandamide reduced the response to TRAP activation associated with a decrease of platelets. Cannabidiol and WIN55,212-2 neither increased nor reduced activation of platelets.

Conclusion: Acute exposure to the endocannabinoid anandamide elicits a cyclooxygenase-dependent pro-thrombotic effect *in vivo*. *In vitro*, anandamide seems to affect human platelet activation by a concentration dependent toxic effect. By contrast, the phytocannabinoid cannabidiol and the synthetic cannabinoid WIN55,212-2 were not associated with induction of thrombosis or activation of platelets.

3 Glossar

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of Variance
BtmG	Betäubungsmittelgesetz
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calciumionen
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii; und andere
FeCl ₃	Eisen (III)-Chlorid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gramm
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
Indo	Indomethacin
ip.	Intraperitoneal
iv.	Intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L	Liter
M	Mol
M.	Musculus
Mb.	Morbus
Mfs	Mittlerer Fluoreszenzshift
Mg	Milligramm
Min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid, 0,9%
N	<i>Number</i> , Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
P	statistisches Signifikanzniveau
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGI ₂	Prostazyklin
PRP	Plättchenreiches Plasma
Rpm	Umdrehungen pro Minute
Sec	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Factor
THC	Tetrahydrocannabinol
TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
vs	versus
vWF	von Willebrand Faktor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
°C	Grad Celsius

4 Einleitung

4.1 Thrombogenese

4.1.1 Klinische Bedeutung der Thrombose

Die Thrombose ist definiert als lokalisierte Blutgerinnung in einem Gefäß oder im Herz (Herold 2014). Man unterscheidet anhand ihrer Lokalisation arterielle und venöse Thrombosen, sowie Thrombosen der Makrozirkulation und Mikrozirkulation.

Die Inzidenz der venösen Thrombose ist mit 1/1000 Einwohner in Industrienationen trotz verbesserter Therapie weiterhin hoch. Ein Drittel der venösen Thrombosen tritt als Lungenembolie in Erscheinung (White 2003).

Arterielle Thrombosen spielen bei kardiovaskulären Erkrankungen, der häufigsten Todesursache in Industrienationen, eine entscheidende Rolle. Sie manifestieren sich meist auf dem Boden eines atherosklerotischen Endothelschadens als Myokardinfarkt, Mesenterialinfarkt, akuter Arterienverschluss in den Extremitäten, Niereninfarkt oder Hirninfarkt (Ruggeri et al. 2002; Herold 2014).

Auch im Rahmen von chirurgischen Eingriffen stellt die Thrombose ein großes Problem dar. Bei jeder Operation kommt es zum Kontakt von Blutbestandteilen mit subendothelialen Strukturen, Veränderung des Blutflusses und zur Immobilisation des Patienten. So sind Thrombosen vor allem bei endoprothetischen Eingriffen an der unteren Extremität und nach Organ- und Hautlappentransplantationen eine gefürchtete und häufige Komplikation (Khoury 1992; Hidalgo et al. 1998; Geerts et al. 2001; Bui et al. 2007; Chang et al. 2011; Li et al. 2014).

Als Ursachen der Thrombose benennt die Virchow Trias eine Störung der Hämodynamik, eine Hyperkoagulabilität der Blutbestandteile oder eine Schädigung des Endothels (Aird 2003b; Bagot und Arya 2008).

Histopathologisch unterscheidet man den Abscheidungsthrombus (weißer Thrombus) vom Gerinnungsthrombus (roter Thrombus). Abscheidungsthromben findet man häufig im arteriellen System. Sie entstehen durch eine schichtweise Anlagerung von Thrombozyten und Fibrin an einen Gefäßwanddefekt bei persistierender Zirkulation. Der Thrombus ist adhärent und die Emboliegefahr gering (Herold 2014). Ein Gerinnungsthrombus (roter Thrombus) entsteht bei Verlangsamung oder Stillstand des Blutflusses. Er besteht hauptsächlich aus Erythrozyten, die in einem Fibrinnetz immobilisiert sind. Die Adhärenz an der Gefäßwand ist gering und die Emboliegefahr hingegen hoch. Gerinnungsthromben findet man vermehrt im venösen Gefäßsystem. Zudem existieren gemischte Thromben aus einem weißen Kopf- und einem roten Schwanzteil (Herold 2014).

Die Klinik einer Thrombose ist abhängig vom betroffenen Organ und Gefäßkaliber.

Mikrovaskuläre Thrombosen in Venolen, Arteriolen und Kapillaren laufen meist symptomarm ab und manifestieren sich erst durch irreversible Organschäden.

Die tiefe Beinvenenthrombose als häufigste makrovaskuläre Thrombose äußert sich durch Umfangsvermehrung der Extremität, Zyanose, ziehende Schmerzen, Überwärmung, und Pratt-Warnvenen. Die wichtigsten Komplikationen der tiefen Venenthrombose sind die Lungenembolie und das postthrombotische Syndrom (Herold 2014).

In der Therapie der venösen Thrombose stehen Allgemeinmaßnahmen, wie Kompressionstherapie und Mobilisation, sowie die Antikoagulantientherapie im Vordergrund. Das Mittel der Wahl ist initial niedermolekulares Heparin, gefolgt von überlappender Phenprocoumonmedikation.

Seit 2008 sind in Deutschland auch die Faktor Xa-Inhibitoren Fondaparinux und Rivaroxaban zur Therapie der Thrombose und Lungenembolie zugelassen (Pollack 2011). Eine Rekanalisationstherapie mit Aktivator der Fibrinolyse erfolgt beispielsweise bei Phlegmasia coerulea dolens, Myokardinfarkt, Apoplex und schwerer Lungenembolie. Chirurgisch kann eine Rekanalisation großer Venen durch Thrombektomie mittels Fogarty-Ballonkatheter erreicht werden. Ein chirurgisches Vorgehen ist vor allem bei Phlegmasia coerulea dolens indiziert (Herold 2014; Saha et al. 2016).

Ein akuter Arterienverschluss entsteht zumeist durch Thromboembolie aus dem Herz, atherosklerotischen Plaques und Aneurysmen. Klinisch äußert sich ein kompletter Verschluss, abhängig vom betroffenen Organ, durch einen Infarkt mit entsprechenden Funktionsausfällen des nachgeschalteten Gewebes. Wichtige Komplikationen sind die ischämische Nekrose, der Schock und das Reperfusionssyndrom. Therapeutisch stehen die chirurgische Thrombembolektomie, intraarterielle Lysetherapie und Aspirationsthrombembolektomie zur Verfügung. Für die Prophylaxe arterieller Thrombosen werden Thrombozytenaggregationshemmer eingesetzt (Cyclooxygenase-Inhibitoren, P2Y12-Antagonisten, Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten) (Jiménez et al. 2016, 2016; Kwon et al. 2016; Pollo et al. 2016).

Trotz der zahlreichen Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten sind die Inzidenz und die Mortalität von Thrombosen und ihren Komplikationen nach wie vor sehr hoch und es bedarf weiterer Forschung um, die Erkrankung besser behandeln zu können. Hierzu ist ein umfassendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge während der Hämostase notwendig (Spronk et al. 2004; Blum und Shamburek 2009).

4.1.2 Physiologie der Hämostase

Für die Blutzirkulation sind ein intaktes Gefäßsystem und der Verschluss möglicher Gefäßwandläsionen von vitaler Bedeutung. Die Blutgerinnung wird im Wesentlichen durch Thrombozyten und plasmatische Gerinnungsfaktoren realisiert. Für die initiale, noch instabile Abdichtung eines Gefäßwandlecks innerhalb von ein bis drei Minuten sind die Thrombozyten verantwortlich. Anschließend wird die Läsion durch die plasmatische Gerinnung stabil verschlossen.

4.1.3 Primäre Hämostase

4.1.3.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Bestandteile des Blutes. Sie entstehen durch Abschnürungen aus Megakaryozyten. Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und sind eingeschränkt zur Proteinbiosynthese fähig (Löffler et al. 1998).

Morphologisch unterscheidet man in den Thrombozyten vier Zonen: die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Membransysteme und die Zone der Organellen.

In der peripheren Zone ist die Zellmembran mit ihren zahlreichen Glykoproteinen lokalisiert.

Die strukturelle Zone besteht aus Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Mikrofilamenten.

Die Funktion der strukturellen Zone ist die Organisation der Organellen, die Ordnung der Glykoproteine auf der Zellmembran, die Bildung von Pseudopodien und die Kontraktion des Thrombus.

In der Organellenzone befinden sich die Mitochondrien, die Ribosomen, das endoplasmatische Retikulum, das Glykogen und die Speichergranula. Die Speichergranula werden in Lysosomen, α -Granula und δ -Granula eingeteilt (Tab. 1).

α -Granula	δ -Granula	Lysosomen
Fibrinogen	ATP	Heparatinase
Gerinnungsfaktor V, VIII	ADP	Saure Hydrolase
Plättchenfaktor 4	Serotonin	
von Willebrand Faktor	Ca^{2+}	
Thrombospondin	Thromboxan- A_2	
Fibronektin		
Wachstumsfaktoren (VEGF, TGF- β , PDGF)		

Tabelle 1: Übersicht über die Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula

Die Zone der Membransysteme besteht aus dem offenen kanalikulären System zur Kommunikation mit dem Extrazellulärraum und dem dichten tubulären System zur Speicherung von Ca^{2+} (White et al. 1994; Löffler et al. 1998; Klinke und Bauer 2003).

4.1.3.2 Ablauf der Thrombozytenaggregation

Das intakte Endothel sezerniert die Mediatoren Prostacyclin (PGI_2) und Stickstoffmonoxid (NO), die eine Interaktion zwischen den Thrombozyten und dem Endothel unterdrücken (Bolhuis et al. 1979).

Kommt es durch einen Endothelschaden zu Kontakt zwischen den Blutbestandteilen und dem Kollagen, Fibronectin und Laminin der subendothelialen Matrix, bindet vor allem der von-Willebrand-Faktor (vWF) an diese Strukturen. Der vWF wird vorwiegend vom Endothel synthetisiert und apikal sowie basal sezerniert. Durch Konformationsänderung des vWF, nach Bindung von Kollagen, können Thrombozyten mit Glykoprotein Ib/V/IX an den vWF und so an die subendotheliale Matrix binden. Thrombozyten binden auch direkt mit Glykoprotein Ia/IIa an subendotheliales Kollagen (Löffler et al. 1998; Varga-Szabo et al. 2009; Nieswandt et al. 2011). Durch die Bindung subendothelialer Strukturen werden die Thrombozyten durch Glykoprotein VI aktiviert. Die Zellaktivierung zeigt sich in einer Formveränderung und einer Sekretion der intrazellulären Granula (Abb. 1). Die Thrombozyten verlieren ihre diskoide Form und bilden Pseudopodien aus, mit denen sie untereinander in Kontakt treten. Bei der Sekretion der Granula werden die entsprechenden Inhaltsstoffe freigesetzt. Sie bewirken eine Vasokonstriktion (Serotonin, Thromboxan- A_2), eine auto- und parakrine Aktivierung weiterer Thrombozyten (Thromboxan- A_2 , Adenosindiphosphat, Plättchenaktivierender Faktor) und eine Adhäsion weiterer Thrombozyten (vWF, Fibronectin, Fibrinogen). Zudem führt die Aktivierung zu einer Translokation von aggregatorischen Glykoproteinen auf die Zellmembran und zu einer Konformationsänderung der Integrine, so dass zum Beispiel Glykoprotein IIb/IIIa Fibrinogen

und vWF hochaffin binden kann. Über diese Wechselwirkung kommt es zu einer Quervernetzung der Thrombozyten. Es entsteht ein Thrombus, der kleine Blutungen in ein bis drei Minuten verschließt. Um den Thrombus kovalent zu stabilisieren, bedarf es der sekundären Hämostase. (Weiss und Turitto 1979; Sakariassen et al. 1986; Nurden et al. 1994; White 1994; Subramaniam et al. 1996; Löffler et al. 1998; Becker et al. 2000; Spronk et al. 2003; Aird 2003; Klink und Bauer 2003; Kram et al. 2013).

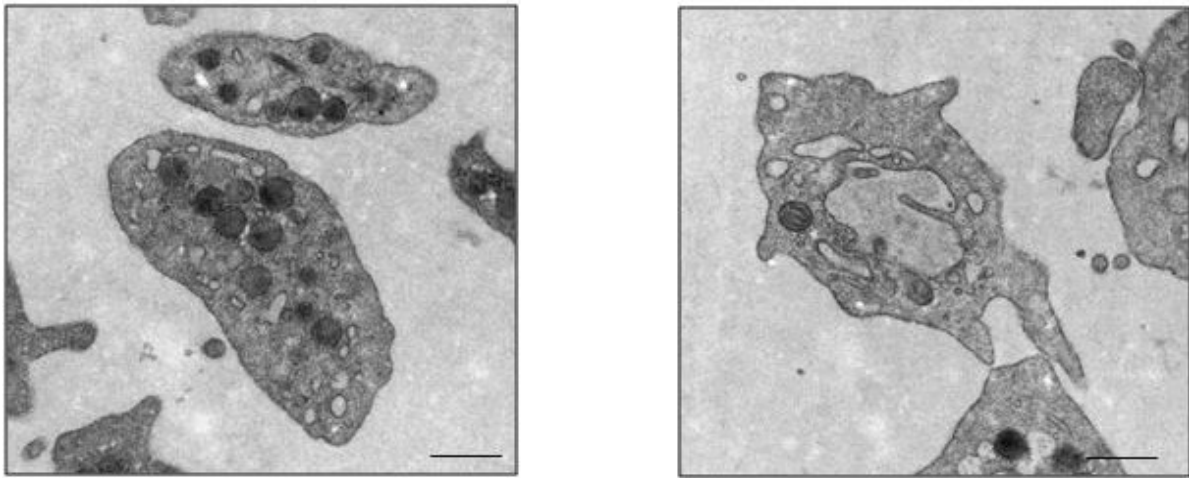


Abbildung 1: Elektronenmikroskopische Bilder von ruhenden Thrombozyten (links) und mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP) stimulierten Thrombozyten (rechts): Die Aufnahmen entstammen der eigenen Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem elektronenmikroskopischen Zentrum der Universitätsmedizin Rostock. Der Maßstab entspricht 500 nm.

4.1.3.3 Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle

Selektine sind heterophile Glykoproteine und dienen der Zelladhäsion. Nach dem Ort der Expression werden E-Selektin auf Endothelzellen, L-Selektin auf Leukozyten und P-Selektin auf Endothelzellen und Thrombozyten unterschieden. P-Selektin ist in der Plasmamembran der α -Granula von Thrombozyten und in den Weibel-Pallade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert (Stenberg et al. 1985; van Mourik et al. 2002). Bei der Aktivierung der Zelle und Sekretion der Vesikel wird das Glykoprotein auf die Zellmembran transloziert und dient der

Zell-Zell-Interaktion. Wichtigster Ligand für das P-Selektin ist P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) auf den Leukozyten (McEver 1992).

P-Selektin spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten und aktivierten Thrombozyten zum Gefäßschaden, sowie bei der Inflammation und Wundheilung. Außerdem stabilisiert es durch Bindung von Fibrin und weiterer Thrombozyten den Thrombus (Theilmeier et al. 1999; Merten et al. 2000; Merten und Thiagarajan 2000; Cleator et al. 2006).

Die P-Selektin-Expression auf Thrombozyten ist ein wichtiger Parameter für die Bestimmung der Aktivität von Thrombozyten (Borges et al. 1997; Merten und Thiagarajan 2004).

Integrine sind auf allen Zellen vorhandene Glykoproteine. Ihre zentralen Aufgaben liegen in der Verankerung von Zellen an der extrazellulären Matrix sowie in der Signaltransduktion zwischen der extrazellulären Matrix und der Zelle. Integrine sind meist Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit (Shattil et al. 1998).

Für die initiale Thrombozytenadhäsion über den vWF an das subendotheliale Kollagen spielt das thrombozytäre Glykoprotein Ib/V/IX die entscheidende Rolle. Es kann ohne vorherige zelluläre Aktivierung schnell mit kollagengebundenem vWF interagieren, die Thrombozyten verlangsamen und diese zur Gefäßverletzung rekrutieren. Weitere Liganden von Glykoprotein Ib/V/IX sind P-Selektin, Max-1 und die Gerinnungsfaktoren I, XI und XII. Die genaue Signaltransduktion ist noch unklar.

Ein Mangel an Glykoprotein Ib/V/IX manifestiert sich als Bernard-Soulier Syndrom (Löffler et al. 1998; Klinker und Bauer 2003; Varga-Szabo et al. 2008; Blair und Flaumenhaft 2009; Nieswandt et al. 2011).

Die verlangsamen, transient an die extrazelluläre Matrix gebundenen Thrombozyten werden durch den thrombozytären Kollagenrezeptor Glykoprotein Ia/IIa stabilisiert (Varga-Szabo et al. 2008).

Das Glykoprotein VI ist ein weiterer wichtiger Kollagenrezeptor der Thrombozyten. Während das Glykoprotein Ia/IIa im Wesentlichen für die Adhäsion verantwortlich ist, aktiviert das Glykoprotein VI die Thrombozyten. Nach Bindung an Kollagen kommt es immunoreceptor

tyrosine-based inhibition Motiv (ITAM)-abhängig zur Phosphorylierung verschiedener Membranproteine und konsekutiv zur Aktivierung der Phospholipase C und zur Ca^{2+} -Freisetzung (Offermanns 2006; Nieswandt et al. 2011).

Glykoprotein IIb/IIIa ist das häufigste Glykoprotein auf Thrombozyten. Es wird in den α -Granula, auf der Zellmembran und im kanalikulären System exprimiert. Glykoprotein IIb/IIIa bindet Liganden, wie vWF, Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin, Fibrin und vor allem Fibrinogen, an einer Arginin-Glycin-Aspartat Sequenz. Glykoprotein IIb/IIIa sorgt für eine Quervernetzung der Thrombozyten über Fibrinogen. Um eine Thrombozytenaggregation auf den Ort einer Gefäßläsion zu limitieren, ist Glykoprotein IIb/IIIa, wie viele andere Integrine, im Ruhezustand exprimiert. Eine Aktivierung der Thrombozyten führt durch Anlagerung von Talin-1 und Kindlin-3 zur Konformationsänderung in den hochaffinen Zustand. Ein Mangel von Glykoprotein IIb/IIIa manifestiert sich als Morbus Glanzmann (Löffler et al. 1998; Klink und Bauer 2003; Nieswandt et al. 2009).

4.1.3.4 Signaltransduktion in Thrombozyten

Die thrombogenen Messenger Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin und Thromboxan- A_2 (TXA_2) binden an Guanosintriphosphat-bindendes Protein (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren. G-Proteine leiten Signale vom Rezeptor an Second-Messenger weiter (Abb. 2).

Darunter werden heterotrimere, rezeptorgekoppelte G-Proteine und kleine cytosolische G-Proteine unterschieden. Die Vertreter der heterotrimeren G-Proteine sind das stimulatorische cAMP-gekoppelte G-Protein (G_s), das inhibitorische cAMP-gekoppelte G-Protein (G_i) und das Phospholipase C-gekoppelte G-Protein (G_q). $\text{G}_{12/13}$ sind die α -Untereinheiten der heterotrimären G-Proteine und regulieren verschiedene Tyrosin-Kinasen und die Rho-Kinase (Offermanns et al.; Alberio und Dale 1999).

ADP, Thrombin und TXA_2 vermitteln über diese G-Proteine positives Feedback unter den Thrombozyten.

TXA₂ wird vom Thrombozyten durch Cyclooxygenase-1 (COX-1) aus Arachidonsäure synthetisiert. Die Wirkung ist durch die kurze Halbwertszeit streng lokal. TXA₂ bindet an den TXA₂-Rezeptor (TP) und wirkt intrazellulär über G_q und G_{12/13}.

Die ADP-Rezeptoren sind P2Y₁ und P2Y₁₂. P2Y₁ koppelt an G_q und P2Y₁₂ an G_i.

Thrombin als stärkster Stimulus für Thrombozyten bindet an Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs). PARs sind gekoppelt an G_q, G_{12/13} und in geringerem Ausmaß an G_i (Becker et al. 1996).

Weitere proaggregatorische Substanzen wie Adrenalin, Prostaglandin-E₂ und Serotonin vermitteln ihre Wirkung ebenfalls über G_i.

Ein Freisetzung von G_q vom Rezeptor führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Die PLC spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ führt über den IP₃-Rezeptor zu einer Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und zu einem Calciumeinstrom durch den Orai1-Kanal. Ca²⁺ und DAG aktivieren die Proteinkinase C (PKC) (Löffler et al. 1998; Klinke und Bauer 2003).

PKC phosphoryliert Rap1-GDP. Rap1-GTP lagert sich mit Talin-1 und Kindlin-3 an das Glykoprotein IIb/IIIa an und führt zur Änderung der Konformation, die für die Thrombozytenaggregation notwendig ist. Für die vollständige Aktivierung des Glykoprotein IIb/IIIa sind darüber hinaus noch G_i- und G₁₃-abhängige Signalwege beschrieben.

G_{12/13} aktiviert den Rho/Rho-Kinase Signalweg, der die Aktomyosinkontraktilität sowie die Mikrotubuli-Organisation reguliert und zusammen mit der erhöhten Ca²⁺ Konzentration zur sphärischen Formveränderung der Thrombozyten führt. Auch G_q kann den Rho/Rho-Kinase Signalweg aktivieren (Offermanns et al. 2006).

Für die Thrombozytenaktivierung und Sekretion ist der Ca²⁺-Einstrom und der PKC Signalweg entscheidend. Unterstützt wird die Sekretion durch die Reorganisation des Cytoskeletts im Rahmen der Formveränderung (Varga-Szabo et al. 2009).

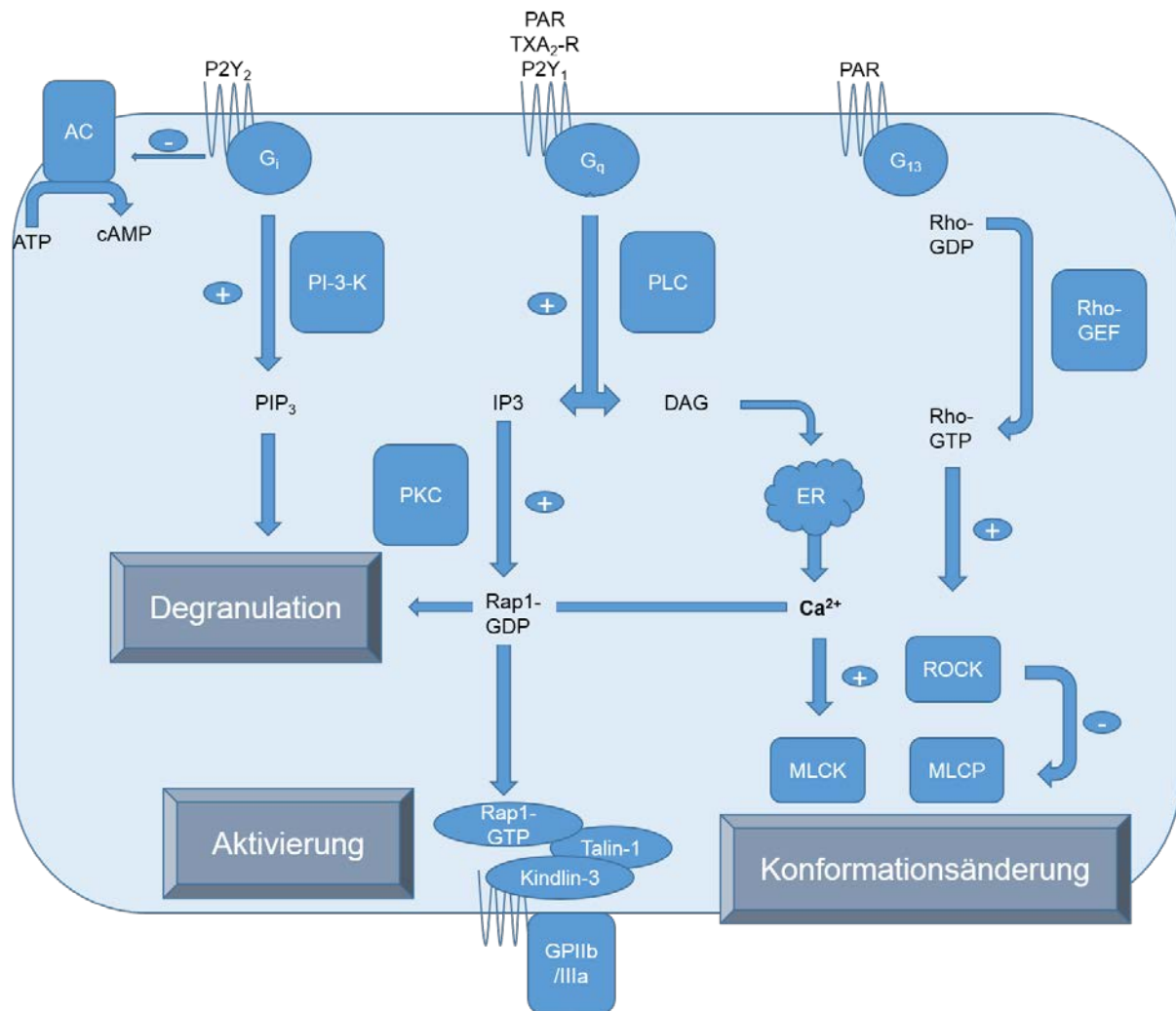


Abbildung 2: G-Protein-abhängige Signaltransduktion in Thrombozyten: Dargestellt sind die G-Protein-abhängigen Signalwege der wichtigsten prothrombogenen Mediatoren: Thrombin (PAR, Protease-aktivierte Rezeptoren), ADP (P2Y₁, P2Y₁₂) und TXA₂ (TXA₂-R). Die Thrombozytenaktivierung, Degranulation und Konformationsänderung werden durch G_i, G_q und G₁₃ vermittelt. (Rho-GEF: Rho-guanine nucleotide exchange factor; MLCP: myosin light chain phosphatase; MLCK: myosin light chain kinase; ER: Endoplasmatisches Retikulum; DAG: Diacylglycerol, IP₃: Inositoltrisphosphat, PLC: Phospholipase C; PKC: Proteinkinase C; PI-3-K: Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP₃: Phosphatidylinositoltrisphosphat; AC: Adenylatcyclase.

Die Stimulation G_i-gekoppelter Rezeptoren vermindert die Konzentration des second messengers cAMP und antagonisiert den Einfluss anti-aggregatorischer Substanzen wie Prostaglandine, die über G_s wirken (Löffler et al. 1998; Offermanns et al 2006).

In nicht-exzitatorischen Zellen wird der extrazelluläre Calciumeinstrom durch die Entleerung der intrazellulären Speicher ausgelöst (store-operated calcium entry, SOCE). Der Großteil des intrazellulären Kalziums ist im endoplasmatischen Retikulum gespeichert. Nach Bindung eines Thrombozytenagonisten und Bildung von IP₃ und DAG bindet IP₃ an seinen-Rezeptor am

endoplasmatischen Retikulum und setzt Ca^{2+} frei. Stromal interaction molecule 1 (STIM1), der Kalziumsensor des endoplasmatischen Retikulums, ändert seine Konformation und aktiviert den Kalziumkanal Orai1 in der Plasmamembran.

Zusätzlich existieren non-SOCE Mechanismen in den Thrombozyten. Die wichtigsten sind die Ca^{2+} -Kanäle TRPV6 und P2X₁, die durch DAG bzw. ATP reguliert werden.

4.1.4 Sekundäre Hämostase

Die Stabilisierung des primären Thrombus wird durch ein kovalent verbundenes Fibrinnetz erreicht. Die Abspaltung von Fibrin aus Fibrinogen (Faktor I) steht am Ende einer komplexen Gerinnungskaskade, deren Ziele die Amplifikation der aktivierten Gerinnungsfaktoren und die Aktivierung der Thrombozyten sind. Die Faktoren I bis XIII sind mehrheitlich Proteasen, die durch limitierte Proteolyse irreversibel aktiviert werden (z.B.: $X \rightarrow X_a$).

Man unterscheidet den extrinsischen Weg und den intrinsischen Weg.

Der extrinsische Weg wird durch Kontakt mit subendothelialen Strukturen aktiviert und ist entscheidend für die Blutgerinnung. Der intrinsische Weg dient wahrscheinlich Thrombin-abhängig der Amplifikation der aktivierten Gerinnungsfaktoren (Löffler et al. 1998).

Auf dem intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade kommt es nach Kontakt von Faktor IX, XI und XII mit negativ geladenen Oberflächen durch gegenseitige Aktivierung zur Bildung des Tenasekomplexes aus den Faktoren IXa und VIIIa. Hier beginnt die gemeinsame Endstrecke mit dem extrinsischen Weg. Klinische Bedeutung erlangt der intrinsische Weg bei Gerinnung im intakten Gefäß und bei Kontakt mit Implantaten.

Den lokalisierten Beginn des extrinsischen Weges initiiert Faktor III (Tissue factor, Thromboplastin). Faktor III kommt im intakten Gefäßsystem nicht vor. Er wird subendothelial und auf aktivierten Thrombozyten exprimiert. Wird er dem Blut durch einen Endotheldefekt exponiert, bindet das Plasmaprotein Faktor VII an Faktor III und wird durch einen bislang unbekannten Mechanismus aktiviert. Der Komplex Faktor III/VIIIa aktiviert wiederum die

Faktoren VIII, IX und in geringem Maß Faktor X. Die Faktoren VIIIa und IXa bilden den bereits aus dem intrinsischen Weg bekannten Tenasekomplex.

Zu Beginn der gemeinsamen Endstrecke aktiviert Faktor Xa den Faktor V. Faktor Xa und Faktor Va bilden zusammen den Prothrombinasekomplex, der Prothrombin (Faktor II) zu Thrombin (Faktor IIa) spaltet. Thrombin kann sowohl Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin (Faktor Ia) spalten, als auch fast alle vorangeschalteten Gerinnungsfaktoren (insbesondere die Faktoren V, VIII, XIII) sowie Thrombozyten über PAR aktivieren. Faktor XIIIa realisiert zum Abschluss der sekundären Hämostase die kovalente Quervernetzung des Fibrins durch Knüpfung von Peptidbindungen.

