

Aus der Klinik für Rheumatologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Jörg Distler

**Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die
Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich Heine Universität

Vorgelegt von

Smutny Sophie

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Georg Pongratz

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

Für meine Familie:

Meine Eltern, für Ihre Unterstützung in Wort, Tat und Verpflegung.

Meine Schwester, für die gemeinsamen Schreibabende und den oft benötigten
Frustabbau.

Meinen Bruder, für seinen stets vorhandenen Humor. Du warst doch schneller
mit dem Titel.

Besonderen Dank an Torsten Lowin für seine geduldige Betreuung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lowin T., Kok C., Smutny S., Pongratz G., (2022), Impact of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Alone and in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomedicines*

Zusammenfassung

Neben der Arthrose, der umgangssprachlich als „Gelenksverschleiß“ bekannten Erkrankung, ist die rheumatoide Arthritis die bekannteste Form entzündlicher rheumatischer Erkrankungen in unserer Gesellschaft.

Die Leitsymptome der rheumatoiden Arthritis sind Schmerzen und Schwellung, welche für die Patienten einen großen Leidensdruck mit sich ziehen. Seit 2017 können Cannabis-Zubereitungen zur Schmerzreduktion sowie zur Verbesserung der Lebensqualität von Patienten mit RA verschrieben werden, seit der Legalisierung von Cannabis Anfang April 2024 auch ohne Rezept nach dem Betäubungsmittelgesetz. Nachdem diverse Studien bereits verschiedene Aspekte der Wirkung von Cannabinoiden auf Zellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis untersucht haben, liegt der Fokus dieser Arbeit nun auf der Wirkung von THC auf synoviale Fibroblasten von Patienten mit rheumatoider Arthritis, im speziellen darauf, ob sich die entzündliche Aktivität und die Wirkstoffaufnahme dieser Stromazellen unter dem Einfluss von THC verändert.

Summary

Apart from arthrosis, also called osteoarthritis, rheumatoid Arthritis is one of the most well known rheumatic diseases in society known for it's tendency to severely deform the hands of affected people. Though these deformities have become a sight of the past, the main symptom of the disease, pain, still torments the affected. Through a change in the laws regarding the use of Cannabis sativa as a medicinal plant in 2017, doctors in Germany are now able to prescribe formulations with cannabinoids as their main acting agents. Receiving a prescription has become even easier since Cannabis has been legalised in April 2024.

While previous studies have looked into a broad spectrum of the effects of cannabinoids on the cells of patients with rheumatoid arthritis, this thesis focuses on how THC affects synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, especially how the inflammatory activity and the absorption of medications is affected by the therapeutic usage of THC.

Sperrvermerk

Die Finanzierung der Verbrauchsmaterialien erfolgt über die Hiller Stiftung für Rheumatologie, die wissenschaftlichen Mitarbeiter werden von der Universität Düsseldorf bezahlt. Die Doktorandin erhält keine Vergütung.

Studiennummer: 2018-87-KFogU, Antragssteller: Prof. Dr. med. Georg Pongratz, Datum der Zustimmung: 03.01.2019

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Definition der RA (RA).....	1
1.2 Epidemiologie und Mortalität der RA.....	1
1.3 Ätiologie und Pathogenese der RA	1
1.4 Klinik der RA	5
1.5 Synoviale Fibroblasten in der RA	6
1.6 Phytocannabinoide	7
1.7 Exkurs in das Endocannabinoidsystem	8
1.8 Relevante Rezeptoren im THC-Stoffwechsel des Menschen.....	10
1.8.1 Cannabinoid-Rezeptoren.....	10
1.8.2 Transient-Receptor-Potential-Kanäle.....	11
1.9 Vorteile der Nutzung von Cannabinoiden.....	12
1.9.1 Nutzung von Cannabinoiden als antiinflammatorische Medikamente.....	12
1.9.2 Nutzung von Cannabinoiden für psychiatrische Komorbiditäten der RA	14
1.10 Risiken der Nutzung von Cannabinoiden.....	15
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien	19
2.1.3 Medien und Supplemente.....	20
2.1.4 ELISA-Kits.....	21
2.1.5 Reagenzien	21
2.1.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Zellkulturmedien.....	22
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.2 Methoden.....	23

2.2.1	Patienten	23
2.2.2	Zellkultivierung.....	24
2.2.3	ELISA.....	25
2.2.4	Kalzium-Assay	27
2.2.5	Berechnungen und statistische Auswertung.....	27
2.2.6	Verwendung künstlicher Intelligenz	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Zellüberleben von RASF unter dem Einfluss von THC	29
3.2	Produktion von IL-6, IL-8 und MMP-3 durch RASF unter Einfluss von THC.....	30
3.3	Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration von RASF unter dem Einfluss von THC.....	35
4	Diskussion	53
4.1	Zellüberleben.....	53
4.2	Zytokinproduktion.....	54
4.3	Veränderungen im Kalziumhaushalt.....	54
4.4	Wirkstoffaufnahme.....	56
4.5	Limitationen	57
4.6	Ausblick	58
	Literaturverzeichnis.....	60
	Anhang	71

Abkürzungsverzeichnis

A96	A967079
ABH4	Alpha-Beta-Hydrolase
2-AG	2-arachidonyl glycerol
APCs	<i>engl.: antigen presenting cells</i> , Antigen-präsentierende Zellen
BAPTA	1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
CBD	Cannabidiol
COR	COR 170, (Z)-N-((3s,5s,7s)-adamantan-1-yl)-4-oxo-1-pentyl-6-phenyl-1,4-dihydroquinoline-3-carbimidic acid
CoViD-19	Corona-Virus-Disease 2019
COX-2	Cyclooxygenase-2
CRP	C-Reaktives Protein
CsA	Cyclosporin A
DAGL	Diacylglycerol Lipase
D22	Decynium 22
DMT1	Diabetes mellitus Typ 1
EGF	<i>engl.: Epidermal growth factor</i> , Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>engl.: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FAAH	Fettsäure-Amid-Hydrolase
FAP α	<i>engl.: fibroblast activation protein α</i>
FCS	<i>engl.: fetal Calf Serum</i> , Fötales Kälberserum
FGF	<i>engl.: fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
G-CSF	<i>engl.: granulocyte colony-stimulating factor</i>
GDE1	Glycerolphosphodiester-Phosphodiesterase 1
HC3	HC-030031
HLA	Humanes LeukozytenAntigen

IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
INF	Interferon
KI	Künstliche Intelligenz
LPA	Lysophosphatidsäure (Lysophosphatidic acid)
MMP-3	Matrix-Metallo-Proteinase 3
NAPE	N-Acyl-Phosphatidylethanolamin
NAPE-PLD	N-Acyl-Phosphatidylethanolamin-hydrolysierende-Phospholipase D
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
PGE-2	Prostaglandin E2
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PoPo3	PoPo3-Kation, 1,1'-{propane-1,3-diylbis[(dimethylazaniumdiyl)propane-3,1-diyl]} bis{4-[3-(3-methyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidene)prop-1-en-1-yl]pyridinium}
PPAR	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RASF	Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts, synoviale Fibroblasten von Patienten mit RA
RF	Rheumafaktor
Rim	Rimonabant
RR	Ruthenium Rot
THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
Treg	T-regulatorische Zellen
TRP	Transient receptor potential, channel
Th	T-Helferzelle

THY1	surface glycoposphatidylinositol-linked Protein
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema eines Sandwich-ELISA	26
Abbildung 2: Beispiel einer Standardkurve eines IL-6 ELISA.....	26
Abbildung 3: Prozentuelles Zellüberleben nach Stimulation mit THC für 24h und TNF α -Exposition nach THC-Exposition	29
Abbildung 4: Prozentuelles Zellüberleben nach Inkubation mit TNF α für 72h und weiteren 24h mit THC.....	30
Abbildung 5: Einfluss von THC auf die IL-6 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC).....	31
Abbildung 6: Einfluss von THC auf die IL-8 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 24h in Prozent der Kontrolle (ohne THC).....	32
Abbildung 7: Einfluss von THC auf die IL-8 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC).....	33
Abbildung 8: Einfluss von THC auf die MMP-3 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 24h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)	34
Abbildung 9: Einfluss von THC auf die MMP-3 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)	35
Abbildung 10: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen.....	36
Abbildung 11: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die Kontrolle (kein THC).....	37
Abbildung 12: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, mit Zusatz von BAPTA, bezogen auf die Kontrolle (kein THC).....	38
Abbildung 13: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die Kontrolle	40
Abbildung 14: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von CsA, bezogen auf die ersten 4 Messungen.....	41
Abbildung 15: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen	42

Abbildung 16: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumhaltigem Medium, ohne Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von RR, bezogen auf die ersten 4 Messungen.....	43
Abbildung 17: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen	44
Abbildung 18: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumfreiem Medium (PBS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen	45
Abbildung 19: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von A967, bezogen auf die ersten 4 Messungen	46
Abbildung 20: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von COR bezogen auf die ersten 4 Messungen .	47
Abbildung 21: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumfreiem Medium, nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von A967, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)	48
Abbildung 22: Änderung der intrazellulären PoPo ₃ -Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Exposition mit TNF unter Zugabe von COR, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)...	49
Abbildung 23: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von THC, bezogen auf die ersten 4 Messungen.....	50
Abbildung 24: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumfreiem Medium (PBS), nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von THC, bezogen auf die ersten 4 Messungen.....	51
Abbildung 25: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem (HBSS) Medium, nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von THC, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	17
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	19
Tabelle 3: Medien und Supplemente	20
Tabelle 4: ELISA-Kits	21
Tabelle 5: Reagenzien	21
Tabelle 6: Zusammensetzung von Puffern und Medien	22
Tabelle 7: p-Werte von Kalzium absolut	71
Tabelle 8: p-Werte von Kalzium auf die ersten 4 Messungen	75
Tabelle 9: p-Werte von Kalzium auf die Kontrolle	78
Tabelle 10: p-Werte von PoPo3 absolut	82
Tabelle 11: p-Werte von PoPo3 auf die ersten 4 Messungen	86
Tabelle 12: p-Werte von PoPo3 auf die Kontrolle	91

1 Einleitung

1.1 Definition der RA (RA)

Die rheumatoide Arthritis, auch chronische Polyarthritits genannt, ist eine chronische, autoimmun-entzündliche, progrediente Erkrankung des Gelenkgewebes, die neben den synovialen Gelenken auch andere Strukturen wie Augen, Sehnen, Schleimbeutel sowie innere Organe wie Herz und Lunge befallen kann und unbehandelt zur Zerstörung von Gelenken und Schädigung anderer betroffener Organe führt. (Hettenkofer, 2003; "Rheumatoid arthritis," n.d.) Zu den am häufigsten betroffenen Gelenken zählen die Gelenke der Hand und des Handgelenks, der Füße, der Sprunggelenke, der Knie, der Ellbogen und der Schultern. ("Rheumatoid arthritis," n.d.)

1.2 Epidemiologie und Mortalität der RA.

Die RA gehört, einer Studie aus dem Vereinigten Königreich nach, welche sich annähernd auf europäische Staaten übertragen lässt, neben der Hashimoto Thyreoiditis, Psoriasis und Polymyalgia rheumatica zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen und ist die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung. (Conrad et al., 2023; Hettenkofer, 2003; Rodríguez Mesa et al., 2021) In Mitteleuropa wird die Morbiditätsrate der RA auf etwa 1% geschätzt. (Hettenkofer, 2003)

Während die RA in jedem Lebensabschnitt auftreten kann, steigt die Wahrscheinlichkeit mit steigendem Lebensalter an. (Conrad et al., 2023) Jedoch existiert auch eine juvenile Form der RA und Kinder und Jugendliche bis zum 16. Lebensjahr machen etwa 4-7% der Erkrankten aus. Des Weiteren liegt die Geschlechterverteilung etwa bei 2:1 zugunsten genetisch weiblicher Personen. (Conrad et al., 2023; Hettenkofer, 2003; "Rheumatoid arthritis," n.d.)

1.3 Ätiologie und Pathogenese der RA

Die Entstehung der RA wird durch verschiedene Faktoren wie Genetik und Epigenetik, immunologische Faktoren wie Autoantikörper, Immunstatus, exogene Umwelteinflüsse und intrinsische Einflüsse des Mikrobioms beeinflusst. Die genaue Ursache der Erkrankung ist bis heute nicht geklärt. (Scherer et al., 2020)

Ein wichtiger genetischer Marker ist das Humane Leukozyten-Antigen DR4 (HLA-DR4), wobei das HLA-DRB4 Gen die Beta-Untereinheit des MHC-Klasse-2-Moleküls kodiert. Die

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Expression des Genlocus HLA-DR4 sowie HLA-DRB1 gehen mit einer verstärkten Präsentation autoimmunologisch aktiver Peptide einher, was zu einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer RA, eines SLE oder eines Diabetes mellitus Typ I führt. (Hettenkofer, 2003, p. 52; Lin et al., 2020) Bei der RA wurde eine Zunahme von T-Helferzellen bei gleichzeitiger Dysfunktion und pathologischer Differenzierung von regulatorischen T Zellen (Treg) sowie eine Einwanderung von CD-4-positiven T-Zellen in betroffene Gelenke bereits in der Frühphase der Erkrankung beobachtet. (Hettenkofer, 2003; Lin et al., 2020; Scherer et al., 2020) Dies führt zu einer gesteigerten Aktivierung von B-Zellen und infolge dessen zu einer verstärkten Bildung von Autoantikörpern wie dem Rheumafaktor (RF). (Hettenkofer, 2003, p. 61) Der aktuellen Hypothese nach kommt es nach Auftreten eines Events wie einer viralen Infektion oder einer Verletzung zur Aktivierung autoreaktiver Lymphozyten und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen. (Lin et al., 2020) Dies führt zu einer Infiltration der Synovialis durch Monozyten sowie zur Proliferation von synovialen Fibroblasten, was zu einer Verdickung der Synovialis führt. (Hettenkofer, 2003; Scherer et al., 2020)

Die Mortalität der RA kann auf Manifestationen an den inneren Organen, Vaskulitiden sowie Komorbiditäten und Therapiefolgen wie Immunsuppression mit daraus folgenden Pneumonien zurückgeführt werden. (Black et al., 2023, p. 5) Die Erkrankung führt zu einem erhöhten Mortalitätsrisiko von etwa 1,49 über einen Zeitraum von 20 Jahren bezogen auf Länder mit hoher Lebensqualität und staatlich geförderter Gesundheitsversorgung. (Black et al., 2023; Hettenkofer, 2003) Während in den letzten Jahrzehnten kardiovaskuläre Komorbiditäten den Hauptfaktor der erhöhten Mortalität darstellten, wurden diese in den letzten Jahren durch respiratorische Erkrankungen überholt. (Black et al., 2023)

Die Pathogenese der RA ist untrennbar mit der Ausschüttung von Zytokinen, wie Interleukinen, und Enzymen wie Matrix-Metalloproteinasen verknüpft:

Bei entsprechender genetischer Prädisposition kommt es nach einem auslösenden Event zu einer Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und einer Infiltration eines oder mehrerer Gelenke. Dort schütten die Lymphozyten, insbesondere Th1 und Th17, Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und IL-23 aus. Des Weiteren kommt es durch weitere Zelltypen, wie dendritische Zellen, zur Ausschüttung von TNF α , INF- α , INF- β und IL-18. (Lin et al., 2020)

Das wichtigste Zytokin in der Pathogenese der RA ist der Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α). (Jang et al., 2021) Dieses Zytokin wurde erstmals 1975 als Faktor identifiziert, welcher

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

eine hämorrhagische Nekrose in transplantierten Sarkomen auslösen kann. (Bradley, 2008; Carswell et al., 1975) Die Ausschüttung erfolgt durch T-Lymphozyten und Makrophagen (Jang et al., 2021), die bei einer Synovitis im Rahmen einer RA in das betroffene Gelenk einwandern. Studien konnten bestätigen, dass nur TNF α , nicht aber TNF β eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielt (Lopatnikova et al., 2013; Robak et al., 1998), sodass Infliximab, ein Anti-TNF-Antikörper als erstes Biologikum gegen RA eingesetzt wurde. (Blumenauer et al., 2002)

TNF α bindet den TNF-Rezeptor 1 und den TNF-Rezeptor 2. (Bradley, 2008) In den betroffenen Gelenken führt die Präsenz von TNF α zu einer Aktivierung von Synoviozyten, die daraufhin weitere Zytokine produzieren und freisetzen, sowie zu einer Chemotaxis weiterer Zellen des Immunsystems, wodurch die Entzündungsreaktion am Laufen gehalten wird. (Jang et al., 2021)

Zu den durch TNF α induzierten Zytokinen gehören unter anderem IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 und MMP-3.

Das bekannteste Zytokin in der Interleukin-1 Familie ist das Zytokin IL-1 β . (Yazdi and Ghoreschi, 2016) IL-1 β und IL-1 α (im Folgenden zusammen als IL-1 bezeichnet) gehören zu den proinflammatorischen Zytokinen dieser Familie, während IL-1Ra als Antagonist am IL-1 Rezeptor wirkt. (Yazdi and Ghoreschi, 2016) IL-1 zeigt sowohl lokale als auch systemische Effekte. Systemisch kommt es zu einer Veränderung der Hämatopoese und des Metabolismus, während lokal die Chemotaxis von Monozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, die Steigerung der Fibroblastenproliferation sowie die Differenzierung von Th17 im Vordergrund stehen. (Gabay and Arend, 1998; Yazdi and Ghoreschi, 2016) Bereits 1998 wurde daher die Inhibition von IL-1 als potentieller Therapieansatz für RA diskutiert, was später im Rahmen der kombinierten Behandlung von RA und Komorbiditäten wie Diabetes mellitus Typ 2 (DM2) wieder aufgegriffen wurde. (Gabay and Arend, 1998; Ruscitti et al., 2018)

Innerhalb der Interleukin-17 (IL-17)-Familie ist IL-17A das am besten untersuchte Interleukin dieser Familie. (McGeachy et al., 2019) IL-17 wird unter anderem von bestimmten CD4+ T-Helferzellen produziert, die entsprechend als T-Helferzellen 17 (Th17) bezeichnet werden (Amatya et al., 2017) und eine wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielen. IL-17 spielt eine Rolle bei der akuten Entzündungsreaktion, indem es die Produktion von Chemokinen, IL-6, G-CSF und verschiedenen antimikrobiellen Peptiden induziert um u.a. neutrophile Granulozyten in das Entzündungsgebiet zu locken. (McGeachy et al., 2019) Darüber hinaus stimuliert IL-17 auch die Bildung von Osteoklasten, was zur Destruktion von Gelenken beiträgt. (Huangfu et al., 2023) Physiologisch liegt die Hauptrelevanz von IL-17 in der mikrobiellen

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Abwehr von Pilzinfektionen oder bakteriellen Infektionen wie *Candida albicans* spp. bzw. *Klebsiella* spp. (McGeachy et al., 2019) Während IL-17 als potentieller Angriffspunkt in der Therapie der RA getestet wurde, erwiesen sich die Versuche in dieser Richtung als nicht erfolgreich. (Huangfu et al., 2023)

Durch aktivierte B und T-Zellen, myeloide Zellen, und vor allem aktivierte Fibroblasten werden weitere proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet, darunter IL8 und, vor allem durch Fibroblasten, IL-6. Als proinflammatorisches Zytokin führt IL-6 zum Wachstum sowie zur Differenzierung von B- und T-Zellen und zur Inhibierung der Differenzierung von Tregs. (Tanaka et al., 2014) Des Weiteren wird durch die Ausschüttung von IL-6 die Produktion von Akute-Phase-Proteinen angeregt. (Bröcker et al., 2019, p. 314; Murphy and Weaver, 2018, pp. 117, 132, 1072) Zu diesen Akute-Phase Proteinen gehört in der Enzymfamilie der Matrix-Metallo-Proteinasen auch MMP-3. Matrix-Metallo-Proteinasen werden unter anderem von Neutrophilen Granulozyten zur Durchwanderung der Basalmembran sowie der extrazellulären Matrix gebildet, jedoch bilden auch Fibroblasten nach entsprechender Stimulation durch TNF α Matrix-Metallo-Proteinasen, zum Beispiel MMP-3. (Konishi et al., 2022) Ihre Relevanz in der RA findet sich in der Zerstörung der extrazellulären Matrix wie des Gelenkknorpels. (Murphy and Weaver, 2018, pp. 143, 868) Des Weiteren wird durch Fibroblasten während einer Entzündungsreaktion RANK-L ausgeschüttet, was zur Aktivierung von Osteoklasten, Abbau von Knochengewebe und schlussendlich zur Zerstörung des Gelenks führt. (Murphy and Weaver, 2018, p. 868)

Ein weiteres bedeutendes Chemokin ist IL-8, welches die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, sowie von T-Zellen in das Gewebe vermittelt. (Bröcker et al., 2019, p. 314; Murphy and Weaver, 2018, pp. 143, 868)

Neben den oben genannten Zytokinen spielen auch Interferone eine Rolle in der Pathogenese der RA, allen voran INF- γ . Dieses Zytokin wird unter anderem von Th1-Zellen produziert (Lee et al., 2022) und aktiviert die Proliferation von Makrophagen. (Casanova et al., 2024) Im Anfangsstadium der RA sind diverse Gene, die im INF- γ -Signalweg relevant sind, hochreguliert. (Lee et al., 2022) Die Analyse von IFN-Gen-Signaturen kann das Ansprechen auf eine Anti-TNF-Therapie vorhersagen, insbesondere bei Patienten asiatischer Abstammung. (Iwasaki et al., 2022) Darüber hinaus korrelieren die Serumspiegel von INF- γ und IL-17 in Studien mit dem Therapieansprechen. (Lee et al., 2022) Januskinase-Inhibitoren können als Inhibitoren des INF-Signalweges eingesetzt werden (Iwasaki et al., 2022) und sind bereits als

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

second-line Therapeutika in den Leitlinien zur Behandlung der RA im Einsatz. (Radu and Bungau, 2021)

1.4 Klinik der RA

Die Erkrankung manifestiert sich in der Regel zwischen dem 25. und 50. Lebensjahr zuerst mit einem unspezifischen Prodromalstadium, welches durch Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, Schwäche, fluktuierende Muskel- und Gelenkschmerzen und Nachtschweiß imponiert. Daraufgehend beginnt nach einigen Tagen bis Monaten das erste Stadium mit konstanten, symmetrischen Synovitiden, üblicherweise der Fingergrund- und -Mittelgelenke, sowie Morgensteifigkeit für mindestens 30 Minuten, welche unbehandelt den gesamten weiteren Krankheitsverlauf begleitet. Auch ein Befall des Kiefergelenks ist nicht ungewöhnlich. (Hettenkofer, 2003) Im zweiten Stadium treten vermehrt Muskelatrophien der kleinen Handmuskulatur auf. Außerdem kommt es vermehrt zu Bursitiden und Tenosynovitiden, welche jedoch auch die Erstmanifestation einer RA sein und als gefürchtete Folge zu Sehnenrupturen führen können. (Hettenkofer, 2003)

Bei weiterer Progredienz manifestieren sich im Stadium 3 Gelenksdeformitäten, welche ihre Ursache einerseits in der Destruktion von Gelenken, andererseits in der weiteren Atrophie der Muskulatur haben. Zu den klassischen Deformierungen zählen die Schwanenhalsdeformität, das Caput-ulnae-Syndrom, die Knopflochdeformität und die 90°/90°-Deformierung des Daumens. Diese verstümmelnde Zerstörung von Gelenken tritt vor allem an den Grundgelenken von Fingern und Zehen auf. Neben diesen können auch größere Gelenke, wie Knie- und Schultergelenk, sowie die Wirbelsäule betroffen sein. Während vor allem die Knie ähnlich den kleinen Gelenken von Deformitäten und Achsenfehlstellungen betroffen sind, manifestiert sich die RA an der Wirbelsäule bevorzugt durch eine früh auftretende Osteoporose sowie Destruktionen am Bandapparat der Wirbelsäule, was in einigen Fällen zu einer Luxation des Dens Axis mit akuten neurologischen Symptomen aufgrund einer Kompression des Rückenmarks führen kann. Nach vollständiger Destruktion des Gelenksknorpels an synovialen Gelenken kommt es schließlich im 4. Stadium zur knöchernen oder fibrösen Ankylose einzelner Gelenke, woraufhin eine irreversible Immobilität bis hin zur Invalidität auftritt. (Hettenkofer, 2003)

Neben dem Gelenksapparat können bereits im Prodromalstadium auch weitere Organsysteme betroffen sein. Die am häufigsten auftretenden Veränderungen betreffen das Blutbild, üblicherweise mit einer normo- bis hypochromen Anämie sowie im akuten Schub mit einer Leukozytose. Auch eine Thrombozytose tritt im akuten Schub gehäuft auf, während sowohl

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

eine Thrombopenie als auch eine Leukopenie ungewöhnlich sind und weiter abgeklärt werden sollten, sofern sie nicht durch die medikamentöse Therapie oder weitere bereits bekannte Erkrankungen erklärt werden können. Ebenso ist gehäuft das lymphatische System betroffen, mit Lymphadenopathien oder Splenomegalie. (Hettenkofer, 2003)

Der Verlauf der RA ist interindividuell sehr unterschiedlich und geht von selbstlimitierenden Fällen bei bis zu 10% der PatientInnen über milde Verläufe mit Teil- und Vollremissionen in etwa 15-30% der Patienten oder langsam progredientem Verlauf in 75% der Fälle bis hin zu rasch progressiven Verläufen bei etwa 25% der PatientInnen.

1.5 Synoviale Fibroblasten in der RA

Fibroblasten finden sich im gesamten menschlichen Körper und bilden über die Produktion der extrazellulären Matrix Faserzüge, welche Organstrukturen abgrenzen. Des Weiteren verändert sich die Funktion von Fibroblasten bei Entzündungsreizen wie Verletzungen. Es kommt zu einer Akkumulation von Fibroblasten und zur Fibrogenese, Immunmodulation und Angiogenese, was im physiologischen Zustand zur Heilung beiträgt. (LeBleu and Neilson, 2019)

Während der Consensus lange darin bestand, dass Fibroblasten eine homogene Gruppe darstellen, konnte dies in den letzten Jahren widerlegt werden. Neben unterschiedlichen Gruppen von Fibroblasten gibt es außerdem so genannte „fibroblast-like cells“, welche sich wie Fibroblasten verhalten, jedoch einen anderen Entwicklungsweg aufweisen. Zu dieser Subpopulation gehören auch Synoviale Fibroblasten, welche im englischen Sprachraum als „fibroblast-like synoviocytes“ bezeichnet werden.