Die Reaktionen unter Beteiligung von Faktor II, VII, IX und X laufen Vitamin K- und Ca^{2+} -abhängig auf der negativ geladenen Oberfläche von aktivierten Thrombozyten ab. (Löffler et al. 1998; Kram et al. 2013; Wohn et al. 1999; Bagot und Arya 2008; Aird 2003a; Klink und Bauer 2003)

4.2 Cannabinoide

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L ist eine der ältesten Nutzpflanzen der Welt. Aus ihrem Bast lässt sich Faserwerkstoff und aus den Blättern, den Blüten und dem Harz das Rauschmittel Cannabis gewinnen.

Marihuana und Haschisch sind die meist konsumierten illegalen Drogen in der westlichen Welt (Klein et al. 2005; Pacher et al. 2006). Allerdings haben die Inhaltsstoffe des Cannabis auch zahlreiche medizinisch günstige Effekte, welche die Cannabinoide für die Medikamentenentwicklung sehr interessant machen.

Cannabis sativa L besteht aus über 400 Substanzen (Elsohly und Slade 2005). Darunter finden sich etwa 108 Phytocannabinoide. Die Hauptbestandteile sind das psychotrope (–)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol (THC) und das modulierende (–)-trans-Cannabidiol (CBD) (McPartland et al. 2015).

Von den pflanzlichen Cannabinoiden unterscheidet man die endogenen und die synthetischen Cannabinoide.

Endogene Cannabinoide sind Arachidonsäurederivate und werden von allen Säugetieren synthetisiert. Sie binden wie Phytocannabinoide an Rezeptoren. Für diese Cannabinoidrezeptoren, insbesondere CB₁ und CB₂, wurden nach deren Entdeckung Ende der 1980er Jahre synthetische Agonisten und Antagonisten entwickelt.

Diese synthetischen Cannabinoide bilden die dritte Gruppe. Die bekanntesten Vertreter sind SR-141716A (Rimonabant) und WIN 55,212-2.

Allen Cannabinoiden ist die hohe Lipophilie und die Aktivität an Cannabinoid-Rezeptoren gemein (Pacher et al. 2006). Durch Bindung ihrer Rezeptoren initiieren die Cannabinoide pleiotrope Effekte (Earleywine et al. 2002).

4.2.1 Geschichte des Cannabis in der Medizin

Erste schriftliche Belege für die Nutzung von Cannabis als Medikament finden sich 3000 v. Chr. in einem chinesischen Kräuterlehrbuch zu mehr als 100 Indikationen (Rudgley et al. 1999). Der Gebrauch in der Medizin verbreitete sich von China aus nach Westen. Um 1500 - 1000 v. Chr. in Ägypten und um 600 v. Chr. in Persien wurden Cannabispräparate zur Sedierung, gegen Migräne und Ohrenschmerzen eingesetzt (Grotenhermen et al. 2004).

Cannabis erreichte die europäische Medizin zur Zeit des antiken Griechenlands und Roms und wurde gegen Ohren- und Kopfschmerzen, Flatulenz, Nasenbluten, Fieber und als Wundsalbe verwendet (Butrica et al. 2002).

Im mittelalterlichen Okzident wurde Cannabis vor allem bei Zahnschmerzen, Geburten und Depression eingesetzt. Orientalische Ärzte nutzten von 800 – 1800 n. Chr. die diuretischen, antiemetischen, antiepileptischen, analgetischen und antipyretischen Effekte (Lozano et al. 2001). Der irische Arzt O'Shoughnessy etablierte Cannabis in der modernen westlichen Medizin des 19. Jahrhunderts, indem er seinen Erfahrungen aus dem Kolonialreich Indien

entsprechend empfahl, Cannabis bei Muskelspasmen, Bauchkrämpfen und Schmerzen zu verwenden. Darüber hinaus wurde Marihuana bei Depression, Tetanus, Epilepsie, Menstruationsbeschwerden, Migräne, Schlafstörungen und Unterernährung eingesetzt (Mack und Joy 2001). Zwischen 1850 und 1900 n. Chr. hatten Cannabisprodukte einen Anteil von mehr als 50% an allen verkauften Arzneimitteln (Lozano et al. 2001; Herer und Bröckers 2014). Gegen Ende des 19. Jahrhunderts verlor Cannabis in der Medizin an Bedeutung, da es durch synthetisch hergestellte Arzneimittel, wie Acetylsalicylsäure, verdrängt wurde. Um 1950 waren fast keine Cannabisprodukte mehr in der Medizin präsent. Schließlich wurden sie 1972 durch das Betäubungsmittelgesetz (BtmG) in Deutschland verboten.

Etwa zur gleichen Zeit konnten Mechoulam und Hollister die Strukturformel und Stereoselektivität der Hauptwirkkomponente (-)-trans-Delta-9-Tetrahydrocannabinol aufklären. Zudem berichteten illegale Konsumenten gehäuft von positiven Nebeneffekten auf ihre Grundkrankheiten wie Glaukom, AIDS oder auf Chemotherapeutika-induziertes Erbrechen (Mechoulam et al. 1998; Hollister et al. 1998; Grotenhermen et al. 2004).

Folglich rückten Cannabis und weitere neu entdeckte Inhaltsstoffe wie CBD zurück in den Fokus der Forschung. Weitere Meilensteine waren die Entdeckung des endogenen Cannabinoidsystems mit seinen Rezeptoren durch Matsuda und Munro sowie der endogenen Liganden durch Devane um 1990 (Devane et al. 1988; Matsuda et al. 1990; Devane et al. 1992; Munro et al. 1993; Richter und Levy 2014).

4.2.2 Klinischer Einsatz von Cannabinoiden

Cannabinoiden greifen in zahlreiche physiologische Prozesse ein und haben vielfältige zentrale und periphere Wirkungen (Tab. 2).

Die Erforschung der Wirkung einzelner Cannabinoiden und Cannabinoidkombinationen ist somit ein sehr interessantes Forschungsfeld, um positive Effekte zu isolieren und unerwünschte, insbesondere psychotrope Effekte zu vermindern (Malinowska et al. 2008).

Di Marzo fasste die Effekte 1998 kurz als „relax, eat, sleep, forget and protect“ zusammen (Di Marzo et al. 1998).

Derzeit ist Cannabis in Deutschland nach Anlage III § 1 Absatz 1 BtMG „ein verkehrs- und verschreibungsfähiges Arzneimittel“, wenn es sich um „Zubereitungen, die als Fertigarzneimittel zugelassen sind“ handelt (BtMG 2015). Cannabis-Präparate sind Nabiximol (Sativex®), Dronabinol und Nabilon. Eine Zulassung in Deutschland existiert seit 2011 für Nabiximol zur Therapie der Spastik im Rahmen der Multiplen Sklerose (Tab. 3).

Bei Nachweis einer unzureichenden Therapie mit zugelassenen Medikamenten können Patienten bei der Bundesopiumstelle eine Sondergenehmigung zum Erwerb medizinischer Cannabisblüten zur ärztlich überwachten Selbsttherapie beantragen (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012).

psychisch (erwünscht)	psychisch (unerwünscht)	somatisch
Euphorie	Störung des Zeitgefühls	Anti-Inflammation
Entspannung	Verminderung der Aufmerksamkeit	Analgesie
Intensivierung sensorischer Wahrnehmung	Verlängerung der Reaktionszeit	Verringerung des Muskeltonus
Wohlbefinden	Dysphorie	Tachykardie
Verringerung der Schmerzwahrnehmung	Einschränkung der motorischen Fähigkeiten	Hypotension
Stressreduktion	Störung des Kurzzeitgedächtnis	Hyposalivation
Humor	Sedierung	Vasodilatation
Libidosteigerung	Angst	intestinale Hypomotilität
Antinausea	Panik	Reduktion des Augeninnendruckes
Antiemesis	Paranoia	Hypothermie
Appetitanregung		Antispastik
		Thrombozytenaggregation?

Tabelle 2: Auswahl akuter Wirkungen von Cannabinoiden (Grotenhermen et al. 2004; Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; McPartland et al. 2015)

Off-Label befinden sich die o.g. Cannabisprodukte im Einsatz zur Therapie von chronischen neuropathischen Schmerzen, Appetitlosigkeit, Zytostatika-induzierter Nausea und Emesis, Levodopa-induzierten Dyskinesien beim M. Parkinson, Harnblasendysfunktion bei multipler Sklerose und zur Reduktion von Tics beim Gilles-de-la-Tourette-Syndrom (Tab. 4) (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; Maione et al. 2013).

	Nabiximol	Dronabinol	Nabilon
Herstellung	Extrakt aus Cannabisblüten	teilsynthetisch	synthetisch
Wirkstoff	THC, CBD 2,7:2,5	THC	THC
Zulassung	Deutschland u.a.	USA, Kanada	USA, GB, AT
Indikationen	schwere Spastik bei MS	Kachexie bei AIDS; Zytostatika-induziertes Erbrechen	Kachexie bei AIDS; Zytostatika-induziertes Erbrechen

Tabelle 3: Synopsis verschreibungsfähiger Cannabinoidzubereitungen

Exkurs: Von 2006 bis 2008 war Rimonabant zur Behandlung der Adipositas in Deutschland zugelassen. Bei dem Wirkstoff handelt es sich um den CB₁-Rezeptorantagonisten SR171416A, aus dem ursprünglich ein Arzneimittel zur Raucherentwöhnung entwickelt werden sollte. Obwohl Rimonabant bei der Gewichtsreduktion effektiv war, musste das Präparat 2008 aufgrund von unerwünschten Wirkungen wie Depression, Suizidgedanken und Angststörungen vom Markt genommen werden (Martins et al. 2014). Zudem gab es Hinweise auf Störung der Fertilität. Rimonabant demonstriert wie Eingriffe in das Cannabinoidsystem Einflüsse auf unterschiedlichste physiologische Funktionen haben.

Forschungsfelder	Gewünschter Effekt
Energiemetabolismus	Gewichtszunahme / -abnahme durch Beeinflussung des peripheren Metabolismus
Appetitregulation	Appetitanregung durch CB ₁ -Rezeptor Stimulation Appetitzügelung durch CB ₁ -Rezeptor Blockade
Schmerz und Inflammation	Analgesie, v.a. bei chronischem neuropathischen Schmerz; Anti-Inflammation
traumatische u. vaskuläre Hirnschäden	Neuroprotektion durch Verminderung des Energiebedarfs und Hemmung der Glia-Zell-Aktivierung
neurologische Bewegungsstörungen	Neurotransmitteralteration
Multiple Sklerose, Rückenmarksläsion	Reduktion der Spastik, Anti-Inflammation
Mb. Parkinson	Neurotransmitteralteration
Mb. Alzheimer	Inhibition der β -Amyloid-abhängigen Glia-Aktivierung
Epilepsie	Präsynaptische Modulation der Glutamat und GABA Rezeptoren
Gilles-de-la-Tourette's Syndrom	Reduktion der Tics
Angst, Depression	Anxiolyse, Euphorisierung
Schlafstörungen	Schlafinduktion, Sedierung
Übelkeit und Erbrechen	Reduktion von Zytostatika-induziertem Erbrechen und Übelkeit
Hypertonie	Senkung von Blutdruck und Herzfrequenz
Kreislaufschock	Kreislaufstabilisierung durch CB-Rezeptor Antagonisten im Schock
Glaukom	Reduktion des Augeninnendruckes
Retinopathie	Schutz der Blut-Retina-Schranke, Neuroprotektion
Neoplasien	Induktion von Zelltod, Antiproliferation
Palliativmedizin	Schlafinduktion, Analgesie, Stimmungsaufhellung, Appetitstimulation, Antiemesis

Tabelle 4: Forschungsfelder und therapeutische Perspektiven für Cannabinoide

4.2.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Cannabinoiden

Durch die pleiotropen Eigenschaften initiieren Cannabinoide auch zahlreiche Nebenwirkungen. Insbesondere psychiatrische und neurologische Nebeneffekte limitieren die

Cannabinoidtherapie. So kann die langfristige regelmäßige Cannabiseinnahme insbesondere bei präpubertären Jugendlichen das Risiko der Ausprägung einer schizophrenen Psychose erhöhen (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012).

Zudem ist für den langfristigen Cannabiskonsum eine negative Beeinflussung kognitiver Funktionen beschrieben. Das Erlernen komplexer Inhalte, die Rekapitulation und die Konzentration zeigten sich in zahlreichen Studien bei chronischer Cannabiseinnahme eingeschränkt (Pope et al. 1995; Ehrenreich et al. 1999; Lundqvist et al. 2005).

Auch periphere Effekte belasten die Therapie mit Cannabinoiden. Beispielsweise finden sich einige Fallberichte über kardiovaskuläre Zwischenfälle unklarer Genese im Zusammenhang mit Cannabiskonsum (Dahdouh et al. 2012; Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; Casier et al. 2014; Hodcroft et al. 2014). Eine Anwendung bei schwerer kardiovaskulärer Grunderkrankung ist relativ kontraindiziert.

Gegen die meisten unerwünschten Arzneimittelwirkungen entwickelt sich nach kurzer Zeit eine Toleranz. Entzugssymptome stellen in der medizinischen Therapie kein bedeutendes Problem dar (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012).

4.2.4 Das endogene Cannabinoidsystem

Das endogene Cannabinoidsystem besteht aus den Endocannabinoiden, den Cannabinoidrezeptoren und den an ihrem Metabolismus beteiligten Transportern und Enzymen (McPartland et al. 2015).

Bereits nach der Feststellung Hollisters 1974, dass THC strikt stereoselektiv wirkt, vermutete man, dass ein Rezeptor für Cannabinoide existiert. Die Aufklärung und Klonierung des CB₁-Rezeptors gelang Devane und Matsuda 1988 und 1990 (Devane et al. 1988; Matsuda et al. 1990). 1993 wurde der CB₂-Rezeptor erstmals beschrieben (Munro et al. 1993).

Anandamid (AEA) konnte 1992 als erstes endogenes Cannabinoid aus Schweinehirn isoliert werden (Devane et al. 1992).

In den folgenden Jahren wurde das endogene Cannabinoidsystem intensiv erforscht. Es ist aber in seiner Vielfältigkeit bis heute nicht vollständig verstanden.

Das endogene Cannabinoidsystem ist an der Regulation der Nozizeption, der Gefäßweite, gastrointestinaler Abläufe, des Lernens und Gedächtnisses, der Motorik und des Immunsystems beteiligt (Munro et al., 1993; Randall und Kendall 1998; Klein 2005; Pacher et al. 2006). Weitere physiologische Ziele des endogenen Cannabinoidsystems sind Gegenstand intensiver Forschung (Vandeputte et al. 2012; Pacher und Kunos 2013).

Neben den bereits erwähnten klassischen Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ binden Cannabinoide noch an zahlreiche weitere Rezeptoren (Tab. 5). Die physiologische Bedeutung der Interaktion ist meist noch nicht bekannt.

Weitere Rezeptoren für Cannabinoide sind beispielsweise ein vasodilatierender Cannabinoidrezeptor am Endothel oder ein nicht-CB₁/CB₂-Cannabinoid Rezeptor im Hippocampus, der die Glutamatfreisetzung inhibiert (Kunos et al. 2000; Pacher et al. 2006).

Viele Cannabinoide aktivieren zudem TRPV1 und spielen bei Nozizeption und Inflammation eine Rolle.

Rezeptor	Effekt	
CB _{1/2}	Adenylatcyclase	↓
	MAP-Kinase	↑
	K-Kanäle	↑
	Ca ²⁺ -Kanäle	↓
GRP ₅₅	Ca ²⁺ (intrazellulär)	↑
	RhoA, Rac	↑
	ERK	↑
TRPV ₁	Ca ²⁺ (intrazellulär)	↑
	Caspase	↑
	Cytochrom C Freisetzung	↑
	Proapoptotische Kinasen	↑
PPAR	ROS	↑
	Tyrosin Kinasen	↑
	Adiponectin, Lipoprotein Lipase	↑

Tabelle 5: Intrazelluläre Signalwege der Cannabinoidrezeptoren

Durch Aktivierung verschiedener Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) regulieren Cannabinoide unterschiedliche Stoffwechselwege (Battista et al. 2012).

Der CB₁-Rezeptor wird hauptsächlich zentral exprimiert und ist der häufigste G-Proteingekoppelte-Rezeptor im zentralen Nervensystem (Pacher et al. 2006).

Innerhalb des ZNS finden sich CB₁-Rezeptoren in größter Dichte im Kleinhirn, in den Basalganglien, im Cortex und im Hippocampus. In einer geringeren Konzentration kommen CB₁-Rezeptoren auch im Thalamus, im Hirnstamm, im Rückenmark und in der Amygdala vor (Tsou et al. 1998).

Zunächst wurde angenommen, dass der CB₁-Rezeptor exklusiv im zentralen Nervensystem vorhanden ist. In den letzten Jahren konnte der CB₁-Rezeptor auch auf zahlreichen peripheren Zellen nachgewiesen werden. Beispielsweise wurden CB₁-Rezeptoren auch auf den Thrombozyten, auf vielen Zellen des Immunsystems, im Pankreas, in der Milz und in den Gefäßen gefunden (Grotenhermen 2004; Pacher et al. 2006; Catani et al. 2010).

Der CB₁-Rezeptor besteht aus sieben Transmembrandomänen und koppelt an ein inhibitorisches G-Protein G_{i/o}, das die Isoformen 2, 4 und 7 der Adenylatcyclase hemmt (Rhee et al. 1998). Konsekutiv wird die Proteinkinase A deaktiviert und im ZNS die Transmitterausschüttung an der Präsynapse reduziert (Battista et al. 2012).

Die Transmitterfreisetzung von Glutamat, Acetylcholin, Dopamin, GABA, Histamin, Serotonin, Cholezystokinin, Aspartat, Glycin und Noradrenalin wird retrograd gehemmt (Grotenhermen et al. 2004). G-Protein-abhängig aktiviert der CB₁-Rezeptor Kaliumkanäle und hemmt Calciumkanäle (Mackie et al. 1995; Pan et al. 1996).

Über einen noch nicht aufgeklärten Mechanismus aktiviert CB₁ die Phospholipase C, die p44/42 MAP Kinase, die p38 Kinase, die JUN terminal Kinase und den Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalweg und beeinflusst den Zellzyklus, die Immunzellfunktion sowie inflammatorische Reaktionen (Pertwee et al. 2000; Pacher et al. 2006; McPartland et al. 2007).

Der CB₁-Rezeptor vermittelt ebenfalls die psychotropen Wirkungen der Cannabinoide.

Der CB₂-Rezeptor ist der Cannabinoidrezeptor der Immunzellen. Die größte Rezeptordichte findet sich auf Splenozyten, Lymphozyten, Monozyten und Mikroglia (McPartland et al. 2007).

Auch Thrombozyten und hämatopoetische Zellen exprimieren CB₂ (Pacher et al. 2006; Catani et al. 2010). Der CB₂-Rezeptor vermittelt die immunmodulatorischen Wirkungen der Cannabinoide (Pertwee et al. 2000).

Die Aktivierung des CB₂-Rezeptors wirkt bei neurodegenerativen Erkrankungen und zerebrovaskulären Ereignissen neuroprotektiv (Battista et al. 2012).

Der CB₂-Rezeptor ist an G_q, nicht aber an G_i gekoppelt. Er aktiviert den MAP Kinase Signalweg. Ein direkter Einfluss auf Ionenkanäle ist für CB₂ im Gegensatz zu CB₁ nicht beschrieben (Pertwee et al. 2000).

Die endogenen Cannabinoide sind lipophile Ester, Ether und Amide langkettiger Fettsäuren (Tab. 6) (McPartland et al. 2007). Die bekanntesten und meist erforschten Endocannabinoide sind Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) (Pacher et al. 2006).

Endogene Cannabinoide werden als lipophile Transmitter nicht in Vesikeln gespeichert, sondern bei Bedarf aus Membranphospholipiden abgespalten und synthetisiert. Der adäquate Reiz für die Endocannabinoidsynthese ist ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Porter et al. 2002; Pacher et al. 2006).

Endogene Cannabinoide	Rezeptoraffinität
Anandamid (AEA)	CB ₁ >>CB ₂ Agonist, TRPV ₁ Agonist
2-Arachidonylglycerol (2-AG)	CB ₁ =CB ₂ Agonist
2-Arachidonylglycerolether	CB ₁ >>CB ₂ Agonist
Virodhamin	CB ₁ Antagonist, CB ₂ Agonist
Arachidonyldopamin	CB ₁ >>CB ₂ Agonist, TRPV ₁ Agonist

Tabelle 6: Endogene Cannabinoide und ihre Rezeptoraffinität

Die Biosynthese von AEA beginnt mit der Calcium-abhängigen Transacylierung des Arachidonsäurerests von Phosphatidylcholin auf Phosphatidylethanolamin (Abb. 3). Es entsteht N Arachidonyl-Phosphatidylethanolamin (NAPE). Die Phospholipase D, das Schlüsselenzym der AEA-Biosynthese, spaltet AEA ebenfalls Calcium-abhängig aus NAPE ab (McPartland et al. 2015).

Der Abbau von AEA findet intrazellulär statt (Abb. 3). Es wird aus dem Extrazellulärraum, aus dem Gefäß oder dem synaptischen Spalt über den Endocannabinoid Membran Transporter (EMT) aufgenommen und dort primär von der Fatty Acid Acyl Hydrolase (FAAH) verstoffwechselt (Pacher et al. 2006; Maccarrone et al 2012.; Dainese et al. 2014).

Die membranständige FAAH hydrolysiert AEA zu Ethanolamin und Arachidonsäure, die Cyclooxygenase-abhängig zu Eikosanoiden wie Prostaglandinen und Thromboxan-A₂ oxidiert werden kann (Pacher et al. 2006; Maccarrone et al. 2012)

Ein zweiter Abbauweg ist die unmittelbare Oxidation von AEA durch die Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX) und Cytochrom P450 (Ligresti et al. 2003; Battista et al. 2012).

Für die Biosynthese von 2-Arachidonylglycerol (2-AG) spaltet die Phospholipase C zunächst Phosphatidylinositol zu 1,2-Diacylglycerol (DAG). Aus DAG wird anschließend durch die Isoenzyme der Diacylglycerol Lipase DAGL α und DAGL β 2-AG synthetisiert. Der Transport von 2-AG wird, wie von AEA, vom EMT katalysiert.

Die Degradation erfolgt analog zu AEA per Hydrolyse durch die Monoacylglycerol Lipase oder direkt per Oxidation durch COX, LOX oder Cytochrom P450 (Ligresti et al. 2003; Pacher et al. 2006).

Auch humane Thrombozyten exprimieren CB₁- und CB₂-Rezeptoren, sowie alle für den Cannabinoidmetabolismus notwendigen Enzyme (Catani et al. 2010).

0

"I have been thinking about you a lot lately," she said.

1997; Randall et al. 2002). Andererseits hatte die Inhibition der NO-Synthase und Cyclooxygenase keinen Einfluss auf die Vasodilatation durch AEA (Garcia et al. 2001). Hier wird eine Rolle der Cannabinoide als Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) oder zumindest als Signal zur Synthese von endothelialelem EDHF angenommen.

Andere diskutierte Mechanismen der Relaxation der Gefäßmuskulatur sind eine Hemmung der Gap-junction Kommunikation in der glatten Gefäßmuskulatur (Deutsch et al. 1997; Randall et al. 2002) und eine periphere Sympathikolyse an der Präsynapse (Kunos et al. 2000).

Randall *et al.* konnten die CB₁-abhängige Vasodilatation auch nach Endothelabtragung und COX-Inhibition erhalten und auf eine Wirkung der Cannabinoide selbst auf die glatte Gefäßmuskulatur schließen (Randall et al. 2002).

Pathophysiologisch interessant ist die Entdeckung, dass CB₁-Antagonisten im hämorrhagischen und Endotoxin-induzierten Schock eine übermäßige Vasodilatation vermindern können (Jarai et al. 2000).

4.4 Der Einfluss von Cannabinoiden auf die Thrombozyten

Thrombozyten synthetisieren AEA, exprimieren den CB₁-Rezeptor, den CB₂-Rezeptor, den EMT und die FAAH (Deutsch et al. 2004; Catani et al. 2010; Angelis et al. 2014). Thrombozyten besitzen also alle Bestandteile des endogenen Cannabinoidsystems. Dies lässt eine Beeinflussung der Thrombozyten durch Cannabinoide wahrscheinlich erscheinen.

Vorangegangene *in vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von Cannabinoiden auf Thrombozyten lieferten kontroverse Ergebnisse.

De Angelis *et al.* zeigten in einer aktuellen umfangreichen *in vitro*-Untersuchung einen antithrombogenen Effekt von AEA auf gewaschene humane Thrombozyten. Sowohl im Aggregometer, als auch in der durchflusszytometrischen P-Selektin und Glykoprotein IIb/IIIa Bestimmung, war die Aktivität der Thrombozyten vermindert. Das Wirkmaximum lag bei einer

AEA-Konzentration von 50 μM . Auf eine rezeptorabhängige Wirkung von AEA selbst weist eine Verstärkung der Inhibition durch Blockade der FAAH hin (Angelis et al. 2014).

Auch nach CBD- und THC-Behandlung ist eine verminderte Aktivität von Thrombozyten beschrieben (Levy et al. 1976 ; Formukong et al. 1989; Angelis et al. 2014).

Brantl *et al.* untersuchten den Effekt von unterschiedlichen Cannabinoiden auf humane Thrombozyten in plättchenreichem Plasma. Für die endogenen Cannabinoide Virodhamin und 2-AG ist eine Cyclooxygenase-abhängige Thrombozytenaktivierung beschrieben. AEA und synthetische Agonisten an $\text{CB}_{1/2}$ hatten keinen Effekt auf die Thrombozytenaktivierung (Brantl et al. 2014).

Die Ergebnisse lassen auf eine Wirkung der Metabolite der endogenen Cannabinoide schließen, die via Arachidonsäure zum proaggregatorischen Thromboxan- A_2 verstoffwechselt werden können (Brantl et al. 2014).

Deusch *et al.* fanden auf humanen Thrombozyten eine erhöhte P-Selektion und Glykoprotein IIb/IIIa-Expression nach Behandlung mit THC. Das Wirkmaximum lag bei 100 μM THC (Deusch et al. 2004).

Signorella et al. konnten eine gesteigerte Aktivität gewaschener humaner Thrombozyten mit AEA FAAH-unabhängig und CB_1 -abhängig im Aggregometer messen. In Dosierungen < 1000 μM war kein Effekt feststellbar (Signorello et al. 2011).

Maccarrone *et al.*, die sich sehr intensiv mit dem Einfluss von Cannabinoiden auf Thrombozyten beschäftigten, aktivierten im Aggregometer ebenfalls gewaschene humane Thrombozyten mit AEA Cyclooxygenase- und FAAH-unabhängig. Die Aktivierung war stärker als durch Arachidonsäure, sodass die Arbeitsgruppe von einer Cannabinoidrezeptor-abhängigen Wirkung ausgeht (Maccarrone et al. 1999; Maccarrone 2014).

Braud *et al.* hingegen untersuchten gewaschene Thrombozyten von Kaninchen und aktivierten sie Cyclooxygenase-abhängig mit AEA. $\text{CB}_{1/2}$ -Antagonisten hatten keine Effekte auf die Thrombozytenaktivierung. Das Wirkmaximum von AEA wurde bei 3-10 μM erreicht und entsprach dem Wirkmaximum der Arachidonsäure. Die Wirkung von AEA setzte um etwa eine

Minute verzögert gegenüber der Arachidonsäure ein. *Braud et. al.* gehen von einer Thrombogenität der Metabolite der endogenen Cannabinoide aus (Braud et al. 2000).

Die Untersuchungen von Baldassari *et al.* an gewaschenen humanen Thrombozyten im Aggregometer zeigten einen prothrombogenen Einfluss von AEA. Die Wirkung wurde durch Acetylsalicylsäure (ASS) und Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten inhibiert. FAAH-Hemmer und CB_{1/2}-Rezeptorantagonisten hatten auf die Ergebnisse keinen Einfluss. Baldassari et. al. schlossen auf einen non-CB_{1/2}-CBx-Rezeptor, der für die Thrombozytenaktivierung durch endogene Cannabinoide verantwortlich sein soll (Baldassarri *et al.* 2008).

Für den Einfluss von synthetischen Cannabinoiden mit einer starken und selektiven Cannabinoidrezeptor-Stimulation liegen noch keine Studienergebnisse vor. Auch der Einfluss pflanzlicher Cannabinoide auf Thrombozyten ist bislang wenig erforscht. Die widersprüchlichen Studienergebnisse, vor dem Hintergrund des zunehmenden klinischen Einsatzes der Cannabispräparationen, machen die Cannabinoide allgemein und speziell den Einfluss auf die Thrombogenese zu einem hochrelevanten Forschungsgegenstand.

5 Zielstellung

Die Cannabinoide sind bekannt für ihre pleiotropen Effekte und sind Gegenstand intensiver Forschung. Trotzdem wird ihr Einfluss auf die mikrovaskuläre Thrombogenese und die Plättchenaktivität kontrovers diskutiert. Aktuelle *in vitro*-Versuche lieferten widersprüchliche Ergebnisse.

Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss ausgewählter Cannabinoide auf die mikrovaskuläre Thrombogenese erstmals im Tiermodell zu untersuchen und die Expressionsmuster von prothrombogenen Adhäsionsmolekülen auf den Thrombozyten nach Cannabinoidexposition zu bestimmen.

Anhand dieser Ausgangslage ergaben sich folgende Fragen:

1. Ist das Modell der phototoxischen Thrombose-Induktion im Ohr der haarlosen Maus geeignet, um mikrovaskuläre Thrombosen zu erzeugen und sie zu analysieren?
2. Welchen Einfluss haben AEA, WIN 55.212 und CBD als ausgewählte Vertreter der Cannabinoide auf die mikrovaskuläre Thrombogenese und die primäre Hämostase?
3. Gibt es über die Effekte nach akuter Exposition hinausgehende Effekte durch chronische langfristige Cannabinoidbehandlung?
4. Haben die in der Studie verwendeten Substanzen Indomethacin und DMSO einen Effekt auf die mikrovaskuläre Thrombogenese?
5. Durch welchen Mechanismus beeinflussen Cannabinoide die Thrombozytenaktivität?
6. Wie beeinflussen AEA, WIN 55.212 und CBD die Expression prothrombogener Adhäsionsmoleküle auf ruhenden und aktivierten humanen Thrombozyten?