Synoviale Fibroblasten, welche einen großen Prozentsatz des Stromas im Gelenk ausmachen, bekleiden eine wichtige Rolle im Erhalt der Entzündung, da sie den anti-apoptischen B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF) sowie Entzündungsmediatoren wie IL-6 und IL-8 ausschütten und über Oberflächenrezeptoren T-Zellen aktivieren können. (Lowin et al., 2020a; Tsaltzkan and Firestein, 2022)

In aktuellen Studien konnten vor allem zwei Subsets von Fibroblasten identifiziert werden, welche Relevanz in der Pathogenese der RA zeigten: $FAP\alpha^+$ $THY1^+$ und $FAP\alpha^+$ $THY1^-$ Fibroblasten. $THY1$ bezeichnet ein Glycophosphatidylinositol-gebundenes Oberflächenprotein über welches sich Fibroblasten in funktionell unterschiedliche Populationen aufteilen lassen (Koumas et al., 2001), $FAP\alpha$ steht für „fibroblast activation protein α “. (Croft et al., 2019)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

FAP α ⁺ THY1⁺ Fibroblasten finden sich in den tieferen Schichten der Synovia und führen, wenn aktiviert, typischerweise zu einer verstärkten und anhaltenden Entzündungsreaktion ohne signifikante destruktive Effekte. FAP α ⁺ THY1⁻ Fibroblasten hingegen kommen in der Deckzellschicht am Übergang von Synovia und Knorpel vor und präsentieren einen gegenteiligen Effekt mit ausgeprägter Destruktion von Knorpel- und Knochengewebe ohne signifikanter Entzündung. (Croft et al., 2019)

1.6 Phytocannabinoide

THC ist das wohl bekannteste unter den über 100 natürlich in Cannabis sativa vorkommenden Cannabinoiden und gehört auch zu den am besten untersuchten. Hauptsächlich bindet THC an die Cannabinoidrezeptoren, CB₁ und CB₂, jedoch nur als partieller Agonist. Außerdem können auch bestimmte TRP-Kanäle, wie TRPA1, durch THC aktiviert werden. (Lowin et al., 2020b). TRP-Kanäle sind insbesondere in der Nozizeption und der Wahrnehmung externer Stimuli involviert, (Levine and Alessandri-Haber, 2007; Muller et al., 2019; Nilius and Flockerzi, 2014) jedoch konnten aktuelle Studien die Relevanz von TRP-Kanälen im Immunsystem unterstreichen. Beinahe alle Arten von Zellen des Immunsystems prägen Untergruppen dieser Kanäle auf der Zellmembran aus. (Yan et al., 2024) Sowohl Stimuli wie Temperaturveränderungen oder bestimmte Substanzen, die je nach Kanal variieren, können diese direkt aktivieren, des Weiteren gibt es jedoch auch indirekte Pfade der Stimulation: Über Aktivierung von G-Protein- oder Tyrosinkinase-gekoppelten Rezeptoren an der Zellmembran durch unterschiedliche Mediatoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C und/oder der Phospholipase A2 und dadurch zur Freisetzung diverser Metabolite der Arachidonsäure, von denen einige, wie 12-(S)-HPETE, als Agonisten an zB TRPV1 wirken. Des Weiteren können Proteasen, welche beispielsweise nach Zerstörung von Nervenzellen oder bei Entzündungen frei werden, verschiedene TRP-Kanäle aktivieren. (Levine and Alessandri-Haber, 2007) Nach Aktivierung der TRP-Kanäle kommt es zu einem lokalisierten Einstrom von Kationen wie Kalzium, was zur Generation diverser Impulse, welche je nach Zellart sowie Lokalisation des Kanals variieren, führt. (Ong et al., 2014)

Ein weiteres Cannabinoid, welches an TRP- und in geringerem Maße auch an CB-Rezeptoren bindet, ist CBD. Während TRPA1, TRPV1 und TRPV2 durch CBD aktiviert und daraufhin desensibilisiert werden, hemmt diese Cannabinoid den TRPM8-Kanal. Dies führt zu einer Inhibierung der Weiterleitung von entzündungsbedingten und chronischen Schmerzreizen in

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

der Peripherie und auf spinalem Level. (De Petrocellis et al., 2011, p. 2)

Auch auf den Kalzium-Haushalt der Zelle kann CBD Einfluss nehmen: Durch direkte Interaktion mit Zielstrukturen innerhalb der Zelle wurde eine Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase nach Zugabe von CBD beobachtet. (De Petrocellis et al., 2011) In älteren Studien wurde gezeigt, dass CBD unerwünschte Arzneimittelwirkungen von THC wie Sedierung und psychotrope Effekte reduziert (Russo and Guy, 2006), neuere Studien konnten diesen Zusammenhang jedoch nicht bestätigen. Weder die kognitiven Einschränkungen oder psychotischen Symptome, noch die als positiv wahrgenommenen Wirkungen von THC wurden durch die in handelsüblichem oder medizinischem Cannabis vorhandenen Konzentrationen von CBD beeinflusst. (Arkell et al., 2019; Englund et al., 2023; Haney et al., 2016)

Eine Beobachtung, welche in diversen Studien gemacht werden konnte, ist, dass Cannabinoide und weitere, teilweise unbekannte Substanzen in biologischen Extrakten aus Cannabis sativa Stämmen synergistische Effekte haben und ein besseres Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil aufweisen als reine Cannabinoid-Präparationen. (De Petrocellis et al., 2011; Russo and Guy, 2006)

1.7 Exkurs in das Endocannabinoidsystem

Während sich diese Arbeit vor allem mit exogenen Cannabinoiden und deren Wirkung auf den Körper beschäftigt, basieren diese Wirkungen doch auf einem bereits existierenden System, dem Endocannabinoidsystem. Als neuromodulatorisches System finden sich Anteile des Endocannabinoidsystems sowohl im Gehirn als auch in der Peripherie. (Rezende et al., 2023) Es besteht aus endogenen Liganden (den Endocannabinoiden), Enzymen zur Produktion derselben sowie ihrer Inaktivierung, sowie diverser Rezeptoren und Kanäle zur Weiterleitung der Signale. (Micale and Drago, 2018)

Neben neuronalen Effekten wurde in diversen Studien eine relevante Rolle des Endocannabinoidsystems in der Regulation des Immunsystems nachgewiesen. (Rodríguez Mesa et al., 2021)

Neben den bereits besprochenen Rezeptoren des Endocannabinoidsystems existieren notwendigerweise auch diverse Liganden. Die wichtigsten Liganden sind Anandamid (AEA, N-arachidonyl-ethanolamin) und 2-AG (2-Arachidonylglycerol). (Micale and Drago, 2018) Weitere Liganden, auf die hier kein Fokus gelegt werden soll, sind beispielsweise 2-AG-Ether, O-Arachidonoyl-Ethanolamin und N-Arachidonoyl-Dopamin. (PACHER et al., 2006)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Anandamid gehört zu den N-Acetylethanolaminen, der Ausgangsstoff in der Synthese ist N-Acyl-Phosphatidylethanolamin (NAPE) (Tsuboi et al., 2013) und wird im ZNS vor allem durch die Fettsäure-Amid-Hydrolase (FAAH) abgebaut. (Rezende et al., 2023) Für 2-AG existieren bisher vor allem 3 bekannte Synthesepfade. (Murataeva et al., 2014) Das wichtigste Enzym der Synthese ist die Diacylglycerol Lipase (DAGL). (Lu and Mackie, 2016) Der Abbau von 2-AG geschieht hauptsächlich durch die Monoacylglycerol Lipase (MAGL) und die Alpha-Beta-Hydrolasen der Domänen 6 und 12 (ABH6 und 12). (Lu and Mackie, 2016; Micale and Drago, 2018) Nach Hydrolyse durch MAGL oder eine ABH wird Arachidonsäure und Glycerol freigesetzt, was 2-AG zur wichtigsten Ressource für den zellulären Pool der Arachidonsäure macht. (Lu and Mackie, 2016; Rezende et al., 2023) Intrazellulär binden 2-AG und AEA an Fettsäure-Bindungsproteine (engl.: fatty acid-binding proteins, FABPs), um ihren jeweiligen Abbaumechanismen, vor allem FAAH, zugeführt zu werden. THC und CBD können ebenfalls, mit größerer Affinität, an FABPs binden und verdrängen Endocannabinoiden aus der Bindung, was zu höheren Konzentrationen an Endocannabinoiden und einem reduzierten Endocannabinoid-Metabolismus führt. (Elmes et al., 2015)

Im Vergleich zu den beschriebenen Endocannabinoiden zeigt THC diverse Unterschiede: Während THC am affinsten mit CB₁ und CB₂ interagiert, (Rezende et al., 2023) ist die Wirkstärke von 2-AG an diesen Rezeptoren größer. TRP-Kanäle werden nur von hohen Konzentrationen von Anandamid und 2-AG aktiviert. (Lu and Mackie, 2016; McPartland et al., 2017; Pertwee, 2007)

THC hat ein großes Verteilungsvolumen und ist lipophil, weshalb sich der Wirkstoff bei rezidivierender Exposition im Fettgewebe anreichern und bei Abbau oder Umverteilung des Fettgewebes wieder in den Blutstrom gelangen und nachgewiesen werden kann. (Lucas et al., 2018) Des Weiteren führt diese Eigenschaft dazu, dass THC die Plazentaschranke überwinden kann und nach Konsum in der Muttermilch nachweisbar ist. (Lucas et al., 2018; M. Perez-Reyes and M. E. Wall, 1982) Der Abbau von THC findet hauptsächlich in der Leber über Cytochrom P450 Isozyme wie beispielsweise CYP 3A4 statt. Als Zwischenprodukt entstehen 11-Hydroxy-THC und 11-Carboxy-THC, welche nach Glucuronidierung über Stuhl und Harn ausgeschieden werden. (Eichler et al., 2012; Gaston and Friedman, 2017; Lucas et al., 2018; Schwoppe et al., 2011) Einzelne Metabolite, wie 11-Hydroxy-THC, zeigten in Studien eine psychoaktive Wirkung. (Lemberger et al., 1972; Lucas et al., 2018) Oral wird THC nur schlecht aufgenommen und durch den first-pass-Effekt wird die Plasmakonzentration erneut deutlich gesenkt, wodurch die Bioverfügbarkeit von oralem THC bei etwa $6 \pm 3\%$ liegt. (Grotenhermen, 2003) Während im Rahmen des First-Pass-Effekts ein Teil des THCs in ebenfalls psychoaktives

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

11-OH-THC umgewandelt wird, welches affin an CB₁ bindet und stärker wirksam als THC ist, ist aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit oral aufgenommenen THC die Wirkung dennoch geringer als nach Inhalation derselben Menge THC. (Chayasirisobhon, 2020)

1.8 Relevante Rezeptoren im THC-Stoffwechsel des Menschen

THC bindet sowohl an klassische G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie CB₁ und CB₂ als auch an Ionenkanäle aus der TRPA-, TRPV und TRPM-Familie und andere Rezeptoren wie GPR18. (Console-Bram et al., 2014; Lu and Mackie, 2016, p. 2; Muller et al., 2019) In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass synoviale Fibroblasten sowohl über Cannabinoid-Rezeptoren (Richardson et al., 2008) als auch verschiedene TRP-Kanäle (Kochukov et al., 2006), verfügen.

1.8.1 Cannabinoid-Rezeptoren

Cannabinoid-Rezeptoren (CB), sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche über die Reduktion von cAMP und Aktivierung von MAP-Kinasen ihr Signal erzeugen. (Al-Zoubi et al., 2019; Atwood and Mackie, 2010) Es gibt zwei bekannte Endocannabinoid-Rezeptoren, CB₁ und CB₂, mit unterschiedlichen Verteilungsmustern innerhalb des menschlichen Körpers. (Galiègue et al., 1995; Howlett and Abood, 2017; Stella, 2010; Tsou et al., 1998)

CB₁ ist der häufigste G-Protein-gekoppelte Rezeptor im menschlichen Gehirn, wird aber auch in Zellen des Immunsystems exprimiert. (Galiègue et al., 1995; Lu and Mackie, 2016) An Neuronen reduziert die Aktivierung von CB₁ die Empfindung von Schmerz durch Hemmung der neuronalen Aktivierung und führt zu Euphorie und Lethargie, während in der Peripherie ein proinflammatorischer Effekt erzielt wird. Somit kann potenziell durch eine periphere CB₁-Antagonisierung ein antiinflammatorischer Effekt erzielt werden. (Lowin et al., 2019; Nowell et al., 2022; Palazzo et al., 2012)

CB₂ hingegen findet sich vor allem in der Peripherie und ist der vorherrschende CB-Rezeptor im Immunsystem. Dort reduziert CB₂ die Zytokin-Produktion und Immunzellmigration und vermittelt so antiinflammatorische Effekte. (Galiègue et al., 1995; Lowin et al., 2019; Lu and Mackie, 2016; Richardson et al., 2008; Schurman et al., 2020)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

1.8.2 Transient-Receptor-Potential-Kanäle

Die Transient-Receptor-Potential-Kanäle (TRP-Kanäle) fungieren im Körper als Rezeptoren für sensorische Stimuli, wie Temperaturwahrnehmung, Schmerz und Juckreiz, aber auch zur Detektion von pathologischen Prozessen, beispielsweise im Rahmen einiger Krebserkrankungen, durch den Einstrom von Kationen nach Aktivierung, wie Natrium und Kalzium. (Kochukov et al., 2006; Muller et al., 2019) In einer Studie von Mikhail et al. in 2005 konnte eine Abhängigkeit des freien zytosolischen Kalziumspiegels von der Aktivierung von TRPV1, TRPV4 und TRPA1 im entzündlichen Milieu nachgewiesen werden. (Kochukov et al., 2006) Die Funktion von TRP-Kanälen als Sensoren für Schmerz ist im Kontext der RA besonders relevant: Durch Entzündung kommt es zu einer Hyperästhesie auf verschiedene Stimuli, weshalb TRP-Kanäle einen interessanten Therapieansatz bei Schmerzsyndromen darstellen. (Levine and Alessandri-Haber, 2007)

Bisher wurden 6 unterschiedliche Iontrope TRP-Kanäle identifiziert, auf welche Cannabinoide aktivierend wirken, darunter vier Kanäle aus der Vanilloid-Unterfamilie, TRPV1, TRPV2, TRPV3 und TRPV4, ein Kanal der Ankyrin-Familie, der Wasabi-Rezeptor TRPA1, sowie ein Kanal der Melastatin-Unterfamilie, TRPM8.

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC), auf welchem der Fokus dieser Arbeit liegt, bindet mit größter Affinität an TRPV2, sowie etwas weniger affin an TRPA1 sowie TRPM8, jedoch der bisherigen Studienlage nach nicht an den Capsaicin-Rezeptor TRPV1, welcher eher durch Cannabidiol (CBD) aktiviert wird. (Muller et al., 2019) Des Weiteren werden TRPV3 und TRPV4 zwar von Derivaten von THC aktiviert, nicht jedoch von THC oder CBD selbst (De Petrocellis et al., 2012; Muller et al., 2019) TRPV4 wird des Weiteren von endogenen Cannabinoiden aktiviert. (Watanabe et al., 2003)

TRPA1, der Wasabi-Rezeptor, findet sich häufig als Heteromer mit TRPV1 (Fischer et al., 2014) und reagiert auf Substanzen aus der Gruppe der Isothiocyanate, welche unter anderem in Senf, Wasabi und Knoblauch vorkommen, was ihm seinen Namen verschafft. (Muller et al., 2019) Während TRPA1 vor allem auf sensorischen Nervenzellen vorkommt, konnte dieser Kanal auch auf menschlichen synovialen Fibroblasten nachgewiesen werden. (Lowin et al., 2015) TRPA1 wird bei längerfristiger Präsenz von TNF α vermehrt intrazellulär exprimiert, insbesondere in synovialen Fibroblasten in der Deckzellschicht welche im Gelenk in räumlicher Nähe zu Makrophagen liegen. (Lowin et al., 2018)

TRPV2 kommt bevorzugt auf mittleren und dicken sensorischen Neuronen vor und wird physiologisch durch Hitze und Entzündungsprozesse aktiviert. Da TRPV2 eine wichtige Rolle

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

bei chronischen Schmerz- und Entzündungsprozessen spielt, ist die Desensibilisierung dieses Kanals ein idealer Ansatzpunkt für in Therapie der RA. (Muller et al., 2019) TRPV2 wird von den bisher getesteten Cannabinoiden am potentesten von THC und CBD aktiviert, die subsequente Desensibilisierung ist jedoch bei anderen Cannabinoiden wie Cannabidiol-Säure stärker ausgeprägt. (De Petrocellis et al., 2011, pp. 6, 7)

TRPM8 gehört zur Familie der Melastatin-TRP-Kanäle. Im Gegensatz zu den anderen hier erwähnten TRP-Kanälen wirken Cannabinoide, am potentesten CBD, antagonistisch auf diesen Rezeptor, welcher vor allem in primär afferenten Neuronen exprimiert wird und dessen physiologischer Stimulus der Kältereiz ist. (De Petrocellis et al., 2011; Muller et al., 2019)

Alle Cannabinoid-sensitiven TRP-Kanäle reagieren auf Temperaturen, wenn auch in unterschiedlichen Temperaturspektren, sowie spielen eine Rolle in der Nozizeption und teilweise auch in entzündlichen Prozessen. (Muller et al., 2019)

1.9 Vorteile der Nutzung von Cannabinoiden

Während die Risiken und potentiellen Nebenwirkungen einer Cannabinoid-Therapie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nicht zu vernachlässigen sind, führen die durchaus relevanten Vorteile einer Therapie mit Cannabinoiden zu einer zunehmenden Anzahl von Verschreibungen. (Cremer-Schaeffer et al., 2024)

Die folgenden Kapitel sollen nun den potentiellen Nutzen von Cannabinoiden in der Therapie der RA in den Fokus rücken.

1.9.1 Nutzung von Cannabinoiden als antiinflammatorische Medikamente

In Studien konnte bei mehreren Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1 (DMT1) oder MS sowie RA ein positiver Effekt einer Cannabinoidtherapie nachgewiesen werden, indem THC und CBD die Ausschüttung diverser Zytokine wie IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α und INF- γ sowie die Aktivität von Zellen des Immunsystems wie Th-1 und Th-17 reduzieren konnte. (Rodríguez Mesa et al., 2021) Des Weiteren wurde eine Verbesserung des Verlaufs von CoViD-19 durch Cannabinoide, insbesondere CBD, diskutiert. (Biali et al., 2020; Pérez et al., 2022)

Aktuelle Ansätze der Forschung deuten darauf hin, dass THC über die Inhibition der Synthese von Prostaglandin E2 in das Immunsystem eingreift und dadurch antiinflammatorische Effekte ausprägt. (Emmanuel S. Onavi et al., 2002, chap. 14; Rodríguez Mesa et al., 2021) Jedoch ist

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

dieser Effekt nicht in allen Geweben gleich, und stark von den Untersuchungsbedingungen abhängig, was sich auf zwei Hauptmechanismen zurückführen lässt: Während THC, beziehungsweise Metabolite von THC die Eicosanoidsynthese, und somit auch die Prostaglandinsynthese reduziert, werden außerdem Phospholipasen aktiviert, welche Phospholipid-gebundene Arachidonsäure freisetzen und somit zu einer Steigerung der Prostaglandinsynthese führt. (Emmanuel S. Onavi et al., 2002, chap. 14; Green and Kim, 1976)

Neben THC greift ein weiteres Cannabinoid in das Immunsystem ein: CBD gehört zu den Cannabinoiden mit der stärksten immunmodulatorischen Wirkung. (Rodríguez Mesa et al., 2021) Unter anderem inhibiert CBD FAAH und steigert über diesen Effekt die Konzentration von Anandamid, weshalb ein Teil der immunmodulatorischen Wirkungen von CBD möglicherweise über diesen Weg zum Tragen kommt. (Nichols and Kaplan, 2020)

In der Therapie der Multiplen Sklerose (MS) werden Cannabinoide bereits eingesetzt: Das Medikament Sativex (Nabiximol), welches die Wirkstoffe THC und CBD in nahezu gleichem Verhältnis enthält, wurde in Deutschland bereits im Jahr 2011 zugelassen, in den USA folgte die Zulassung 10 Jahre später in 2021. (Rodríguez Mesa et al., 2021; "Sativex® 27 mg/25 mg Spray zur Anwendung in der Mundhöhle," 2023) Während Sativex aufgrund seiner Wirkung auf die Spastik sowie Schmerzen, welche bei einer Vielzahl von Patienten mit Multipler Sklerose zu einer signifikanten Einschränkung der Lebensqualität führt, zugelassen wurde, (Bilbao and Spanagel, 2022; Onaivi, 2010) konnte nachgewiesen werden, dass CBD im Mausmodell die entzündliche Aktivität im Gehirn durch eine Reduktion der Level proinflammatorischer Zytokine sowie die Infiltration durch CD-4⁺ T-Zellen senken kann. (Hind et al., 2016; Nichols and Kaplan, 2020; Rodríguez Mesa et al., 2021) Dieser Mechanismus könnte ein Grund sein, weshalb im Mausmodell der multiplen Sklerose die Entwicklung der Erkrankung durch Cannabinoide verzögert oder sogar verhindert werden konnte. (Baker et al., 1990) THC hingegen führt in niedrigen Dosen zu einer Steigerung der motorischen Aktivität und in höheren Dosen zu einer Senkung bis hin zur Katalapsie sowie Muskelrelaxation, was sich die Cannabinoid-Therapie der MS bei der Spastizität zu Nutze macht. (Emmanuel S. Onavi et al., 2002, chap. 7)

Die Aktivierung von CB₁ und CB₂ Rezeptors führt zu neuroprotektiven Effekten durch Verbesserung des Überlebens von Neuronen, beispielsweise durch Regulation der Glutamat-Homöostase an Oligodendrozyten, Astrozyten und weiteren Zelllinien. (Fernández-Ruiz et al., 2015; Manera and Bertini, 2021)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Für eine weitere Autoimmunerkrankung, den Diabetes mellitus Typ I zeigten Cannabinoide ebenfalls eine Reduktion der entzündlichen Aktivität in den frühen Stadien der Erkrankung. Des Weiteren fand sich eine antioxidative und antihyperglykämische Wirkung von THC, welche ebenfalls den Fortschritt der Erkrankung zügelte und die Gefäßwände wie auch die kardiale Muskulatur schützt. (Rodríguez Mesa et al., 2021) Einen Zusammenhang zwischen CB₁ und der kardialen Funktion konnte auch eine Studie aus 2014 an Personen mit Herzinsuffizienz zeigen: In Patienten mit Herzinsuffizienz zeigte sich eine reduzierte Anzahl an CB₁ und TRPV1 Rezeptoren an Herzmuskelzellen. Nach 4-monatigem standardisiertem Training zeigte sich eine signifikante Steigerung der CB₁- und TRPV1-Expression an Herzmuskelzellen sowie eine Verbesserung des muskulären Metabo- und Mechanoreflexes, was die Relevanz von CB₁ in der gesunden Herzmuskelfunktion unterstützt. (Antunes-Correa et al., 2014)

Aufgrund der aktuellen CoViD-19 Epidemie, welche durch Dysregulation des Immunsystems im seltenen Fällen zu einem Zytokinsturm führen kann (Hu et al., 2021) wurden Cannabinoide auch in diesem Kontext erforscht. Während der Konsum von Cannabinoiden im Tiermodell nachweisbar die Viruslast in Herpes-Simplex infizierten Tieren sowie die Progredienz der hepatalen Fibrose bei mit Hepatitis C infizierten Mäusen verstärkt, gibt es Hinweise auf eine Verbesserung der Prognose von CoViD-19 durch Applikation von CBD aufgrund der Hemmung der Zytokinausschüttung, was bei manchen Patienten die Ausprägung eines Zytokinsturms verringern oder gar verhindern kann. (Biali et al., 2020; Pérez et al., 2022) Andererseits können die unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) von Cannabinoiden auch die empfundene Krankheitslast durch Verstärkung von Erschöpfung und Verwirrung verstärken. (Biali et al., 2020)

1.9.2 Nutzung von Cannabinoiden für psychiatrische Komorbiditäten der RA

Wie bereits mehrere Studien zeigten, führt die Aktivierung von CB₁ Rezeptoren im Gehirn über eine reduzierte Ausschüttung von Neurotransmittern wie GABA und Glutamat zu antidepressiven und anxiolytischen Effekten. (Hasbi et al., 2023; Hill and Gorzalka, 2005; Joshi and Onaivi, 2021) Ein ähnlicher Effekt kann dosisabhängig über eine Aktivierung dieses Rezeptors durch THC und in hohen Dosen über andere Mechanismen auch durch CBD erzielt werden, wie unter anderem El-Alfy et al. im Mausmodell nachweisen konnten. (El-Alfy et al., 2010) RA

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Jedoch zeigen weitere Studien eine zusätzliche Dimension: Während geringere Dosen diverse Cannabinoide anxiolytisch und antidepressiv wirkten, führen höhere Dosen verschiedener Cannabinoide sowohl pflanzlichen als auch synthetischen Ursprungs zu anxiogenen und depressiven Effekten. (El-Alfy et al., 2010; Hasbi et al., 2023; Moreira et al., 2008) Des Weiteren kommt es bei rascher oder hochdosierter Aufnahme von THC zu einem biphasischen Verlauf, in welchem initial Psychosen und Panik auftreten, während nach partiellem Abbau von THC die anxiolytischen Effekte zu Tage treten. (Hasbi et al., 2023; Micale et al., 2013)

Während eine Störung des Endocannabinoidsystems und somit eine mögliche positive Beeinflussung durch eine Therapie mit Cannabinoiden bei einer Reihe weiterer psychischer Erkrankungen, wie der Alzheimer-Demenz, vermutet wird, gibt es auch bei diversen physischen Erkrankungen nachgewiesene unterstützende Effekte einer Cannabinoidtherapie: Im Management zweier Syndrome, welche pädiatrische Epilepsien auslösen, wird CBD zur Reduktion der Häufigkeit von Krampfanfällen eingesetzt. (Devinsky et al., 2017; Thiele et al., 2018) Außerdem kommen Präparationen mit THC zur Therapie von Chemotherapie-induzierter Übelkeit und Appetitlosigkeit sowie zur Therapie des HIV-AIDS-assoziierten Wasting-Syndroms zum Einsatz. (Joshi and Onaivi, 2021) Für weitere Erkrankungen könnten die antiinflammatorischen, neuromodulatorischen und neuroprotektiven Effekte der Antagonisierung oder Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren von explizitem Interesse sein und sind daher Gegenstand der aktuellen Forschung. (Joshi and Onaivi, 2021; Lowin et al., 2019)

1.10 Risiken der Nutzung von Cannabinoiden

Aufgrund der Tatsache, dass CB₁ Rezeptoren die am häufigsten exprimierten G-Proteingekoppelten Rezeptoren im zentralen Nervensystem sind und des Weiteren auch TRP-Kanäle sowie möglicherweise ebenfalls CB₂ Rezeptoren (Joshi and Onaivi, 2021) im ZNS ausgebildet werden, besteht das Risiko zentralnervöser Nebenwirkungen einer Therapie mit Cannabinoiden. Am wohl bekanntesten ist das Risiko der Ausprägung einer schizophrenen Störung nach Cannabinoid-Genuss. (Joshi and Onaivi, 2021; Lu and Mackie, 2016)

Nicht nur die Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren birgt Risiken. Während, wie oben beschrieben, durch die Aktivierung von CB₁ viele wünschenswerte Effekte erzielt werden können, führt eine inverse Aktivierung dieses Rezeptors zu einem relevanten Problem: Rimonabant, ein inverser Agonist am CB₁ Rezeptor, wurde 2006 zur Behandlung von morbidem Übergewicht in Europa zugelassen, da die Blockade von CB₁ zu einer reduzierten

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Aufnahme von kohlehydrat- und fettreicher Nahrung führt. („BfArM - Risikoinformationen - Rote-Hand-Brief zu Acomplia®: Europäische Arzneimittelagentur hält Ruhen der Zulassung für erforderlich,“ n.d.; Leite et al., 2009) Zu den UAW des Präparats gehören jedoch auch eine höhere Inzidenz von Depressionen und Angststörungen, da durch die invers-agonistische Wirkung nicht nur eine Aktivierung des Rezeptors verhindert, sondern selbst das basale Signal blockiert wird. (Kenakin, 1987; Leite et al., 2009) Im 2-jährigen Intervall nach Markteinführung des Medikaments, welches unter dem Namen Acomplia® als „Anti-Bierbauch-Tablette“ vermarktet wurde, kam es unter Patienten, die dieses Präparat erhielten, zu einer Zunahme von Depressionen und Suiziden, weshalb im Jahr 2008 die Zulassung widerrufen wurde. („BfArM - Risikoinformationen - Rote-Hand-Brief zu Acomplia®: Europäische Arzneimittelagentur hält Ruhen der Zulassung für erforderlich,“ n.d.; Leite et al., 2009)

Ein weiteres Risiko zeigt sich in der möglichen Atemdepression durch synthetische Cannabinoide. (Alon and Saint-Fleur, 2017) Während Cannabinoide schon vor Jahrzehnten aufgrund ihrer schmerzlindernden Eigenschaften als Co-Therapeutikum mit Opioiden verabreicht wurden, da so die Menge der verabreichten Opioiden reduziert werden kann, gibt es in den letzten Jahren durch unregulierte Einnahme synthetischer Cannabinoide vermehrt Fälle von durch Cannabinoide ausgelöster Atemdepression. (Alon and Saint-Fleur, 2017; Noori et al., 2021) Bisher konnten CB₁ und CB₂ weder in der Pons noch in der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Joshi and Onaivi, 2021), weshalb ein atemdepressiver Effekt über diese Rezeptoren unwahrscheinlich ist. Jedoch kommt es in den letzten Jahren zu einer zunehmenden Anzahl von Fällen von Atemdepression nach Cannabinoid-Abusus. Diese Fälle haben einen wichtigen Punkt gemeinsam: alle traten nach dem Genuss synthetischer Cannabinoide auf. (Alon and Saint-Fleur, 2017) Während Cannabinoide phytologischen Ursprungs üblicherweise die Atemfrequenz erhöhen (Emmanuel S. Onaivi et al., 2002, p. 235), kommt es bei einer Intoxikation mit synthetischen Cannabinoiden gehäuft zu einer respiratorischen Insuffizienz. (Alon and Saint-Fleur, 2017) In diesen Fällen wurden die synthetischen Cannabinoide über nicht regulierte Wege erstanden und enthielten eine unbekannte und äußerst variable Zusammensetzung aus den fünf bekannten Gruppen der synthetischen Cannabinoide, welche abhängig von der Substanz agonistisch, partiell agonistisch oder invers agonistisch an Cannabinoidrezeptoren wirken können. Daher ist eine genaue Zuordnung der beobachteten Effekte zu den auslösenden Substanzen in diesen Fällen kaum bis gar nicht möglich. (Alon and Saint-Fleur, 2017)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Eine gestörte Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren kann zu einer weiten Bandbreite von neuropsychiatrischen Problemen führen, wie ein gehäuftes Auftreten von Angststörungen, Depressionen, Psychosen, Insomnie oder Suchterkrankungen. (Joshi and Onaivi, 2021; Surraev et al., 2020)

Des Weiteren kann eine übermäßige Stimulation dieser Rezeptoren, besonders in der Jugend, ebenso zu unerwünschten Wirkungen wie Gedächtnisproblemen oder eingeschränkter Aufmerksamkeit und Lernfähigkeit, mit durch bildgebende Untersuchungen nachweisbarer Reduktion der grauen Substanz des Gehirns ohne Minderung des Gesamtvolumens des Gehirns (Emmanuel S. Onavi et al., 2002), sowie in Personen mit entsprechender Prädisposition zur Ausprägung komplexerer psychiatrischer Störungen wie Schizophrenie führen. (Roser, 2019) Des weiteren kann THC die Symptomlast in Patienten mit bereits diagnostizierter Schizophrenie verschlechtern. (Ahmed et al., 2021)

Auch auf das Immunsystem hat eine Cannabinoidtherapie nicht nur wünschenswerte Effekte. Eine prospektive Studie zum Einfluss von Cannabinoiden auf die Progredienz einer hepatalen Zirrhose nach Infektion mit Hepatitis C aus dem Jahr 2005 ergab, dass täglicher Cannabis-Genuss zu einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit einer raschen Progredienz des Zirrhosestadiums führt. (Hézode et al., 2005) Außerdem fand sich in Mausstudien eine Steigerung der Viruslast und die Mortalität in mit Herpes simplex infizierten Mäusen. (Mishkin and Cabral, 1985) Eine in-vitro-Studie fand ebenfalls eine gesteigerte extrazelluläre Viruslast nach Infektion von Vero-Zellen mit Herpes simplex Typ 2 unter Zugabe von THC. (Cabral et al., 1987) Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass Cannabinoide die Reaktion des Immunsystems auf virale Infekte hemmen können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Hauptsitz
Inkubator	CB 170	BINDER GmbH	Tuttlingen, DE