6 Material und Methoden

6.1 Chemikalien

Anandamid (AEA, N-Arachodonylethanolamin, (all-Z)-N-(2-Hydroxyethyl)-5,8,11,14-eicosatetraenamid) ist ein endogenes Cannabinoid. Es fungiert als CB₁-Agonist und partieller CB₂-Agonist. AEA wurde von Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, New York, USA) bezogen und bei -80° Celsius gelagert.

WIN 55,212-2 [(R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo(1,2,3-de)-1,4-benzoxazin-6-yl-1-naphthalenylmethanone] ist ein synthetisches Cannabinoid. Es ist der Prototyp der Aminoalkylindole und ein CB_{1/2} Agonist. WIN 55.212-2 wurde von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA) bezogen und bei -20° Celsius gelagert.

Cannabidiol (CBD, 2-[(1*R*,6*R*)-3-Methyl-6-prop-1-en-2-yl-1-cyclohex-2-enyl]-5-pentylbenzene-1,3-diol) besitzt intrinsische Aktivität an CB_{1/2}. CBD wurde von Biotrend Chemikalien GmbH (Köln, Deutschland) hergestellt und bei -20° Celsius aufbewahrt.

Für die intravitale Thromboseinduktion wurde eine Stammlösung mit einer Cannabinoidkonzentration von 10mM in Dimethylsulfoxid 2% (DMSO, Merck Chemikalien, Darmstadt, Deutschland) als Vehikellösung angesetzt.

Für die *in vitro*-Versuche wurden die Cannabinoide entsprechend der Herstellerangaben in 100% Ethanol gelöst. Für die Versuchsansätze ergaben sich daraus Ethanolkonzentrationen von 0,1 bis 1% und 1% in der Kontrollgruppe.

Indomethacin (2-[1-(4-Chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]-Essigsäure) ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum und unspezifischer Cyclooxygenase-Inhibitor. Indomethacin wirkt analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch (Indomethacin: MedlinePlus Drug Information 2015). Das in der vorliegenden Studie verwendete Indomethacin wurde von Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, USA) produziert und im Kühlschrank bei -4° Celsius gelagert.

Thrombin Rezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP) ist ein starker prothrombogener Stimulus für Thrombozyten und dient der Aktivierung der Thrombozyten für die Bestimmung der P-Selektin-Expression. TRAP wurde von der Bachem AG (Bubendorf, Schweiz) bezogen und bei -20° Celsius gelagert. 100 mM TRAP wurde zur Aktivierung der Thrombozyten zum plättchenreichen Plasma hinzugefügt.

6.2 *In vivo*-Versuche

Alle *in vivo*-Versuche (7221.3-1-006/15) wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien des National Institute of Health (Maryland, USA) Richtlinien für Tierversuche durchgeführt.

6.2.1 Tiermodell

6.2.1.1 Die SKH-1/hr Maus

Die SKH-1/hr Maus wurde 1926 in einem Zoo in London entdeckt und verliert durch einen Gendefekt auf dem Chromosom 14 ab dem zehnten Lebenstag vollständig ihr Haarkleid (Abb. 4) (Benavides et al. 2009). Dadurch sind die Ohrmuschelgefäße der Intravitalmikroskopie gut zugänglich (Abb. 5).

Die haarlose Maus verfügt im Gegensatz zur Nacktmaus über eine Thymusdrüse und ist immunkompetent.

Die *in vivo*-Versuche erfolgten an männlichen SKH-1/hr Mäusen im Alter von vier bis sechs Wochen mit einem Gewicht von 20g bis 25g. Die Tiere stammen aus der Zucht der Versuchstierhaltung des Rudolf-Zenker-Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock.



Abbildung 4: SKH-1/hr Mäuse

Die Versuchstiere wurden unter standardisierten Bedingungen bei ständigem Zugang zu Nahrung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser ad libitum gehalten. Sie unterlagen einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus.

Das Ohr der haarlosen Maus hat eine Größe von etwa 13 x 13 mm und macht etwa 6% der Körperoberfläche aus. Die durchschnittliche Dicke des Ohres beträgt 300 µm. Es besteht aus zwei Hautschichten, die durch eine Stützknorpelschicht getrennt sind. Der Ohrknorpel verleiht dem Ohr seine dorsal konvexe Form. Beidseits der Knorpelschicht aus Lipochondrozyten verlaufen in der Subkutis die versorgenden drei bis fünf Gefäß-Nervenbündel (Abb. 6). Die Gefäße lassen sich, von der Basis zur Peripherie, in Gefäße erster bis vierter Ordnung unterteilen. Die Venolen haben einen Durchmesser von 8 bis 9 µm in Kapillarnähe und bis 200 µm basisnah. Die Arteriolen und Venolen sind durch Shuntgefäße verbunden. Die Versorgungsgebiete der Gefäß-Nerven-Stränge sind miteinander durch periphere Gefäßarkaden zusammengeschlossen. Die leeren Haarfollikel sind von einem engmaschigen Kapillarnetz umgeben (Barker et al. 1988; 1989).



Abbildung 5: Ausgelagertes Ohr der SKH-1/hr Maus in der Planimetrie zur Darstellung der Gefäß-Nerven-Stränge: Ansicht des rechten Ohres von dorsal.

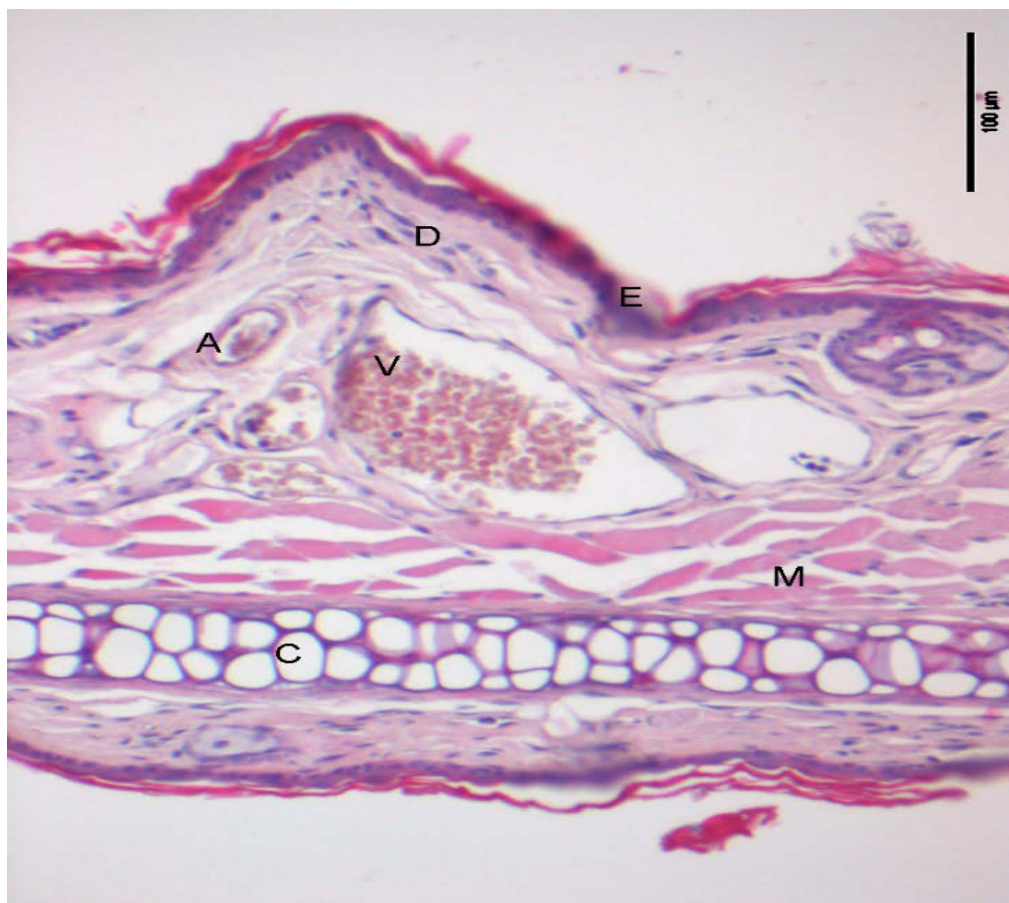


Abbildung 6: Histologischer Aufbau des Ohres der SKH-1/hr Maus: Hier kommen Epidermis (E), Dermis (D), Venolen (V), Arteriolen (A), Muskelfasern und Stützknorpel (C) zur Darstellung. Auffällig sind die reichhaltige Vaskularisierung der Subkutis und die geringgradige Verhornung der Epidermis.

6.2.1.2 Vorbereitung der Versuchstiere

Zunächst wurden die Versuchstiere gewogen und 15 Minuten vor Beginn der Thrombose-Induktion mit Ketamin (90 mg/kg) intramuskulär (i.m.) und Xylazin (25 mg/kg) i.m. gewichtsadaptiert narkotisiert. Die Injektion wurde in den Hinterlauf der Maus verabreicht (Alef und Oechtering 1998).

Zum Schutz der Cornea vor Austrocknung wurde Bepanthen®-Augensalbe beidseits auf die Augen aufgetragen.

Anschließend wurden die Ohrhaltefäden (Ethicon® Prolene 7-0) kranial und kaudal eingestochen. Es war zur bestmöglichen Auslagerung bei geringer Traumatisierung des Ohres ein basisnaher und marginaler Einstich zu wählen.

Anschließend wurde das Versuchstier zur Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur auf einer Heizplatte mit 37,5° C gelagert. Zur mikrochirurgischen Präparation wurde es in Rückenlage mit vier Leukosilk® Klebebändern an den Extremitäten fixiert und der Kopf mit einem unter den Schneidezähnen eingehakten Faden dorsal extendiert. Anschließend wurde der Hals der Maus über der Halsvene durch einen 5 mm langen, kranio-kaudalen Hautschnitt eröffnet. Unter dem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz) wurde anschließend das subkutane Fettgewebe mit mikrochirurgischen Instrumenten entfernt. Die störenden Seitenäste der Halsvene wurden mit einem Elektrokauter oder einer Ligatur (Polyester 8/0) verschlossen.

Nach der Freilegung der Vene erfolgte unter mikroskopischer Sicht die Injektion von 0,05 ml bzw. 0,1 ml FITC-Dextran 5% (Sigma; Deisenhofen; Deutschland; MG 150.000 D) intravenös (i.v.) mit einer Insulinspritze. Für die Blutstillung wurden chirurgische Watteträger verwendet.

Anschließend wurde das Versuchstier auf eine speziell für die Auslagerung des Ohres entwickelte Plexiglaskonstruktion transferiert und dort in Bauchlage auf der Heizplatte fixiert. Es folgte die spannungsfreie Auslagerung des Ohres auf der 1 cm hohen Empore des Plexiglasses. Dafür wurde zunächst ein Tropfen NaCl 0,9% von Raumtemperatur unterhalb des

Ohres auf der Empore aufgebracht. Anschließend wurde der Wassertropfen mit einem Watteträger entfernt. Das Ohr legte sich so durch die Kapillarkräfte plan dem Plexiglas an. Zur Fixierung der Lagerung und Minimierung von Bewegungsartefakten folgte die Befestigung der eingangs angebrachten Haltefäden unter leichtem Zug, mit Leukosilk® Pflasterstreifen. Anschließend wurde ein Tropfen NaCl 0,9% von Raumtemperatur auf die dorsale Seite des Ohres getropft und ein Deckglas mit 0,5 cm Durchmesser aufgelegt, ohne die Gefäße des Ohres zu komprimieren (Abb. 7).

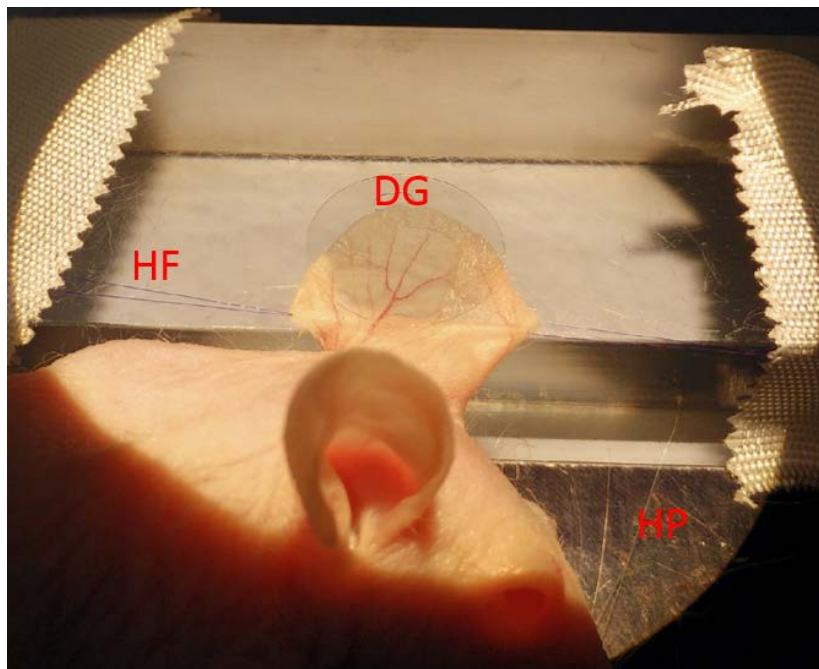


Abbildung 7: Lagerung des Ohres der SKH-1/hr Maus: Das ausgelagerte Ohr ist mit Ethicon® Prolene 7-0 Haltefäden (HF) fixiert. Zur folgenden Wasserimmersionsmikroskopie ist ein Deckglas (DG) aufgelegt. Das Versuchstier liegt auf einer Heizplatte (HP).

6.2.1.3 Gewebeasservierung

Nach der Intravitalmikroskopie des linken Ohres erfolgte die Entnahme von 0,5 ml EDTA Blut mit einer Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus. Daran schloss sich die

Euthanasie des narkotisierten Versuchstieres durch intravenöse Injektion von Ketamin in die laterale Schwanzvene (500 mg/kg i.v.) an.

Aus der entnommenen Probe wurde sodann ein Differentialblutbild angefertigt (Sysmex; Norderstedt; Deutschland). Anschließend wurde diese bei 5000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert (GS-15 Zentrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA). Das überstehende Blutplasma wurde abpipettiert, um es bei -20° Celsius einzufrieren.

Hiernach wurden die Ohren des Versuchstieres durch Scherenschlag abgetrennt und entlang der Mittelachse geteilt. Eine Hälfte wurde in Formaldehyd 4% zur histologischen Aufarbeitung fixiert und die zweite Hälfte nach Behandlung mit Flüssigstickstoff bei -80° Celsius konserviert (Pegg et al. 2007).

6.2.2 Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion



Abbildung 8: Versuchsaufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie: Der Versuchsaufbau besteht aus dem Mikroskop (Axiotech® Vario 100; Zeiss; Göttingen; Deutschland) inklusive Objektivrevolver (1), Lichtfiltersystem (2) für verschiedene Exzitations- und Emissionsmaxima, sowie einer CCD Kamera (3), welche über einen Echtzeitgenerator (5) mit einem Monitor (6) und einem DVD-Rekorder (7) verbunden ist. Anbei befindet sich ein Steuerelement für die Belichtungsintensität (4).

Die Intravitalmikroskopie erfolgte mit dem Mikroskop Axiotech® Vario 100 (Abb. 8) (Zeiss; Göttingen; Deutschland). Als Lichtquelle diente eine stufenlos regulierbare Quecksilberdampf-Kurzbogen-Lampe (HBO 103 W/2, Zeiss, Göttingen). Das Lichtfiltersystem wurde für Fluoreszein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran) auf 450nm bis 490 nm; FT 510; LP 520 eingestellt.

Das Bild wird durch eine hochauflösende Schwarz-Weiß-CCD-Videokamera (FK 6990 IQ-S; Pieper; Schwerte; Deutschland) eingefangen und über einen Echtzeitgenerator (AG-7350; Panasonic; Deutschland) an einen DVD-Rekorder (Panasonic DMR-EX99V) weitergeleitet.

Nach der Lagerung des Versuchstiers auf der Heizplatte mit der Plexiglasvorrichtung begann die Intravitalmikroskopie mit dem Zeiss Intravitalmikroskop.

Zur Färbung des Plasmas und Initiation der phototoxischen Reaktion wurde dem Versuchstier 5 Minuten vor Beginn der Intravitalmikroskopie FITC-Dextran 5% (Sigma; Deisenhofen; Deutschland) mit einem Molekulargewicht von 150.000 D in die präparierte Halsvene injiziert. FITC-Dextran ist hydrophil und besteht aus einem Dextran und dem daran gekoppelten FITC. Dextrane sind Glukosepolymere von großer Molekülmasse, welche die Ausscheidung des Farbstoffes aus dem Gefäßsystem verzögern. Der Farbstoff FITC hat ein Exzitationsmaximum im blauen Bereich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 495 \text{ nm}$ und ein Emissionsmaximum im grünen Bereich von $\lambda = 519 \text{ nm}$ (Roesken et al. 1997).

Zunächst wurde ein geeignetes venöses Gefäß mit einem definierten Durchmesser und einer definierten Flussgeschwindigkeit mit Hilfe der 10-fachen (10x/0,30 W; Plan-NEOFLUAR; Zeiss) und 20-fachen (20x/0,50 W; Plan-NEOFLUAR; Zeiss) Übersichtsvergrößerungen aufgesucht. Anschließend erfolgte der Wechsel auf das Wasserimmersionsobjektiv mit 63-facher Vergrößerung (63x/0,95 W; ACHROPLAN; Zeiss). Nach dem Auftragen eines Tropfens NaCl 0,9% auf das Deckglas begann die Aufzeichnung mit dem DVD-Rekorder (Panasonic DMR-EX99V).

Der Blutfluss im ausgewählten Gefäß wurde für 20 Sekunden aufgezeichnet, um offline Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit mit der Software CapImage® zu bestimmen. Danach begann die Epi-Illumination des Gefäßes bei voller Lichtintensität.

Das Intravitalmikroskop wurde zur phototoxischen Belichtung stets bei 100% Lichtintensität betrieben. Zur Kontrolle, ob das Gefäß vollständig okkludiert war, wurde alle 30 Sekunden die Öffnung der Blende des Intravitalmikroskops kurz verkleinert und bei persistierender Perfusion wieder vollständig geöffnet. Bei Stillstand oder Umkehr des Blutflusses für 30 Sekunden galt das Gefäß als verschlossen. Der Zeitraum vom Beginn der Epi-Illumination mit 100% Lichtintensität bis zum vollständigen Gefäßverschluss wurde als Gefäßokklusionszeit aufgezeichnet und analysiert. Nach vollständigem Gefäßverschluss erfolgte der Wechsel zum nächsten Gefäß.

Die Epi-Illumination führt zu einem lokalisierten, phototoxischen Endothelschaden durch Erzeugung von Sauerstoffradikalen, die bei der Reaktion des intravasalen FITC-Dextrans mit gefiltertem Blaulicht (450 bis 490 nm) freigesetzt werden (Saniabadi et al. 1995).

Die Untersuchungszeit unter dem Intravitalmikroskop war auf eine Stunde limitiert, um Verfälschungen durch Extravasation und Ausscheidung des Farbstoffes zu reduzieren.

6.2.3 Versuchsgruppen

Um den Einfluss einer langfristigen und einer unmittelbaren Cannabinoideinnahme differenzieren zu können, wurden die Versuchstiere zunächst aufgeteilt und je eine Versuchsgruppe einmalig (akut) beziehungsweise mehrfach (chronisch) den zu untersuchenden Cannabinoiden exponiert. Den Ergebnissen dieser ersten beiden Versuchsteile entsprechend wurde anschließend zur Aufklärung des Mechanismus der Cannabinoidwirkung eine Behandlung mit AEA unter Cyclooxygenase-Inhibition durchgeführt.

6.2.3.1 Akute Cannabinoidexposition

Für die Untersuchung der Wirkung o.g. Cannabinoide bei akuter Exposition wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen eingeteilt (jeweils n=5) (Tab. 7).

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
DMSO	AEA	WIN 55,212-2	CBD

Tabelle 7: Einteilung der Tiere im Versuch mit akuter Cannabinoidexposition.

An Tag 0 und Tag 2 wurde 30 Minuten nach i.p. Injektion des jeweiligen Wirkstoffs (5 mg/kg KG) mit der phototoxischen Thrombose-Induktion begonnen. Zunächst wurde an Tag 0 das rechte Ohr und anschließend an Tag 2 das linke Ohr untersucht. Die Intravitalmikroskopie nach Injektion von 0,05 ml FITC-Dextran war auf eine Stunde limitiert (Abb. 9).

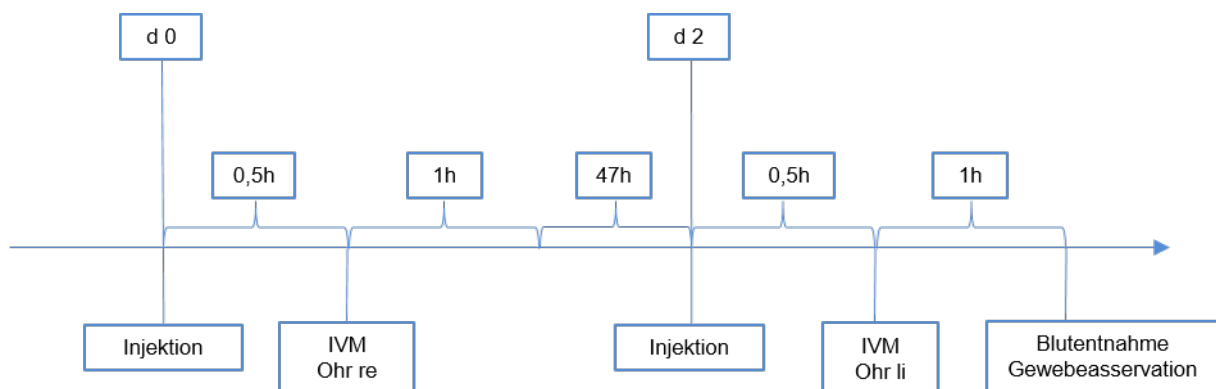


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Ablaufs des Versuchs mit einmaliger Cannabinoidexposition und des Versuchs mit Cyclooxygenase-Inhibition: An Tag (d) 0 erfolgt die i.p. Injektion der Wirkstoffe 0,5 Stunden vor der intravitalmikroskopischen Thrombose-Induktion des rechten Ohres. An Tag (d) 2 erfolgte die erneute Injektion der Wirkstoffe 0,5 Stunden vor der Thrombose-Induktion. Es schloss sich die Gewebeasservierung, die Blutentnahme und die Euthanasie des Versuchstieres an.

6.2.3.2 Akute Cannabinoidexposition mit Cyclooxygenase-Inhibition

Für die Untersuchung des Wirkmechanismus von AEA wurden die Versuchstiere in vier Gruppen unterteilt (jeweils n=5) (Tab. 8).

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
DMSO	AEA	AEA + Indomethacin	Indomethacin

Tabelle 8: Einteilung der Tiere im Versuch der akuten Cannabinoidexposition unter Cyclooxygenase-Inhibition.

An Tag 0 wurde das rechte Ohr und an Tag 2 das linke Ohr untersucht. 30 Minuten vor Beginn der Thrombose-Induktion erfolgte die Applikation der Wirkstoffe in folgenden Dosierungen: DMSO 2% 5 mg/kg KG, AEA 10 mg/kg KG und Indomethacin 5 mg/kg KG. Die Intravitalmikroskopie nach Injektion von 0,1 ml FITC-Dextran i.v. war auf eine Stunde limitiert (Abb. 9).

6.2.3.3 Repetitive Cannabinoidexposition

Für die Untersuchung der Wirkung von WIN 55,212-2, CBD und AEA bei wiederholter Exposition wurden die Versuchstiere in 4 Gruppen unterteilt (jeweils n=5) (Tab. 9).

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
DMSO	AEA	WIN 55,212-2	CBD

Tabelle 9: Einteilung der Tiere im Versuch mit chronischer Cannabinoidexposition.

Die Versuchstiere erhielten an Tag -3, -2 und -1 eine intraperitoneale Injektion des jeweiligen Wirkstoffes (5 mg/kg KG), gelöst in DMSO 2% (5 mg/kg KG).

An Tag 0 erfolgte mit 24 Stunden Abstand zur letzten Injektion die Intravitalmikroskopie des rechten Ohres und an Tag 1 48 Stunden nach der letzten Injektion die Intravitalmikroskopie

des linken Ohres. Die Intravitalmikroskopie nach Injektion von 0,05 ml FITC-Dextran war auf eine Stunde limitiert (Abb. 10).

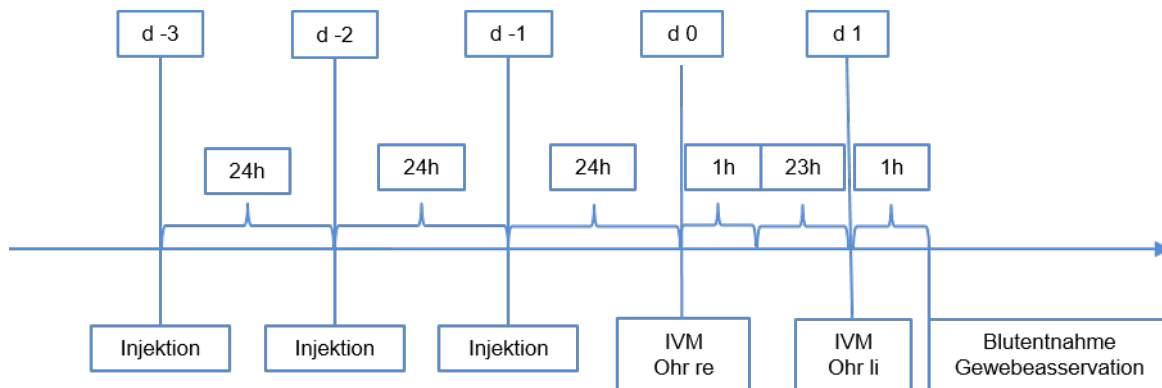


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Versuches mit chronischer Cannabinoidexposition: An Tag (d) -3, -2 und -1 erfolgte die intraperitoneale Injektion von 5 mg/kg von WIN 55,212-2, CBD, AEA oder DMSO im Abstand von 24 Stunden. An Tag 0 wurde ebenfalls nach 24 Stunden die Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion des rechten Ohres durchgeführt. Nach 23 Stunden Ruhephase für das Versuchstier erfolgte die Thrombose-Induktion im linken Ohr. Es schloss sich die Gewebeasservierung, die Blutentnahme und die Euthanasie des Versuchstieres an.

6.3 In vitro-Versuche

6.3.1 Blutentnahme und Herstellung des plättchenreichen Plasmas

Die Entnahme von jeweils drei S-Monovetten 9NC (1:10 Citrat vol/vol; Sarstedt; Nümbrecht; Deutschland) erfolgte nach schriftlicher Zustimmung und Aufklärung von 14 männlichen humanen Spendern mit einer Butterfly-Kanüle (Safety-Multifly-Set, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Die männlichen Spender waren zwischen 24 und 28 Jahren alt. Sie gaben an, 14 Tage vor der Blutentnahme kein Cannabis konsumiert und keine Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen zu haben. Die Blutentnahme war im Vorhinein durch die Ethikkommission der Universität Rostock genehmigt worden (Registriernummer: A 2015-0016).

Die erste Monovette wurde verworfen, die zwei weiteren Monovetten wurden geschwenkt und zur Bestimmung der Thrombozytenzahl dem Blutbildanalysegerät (Sysmex; Norderstedt;

Deutschland) zugeführt. Danach wurde das Citratblut mit 110 g für 15 Minuten mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremse zentrifugiert (Allegra X-12R Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornien, USA). Das PRP wurde in die Reaktionsgefäße (BD Bioscience, Bedford, USA) überführt. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl erneut bestimmt und auf $2 \cdot 10^8$ Thrombozyten/ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) eingestellt. 50 µl des PRP wurden in 200 µl PBS pipettiert. Anschließend wurden WIN 55,212-2, CBD und AEA in den unten aufgeführten Dosierungen hinzugefügt (Tab. 10).

AEA	AEA + TRAP	WIN 55,212-2	WIN 55,212-2 + TRAP	CBD	CBD + TRAP
0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM	0,1 µM
1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM

Tabelle 10: Versuchsansatz für die durchflusszytometrische Bestimmung der P-Selektin-Expression auf Thrombozyten. Zur Überprüfung ob die Thrombozyten im plättchenreichen Plasma im Ruhezustand waren und ob die ruhenden Thrombozyten durch TRAP (Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid) stimulierbar waren, wurden jeweils eine Kontrollgruppe und eine TRAP-Gruppe mitgeführt.

Um auch einen antithrombogenen Effekt detektieren zu können, wurden die Thrombozyten in einem weiteren Ansatz nach Behandlung mit den jeweiligen Cannabinoiden durch Thrombinrezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP) stimuliert.

Als Kontrollgruppe dienten ruhende Thrombozyten, zur Verifizierung der Aktivität der Blutprobe durch TRAP stimulierte Thrombozyten.

Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurde die Reaktion durch Hinzufügen von Formaldehyd 1% (Cell Fix; Becton Dickinson; Heidelberg; Deutschland) und Lagerung auf Eis gestoppt, sowie die Thrombozyten in ihrem Zustand konserviert.

Schließlich wurden die Thrombozyten bei 4° C mit 350 g für vier Minuten zentrifugiert und die Fixierlösung mit PBS ausgewaschen. Unter Ausschluss von Licht erfolgte die Färbung mit 1,5 µl monoklonalen FITC-markierten Maus anti-Human anti-P-Selektin Antikörper (Biotech; Santa Cruz). 40 Minuten später wurden die Thrombozyten mit 1 ml PBS gewaschen und erneut

bei 350 g für vier Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Thrombozyten erneut in PBS gelöst (Kram et al. 2013).

6.3.2 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurde das FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) auf Fluoreszenz-Standard-Microbeads (CaliBRITE Beads, Becton Dickinson Franklin Lakes, New Jersey, USA) eingestellt. Mit der Software CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) wurden die Thrombozyten anhand ihres forward scatter (FSC) und sideward scatter (SSC) detektiert und ihre Fluoreszenz analysiert. Von jeder Probe wurden 20000 Zellen analysiert. Die Eigenfluoreszenz und der Dot-Plot wurden in der Leerprobe erfasst. Die fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper dienten der Quantifizierung der P-Selektin-Expression auf den Thrombozyten.