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Microplate Reader	iMark	Bio Rad	Hercules, California, USA
Mikroskop	Axio Vert. A1	Zeiss	Göttingen, DE
Sterilbank	LaminAir®HB 2472	Heraeus instruments	Hanau, DE
Sterilbank	HS 18	Kendro/Heraeus instruments	Hanau, DE
Tecan Reader	Infinite M200 Pro	Tecan	Grödig, AU
Zellzähler	Bio Rad TC20™	Bio Rad	Hercules, California, USA
Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich GmbH & Co KG	Tuttlingen, DE
Mini-Zentrifuge	NG002B	Nippon Genetics	Düren, DE
Vortexmixer	Vornado	Benchmark	Edison, USA
Kühlschrank	GPS-Series	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Tiefkühlschrank	LGPv 6520 Index 41C/001	Liebherr	Kirchdorf an der Iller, DE
Elektrische Stripette	Su1700	SunLab	Mannheim, DE
Finnpipette	HH36764 4540	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Multistepper Pipette	Finntips Multistepper 50- 1500µl	VWR	Darmstadt, DE
Aspirator	N2400-90000	StarLab	Hamburg, DE
Aspirator	FTA-1	Grand Bio	Cambridgeshire, UK

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Schwefelsäure 1 mol/l (2 N) in wässriger Lösung, AVS TITRINORM volumetrische Lösung	VWR Merck Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Bicarbonat-Puffer C6	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
Sucrose	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
DMSO D2650	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
Ethanol 437433T	VWR, Darmstadt, DE
Pluronic F127	Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA, # P6866

2.1.3 Medien und Supplemente

Tabelle 3: Medien und Supplemente

Medium/Supplement	Hersteller
RPMI 1640 Medium	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
HEPES Solution	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
Fetal Bovine Serum	Gibco® Paisley, UK
Penicillin/Streptomycin	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's PBS (1x)	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
PBS (10x), 70011-051	Gibco® Paisley, UK
Trypsin/EDTA	Gibco® Paisley, UK
EGF (Epithelial growth factor), E9644	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
FGF (fibroblast growth factor), 100-18C	PeptoTech (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA
HBSS	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA
Glutamax 35050-038	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Natriumpyruvat S8636	SIGMA ALDRICH Life Science

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

	St. Louis, Missouri, USA
Cal-520, ab171868	Abcam, Cambridge, UK
Caseinpuffer, ab171532	Abcam, Cambridge, UK
Heat inactivated FBS 10500-064	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween 20 (Polysorbat-20)	SIGMA ALDRICH Life Science St. Louis, Missouri, USA

2.1.4 ELISA-Kits

Tabelle 4: ELISA-Kits

Kit	Hersteller
BD ELISA-Kit IL-6	BD, San José
BD ELISA-Kit IL-8	BD, San José
ELISA-Kit MMP-3	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.5 Reagenzien

Tabelle 5: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
TRPA1-Antagonist (A967079), Produktnummer 15207	Tocris/Biotechne, Wiesbaden, DE
BAPTA-AM	
COR170	Tocris/Biotechne, Wiesbaden, DE
Cyclosporin A	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Decynium 22	Sigma Aldrich, Taufkirchen, DE
Dronabinol	THC-Pharm, Frankfurt, DE
Celltiter Blue G8081	Promega, Walldorf, DE
PoPo3-Iodid, P3584	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rimonabant	Tocris/Biotechne, Wiesbaden, DE
Ruthenium Red	Tocris/Biotechne, Wiesbaden, DE
TNF- α Recombinant Human	PeptoTech (Thermo Fisher Scientific), Waltham, Massachusetts, USA

2.1.6 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Zellkulturmedien

Tabelle 6: Zusammensetzung von Puffern und Medien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Anzuchtmedium 10% FCS	500 ml RPMI 1640 Medium 50 ml FCS (\approx 10%) 12,5 ml Heps-Puffer 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml GlutaMAX 5 ml Natriumpyruvat 5 μ l EGF (Endkonzentration \approx 1ng/ml) 5 μ l FGF (Endkonzentration \approx 1ng/ml)
Erhaltungsmedium 2% FCS	500 ml RPMI 1640 Medium 10 ml FCS (\approx 2%) 12,5 ml Heps-Puffer 5 ml Penicillin/Streptomycin 5 ml GlutaMAX 5 ml Natriumpyruvat 5 μ l EGF (Endkonzentration \approx 1ng/ml) 5 μ l FGF (Endkonzentration \approx 1ng/ml)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Waschpuffer (ELISA)	PBS Tween 20
Carbonat-Bicarbonat-Puffer	1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat-Puffer (Sigma) 100ml deionisiertes Wasser
Blockpuffer	Casein Phosphate Buffered Saline (PBS) Casein ELISA Reagent ab171532 1:5 deionisiertes Wasser
PoPo3-Stammlösung	PoPo3 1:500 HBSS oder PBS

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Nicht näher beschriebene Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Greiner (Röhrchen mit Schraubverschluss, Zellkulturschalen, 96-Well-Platten), Brand, StarLab (TipOne Pipettenspitzen und Filterpipettenspitzen), BioRad (Zählkammern für Cellcounter, Nitrozellulosetücher), Corning Costar (Stripetten, 96-Well-Platten, Centrifuge Tubes), Bode (Bacillol, Bacillol-Wipes), VWR Merck (Pipettenspitzen, Disposable Pipetting Reservoirs, Adhesive Film for Microplates), Fresenius Kabi (Ampuwa), Thermo Fisher Scientific (96-Well-Platten), NIPPON Genetics (8er-Streifen PCR-Gefäße), Witeg (Parafilm), Wepa (Reinigungstücher), Sartorius (Pipettenspitzen), Ansell (Nitrilhandschuhe), Hangzhou TianCheng Pharmaceutical CO (Masken) und Eppendorf (Pipettenspitzen, Safe-Lock-Tubes).

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten

Die synovialen Fibroblasten stammen von PatientInnen und Patienten, welche seit mehreren Jahren an RA litten und sich im Rahmen der Erkrankung einer Kniegelenkersatz-Operation unterzogen. Die PatientInnen und Patienten wurden anhand der überarbeiteten Kriterien des American College of Rheumatology ausgewählt und schriftlich über den Eingriff sowie die Verwendung des exzidierten Gewebes in der Forschung aufgeklärt. Nach Einwilligung und

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Durchführung der Operation durch Dr. Tim Claßen aus der Klinik für Orthopädie und orthopädische Rheumatologie im St. Elisabeth Hospital Meerbusch Lank stellte uns dieser freundlicherweise die Gewebeproben zur Verfügung. Die Genehmigung durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf fand im Vorhinein statt und liegt unter der Studiennummer 2018-87-KfogU auf. Es wurden Proben von insgesamt 8 Personen verwendet.

2.2.2 Zellkultivierung

Nach Extraktion und Reinigung der Gewebeproben wurden die Zellen in einer Mischung aus RPMI1640 Medium, 10% fetalem Kälberserum (*engl.: fetal calf serum*, FCS), 2,5% HEPES-Puffer, 1% Glutamax, 1% Natriumpyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin zur Reduktion der Gefahr einer Verunreinigung der Zellkulturen, 0,005ng epitheliale Wachstumsfaktor (*engl.: epithelial growth factor*, EGF) und 0,005ng Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*engl.: fibroblast growth factor*, FGF) unter normoxischen Bedingungen und 37°C kultiviert.

Zur Passagierung wurden die Zellen mittels einfacher Trypsin-EDTA-Lösung vom Plattenboden getrennt, der Erfolg der Trennung wurde mittels Durchlichtmikroskopie verifiziert. Nach Resuspension wurde die Zelldichte mittels CellCounter bestimmt und die RASF mit einer Dichte von 5.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Zwischen 48h und 72h nach Aussaat wurde wiederholt die Dichte bis zu einer etwa 80%igen Flächendeckung kontrolliert. Nach Erreichen dieser Dichte wurde das 10%ige Medium durch ein 2%iges Medium ersetzt und die entsprechenden Stimulationsreihen gestartet.

Die Versuche fanden zwischen der 5. und 11. Passage der Zellen statt.

Für den ELISA-Essay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurden von jedem Patienten Zellen auf 2 96-Well-Platten ausgesät. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurde das 10%ige Medium in der ersten Platte gegen ein 2%iges Medium unter Zugabe von 10ng/ml TNF-Lösung pro Well und in der zweiten Platte gegen ein 2%iges Medium ohne Zugabe von TNF ausgetauscht und beide Platten für 72 Stunden bei 37°C und Normoxie inkubiert.

Nach Abschluss dieser Inkubationsphase wurde das Medium beider Platten gegen die Stimulationslösungen aus 2%igem Medium mit A967079 oder Rimonabant und THC in den Konzentrationen 0,1µM, 1µM, 5µM, 10µM und 25µM ersetzt, wobei eine Vorinkubation von 30 Minuten ohne THC stattfand. Die bis dahin TNF-freie Platte wurde 5 Stunden nach Auftragen der Stimulationslösungen mit einer TNF-Lösung versehen, welche in den Wells zu einer Konzentration von 10ng/ml führte. Die Platten wurden mit den Stimulationslösungen für

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

16h inkubiert, danach nach rascher Zentrifugation der Platten für etwa 5 Sekunden zur Sedimentation der Zellen die Stimulationslösungen abpipettiert und die Platten mit einer Celltiter-Blue-Lösung nach Gebrauchsanweisung inkubiert. Die Metabolisierung der Celltiter-Blue-Lösung wurde mittels Tecan Reader bestimmt. Die Stimulationslösungen wurden bei -20°C eingefroren oder direkt unter Verwendung von Kits von BD (Interleukine) und R&D (Matrix-Metallo-Proteinase) auf ihren Gehalt an drei, in der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis relevanten, Zytokinen (IL-6, IL-8 und MMP-3) untersucht.

2.2.3 ELISA

ELISA steht für Enzyme-linked Immunosorbent Assay und bezeichnet eine sensitive Form der Bestimmung der Konzentration von Biomolekülen in einer Lösung. Ursprünglich wurde der Elisa als Radioimmunoassay 1973 eingeführt und wurde seitdem beständig weiterentwickelt. (Hoffman, 1973)

In dieser Arbeit wurde eine Unterform des ELISAs namens Sandwich-ELISA verwendet. Hierbei wird eine Oberfläche, üblicherweise Plastik, mit einem Capture-Antikörper beschichtet, welcher im nächsten Schritt das Zielmolekül bindet. Nach Abbinden der offenen Capture-Antikörper-Stellen mit einem Molekül, das nicht an den Detektionsantikörper bindet, wird der Detektions-Antikörper zugegeben, welcher an ein Enzym gekoppelt ist und an die Capture-Antikörper-gebundenen Zielmoleküle bindet. Im letzten Schritt wird ein Substrat zugegeben, welches durch das Enzym gespalten wird. Dieses Substrat ist üblicherweise ein Farbstoff, der seine Farbe durch die Spaltung verändert. Durch Messung der Farbveränderung ist es möglich, die Konzentration des gebundenen Zielmoleküls zu bestimmen. Dies ermöglicht sowohl eine qualitative, als auch eine quantitative Auswertung der Konzentration des Zielmoleküls in einer Lösung. (Tabatabaei and Ahmed, 2022) Zwischen den einzelnen Schritten finden zusätzlich Inkubations- und Waschvorgänge statt, deren Art und Anzahl je nach durchgeführtem Assay variieren kann.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

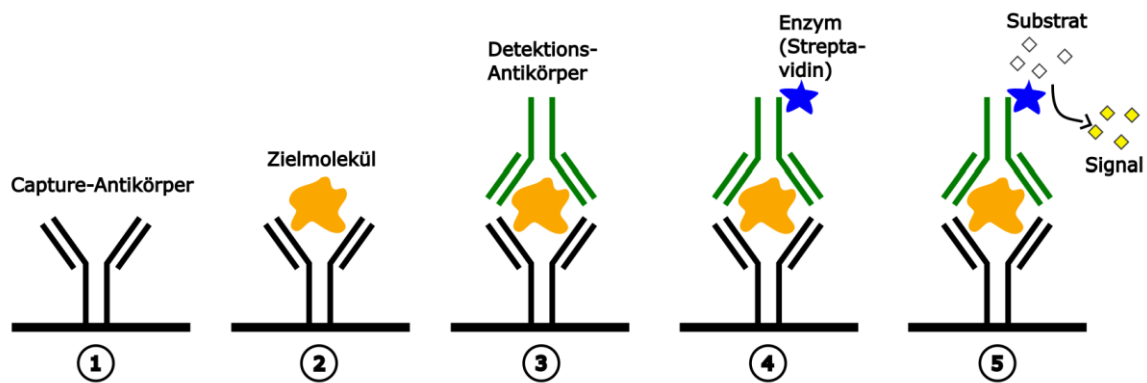


Abbildung 1: Schema eines Sandwich-ELISA

(1) Die Platte wird mit einem Capture-Antikörper beschichtet. (2) Durch Zugabe der zu untersuchenden Lösung bindet das Antigen (Zielmolekül). (3) Der Detektionsantikörper bindet an das Zielmolekül. Dies gibt dem Assay den Namen „Sandwich“-ELISA. (4) Ein Enzym koppelt an den Detektionsantikörper. (5) Das Substrat wird durch das Enzym gespalten und ändert seine Farbe.

Die Auswertung eines ELISAs erfolgt durch photometrische Messung des Substratumsatzes. Durch Vergleich mit einer Standardkurve, welche mittels einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen gewonnen wird, kann die Konzentration des Zielmoleküls ermittelt werden.

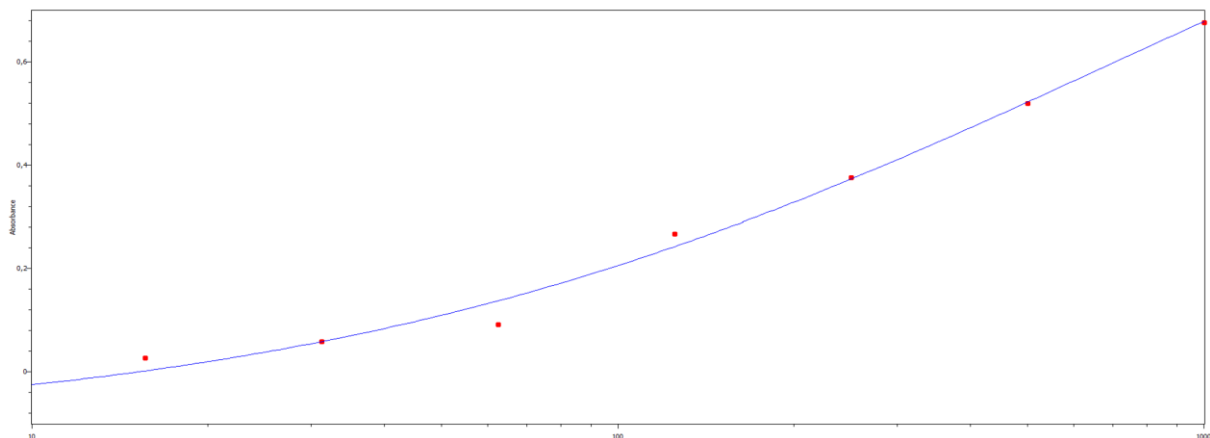


Abbildung 2: Beispiel einer Standardkurve eines IL-6 ELISA

2.2.3.1 IL-6-, IL-8- und MMP-3-ELISA (kommerziell)

Die Bestimmung der Konzentrationen von IL-6, IL-8 und MMP-3 in den Überständen fand unter Verwendung des Human IL-6 ELISA Kits und des Human IL-8 ELISA Kits von BD sowie des Human Total MMP-3 DuoSet ELISA Kits von R&D Systems nach Herstellerangaben statt, die Auswertung erfolgte über den Microplate-Reader.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

2.2.4 Kalzium-Assay

Für den Kalzium-Assay wurden von jedem Patienten 3 Platten angelegt. Nach Erreichen der angestrebten Konfluenz wurde das 10%ige Medium durch 2%iges Medium ersetzt und 2 von 3 Platten für 72h mit TNF in einer Konzentration von 10ng/ml bei 37°C unter Normoxie inkubiert.

Hiernach fand eine Inkubation mit einer photosensitiven Kalzium-Lösung aus PBS mit 0,02% Pluronic und 4 µM des Kalzium-Farbstoffs Cal-520 für 60 Minuten bei 37°C und für 30 Minuten bei Raumtemperatur statt.

Diese Lösung wurde anschließend nach einmaligem Waschen mit PBS für 30 Minuten durch die PoPo3-Stammlösung (s. Zusammensetzungsverzeichnis), zwei Platten mit einer HBSS-haltigen Stammlösung, eine Platte mit einer PBS-haltigen Stammlösung, unter Zusatz der Antagonisten (s. Kalzium-Assay Stimulationsschema) ersetzt. Mit Ausnahme von Ruthenium Rot wurden alle Antagonisten vor der Zugabe zur PoPo3-Stammlösung mit DMSO verdünnt; Ruthenium Rot wurde in H₂O gelöst geliefert und vor der Zugabe mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Von den beiden mit TNF prästimulierten Platten wurde eine mit einer HBSS-haltigen PoPo3-Stammlösung, die andere mit einer PBS-haltigen Stammlösung behandelt, da PBS im Gegensatz zu HBSS kein Kalzium enthält, und somit der Unterschied zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Kalziumverbrauch dargestellt werden kann.

Im Plattenlesegerät wurden zuerst 4 Messungen zur Bestimmung der Baseline durchgeführt und anschließend die THC-haltigen Stimulationslösungen aus 2%igem Medium und THC hinzugefügt, wodurch in den Wells jeweils eine Konzentration von 25 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0,1 µM THC erreicht, wobei eine Kontrolle ohne THC belassen wurde. Die ersten 4 Messungen dienten hierbei zur Messung der intrazellulären Kalzium- und PoPo3-Konzentration vor Zugabe von THC. Die Messungen fanden über einen Zeitraum von 90 Minuten statt.

2.2.5 Berechnungen und statistische Auswertung

Für die Datenanalysen wurden Microsoft Excel sowie SPSS Version 29 (IBM) verwendet,

In Excel erfolgte die Berechnung der gemessenen Werte im Vergleich zu den Kontrollwerten, wobei die Ergebnisse als Prozentsatz der Kontrollwerte dargestellt wurden.

In SPSS wurden Ausreißer mittels Boxplots identifiziert, wobei Werte als Ausreißer definiert wurden, die mehr als drei Standardabweichungen vom Zentrum der Verteilung abwichen. Diese

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Ausreißer wurden anschließend aus den Datensätzen entfernt. Die verbleibenden Daten wurden in Form von Balkendiagrammen visualisiert, in denen zusätzlich Fehlerbalken zur Darstellung des Standardfehlers integriert wurden.

Die p-Werte wurden von SPSS berechnet und anschließend mithilfe des Vektor-Zeichenprogramms Inkscape in die Balkendiagramme übertragen.

Die Auswertung der Kalzium-Assay-Daten erfolgte in Analogie zur Berechnung der Ergebnisse des ELISA-Assays bis zur Identifizierung und Eliminierung von Ausreißern. Der Schritt der prozentualen Berechnung wurde ausgelassen, da dieser bereits automatisch durch das Messgerät durchgeführt wurde. Zur Auswertung wurden 3 Varianten herangezogen: In der ersten wurden die ersten 4 Messungen, bevor THC hinzugefügt wurde, gemittelt und als Referenzwert für die Folgemessungen herangezogen. In der zweiten Variante wurden für alle Zeitpunkte die Werte der Kontrolle – namentlich der THC-freien Kurve – als Referenzwert verwendet. Zu guter Letzt wurden auch die Rohdaten mit der absoluten Änderung der gemessenen Konzentrationswerte verglichen.

Bei der statistischen Auswertung der Daten wurde Unterstützung von dem Statistiker Georg Neunteufel eingeholt.

Die Visualisierung der Ergebnisse in Multiple-Line-Graphen sowie die Berechnung der p-Werte des Kalzium-Assays erfolgte in SPSS und wurden anschließend mithilfe des Vektor-Zeichenprogramms Inkscape zusammengeführt.

2.2.6 Verwendung künstlicher Intelligenz

In dieser Doktorarbeit wurden Künstliche-Intelligenz-Technologien (KI) zur Unterstützung bei der wissenschaftlicheren Formulierung von Absätzen, der Vereinfachung von Satzstrukturen und der Unterstützung bei der Wortfindung eingesetzt.

Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die endgültige Verantwortung für die inhaltliche Richtigkeit, die kritische Reflexion und die Interpretation der Ergebnisse bei der Autorin dieser Arbeit liegt.

Die KI diene lediglich als Werkzeug und nicht als Ersatz für das kritische und analytische Denken der Forschenden. (“KI Disclaimer Vorlage und Muster | 1a-Studi,” n.d.)

Verwendet wurden die Gemini 3 Flash Variante sowie Chat-GPT von Open AI Version 4 Stand 2025.

3 Ergebnisse

3.1 Zellüberleben von RASF unter dem Einfluss von THC

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zeigte sich im CTB - Assay frühzeitig ein deutlicher Trend: Bei einer Konzentration von 25 μM THC kam es zu einem vermehrten Zellsterben der synovialen Fibroblasten. Nach Stimulation mit einem proinflammatorischen Zytokin wurde jedoch bei Konzentrationen von 5 μM und 10 μM THC eine signifikante Zunahme des Zellüberlebens beobachtet, sowohl in der Kontrolle als auch unter Zusatz von Rimonabant und A967.

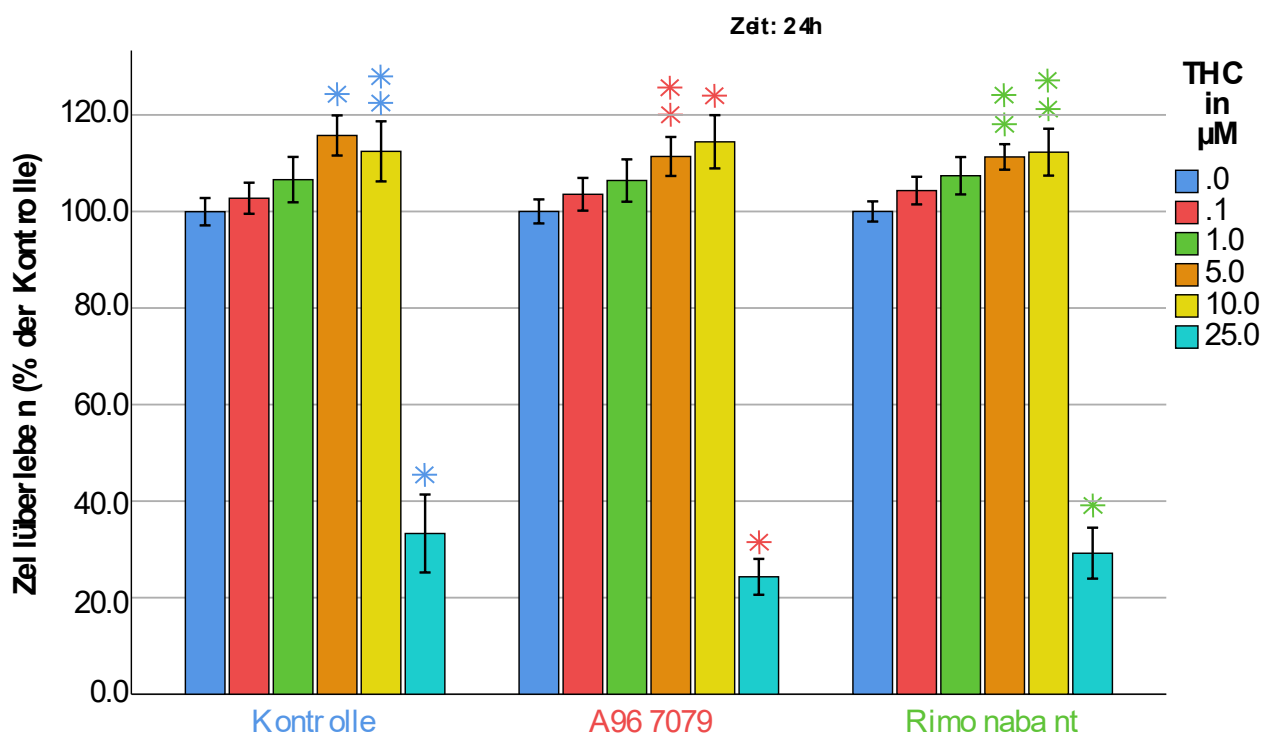


Abbildung 3: Prozentuelles Zellüberleben nach Stimulation mit THC für 24h und TNF α -Exposition nach THC-Exposition

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation in 2%igem Medium ohne TNF α , wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in 1 μM (Rimonabant) und 10 μM (A967079) vorstimuliert, woraufhin THC zugesetzt wurde. Nach 5 Stunden Inkubation wurde TNF α (10ng/ml) hinzugefügt und die Platten für weitere 24h inkubiert. In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an, 2 Sterne einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,05$; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

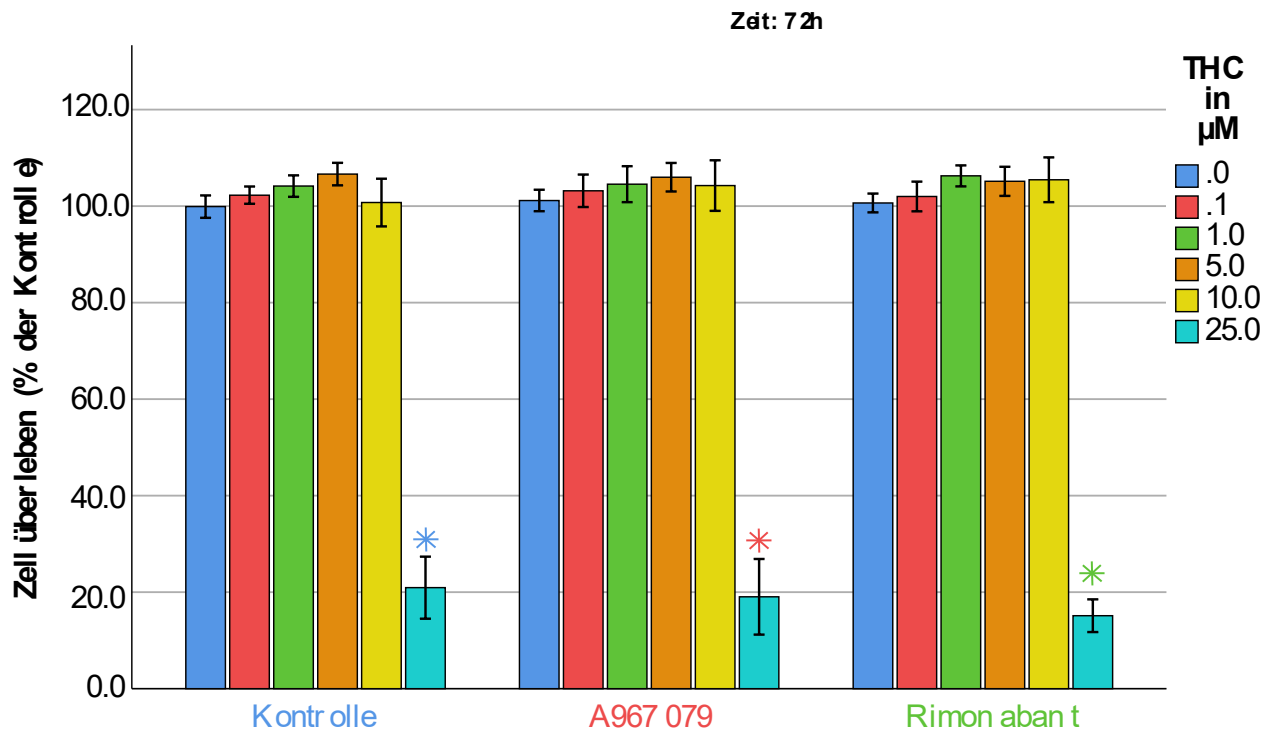


Abbildung 4: Prozentuelles Zellüberleben nach Inkubation mit TNF α für 72h und weiteren 24h mit THC

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF α (10ng/ml), wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in 1 μ M (Rimonabant) und 10 μ M (A967079) vorstimuliert, woraufhin für 24h THC zugesetzt wurde.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Dieser Steigerung des Überlebens war in Zellen, die bereits vor der THC-Exposition mit TNF behandelt wurden nicht mehr signifikant. In allen Versuchen führte eine THC-Konzentration von 25 μ M zum Absterben der synovialen Fibroblasten. (Siehe Abb. 3) Jedoch kam es bei Zugabe eines pro-inflammatorischen Zytokins nach THC-Exposition zu einem Abfall auf 20-40% der Kontrolle, bei Vorinkubation mit TNF α hingegen zu einem Abfall auf 15-22% der Kontrolle.

3.2 Produktion von IL-6, IL-8 und MMP-3 durch RASF unter Einfluss von THC

Zur Evaluation des Einflusses von THC auf die Zytokinproduktion von RASF wurden ELISA-Assays auf zwei wichtige Zytokine, IL-6 und IL-8, und eine Matrix-Metallo-Proteinase, MMP-3, durchgeführt.