Ein FITC-markierter Isotyp-Kontrolle IgG-1 Antikörper (1,5 µl; sc 8419 Santa Cruz) diente in einem gesonderten Versuchsansatz der Erkennung von unspezifischen Bindungen. Diese wurden von der Gesamtfluoreszenz der anderen Versuchsansätze subtrahiert (Kram et al. 2013). Nach der Durchflusszytometrie wurde erneut die Thrombozytenzahl bestimmt. Aufgrund der Fixierung der Thrombozyten in Formaldehyd 1% war eine Auswertung mit dem Blutbildanalysegerät (Sysmex; Norderstedt; Deutschland) nicht möglich. Ein Tropfen des PRP wurde unter das Deckglas einer Neubauer improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) pipettiert. Von oben links nach unten rechts diagonal wurden fünf Gruppenquadrate unter dem Lichtmikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany) ausgezählt. Die Thrombozytenzahl wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Thrombozyten}}{(\mu\text{l})} = \frac{\text{ausgezählte Thrombozyten}}{\text{ausgezählte Fläche (mm}^2\text{)} * \text{Kammertiefe (mm)}}$$

6.4 Statistische Analyse

Die mit CaplImage® erhobenen Daten aus den *in vivo*-Versuchen zur Gefäßverschlusszeit, Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit, sowie die Parameter Hämoglobin, Erythrozyten, Leukozyten, Hämatokrit und Thrombozyten aus dem Blutbild wurden zur Datenverarbeitung in Excel® (Microsoft®, Redmond, Washington, USA) eingepflegt. Mit SigmaPlot® (Jandel Corp., San Rafael, California; USA) erfolgte die statistische Aufarbeitung. Zunächst wurde eine One Way Analysis of Variance (ANOVA) mit einem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt. Wenn diese nicht gegeben war, wurde ein Rangsummentest für unverbundene Stichproben nach Kruskal-Wallis berechnet. Die Ergebnisse wurden mittels Dunn's Post-hoc-Test paarweise verglichen. Letztlich wurden die Ergebnisse als Box Plots oder Balkendiagramme graphisch dargestellt.

Die in den *in vitro*-Versuchen gemessene relative Fluoreszenz der Thrombozyten wurde analog zu den *in vivo*-Daten mit SigmaPlot® ausgewertet.

Eine Signifikanz der Ergebnisse wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ angenommen. Es erfolgte keine Differenzierung in Signifikanzniveaus.

7 Ergebnisse

7.1 *In vivo*-Versuche

Die intravitalmikroskopische Thromboseinduktion führt zu einem vollständigen thrombotischen Gefäßverschluss (Abb 11). Alle nach 900 Sekunden verschlossenen Gefäße wurden erfasst und die Gefäßverschlusszeit statistisch ausgewertet.

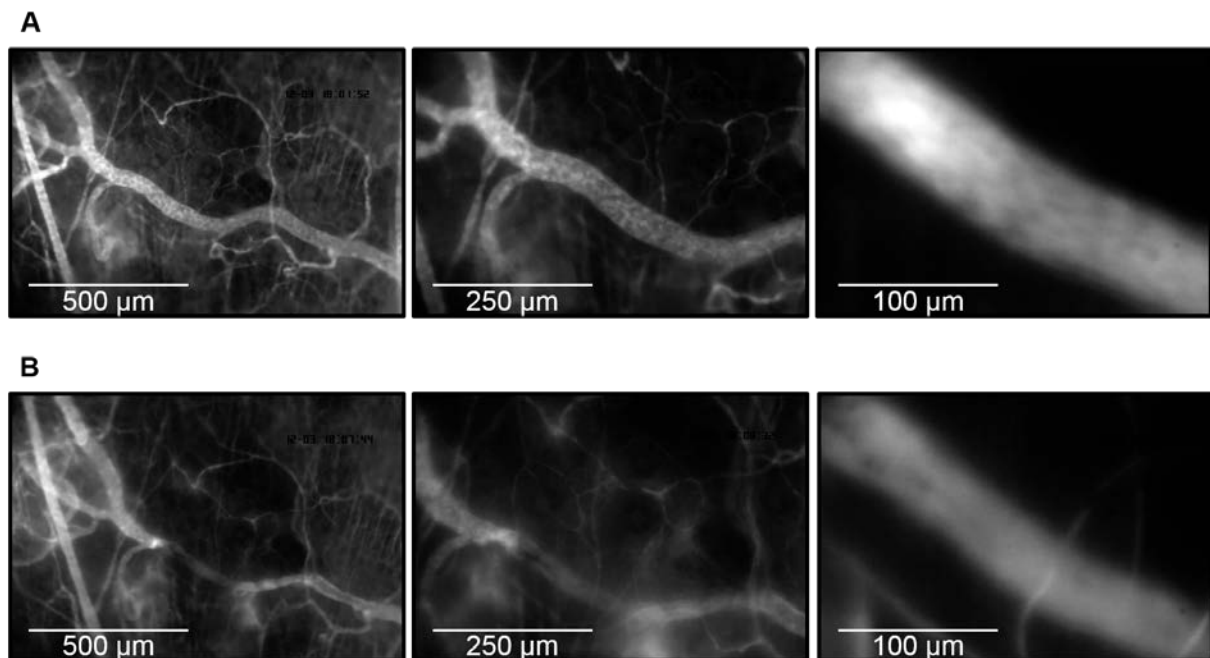


Abbildung 11: Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Gefäßen im Ohr der SKH-1/hr Maus vor (oben) und nach (unten) Thrombose-Induktion in 10-facher, 20-facher und 63-facher Vergrößerung: Zu sehen sind eine Arteriole, eine drainierende Venole und ein Thrombus in der Venole. Zur Kontrastverstärkung der Gefäße gegenüber dem Extravasalraum ist das Plasma mit FITC-Dextran 5% angefärbt.

7.1.1 Akute Cannabinoidexposition

Die intravitalmikroskopische Thromboseinduktion führte bei den Tieren der Vehikelgruppe nach Injektion von DMSO zur medianen Gefäßokklusion nach 430 Sekunden (25-% Perzentil: 330s, 75-% Perzentil: 637s).

Nach Behandlung der Versuchstiere mit WIN 55,212-2 betrug die mediane Verschlusszeit 450 Sekunden (25-% Perzentil: 330s, 75-% Perzentil: 630s).

Die Injektion von CBD führte zur Gefäßokklusion nach median 420 Sekunden (25-% Perzentil: 307s, 75-% Perzentil: 577s).

Die Verschlusszeiten nach Behandlung mit DMSO, WIN 55,212-2 und CBD unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 12).

Die Behandlung der Versuchstiere mit AEA beschleunigte den Verschluss auf 270 Sekunden im Median (25-% Perzentil: 240s, 75-% Perzentil: 360s). Die Gefäßokklusionszeit unter AEA war signifikant gegen die Verschlusszeiten der WIN 55,212-2, CBD und DMSO Behandlung verkürzt ($p < 0,05$ vs DMSO, WIN 55,212-2 und CBD) (Abb 12).

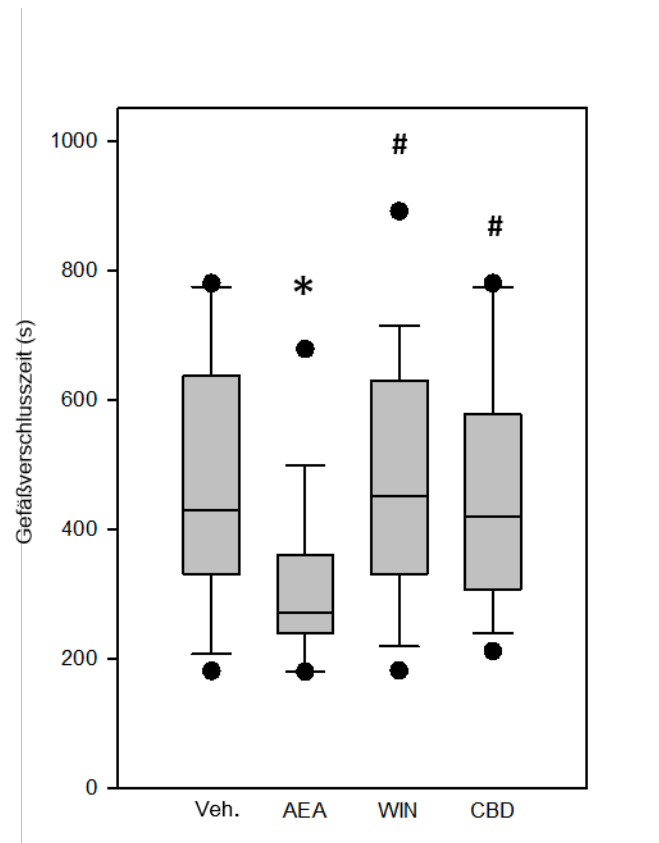


Abbildung 12: Gefäßverschlusszeit in Venolen bei akuter Cannabinoidexposition. Quantitative Analyse der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss der Venolen: * $p < 0,05$ vs Veh., # $p < 0,05$ vs AEA, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode. Dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, die Whisker und das 5. und 95. Perzentil.

7.1.2 Akute Cannabinoidexposition mit Cyclooxygenase-Inhibition

Um zu untersuchen, ob die Hydrolyseprodukte von AEA und ihre anschließende Cyclooxygenase-abhängige Metabolisation zu vasoaktiven Substanzen wie TXA_2 für den prothrombogenen Effekt verantwortlich sind, wurde in einem gesonderten Ansatz die Cyclooxygenase mit Indomethacin gehemmt (Abb. 13).

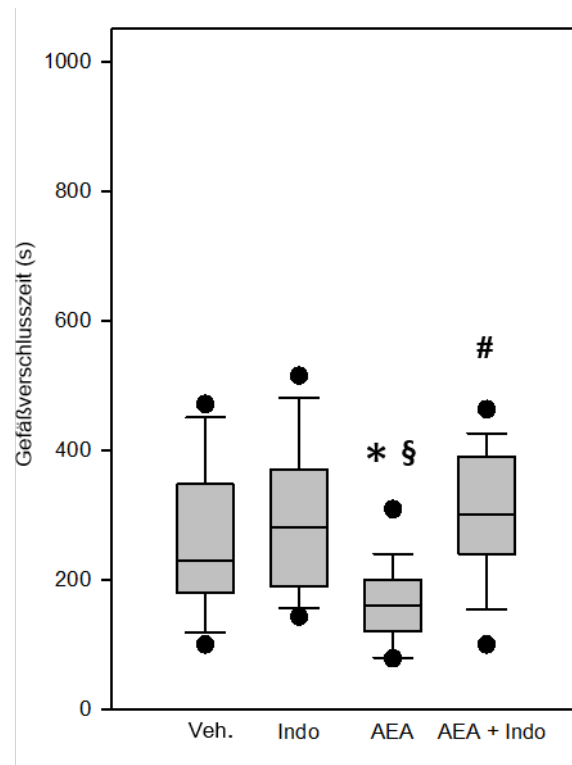


Abbildung 13: Gefäßverschlusszeiten in Venolen bei akuter Cannabinoidexposition mit Cyclooxygenase-Inhibition: Quantitative Analyse der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss der Venolen. * $p < 0,05$ vs Veh., # $p < 0,05$ vs Indo, § $p < 0,05$ vs. AEA; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode. Dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, die Whisker und das 5. und 95. Perzentil.

In der Vehikelgruppe lag der Median der Gefäßverschlusszeiten bei 240 Sekunden (25% Perzentil: 180s, 75% Perzentil: 315s). Indomethacin allein beeinflusste die Gefäßverschlusszeit nicht. Der Median der Okklusionszeiten betrug 280 Sekunden (25% Perzentil: 190s, 75%-Perzentil: 370s). Die Behandlung der Versuchstiere mit AEA führte erneut zu signifikant kürzeren Gefäßokklusionszeiten. Der Median entsprach 160 Sekunden (25%-Perzentil: 100s, 75%-Perzentil: 200s; $p < 0,05$ vs Vehikel, Indomethacin und AEA + Indomethacin).

Bei simultaner Behandlung mit AEA und Indomethacin lag der Median der Verschlusszeiten bei 300 Sekunden (25%-Perzentil: 240, 75%-Perzentil: 420s) und somit auf dem Niveau der Vehikelgruppe.

7.1.3 Repetitive Cannabinoidexposition

Bei Tieren, die mit dem Vehikel behandelt wurden, betrug die mediane Verschlusszeit 360 Sekunden (25-% Perzentil: 242s, 75-% Perzentil: 540s).

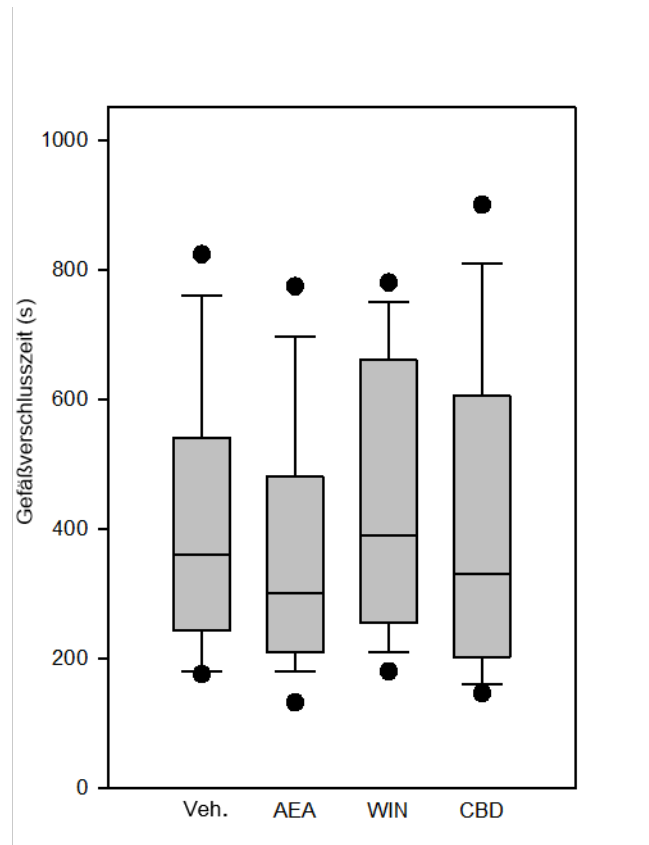


Abbildung 14: Gefäßverschlusszeit in Venolen bei repetitiver Cannabinoidexposition: Quantitative Analyse der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss der Venolen. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode). Dargestellt ist der Median, das obere und untere Quartil, die Whisker und das 5. und 95. Perzentil.

Der Median lag nach Behandlung mit WIN 55,212-2 bei 390 Sekunden (25-% Perzentil: 255s, 75-% Perzentil: 660s). Die CBD-Behandlung führte zu einem Median der Verschlusszeiten von 330 Sekunden (25-% Perzentil: 210s, 75-% Perzentil: 480s). AEA konnte bei chronischer Exposition die Verschlusszeiten nicht verkürzen. Der Median entsprach 300 Sekunden (25% Perzentil: 210s, 75% Perzentil: 480s). Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 14).

Beim paarweisen Vergleich der Ergebnisse von Versuchstag 1 (24h nach der letzten Cannabinoidinjektion) und Versuchstag 2 (48h nach der letzten Cannabinoidinjektion) des jeweiligen Cannabinoids zeigten sich ebenfalls keine statistisch relevanten Unterschiede der Gefäßokklusionszeiten (Abb. 15).

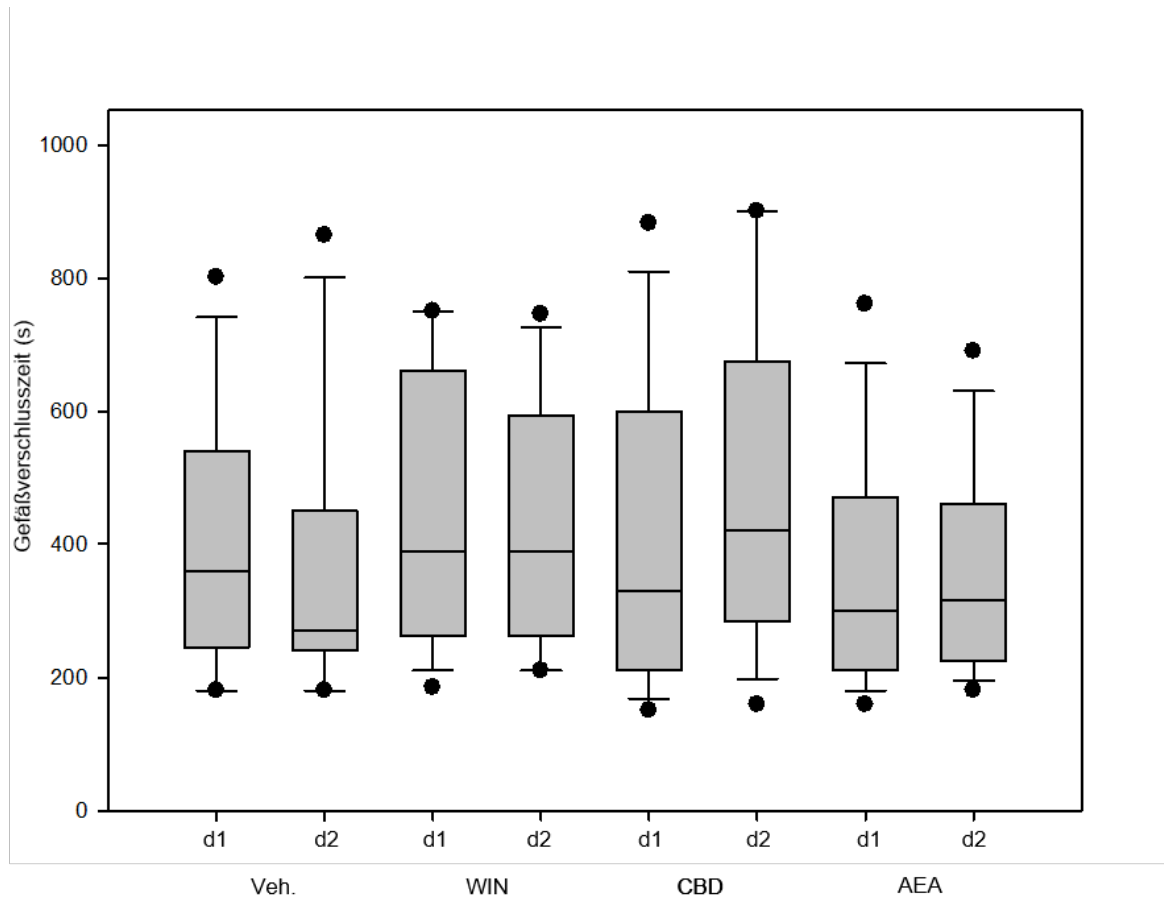


Abbildung 15: Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Gefäßverschlusszeiten nach Behandlung der Versuchstiere mit Veh., WIN 55,212-2 (WIN), CBD und AEA von Versuchstag 1 (d1) gegen Versuchstag 2 (d2):. Es ergab sich keine statische Signifikanz ($p > 0,05$). Dargestellt sind Median, das obere und untere Quartil, die Whisker und das 5. und 95. Perzentil. Es erfolgte der Rangsummentest nach Mann-Whitney.

Die dreitägige Cannabinoidbehandlung im *in vivo*-Versuchsmodell der langfristiger Exposition führte bei keinem der verwendeten Cannabinoide zu einer Beeinflussung der Thrombozytenzahl oder Leukozytenzahl (Tab. 11).

	DMSO	AEA	CBD	WIN 55,212-2
Thrombozyten ($1 \cdot 10^9/l$)	988 \pm 62	963 \pm 81	873 \pm 90	775 \pm 196
Leukozyten ($1 \cdot 10^9/l$)	5,65 \pm 1,0	5,07 \pm 0,7	5,12 \pm 1,3	5,15 \pm 0,7

Tabelle 11: Thrombozytenzahl und Leukozytenzahl nach repetitiver Cannabinoidexposition: Quantitative Analyse des kleinen Blutbildes. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM nach One Way Anova on Ranks ($p=0,522$).

7.2 In vitro-Versuche

7.2.1 P-Selektin-Expression

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigten humane Thrombozyten im Ruhezustand eine physiologisch geringe Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche. Der Median war 0,34% (25-% Perzentil: 0,14%; 75-% Perzentil: 0,76%). Die Stimulation der Thrombozyten mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid führte in allen Experimenten zur Erhöhung der P-Selektin-Expression auf 91,25% (25-% Perzentil: 87,2%; 75-% Perzentil: 94,16%) ($p < 0,05$ vs Vehikel) (Abb. 16).

Die Inkubation der Thrombozyten mit AEA in Dosierungen von 0,1 μ M (Median: 0,6%; 25-% Perzentil: 0,60%; 75-% Perzentil: 1,44%) bis 250 μ M (Median: 0,88%; 25-% Perzentil: 0,66%; 75-% Perzentil: 1,05%) führte im Vergleich zu ruhenden Thrombozyten zu keiner Erhöhung der P-Selektin-Expression.

Die Behandlung der Thrombozyten mit WIN 55,212-2 in Konzentrationen von 0,1 μ M (Median: 0,82%; 25-% Perzentil: 0,44%; 75-% Perzentil: 1,60%) bis 10 μ M (Median: 2,7%; 25-% Perzentil: 1,08%; 75-% Perzentil: 2,81%) beeinflusste die P-Selektin-Expression im Vergleich zu der Vehikelgruppe nicht signifikant.

Auch CBD hatte in Konzentrationen von 0,1 μ M (Median: 0,64%; 25-% Perzentil: 0,63%; 75-% Perzentil: 2,00%) bis 10 μ M (Median: 0,62%; 25-% Perzentil: 0,58%; 75-% Perzentil: 1,10%) keinen wesentlichen Effekt auf die P-Selektin-Expression (Abb. 17).

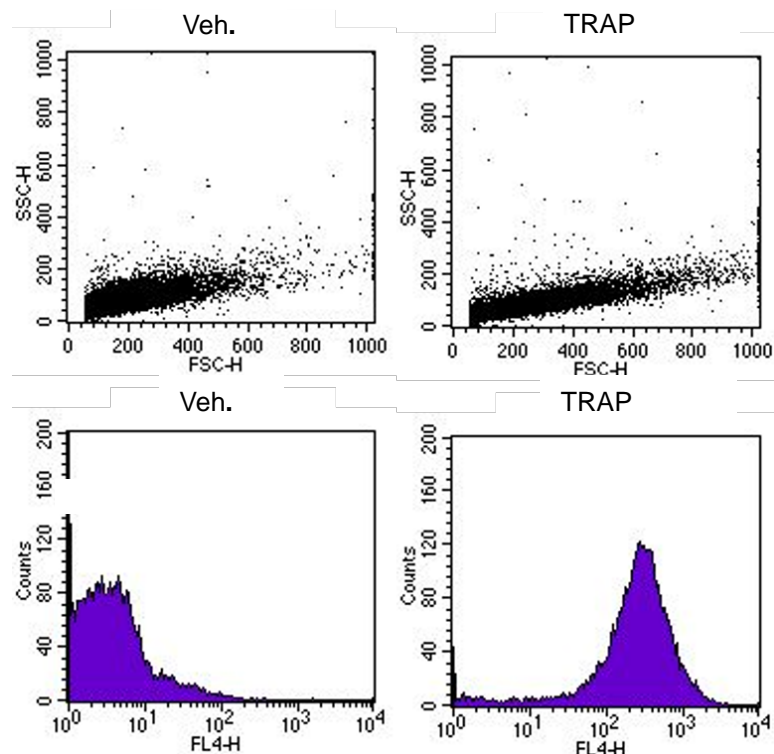


Abbildung 16: Exemplarische Dot Plots von ruhenden und aktivierten Thrombozyten: Oben sind die Dot Plots für Vehikel bzw. TRAP behandelte Thrombozyten dargestellt. Es ist der forward scatter als Marker der Zellgröße auf der x-Achse gegen den sideward scatter als Marker der P-Selektin-Expression auf der y-Achse aufgetragen. Unten ist die Fluoreszenz der monoklonalen FITC-markierten Maus anti-Human anti-P-Selektin Antikörper auf der x-Achse gegen die gezählten Zellen auf der y-Achse aufgetragen. Links ist ein typisches Verteilungsmuster für ruhende Thrombozyten und rechts für aktivierte Thrombozyten dargestellt.

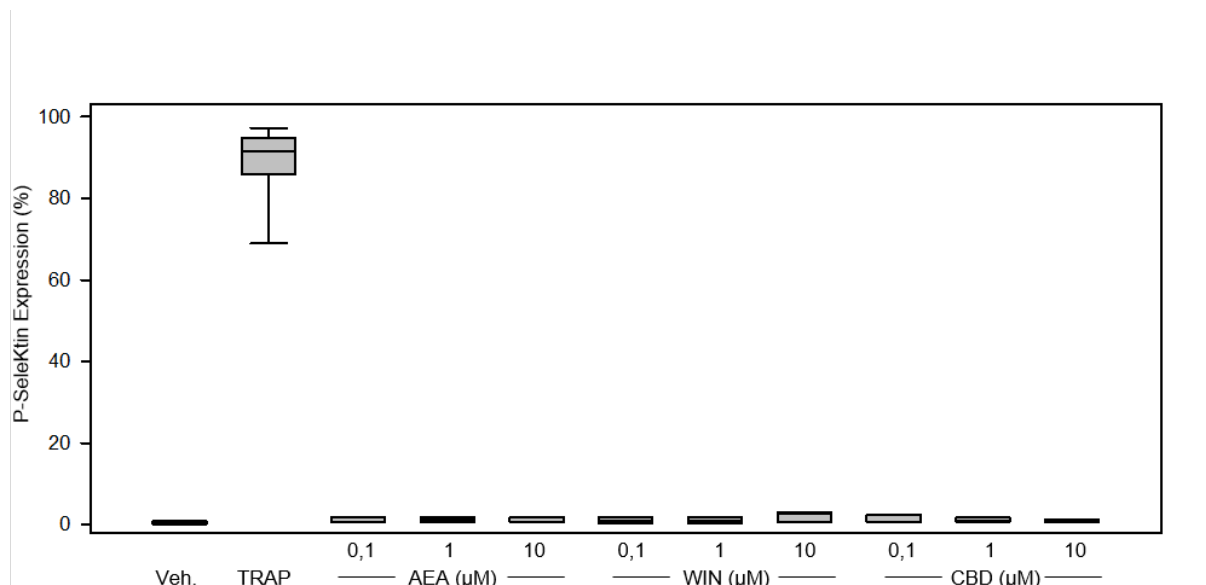


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse ruhender humaner Thrombozyten in plättchenreichem Plasma: Die P-Selektin-Expression wurde im ruhenden Zustand (Veh.) sowie nach Inkubation AEA, WIN55 und CBD in steigender Dosierung gemessen. Die Unterschiede in der P-Selektin-Expression waren statistisch nicht signifikant. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. Dargestellt sind der Median sowie das obere und untere Quartil.

Die Inkubation der Thrombozyten mit AEA und anschließender Stimulation mit TRAP in AEA Konzentrationen von 0,1 μM (Median: 90,8%; 25-% Perzentil: 73,25%; 75-% Perzentil: 96,9%) bis 100 μM (Median: 91,14%; 25-% Perzentil: 86,13%; 75-% Perzentil: 95,50%) führte zu keiner Beeinflussung der P-Selektin-Expression im Vergleich zu TRAP-stimulierten Thrombozyten (Abb. 17).

Die Behandlung der Thrombozyten mit WIN 55,212-2 und TRAP, in WIN 55,212-2 Konzentrationen von 0,1 μM (Median: 94,94%; 25-% Perzentil: 91,32%; 75-% Perzentil: 96,73%) bis 10 μM (Median: 94,34%; 25-% Perzentil: 92,33%; 75-% Perzentil: 96,25%), beeinflusste die P-Selektin-Expression im Vergleich zu TRAP-stimulierten Thrombozyten ebenfalls nicht signifikant.

Auch CBD hatte in Konzentrationen von 0,1 μM (Median: 76,94%; 25-% Perzentil: 55,43%; 75-% Perzentil: 85,74%) bis 10 μM (Median: 80,09%; 25-% Perzentil: 64,45%; 75-% Perzentil: 88,90%) keinen statistisch signifikanten Effekt auf die P-Selektin-Expression auf TRAP-stimulierte Thrombozyten (Abb. 18).

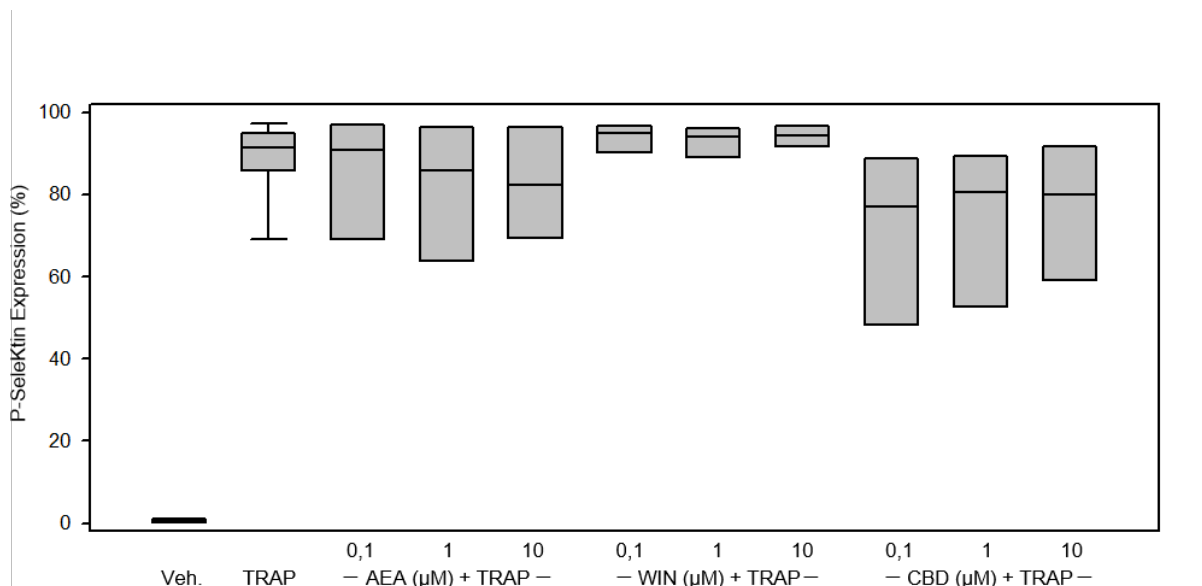


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse TRAP-aktivierter humaner Thrombozyten in plättchenreichem Plasma: Die P-Selektin-Expression wurde nach Stimulation mit TRAP allein sowie nach Stimulation mit TRAP und anschließender Behandlung mit AEA, WIN 55,212-2 und CBD in steigender Konzentration gemessen. Die Unterschiede in der P-Selektin-Expression waren statistisch nicht signifikant. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks. Dargestellt sind der Median sowie das obere und untere Quartil und die Whisker.