Bei allen gemessenen Substanzen fand sich im ELISA-Assay nur bei 25 μ M ein signifikanter

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Abfall, was sich jedoch auch durch das reduzierte Zellüberleben erklären lässt. (Siehe Abb. 3 bis 9)

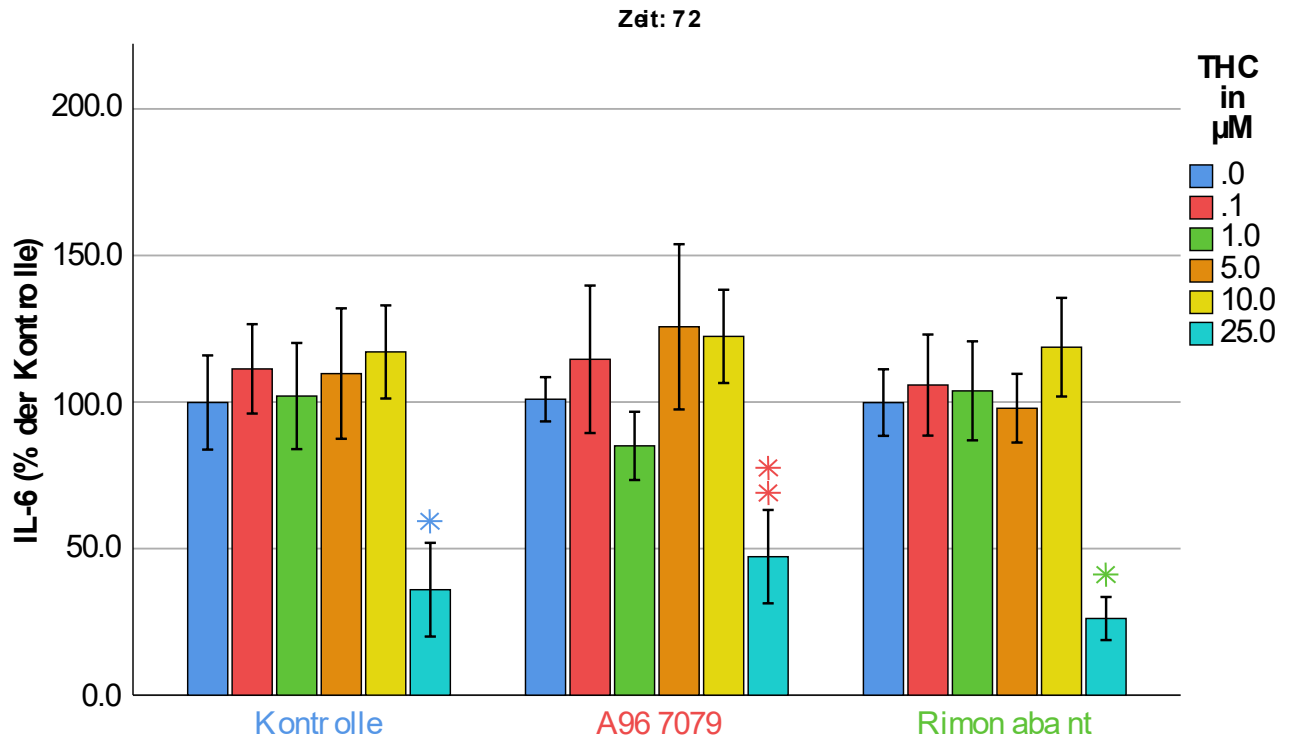


Abbildung 5: Einfluss von THC auf die IL-6 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF α (10ng/ml), wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in 1 μ M (Rimonabant) und 10 μ M (A967079) vorstimuliert, woraufhin für 24h THC zugesetzt wurde.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an, zwei Sterne einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,05$; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Bei einer Vorstimulation mit TNF zeigte die Gruppe mit Rimonabant und 25 μ M THC die stärkste Abnahme der IL-8-Konzentration (siehe Abb. 6). Wurde TNF hingegen erst nach der THC-Applikation zugegeben, war die Abnahme der IL-8-Konzentration in der mit A967 und 25 μ M THC behandelten Gruppe am stärksten. (siehe Abb. 7)

Eine Wiederholung des Versuchsaufbaus mit einer größeren Anzahl an Probanden und Zellreihen könnte eine Signifikanz der restlichen Zusammenhänge evaluieren.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

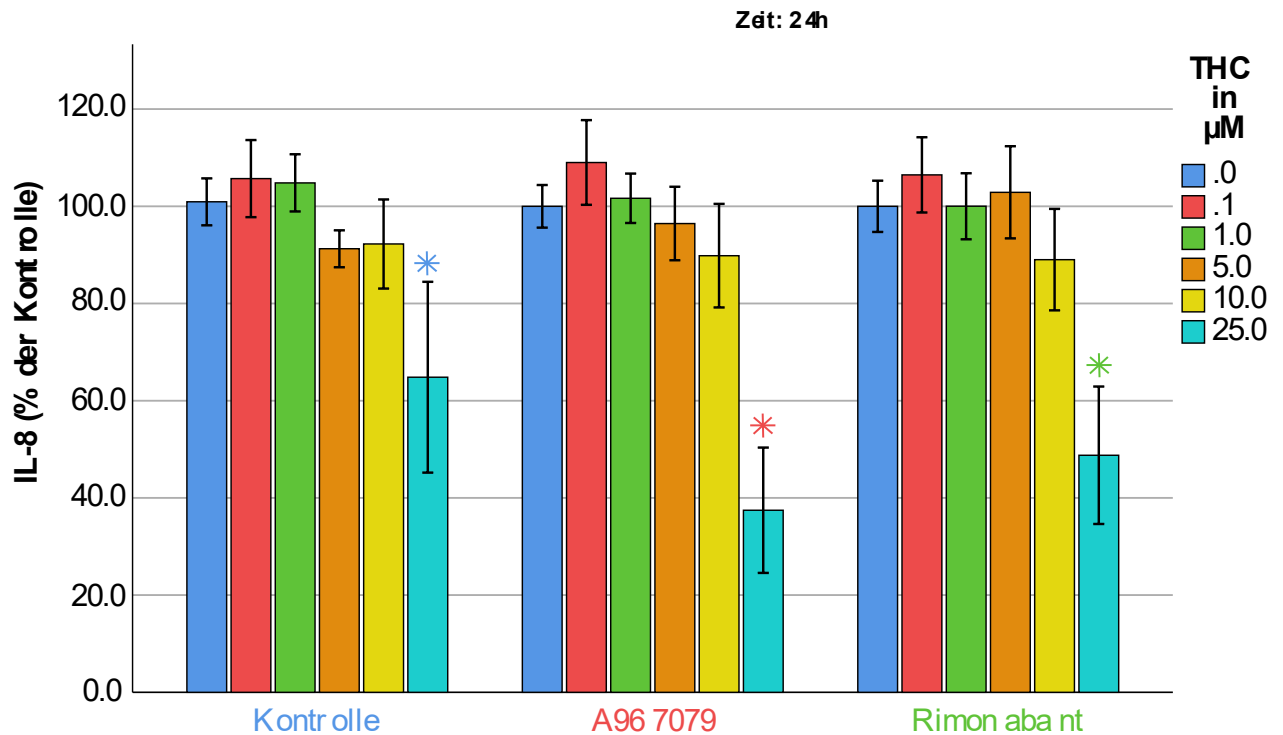


Abbildung 6: Einfluss von THC auf die IL-8 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 24h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation in 2%igem Medium ohne TNF α , wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in 1 μ M (Rimonabant) und 10 μ M (A967079) vorstimuliert, woraufhin THC zugesetzt wurde. Nach 5 Stunden Inkubation wurde TNF α (10ng/ml) hinzugefügt und die Platten für weitere 24h inkubiert. In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet. Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet. Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

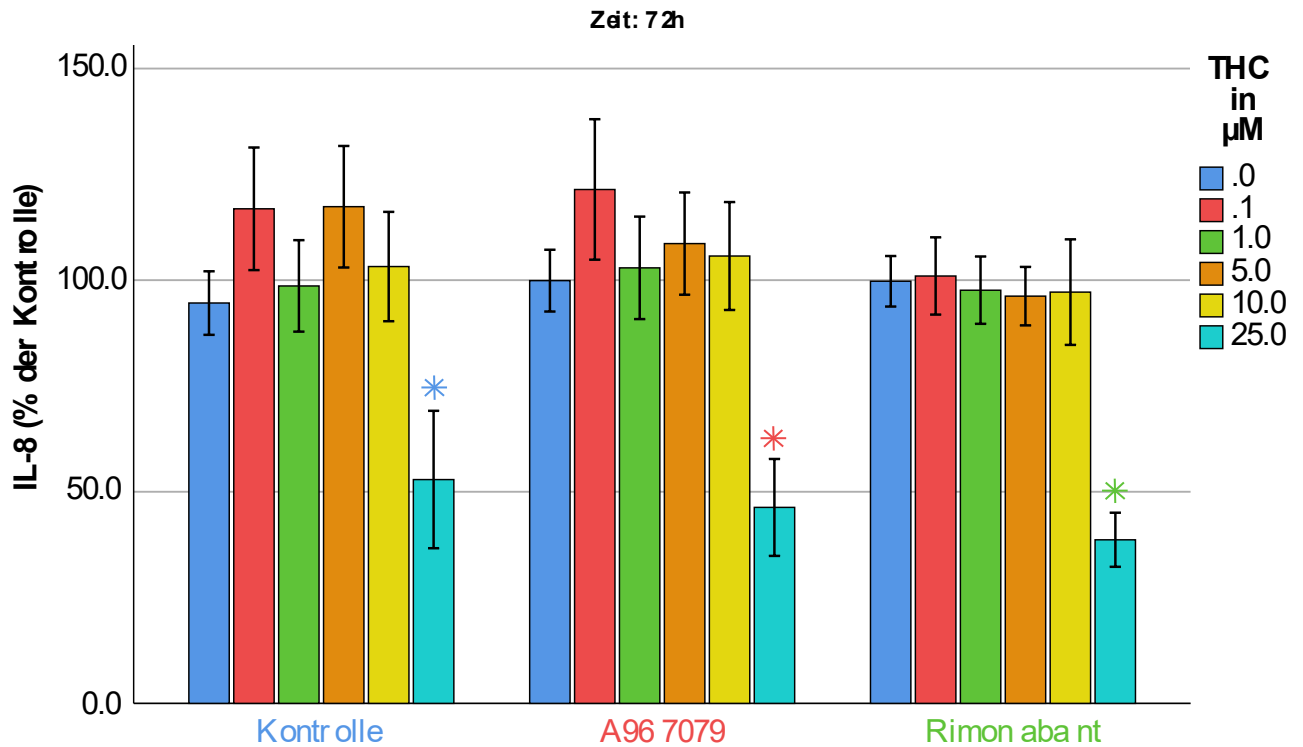


Abbildung 7: Einfluss von THC auf die IL-8 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit TNF α (10ng/ml), wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in 1 μ M (Rimonabant) und 10 μ M (A967079) vorstimuliert, woraufhin für 24h THC zugesetzt wurde.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Die Analyse der MMP-3-Konzentrationen zeigte ein mit den übrigen untersuchten Zytokinen vergleichbares Muster. In allen mit 25 μ M THC behandelten Gruppen wurde eine signifikante Abnahme der MMP-3-Konzentration beobachtet. Die niedrigsten MMP-3-Konzentrationen traten bei Zugabe von TNF nach der THC-Applikation in der mit A967 und 25 μ M THC behandelten Gruppe sowie bei Vorstimulation mit TNF in der Gruppe mit Rimonabant und 25 μ M THC auf.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

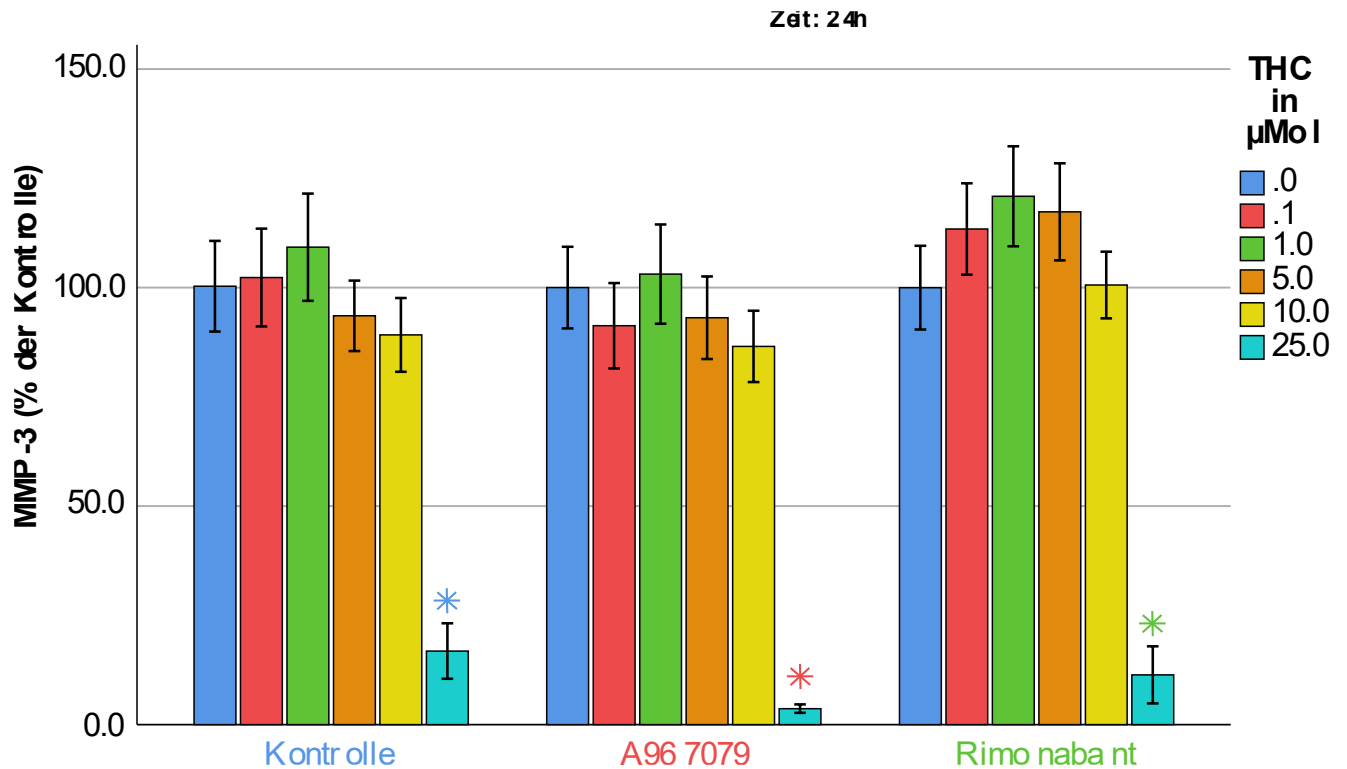


Abbildung 8: Einfluss von THC auf die MMP-3 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 24h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation in 2%igem Medium ohne $\text{TNF}\alpha$, wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in $1\mu\text{M}$ (Rimonabant) und $10\mu\text{M}$ (A967079) vorstimuliert, woraufhin THC zugesetzt wurde. Nach 5 Stunden Inkubation wurde $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) hinzugefügt und die Platten für weitere 24h inkubiert. In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet. Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet. Ein Stern gibt einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,001$ an, 2 Sterne einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,05$; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

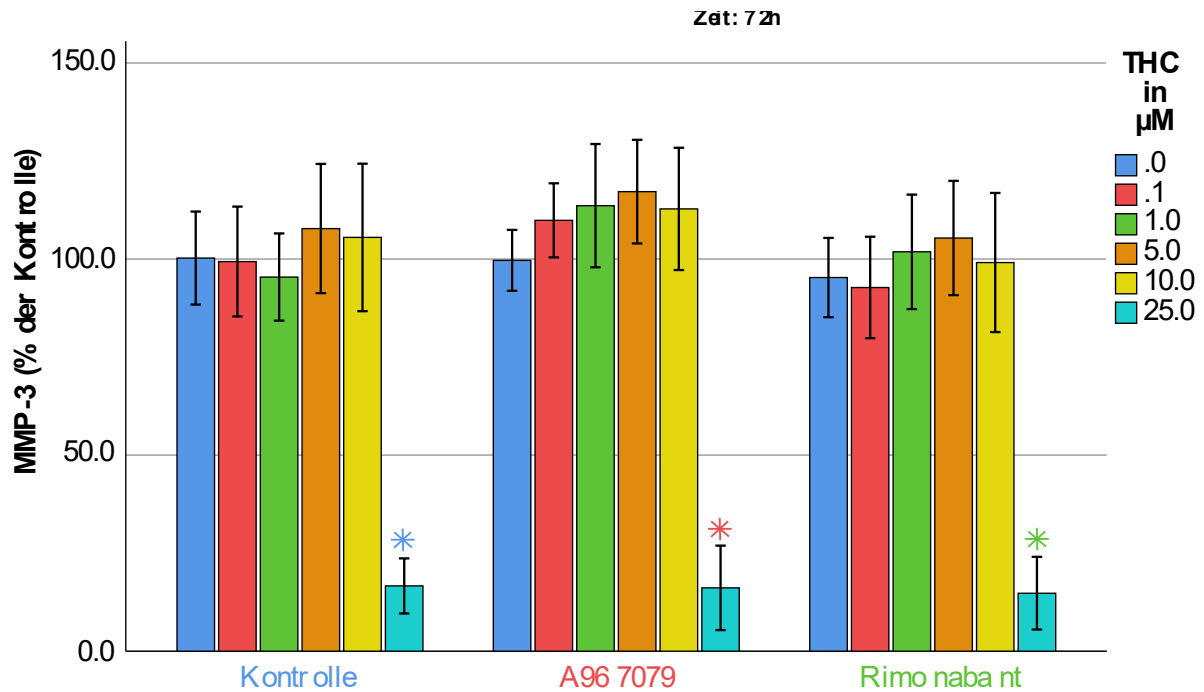


Abbildung 9: Einfluss von THC auf die MMP-3 Produktion von RASF unter TNF-Stimulation für 72h in Prozent der Kontrolle (ohne THC)

RASF erhielten für 72h eine Vorstimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml), wurden gewaschen und für 30 Minuten mit den Antagonisten in $1\mu\text{M}$ (Rimonabant) und $10\mu\text{M}$ (A967079) vorstimuliert, woraufhin für 24h THC zugesetzt wurde.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 7-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz zur Kontrolle wurde mittels ANOVA mit dem Bonferroni post-hoc Test berechnet.

Zwei Sterne geben einen signifikanten Zusammenhang mit $p < 0,05$; die Fehlerbalken zeigen 2 Standardabweichungen an.

3.3 Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration von RASF unter dem Einfluss von THC

Nachdem die Aktivierung von TRP-Kanälen oder $\text{CB}_{1/2}$ Rezeptoren zu einer Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen führen kann (Chainani et al., 2020), wurde die Kalziummobilisation nach THC Zugabe untersucht. THC moduliert vornehmlich über die Aktivierung von TRPA1 die intrazelluläre Kalziumkonzentration (Lowin et al., 2022), weshalb Antagonisten mit unterschiedlichen Zielstrukturen, zB Agonisten und Antagonisten von unterschiedlichen TRP-Kanälen, Agonisten und Antagonisten von $\text{CB}_{1/2}$, etc., verwendet wurden, um die Modulation der Kalziumaufnahme unter THC weiter zu untersuchen. Des Weiteren fanden dieselben Versuchsreihen mit einer PoPo3 -haltigen Lösung statt. PoPo3 fungiert in diesem Aufbau als Surrogatmarker für die Wirkstoffaufnahme bei gleichzeitiger THC-Präsenz.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Während nach Vorstimulation der Zellen mit TNF 72h vor Messung die intrazellulären Kalziumlevel durch eine Zugabe von THC (Vergleich der Absolutwerte, 1-25 μM , $p < 0,001$) signifikant anstiegen, kam es ohne vorangegangene Stimulation mit TNF zu keiner relevanten Steigerung. (siehe beispielhaft Abb. 10-12)

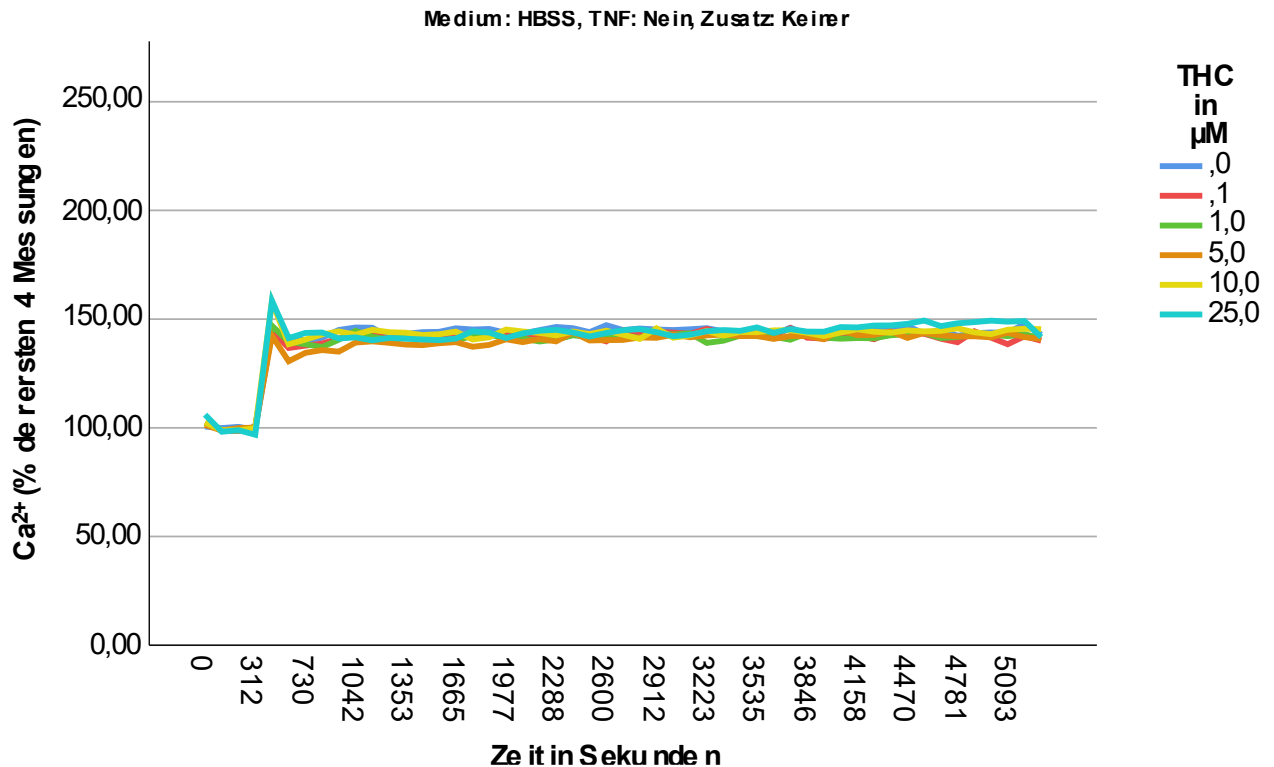


Abbildung 10: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden ohne TNF-Vorstimulation inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen. In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 10-11 Patienten verwendet. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

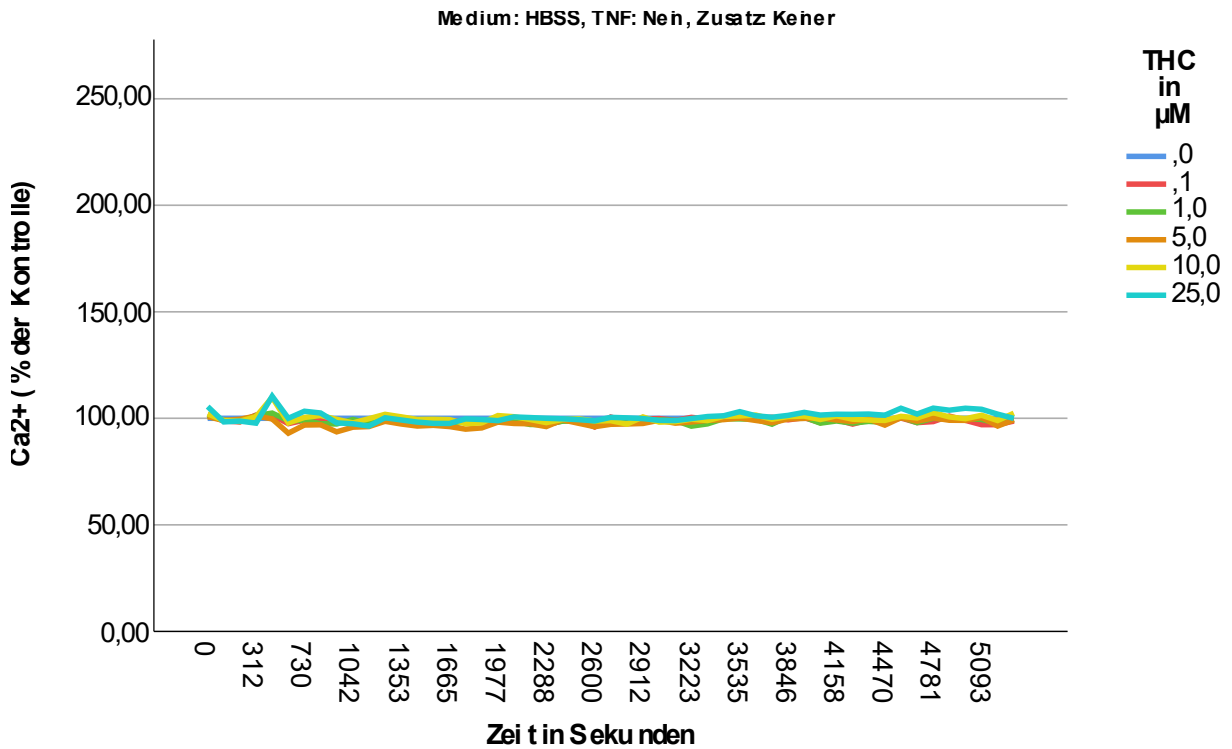


Abbildung 11: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die Kontrolle (kein THC)

RASF wurden ohne TNF-Vorstimulation inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen. In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 10-11 Patienten verwendet. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt.

Die Zugabe von BAPTA führte auch in nicht entzündlich veränderten RASF zu einem statistisch signifikanten ($p < 0,001$) Abfall der intrazellulären Kalziumkonzentration, insbesondere bei einer THC-Konzentration von 5, 10 und 25 μM. (Siehe Abb. 12)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

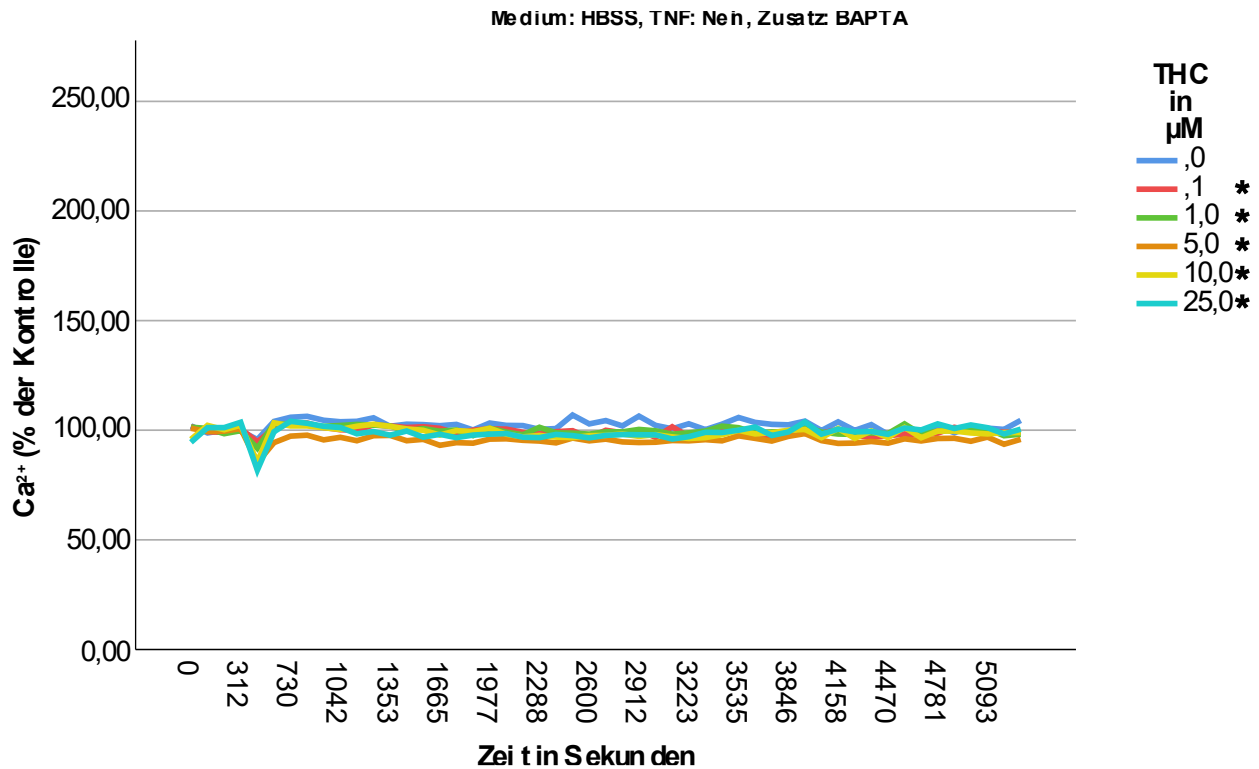


Abbildung 12: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, mit Zusatz von BAPTA, bezogen auf die Kontrolle (kein THC)

RASF wurden ohne TNF-Vorstimulation inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen. BAPTA: Kalzium-Chelator.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 10-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$

Die Applikation von TNF zur Induktion eines proinflammatorischen Milieus führte in allen untersuchten Zelllinien zu einem signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration im Vergleich zur THC-freien Kontrollgruppe. Dieser Effekt war insbesondere bei Konzentrationen von 5 μM , 10 μM und 25 μM THC zu beobachten (vgl. exemplarisch Abb. 13). In Abwesenheit weiterer Wirkstoffe verzeichnete die 25 μM THC-Gruppe einen maximalen Anstieg auf ca. 210 % des Kontrollwerts. Die Konzentrationen von 5 μM und 10 μM THC wiesen analoge Verläufe mit Maxima von 145 % beziehungsweise 170 % auf. Während 1 μM THC einen moderaten, stetigen Anstieg auf geringfügig über 110 % induzierte, führte die Behandlung mit 0,1 μM THC zu einer nicht signifikanten Reduktion der intrazellulären Kalziumkonzentration auf 95 % über den gesamten Messzeitraum. (vgl. Abb. 14)

Die Vorbehandlung mit den TRPA1-Antagonisten A967 und HC3 modulierte den THC-induzierten Effekt signifikant, unter A967 mehr als unter HC3: Unter Einfluss von A967 stieg die Kalziumkonzentration bei Applikation von 25 μM THC nach 50 Minuten lediglich auf ein Maximum von etwa 130 % der Kontrolle an, während es unter HC3 zu einem Anstieg auf

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

durchschnittlich 170-180% der Kontrolle kam. Ebenso führten auch die niedrigeren THC-Konzentrationen zu einem etwas stärkeren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration als A967, jedoch weiterhin deutlich geringer als ohne Wirkstoffzusatz. (A967: $p < 0,001$ bei 10 und 25 μM , $p = 0,009$ bei 5 μM , $p = 0,052$ bei 1 μM ; HC3: $p < 0,001$ bei 5-25 μM)

Unter RR, einem rein extrazellulären TRPA1-Antagonisten, unduliert die 25 μM THC Kurve um 190% ($p < 0,001$ bei 5-25 μM), stärker jedoch war der Unterschied der intra- und extrazellulären Blockade von TRPA1 in kalziumfreiem Medium, da hier intrazelluläre Kalziumkonzentrationsänderungen rein aus den intrazellulären Speichern kommen können: Während A967 die Effekte von THC in diesem Milieu vollkommen negierte ($p < 0,001$ bei 10 und 25 μM), zeigte RR hier nur wenig Effekt ($p < 0,001$ bei 5-25 μM).

In der Auswertung nach Zugabe von BAPTA, einem Kalziumchelator, zeigte die 25 μM Kurve einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration nach 25 Minuten auf knapp 230% des Ausgangswertes, sankt dann ab 30 Minuten auf ein Plateau von 180% zwischen Minute 53 und 78 ab, und stieg dann zum Ende der Messung auf knapp über 190% an. ($p < 0,001$ bei 5-25 μM) Die Kurven verhielten sich insgesamt analog zum Graphen ohne Zugabe weiterer Wirkstoffe, jedoch mit etwas vermehrter intrazellulärer Kalziumkonzentration nach Zugabe von höheren Dosen THC.

Die Zugabe von COR, einem inversen CB_2 -Agonisten, führte im Vergleich zur Kurve ohne Zusatz zu einem geringfügig schwächeren Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration über alle THC-Konzentrationen hinweg ($p < 0,001$ bei 5-25 μM), während CsA, ein Immunsuppressivum, und Rimonabant, ein selektiver CB_1 -Antagonist, zu keinem relevanten Unterschied führten.

D22 als Antagonist organischer Kationentransporter supprimierte den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration unter den meisten THC-Konzentrationen bis zu einer Messdauer von einer halben Stunde. Im weiteren Verlauf der Kurve mit 25 μM THC überstieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration unter D22-Einfluss jedoch sogar die entsprechenden Werte der alleinigen THC-Applikation.

Eine Vorstimulation mit THC, welches vor allem über TRPA1 in den Kalziumhaushalt der Zellen eingreift und TRPV2 stimuliert, sowie als partieller Agonist an CB_1/CB_2 fungiert, induziert bei Zugabe von 25 μM THC einen abrupten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, welche nach transientser Reduktion nach 25 Minuten bei 190% stagniert und im weiteren Messverlauf graduell auf 160% abfällt ($p < 0,001$ bei 5-25 μM). (vgl. Abb. 25)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

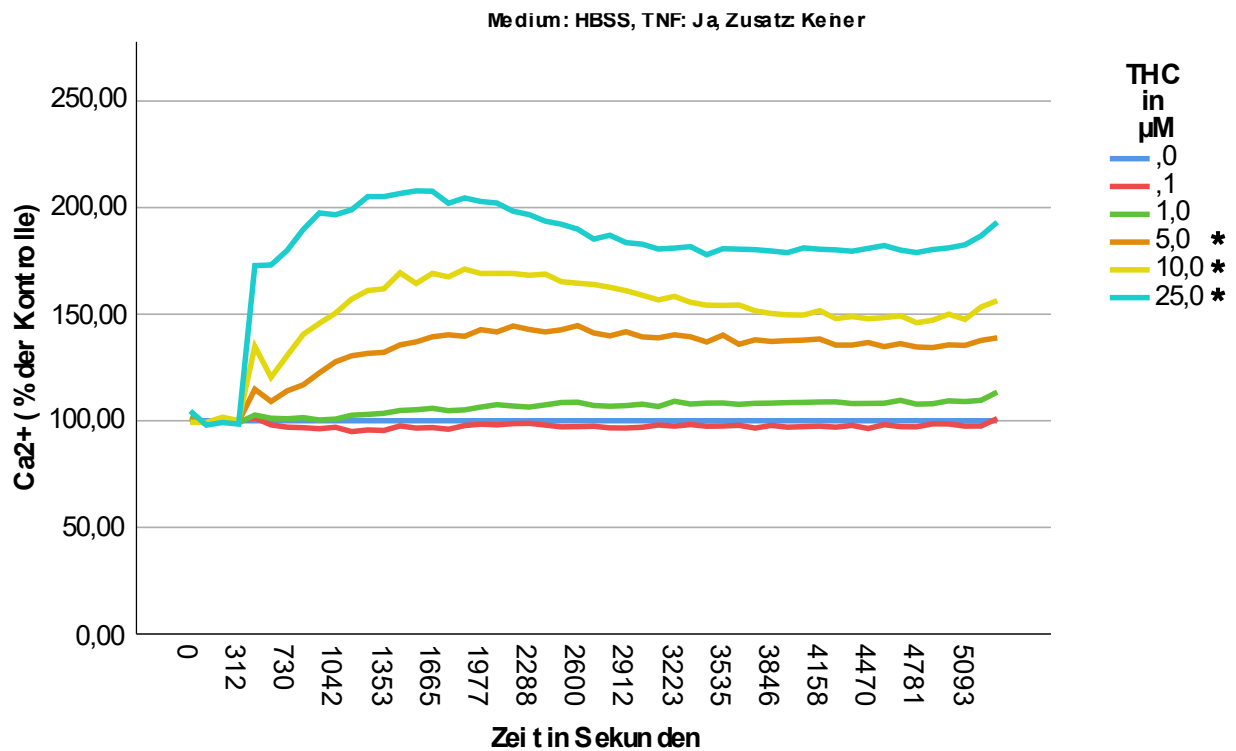


Abbildung 13: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die Kontrolle

RASF wurden, nach einer Vorstimulation mit TNF α (10ng/ml) für 72h, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

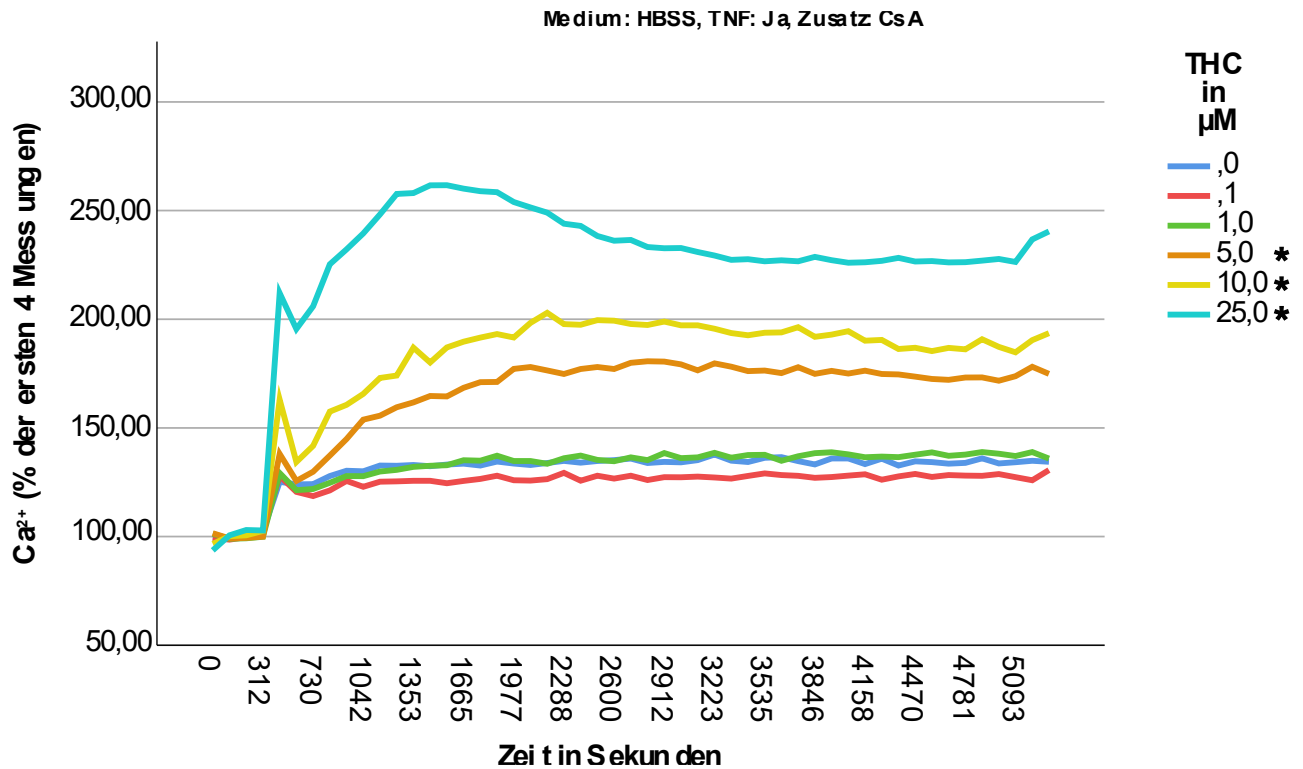


Abbildung 14: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von CsA, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

CsA: Immunsuppressivum, Cyclophilin-Antagonist

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. ** p < 0,001

In nicht entzündlich veränderten RASF bewirkt die Zugabe von THC ohne Zugabe weiterer Wirkstoffe keinen vermehrten Einstrom von Kalziumionen in die Zelle, PoPo3 hingegen, was als Marker für die Aufnahme von Wirkstoffen in die Zelle genutzt wurde, zeigte eine signifikant gesteigerte Aufnahme insbesondere bei einer THC-Konzentration von 25 μ M. (siehe Abb. 16)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

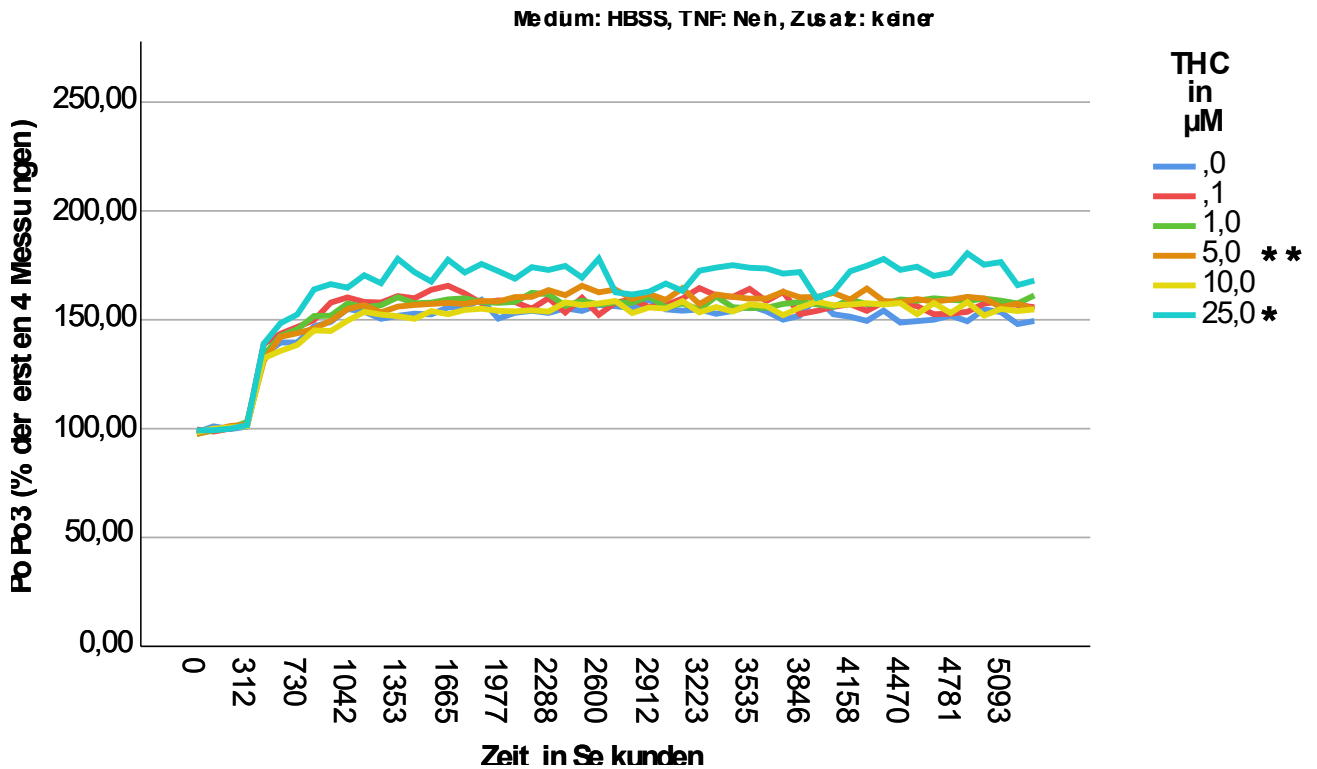


Abbildung 15: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), ohne Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden ohne TNF α inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 10-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

Der prozentuell stärkste Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration unter den nicht proinflammatorisch vorbehandelten RASF fand sich in der mit Ruthenium Rot vorbehandelten Gruppe unter 25 μM THC im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert vor THC-Applikation. (vgl. Abb. 17) Nach Referenzierung der Absolutwerte lässt sich dieser Effekt jedoch zumindest teilweise durch ein deutlich niedrigeres Basisniveau von PoPo3 in den Zellen erklären, welches über den gesamten Zeitraum der Beobachtung unterhalb der Messwerte aller anderen Testgruppen blieb, jedoch damit einen prozentuell stärkeren Anstieg ermöglichte.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

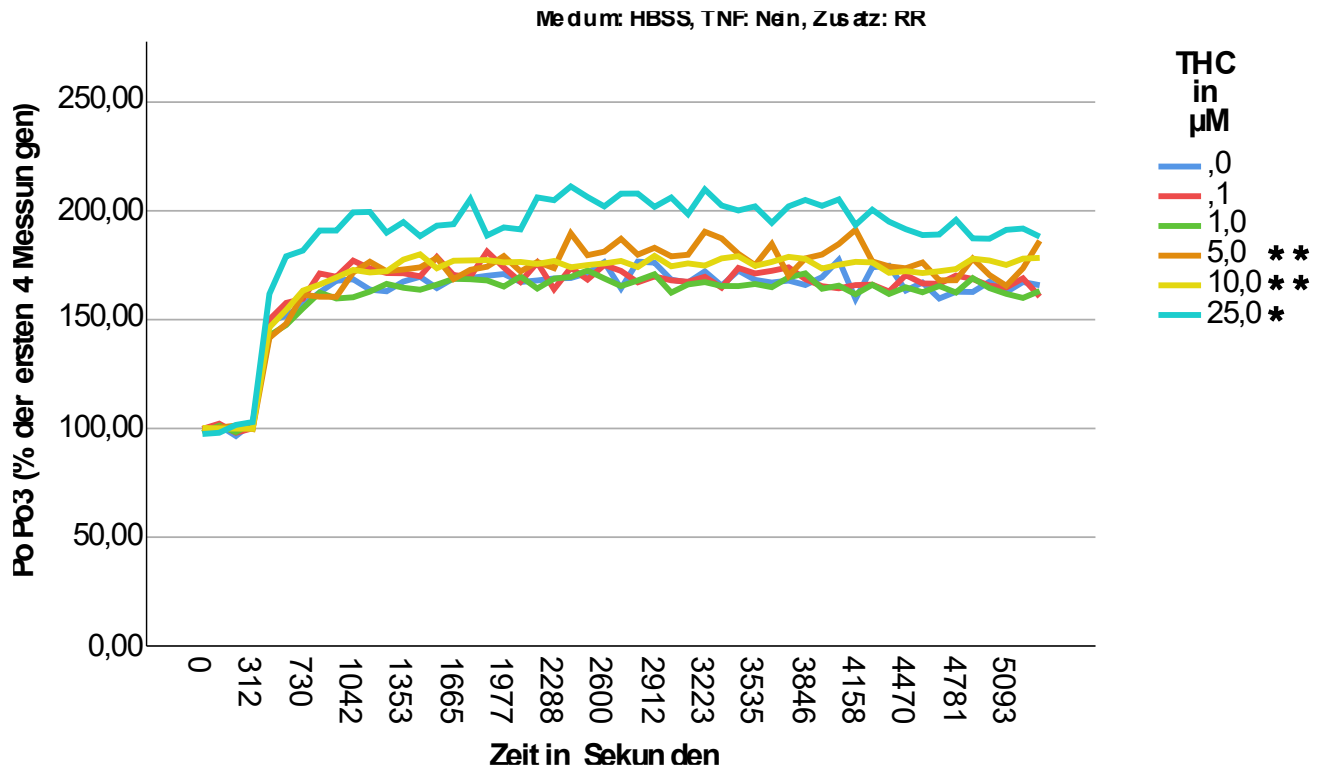


Abbildung 16: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumhaltigem Medium, ohne Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von RR, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden ohne TNF α inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

RR: Ruthenium Rot, genereller TRP-Kanal-Blocker

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

Nach Induktion eines proinflammatorischen Milieus durch Vorstimulation mit TNF α fand sich im kalziumhaltigen Medium eine absolute Zunahme der intrazellulären PoPo3-Konzentration bereits ab einer Exposition mit 0,1 μM THC ($p < 0,001$ bei 0,1-25 μM). Nach Normierung der Daten, sowohl auf den initialen Basalwert (erste 4 Messungen) als auch auf die Kontrolle (ohne THC), verifizierte sich dieser Effekt jedoch erst ab einer Konzentration von 1 μM THC signifikant ($p < 0,001$ bei 1-25 μM). (vgl. Abb. 18)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

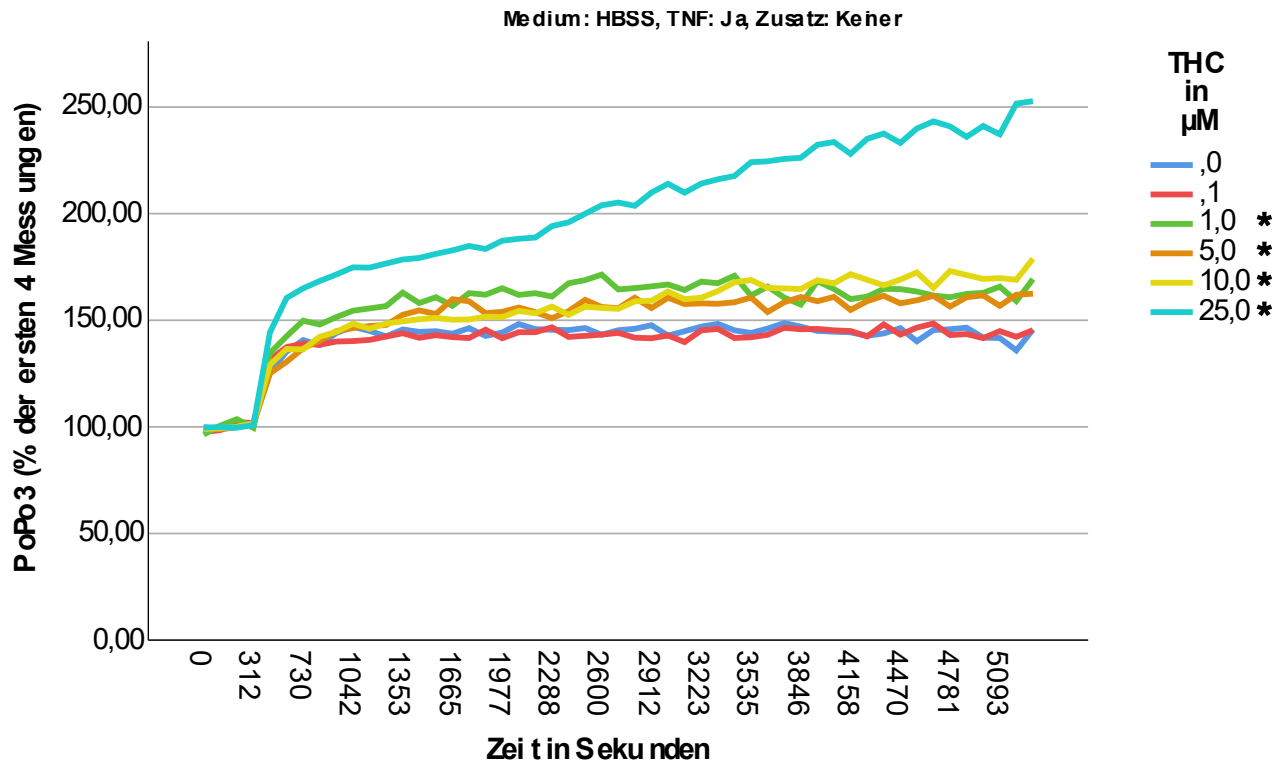


Abbildung 17: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9-11 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$

Die Applikation des TRPA1-Antagonisten A967 resultierte in den Absolutwerten in einer signifikanten Zunahme der intrazellulären PoPo3-Konzentration über nahezu alle THC-Konzentrationen hinweg ($p < 0,001$ bei 5 und 25 μM , $p = 0,001$ bei 10 μM , $p = 0,009$ bei 0,1 μM). Lediglich nach Zugabe von 1 μM THC fand sich mit einem p-Wert von 0,055, womit das Signifikanzniveau knapp verfehlt wurde.

Nach Normalisierung auf die Kontrolle ist diese Akkumulation schwächer ausgeprägt, erreichte aber bei allen Konzentrationen von 1-25 μM THC statistische Signifikanz ($p < 0,001$ bei 5-25 μM , $p = 0,012$ bei 1 μM).

Durch die Inhibition organischer Kationentransporter mittels D22 kam es zu einer Supprimierung der PoPo3-Aufnahme. Nach Normierung auf die Kontrolle fand sich ein Abfall der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition auf knapp 75% ($p < 0,001$ bei 1-25 μM).

Die Verwendung eines kalziumfreien Mediums hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Aufnahme von PoPo3. Ohne weitere Zusätze kam es weiterhin bei allen THC-Konzentrationen

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

außer 0,1 μM nach Normalisierung auf die Kontrolle oder die Baseline zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration ($p < 0,001$ bei 1-25 μM). (vgl. Abb. 18)

Im Falle einer Präinkubation mit THC fand sich nur nach Sekundärstimulation mit den höchsten Konzentrationen an THC eine statistische Signifikanz im Anstieg der intrazellulären PoPo3-Spiegel normalisiert auf die Kontrolle ($p < 0,001$ bei 10 und 25 μM).

Konsistent über alle Versuchsreihen in kalziumfreiem Medium hinweg evozierte eine Exposition mit 25 μM THC einen signifikanten Anstieg der intrazellulären PoPo3 Konzentration, während geringere Konzentrationen nicht immer statistisch signifikante Ergebnisse lieferten. (vgl. exemplarisch Abb. 19 und 20)

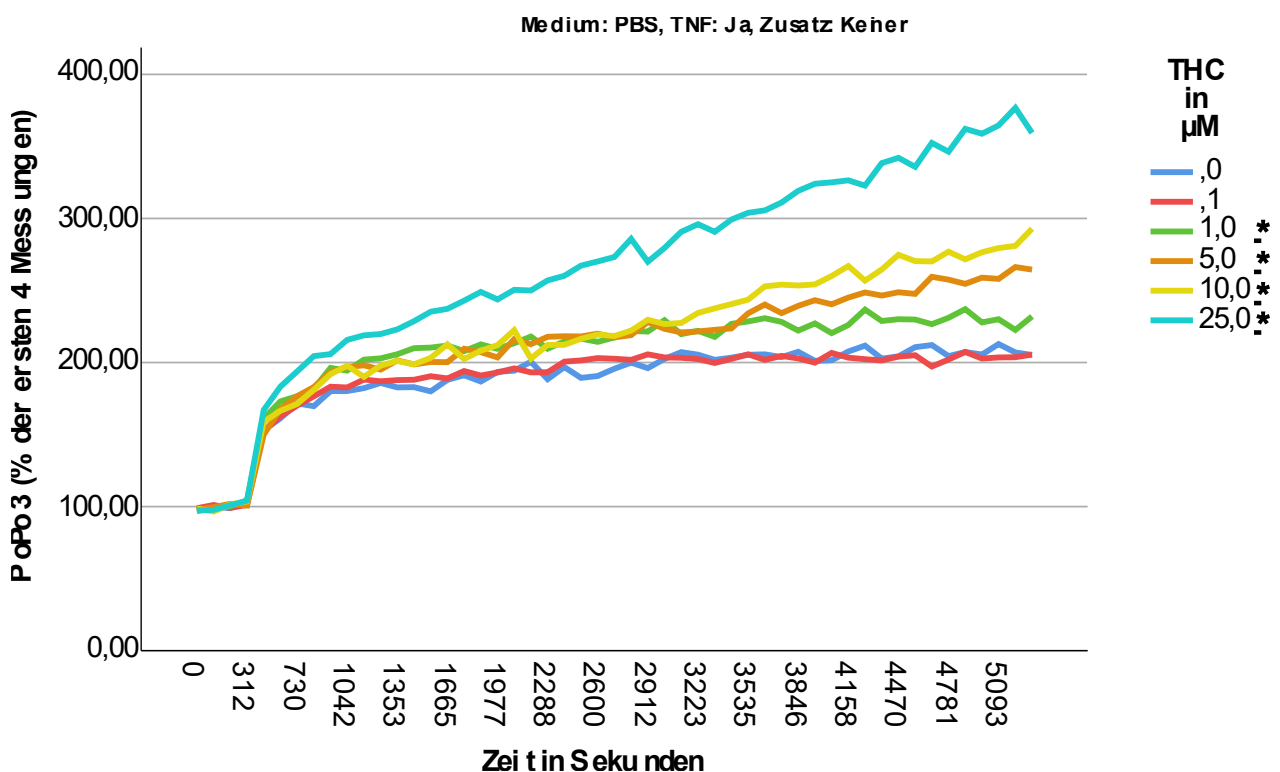


Abbildung 18: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumfreiem Medium (PBS), nach Vorstimulation mit TNF, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$

In Zellreihen, denen RR oder BAPTA zugesetzt wurde, fand sich hingegen eine signifikante Zunahme oder zumindest eine tendenzielle Steigerung in allen THC-Konzentrationen. In der BAPTA-Gruppe wurde für die Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 5 μM und 25 μM statistische Signifikanz erreicht, während 10 μM THC das Signifikanzniveau knapp verpasste ($p=0,086$). Unter Einfluss von RR erwiesen sich die Konzentrationen von 0,1 μM , 1 μM und

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

25 μM als signifikant, für 5 μM und 10 μM verzeichnete sich eine entsprechende Tendenz mit $p=0,09$ für 5 μM und $p=0,082$ für 10 μM respektive.

Nach Normalisierung der Daten auf die Kontrolle oder auf die Baseline relativierten sich diese Effekte teilweise, dennoch blieb nach Vorstimulation mit RR und Normalisierung auf die Kontrolle die Signifikanz für fast alle THC Konzentrationen bis auf 1 μM bestehen, mit $p<0,001$ für 5-25 μM und $p=0,001$ für 0,1 μM THC.