Die Behandlung der Thrombozyten mit 500 μM AEA erhöhte den Median der P-Selektin-Expression auf 11,86% (25-% Perzentil: 2,068%; 75-% Perzentil: 28,45%) und durch Behandlung mit 1000 μM auf 25,55% (25-% Perzentil: 18,69%; 75-% Perzentil: 43,95%). Die Expression von P-Selektin war, sowohl für 500 μM als auch für 1000 μM AEA, signifikant erhöht gegenüber den unstimulierten Thrombozyten (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode; $p < 0,05$) (Abb. 19).

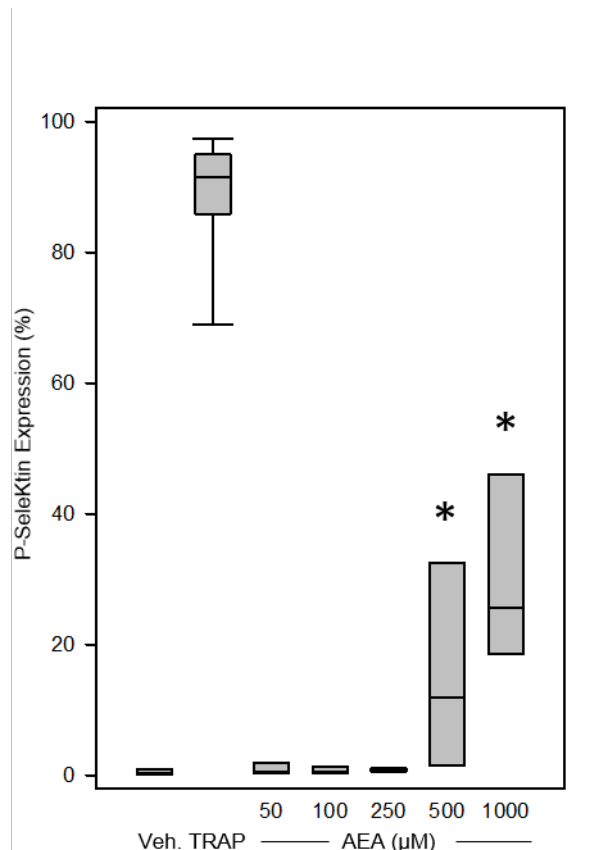


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse humaner Thrombozyten in plättchenreichem Plasma: Die P-Selektin-Expression wurde im ruhenden Zustand sowie nach Inkubation mit AEA in steigender Dosierung gemessen. * $p < 0,05$ vs Veh.; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode. Dargestellt sind der Median, das obere und untere Quartil und die Whisker.

Die Behandlung der Thrombozyten mit 250 μM AEA und TRAP verminderte den Median der P-Selektin-Expression auf 47,42% (25-% Perzentil: 43,01%; 75-% Perzentil: 66,85%) im Vergleich mit TRAP-stimulierten Thrombozyten. Dosisabhängig wurde die P-Selektin-Expression TRAP-stimulierter Thrombozyten durch Inkubation mit 500 μM AEA (Median: 7,96%; 25-% Perzentil: 2,37%; 75-% Perzentil: 19,65%) und 1000 μM AEA (Median: 11,65%;

25-% Perzentil: 7,07%; 75-% Perzentil: 23,67%) weiter reduziert. Die Expression von P-Selektin war sowohl für 250 μM , 500 μM als auch für 1000 μM AEA gegenüber den TRAP-stimulierten Thrombozyten signifikant verringert. (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode; $p < 0,05$) (Abb. 20).

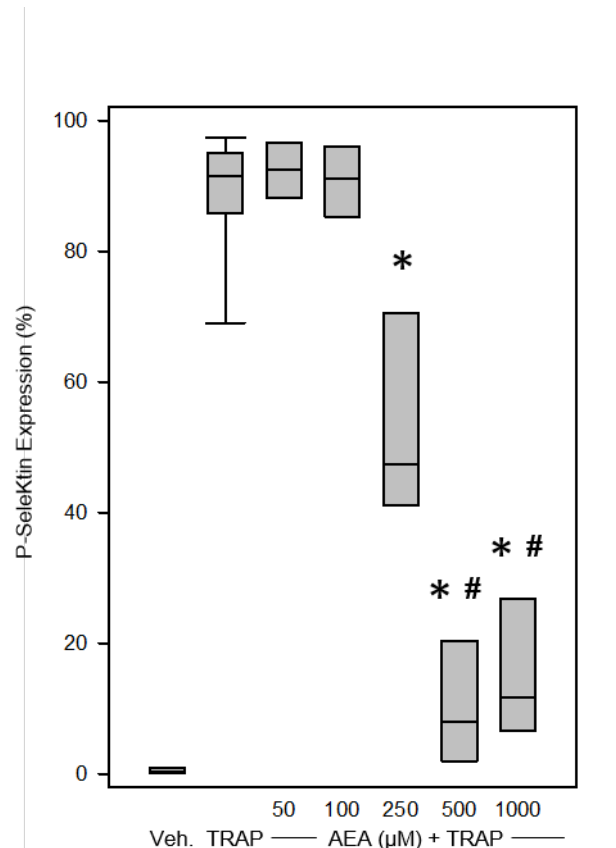


Abbildung 20: Durchflusszytometrische Analyse humaner Thrombozyten in plättchenreichem Plasma [AEA 50 – 1000 μM]: Die P-Selektin-Expression wurde nach Stimulation mit TRAP allein, sowie nach Stimulation mit TRAP und anschließender Behandlung mit AEA in steigender Dosierung gemessen. * $p < 0,05$ vs Veh.; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Dunn's Methode. Dargestellt sind der Median, das obere und untere Quartil und die Whisker.

7.2.2 Thrombozytenzahl

Um die widersprüchlichen Ergebnisse der Durchflusszytometrie für AEA in hohen Dosierungen mit scheinbar prothrombogenen Effekten auf der einen und scheinbar antithrombogenen Effekten auf der anderen Seite aufzuklären, wurde die Zellzahl in den Reaktionsgefäßen bestimmt (Abb. 21).

In der Vehikel-Lösung befanden sich nach Abschluss der Durchflusszytometrie durchschnittlich $2,1 \cdot 10^6$ ($\pm 0,30 \cdot 10^6$) Thrombozyten. Nach vorheriger Behandlung mit AEA in der Konzentration 250 μM wurden im Mittel $3,01 \cdot 10^6$ ($\pm 0,04 \cdot 10^6$) Thrombozyten gezählt.

Eine Behandlung der Thrombozyten mit AEA in den Konzentrationen 500 μM und 1000 μM reduzierte die Zellzahl konzentrationsabhängig auf $1,31 \cdot 10^6$ ($\pm 0,46 \cdot 10^6$) beziehungsweise $0,50 \cdot 10^6$ ($\pm 0,09 \cdot 10^6$) Zellen.

Die Zellzahl war nach Behandlung mit AEA in den Konzentrationen 500 μM und 1000 μM gegenüber der Lösung signifikant verringert, welche 250 μM AEA exponiert war.

Die Thrombozytenzahl nach Inkubation mit 1000 μM AEA war gegenüber der Vehikelgruppe signifikant vermindert (One Way Analysis of Variance, multipler Paarvergleich nach Holm-Sidak; $p < 0,05$).

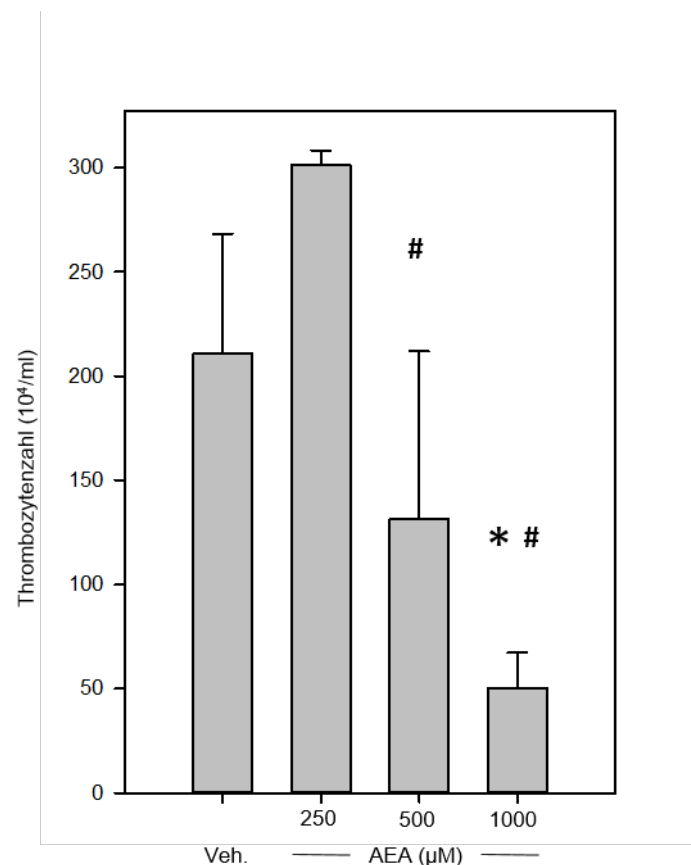


Abbildung 21: Thrombozytenzahl im PRP nach Behandlung mit AEA in steigender Dosierung: Ethanol (EtOH) diente als Lösungsmittel für AEA und als Kontrolle. Es zeigt sich bei einer AEA-Konzentration von 1000 μM eine signifikant verringerte Zellzahl gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$). One Way Analysis of Variance on Ranks, multipler Paarvergleich nach Holm-Sidak. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes.

8 Diskussion

8.1 Diskussion von Material und Methoden

8.1.1 Versuchstiere

Die haarlose Haut am Ohr der SKH-1/hr Maus ermöglicht einen unmittelbaren Zugang zu den Gefäßen für die Intravitalmikroskopie (Eriksson et al. 1980; Barker et al. 1989; Benavides et al. 2009).

Zudem gleicht der histologische Aufbau des Ohres der haarlosen Maus, abgesehen von der Abwesenheit von Schweißdrüsen, der Haut des Menschen (Benavides et al. 2009).

Optimale Untersuchungsbedingungen bestanden aufgrund der geringen Verhornung der Epidermis bei jungen Versuchstieren im Alter von vier bis sechs Wochen.

Um eine zyklusabhängige Beeinflussung der Hämostase auszuschließen, wurden ausschließlich männliche SKH-1/hr Mäuse verwendet.

Auf die Einzelhaltung der Tiere konnte verzichtet werden, da während des gesamten Versuchszeitraums keine Bissverletzungen beobachtet wurden.

8.1.2 Narkose

Die Versuchstiere wurden mit der etablierten Kombination aus 120 mg/kg KG Ketamin und 16 mg/kg KG Xylazin (Green 1982; Kronberger 1992) narkotisiert. Ketamin ist ein Glutamat-NMDA-Antagonist und bewirkt eine dissoziative Anästhesie. Es erzeugt eine Analgesie und Sedierung, erhält aber gleichzeitig die Schutzreflexe. Über Beeinflussung weiterer Neurotransmitter wirkt Ketamin kreislaufstabilisierend (Morgan et al. 1971; Keith und Shenoy 1981).

Xylazin ist ein α_2 -Rezeptor Agonist und wirkt sedierend, analgetisch und muskelrelaxierend.

Die Kombination von Ketamin und Xylazin ist in der Veterinärmedizin als „Hellabrunner Mischung“ etabliert. Nebenwirkungen sind Atemdepression, mäßige Herz-Kreislaufdepression, Hypothermie und Diurese (Green 1982).

Die Anästhetika wurden intramuskulär in den Hinterlauf der Maus injiziert, um Interferenzen mit der Absorption der intraperitoneal verabreichten Cannabinoide zu vermeiden.

Es wurde in der o.g. Dosierung und Applikationsart eine zuverlässige Anästhesie für 1,5 bis 2 Stunden erreicht. Narkosekomplikationen traten nicht auf.

8.1.3 Ohrmodell der haarlosen Maus

Die *in vivo*-Versuche zur Untersuchung der Mikrozirkulation unter Cannabinoideinfluss wurden am Ohrmodell der haarlosen Maus durchgeführt. Es handelt sich um ein etabliertes Modell, das 1980 erstmals von Eriksson et al. beschrieben wurde (Eriksson et al. 1980). Verwendung fand das Ohrmodell der haarlosen Maus hauptsächlich in Studien zur Wundheilung (Goertz et al. 2010; Goertz et al. 2011), zur Durchblutung von Hautlappen (Barker et al. 1989; Langer et al. 2001; Benavides et al. 2009) und zur Thrombose (Roesken et al. 1997; Sorg et al. 2006; Sorg et al. 2007).

Alternative Modelle zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation sind die Wange des Hamsters (Kovács et al. 1975), die Mesenterialgefäße der Ratte (Sato und Ohshima 1984), die Retina der Ratte (Wilson und Hatchell 1991) und spinale sowie kraniale Gefäßfenster der Ratte (Ishikawa et al. 2002). Weitere etablierte Modelle sind die Rückenhautkammer der Maus (Laschke et al. 2011; Kram et al. 2013; Grambow et al. 2014) und der Cremastermuskel der Ratte und der Maus (Sorg et al. 2006; 2007).

Ein großer Vorteil des Ohrmodells der haarlosen Maus gegenüber den anderen Verfahren ist der unmittelbare Zugang zu den Ohrgefäßen für die Intravitalmikroskopie. Es ist keine chirurgische Präparation notwendig, bei der es zwangsläufig zu Gewebsschäden,

Inflammation, Mediatorfreisetzung, Vasokonstriktion und Beeinflussung der Hämostase kommt (Fiebig et al. 1991). Selbst beim Modell der Rückenhautkammer, die drei Tage nach der Präparation untersucht wird, kann es durch Entzündungsvorgänge noch zu einer Alteration der Messparameter kommen. Zudem wird dem Versuchstier das Tragen der Rückenhautkammer über mehrere Tage erspart (Laschke et al. 2011).

Ein weiterer Vorteil des Ohres der haarlosen Maus ist die Möglichkeit einer zweizeitigen Thromboseinduktion, jeweils in einem Ohr des Versuchstieres. Dies erlaubt eine Beurteilung der Behandlung im zeitlichen Verlauf. Alternative Verfahren wie etwa die Rückenhautkammer bieten diese Möglichkeit aufgrund der räumlichen Nähe der thrombosierbaren Gefäße nur eingeschränkt.

Die Gefäßarchitektur im Ohr der Maus ist interindividuell sehr gut vergleichbar und man kann in beiden Ohren viele Gefäße untersuchen. Es wurden 10 Venolen pro Maus thrombosiert.

Limitiert war die Dauer der Intravitalmikroskopie durch die festgesetzte Untersuchungsdauer von maximal einer Stunde, um Verfälschungen durch Ausscheidung und Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden.

8.1.4 Intravitalmikroskopie und Thrombose-Induktion

Die Intravitalmikroskopie wurde erstmals 1945 (Knisely und Stratman-Thomas 1945) beschrieben. Die Kombination mit intravenös injizierten Fluoreszenzfarbstoffen erschloss ein breites Forschungsfeld (Sherman und Fisher 1986). Heute ist die Intravitalmikroskopie ein etabliertes Verfahren, um unterschiedlichste *in vitro*-Forschungsergebnisse *in vivo* zu verifizieren (Barker et al. 1988; Roesken et al. 1997).

Alternative Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation sind die Mikrosphären-Technik (Zwissler et al. 1991), die Laser-Doppler-Flowmetrie (Vollmar et al. 1994) und die Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Blut (Vollmar et al. 1992).

Der entscheidende Vorteil der Intravitalmikroskopie, insbesondere in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen, besteht in der Möglichkeit, die Mikrozirkulation direkt optisch und in Echtzeit zu beobachten (Barker et al. 1989) (Abb. 22).

Für die Induktion einer Thrombose im Versuchstier stehen die elektrische Endothelläsion (Callahan et al. 1960), die mechanische Endotheldenudation durch einen Ballonkatheter (Lee und Lee 1975), die mechanische Gefäßverletzung (Hugues 1953), die Beschädigung der Gefäßwand und der zirkulierenden Blutbestandteile durch einen Laser (Kochen und Baez 1965; Kovács et al. 1975; Rosen et al. 2001) und die Einleitung einer Ischämie oder einer Inflammation (Massberg et al. 1999; Cerwinka et al. 2002; Rumbaut et al. 2005) zur Verfügung. In der vorliegenden Studie wurde mit der light/dye-Methode ein weiteres Verfahren der Thrombose-Induktion eingesetzt. Es ermöglicht die visuelle Darstellung des Thrombuswachstums vom Beginn der Thrombose-Induktion bis zur vollständigen Gefäßokklusion. Das light/dye-Modell ist im Gegensatz zu alternativen Verfahren wenig invasiv und erhält ein weitgehend physiologisches Milieu im Zielgefäß während der Thrombose-Induktion (Roesken et al. 1997).

Zudem findet die Thrombosierung des Gefäßes streng lokal im Lichtkegel des Mikroskops statt. Benachbarte Gefäße sind nicht betroffen und können nachfolgend für eine Thrombose-Induktion herangezogen werden.

Der thrombogene Effekt der Epi-Illumination entsteht durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus dem Fluoreszenzfarbstoff bei der Reaktion mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (Saniabadi et al. 1995). Die freigesetzte Wärmeenergie ist für eine Endothelschädigung nicht ausreichend (Herrmann 1983; Sato und Ohshima 1984; Steinbauer et al. 2000). Die Expositionszeit der fließenden Partikel ist im Vergleich mit den ortsständigen Endothelzellen 1000-fach geringer. Der thrombogene Effekt wird folglich durch den phototoxischen Endothelschaden verursacht (Herrmann et al. 1983). Daher eignet sich das Modell der phototoxischen Thrombose-Induktion sehr gut, um die Thrombosegenese aufgrund einer Endothelläsion zu simulieren. Die Thrombozyten werden durch Kontakt mit der

subendothelialen Matrix aktiviert und aggregieren. Es bildet sich ein weißer Thrombus, der hauptsächlich aus Thrombozyten besteht (Rumbaut et al. 2005).

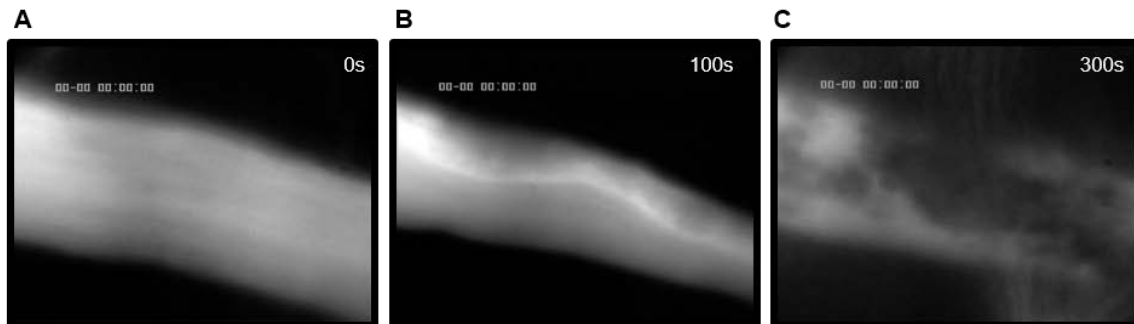


Abbildung 22: Phototoxische Induktion einer Thrombose in einer Venole nach (A) 60 s, (B) 120 s und (C) 180 s. Im Lichtkegel des Mikroskops bildet sich lokalisiert ein randständiger Thrombus, der zunehmend das komplette Gefäßlumen okkludiert.

Dieser Mechanismus spielt beispielsweise bei der Ruptur von atherosklerotischen Plaques beim Übergang von einer stabilen zur instabilen Angina pectoris und bei Gefäßanastomosen eine herausragende klinische Rolle.

Für die Injektion des FITC-Dextrans wurde die Direktinjektion in die Halsvene des Tieres gewählt, um eine unmittelbare und vollständige Verfügbarkeit des Farbstoffes im Gefäßsystem der Maus sicherzustellen.

Bei der Injektion in die Schwanzvene und in den retrobulbären Venenplexus bleibt stets eine Unsicherheit, wie viel Farbstoff paravasal verabreicht wurde. Eine ungenaue Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe beeinflusst wiederum stark die Gefäßokklusionszeit.

In Arteriolen bewirkt die phototoxische Lichtexposition einen Vasospasmus (Rumbaut et al. 2005). Um eine Beeinflussung der Okklusionszeit durch Steigerung der Flussgeschwindigkeit und Verringerung des Gefäßdurchmessers auszuschließen, wurden lediglich Venolen untersucht.

8.1.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde für die Analyse der P-Selektin-Expression auf Thrombozyten genutzt.

Das prothrombotische Adhäsionsmolekül P-Selektin ist ein guter Marker für die Plättchenaktivität (Grambow et al. 2014). P-Selektin ist in ruhenden Thrombozyten in der α -Granula gespeichert und wird bei Aktivierung extrazellulär auf die Zellmembran transloziert. Hier kann es in der Durchflusszytometrie qualitativ und quantitativ erfasst werden.

Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter, FACS) messen primär die Lichtstreuung von Zellen einer Suspension, die einzeln eine Kapillare passieren. Ein Laser erfasst die Vorwärtsstreuung (forward scatter, FSC) und rechtwinklig dazu die Seitwärtsstreuung (sideward scatter, SSC) des Lichtes.

Die Vorwärtsstreuung wird durch Zellgröße, die Seitwärtsstreuung durch Zellmembran, Oberflächenmoleküle und Zellorganellen beeinflusst. Verschiedene Zelltypen lassen sich zuverlässig differenzieren.

Durch Kombination der Durchflusszytometrie mit Fluoreszenzantikörpern können bestimmte Membranproteine quantifiziert werden.

Ein Nachteil der Durchflusszytometrie ist die mangelnde Fähigkeit zu differenzieren, ob die Aktivierung der Thrombozyten auf den Agonisten, im Fall der vorliegenden Studie TRAP, oder auf einen toxischen Zellschaden und konsekutiv freigesetzte prothrombogene intrazelluläre Mediatoren zurückzuführen ist.

8.1.6 Versuchssubstanzen

AEA wurde 1992 von Devane et al. entdeckt und ist bis heute das meistbeforschte endogene Cannabinoid. Es ist das Amid von Arachidonsäure und Ethanol (Abb. 23) (Devane et al. 1992).

AEA ist ein voller Agonist am CB₁ Rezeptor und ein partieller Agonist am CB₂-Rezeptor (Gonsiorek et al. 2000; Showalter et al. 1996). Die Dissoziationskonstante K_i beträgt für CB₁ 89 nM und für CB₂ 371 nM. Zum Vergleich beträgt die Dissoziationskonstante K_i von THC zu CB₁ 53 nM und für CB₂ 75 nM. Zudem bindet AEA an TRPV₁, TRPV₄, GPR₅₅, 5-HT₃ und den Glycin Rezeptor. AEA ist im Vergleich zu pflanzlichen und synthetischen Cannabinoiden ein schwacher Cannabinoidrezeptor-Agonist, hat aber ein breites Spektrum an Rezeptoraktivität. Dadurch ist AEA an der Regulation zahlreicher Organsysteme beteiligt.

Der AEA Plasmaspiegel liegt physiologisch bei etwa 1 ng/ml, kann aber lokal bei pathologischen Prozessen bis über 1000 ng/ml ansteigen (Thieme et al. 2014; Lindgren et al. 2015; Xiong et al. 2015).

Bei Applikation im Tiermodell löst es die typische Cannabinoid-Tetrade durch CB₁-Rezeptorstimulation aus. Sie besteht aus Hypomotilität, Katalepsie, Hypothermie und Analgesie. Alle Wirkungen auf das Verhalten der Versuchstiere konnten durch CB₁-Antagonisten und CB₁-Knockout verhindert werden (Ahn et al. 2008; Altun et al. 2015).

Messbare Effekte auf Verhalten und Blutdruck der Versuchstiere sind ab einer Dosis von 0,5 mg/kg beschrieben (Stein et al. 1996; Calignano et al. 1997, Arizzi et al. 2004).

Für die vorliegende Arbeit wurden, sich an diesen Studien orientierend, 5 und 10 mg/kg AEA verwendet.

AEA kann i.v. und i.p. injiziert werden. Die i.v.-Applikation zeigt sicher und reproduzierbar gute Effekte. Die Wirkung wird aber durch FAAH und unspezifische Esterasen schnell beendet. Die maximalen Effekte wurden ein bis drei Minuten nach i.v.-Applikation erreicht (Garcia et al. 2001). Die i.p.-Applikation führt zu einer langsameren Wirkstofffreisetzung, aber schlechter kalkulierbarer Resorption (Smith et al. 1994; Stein et al. 1996). Durch 2,5 mg/kg AEA i.p. wurden in der Maus psychotrope Effekte ausgelöst (Arizzi et al. 2004; Gallo et al. 2014).

In vitro wurde eine AEA-Plasmahalbwertszeit von 80 Minuten bei 37° C gemessen (Hillard et al. 1995).

Die *in vitro* verwendeten Konzentrationen orientieren sich an den zuvor veröffentlichten Studien zum Einfluss von AEA auf die Thrombozytenaktivität (Maccarrone et al. 1999; Braud et al. 2000; Deusch et al. 2004; Signorello et al. 2011; Brantl et al. 2014; Angelis et al. 2014). In der vorliegenden Studie wurde AEA als endogenes Cannabinoid verwendet, um durch die breite, über CB₁ und CB₂ hinausgehende Rezeptoraktivität, eine non-CB_{1/2}-Cannabinoidrezeptor-abhängige Beeinflussung der Thrombozytenfunktion aufklären zu können.

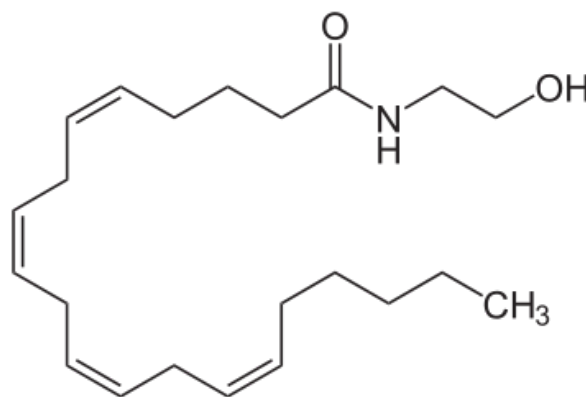


Abbildung 23: Strukturformel von AEA

WIN 55,212-2 ist ein synthetisches Cannabinoid. Es ist der Prototyp der Aminoalkylindole (Abb. 24).

WIN 55,212-2 hat eine sehr hohe Affinität zu den klassischen CB_{1/2}-Rezeptoren. Die Dissoziationskonstante K_i beträgt für CB₁ 1,89 nM, und für CB₂ 0,28 nM (Showalter et al. 1996; Johns et al. 2007; Felder et al. 1998).

Durch die hohe Affinität zum CB₁-Rezeptor wirkt WIN 55,212-2 stark psychotrop. Im Tierversuch ließen sich ab einer Dosierung von 0,3 mg/kg i.v. alle Symptome der CB₁-Tetrade auslösen (Wiley et al. 2014).

Zahlreiche Studien belegen die Wirksamkeit von WIN 55,212-2 nach i.p.-Applikation (Alijanpour et al. 2013; Abboussi et al. 2014; Gallo et al. 2014).

Für WIN 55,212-2 sind zahlreiche positive Effekte beschrieben, die es für die weitere Forschung und gegebenenfalls für die Entwicklung von Pharmazeutika interessant machen. So konnte die Applikation von WIN 55,212-2 die Größe von zerebralen Infarktarealen nach Gefäßverschluss in Ratten verkleinern (Nagayama et al. 1999), die β -Amyloid-abhängige Glia-Zell-Aktivierung in der Pathogenese des Morbus Alzheimer hemmen (Ramirez et al. 2005) und zu einer Dilatation humaner Bronchien *ex vivo* führen (Grassin-Delyle et al. 2014). Trotz der negativen psychotropen Effekte ist WIN 55,212-2 also ein besonders für die Neurologie vielversprechender Wirkstoff (Sun et al. 2013).

In Thrombozyten konnten durch Catani et.al. $CB_{1/2}$ -Rezeptoren nachgewiesen werden. Diese lassen sich durch WIN 55,212-2 stark aktivieren (Catani et al. 2010). In der vorliegenden Studie wurde WIN 55,212-2 ausgewählt, um einen $CB_{1/2}$ -Rezeptor-abhängigen Mechanismus der Thrombozytenaktivierung untersuchen zu können.

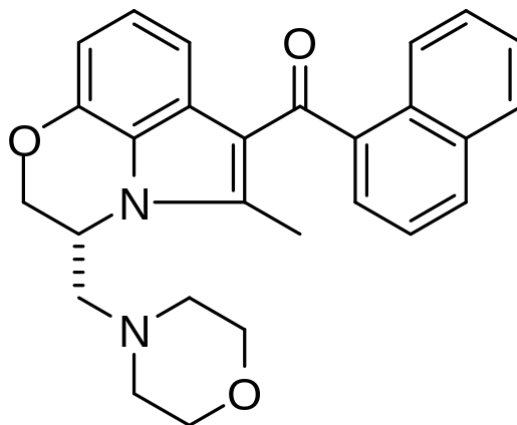


Abbildung 24: Strukturformel von WIN 55,212-2

CBD ist das zweithäufigste Phytocannabinoid nach THC in *Cannabis sativa* L. Cannabidiol wurde 1940 von Roger Adams und Alexander Todd erstmals isoliert und charakterisiert. 1963 gelang die Aufklärung der Struktur von CBD (Abb. 25) (Mechoulam und Hanuš 2002).

CBD ähnelt strukturell stark THC, besitzt pharmakodynamisch allerdings andere Eigenschaften. Die Rezeptoraffinität zu den klassischen Cannabinoidrezeptoren ist sehr

gering. Die Dissoziationskonstante K_i für CB_1 beträgt 1820 nM und zu CB_2 2860 nM (Jones et al. 2010; Xiong et al. 2012). Diese Daten lassen auf einen schwachen inversen Agonismus schließen (McPartland et al. 2007).

Bemerkenswert ist, dass die Effekte von CBD in der Anwesenheit eines CB_1 -Antagonisten und in CB_1 -Rezeptor Knockout Mäusen nicht oder nur vermindert auftraten. Diese Beobachtung lässt auf einen allosterischen Einfluss auf die Cannabinoidrezeptoren schließen (McPartland et al. 2015).

Tatsächlich konnten einige Studien eine Hemmung der Aktivität der FAAH und des EMT durch CBD feststellen. Auf diese Weise kann CBD den Endocannabinoidtonus erhöhen und so indirekt die Cannabinoidrezeptoren aktivieren. Zudem wird durch die Aktivierung der Phospholipase A_2 Arachidonsäure für die Synthese der endogenen Cannabinoide bereitgestellt. Auch die 2-AG-Plasmakonzentration wird durch die Einnahme von CBD erhöht (McPartland et al. 2015). Hierdurch können hohe Dosen ($>10 \mu\text{M}$) von CBD CB_1 -abhängige Effekte im Tierversuch hervorrufen (McPartland et al. 2007).

Weitere Rezeptoren, die von CBD moduliert werden, sind GPR_{55} , α_1 -Adrenorezeptoren, Dopamin D_2 -Rezeptoren, GABA-Rezeptoren, μ - und δ -Opioid-Rezeptoren, $TRPV_1$ und $PPAR-\gamma$ (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012b; McPartland et al. 2015).

CBD wirkt anxiolytisch, antineoplastisch, analgetisch, anti-inflammatorisch, anti-emetisch, antidepressiv, antipsychotisch und antikonvulsiv (Mechoulam und Hanuš 2002; Grotenhermen 2004; Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; McPartland et al. 2015). Während die THC-Wirkung auf Spasmolyse, Antikonvulsion, Analgesie und Nausea verstärkt wurde, konnten die psychischen Nebenwirkungen wie Angst und Psychosen reduziert werden (Grinspoon und Bakalar 1998; McPartland et al. 2015).

Zudem ist CBD ein potentes Antioxidans und kann reaktive Sauerstoffspezies etwa 40mal wirksamer entgiften als Vitamin C (McPartland et al. 2015).

Diese Wirkungen und die Abwesenheit von psychotropen Effekten machen CBD zu einem interessanten Arzneimittel, dass auch schon als Teil des Cannabisextraktes Sativex®

zugelassen ist. Zudem besitzt es ähnlich wie AEA eine sehr breite modulierende Rezeptoraktivität und wurde daher in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

Übliche und wirksame Konzentrationen von CBD lagen in den zuvor veröffentlichten Studien bei 0,1 μM bis 100 μM *in vitro* (Zuardi et al. 1993; McPartland et al. 2007; 2015; Jones et al. 2010; Xiong et al. 2015).

Ramer et al. zeigten, dass die im vorliegenden Versuch verwendete Dosis von 5 mg/kg KG i.p. CBD in der Maus wirksam ist (Ramer et al. 2010).

Die maximale Dosis von CBD im Rahmen der Therapie mit Sativex® sind nach Arzneimittelinformation (Stand Mai 2011) maximal 0,5 mg/kg KG appliziert als Sprühstoß p.o.

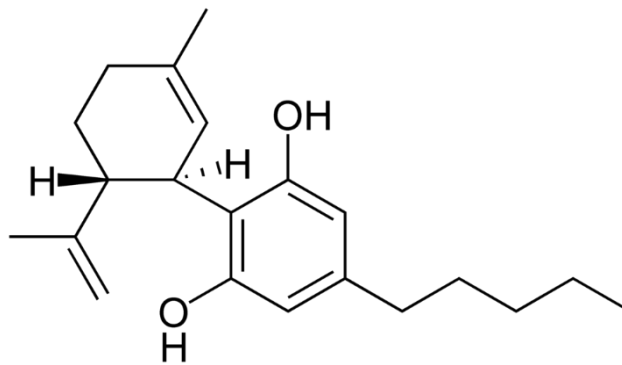


Abbildung 25: Strukturformel von CBD

Als Lösungsmittel für die *in vivo*-Versuche wurde das farb- und geruchlose Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. DMSO wirkt anti-inflammatorisch, vasodilatierend und radikalbindend (Salim 1992). Eine messbare Beeinflussung der Gefäßokklusionszeit im light/dye-Modell der Thromboseinduktion wurde nicht festgestellt (Herrmann 1983). Zudem waren alle Wirkstoffe und Kontrollgruppen im Tierversuch DMSO gelöst, um einen Einfluss eines möglichen antithrombogenen Effektes durch DMSO auszuschließen.

Für die Hemmung der Cyclooxygenase als Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese wurde der unspezifische Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin eingesetzt. Alternativ zur Cyclooxygenase ist auch die Hemmung der anderen Enzyme, die am Abbau von AEA zu TXA_2

beteiligt sind, möglich. Von einer Hemmung der FAAH wurde wegen kontroverser Daten im Versuch mit den Inhibitoren JZL184 und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) Abstand genommen (Maccarrone 2014; Braud et al. 2000; Angelis et al. 2014). Zudem erschien der Einsatz von Indomethacin wegen der geringeren Beeinflussung des endogenen Cannabinoidsystems sinnvoller.

Die Hemmung der Cyclooxygenase wirkt sich auf das komplexe Zusammenspiel antithrombogener endothelialer und prothrombogener thrombozytärer Prostaglandine aus. Die Behandlung der Versuchstiere mit Indomethacin allein führte in vorliegenden Modell der Thromboseinduktion zu keiner signifikanten Beeinflussung der Gefäßverschlusszeit (Taher et al. 2015). Auch Sorg et al. konnten im Cremaster-Modell der Maus keine Veränderung der Thrombosezeiten durch Indomethacin feststellen (Sorg et al. 2006).

Entsprechend der Herstellerangaben wurden die Cannabinoide für die *in vitro*-Versuche in Ethanol gelöst. Es ergab sich in der finalen Lösung abhängig von der Cannabinoidkonzentration eine Ethanolkonzentration von 0,1% bis 1%. Gegenüber der Kontrollgruppe mit PRP ohne Ethanol zeigten sich für die vorliegenden Ethylkonzentrationen in der Durchflusszytometrie und in der Zählkammer keine Hinweise auf eine Toxizität.

Für die Aktivierung der Thrombozyten wurden 100 μ M TRAP verwendet, um einen möglichen antithrombogenen Effekt aufdecken zu können,. Dies entspricht der gängigen Dosierung zur Untersuchung aktivierter Thrombozyten (Weber und Schrör 2001; Kram et al. 2013).

8.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie demonstriert, dass das endogene Cannabinoid AEA Cyclooxygenase-abhängig *in vivo* prothrombogen wirkt, während weder das synthetische Cannabinoid

WIN 55,212-2 noch das pflanzliche Cannabinoid CBD einen Effekt auf die Thrombogenese hatten. *In vitro* führte die Exposition von Thrombozyten mit AEA zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung und damit Hochregulation von P-Selektin auf der Zellmembran. Im Gegensatz dazu führte AEA zu einer Herunterregulation von P-Selektin auf zuvor mit TRAP-stimulierten Thrombozyten. In AEA-Konzentrationen $> 500 \mu\text{M}$ wurde zudem die Thrombozytenzahl im Versuchsansatz reduziert.

Die Cannabinoide sind pleiotrope Substanzen und werden zunehmend klinisch eingesetzt. Die wichtigsten Indikationen sind die ausgeprägte Spastik bei Multipler Sklerose, das Zytostatika-induzierte Erbrechen, die Kachexie und der chronische Schmerz. Hier profitieren die Patienten von den spasmolytischen, antiemetischen, appetitsteigernden und analgetischen Effekten der Cannabinoide (Hollister 1998; Butrica 2002; Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; Hazekamp et al. 2013).

Auch der Einfluss der Cannabinoide auf die Thrombose und die Thrombozytenaktivität rückte in den Fokus der Forschung und konnte bis heute, trotz zahlreicher *in vitro*-Studien, nicht abschließend geklärt werden (Tab. 10). Tatsächlich exprimieren humane Thrombozyten CB_1 sowie CB_2 und besitzen eine relevante FAAH-Aktivität (Maccarrone 2014; Catani et al. 2010). Diese Beobachtung lässt eine Beeinflussung humaner Thrombozyten durch Cannabinoide wahrscheinlich erscheinen.

Die erste Studie zum Einfluss von Cannabinoiden auf die Thrombozyten führten Formukong et. al. bereits 1989 durch. Sie beobachteten eine antithrombogene Wirkung von THC und CBD auf humane Thrombozyten und Kaninchen-Thrombozyten in Dosen von $10 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ (Formukong et al. 1989).

Eine weitere umfangreiche aktuelle Studie von de Angelis et al. stellte ebenfalls eine antithrombogene Wirkung von AEA fest. Das PRP und die gewaschenen Thrombozyten von humanen Spendern wurden aggregometrisch und durchflusszytometrisch in AEA-Konzentrationen von 1 bis $50 \mu\text{M}$ untersucht. Auch Thrombozyten, die aus dem Blut von regelmäßigen Cannabiskonsumenten gewonnen wurden, waren eingeschränkt aktivierbar.

De Angelis et al. diskutieren eine verminderte Sekretion der α -Granula und eine verminderte Aktivität von GPIIb/IIIa (Angelis et al. 2014).

Ein antithrombogenes Potential der Cannabinoide würde diese für die Medikamententwicklung sehr interessant machen.

Allerdings stellte die Mehrzahl der Arbeitsgruppen, die sich mit dem Einfluss der Cannabinoide auf die Thrombozyten beschäftigten, einen prothrombogenen Effekt fest.

1999 behandelten Maccarrone et al. gewaschene humane Thrombozyten mit AEA in Dosen zwischen 1 μ M bis 1600 μ M. Im Aggregometer zeigte sich eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten mit einem Wirkmaximum von 1300 μ M AEA. Eine vorherige Behandlung mit dem unspezifischen Cyclooxygenase-Inhibitor Acetylsalicylsäure (ASS) und dem unspezifischen FAAH-Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) konnte den prothrombogenen Effekt von AEA nicht unterbinden. Maccarrone et al. schlossen daher auf eine Cannabinoidrezeptor-abhängige Wirkung, zumal der prothrombogene Effekt von AEA stärker war als von Arachidonsäure (AA) allein (Maccarrone et al. 1999).

Baldassari et al. aus der gleichen Arbeitsgruppe kamen 2008 zu vergleichbaren Ergebnissen für 2-AG. Eine Behandlung mit CB₁- und CB₂-Rezeptor-Antagonisten kann die prothrombogene Wirkung auf die gewaschenen humanen Thrombozyten nicht terminieren. Daher wurde einem bislang noch nicht bekannten non-CB₁/CB₂-Cannabinoid-Rezeptor die Vermittlung des prothrombogenen Effekts zugeschrieben (Baldassarri et al. 2008).

Signorello et al. untersuchten 2011 den Einfluss von AEA auf die thrombozytäre NO-Synthese und Plättchenaktivität. Die thrombozytäre NO-Synthese wurde in geringen AEA Konzentrationen (0,5 μ M bis 10 μ M) CB₁-abhängig gesteigert. Für unphysiologisch hohe AEA-Konzentrationen um 1000 μ M wurde aggregometrisch ein prothrombogener Effekt festgestellt (Signorello et al. 2011).

Braud et al. verwendeten gewaschene Thrombozyten von Kaninchen und untersuchten den Einfluss von AEA in Konzentrationen von 0,1 μ M bis 200 μ M im Aggregometer. Es wurde ein maximaler prothrombogener Effekt bei einer AEA-Konzentration von 3 bis 10 μ M beobachtet. Die Dosis-Wirkungskurve war deckungsgleich mit AA. Die Thrombozytenaggregation nach

Behandlung mit AEA war gegenüber der Behandlung mit AA verzögert. Eine zusätzliche Applikation von ASS konnte die Wirkung von AEA und AA effektiv antagonisieren. Eine zusätzliche Behandlung mit PMSF hemmte den Effekt von AEA, nicht aber den Effekt von AA. Braud et al. schlossen daraus, dass AEA zu AA degradiert wird und über seine Metaboliten Cyclooxygenase-abhängig prothrombogen wirkt (Braud et al. 2000).

Brantl et al. untersuchten 2014 die endogenen Cannabinoide Virodhamin, 2-AG und AEA aggregometrisch in humanem PRP und Vollblut. AEA hatte in Konzentrationen von 100 µM bis 800 µM keinen Einfluss auf die Thrombozytenaktivität. Virodhamin und 2-AG hingegen aktivierten die Thrombozyten Cyclooxygenase-abhängig. Eine Hemmung der Monoacylglycerol Lipase (MAGL), die AA aus der Esterbindung in Virodhamin und 2-AG freisetzt, konnte die Aktivierung der Thrombozyten durch diese endogenen Cannabinoide verhindern. Brantl et al. folgerten, dass die endogenen Cannabinoide als Arachidonsäurereservoir prothrombogen wirken (Rodriguez-Linares und Cano 1995). AEA könne diesen Effekt nicht entfalten, weil es im Versuch nicht in die Thrombozyten aufgenommen werde und so nicht durch die zytoplasmatische FAAH der Thrombozyten gespalten würde. Die MAGL habe auch im Plasma eine ausreichende Aktivität (Brantl et al. 2014).

Die Resultate scheinen folglich stark von der Herkunft der Thrombozyten (Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen), von der Aufbereitung der Thrombozyten (plättchenreiches Plasma, Vollblut, gewaschene Thrombozyten) und der Untersuchungsmethode (Durchflusszytometrie, Aggregometer) abhängig zu sein.

Klinische Anhaltspunkte für ein prothrombogenes Potential der Cannabinoide ergeben sich aus aktuellen Case-Reports. Diese berichten über ein erhöhtes Risiko für Cannabiskonsumenten einen Myokardinfarkt zu erleiden (Mittleman et al. 2001; Sauvanier et al. 2002; Dahdouh et al. 2012; Hodcroft et al. 2014; Casier et al. 2014).

Anti-thrombogen		Pro-thrombogen					
Formukong et al.	Angelis et al.	Maccharone et al.	Braud et al.	Deusch et al.	Baldassari et al.	Signorello et al.	Brantl et al.
1989	2014	1999	2000	2004	2008	2011	2013
J. Pharm. Pharmacol. 41 (10)	PLoS One 9 (9)	FEBS Lett 447 (2-3)	FEBS Lett 471 (1)	Anesth. Analg. 99 (4)	JTH 6 (10)	J Cell. Biochem. 112 (3)	Platelets 25 (3)
THC, CBD	AEA	AEA	AEA	THC	2-AG	AEA	AEA, 2-AG, Virodhamin

Tabelle 10: Synopsis der veröffentlichten *in vitro*-Studien zum Einfluss der Cannabinoide auf Thrombozyten. Die Studien sind nach beschriebenen anti- und prothrombogenen Effekten geordnet. Von oben nach unten werden die Arbeitsgruppe, Jahr der Publikation, Journal und verwendete Cannabinoide aufgeführt.

Ausgehend von diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie erstmals *in vivo* der Einfluss von Cannabinoiden auf die Thrombogenese untersucht. Der starke CB₁ und CB₂ Agonist WIN 55-212,2 und das pflanzliche Cannabinoid CBD mit intrinsischer Aktivität an allen Cannabinoidrezeptoren wurden verwendet, um eine mögliche Cannabinoidrezeptor-abhängige Beeinflussung der Thrombozytenaktivität aufzuklären.

CB₁ und CB₂ koppeln wie die Rezeptoren der prothrombogenen Messenger Thrombin, TXA₂, ADP, Adrenalin, Prostaglandin-E₂ und Serotonin an inhibitorische G-Proteine. Die konsekutiv verminderte cAMP Konzentration antagonisiert den Einfluss wichtiger antiaggregatorisch wirksamer Mediatoren, wie beispielsweise Prostaglandine, die vom Endothel sezerniert werden.

Die Gefäßokklusionszeit wurde im light/dye Modell der Thromboseinduktion durch WIN 55-212,2 und CBD nicht signifikant beeinflusst. Eine Cannabinoidrezeptor-abhängige Beeinflussung der Thrombozytenaktivität erscheint daher unwahrscheinlich. Beide Cannabinoide sind als lipophile Substanzen in der Lage durch die Plasmamembran der Thrombozyten zu diffundieren und die auf Thrombozyten vornehmlich intrazellulär lokalisierten Cannabinoidrezeptoren zu erreichen (Catani et al. 2010).

Das dritte untersuchte Cannabinoid AEA konnte die Okklusionszeit der Venolen signifikant verkürzen. AEA ist als endogenes Cannabinoid ein Arachidonsäurederivat und CB₁- sowie CB₂-Agonist.

Es bestehen folglich drei Möglichkeiten einer Thrombozytenaktivierung durch AEA.

Die erste Möglichkeit ist die Aktivierung der Thrombozyten durch direkte Bindung an einen Cannabinoidrezeptor. Da der wesentlich stärkere CB₁ und CB₂ Agonist WIN 55-212,2 keine signifikante Verkürzung der Thrombosezeit verursachte, ist eine Wirkung von AEA über CB₁ oder CB₂ nicht zu erklären. Im Gegensatz zu WIN 55-212,2 bindet AEA noch an weitere non-CB_{1/2}-Cannabinoidrezeptoren. Eine Bindung an einen non-CB_{1/2}-Cannabinoidrezeptor könnte den prothrombogenen Effekt verursachen (Baldassarri et al. 2008).

Die zweite Möglichkeit ist die Aktivierung der Thrombozyten durch die Abbauprodukte der endogenen Cannabinoide. AEA wird durch den Endocannabinoid Membran Transporter (EMT) in relevanten Mengen in die Thrombozyten aufgenommen (Catani et al. 2010). Anschließend wird die Amidbindung durch die FAAH gespalten und AA sowie Ethanolamin werden freigesetzt. AA wird anschließend im Thrombozyten durch die Cyclooxygenase 1 (COX-1) und die Thromboxan-Synthase zu TXA₂ verstoffwechselt. TXA₂ ist ein potenter Agonist der Thrombozytenaggregation (Löffler et al. 1998; Braud et al. 2000; Klinke und Bauer 2003; Brantl et al. 2014) (Abb. 26).

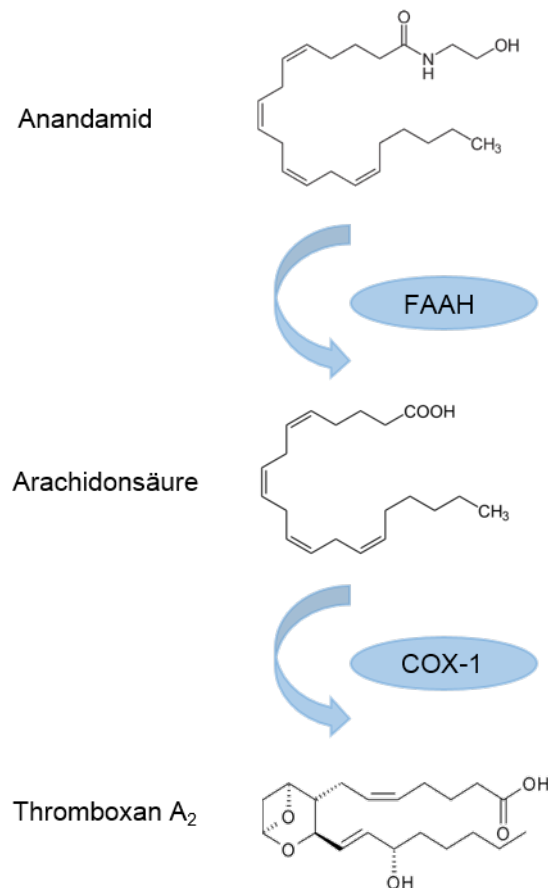


Abbildung 26: Zusammenfassung des intrazellulären Abbaus von AEA zum prothrombogenen Mediator Thromboxan A₂: Die beteiligten Schlüsselenzyme sind die FAAH (fatty acid acyl hydrolase) und die COX-1 (Cyclooxygenase-1).

Ein weiterer Abbauweg der endogenen Cannabinoide ist die direkte Oxidation durch die COX oder die Lipoxygenase. Die Degradation von AEA durch die Cyclooxygenase führt zur Bildung von Prostaglandin H₂-Ethanolamin. Prostaglandin H₂-Ethanolamin wird gewebespezifisch zu Prostaglandinen abgebaut. Entsprechend der sequentiellen Reaktionen von COX-2 und Thromboxan Synthase wurde angenommen, dass TXA₂-Ethanolamid entsteht (Kozak et al. 2002). Allerdings ist AEA ein schlechtes Substrat für die im Thrombozyten exprimierte COX-1 Isoform. Daher ist es unwahrscheinlich, dass AEA als direkter Endoperoxid-Vorläufer in Thrombozyten dient (Yu et al. 1997).

Zudem ist das COX-Produkt Prostaglandin H₂-Ethanolamin aufgrund seiner Struktur ein schlechtes Substrat für die Thromboxan-Synthase (Pacher et al. 2006; Urquhart et al. 2015).

Auch AEA-Hydroperoxide, die Produkte der Lipoxygenase, beeinflussen die Thrombozytenaggregation nicht (Maccarrone et al. 1999).

Die dritte mögliche Erklärung eines prothrombogenen Effektes von AEA im vorliegenden Modell ist eine Verstärkung des phototoxischen Endothelschadens durch direkte oder indirekte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch AEA.

Im Versuch mit Cyclooxygenase-Inhibition durch Indomethacin versuchte die vorliegende Studie aufzuklären, ob AEA die Gefäßokklusionszeiten Cannabinoidrezeptor-abhängig, toxisch oder durch seine Abbauprodukte verringert. Um den prothrombogenen Effekt von AEA, der bei akuter Exposition gemessen wurde, herauszustellen und die Wahrscheinlichkeit der Detektion einer Cyclooxygenase-abhängigen Wirkung zu detektieren, wurde die AEA-Dosierung auf 10 mg/kg KG erhöht und das i.v. injizierte Volumen von FITC-Dextran auf 0,1 ml verdoppelt. Es resultierten verkürzte Gefäßverschlusszeiten in allen Versuchsgruppen. Der prothrombogene Effekt von AEA konnte deutlich bestätigt werden.

Die Hemmung der Cyclooxygenase neutralisierte diese prothrombogene Wirkung von AEA. Diese Ergebnisse lassen auf eine prothrombogene Wirkung von AEA und anderer AA-haltiger Cannabinoide durch die Degradation zu prothrombogenen Substanzen schließen. Eine direkte Wirkung über CB₁, CB₂ oder non- CB_{1/2}-CB_x ist unwahrscheinlich.

Ebenso erscheint ein prothrombogener Effekt durch Toxizität oder Verstärkung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies unwahrscheinlich, da dieser nicht durch Indomethacin reversibel wäre. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den *in vitro*-Studien von Brantl et al. und Braud et al. (Braud et al. 2000; Brantl et al. 2014).

Die offline durchgeführte Auswertung der Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Ein Einfluss dieser Parameter auf die veränderte Okklusionszeit unter AEA-Behandlung ist daher auszuschließen. Auch die Thrombozytenzahl wurde durch die Behandlung mit den Cannabinoiden im Vergleich zu DMSO nicht signifikant verändert. Durch die streng lokale Endothelschädigung im Ohr der Maus kommt es nicht zu einem im Gesamtorganismus messbaren Verbrauch von Plättchen oder zu einer zytotoxischen Reduktion der Thrombozytenzahl.

Auch die Leukozytenzahl wurde durch die Behandlung nicht verändert. Eine Beeinflussung der Thrombogenese durch eine systemische Inflammation nach intraperitonealer Applikation der Cannabinoide ist daher unwahrscheinlich.

Die hier diskutierten Gefäßverschlusszeiten stammen ausschließlich aus okkludierten Venolen, da die phototoxische Lichtexposition in Arteriolen einen Vasospasmus bewirkt und Flussgeschwindigkeit sowie Gefäßdurchmesser beeinflusst (Rumbaut 2005). Aufgrund der großen Bedeutung der TXA_2 -abhängigen Aktivierung von Thrombozyten im arteriellen System, beeinflusst AEA sehr wahrscheinlich auch die Hämostase in Arterien (Ruggeri 2002). Weitergehende Untersuchungen an einem geeigneten Modell zur arteriellen Thrombogenese, wie zum Beispiel die $FeCl_3$ -abhängige Carotisendothel-Läsion in der Maus, wären wünschenswert (Sorg et al. 2007; Li et al. 2013; Subramaniam und Kanse 2014).

Während CBD und WIN 55,212-2 auch nach akuter Exposition keinen Einfluss auf die Thrombogenese hatten, ist das Fehlen eines Effektes nach wiederholter Applikation von AEA auf den schnellen Metabolismus von AEA durch spezifische und unspezifische Enzyme zurückzuführen. Die Messung der Gefäßokklusionszeit wurde 24 Stunden nach der letzten Applikation durchgeführt. Der prothrombogene Effekt durch AEA war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. Eine Toleranzentwicklung für die Wirkung der Cannabinoide ist bislang nicht beschrieben worden (Grotenhermen et al. 2012).

Eine Blutentnahme und Bestimmung der Cannabinoid-Plasmaspiegel zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wurde in der Studie nicht durchgeführt. Weitere Untersuchungen zur Kinetik des Cannabinoidmetabolismus nach intraperitonealer, oraler und intravenöser Gabe könnten diesen Diskussionspunkt klären.

Zusammenfassend geht die vorliegende Arbeit davon aus, dass AEA nach intraperitonealer Injektion vom reichlich vaskularisierten Peritoneum schnell resorbiert und mit dem Blut im Gefäßsystem des Versuchstieres verteilt wird. Hier wird es durch unspezifische Esterasen und durch die FAAH zu AA degradiert. Am Ort der phototoxischen Gefäßendothelschädigung wird AA verstärkt zu TXA_2 verstoffwechselt und übt so einen prothrombogenen Effekt aus. 24 Stunden nach der letzten Injektion bei repetitiver Behandlung sind AEA und AA aufgrund

ihrer kurzen Halbwertszeit im Blut verstoffwechselt und können selbst somit keine messbare prothrombogene Wirkung im vorliegenden Modell initiieren.

Die *in vivo*-Versuche wurden um die durchflusszytometrische Bestimmung der P-Selektin-Expression auf den humanen Thrombozyten in PRP ergänzt. AEA, WIN 55,212-2 und CBD zeigten in den Konzentrationen 0,1 μM bis 10 μM keinen prothrombogenen Einfluss auf ruhende Thrombozyten und keinen antithrombogenen Einfluss auf TRAP-aktivierte Thrombozyten.

Da Maccarrone et al., Brantl et al. und de Angelis et al. erst in Konzentrationen von 50 μM bis 1600 μM Effekte von AEA auf die Thrombozyten messen konnten, wurde die Konzentration von AEA, um vergleichbare Daten zu erhalten, schrittweise von 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM auf 1000 μM erhöht. Für 500 μM und 1000 μM AEA konnte eine signifikant erhöhte P-Selektin-Expression auf den ruhenden Thrombozyten gemessen werden. Umgekehrt war auf den TRAP-aktivierten Thrombozyten nach der Behandlung mit AEA in den hohen Konzentrationen von 500 μM und von 1000 μM AEA die P-Selektin-Expression signifikant vermindert (Abb 27).

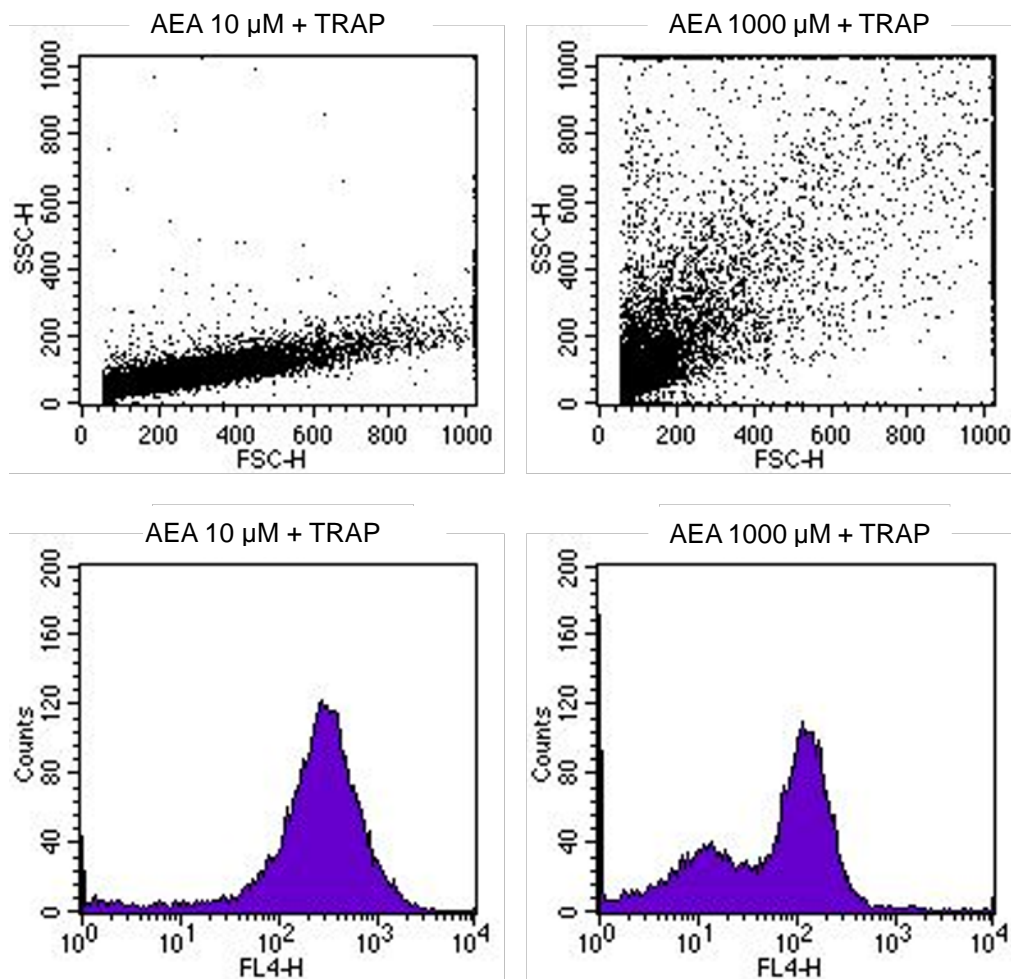


Abbildung 27: Exemplarische Dot Plots aus der Durchflusszytometrie: Oben sind die Dot Plots für mit 10 µM (li) bzw. 1000 µM (re) AEA und 100 µM TRAP behandelten Thrombozyten dargestellt. Es ist der forward scatter als Marker der Zellgröße auf der x-Achse gegen den sideward scatter als Marker Zellkonfiguration auf der y-Achse dargestellt. Auffällig ist die breitere Fluoreszenzstreuung als Hinweis auf Zelltrümmer nach der Inkubation mit 1000 M AEA und TRAP. Unten ist der Anteil aktivierter Thrombozyten dargestellt. Die Thrombozyten gelten ab einer FL4-H Fluoreszenzintensität von 10² Einheiten als aktiviert.