Im Vergleich auf die ersten 4 Messungen, mit welchen die Baseline vor THC-Applikation festgelegt wurde (siehe Methoden), zeigten die meisten THC Konzentrationen in den Gruppen mit A967, THC, COR sowie der Kontrollgruppe ohne weitere Zusätze einen signifikanten Anstieg der PoPo3-Konzentration, während in Bezug auf die Kontrolle ohne THC-Exposition die Zellreihen mit A967, COR, Rim sowie ohne Zusatzstoffe die Mehrheit der THC Dosierungen eine signifikante Steigerung der intrazellulären PoPo3-Konzentration aufwies (vgl. Abb. 20 und 21). Konsistent mit den vorangegangenen Beobachtungen mit der intrazellulären Kalziumkonzentration wurde bei A967 bezogen auf die Kontrolle der Anstieg der intrazellulären PoPo3-Konzentration nahezu vollkommen blockiert. (siehe Abb. 21) Ein ähnliches Bild fand sich für COR bezogen auf die Kontrolle. (vgl. Abb. 22)

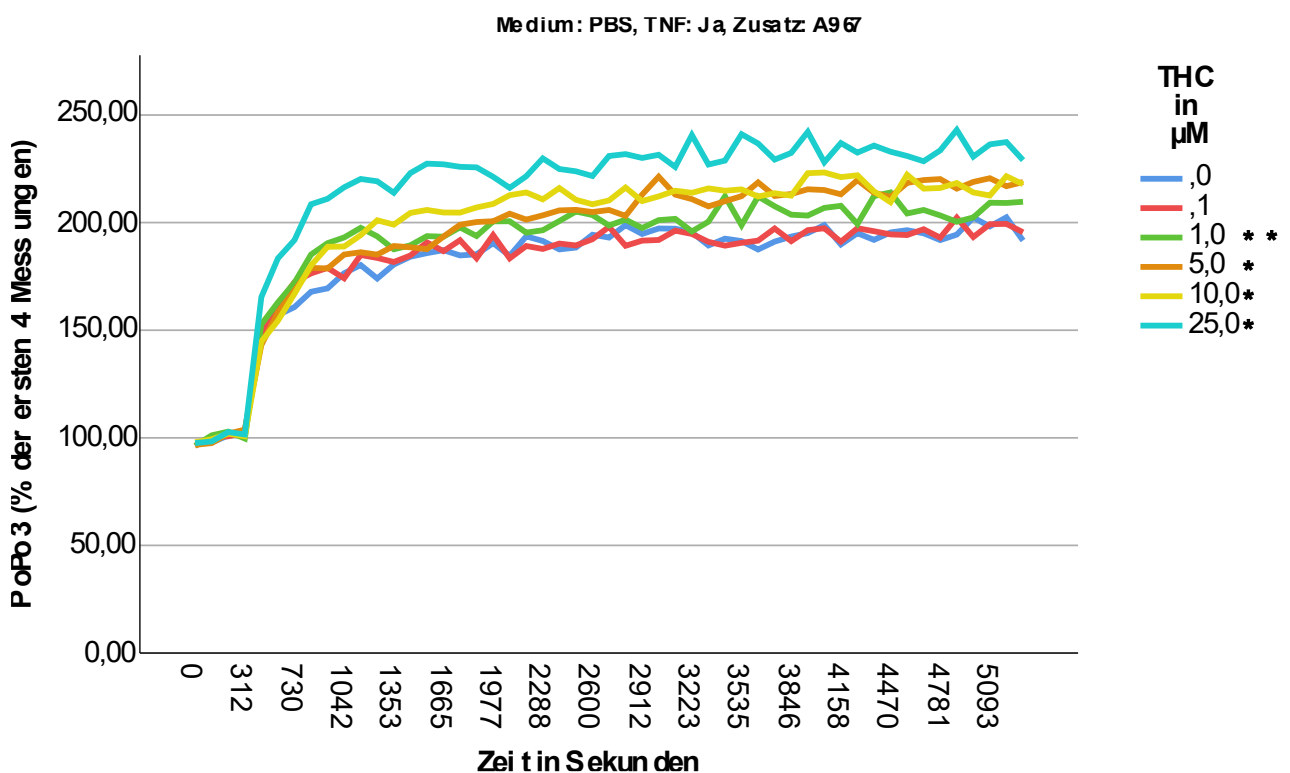


Abbildung 19: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von A967, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

A967: A967079, selektiver TRPA1-Antagonist

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9 Patienten verwendet.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$, ** $p < 0,05$

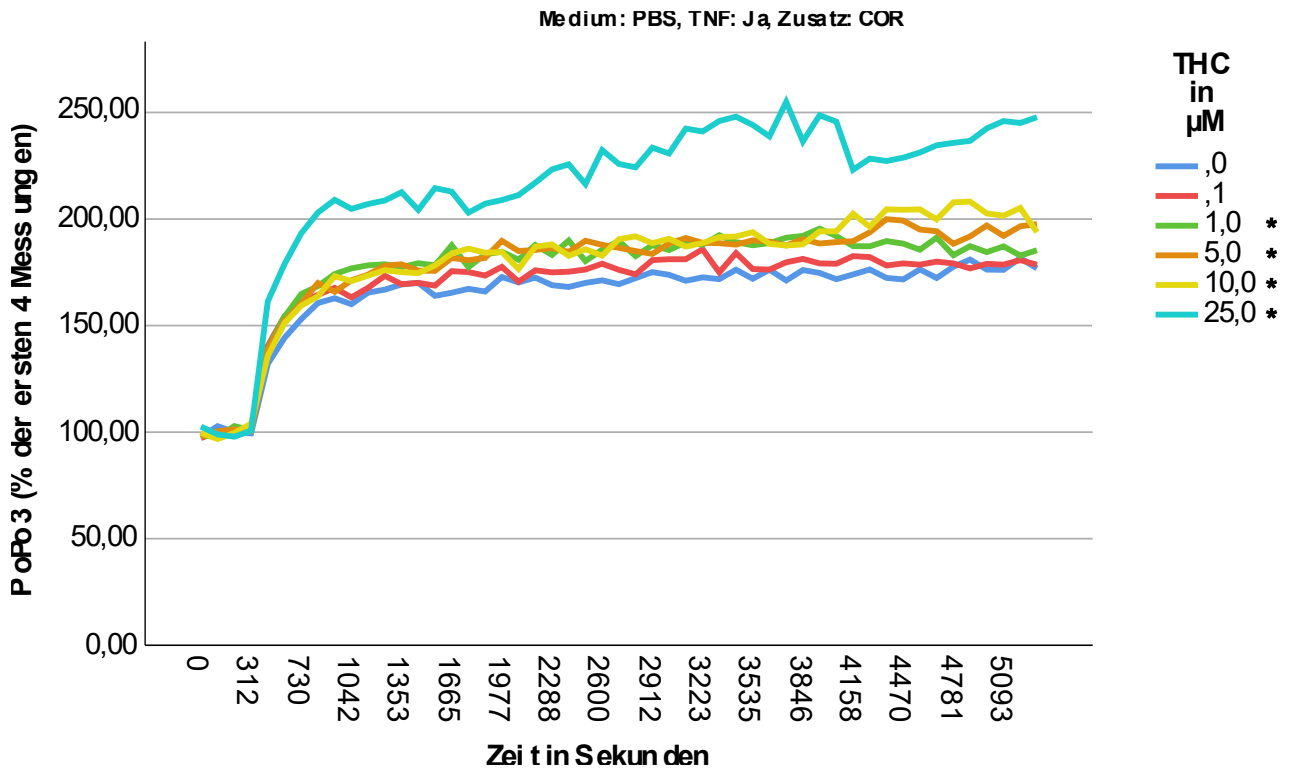


Abbildung 20: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von COR bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

COR: COR170, inverser CB2-Agonist

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * $p < 0,001$

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

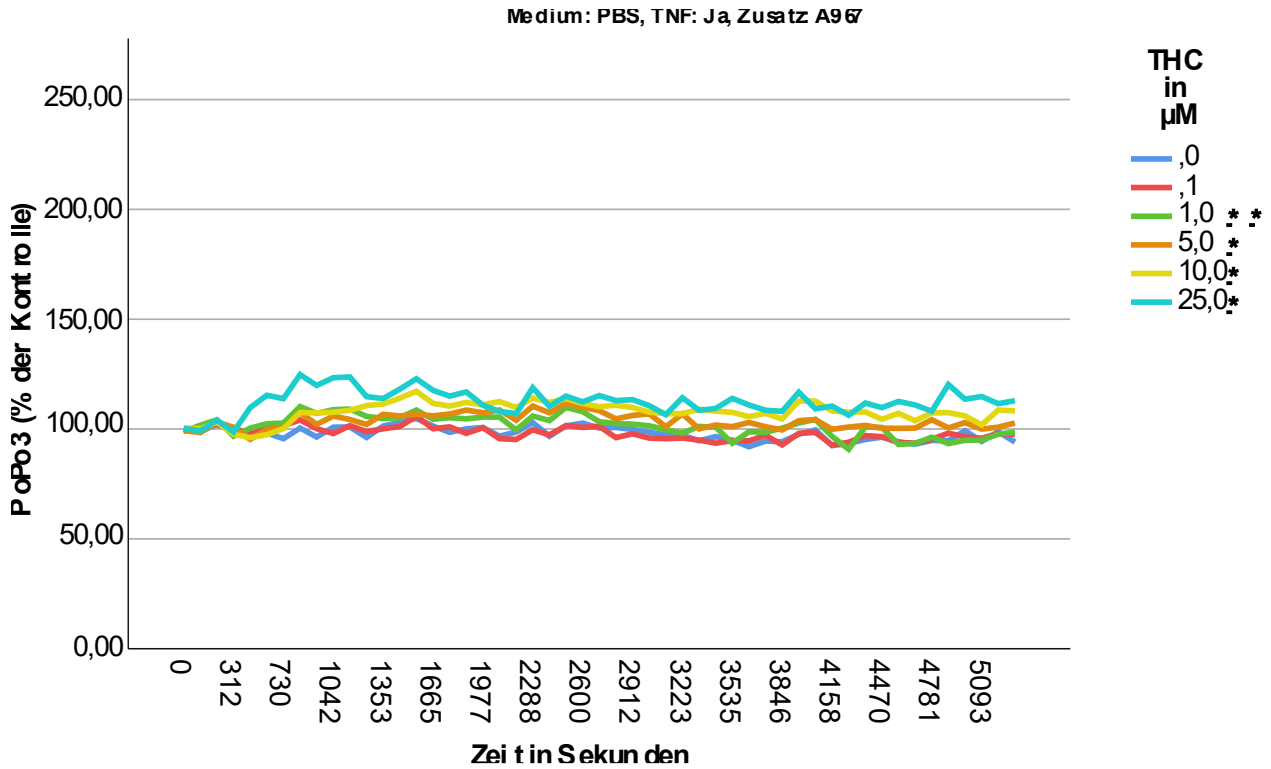


Abbildung 21: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumfreiem Medium, nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von A967, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

A967: A967079, selektiver TRPA1-Antagonist

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 8-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * p < 0,001, ** p < 0,05

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

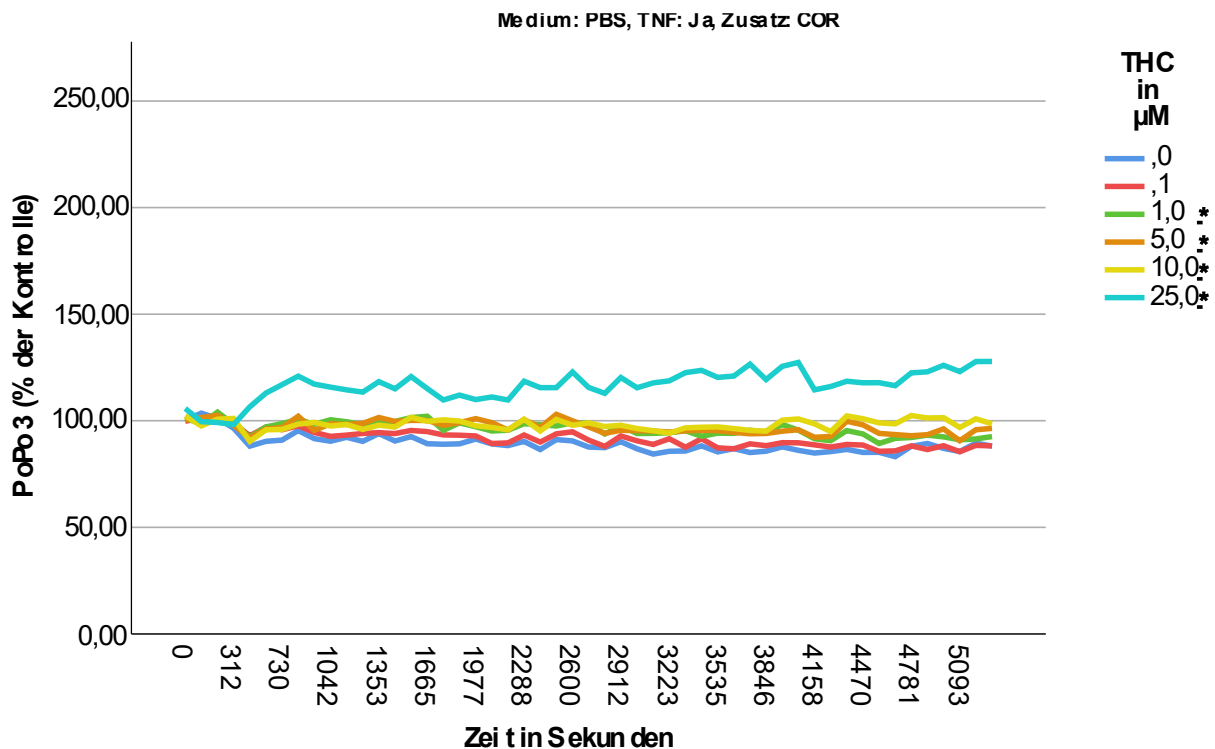


Abbildung 22: Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration in kalziumfreiem Medium nach Exposition mit TNF unter Zugabe von COR, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären PoPo3-Konzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

COR: COR170, inverser CB2-Agonist

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 8-9 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * p < 0,001

Um die Effekte einer vorangegangenen THC-Exposition zu evaluieren, wurde eine Gruppe an RASF mit THC inkubiert. Unter kalziumfreien Bedingungen kam es im Vergleich zum kalziumhaltigen Medium zu einem deutlich akzentuierteren Anstieg des intrazellulären freien Kalziums. (vgl. Abb. 23 und 24) Während die intrazelluläre Kalziumkonzentration im kalziumhaltigen Medium initial auf knapp 250% anstieg und anschließend ein Plateau um 200% der Ausgangskonzentration erreichte, stieg die intrazelluläre Kalziumkonzentration im kalziumfreien Medium auf nahezu 500% des Ausgangswertes an. Es ist jedoch anzumerken, dass diese ausgeprägte Dynamik nur nach Normalisierung auf die Baseline ersichtlich ist, in Relation zur Kontrolle (ohne THC) relativiert sich dieser Effekt auf einen deutlich geringeren Anstieg auf unter 200%. (Siehe Abb. 25)

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

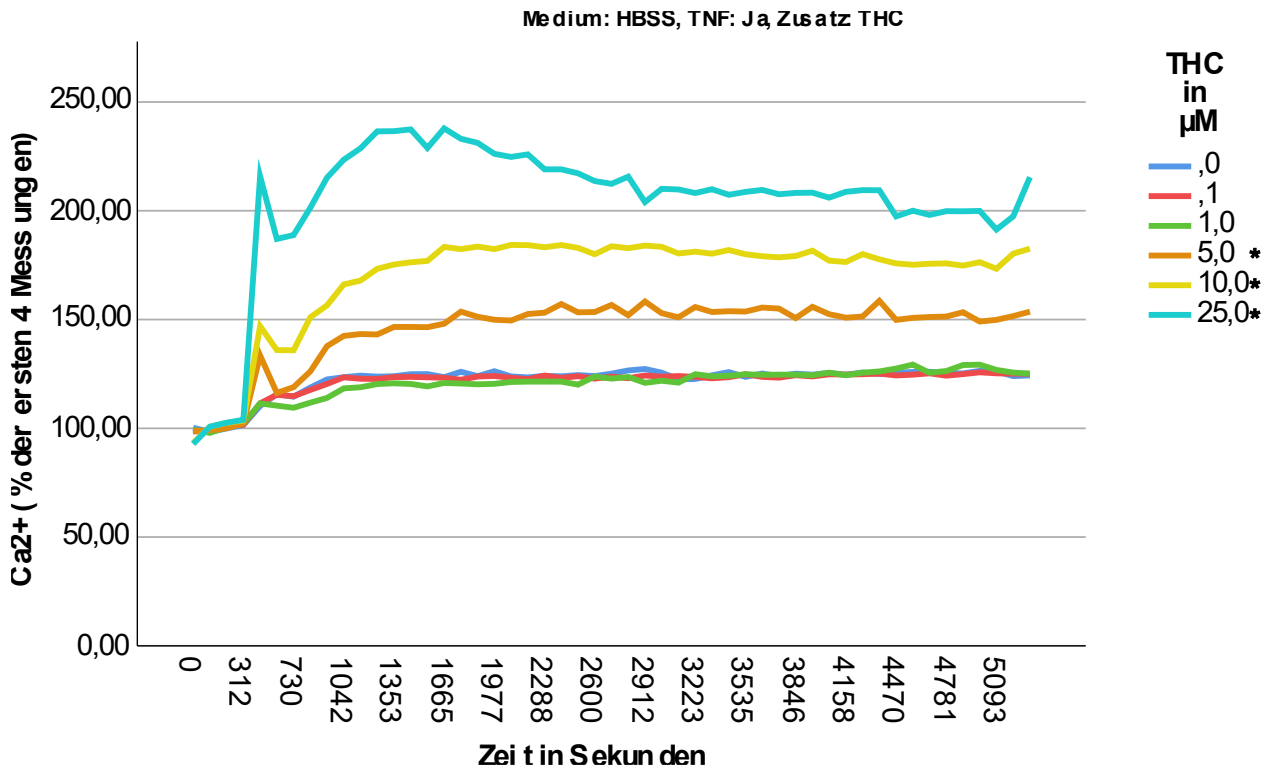


Abbildung 23: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem Medium (HBSS), nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von THC, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

THC: TRPV2-Agonist, partieller Agonist an CB₁ und CB₂

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 8-10 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * p < 0,001

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

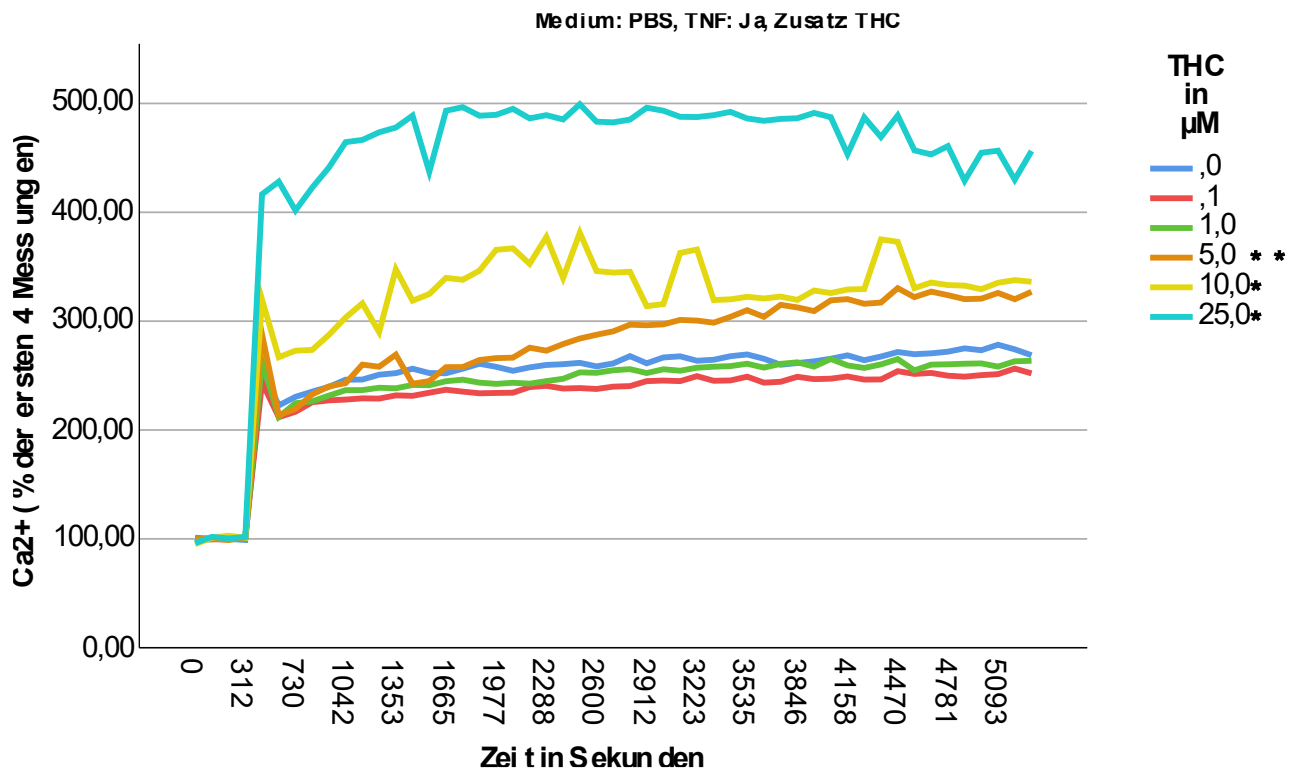


Abbildung 24: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumfreiem Medium (PBS), nach Vorstimulation mit TNF unter Zugabe von THC, bezogen auf die ersten 4 Messungen

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition ohne extrazellulärem Kalzium (PBS) gemessen.

THC: TRPV2-Agonist, partieller Agonist an CB₁ und CB₂

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 8-10 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * p < 0,001, ** p < 0,05

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

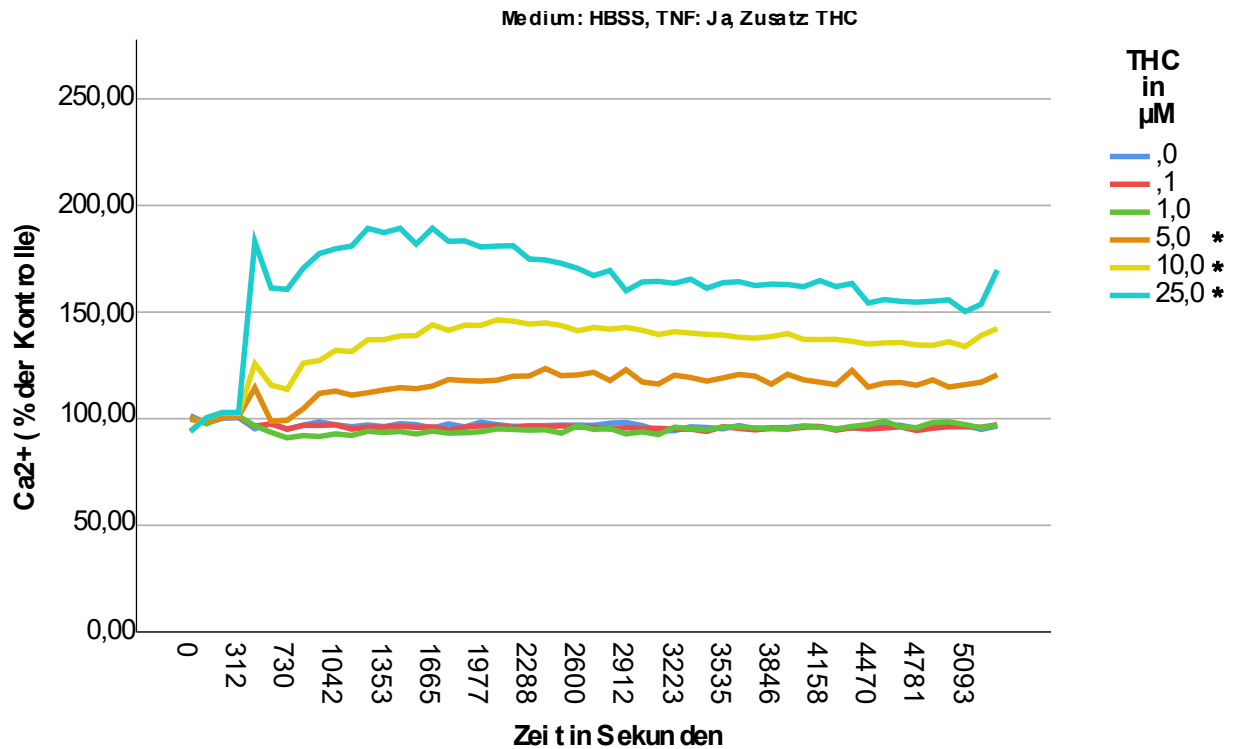


Abbildung 25: Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration in kalziumhaltigem (HBSS) Medium, nach Vorstimulation mit TNF, unter Zugabe von THC, bezogen auf die Kontrolle (ohne THC)

RASF wurden für 72h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert, gewaschen und die Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach THC-Exposition bei vorhandenem extrazellulärem Kalzium (HBSS) gemessen.

THC: TRPV2-Agonist, partieller Agonist an CB₁ und CB₂

In diesem Versuch wurden Daten von RASF-Kulturen von 8-10 Patienten verwendet.

Die Signifikanz wurde mittels ANOVA sowie dem Bonferroni post-hoc-Test ermittelt. * p < 0,001

4 Diskussion

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten einige Rückschlüsse auf die untersuchten Prozesse zu.

4.1 Zellüberleben

Einer zentraler Rückschluss betrifft die höchste verwendete THC-Konzentration: Mit TNF α vorstimulierte RASF, welche hier als Modell einer chronischen Entzündung dienen, weisen bei einer Konzentration von 25 μ M THC eine deutlich reduzierte metabolische Aktivität - entsprechend einem reduzierten Zellüberleben - auf als Zellen, welche erst nach THC-Exposition mit TNF α stimuliert wurden. Dies lässt sich klar aus den Ergebnissen des CTB-Assays ablesen und wird durch die Ergebnisse des Kalzium-Assays unterstützt: In chronisch-inflammatorisch veränderten RASF induziert die Exposition mit hohen THC-Konzentrationen einen signifikant verstärkten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Da dieser Effekt auch in kalziumfreiem Medium persistiert, deutet dies auf eine Mobilisierung intrazellulärer Kalziumreserven in das Zytoplasma hin, was auch schon Filipeanu et al. zeigen konnten (Filipeanu et al., 1997).

Die beobachtete Vitalitätsreduktion in RASF, welche vor THC-Exposition einer proinflammatorische Stimulation mit TNF α unterzogen wurden, im Vergleich zu Zellen, in welchen das proinflammatorische Milieu erst nach THC-Exposition simuliert wurde, deutet auf eine gesteigerte Suszeptibilität entzündlich veränderter Fibroblasten gegenüber THC hin. Diese Beobachtungen spiegeln sich beispielsweise in einer Studie an Zellen eines Kolorektalen Karzinoms, bei denen eine Behandlung mit 40 μ M THC ähnliche Muster der Viabilität auslöste, wieder (Hwang et al., 2023) Auch in einer Studie zum Mammakarzinom zeigten THC-haltige Extrakte einen supprimierenden Einfluss auf das Zellwachstum. (Li et al., 2022) Dieser Zusammenhang konnte des Weiteren in Studien an diversen anderen Malignomen nachgewiesen werden. (Armstrong et al., 2015; Carracedo et al., 2006; Salazar et al., 2013, 2009) Über die reduzierenden Effekte auf den Zellmetabolismus hinaus wurde jedoch in einer Studie aus Japan eine dosisabhängige Zytotoxizität auf murine zerebrale Zellen nachgewiesen, was auf potentielle Nebenwirkung bei hochdosierter THC-Applikation im Menschen hindeutet. (Funada and Tomiyama, 2020)

Diese pro-apoptotische Synergie zwischen proinflammatorischen Zytokinen und THC konnte bereits in verschiedenen Modellen beschrieben werden. Lowin et al. beschrieb 2018 eine TRPA1-medierte, kalziumabhängige Zytotoxizität (Lowin et al., 2018), während Salazar et al.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Autophagie als Treiber der Zytotoxizität von THC in diversen Malignomzellen, jedoch nicht in gesunden Zellen, nachweisen konnte. (Salazar et al., 2009) Eine Wiederholung der Versuche mit variablen Inkubationszeiten mit TNF könnte hier weitere Erkenntnisse liefern, ab welchem Zeitpunkt ein pro-inflammatorisches Priming die zytotoxische Schwelle von THC signifikant senkt.

4.2 Zytokinproduktion

Die Zytokinproduktion von RASF wurde Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente durch die Exposition mit den meisten Konzentrationen an THC nicht signifikant beeinflusst. In der Gruppe, welche der höchsten THC-Konzentration ausgesetzt wurde, fand sich über alle getesteten Zytokine hinweg eine reduzierte Zytokinproduktion, jedoch kann diese aufgrund des vermehrten Zelluntergangs in derselben Gruppe nur schwer mit den anderen Gruppen verglichen werden. Dies zeigt sich auch in den Versuchen von Li et al. (2022), in welchen THC-Extrakte bis 10 μ M die Ausschüttung von IL-6 und IL-8 reduzierte. (Li et al., 2022) Des Weiteren konnte in Tierversuchen an Makaken eine Reduktion der IL-6-Ausschüttung und an Ratten mit iatrogen induzierter RA eine Reduktion der Serumlevel an IL-6 und IL-8 festgestellt werden. (Ismail et al., 2018; Van Zandt et al., 2025) Unter anderem kommt dieser Effekt durch die Effekte von THC auf Zellen des Immunsystems, wie T-Zellen und Makrophagen zustande, welche in der RA ebenfalls fehlaktiviert werden. (Rieder et al., 2010; Tashkin et al., 2002)

Der immunsuppressive Effekt konnte in diesen Versuchen nicht durch CB₁-Antagonisten oder TRPA1-Antagonisten unterdrückt werden, was für einen rezeptorunabhängigen Effekt spricht. Jedoch konnte Tashkin et al. zeigen, dass in Mäusen der immunsuppressiven Wirkung von THC auf Makrophagen und T-Zellen durch Verwendung von CB₂-Antagonisten entgegengewirkt werden konnte (Tashkin et al., 2002), weshalb dieser Ansatz für RASF untersucht werden könnte.

4.3 Veränderungen im Kalziumhaushalt

Während native RASF, welche keinem Entzündungsreiz ausgesetzt wurden, kaum auf eine Zugabe von THC reagierten, kam es nach Inkubation mit TNF und somit Simulation einer bestehenden Entzündung zu einem raschen Anstieg des freien intrazellulären Kalziums nach THC-Exposition. Sowohl in einem kalziumhaltigen Medium, als auch in einem kalziumfreien Medium kam es zu einem messbaren Anstieg des freien intrazellulären Kalziums, was auf eine Mobilisierung intrazellulärer Kalziumreserven als zusätzlichen Mechanismus neben der

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Kalziumaufnahme aus dem Extrazellulärraum hindeutet. Dass ein Anstieg des intrazellulären Kalziums die Zellteilung (Tombes and Borisy, 1989) fördern oder bei Störung des Kalziumhaushaltes zu Entzündungsreaktionen und Apoptose führen kann (Chang et al., 2010; Whyte et al., 1993; Ye et al., 2021) ist somit hochrelevant für den Einfluss von THC auf die Krankheitsaktivität in der RA.

Des Weiteren induzierte eine Sekundärstimulation mit THC ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese Beobachtung deutet auf eine fehlende oder lediglich gering ausgeprägte Desensibilisierung der beteiligten Signalwege hin. Während die hier durchgeführten Versuche auf eine kritische Rolle von TRPA1 in der Mobilisierung von Kalzium nach THC-Exposition hindeuten, fanden andere Studien, dass TRPA1 durchaus durch wiederholte Stimulation mit anderen Reagenzien desensibilisiert werden kann. (Ohashi et al., 2023; Xu et al., 2025) Während dies für THC nicht gezeigt werden konnte, besteht dennoch die Möglichkeit, dass die Desensibilisierung zum Zeitpunkt der Sekundärstimulation bereits wieder aufgehoben war.

Die Antagonisierung von CB_{1/2} übte in den vorliegenden Versuchen nur einen marginalen Einfluss auf die THC-medierte Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration aus. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Rao et al., welche in murinen T-Lymphozyten eine CB_{1/2}-abhängige Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch THC nachweisen konnten. (Rao et al., 2004) Diese Diskrepanz lässt sich jedoch möglicherweise durch eine unterschiedliche Schwerpunktsetzung der Studien erklären: Während sich Rao et al. exklusiv auf Cannabinoidrezeptoren konzentrierten, wurden in der vorliegenden Arbeit ein breiteres Spektrum potentieller Rezeptoren untersucht. Im direkten Vergleich nimmt die Wirkung einer CB_{1/2}-Blockade eine vergleichsweise untergeordnete Rolle gegenüber der Wirkung anderer Rezeptorblockaden ein, insbesondere gegenüber der Blockade von TRPA1.