Um diesen Widerspruch zwischen prothrombogenen Effekten auf der einen Seite und antithrombogenen Effekten auf der anderen Seite aufzuklären, wurde in der Zählkammer die Thrombozytenzahl in den Konzentrationen von 250, 500 und 1000 µM AEA bestimmt. Es zeigte sich ein leichter Anstieg der Thrombozytenzahl für 250 µM AEA, sowie eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der Thrombozytenzahl für 500 µM AEA und für 1000 µM AEA. Der Anstieg der Zellzahl bei 250 µM AEA kann dem zytoprotektiven Effekt von AEA zugeschrieben werden, der von Catani et. al. für niedrige AEA Konzentrationen beschrieben wurde (Catani et. al. 2010).

Aus der Reduktion der Zellzahl bei hohen Konzentrationen von AEA kann geschlossen werden, dass AEA zytotoxisch auf Thrombozyten wirkt. Die aus den strukturell geschädigten Zellen freigesetzten intrazellulären Mediatoren wie ADP, TXA₂, Serotonin, Ca²⁺ und Thrombospondin (u.a.) können die verbliebenen intakten Thrombozyten durch Bindung an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktivieren. Dies ist eine mögliche Erklärung für den prothrombogen Effekt von AEA auf ruhende Thrombozyten.

Auch die Reduktion der P-Selektin-Expression im Versuchsansatz mit AEA-Behandlung in 250 µM bis 1000 µM und anschließender TRAP-Aktivierung kann auf eine zytotoxische Schädigung der Thrombozyten zurückgeführt werden. Der Kontakt der überlebenden Thrombozyten mit AEA führt zu einer Präaktivierung. Diese Plättchen kann der starke Agonist TRAP nicht mehr vollständig aktivieren und das P-Selektin wird nur teilweise auf die Zellmembran transloziert. Ein weiterer Erklärungsansatz ist eine Verminderung der Exozytose der α-Granula und somit von P-Selektin durch strukturelle Schädigung der Thrombozyten nach Kontakt mit hochkonzentriertem AEA.

Der zytotoxische Effekt von AEA in hohen Konzentrationen ist möglicherweise auch für die hohe Diskrepanz der Versuchsergebnisse der vorangegangenen Studien verantwortlich, da geschädigte und funktionell eingeschränkte Thrombozyten aggregometrische und durchflusszytometrische Verfahren unterschiedlich beeinflussen können. Ein Beispiel wäre, wie oben dargestellt, ein scheinbar prothrombogener Effekt in der Durchflusszytometrie im Sinne einer vermehrten P-Selektin-Expression auf geschädigten Thrombozyten und ein scheinbar antithrombogener Effekt in der Aggregometrie durch eine verringerte Vernetzung von geschädigten Thrombozyten untereinander. In jedem Fall sollten die Studien, die sehr hohe AEA Konzentrationen verwendeten, mit Vorsicht interpretiert werden.

Catani et al. zeigten, dass AEA in Konzentrationen von 0,1 µM bis 10 µM das Überleben von Thrombozyten *ex vivo* verlängert. Dieser Effekt war CB_{1/2}-abhängig. Eine Behandlung der Thrombozyten mit AA in 1 µM und 10 µM induzierte konzentrationsabhängig den Zelltod (Catani et al. 2010). In der vorliegenden Studie lag die Zellzahl bei 250 µM AEA noch höher als in der Kontrollgruppe, wurde aber bei steigender AEA-Konzentration dosisabhängig

reduziert. Es ist daher davon auszugehen, dass bei Applikation von AEA in hohen Konzentrationen der zytotoxische Effekt vom Hydrolyseprodukt AA gegenüber dem zytoprotektiven Effekt von AEA überwiegt. *In vivo* zeigte sich nach Cannabinoidbehandlung der SKH1-hr Mäuse über drei Tage mit 5 mg/kg weder eine offensichtliche Toxizität bei der Beobachtung der Versuchstiere im Sinne von petechialen Einblutungen, noch eine Beeinflussung der erhobenen hämatologischen Parameter, insbesondere der Thrombozytenzahl. Auch die Leukozytenzahlen im Differentialblutbild blieben nach repetitiver Behandlung mit den Cannabinoiden normwertig, so dass insgesamt keine Hinweise auf eine systemische Inflammation durch die intraperitoneale Injektion als Grund für die prothrombogene Wirkung vorliegen.

8.3 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie wurde vor dem Hintergrund der wachsenden Bedeutung von medizinischem Cannabis und der fortwährenden Diskussion über die Legalisierung von Cannabis durchgeführt. Ziel war es aufbauend auf der kontroversen Datenlage in der Fachliteratur zu klären, ob Cannabinoide über ihre spezifischen Rezeptoren die Thrombogenese beeinflussen können und somit potentielle Pharmaka für die Behandlung und Prophylaxe von thrombotischen Ereignissen darstellen.

Eine Stimulation der CB_{1/2} Rezeptoren beeinflusst die Hämostase nicht. Die festgestellte Reduktion der Gefäßverschlusszeit unter Behandlung mit dem endogenen Cannabinoid AEA ist auf den Metabolismus zum thrombogenen Messenger TXA₂ zurückzuführen. Unter Inhibition der Cyclooxygenase bleibt der prothrombogene Effekt aus.

Da es sich bei anderen endogenen Cannabinoiden wie 2-AG und Virodhamin auch um Arachidonsäurederivate handelt, erscheint eine prothrombogene Beeinflussung der Hämostase auch für diese Substanzen wahrscheinlich. Endogene Cannabinoide sind aufgrund ihrer Lipophilie durch psychoaktive Effekte belastet und werden schnell durch spezifische Enzyme abgebaut. Daher besitzen die endogenen Cannabinoide ohnehin nur ein geringes Potential als Arzneimittel.

Der starke synthetische CB₁ und CB₂ Agonist WIN 55,212-2 und das modulierende phytogene CBD beeinflussten weder die Thrombogenese *in vivo*, noch die Thrombozytenaktivität *in vitro*. Daher lieferte die vorliegende Studie keine Belege für die pharmakologische Eignung der Cannabinoide zur Beeinflussung thrombotischer Ereignisse.

Umgekehrt ergaben sich auch keine Hinweise dafür, dass eine Modulation der Cannabinoid-Rezeptoren prothrombogen wirkt. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen sind diesbezüglich keine unerwünschten Nebenwirkungen durch eine entsprechende Therapie mit synthetischen oder pflanzlichen Cannabinoiden zu erwarten.

9 Anhang

	DMSO	AEA	CBD	WIN 55,212-2
Blutflussgeschwindigkeit von Erythrozyten ($\mu\text{m/s}$)	410 (237/664)	529 (380/793)	574 (322/694)	419 (286/637)
Gefäßdurchmesser (μm)	54,8 \pm 4,6	56,5 \pm 2,9	57,7 \pm 2,7	55,6 \pm 3,9
Thrombozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	988 \pm 62	963 \pm 81	873 \pm 90	775 \pm 196
Leukozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	5,65 \pm 1,0	5,07 \pm 0,7	5,12 \pm 1,3	5,15 \pm 0,7
Erythrozyten ($1 \cdot 10^{12}/\text{l}$)	9,06 \pm 0,3	8,99 \pm 0,3	8,30 \pm 0,8	8,36 \pm 1,0
Hämoglobin (mM/l)	9,20 (8,66/9,38)	8,70 (8,60/8,90)	8,40 (7,40/10,0)	8,40 (7,5/9,3)
Hämatokrit (l/l)	0,49 \pm 0,01	0,50 \pm 0,01	0,46 \pm 0,04	0,46 \pm 0,04

Tabelle 11: Mikrohämodynamik in Venolen und Blutbild im Versuch mit chronischer Cannabinoidexposition: Quantitative Analyse der erythrozytären Flussgeschwindigkeit, des Gefäßdurchmessers und des kleinen Blutbildes. Dargestellt ist der Median (P25/P75) nach One Way Anova on Ranks (Blutflussgeschwindigkeit: $p=0,254$; Hämoglobin: $p=0,769$) und der Mittelwert \pm SEM nach One Way Anova on Ranks (Gefäßdurchmesser $p=0,946$; Thrombozyten: $p=0,522$; Leukozyten: $p=0,978$; Erythrozyten: $p=0,759$; Hämatokrit $p=0,687$).

	DMSO	AEA	CBD	WIN 55,212-2
Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten ($\mu\text{m/s}$)	530 (329/718)	478 (315/620)	522 (326/730)	596 (369/829)
Gefäßdurchmesser (μm)	53,6 (39,8/64,7)	62,5 (51,5/74,1)	59,1 (48,3/77,6)	55,8 (43,5/77,2)
Thrombozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	968 \pm 45	976 \pm 93	989 \pm 83	939 \pm 75
Leukozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	4,22 \pm 0,3	4,72 \pm 0,7	3,52 \pm 0,5	4,42 \pm 0,5
Erythrozyten ($1 \cdot 10^{12}/\text{l}$)	8,44 \pm 0,2	8,07 \pm 0,1	9,14 \pm 0,3	8,11 \pm 0,5
Hämoglobin (mM/l)	8,69 \pm 0,2	8,62 \pm 0,1	9,02 \pm 0,5	8,44 \pm 0,4
Hämatokrit (l/l)	0,48 (0,46/0,5)	0,46 (0,45/0,47)	0,50 (0,49/0,53)	0,46 (0,42/0,59)

Tabelle 12: Mikrohämodynamik in Venolen und Blutbild im Modell der akuten Exposition: Quantitative Analyse der Blutflussgeschwindigkeit, des Gefäßdurchmessers und des kleinen Blutbildes. Dargestellt ist der Median (P25/P75) nach One Way Anova on Ranks (Blutflussgeschwindigkeit: $p=0,483$; Gefäßdurchmesser $p=0,101$; Hämatokrit $p=0,125$) und der Mittelwert \pm SEM nach One Way Anova on Ranks (Thrombozyten: $p=0,975$; Leukozyten: $p=0,529$; Erythrozyten: $p=0,135$; Hämoglobin $p=0,720$).

	DMSO	AEA	Indo	AEA + Indo
Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten ($\mu\text{m/s}$)	675 (514/884)	800 (590/1040)	851 (687/1044)	863 (658/1130)
Gefäßdurchmesser (μm)	69,2 \pm 1,9	63,2 \pm 1,9	65,7 \pm 1,9	63,6 \pm 1,7
Thrombozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	914 \pm 60	753 \pm 89	715 \pm 94	846 \pm 136
Leukozyten ($1 \cdot 10^9/\text{l}$)	5,24 \pm 0,78	4,13 \pm 0,72	4,68 \pm 0,60	4,58 \pm 0,60
Erythrozyten ($1 \cdot 10^{12}/\text{l}$)	7,02 (6,10/7,90)	8,03 (7,08/8,64)	7,35 (6,26/8,65)	6,79 (6,48/7,10)
Hämoglobin (mM/l)	7,70 \pm 0,54	8,50 \pm 0,46	7,91 \pm 0,53	7,38 \pm 0,22
Hämatokrit (l/l)	0,40 \pm 0,02	0,45 \pm 0,03	0,42 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01

Tabelle 13: Mikrohämodynamik in Venolen und Blutbild im Modell der akuten Exposition mit Cyclooxygenase-Inhibition: Quantitative Analyse der Blutflussgeschwindigkeit, des Gefäßdurchmessers und des kleinen Blutbildes. Dargestellt ist der Median (P25/P75) nach One Way Anova on Ranks (Blutflussgeschwindigkeit: $p=0,104$; Erythrozyten: $p=0,407$; Hämatokrit $p=0,310$) und der Mittelwert \pm SEM nach One Way Anova on Ranks (Gefäßdurchmesser $p=0,130$; Thrombozyten: $p=0,558$; Leukozyten: $p=0,779$; Hämoglobin: $p=0,497$).

10 Literaturverzeichnis

Abboussi O, Tazi A, Paizanis E, El Ganouni S. (2014): Chronic exposure to WIN55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis. In: *Pharmacol Biochem Behav.* 120, S: 95-102.

Ahn, K; McKinney, M K.; Cravatt, B F. (2008): Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. In: *Chemical reviews* 108 (5), S. 1687–1707.

Aird, W. C. (2003): Hemostasis and irreducible complexity. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 1 (2), S. 227–230.

Alberio, L.; Dale, G. L. (1999): Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. In: *Eur J Clin Invest* 29 (12), S. 1066–1076.

Alef, M.; Oechtering, G. (1998): Reflections on anesthetic risk. In: *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 26 (5), S. 302–314.

Alijanpour, S., Rezayof, A. (2013): Involvement of dorsal hippocampal and medial septal nicotinic receptors in cross state-dependent memory between WIN55, 212-2 and nicotine or ethanol in mice. *Neuroscience.* 245, 61-73.

Altun, A; Ozdemir, E; Yildirim, K; Gursoy, S; Durmus, N; Bagcivan, I (2015): The effects of endocannabinoid receptor agonist anandamide and antagonist rimonabant on opioid analgesia and tolerance in rats. In: *General physiology and biophysics.* 34(4):433-440.

Angelis, V de; Koekman, A C.; Weeterings, C; Roest, M; de Groot, P G; Herczenik, E; Maas, C (2014): Endocannabinoids control platelet activation and limit aggregate formation under flow. In: *PLoS One* 9 (9), S. 1000-1011

Arizzi, M. N.; Cervone, K. M.; Aberman, J. E.; Betz, A.; Liu, Q.; Lin, S. et al. (2004): Behavioral effects of inhibition of cannabinoid metabolism: The amidase inhibitor AM374 enhances the suppression of lever pressing produced by exogenously administered anandamide. In: *Life sciences* 74 (8), S. 1001–1011.

Bagot, Catherine N.; Arya, Roopen (2008): Virchow and his triad: a question of attribution. In: *Br J Haematol* 143 (2), S. 180–190.

- Baldassarri, S.; Bertoni, A.; Bagarotti, A.; Sarasso, C.; Zanfa, M.; Catani, M. V. et al. (2008): The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB1/CB2 receptors. In: *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 6 (10), S. 1772–1779.
- Barker, J. H.; Frank, J.; Bidiwala, S. B.; Stengel, C. K.; Carroll, S. M.; Carroll, C. M. et al. (1999): An animal model to study microcirculatory changes associated with vascular delay. In: *Br J Plast Surg* 52 (2), S. 133–142.
- Barker, J. H.; Hammersen, F.; Bondar, I.; Galla, T. J.; Menger, M. D.; Gross, W.; Messmer, K. (1989a): Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model. In: *Plast Reconstr Surg* 84 (2), S. 303–313.
- Barker, J. H.; Hammersen, F.; Bondar, I.; Uhl, E.; Galla, T. J.; Menger, M. D.; Messmer, K. (1989b): The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. In: *Plast Reconstr Surg* 83 (6), S. 948–959.
- Barker, J. H.; Menger, M. D.; Sack, F. U.; Messmer, K. (1988): Nutritive skin circulation in partial ischemia: effect of various vasoactive substances. In: *Vasa* 17 (1), S. 37–41.
- Battista, N; Di Tommaso, M; Bari, M; Maccarrone, M (2012): The endocannabinoid system: an overview. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 6, S. 9.
- Becker, B. F.; Heindl, B.; Kupatt, C.; Zahler, S. (2000): Endothelial function and hemostasis. In: *Z Kardiol* 89 (3), S. 160–167.
- Becker, B. F.; Zahler, S.; Seligmann, C.; Kupatt, C.; Habazettl, H. (1996): Interaction of adenosine with leukocytes and thrombocytes. In: *Z Kardiol* 85 Suppl 6, S. 161–170.
- Benavides, F; Oberyszyn, T M.; VanBuskirk, A M.; Reeve, V E.; Kusewitt, D F. (2009): The hairless mouse in skin research. In: *J Dermatol Sci* 53 (1), S. 10–18.
- Blair, P; Flaumenhaft, R (2009): Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. In: *Blood reviews* 23 (4), S. 177–189.
- Blum, A.; Shamburek, R. (2009): The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. In: *Atherosclerosis* 203 (2), S. 325–330.
- Bolhuis, P. A.; Sakariassen, K. S.; Sixma, J. J. (1979): Adhesion of blood platelets to human arterial subendothelium: role of factor VIII-Von Willebrand factor. In: *Haemostasis* 8 (3-5), S. 312–323.

- Borges, E.; Tietz, W.; Steegmaier, M.; Moll, T.; Hallmann, R.; Hamann, A.; Vestweber, D. (1997): P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. In: *J Exp Med* 185 (3), S. 573–578.
- Brantl, S. Annette; Khandoga, Anna L.; Siess, Wolfgang (2014): Mechanism of platelet activation induced by endocannabinoids in blood and plasma. In: *Platelets* 25 (3), S. 151–161.
- Braud, S; Bon, C; Touqui, L; Mounier, C (2000): Activation of rabbit blood platelets by anandamide through its cleavage into arachidonic acid. In: *FEBS Lett* 471 (1), S. 12–16.
- Bui, D T.; Cordeiro, P G.; Hu, Qun-Ying; Disa, J J.; Pusic, A; Mehrara, B J. (2007): Free flap reexploration: indications, treatment, and outcomes in 1193 free flaps. In: *Plast Reconstr Surg* 119 (7), S. 2092–2100.
- Butrica, J L. (2002): The Medical Use of Cannabis Among the Greeks and Romans. In: *Journal of Cannabis Therapeutics* 2 (2), S. 51–70.
- Calignano, A; La Rana, G; Beltramo, M; Makriyannis, A; Piomelli, D (1997): Potentiation of anandamide hypotension by the transport inhibitor, AM404. In: *European Journal of Pharmacology* 337 (1), S. R1-R2.
- Callahan, A. B.; Lutz, B. R.; Fulton, G. P.; Degelman, J. (1960): Smooth muscle and thrombus thresholds to unipolar stimulation of S blood vessels. In: *Angiology* 11, S. 35–39.
- Casier, I; Vanduyndhoven, P; Haine, S; Vrints, C; Jorens, P G. (2014): Is recent cannabis use associated with acute coronary syndromes? An illustrative case series. In: *Acta Cardiol* 69 (2), S. 131–136.
- Catani, M. V.; Gasperi, V.; Catanzaro, G.; Baldassarri, S.; Bertoni, A.; Sinigaglia, F. et al. (2010): Human platelets express authentic CB(1) and CB(2) receptors. In: *Curr Neurovasc Res* 7 (4), S. 311–318.
- Catani, M V; Gasperi, V; Evangelista, D; Finazzi A, Alessandro; A, Luciana; Maccarrone, M (2010): Anandamide extends platelets survival through CB(1)-dependent Akt signaling. In: *Cell Mol Life Sci* 67 (4), S. 601–610.
- Cerwinka, W H.; Cooper, D; Kriegelstein, C F.; Feelisch, M; Granger, D. N (2002): Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282 (3), S. 1111-1117.
- Chang, E I.; Mehrara, B J.; Festekjian, J H.; Da Lio, A L; Crisera, C A. (2011): Vascular complications and microvascular free flap salvage: the role of thrombolytic agents. In: *Microsurgery* 31 (7), S. 505–509.

- Cleator, J H.; Zhu, Wen Qin; Vaughan, D E.; Hamm, H E. (2006): Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. In: *Blood* 107 (7), S. 2736–2744.
- Dahdouh, Z; Roule, V; Lognoné, T; Sabatier, R; Grollier, G (2012): Cannabis and coronary thrombosis: What is the role of platelets? In: *Platelets* 23 (3), S. 243–245.
- Dainese, E; Fabritiis, G de; Sabatucci, A; Oddi, S; Angelucci, C B; Di Pancrazio, C et al. (2014): Membrane lipids are key modulators of the endocannabinoid-hydrolase FAAH. In: *The Biochemical journal* 457 (3), S. 463–472.
- Deusch, E; Kress, H G; Kraft, B; Kozek-Langenecker, S A. (2004): The procoagulatory effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in human platelets. In: *Anesthesia and analgesia* 99 (4), S. 1127-1130
- Deutsch, D. G.; Goligorsky, M. S.; Schmid, P. C.; Krebsbach, R. J.; Schmid, H. H.; Das, S. K. et al. (1997): Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. In: *J Clin Invest* 100 (6), S. 1538–1546.
- Devane, W. A.; Dysarz, F A 3rd; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; Howlett, A. C. (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. In: *Mol Pharmacol* 34 (5), S. 605–613.
- Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G. et al. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. In: *Science* 258 (5090), S. 1946–1949.
- Di Marzo, Vincenzo (2006): A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 27 (3), S. 134–140.
- Ehrenreich, H.; Rinn, T.; Kunert, H. J.; Moeller, M. R.; Poser, W.; Schilling, L. et al. (1999): Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. In: *Psychopharmacology (Berl)* 142 (3), S. 295–301.
- Elsohly, Mahmoud A.; Slade, Desmond (2005): Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. In: *Life Sci* 78 (5), S. 539–548.
- Eriksson, Elof; Boykin, Joseph V.; Pittman, Roland N. (1980): Method for in vivo microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear. In: *Microvascular Research* 19 (3), S. 374–379.

- Felder, C. C.; Joyce, K. E.; Briley, E. M.; Glass, M.; Mackie, K. P.; Fahey, K. J. et al. (1998): LY320135, a novel cannabinoid CB1 receptor antagonist, unmask coupling of the CB1 receptor to stimulation of cAMP accumulation. In: The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 284 (1), S. 291–297.
- Fiebig, E.; Ley, K.; Arfors, K. E. (1991): Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. In: International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation 10 (2), S. 127–144.
- Fonseca, B. M.; Battista, N.; Correia-da-Silva, G.; Rapino, C.; Maccarrone, M.; Teixeira, N. A. (2014): Activity of anandamide (AEA) metabolic enzymes in rat placental bed. In: Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.) 49C, S. 74–77.
- Formukong, E. A.; Evans, A. T.; Evans, F. J. (1989): The inhibitory effects of cannabinoids, the active constituents of Cannabis sativa L. on human and rabbit platelet aggregation. In: J Pharm Pharmacol 41 (10), S. 705–709.
- Gallo, A.; Bouchard, C.; Rompré, P. P. (2014): Animals with a schizophrenia-like phenotype are differentially sensitive to the motivational effects of cannabinoid agonists in conditioned place preference. Behav Brain Res. 268, 202-212.
- Garcia, N.; J  rai, Z.; Mirshahi, F.; Kunos, G.; Sanyal, A. J. (2001): Systemic and portal hemodynamic effects of anandamide. In: American journal of physiology: Gastrointestinal and liver physiology 280 (1), S. 14–20.
- Geerts, W. H.; Heit, J. A.; Clagett, G. P.; Pineo, G. F.; Colwell, C. W.; Anderson, F A Jr; Wheeler, H. B. (2001): Prevention of venous thromboembolism. In: Chest 119 (1 Suppl), S. 132-175.
- Goertz, O.; Ring, A.; Knie, U.; Abels, C.; Daigeler, A.; Steinau, H-U et al. (2010): Evaluation of a novel polihexanide-preserved wound covering gel on dermal wound healing. In: European surgical research. Europ  ische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europ  ennes 44 (1), S. 23–29.
- Goertz, O.; Baerreiter, S.; Ring, A.; Jettkant, Birger; Hirsch, T; Daigeler, A et al. (2011): Determination of microcirculatory changes and angiogenesis in a model of frostbite injury in vivo. In: J. Surg. Res. 168 (1), S. 155–161.
- Gonsiorek, W.; Lunn, C.; Fan, X.; Narula, S.; Lundell, D.; Hipkin, R. W. (2000): Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. In: Mol Pharmacol 57 (5), S. 1045–1050.

- Grambow, E; Mueller-Graf, Fabian; Delyagina, E; Frank, M; Kuhla, A; Vollmar, B (2014): Effect of the hydrogen sulfide donor GYY4137 on platelet activation and microvascular thrombus formation in mice. In: Platelets 25 (3), S. 166–174.
- Grassin-Delyle, S.; Naline, E.; Buenestado, A.; Faisy, C.; Alvarez, J-C; Salvator, H. et al. (2014): Cannabinoids inhibit cholinergic contraction in human airways through prejunctional CB1 receptors. In: British journal of pharmacology 171 (11), S. 2767–2777.
- Green, C. J. (1982): Animal anaesthesia. London: Laboratory animals Ltd (Laboratory animal handbooks, 8).
- Grinspoon, L.; Bakalar, J. B. (1998): The use of cannabis as a mood stabilizer in bipolar disorder: anecdotal evidence and the need for clinical research. In: J Psychoactive Drugs 30 (2), S. 171–177.
- Grotenhermen, F (2004): Pharmacology of cannabinoids. In: Neuro Endocrinol Lett 25 (1-2), S. 14–23.
- Grotenhermen, Franjo; Müller-Vahl, Kirsten (2012): The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. In: Deutsches Ärzteblatt international 109 (29-30), S. 495–501.
- Hazekamp, A; Ware, M A.; Muller-Vahl, K R.; Abrams, D; Grotenhermen, F (2013): The medicinal use of cannabis and cannabinoids--an international cross-sectional survey on administration forms. In: J Psychoactive Drugs 45 (3), S. 199–210.
- Herold, G (2014): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold.
- Herrmann, K. S. (1983): Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. In: Microvascular Research 26 (2), S. 238–249.
- Hidalgo, D. A.; Disa, J. J.; Cordeiro, P. G.; Hu, Q. Y. (1998): A review of 716 consecutive free flaps for oncologic surgical defects: refinement in donor-site selection and technique. In: Plast Reconstr Surg 102 (3), S. 722-34.
- Hillard, C. J.; Wilkison, D. M.; Edgemond, W. S.; Campbell, W. B. (1995): Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. In: Biochim Biophys Acta 1257 (3), S. 249–256.
- Hodcroft, Christopher J.; Rossiter, Melissa C.; Buch, Ashesh N. (2014): Cannabis-associated myocardial infarction in a young man with normal coronary arteries. In: The Journal of emergency medicine 47 (3), S. 277–281.

- Hollister, Leo E. (1998): Health aspects of cannabis: revisited. In: *Int J Neuropsychopharmacol* 1 (1), S. 71–80.
- Howlett, Allyn C.; Breivogel, Christopher S.; Childers, Steven R.; Deadwyler, Samuel A.; Hampson, Robert E.; Porrino, Linda J.: Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. In: *Neuropharmacology* 47 1, S. 345–5.
- Hugues, J. (1953): Contribution to the study of vascular and blood factors in spontaneous hemostasis. In: *Archives internationales de physiologie* 61 (4), S. 565–711.
- Ishikawa, Mami; Sekizuka, Eiichi; Oshio, Chikara; Sato, Shuzo; Yamaguchi, Noriyuki; Terao, Satoshi et al. (2002): Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows. In: *Journal of the neurological sciences* 194 (1), S. 59–69.
- Jarai, Z.; Wagner, J. A.; Goparaju, S. K.; Wang, L.; Razdan, R. K.; Sugiura, T. et al. (2000): Cardiovascular Effects of 2-Arachidonoyl Glycerol in Anesthetized Mice. In: *Hypertension* 35 (2), S. 679–684.
- Jarai, Zoltan; Kunos, Gyorgy (2002): Cardiovascular effects of cannabinoids. In: *Orv Hetil* 143 (26), S. 1563–1568.
- Jiménez, David; Miguel-Díez, Javier de; Guijarro, Ricardo; Trujillo-Santos, Javier; Otero, Remedios; Barba, Raquel et al. (2016): Trends in the Management and Outcomes of Acute Pulmonary Embolism: Analysis From the RIETE Registry. In: *Journal of the American College of Cardiology* 67 (2), S. 162–170.
- Johns, D. G.; Behm, D. J.; Walker, D. J.; Ao, Z.; Shapland, E. M.; Daniels, D. A. et al. (2007): The novel endocannabinoid receptor GPR55 is activated by atypical cannabinoids but does not mediate their vasodilator effects. In: *British journal of pharmacology* 152 (5), S. 825–831.
- Jones, Nicholas A.; Hill, Andrew J.; Smith, Imogen; Bevan, Sarah A.; Williams, Claire M.; Whalley, Benjamin J.; Stephens, Gary J. (2010): Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 332 (2), S. 569–577.
- Keith, I.; Shenoy, B. J. (1981): Total intravenous anaesthesia with low dose ketamine and Althesin. Assessment of a technique for minor surgery in difficult situations. In: *Anaesthesia* 36 (7), S. 702–704.
- Khoury, R. K. (1992): Avoiding free flap failure. In: *Clin Plast Surg* 19 (4), S. 773–781.
- Klein, Thomas W. (2005): Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. In: *Nat Rev Immunol* 5 (5), S. 400–411.

Klinke, Rainer; Bauer, Christian (2003): Lehrbuch der Physiologie. 55 Tabellen. 4., korrigierte Aufl. Stuttgart, New York: Thieme.

Kochen, J. A.; Baez, S. (1965): Laser-induced microvascular thrombosis, embolization, and recanalization in the rat. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 122, S. 728–737.

Kovács, I. B.; Sebes, A.; Trombitás, K.; Csalay, L.; Görög, P. (1975): Proceedings: Improved technique to produce endothelial injury by laser beam without direct damage of blood cells. In: *Thrombosis et diathesis haemorrhagica* 34 (1), S. 331.

Kozak, Kevin R.; Crews, Brenda C.; Morrow, Jason D.; Wang, Lee-Ho; Ma, Y. Henry; Weinander, Rolf et al. (2002): Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (47), S. 44877–44885.

Kram, L; Grambow, E; Mueller-Graf, F; Sorg, H; Vollmar, B (2013): The anti-thrombotic effect of hydrogen sulfide is partly mediated by an upregulation of nitric oxide synthases. In: *Thrombosis research : an international journal on vascular obstruction, hemorrhage and hemostasis* 132 (2), S. 112–117.

Kronberger, L (1992): Experimentelle Chirurgie. Stuttgart: Enke.

Kunos, G; Járai, Z; Bátka, S; Goparaju, Sravan K; Ishac, E J.N; Liu, Jie et al. (2000): Endocannabinoids as cardiovascular modulators. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 108 (1-2), S. 159–168.

Kunos, K; Járai, Z; Varga, K; Liu, Jie; Wang, Lei; Wagner, J A. (2000): Cardiovascular effects of endocannabinoids—the plot thickens. In: *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 61 (1-2), S. 71–84.

Kwon, S. H.; Ahn, S-E; Shin, J. S.; Youn, H-C; Kim, J-H; Oh, J. H. (2016): A phantom model study to identify the most effective manual aspiration thrombectomy for acute deep-vein thrombosis of the lower extremity. In: *Clinical radiology*. 71(4):321-327.

Langer, S.; Biberthaler, P.; Harris, A. G.; Steinau, H. U.; Messmer, K. (2001): In vivo monitoring of microvessels in skin flaps: introduction of a novel technique. In: *Microsurgery* 21 (7), S. 317–334.

Laschke, M. W.; Vollmar, B.; Menger, M. D. (2011): The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. In: *European cells & materials* 22, S. 147-167.

Lee, W. M.; Lee, K. T. (1975): Advanced coronary atherosclerosis in swine produced by combination of balloon-catheter injury and cholesterol feeding. In: *Experimental and molecular pathology* 23 (3), S. 491–499.

- Levy, R.; Schurr, A.; Nathan, I.; Dvilanski, A.; Livne, A. (1976): Impairment of ADP-induced platelet aggregation by hashish components. In: *Thromb Haemost* 36 (3), S. 634–640.
- Li, Mingqing; Hu, Yihe; Xie, Jie (2014): Analysis of the complications of the collum femoris preserving (CFP) prostheses. In: *Acta orthopaedica et traumatologica turcica* 48 (6), S. 623–627.
- Li, W; McIntyre, T M.; Silverstein, R L. (2013): Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. In: *Redox biology* 1, S. 50–55.
- Ligresti, A; Bisogno, T; Matias, I; Petrocellis, L de; Cascio, M Grazia; Cosenza, Vittorio et al. (2003): Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. In: *Gastroenterology* 125 (3), S. 677–687.
- Lindgren, L; Gouveia-Figueira, S; Nording, Malin L.; Fowler, C J. (2015): Endocannabinoids and related lipids in blood plasma following touch massage: a randomised, crossover study. In: *BMC research notes* 8, S. 504-520.
- Löffler, G; Petrides, P E.; Löffler-Petrides (1998): *Biochemie und Pathobiochemie*. Mit 233 Tabellen. 6., korr. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Lozano, I (2001): The Therapeutic Use of Cannabis sativa (L.) in Arabic Medicine. In: *Journal of Cannabis Therapeutics* 1 (1), S. 63–70.
- Lundqvist, T (2005): Cognitive consequences of cannabis use: comparison with abuse of stimulants and heroin with regard to attention, memory and executive functions. In: *Pharmacol Biochem Behav* 81 (2), S. 319–330.
- Maccarrone, M.; Attinà, M.; Bari, M.; Cartoni, A.; Ledent, C.; Finazzi Agrò, A.: Anandamide degradation and N-acylethanolamines level in wild-type and CB1 cannabinoid receptor knockout mice of different ages. In: *Journal of neurochemistry* 78 (2), S. 339–48.
- Maccarrone, M (2014): Activation of platelets by endocannabinoids: distinct agonists or arachidonate reservoirs? In: *Platelets* 25 (6), S. 463–464.
- Maccarrone, M; Bari, M; Menichelli, A; Del Principe, D; Finazzi Agrò, A (1999): Anandamide activates human platelets through a pathway independent of the arachidonate cascade. In: *FEBS Lett* 447 (2-3), S. 277–282.
- Mack, A; Joy, E (2001): *Marijuana as medicine? The science beyond the controversy*. Washington, D.C.: National Academy Press.
- Mackie, K.; Lai, Y.; Westenbroek, R.; Mitchell, R. (1995): Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. In: *J Neurosci* 15 (10), S. 6552–6561.

Maione, S; Costa, B; Di Marzo, V (2013): Endocannabinoids: a unique opportunity to develop multitarget analgesics. In: *Pain* 154 Suppl 1, S. 87-93.

Malinowska, B.; Lupinski, S.; Godlewski, G.; Baranowska, U.; Schlicker, E. (2008): Role of endocannabinoids in cardiovascular shock. In: *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society* 59 Suppl 8, S. 91–107.

Martins, C J M; Genelhu, V.; Di Marzo, V.; Francischetti, E. A. (2014): The endocannabinoid system--back to the scene of cardiometabolic risk factors control? In: *Horm Metab Res* 46 (8), S. 529–536.

Massberg, S.; Enders, G.; Matos, F. C.; Tomic, L. I.; Leiderer, R.; Eisenmenger, S. et al. (1999): Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. In: *Blood* 94 (11), S. 3829–3838.

Matsuda, L. A.; Lolait, S. J.; Brownstein, M. J.; Young, A. C.; Bonner, T. I. (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. In: *Nature* 346 (6284), S. 561–564.

McCollum, LaTronya; Howlett, Allyn C.; Mukhopadhyay, Somnath (2007): Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor--independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321 (3), S. 930–937.

McEver, R. P. (1992): Leukocyte-endothelial cell interactions. In: *Current opinion in cell biology* 4 (5), S. 840–849.

McPartland, J. M.; Glass, M.; Pertwee, R. G. (2007): Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. In: *British journal of pharmacology* 152 (5), S. 583–593.

McPartland, J M.; Duncan, Marnie; Di Marzo, Vincenzo; Pertwee, Roger G. (2015): Are cannabidiol and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. In: *British journal of pharmacology* 172 (3), S. 737–753.

McPartland, J M.; Norris, R W.; Kilpatrick, C. W (2007): Tempo and mode in the endocannabinoid system. In: *Journal of molecular evolution* 65 (3), S. 267–276.

Mechoulam, R.; Frider, E.; Di Marzo, V. (1998): Endocannabinoids. In: *European Journal of Pharmacology* 359 (1), S. 1–18.

Mechoulam, R; Hanuš, L (2002): Cannabidiol: an overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: chemical aspects. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 121 (1-2), S. 35–43.

- Merten, M.; Chow, T.; Hellums, J. D.; Thiagarajan, P. (2000): A new role for P-selectin in shear-induced platelet aggregation. In: *Circulation* 102 (17), S. 2045–2050.
- Merten, M.; Thiagarajan, P. (2000): P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. In: *Circulation* 102 (16), S. 1931–1936.
- Merten, M.; Thiagarajan, P. (2004): P-selectin in arterial thrombosis. In: *Zeitschrift für Kardiologie* 93 (11), S. 855–863.
- Mittleman, M. A.; Lewis, R. A.; Maclure, M.; Sherwood, J. B.; Muller, J. E. (2001): Triggering myocardial infarction by marijuana. In: *Circulation* 103 (23), S. 2805–2809.
- Morgan, M.; Loh, L.; Singer, L.; Moore, P. H. (1971): Ketamine as the sole anaesthetic agent for minor surgical procedures. In: *Anaesthesia* 26 (2), S. 158–159.
- Munro, S.; Thomas, K. L.; Abu-Shaar, M. (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. In: *Nature* 365 (6441), S. 61–65.
- Nagayama, T.; Sinor, A. D.; Simon, R. P.; Chen, J.; Graham, S. H.; Jin, K.; Greenberg, D. A. (1999): Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. In: *J Neurosci* 19 (8), S. 2987–2995.
- Nieswandt, B.; Pleines, I.; Bender, M. (2011): Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 9 Suppl 1, S. 92–104.
- Nieswandt, B.; Varga-Szabo, D.; Elvers, M. (2009): Integrins in platelet activation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1, S. 206–209.
- Nurden, P.; Heilmann, E.; Paponneau, A.; Nurden, A. (1994): Two-way trafficking of membrane glycoproteins on thrombin-activated human platelets. In: *Semin Hematol* 31 (3), S. 240–250.
- Offermanns, S.; Toombs, C. F.; Hu, Y. H.; Simon, M. I.: Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. In: *Nature* 389 (6647), S. 183–186
- Offermanns, S (2006): Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. In: *Circulation research* 99 (12), S. 1293–1304.
- Pacher, Pál; Bátkai, Sándor; Kunos, George (2006): The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. In: *Pharmacological reviews* 58 (3), S. 389–462.
- Pacher, Pál; Kunos, George (2013): Modulating the endocannabinoid system in human health and disease--successes and failures. In: *The FEBS journal* 280 (9), S. 1918–1943.
- Pan, X.; Ikeda, S. R.; Lewis, D. L. (1996): Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca²⁺ channels in a neuronal expression system. In: *Mol Pharmacol* 49 (4), S. 707–714.
- Pegg, David E. (2007): Principles of cryopreservation. In: *Methods Mol Biol* 368, S. 39–57.

Pertwee, R. G.: Neuropharmacology and therapeutic potential of cannabinoids. In: *Addiction biology* 5 (1), S. 37–46

Pollack, Charles V. (2011): Advanced management of acute iliofemoral deep venous thrombosis: emergency department and beyond. In: *Annals of emergency medicine* 57 (6), S. 590–599.

Pollo, Viviane; Dionízio, Danielle; Bucuvic, Edwa Maria; Castro, João Henrique; Ponce, Daniela (2016): Alteplase vs. urokinase for occluded hemodialysis catheter: A randomized trial. In: *Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis*. DOI: 10.1111/hdi.12391.

Pope, H G Jr; Gruber, A. J.; Yurgelun-Todd, D. (1995): The residual neuropsychological effects of cannabis: the current status of research. In: *Drug Alcohol Depend* 38 (1), S. 25–34.

Porter, Amy C.; Sauer, John-Michael; Knierman, Michael D.; Becker, Gerald W.; Berna, Michael J.; Bao, Jingqi et al. (2002): Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301 (3), S. 1020–1024.

Ramer, R., Merkord, J., Rohde, H., Hinz, B. (2010): Cannabidiol inhibits cancer cell invasion via upregulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1. *Biochem Pharmacol.* 79, S. 955-966.

Ramirez, Belen G.; Blazquez, Cristina; Gomez del Pulgar, Teresa; Guzman, Manuel; de Ceballos, Maria L (2005): Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. In: *J Neurosci* 25 (8), S. 1904–1913.

Randall, M. D.; Kendall, D. A. (1998): Endocannabinoids: a new class of vasoactive substances. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 19 (2), S. 55–58.

Randall, Michael D.; Harris, David; Kendall, David A.; Ralevic, Vera (2002): Cardiovascular effects of cannabinoids. In: *Pharmacology & Therapeutics* 95 (2), S. 191–202.

Rhee, M. H.; Bayewitch, M.; Avidor-Reiss, T.; Levy, R.; Vogel, Z. (1998): Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. In: *Journal of neurochemistry* 71 (4), S. 1525–1534.

Richter, K. P.; Levy, S (2014): Big marijuana -lessons from big tobacco. In: *The New England journal of medicine* 371 (5), S. 399–401.

Rodriguez-Linares, B.; Cano, E. (1995): In-vitro platelet responses to arachidonic acid in the rat. In: *J Pharm Pharmacol* 47 (12A), S. 1015–1020.

- Roesken, F.; Ruecker, M.; Vollmar, B.; Boeckel, N.; Morgenstern, E.; Menger, M. D. (1997): A new model for quantitative in vivo microscopic analysis of thrombus formation and vascular recanalisation: the ear of the hairless (hr/hr) mouse. In: *Thromb Haemost* 78 (5), S. 1408–1414.
- Rosen, Elliot D.; Raymond, Sylvain; Zollman, Amy; Noria, Francisco; Sandoval-Cooper, Mayra; Shulman, Alexis et al. (2001): Laser-Induced Noninvasive Vascular Injury Models in Mice Generate Platelet- and Coagulation-Dependent Thrombi. In: *Am J Pathol* 158 (5), S. 1613–1622.
- Rudgley, Richard (1999): *The encyclopaedia of psychoactive substances*. [New ed.]. London: Abacus (Abacus book).
- Ruggeri, Zaverio M. (2002): Platelets in atherothrombosis. In: *Nature medicine* 8 (11), S. 1227–1234.
- Rumbaut, Rolando E. (2005): Platelet–Microvessel Interactions. In: *Microcirculation* 12 (3), S. 233–234.
- Rumbaut, Rolando E.; Slaff, Dick W.; Burns, Alan R. (2005): Microvascular Thrombosis Models in Venules and Arterioles In Vivo. In: *Microcirculation* 12 (3), S. 259–274.
- Saha, Prakash; Black, Stephen; Breen, Karen; Patel, Ashish; Modarai, Bijan; Smith, Alberto (2016): Contemporary management of acute and chronic deep venous thrombosis. In: *British medical bulletin*.
- Sakariassen, K. S.; Nievelstein, P. F.; Collier, B. S.; Sixma, J. J. (1986): The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. In: *Br J Haematol* 63 (4), S. 681–691.
- Salim, A. S. (1992): Role of oxygen-derived free radical scavengers in the management of recurrent attacks of ulcerative colitis: a new approach. In: *The Journal of laboratory and clinical medicine* 119 (6), S. 710–717.
- Saniabadi, A. R.; Umemura, K.; Matsumoto, N.; Sakuma, S.; Nakashima, M. (1995): Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction. In: *Thromb Haemost* 73 (5), S. 868–872.
- Sato, M.; Ohshima, N. (1984): Platelet thrombus induced in vivo by filtered light and fluorescent dye in mesenteric microvessels of the rat. In: *Thrombosis research* 35 (3), S. 319–334.
- Sauvanier, M.; Constans, J.; Skopinski, S.; Barcat, D.; Berard, A.; Parrot, F. et al. (2002): Lower limb occlusive arteriopathy: retrospective analysis of 73 patients with onset before the age of 50 years. In: *J Mal Vasc* 27 (2), S. 69–76.

Shattil, S. J.; Kashiwagi, H.; Pampori, N. (1998): Integrin signaling: the platelet paradigm. In: *Blood* 91 (8), S. 2645–2657.

Showalter, V. M.; Compton, D. R.; Martin, B. R.; Abood, M. E. (1996): Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 278 (3), S. 989–999.

Signorello, Maria Grazia; Giacobbe, Enrica; Passalacqua, Mario; Leoncini, Giuliana (2011): The anandamide effect on NO/cGMP pathway in human platelets. In: *Journal of cellular biochemistry* 112 (3), S. 924–932.

Smith, P. B.; Compton, D. R.; Welch, S. P.; Razdan, R. K.; Mechoulam, R.; Martin, B. R. (1994): The pharmacological activity of anandamide, a putative endogenous cannabinoid, in mice. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 270 (1), S. 219–227.

Sorg, H; Hoffmann, J.; Menger, M; Lindenblatt, N; Goehring, P; Vollmar, B (2006): Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. In: *Thrombosis and haemostasis* 96 (3), S. 371–377.

Sorg, H; Hoffmann, J N.; Rumbaut, R E.; Menger, M D.; Lindenblatt, N; Vollmar, B (2007): Efficacy of antithrombin in the prevention of microvascular thrombosis during endotoxemia: an intravital microscopic study. In: *Thrombosis research* 121 (2), S. 241–248.

Spronk, Henri Mh; van der Voort, Danielle; Cate, Hugo ten (2004): Blood coagulation and the risk of atherothrombosis: a complex relationship. In: *Thromb J* 2 (1), S. 12-22.

Spronk, Henri M H; Govers-Riemslog, Jose W P; Cate, Hugo ten (2003): The blood coagulation system as a molecular machine. In: *Bioessays* 25 (12), S. 1220–1228.

Stein, E. A.; Fuller, S. A.; Edgemond, W. S.; Campbell, W. B. (1996): Physiological and behavioural effects of the endogenous cannabinoid, arachidonylethanolamide (anandamide), in the rat. In: *British journal of pharmacology* 119 (1), S. 107–114

Steinbauer, M.; Harris, A. G.; Abels, C.; Messmer, K. (2000): Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. In: *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie* 385 (4), S. 290–298.

Stenberg, P. E.; McEver, R. P.; Shuman, M. A.; Jacques, Y. V.; Bainton, D. F. (1985): A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. In: *The Journal of cell biology* 101 (3), S. 880–886.

Subramaniam, M.; Frenette, P. S.; Saffaripour, S.; Johnson, R. C.; Hynes, R. O.; Wagner, D. D. (1996): Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. In: *Blood* 87 (4), S. 1238–1242.

- Subramaniam, Saravanan; Kanse, Sandip M. (2014): Ferric chloride-induced arterial thrombosis in mice. In: *Current protocols in mouse biology* 4 (4), S. 151–164.
- Sun, Jing; Fang, Yin-quan; Ren, Hong; Chen, Tao; Guo, Jing-jing; Yan, Jun et al. (2013): WIN55,212-2 protects oligodendrocyte precursor cells in stroke penumbra following permanent focal cerebral ischemia in rats. In: *Acta pharmacologica Sinica* 34 (1), S. 119–128.
- Taher, Y. A., Samud, A. M., El-Taher, F. E., ben-Hussin, G., Elmezogi, J. S., et al. (2015): Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. *Libyan J Med.* 10, 28685.
- Theilmeier, G.; Lenaerts, T.; Remacle, C.; Collen, D.; Vermeylen, J.; Hoylaerts, M. F. (1999): Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoid/endothelial cell interaction under shear stress. In: *Blood* 94 (8), S. 2725–2734.
- Thieme, U; Schelling, G; Hauer, D; Greif, R; Dame, T; Laubender, R. P. et al. (2014): Quantification of anandamide and 2-arachidonoylglycerol plasma levels to examine potential influences of tetrahydrocannabinol application on the endocannabinoid system in humans. In: *Drug testing and analysis* 6 (1-2), S. 17–23.
- 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. In: *Neuroscience* 83 (2), S. 393–411.
- Urquhart, P.; Nicolaou, A.; Woodward, D. F. (2015): Endocannabinoids and their oxygenation by cyclo-oxygenases, lipoxygenases and other oxygenases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1851 (4), S. 366–376.
- van Mourik, Jan A.; Romani de Wit, Thalia; Voorberg, Jan (2002): Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. In: *Histochemistry and cell biology* 117 (2), S. 113–122.
- Vandeputte, C; Casteels, C; Struys, T; Koole, M; van Veghel, D; Evens, N et al. (2012): Small-animal PET imaging of the type 1 and type 2 cannabinoid receptors in a photothrombotic stroke model. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 39 (11), S. 1796–1806.
- Varga-Szabo, D.; Braun, A.; Nieswandt, B. (2009): Calcium signaling in platelets. In: *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 7 (7), S. 1057–1066.
- Varga-Szabo, David; Pleines, Irina; Nieswandt, Bernhard (2008): Cell adhesion mechanisms in platelets. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28 (3), S. 403–412.
- Wagner, J. A.; Varga, K.; Jarai, Z.; Kunos, G. (1999): Mesenteric vasodilation mediated by endothelial anandamide receptors. In: *Hypertension* 33 (1 Pt 2), S. 429–434.

- Wagner, J. A.; Varga, K.; Kunos, G. (1998): Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. In: *J Mol Med (Berl)* 76 (12), S. 824–836.
- Weber, A. A.; Schrör, K. (2001): Differential inhibition of adenosine diphosphate- versus thrombin receptor-activating peptide-stimulated platelet fibrinogen binding by abciximab due to different glycoprotein IIb/IIIa activation kinetics. In: *Blood* 98 (5), S. 1619–1621.
- Weiss, H. J.; Turitto, V. T. (1979): Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. In: *Blood* 53 (2), S. 244–250.
- White, J. G. (1994): Platelets and atherosclerosis. In: *Eur J Clin Invest* 24 Suppl 1, S. 25–29.
- White, Richard H. (2003): The epidemiology of venous thromboembolism. In: *Circulation* 107 (23 Suppl 1), S. I4-18.
- Wohn, K. D.; Schmidt, T.; Kanse, S. M.; Yutzy, B.; Germer, M.; Morgenstern, E.; Preissner, K. T. (1999): The role of plasminogen activator inhibitor-1 as inhibitor of platelet and megakaryoblastic cell adhesion. In: *Br J Haematol* 104 (4), S. 901–908.
- Xiong, Wei; Cui, Tanxing; Cheng, Kejun; Yang, Fei; Chen, Shao-Rui; Willenbring, Dan et al. (2012): Cannabinoids suppress inflammatory and neuropathic pain by targeting $\alpha 3$ glycine receptors. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (6), S. 1121–1134.
- Xiong, Xin; Zhang, Lei; Cheng, Litao; Mao, Wei (2015): High-throughput salting-out assisted liquid-liquid extraction with acetonitrile for the determination of anandamide in plasma of hemodialysis patients with liquid chromatography tandem mass spectrometry. In: *Biomedical chromatography : BMC* 29 (9), S. 1317–1324.
- Yu, M.; Ives, D.; Ramesha, C. S. (1997): Synthesis of prostaglandin E₂ ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (34), S. 21181–21186.
- Zuardi, A. W.; Cosme, R. A.; Graeff, F. G.; Guimarães, F. S. (1993): Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. In: *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 7 (1 Suppl), S. 82–88.

11 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

11.1 Abbildungen

- Abb. 1: Elektronenmikroskopische Bilder von ruhenden Thrombozyten (links) und mit Thrombinrezeptor-aktivierendem Peptid (TRAP) stimulierten Thrombozyten (rechts)
- Abb. 2: G-Protein-abhängige Signaltransduktion in Thrombozyten
- Abb. 3: Schema der Hauptelemente des Endocannabinoidsystems am Beispiel von Anandamid (AEA)
- Abb. 4: SKH-1/hr Maus
- Abb. 5: Ausgelagertes Ohr der SKH-1/hr Maus in der Planimetrie zur Darstellung der Gefäß-Nerven-Stränge
- Abb. 6: Histologischer Aufbau des Ohres der SKH-1/hr Maus
- Abb. 7: Lagerung des Ohres der SKH-1/hr Maus
- Abb. 8: Aufbau der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie
- Abb. 9: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs mit einmaliger Cannabinoidexposition und des Versuchs mit Cyclooxygenase-Inhibition
- Abb. 10: Schematische Darstellung des Ablaufs des Versuches mit chronischer Cannabinoidexposition
- Abb. 11: Intravitalmikroskopische Aufnahmen von Gefäßen im Ohr der SKH-1/hr Maus vor (oben) und nach (unten) Thrombose-Induktion in 10-facher, 20-facher und 63-facher Vergrößerung
- Abb. 12: Gefäßverschlusszeit in Venolen bei akuter Cannabinoidexposition. Quantitative Analyse der Zeit bis zum vollständigen Gefäßverschluss der Venolen
- Abb. 13: Gefäßverschlusszeit in Venolen bei Akuter Cannabinoidexposition mit Cyclooxygenase-Inhibition

- Abb. 14: Gefäßverschlusszeit in Venolen bei repetitiver Cannabinoidexposition
- Abb. 15: Ergebnisse des paarweisen Vergleichs der Gefäßverschlusszeiten nach Behandlung der Versuchstiere mit Veh., WIN 55,212-2 (WIN), CBD und AEA von Versuchstag 1 (d1) gegen Versuchstag 2 (d2)
- Abb. 16 Exemplarische Dot Plots von ruhenden und aktivierten Thrombozyten
- Abb. 17: Durchflusszytometrische Analyse ruhender humaner Thrombozyten
- Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse TRAP-aktivierter humaner Thrombozyten
- Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse ruhender humaner Thrombozyten [AEA 50 – 1000 μ M]
- Abb. 20: Durchflusszytometrische Analyse TRAP-aktivierter humaner Thrombozyten [AEA 50 – 1000 μ M]
- Abb. 21: Thrombozytenzahl im PRP nach Behandlung mit AEA in steigender Dosierung
- Abb. 22: Phototoxische Induktion einer Thrombose in einer Venole (V)
- Abb. 23: Strukturformel von AEA
- Abb. 24: Strukturformel von WIN 55,212-2
- Abb. 25: Strukturformel von CBD
- Abb. 26: Zusammenfassung des intrazellulären Abbaus von AEA zum prothrombogenen Mediator Thromboxan A₂
- Abb. 27: Exemplarische Dot Plots aus der Durchflusszytometrie

11.2 Tabellen

Tab. 1:	Übersicht über die Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula
Tab. 2:	Auswahl akuter Wirkungen von Cannabinoiden
Tab. 3:	Synopsis verschreibungsfähiger Cannabinoidzubereitungen
Tab. 4:	Forschungsfelder und therapeutische Perspektiven für Cannabinoide
Tab. 5:	Intrazelluläre Signalwege der Cannabinoidrezeptoren
Tab. 6:	Endogene Cannabinoide und ihre Rezeptoraffinität
Tab. 7:	Einteilung der Tiere im Versuch mit akuter Cannabinoidexposition
Tab. 8:	Einteilung der Tiere im Versuch der akuten Cannabinoidexposition unter Cyclooxygenase-Inhibitio

12 Lebenslauf

-

13 Thesen zur Dissertation

1. Störungen der Thrombogenese führen zu Erkrankungen mit hoher Inzidenz und schwerwiegenden Komplikationen. Trotz intensiver Forschung bedarf es einer Weiterentwicklung von Therapie und Prophylaxe der Thrombose.
2. Die komplexen Vorgänge der Hämostase sind *in vitro* allein nur unzureichend simulierbar. Daher werden zur Untersuchung der Thrombogenese auch geeignete *in vivo*-Modelle benötigt.
3. Die Durchflusszytometrie ermöglicht die quantitative und qualitative Messung der Expression prothrombogener Adhäsionsmoleküle auf Thrombozyten. P-Selektin ist ein repräsentativer Marker für die Thrombozytenaktivität, da es im ruhenden Thrombozyten nur in den α -Granula, nicht aber auf der Zellmembran exprimiert wird.
4. Das Ohr der haarlosen SKH-1/hr Maus eignet sich sehr gut zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Thrombogenese, weil die Gefäße der gut vaskularisierten Ohrmuscheln der phototoxischen Thrombose-Induktion ohne vorherige Präparation zugänglich sind.
5. Cannabinoide sind pleiotrope Substanzen und haben vielfältige zentrale und periphere Wirkungen, die über Cannabinoid-Rezeptoren (CB₁ und CB₂ u.a.) vermittelt werden. Daher werden Liganden der Cannabinoid-Rezeptoren zunehmend klinisch eingesetzt und intensiv erforscht.
6. Das Endothel und die Thrombozyten, zwei zentrale Elemente der Thrombogenese, exprimieren Cannabinoid-Rezeptoren. Eine Beeinflussung der Hämostase durch Cannabinoide ist daher wahrscheinlich. Die zu dieser Fragestellung in der Literatur vorliegenden Daten stammen allesamt aus *in vitro*-Untersuchungen und sind widersprüchlich.

7. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der synthetische Cannabinoid-Rezeptor Agonist WIN55.212-2 und das phyto gene Cannabinoid Cannabidiol weder die Thrombozytenaktivität *in vitro* noch die Gefäßverschlusszeit *in vivo* beeinflussen. Dieses Ergebnis macht die Beteiligung der CB₁- und CB₂-Rezeptoren an der Thrombogenese unwahrscheinlich.
8. Das endogene Cannabinoid Anandamid erhöht in Konzentrationen von >250 µM die Thrombozytenaktivität *in vitro*. Diese Wirkung muss nach Analyse der Thrombozytenzahlen eher auf einen zytotoxischen als einen prothrombogenen Effekt zurückgeführt werden.
9. *In vivo* wirkt Anandamid im Ohrmodell der haarlosen Maus prothrombogen. Der Effekt wird durch parallele Behandlung mit dem Cyclooxygenase-Inhibitor Indomethacin vollständig aufgehoben. Der prothrombogene Effekt beruht somit auf dem Metabolismus von Anandamid zu Arachidonsäure und nachfolgender Freisetzung von Thromboxan A₂
10. Die Versuchsergebnisse lassen nicht auf eine Eignung des Cannabinoidsystem als neues pharmakologisches Target zur Thrombosebehandlung schließen. Allerdings ergaben sich auch keine Hinweise auf prothrombogene Nebenwirkungen durch die therapeutisch relevanten Phytocannabinoide und synthetischen Cannabinoide.

14 Danksagung

Am Ende möchte ich mich noch bei den Menschen erkenntlich zeigen, ohne deren Unterstützung diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre:

Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar danke ich für die Möglichkeit, die Versuche unter Ihrer Anleitung und Aufsicht durchzuführen. Ihre Motivation, Präzision und Förderung haben mich in den Jahren unserer Zusammenarbeit und auch über meine Zeit am Institut für Experimentelle Chirurgie hinaus, wesentlich geprägt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Eberhard Grambow für die Bereitstellung des attraktiven Themas und die jederzeit freundliche und professionelle Betreuungsarbeit und Unterstützung. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm begleitet und gemeinsam lösten wir insbesondere bei der Etablierung des Modells viele Schwierigkeiten.

Herr Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Hinz warf die spannende Idee zur interdisziplinären Erforschung der vorliegenden Thematik erst auf. Ich bedanke mich recht herzlich für seine stetigen Hilfestellungen bei allen Fragen zur hochkomplexen Welt der Cannabinoide und für die konstruktive Begutachtung der Promotionsarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt auch Frau Berit Blendow für Ihre unterhaltsame Einführung in die *in vitro* Analytik und die hervorragende Unterstützung bei der Vorbereitung und Durchführung der Durchflusszytometrie.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dorothea Frenz für die histologische Aufarbeitung der Schnittpräparate.

Dem gesamten Team der experimentellen Chirurgie gilt mein Dank für die jederzeit sehr angenehme Zusammenarbeit und die hervorragende technische Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein ganz herzlicher Dank meiner Familie Lisa, Michaela, Hilde und Eberhard Strüder, die mir das Studium und die Promotion ermöglichten und mir trotz der großen Distanz immer nah waren. So konnten sie durch ihren liebevollen Rückhalt und ihre uneingeschränkte Unterstützung wesentlich zum Gelingen der Arbeit beitragen.

15 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die vorliegende Promotionsarbeit „Der Einfluss von Cannabinoiden auf humane Thrombozyten und die mikrovaskuläre Thrombogenese im Ohrmodell der haarlosen Maus“ selbstständig unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Wörtliche und inhaltliche Aussagen verwendeter Werke sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin versichere ich diese Arbeit bei keiner anderen Einrichtung als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht zu haben.

Rostock, den 1. Mai 2016