Die Vorinkubation mit A967, welches als Antagonist an TRPA1 die kalziummodulierende Wirkung von THC über den TRPA1-Kanal blockiert, zeigte vor allem in kalziumfreiem Medium signifikante Effekte: Unter diesen Bedingungen waren THC-Konzentrationen von mindestens 10µM THC notwendig, um einen signifikanten Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zu induzieren, während dieser Effekt in kalziumhaltigem Medium weniger stark ausgeprägt war. Diese Diskrepanz lässt sich potentiell durch die aktivitätsmodulierende Wirkung von Kalzium an TRPA1 erklären, wie sie von Zhao et al. und Brauchi und Rothberg beschrieben wurde. (Brauchi and Rothberg, 2020; Zhao et al., 2020) Die unter Einsatz von A967 gewonnenen Erkenntnisse werden durch die Versuche mit HC3

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

gestützt. Obwohl die Effekte im Vergleich zu A967 schwächer ausfielen, validiert die Übereinstimmung der Trends zweier strukturell unterschiedlicher Antagonisten an TRPA1 die Beteiligung des Rezeptors an der THC-induzierten Kalziumantwort.

Hieraus lässt sich ableiten, dass TRPA1 vorrangig an der Mobilisierung intrazellulärer Kalziumreserven in synovialen Fibroblasten beteiligt ist. Wie Lowin et al. bereits zeigen konnten, führt ein Kalzium-Einstrom durch TRPA1 zu einem Absterben inflammatorisch veränderter RASF (Lowin et al., 2018), weshalb eine THC-mediierte TRPA1-Aktivierung einen potentiellen therapeutischen Ansatz für die lokale Behandlung der RA darstellen könnte.

4.4 Wirkstoffaufnahme

Analog zur Kalziumdynamik wurde auch die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes PoPo3, welcher als Surrogatparameter für die zelluläre Wirkstoffaufnahme herangezogen wurde, nach Vorinkubation mit A967 und HC3 signifikant. Dieser Effekt ist bereits in nicht-inflammatorisch stimulierten RASF erkennbar, jedoch verzeichneten alle Zelllinien ohne Vorstimulation mit TNF α nur einen vernachlässigbaren Anstieg der intrazellulären PoPo3-Konzentration, sofern dieser überhaupt verifizierbar war. Da eine Aktivierung von TRPA1 unter anderem einen wesentlichen Faktor in der immunoneuralen Kommunikation darstellt (Bandell et al., 2004; Cortright et al., 2007; Jordt et al., 2004; Silverman et al., 2020; Story et al., 2003), bildet die TRPA1-vermittelte Modulation der Wirkstoffaufnahme einen zentralen Aspekt in der Evaluation zukünftiger Therapiestrategien.

Deutlich ausgeprägter als der Effekt einer TRPA1-Inhibition erwies sich der Effekt einer Blockade organischer Kationentransporter durch D22 in Bezug auf die zelluläre PoPo3-Aufnahme. Während in der Literatur teilweise diskutiert wird, dass PoPo3 lediglich über kompromittierte Zellmembranen penetrieren kann, wurde für multiple, mit PoPo3 verwandte Verbindungen bereits ein Transport über organische Kationentransporter nachgewiesen. (Schilling et al., 1999; Stueber et al., 2016) In Verbindung mit der hier beobachteten, profunden Reduktion der Farbstoffaufnahme nach Vorstimulation mit D22 kann dieser Aufnahmemechanismus mit hoher Wahrscheinlichkeit auch für PoPo3 postuliert werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse einer Studie zu den Effekten von CBD, welche bei analogem Versuchsaufbau vergleichbare Resultate lieferte. (Lowin et al., 2020b) D22 ist ein unspezifischer Antagonist organischer Kationen Transporter (Bönisch, 2021) und stellt derzeit den einzigen bekannten Inhibitor dar, der bereits im sub-mikromolaren

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Konzentrationsbereich Wirkung entfaltet. (Haar et al., 2023) Zur weiterführenden Spezifizierung der zugrundeliegenden Prozesse wäre künftig jedoch die gezielte Blockade einzelner OCT-Subtypen zur differenzierteren Beurteilung der Transportkinetik interessant. Nachdem in vivo eine hepatische Ausscheidung von THC über OCT1 nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 2024), wäre dies ein interessanter Ansatz für weitere Forschungen an synovialen Fibroblasten.

Ein weiterer Aspekt der PoPo₃-Aufnahmekinetik unterscheidet sich maßgeblich von der beobachteten Dynamik der intrazellulären Kalziumkonzentration: Eine Vorstimulation der RASF mit THC, welche eine vorangegangene Behandlung mit THC-haltigen Präparaten oder Genuss von THC-haltigen Zubereitungen simulieren sollte, führte zu einer signifikant reduzierten PoPo₃-Aufnahme bei erneuter THC-Exposition: Während pro-inflammatorisch stimulierte Zellen ohne weitere Zusätze auf die Zugabe von 25 µM THC mit einem Anstieg der intrazellulären PoPo₃-Konzentration auf 180% der Kontrolle reagierten, reduzierte sich der Effekt nach Vorstimulation mit THC auf 140%. Nachdem organische Kationentransporter, wie zuvor dargelegt, als potentieller Hauptaufnahmeweg für PoPo₃ postuliert werden (Lowin et al., 2022, 2020b), deutet diese Beobachtung auf eine THC-induzierte Desensibilisierung oder funktionelle Downregulation eines oder mehrerer OCT durch THC hin. Da für eine Interaktionen von THC mit organischen Kationen Transportern sowie für eine mögliche Desensibilisierung dieser Transporter bisher kaum Literaturdaten vorliegen, stellt sich die Einordnung in den Forschungskontext schwierig dar. Jedoch legt dieser Effekt nahe, dass bei wiederholter, THC-basierter Therapie die Akkumulation anderer Wirkstoffe in den synovialen Fibroblasten herabgesetzt und die Effektivität dieser Therapien reduziert sein könnte. Hingegen könnte eine Kombinationstherapie von THC mit weiteren Wirkstoffen die Aufnahme dieser und die Effektivität der Therapie verbessern, ein Effekt, welcher bereits für CBD erfolgreich nachgewiesen werden konnte. (Neumann-Raizel et al., 2019)

4.5 Limitationen

Die vorliegende Arbeit unterliegt naturgemäß verschiedenen Limitationen, welche für die Interpretation der Ergebnisse bedacht werden müssen. Zunächst wurde für sämtliche Versuchsreihen ausschließlich Zellen von Patienten mit RA verwendet, welche sich aufgrund des fortgeschrittenen Erkrankungsstadiums einer Kniegelenksersatz-Operation unterzogen. Dies hat zur Folge, dass sich die Ergebnisse potentiell nur bedingt auf frühe Erkrankungsstadien übertragen lassen, in denen die Entzündungsaktivität sowie die epigenetischen, proinflammatorischen Veränderungen möglicherweise noch variieren.

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Ein weiterer kritischer Aspekt der Transfer vom *in vitro* Modell in die Situation *in vivo*. Während die verwendeten Zellen aus humanem Gewebe isoliert wurden, befinden sie sich für die Versuche in einer aufgereinigten Kultur statt im physiologischen Zellverband, und wurden bereits einige Zeit in dieser kultiviert. Aspekte wie die Wechselwirkungen mit benachbarten Immunzellen, der extrazellulären Matrix oder Schwankungen in der Nährstoffversorgung können daher nicht vollständig abgebildet werden. Zudem lassen sich die pharmakokinetischen Prozesse einer potentiellen lokalen Anwendung wie beispielsweise die systemische Resorption oder die Verteilung in angrenzende Kompartments nicht abbilden und können bei einer Übertragung in die *in vivo* Anwendung zu signifikanten Schwankungen im Vergleich zu den *in vitro* gewonnenen Ergebnissen führen.

Des Weiteren bleiben systemische Variablen wie Hormonveränderungen bei Frauen, welche die Krankheitsaktivität beeinflussen können (Masi and Chrousos, 2003; Ren et al., 2020), systemische Medikation oder endokrine Regulation und Stress im experimentellen Modell unberücksichtigt. So konnte für organische Kationen Transporter eine Inhibition durch Hydrocortison nachgewiesen werden (Bönisch, 2021). Da Glukokortikoide zur Reduktion der Krankheitsaktivität bei rheumatoiden Erkrankungen klinisch weit verbreitet sind (Ruysse-Witrand et al., 2025), könnten solche Interaktionen die Effektivität einer Therapie mit THC und anderen Wirkstoffen maßgeblich beeinflussen.

4.6 Ausblick

Während in einigen Bereichen signifikante Effekte detektiert werden konnten, war die statistische Aussagekraft für Exploration anderer Versuche aufgrund der begrenzten Stichprobenanzahl limitiert. Dies manifestiert sich visuell und rechnerisch als teils große Varianz in den Messwerten, die nach Bereinigung um Extremwerte persistiert. Dennoch lieferten die Daten Evidenz für grundlegende pharmakologische Zusammenhänge, welche in zukünftigen Studien validiert und weiterführend untersucht werden können.

Da nachgewiesen werden konnte, dass TRPA1 einen relevanten Einfluss auf die THC-assoziierte Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit das Zellüberleben hat, diesen Effekt jedoch primär im proinflammatorischen Milieu ausübt, stellt dieser Kanal ein vielversprechendes Ziel für zukünftige Therapiestrategien dar. Nachdem jedoch signifikante Effekte in vielen Versuchsreihen erst bei den höchsten getesteten THC-Konzentrationen (5 μ M, 10 μ M, 25 μ M) nachweisbar waren, erscheint eine systemische Therapie, ob oral oder inhalativ, wenig zielführend, da die durchschnittliche Serum-Konzentration nach Konsumation eines

Einfluss von THC auf den Kalziumhaushalt und die Zytokinproduktion von synovialen Fibroblasten von RA-Patienten

Joints bei etwa 100ng/ml THC liegt ("THC Rechner," 2024), was bei einer molaren Masse von 314,46g/mol ("Delta-9-THC," n.d.) lediglich einer Konzentration von etwa 0,318 $\mu\text{M/l}$ THC entspricht ("Masse-Molaritäts-Rechner," n.d.). Folglich lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass durch den konventionellen Konsum von Cannabinoiden zur symptomatischen Behandlung (zB Schmerzlinderung und antidepressive Effekte) keine THC-Serumspiegel erreicht werden können, die eine direkte Modulation der synovialen Krankheitsaktivität bewirken.

Ein vielversprechender Ansatz für zukünftige Studien wäre eine Lokalbehandlung, wie beispielsweise die Durchführung von Gelenkspülungen mit hochdosiertem THC. Da in dieser Arbeit signifikante Effekte primär auf mit TNF α vorbehandelte Zellen nachgewiesen wurden und die Modulationen des Kalziumhaushaltes sowie der Wirkstoffaufnahme innerhalb weniger Sekunden auftritt, sollte künftig untersucht werden, in welchem Umfang THC nach kurzfristiger Exposition über die Synovia systemisch aufgenommen wird, und was für ein Zeitrahmen einer Exposition mit nachfolgendem Auswaschen des THC's zu einem optimalen Nutzen-Risiko-Profil führt. Insbesondere im Hinblick auf das psychotrope Nebenwirkungsprofil von THC ist eine kritische Evaluation der systemisch verfügbaren Menge an THC nach Lokaltherapie notwendig. Ergänzend dazu wären Kombinationstherapien aus THC und antirheumatischen Wirkstoffen zu evaluieren, da THC nachweislich die Aufnahme von PoPo_3 , dem Surrogatparameters für die Aufnahme von antirheumatischen Wirkstoffen, über organische Kationentransporter fördert und erste Versuche mit CBD und weiteren Wirkstoffen vielversprechende synergistische Ergebnisse lieferten. (Neumann-Raizel et al., 2019)

Zusammenfassend stellt sich THC als vielversprechender Ansatz zur Entwicklung weiterer Therapieansätze für die rheumatoide Arthritis dar.

Literaturverzeichnis

- Ahmed, S., Roth, R.M., Stanciu, C.N., Brunette, M.F., 2021. The Impact of THC and CBD in Schizophrenia: A Systematic Review. *Front. Psychiatry* 12, 694394. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.694394>
- Alon, M.H., Saint-Fleur, M.O., 2017. Synthetic cannabinoid induced acute respiratory depression: Case series and literature review. *Respir. Med. Case Rep.* 22, 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2017.07.011>
- Al-Zoubi, R., Morales, P., Reggio, P.H., 2019. Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1837. <https://doi.org/10.3390/ijms20081837>
- Amatya, N., Garg, A.V., Gaffen, S.L., 2017. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. *Trends Immunol.* 38, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006>
- Antunes-Correa, L.M., Nobre, T.S., Groehs, R.V., Alves, M.J.N.N., Fernandes, T., Couto, G.K., Rondon, M.U.P.B., Oliveira, P., Lima, M., Mathias, W., Brum, P.C., Mady, C., Almeida, D.R., Rossoni, L.V., Oliveira, E.M., Middlekauff, H.R., Negrao, C.E., 2014. Molecular basis for the improvement in muscle metaboreflex and mechanoreflex control in exercise-trained humans with chronic heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H1655-1666. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00136.2014>
- Arkell, T.R., Lintzeris, N., Kevin, R.C., Ramaekers, J.G., Vandrey, R., Irwin, C., Haber, P.S., McGregor, I.S., 2019. Cannabidiol (CBD) content in vaporized cannabis does not prevent tetrahydrocannabinol (THC)-induced impairment of driving and cognition. *Psychopharmacology (Berl.)* 236, 2713–2724. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05246-8>
- Armstrong, J.L., Hill, D.S., McKee, C.S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., Eleni Anagnostou, M., Babatunde, F., Corazzari, M., Redfern, C.P.F., Velasco, G., Lovat, P.E., 2015. Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1629–1637. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.45>
- Atwood, B.K., Mackie, K., 2010. CB2: a cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* 160, 467–479. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00729.x>
- Baker, D., O'Neill, J.K., Gschmeissner, S.E., Wilcox, C.E., Butter, C., Turk, J.L., 1990. Induction of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Biozzi mice. *J. Neuroimmunol.* 28, 261–270. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90019-j](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90019-j)
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J., Patapoutian, A., 2004. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41, 849–857. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00150-3)
- BfArM - Risikoinformationen - Rote-Hand-Brief zu Acomplia®: Europäische Arzneimittelagentur hält Ruhen der Zulassung für erforderlich [WWW Document], n.d. URL <https://www.bfarm.de/SharedDocs/Risikoinformationen/Pharmakovigilanz/DE/RHB/2008/rhb-acomplia.html> (accessed 3.27.24).
- Biali, M.E., Broers, B., Besson, M., Demeules, J., 2020. Cannabinoids and COVID-19. *Med. Cannabis Cannabinoids* 3, 111. <https://doi.org/10.1159/000510799>
- Bilbao, A., Spanagel, R., 2022. Medical cannabinoids: a pharmacology-based systematic review and meta-analysis for all relevant medical indications. *BMC Med.* 20, 259. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02459-1>
- Black, R.J., Lester, S., Tieu, J., Sinnathurai, P., Barrett, C., Buchbinder, R., Lassere, M., March, L., Proudman, S.M., Hill, C.L., 2023. Mortality estimates and excess mortality in

- rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* 62, 3576–3583. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kead106>
- Blumenauer, B., Judd, M., Wells, G., Burls, A., Cranney, A., Hochberg, M., Tugwell, P., 2002. Infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2002, CD003785. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003785>
- Bönisch, H., 2021. Substrates and Inhibitors of Organic Cation Transporters (OCTs) and Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT) and Therapeutic Implications, in: Daws, L.C. (Ed.), *Organic Cation Transporters in the Central Nervous System*. Springer International Publishing, Cham, pp. 119–167. https://doi.org/10.1007/164_2021_516
- Bradley, J., 2008. TNF-mediated inflammatory disease. *J. Pathol.* 214, 149–160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Brauchi, S.E., Rothberg, B.S., 2020. Gating and calcium-sensing mechanisms of TRPA1 channels revealed. *Cell Calcium* 91, 102278. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102278>
- Bröcker, B., Schütt, C., Fleischer, B., 2019. *Grundwissen Immunologie*, 4th ed. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- Cabral, G.A., McNerney, P.J., Mishkin, E.M., 1987. Effect of micromolar concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol on herpes simplex virus type 2 replication in vitro. *J. Toxicol. Environ. Health* 21, 277–293. <https://doi.org/10.1080/15287398709531019>
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., Garcia, S., Guzmán, M., Velasco, G., Iovanna, J.L., 2006. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 66, 6748–6755. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0169>
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 3666–3670. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3666>
- Casanova, J.-L., MacMicking, J.D., Nathan, C.F., 2024. Interferon- γ and infectious diseases: Lessons and prospects. *Science* 384, eadl2016. <https://doi.org/10.1126/science.adl2016>
- Chainani, A., Matson, A., Chainani, M., Colon, A.J.M., Toth, A.P., Garrigues, G.E., Little, D., 2020. Contracture and transient receptor potential channel upregulation in the anterior glenohumeral joint capsule of patients with end-stage osteoarthritis. *J. Shoulder Elbow Surg.* 29, e253–e268. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2019.11.013>
- Chang, W.J., Chehab, M., Kink, S., Toledo-Pereyra, L.H., 2010. Intracellular calcium signaling pathways during liver ischemia and reperfusion. *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* 23, 228–238. <https://doi.org/10.3109/08941939.2010.496036>
- Chayasirisobhon, S., 2020. Mechanisms of Action and Pharmacokinetics of Cannabis. *Perm. J.* 25, 19.200. <https://doi.org/10.7812/TPP/19.200>
- Chen, X., Gáborik, Z., Mao, Q., Unadkat, J.D., 2024. Are Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Its Major Metabolites Substrates or Inhibitors of Placental or Human Hepatic Drug Solute-Carrier Transporters? *Int. J. Mol. Sci.* 25, 12036. <https://doi.org/10.3390/ijms252212036>
- Conrad, N., Misra, S., Verbakel, J.Y., Verbeke, G., Molenberghs, G., Taylor, P.N., Mason, J., Sattar, N., McMurray, J.J.V., McInnes, I.B., Khunti, K., Cambridge, G., 2023. Incidence, prevalence, and co-occurrence of autoimmune disorders over time and by age, sex, and socioeconomic status: a population-based cohort study of 22 million individuals in the UK. *The Lancet* 401, 1878–1890. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00457-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00457-9)
- Console-Bram, L., Brailoiu, E., Brailoiu, G.C., Sharir, H., Abood, M.E., 2014. Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: a tale of biased agonism. *Br. J. Pharmacol.* 171, 3908–3917. <https://doi.org/10.1111/bph.12746>

- Cortright, D.N., Krause, J.E., Broom, D.C., 2007. TRP channels and pain. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 978–988. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.003>
- Cremer-Schaeffer, P., Langer, S., Ärzteblatt, D.Ä.G., Redaktion Deutsches, 2024. Verschreibung von Cannabisarzneimitteln an Selbstzahlende [WWW Document]. *Dtsch. Ärztebl.* URL <https://www.aerzteblatt.de/archiv/239101/Verschreibung-von-Cannabisarzneimitteln-an-Selbstzahlende> (accessed 12.9.24).
- Croft, A.P., Campos, J., Jansen, K., Turner, J.D., Marshall, J., Attar, M., Savary, L., Wehmeyer, C., Naylor, A.J., Kemble, S., Begum, J., Duerholz, K., Perlman, H., Barone, F., McGettrick, H.M., Fearon, D.T., Wei, K., Raychaudhuri, S., Korsunsky, I., Brenner, M.B., Coles, M., Sansom, S.N., Filer, A., Buckley, C.D., 2019. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature* 570, 246–251. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1263-7>
- De Petrocellis, L., Ligresti, A., Schiano Moriello, A., Allarà, M., Bisogno, T., Petrosino, S., Stott, C.G., Di Marzo, V., 2011. Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.*, Themed issue: Cannabinoids in Biology and Medicin, Part 1. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01166.x>
- De Petrocellis, L., Orlando, P., Moriello, A.S., Aviello, G., Stott, C., Izzo, A.A., Di Marzo, V., 2012. Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 204, 255–266. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2011.02338.x>
- Delta-9-THC [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/publications/m/item/delta-9-thc> (accessed 12.14.25).
- Devinsky, O., Cross, J.H., Laux, L., Marsh, E., Miller, I., Nabbout, R., Scheffer, I.E., Thiele, E.A., Wright, S., Cannabidiol in Dravet Syndrome Study Group, 2017. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 376, 2011–2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611618>
- Eichler, M., Spinedi, L., Unfer-Grauwiler, S., Bodmer, M., Surber, C., Luedi, M., Drewe, J., 2012. Heat exposure of Cannabis sativa extracts affects the pharmacokinetic and metabolic profile in healthy male subjects. *Planta Med.* 78, 686–691. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1298334>
- El-Alfy, A.T., Ivey, K., Robinson, K., Ahmed, S., Radwan, M., Slade, D., Khan, I., ElSohly, M., Ross, S., 2010. Antidepressant-like effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from Cannabis sativa L. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 434. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.004>
- Elmes, M.W., Kaczocha, M., Berger, W.T., Leung, K., Ralph, B.P., Wang, L., Sweeney, J.M., Miyauchi, J.T., Tsirka, S.E., Ojima, I., Deutsch, D.G., 2015. Fatty Acid-binding Proteins (FABPs) Are Intracellular Carriers for Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Cannabidiol (CBD)*. *J. Biol. Chem.* 290, 8711–8721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618447>
- Emmanuel S. Onavi, Hiroki Ishiguro, Zhicheng Lin, Babatunde E. Akinshola, Ping-Wu Zhang, George R. Uhl, Richard E. Musty, Eliot L. Gardner, Stephen J. Heishman, Vincenzo Di Marzo, Luciano De Petrocellis, Tiziana Bisogno, Alvin Berger, Raphael Mechoulam, Ester Fride, M. Clara Sanudo-Pena, William H. Wilson, Roy J. Mathew, Guy A. Cabral, Nadia Solowij, Laura L. Murphy, B. C. Paria, S. K. Dey, Nissar A Darmani, Sumner H. Burstein, Michelle Glass, Sean D. McAllister, Gabriel G. Nahas, D. Harvey, K. M. Sutin, H. Turndorf, R. Cancro, Patricia H. Reggio, Sonya L. Palmer, Atmaram D. Khanolkar, Alexandros Makriyannis, Paul Schweitzer, Michael D. Randall, David Harris, David A. Kendall, David Shire, Paul Gouldson, Bernhard Calandra, Marielle Portier, Monsif Bouaboula, Francis Barth, Murielle Rinaldi-Carmona, Pierre Casellas, Gerard Le Fur, Pascual Ferrara, J. Michael Walker, Nicole M. Strangman, Susan M.

- Huang, Robert E. Hampson, Elena Grigorenko, Sam. A. Deadwyler, John R. Hubbard, 2002. *Biology of Marijuana - From Gene to Behavior*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Englund, A., Oliver, D., Chesney, E., Chester, L., Wilson, J., Sovi, S., De Micheli, A., Hodsoll, J., Fusar-Poli, P., Strang, J., Murray, R.M., Freeman, T.P., McGuire, P., 2023. Does cannabidiol make cannabis safer? A randomised, double-blind, cross-over trial of cannabis with four different CBD:THC ratios. *Neuropsychopharmacology* 48, 869–876. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01478-z>
- Fernández-Ruiz, J., Romero, J., Ramos, J.A., 2015. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. *Handb. Exp. Pharmacol.* 231, 233–259. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20825-1_8
- Filipeanu, C.M., De Zeeuw, D., Nelemans, S.A., 1997. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol activates $[Ca^{2+}]_i$ increases partly sensitive to capacitative store refilling. *Eur. J. Pharmacol.* 336, R1–R3. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01254-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01254-5)
- Fischer, M.J.M., Balasuriya, D., Jeggle, P., Goetze, T.A., McNaughton, P.A., Reeh, P.W., Edwardson, J.M., 2014. Direct evidence for functional TRPV1/TRPA1 heteromers. *Pflugers Arch.* 466, 2229–2241. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1497-z>
- Funada, M., Tomiyama, K.-I., 2020. [Dependence and Cytotoxicity of Components of Cannabis]. *Yakugaku Zasshi* 140, 205–214. <https://doi.org/10.1248/yakushi.19-00195-4>
- Gabay, C., Arend, W.P., 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with IL-1 inhibitors. *Springer Semin. Immunopathol.* 20, 229–246. <https://doi.org/10.1007/BF00832009>
- Galiègue, S., Mary, S., Marchand, J., Dussossoy, D., Carrière, D., Carayon, P., Bouaboula, M., Shire, D., Le Fur, G., Casellas, P., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur. J. Biochem.* 232, 54–61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20780.x>
- Gaston, T.E., Friedman, D., 2017. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav.* EB 70, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.11.016>
- Green, K., Kim, K., 1976. Interaction of adrenergic antagonists with prostaglandin E₂ and tetrahydrocannabinol in the eye. *Invest. Ophthalmol.* 15, 102–111.
- Grotenhermen, F., 2003. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids. *Clin. Pharmacokinet.* 42, 327–360. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00003>
- Haar, G., Hrachova, K., Wagner, T., Boehm, S., Schicker, K., 2023. Impairment of exocytotic transmitter release by decynium-22 through an inhibition of ion channels. *Front. Pharmacol.* 14, 1276100. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1276100>
- Haney, M., Malcolm, R.J., Babalonis, S., Nuzzo, P.A., Cooper, Z.D., Bedi, G., Gray, K.M., McRae-Clark, A., Lofwall, M.R., Sparenborg, S., Walsh, S.L., 2016. Oral Cannabidiol does not Alter the Subjective, Reinforcing or Cardiovascular Effects of Smoked Cannabis. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 41, 1974–1982. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.367>
- Hasbi, A., Madras, B.K., George, S.R., 2023. Endocannabinoid System and Exogenous Cannabinoids in Depression and Anxiety: A Review. *Brain Sci.* 13, 325. <https://doi.org/10.3390/brainsci13020325>
- Hettenkofer, H.-J., 2003. *Rheumatologie; Diagnostik - Klinik - Therapie*, 5th ed. Georg Thieme Verlag.
- Hézode, C., Roudot-Thoraval, F., Nguyen, S., Grenard, P., Julien, B., Zafrani, E.-S., Pawlotsky, J.-M., Dhumeaux, D., Lotersztajn, S., Mallat, A., 2005. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 42, 63–71. <https://doi.org/10.1002/hep.20733>

- Hill, M.N., Gorzalka, B.B., 2005. Is there a role for the endocannabinoid system in the etiology and treatment of melancholic depression? *Behav. Pharmacol.* 16, 333–352. <https://doi.org/10.1097/00008877-200509000-00006>
- Hind, W.H., England, T.J., O’Sullivan, S.E., 2016. Cannabidiol protects an in vitro model of the blood–brain barrier from oxygen-glucose deprivation via PPAR γ and 5-HT $1A$ receptors. *Br. J. Pharmacol.* 173, 815. <https://doi.org/10.1111/bph.13368>
- Hoffman, D.R., 1973. Estimation of serum IgE by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Allergy Clin. Immunol.* 51, 303–307. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(73\)90132-2](https://doi.org/10.1016/0091-6749(73)90132-2)
- Howlett, A.C., Abood, M.E., 2017. CB1 & CB2 Receptor Pharmacology. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 80, 169–206. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>
- Hu, B., Huang, S., Yin, L., 2021. The cytokine storm and COVID-19. *J. Med. Virol.* 93, 250–256. <https://doi.org/10.1002/jmv.26232>
- Huangfu, L., Li, R., Huang, Y., Wang, S., 2023. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 402. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01620-3>
- Hwang, Y.-N., Kwon, I.-S., Park, J.-H., Na, H.-H., Kwon, T.-H., Park, J.-S., Kim, K.-C., 2023. Cell death induction and intracellular vesicle formation in human colorectal cancer cells treated with $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol. *Genes Genomics* 45, 1463–1474. <https://doi.org/10.1007/s13258-023-01466-7>
- Ismail, M., Hasan, H., El-Orfali, Y., Ismail, H., Khawaja, G., 2018. Anti-Inflammatory, Antioxidative, and Hepatoprotective Effects of Trans $\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol/Sesame Oil on Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2018, 9365464. <https://doi.org/10.1155/2018/9365464>
- Iwasaki, T., Watanabe, R., Ito, H., Fujii, T., Okuma, K., Oku, T., Hirayama, Y., Ohmura, K., Murata, K., Murakami, K., Yoshitomi, H., Tanaka, M., Matsuda, S., Matsuda, F., Morinobu, A., Hashimoto, M., 2022. Dynamics of Type I and Type II Interferon Signature Determines Responsiveness to Anti-TNF Therapy in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* 13, 901437. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.901437>
- Jang, D., Lee, A.-H., Shin, H.-Y., Song, H.-R., Park, J.-H., Kang, T.-B., Lee, S.-R., Yang, S.-H., 2021. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>
- Jordt, S.-E., Bautista, D.M., Chuang, H.-H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Högestätt, E.D., Meng, I.D., Julius, D., 2004. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427, 260–265. <https://doi.org/10.1038/nature02282>
- Joshi, N., Onaivi, E.S., 2021. Psychiatric Disorders and Cannabinoid Receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1264, 131–153. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_9
- Kenakin, T., 1987. Agonists, partial agonists, antagonists, inverse agonists and agonist/antagonists? *Trends Pharmacol. Sci.* 8, 423–426. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(87\)90229-X](https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90229-X)
- KI Disclaimer Vorlage und Muster | 1a-Studi [WWW Document], n.d. URL <https://www.1a-studi.de/bachelorarbeit/ki-disclaimer> (accessed 1.15.26).
- Kochukov, M.Y., McNearney, T.A., Fu, Y., Westlund, K.N., 2006. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 291, C424–C432. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00553.2005>
- Konishi, H., Kanou, S.-E., Yukimatsu, R., Inui, M., Sato, M., Yamamoto, N., Nakano, M., Koshiba, M., 2022. Adenosine inhibits TNF α -induced MMP-3 production in MH7A rheumatoid arthritis synoviocytes via A2A receptor signaling. *Sci. Rep.* 12, 6033. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10012-6>

- Koumas, L., King, A.E., Critchley, H.O.D., Kelly, R.W., Phipps, R.P., 2001. Fibroblast Heterogeneity. *Am. J. Pathol.* 159, 925–935.
- LeBleu, V.S., Neilson, E.G., 2019. Origin and functional heterogeneity of fibroblasts. *Faseb J.* <https://doi.org/10.1096/fj.201903188R>
- Lee, K., Min, H.K., Koh, S.-H., Lee, S.-H., Kim, H.-R., Ju, J.H., Kim, H.-Y., 2022. Prognostic signature of interferon- γ and interleukin-17A in early rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 40, 999–1005. <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/mkbvch>
- Leite, C.E., Mocelin, C.A., Petersen, G.O., Leal, M.B., Thiesen, F.V., 2009. Rimobabant: an antagonist drug of the endocannabinoid system for the treatment of obesity. *Pharmacol. Rep.* 61, 217–224. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70025-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70025-8)
- Lemberger, L., Crabtree, R.E., Rowe, H.M., 1972. 11-hydroxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: pharmacology, disposition, and metabolism of a major metabolite of marijuana in man. *Science* 177, 62–64. <https://doi.org/10.1126/science.177.4043.62>
- Levine, J.D., Alessandri-Haber, N., 2007. TRP channels: Targets for the relief of pain. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.01.008>
- Li, D., Ilynskyy, Y., Ghasemi Gojani, E., Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., 2022. Analysis of Anti-Cancer and Anti-Inflammatory Properties of 25 High-THC Cannabis Extracts. *Mol. Basel Switz.* 27, 6057. <https://doi.org/10.3390/molecules27186057>
- Lin, Y.-J., Anzaghe, M., Schülke, S., 2020. Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells* 9, 880. <https://doi.org/10.3390/cells9040880>
- Lopatnikova, J., Golikova, E., Shkaruba, N., Sizikov, A., Sennikov, S., 2013. Analysis of the levels of tumour necrosis factor (TNF), autoantibodies to TNF, and soluble TNF receptors in patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 42, 429–432. <https://doi.org/10.3109/03009742.2013.794471>
- Lowin, T., Anssar, T.M., Bäuml, M., Classen, T., Schneider, M., Pongratz, G., 2020a. Positive and negative cooperativity of TNF and Interferon- γ in regulating synovial fibroblast function and B cell survival in fibroblast/B cell co-cultures. *Sci. Rep.* 10, 780. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57772-7>
- Lowin, T., Apitz, M., Anders, S., Straub, R.H., 2015. Anti-inflammatory effects of N-acylethanolamines in rheumatoid arthritis synovial cells are mediated by TRPV1 and TRPA1 in a COX-2 dependent manner. *Arthritis Res. Ther.* 17, 321. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0845-5>
- Lowin, T., Bleck, J., Schneider, M., Pongratz, G., 2018. Selective killing of proinflammatory synovial fibroblasts via activation of transient receptor potential ankyrin (TRPA1). *Biochem. Pharmacol.* 154, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.05.015>
- Lowin, T., Kok, C., Smutny, S., Pongratz, G., 2022. Impact of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol on Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts Alone and in Co-Culture with Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biomedicines* 10, 1118. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051118>
- Lowin, T., Schneider, M., Pongratz, G., 2019. Joints for joints: cannabinoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 31, 271–278. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000590>
- Lowin, T., Tingting, R., Zurmahr, J., Classen, T., Schneider, M., Pongratz, G., 2020b. Cannabidiol (CBD): a killer for inflammatory rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Cell Death Dis.* 11, 714. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02892-1>
- Lu, H.-C., Mackie, K., 2016. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* 79, 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Lucas, C.J., Galettis, P., Schneider, J., 2018. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 84. <https://doi.org/10.1111/bcp.13710>

- M. Perez-Reyes, M. E. Wall, 1982. Presence of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol in Human Milk. *N. Engl. J. Med.* 307, 819–820. <https://doi.org/10.1056/NEJM198209233071311>
- Manera, C., Bertini, S., 2021. Cannabinoid-Based Medicines and Multiple Sclerosis, in: Murillo-Rodriguez, E., Pandi-Perumal, S.R., Monti, J.M. (Eds.), *Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders*. Springer International Publishing, Cham, pp. 111–129. https://doi.org/10.1007/978-3-030-57369-0_8
- Masi, A.T., Chrousos, G.P., 2003. Polycystic ovarian syndrome and rheumatoid arthritis: possible physiopathogenetic clues to hormonal influences on chronic inflammation. *Semin. Arthritis Rheum.* 33, 67–71. [https://doi.org/10.1016/s0049-0172\(02\)70110-8](https://doi.org/10.1016/s0049-0172(02)70110-8)
- Masse-Molaritäts-Rechner [WWW Document], n.d. URL <https://www.qiagen.com/de/applications/enzymes/tools-and-calculators/molarity-calculator> (accessed 12.14.25).
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., Gaffen, S.L., 2019. The IL-17 family of cytokines in health and disease. *Immunity* 50, 892–906. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.021>
- McPartland, J.M., MacDonald, C., Young, M., Grant, P.S., Furkert, D.P., Glass, M., 2017. Affinity and Efficacy Studies of Tetrahydrocannabinolic Acid A at Cannabinoid Receptor Types One and Two. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 87. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0032>
- Micale, V., Di Marzo, V., Sulcova, A., Wotjak, C.T., Drago, F., 2013. Endocannabinoid system and mood disorders: Priming a target for new therapies. *Pharmacol. Ther.* 138, 18–37. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.002>
- Micale, V., Drago, F., 2018. Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *Eur. J. Pharmacol.* 834, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.039>
- Mishkin, E.M., Cabral, G.A., 1985. delta-9-Tetrahydrocannabinol decreases host resistance to herpes simplex virus type 2 vaginal infection in the B6C3F1 mouse. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 12), 2539–2549. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-12-2539>
- Moreira, F.A., Kaiser, N., Monory, K., Lutz, B., 2008. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2007.07.005>
- Muller, C., Morales, P., Reggio, P.H., 2019. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 487. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>
- Murataeva, N., Straiker, A., Mackie, K., 2014. Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1379–1391. <https://doi.org/10.1111/bph.12411>
- Murphy, K., Weaver, C., 2018. *Janeway Immunologie*, 9th ed. Springer Spektrum Berlin, Heidelberg.
- Neumann-Raizel, H., Shilo, A., Lev, S., Mogilevsky, M., Katz, B., Shneur, D., Shaul, Y.D., Leffler, A., Gabizon, A., Karni, R., Honigman, A., Binshtok, A.M., 2019. 2-APB and CBD-Mediated Targeting of Charged Cytotoxic Compounds Into Tumor Cells Suggests the Involvement of TRPV2 Channels. *Front. Pharmacol.* 10, 1198. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01198>
- Nichols, J.M., Kaplan, B.L., 2020. Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis Cannabinoid Res.* 5, 12. <https://doi.org/10.1089/can.2018.0073>
- Nilius, B., Flockerzi, V. (Eds.), 2014. *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels: Volume I, Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2>
- Noori, A., Miroshnychenko, A., Shergill, Y., Ashoorion, V., Rehman, Y., Couban, R.J., Buckley, D.N., Thabane, L., Bhandari, M., Guyatt, G.H., Agoritsas, T., Busse, J.W., 2021. Opioid-sparing effects of medical cannabis or cannabinoids for chronic pain: a

- systematic review and meta-analysis of randomised and observational studies. *BMJ Open* 11, e047717. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-047717>
- Nowell, W.B., Gavigan, K., L Silverman, S., 2022. Cannabis for Rheumatic Disease Pain: a Review of Current Literature. *Curr. Rheumatol. Rep.* 24, 119–131. <https://doi.org/10.1007/s11926-022-01065-7>
- Ohashi, N., Tashima, K., Namiki, T., Horie, S., 2023. Allyl isothiocyanate, an activator of TRPA1, increases gastric mucosal blood flow through calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin in anesthetized rats. *J. Pharmacol. Sci.* 151, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2023.02.002>
- Onaivi, E.S., 2010. Endocannabinoid system, pharmacogenomics and response to therapy. *Pharmacogenomics* 11, 907–910. <https://doi.org/10.2217/pgs.10.91>
- Ong, H.L., de Souza, L.B., Cheng, K.T., Ambudkar, I.S., 2014. Physiological functions and regulation of TRPC channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 223, 1005–1034. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05161-1_12
- PACHER, P., BÁTKAI, S., KUNOS, G., 2006. The Endocannabinoid System as an Emerging Target of Pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 389–462. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.2>
- Palazzo, E., Luongo, L., Bellini, G., Guida, F., Marabese, I., Boccella, S., Rossi, F., Maione, S., de Novellis, V., 2012. Changes in cannabinoid receptor subtype 1 activity and interaction with metabotropic glutamate subtype 5 receptors in the periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla pathway in a rodent neuropathic pain model. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11, 148–161. <https://doi.org/10.2174/187152712800269731>
- Pérez, R., Glaser, T., Villegas, C., Burgos, V., Ulrich, H., Paz, C., 2022. Therapeutic Effects of Cannabinoids and Their Applications in COVID-19 Treatment. *Life* 12, 2117. <https://doi.org/10.3390/life12122117>
- Pertwee, R.G., 2007. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ 9-tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 153, 199. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>
- Radu, A.-F., Bungau, S.G., 2021. Management of Rheumatoid Arthritis: An Overview. *Cells* 10, 2857. <https://doi.org/10.3390/cells10112857>
- Rao, G.K., Zhang, W., Kaminski, N.E., 2004. Cannabinoid receptor-mediated regulation of intracellular calcium by delta(9)-tetrahydrocannabinol in resting T cells. *J. Leukoc. Biol.* 75, 884–892. <https://doi.org/10.1189/jlb.1203638>
- Ren, J., Masi, A.T., Aldag, J.C., Asche, C.V., 2020. Hereditary, socio-behavioural, and immuno-hormonal predictors of incident rheumatoid arthritis and therapy response influences on survival versus matched control subjects using a generalised structural equation model. *Clin. Exp. Rheumatol.* 38, 640–648.
- Rezende, B., Alencar, A.K.N., Bem, G.F. de, Fontes-Dantas, F.L., Montes, G.C., 2023. Endocannabinoid System: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Pharmaceuticals* 16, 148. <https://doi.org/10.3390/ph16020148>
- Rheumatoid arthritis [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/rheumatoid-arthritis> (accessed 4.28.24).
- Richardson, D., Pearson, R.G., Kurian, N., Latif, M.L., Garle, M.J., Barrett, D.A., Kendall, D.A., Scammell, B.E., Reeve, A.J., Chapman, V., 2008. Characterisation of the cannabinoid receptor system in synovial tissue and fluid in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10, R43. <https://doi.org/10.1186/ar2401>
- Rieder, S.A., Chauhan, A., Singh, U., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P., 2010. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 215, 598–605. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.04.001>

- Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H., 1998. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 9, 145–154.
- Rodríguez Mesa, X.M., Moreno Vergara, A.F., Contreras Bolaños, L.A., Guevara Moriones, N., Mejía Piñeros, A.L., Santander González, S.P., 2021. Therapeutic Prospects of Cannabinoids in the Immunomodulation of Prevalent Autoimmune Diseases. *Cannabis Cannabinoid Res.* 6, 196–210. <https://doi.org/10.1089/can.2020.0183>
- Roser, P., 2019. Cannabis und Schizophrenie – Risikofaktoren, diagnostische Einordnung und Auswirkungen auf Verlauf und Prognose. *Forensische Psychiatr. Psychol. Kriminol.* 13, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s11757-019-00543-6>
- Ruscitti, P., Cipriani, P., Liakouli, V., Carubbi, F., Berardicurti, O., Di Benedetto, P., Ciccia, F., Guggino, G., Alvaro, S., Triolo, G., Giacomelli, R., 2018. The Emerging Role of IL-1 Inhibition in Patients Affected by Rheumatoid Arthritis and Diabetes. *Rev. Recent Clin. Trials* 13, 210–214. <https://doi.org/10.2174/1574887113666180314102651>
- Russo, E., Guy, G.W., 2006. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med. Hypotheses* 66, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.08.026>
- Ruysen-Witrand, A., Brusq, C., Masson, M., Bongard, V., Salliot, C., Poiroux, L., Nguyen, M., Roux, C.H., Richez, C., Saraux, A., Vergne-Salle, P., Morel, J., Flipo, R.-M., Piperno, M., Gottenberg, J.-E., Marotte, H., Soubrier, M., Gossec, L., Dieudé, P., Lassoued, S., Zabraniecki, L., Couture, G., Boyer, J.F., Jamard, B., Degboe, Y., Constantin, A., 2025. Comparison of two strategies of glucocorticoid withdrawal in patients with rheumatoid arthritis in low disease activity (STAR): a randomised, placebo- controlled, double-blind trial. *Ann. Rheum. Dis.* 84, 49–59. <https://doi.org/10.1136/ard-2024-226620>
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., Nowak, J., Fimia, G.M., Piacentini, M., Cecconi, F., Pandolfi, P.P., González-Feria, L., Iovanna, J.L., Guzmán, M., Boya, P., Velasco, G., 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1359–1372. <https://doi.org/10.1172/jci37948>
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Davila, D., Francis, S.E., Guzmán, M., Kiss-Toth, E., Velasco, G., 2013. The pseudokinase tribbles homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1573–1578. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2013.03.014>
- Sativex® 27 mg/25 mg Spray zur Anwendung in der Mundhöhle, 2023.
- Scherer, H.U., Häupl, T., Burmester, G.R., 2020. The etiology of rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 110, 102400. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.102400>
- Schilling, W.P., Wasylyna, T., Dubyak, G.R., Humphreys, B.D., Sinkins, W.G., 1999. Maitotoxin and P2Z/P2X(7) purinergic receptor stimulation activate a common cytolytic pore. *Am. J. Physiol.* 277, C766-776. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.4.C766>
- Schurman, L.D., Lu, D., Kendall, D.A., Howlett, A.C., Lichtman, A.H., 2020. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology. *Handb. Exp. Pharmacol.* 258, 323–353. https://doi.org/10.1007/164_2019_298
- Schwoppe, D.M., Karschner, E.L., Gorelick, D.A., Huestis, M.A., 2011. Identification of Recent Cannabis Use: Whole-Blood and Plasma Free and Glucuronidated Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Smoked Cannabis Administration. *Clin. Chem.* 57, 1406. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.171777>

- Silverman, H.A., Chen, A., Kravatz, N.L., Chavan, S.S., Chang, E.H., 2020. Involvement of Neural Transient Receptor Potential Channels in Peripheral Inflammation. *Front. Immunol.* 11, 590261. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.590261>
- Stella, N., 2010. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 58, 1017–1030. <https://doi.org/10.1002/glia.20983>
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A., 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819–829. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00158-2)
- Stueber, T., Eberhardt, M.J., Hadamitzky, C., Jangra, A., Schenk, S., Dick, F., Stoetzer, C., Kistner, K., Reeh, P.W., Binshtok, A.M., Leffler, A., 2016. Quaternary Lidocaine Derivative QX-314 Activates and Permeates Human TRPV1 and TRPA1 to Produce Inhibition of Sodium Channels and Cytotoxicity. *Anesthesiology* 124, 1153–1165. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001050>
- Suraev, A.S., Marshall, N.S., Vandrey, R., McCartney, D., Benson, M.J., McGregor, I.S., Grunstein, R.R., Hoyos, C.M., 2020. Cannabinoid therapies in the management of sleep disorders: A systematic review of preclinical and clinical studies. *Sleep Med. Rev.* 53, 101339. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2020.101339>
- Tabatabaei, M.S., Ahmed, M., 2022. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 2508, 115–134. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2376-3_10
- Tanaka, T., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2014. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tashkin, D.P., Baldwin, G.C., Sarafian, T., Dubinett, S., Roth, M.D., 2002. Respiratory and Immunologic Consequences of Marijuana Smoking. *J. Clin. Pharmacol.* 42, 71S–81S. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.2002.tb06006.x>
- THC Rechner: THC-Abbauwerte im Blut & Urin berechnen [WWW Document], 2024. URL <https://www.cannabis-aerzte.de/thc-rechner/> (accessed 12.14.25).
- Thiele, E.A., Marsh, E.D., French, J.A., Mazurkiewicz-Beldzinska, M., Benbadis, S.R., Joshi, C., Lyons, P.D., Taylor, A., Roberts, C., Sommerville, K., GWPCARE4 Study Group, 2018. Cannabidiol in patients with seizures associated with Lennox-Gastaut syndrome (GWPCARE4): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 391, 1085–1096. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30136-3)
- Tombes, R.M., Borisy, G.G., 1989. Intracellular free calcium and mitosis in mammalian cells: anaphase onset is calcium modulated, but is not triggered by a brief transient. *J. Cell Biol.* 109, 627–636. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.2.627>
- Tsalskan, V., Firestein, G.S., 2022. Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 67, 102304. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102304>
- Tsou, K., Brown, S., Sañudo-Peña, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83, 393–411. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(97\)00436-3](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(97)00436-3)
- Tsuboi, K., Ikematsu, N., Uyama, T., Deutsch, D.G., Tokumura, A., Ueda, N., 2013. Biosynthetic pathways of bioactive N-acylethanolamines in brain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12. <https://doi.org/10.2174/1871527311312010005>
- Van Zandt, A.R., Horn, M.D., Peterson, T.A., Dickinson, S.Y., Frost, E.M., MacLean, A.G., 2025. THC reverses SIV-induced senescence in astrocytes: possible compensatory

- mechanism against HIV associated brain injury? *Front. Cell. Neurosci.* 19, 1642917. <https://doi.org/10.3389/fncel.2025.1642917>
- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T., Nilius, B., 2003. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424, 434–438. <https://doi.org/10.1038/nature01807>
- Whyte, M.K., Hardwick, S.J., Meagher, L.C., Savill, J.S., Haslett, C., 1993. Transient elevations of cytosolic free calcium retard subsequent apoptosis in neutrophils in vitro. *J. Clin. Invest.* 92, 446–455. <https://doi.org/10.1172/JCI116587>
- Xu, S., Zhao, J.-Y., Ma, J.-Y., Cui, X.-L., Lin, J.-H., Sun, S.-Y., Liu, S.-J., Zhou, G.-K., Zhang, J.-T., Kang, P., Liu, T., 2025. Desensitization of TRPA1 by dimethyl itaconate attenuates acute and chronic pain in mice. *Front. Pharmacol.* 16, 1671461. <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1671461>
- Yan, Q., Gao, C., Li, M., Lan, R., Wei, S., Fan, R., Cheng, W., 2024. TRP Ion Channels in Immune Cells and Their Implications for Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 2719. <https://doi.org/10.3390/ijms25052719>
- Yazdi, A.S., Ghoreschi, K., 2016. The Interleukin-1 Family. *Adv. Exp. Med. Biol.* 941, 21–29. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0921-5_2
- Ye, L., Zeng, Q., Ling, M., Ma, R., Chen, H., Lin, F., Li, Z., Pan, L., 2021. Inhibition of IP3R/Ca²⁺ Dysregulation Protects Mice From Ventilator-Induced Lung Injury via Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Pathways. *Front. Immunol.* 12, 729094. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729094>
- Zhao, J., Lin King, J.V., Paulsen, C.E., Cheng, Y., Julius, D., 2020. Irritant-evoked activation and calcium modulation of the TRPA1 receptor. *Nature* 585, 141–145. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2480-9>

Anhang

Tabelle 7: p-Werte von Kalzium absolut

Kalzium absolut		
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante THC-Konzentrationen ($p < 0,5$)</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz THC Konzentrationen ($p < 0,1$)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	1 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF A967	/	25 (0,051)
HBSS Kein TNF BAPTA	1 ($< 0,001$) 10 (0,037) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF COR	5 ($< 0,001$) 10 (0,018) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF CsA	1 ($< 0,001$) 5 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF D22	1 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF	1 ($< 0,001$) 25 (0,036)	/

HC3		
HBSS	1 (< 0,001)	0,1 (0,05)
Kein TNF	25 (< 0,001)	
Rim		
HBSS	0,1 (< 0,001)	/
Kein TNF	1 (< 0,001)	
RR		
HBSS	0,1 (< 0,001)	1 (0,086)
Kein TNF	25 (< 0,001)	
THC		
HBSS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
Kein Zusatz	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	1 (0,049)	0,1 (0,083)
TNF	25 (< 0,001)	
A967		
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
BAPTA	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
COR	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	

CsA	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,005)	/
TNF	25 (< 0,001)	
HC3		
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
HBSS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
RR		
HBSS	5 (0,002)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	
TNF	10 (< 0,001)	
Kein Zusatz	25 (< 0,001)	
PBS	/	/
TNF		
A967		
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
BAPTA		

PBS	5 (0,006)	/
TNF	10 (< 0,001)	
COR	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
CsA	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
PBS	25 (< 0,001)	/
TNF		
HC3		
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
RR		
PBS	5 (0,006)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	

Tabelle 8: p-Werte von Kalzium auf die ersten 4 Messungen

Kalzium auf die ersten 4 Messungen		
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante THC-Konzentrationen ($p < 0,5$)</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz THC Konzentrationen ($p < 0,1$)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	/	5 (0,057)
HBSS Kein TNF A967	25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF BAPTA	5 ($< 0,001$) 10 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF COR	0,1 (0,044) 5 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF CsA	1 ($< 0,001$) 5 (0,002) 10 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF D22	25 ($< 0,001$)	/
HBSS	5 ($< 0,001$)	/

Kein TNF HC3	25 (0,038)/	
HBSS Kein TNF Rim	5 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF RR	1 (0,002) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001)	0,1 (0,086)
HBSS Kein TNF THC	5 (< 0,001)	/
HBSS TNF Kein Zusatz	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF A967	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF BAPTA	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF COR	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS	5 (< 0,001)	/

TNF	10 (< 0,001)	
CsA	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
HC3	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Kein Zusatz	25 (< 0,001)	
PBS	25 (< 0,001)	/
TNF		
A967		
PBS	5 (0,006)	/
TNF	10 (< 0,001)	

BAPTA	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
COR	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
CsA	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
HC3		
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
PBS	5 (0,031)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
PBS	5 (0,017)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	

Tabelle 9: p-Werte von Kalzium auf die Kontrolle

Kalzium auf die Kontrolle		
----------------------------------	--	--

<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante THC-Konzentrationen ($p < 0,5$)</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz THC Konzentrationen ($p < 0,1$)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	5 (0,002)	/
HBSS Kein TNF A967	0,1 (0,001) 5 (0,038) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF BAPTA	0,1 ($< 0,001$) 1 ($< 0,001$) 5 ($< 0,001$) 10 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF COR	0,1 (0,003) 5 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF CsA	1 ($< 0,001$) 5 ($< 0,001$) 10 ($< 0,001$)	0,1 (0,064)
HBSS Kein TNF D22	10 (0,022) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF	5 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/

HC3		
HBSS Kein TNF Rim	5 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF RR	0,1 (0,005) 1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001)	
HBSS Kein TNF THC	0,1 (0,039) 5 (< 0,001) 25 (0,007)	
HBSS TNF Kein Zusatz	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF A967	5 (0,009) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	1 (0,052)
HBSS TNF BAPTA	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF COR	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF	5 (< 0,001) 10 (< 0,001)	/

CsA	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
HC3	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Kein Zusatz	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
A967		
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
BAPTA	25 (< 0,001)	

PBS	1 (0,024)	/
TNF	5 (< 0,001)	
COR	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
CsA	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
HC3	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
THC	25 (< 0,001)	

Tabelle 10: p-Werte von PoPo3 absolut

PoPo3 absolut		
----------------------	--	--

<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante THC-Konzentrationen ($p < 0,5$)</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz THC-Konzentrationen ($p < 0,1$)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	0,1 ($< 0,001$) 5 (0,004) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF A967	1 (0,002) 5 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF BAPTA	10 (0,002)	1 (0,058)
HBSS Kein TNF COR	25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF CsA	5 (0,027)	/
HBSS Kein TNF D22	5 ($< 0,001$) 10 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF HC3	1 ($< 0,001$) 5 ($< 0,001$) 25 ($< 0,001$)	/
HBSS Kein TNF	5 ($< 0,001$)	1 (0,076)

Rim		
HBSS Kein TNF RR	25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF THC	0,1 (< 0,001) 5 (0,006)	/
HBSS TNF Kein Zusatz	0,1 (< 0,001) 1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF A967	0,1 (0,009) 5 (< 0,001) 10 (0,001) 25 (< 0,001)	1 (0,055)
HBSS TNF BAPTA	25 (< 0,001)	/
HBSS TNF COR	25 (< 0,001)	/
HBSS TNF CsA	25 (< 0,001)	/

HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (< 0,001)	/
TNF	10 (0,006)	
HC3	25 (< 0,001)	
HBSS	25 (< 0,001)	/
TNF		
Rim		
HBSS	25 (< 0,001)	/
TNF		
RR		
HBSS	10 (< 0,001)	5 (0,077)
TNF	25 (< 0,001)	
THC		
PBS	25 (< 0,001)	/
TNF		
Kein Zusatz		
PBS	/	/
TNF		
A967		
PBS	0,1 (0,046)	10 (0,086)
TNF	1 (0,003)	
BAPTA	5 (0,042)	
	25 (< 0,001)	

PBS TNF COR	25 (0,003)	/
PBS TNF CsA	25 (< 0,001)	/
PBS TNF D22	/	/
PBS TNF HC3	0,1 (0,003) 5 (< 0,001)	/
PBS TNF Rim	10 (0,002)	/
PBS TNF RR	0,1 (0,009) 1 (0,014) 25 (< 0,001)	5 (0,09) 10 (0,082)
PBS TNF THC	25 (< 0,001)	/

Tabelle 11: p-Werte von PoPo3 auf die ersten 4 Messungen

PoPo3 auf die ersten 4 Messungen		
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz</i>

	<i>THC-Konzentrationen</i> <i>(p<0,5)</i>	<i>THC Konzentrationen</i> <i>(p<0,1)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	5 (0,033) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF A967	0,1 (< 0,001) 25 (0,003)	/
HBSS Kein TNF BAPTA	5 (0,026) 10 (0,005)	/
HBSS Kein TNF COR	25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF CsA	1 (0,016)	/
HBSS Kein TNF D22	0,1 (0,026) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF HC3	0,1 (< 0,001) 1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/

HBSS	25 (< 0,001)	5 (0,054)
Kein TNF		10 (0,05)
Rim		
HBSS	5 (0,01)	/
Kein TNF	10 (0,041)	
RR	25 (< 0,001)	
HBSS	25 (< 0,001)	10 (0,066)
Kein TNF		
THC		
HBSS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
Kein Zusatz	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
A967	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,005)	/
TNF	10 (< 0,001)	
BAPTA	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
COR	25 (< 0,001)	
HBSS	1 (0,024)	/
TNF	25 (< 0,001)	
CsA		

HBSS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
D22	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	1 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
HC3		
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
Rim	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,015)	/
TNF	5 (0,014)	
RR	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	10 (0,005)	/
TNF	25 (< 0,001)	
THC		
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
Kein Zusatz	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	1 (0,01)	/
TNF	5 (< 0,001)	
A967	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	

PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
BAPTA		
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
COR	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
CsA		
PBS	0,1 (0,014)	/
TNF	10 (0,011)	
D22	25 (< 0,001)	
PBS	0,1 (< 0,001)	/
TNF	10 (0,002)	
HC3	25 (< 0,001)	
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
Rim		
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
PBS	0,1 (< 0,001)	/
TNF	1 (0,019)	
THC	10 (0,002)	
	25 (< 0,001)	

Tabelle 12: p-Werte von PoPo3 auf die Kontrolle

PoPo3 auf die Kontrolle		
<i>Versuchsreihe</i>	<i>Signifikante THC-Konzentrationen ($p < 0,5$)</i>	<i>Tendenz zu Signifikanz THC Konzentrationen ($p < 0,1$)</i>
HBSS Kein TNF Kein Zusatz	0,1 (< 0,001) 1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF A967	0,1 (< 0,001) 1 (< 0,001) 5 (0,011) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF BAPTA	5 (< 0,001) 10 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF COR	25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF CsA	1 (0,001) 5 (0,017)	10 (0,054)
HBSS Kein TNF	0,1 (0,039) 5 (< 0,001)	/

D22	10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	
HBSS Kein TNF HC3	0,1 (< 0,001) 1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF Rim	5 (0,008) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF RR	5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS Kein TNF THC	25 (< 0,001)	/
HBSS TNF Kein Zusatz	1 (< 0,001) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS TNF A967	1 (0,012) 5 (< 0,001) 10 (< 0,001) 25 (< 0,001)	/
HBSS	0,1 (< 0,001)	/

TNF	5 (0,024)	
BAPTA	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
COR	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,027)	/
TNF	1 (0,004)	
CsA	10 (0,023)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
D22	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	1 (< 0,001)	10 (0,099)
TNF	5 (0,015)	
HC3	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,016)	/
TNF	5 (< 0,001)	
Rim	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	0,1 (0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
RR	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
HBSS	10 (< 0,001)	/

TNF	25 (< 0,001)	
THC		
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
Kein Zusatz	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	1 (0,008)	/
TNF	5 (< 0,001)	
A967	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	5 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
BAPTA	25 (< 0,001)	
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	5 (< 0,001)	
COR	10 (< 0,001)	
	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
CsA		
PBS	0,1 (< 0,001)	/
TNF	1 (< 0,001)	
D22	25 (< 0,001)	
PBS	0,1 (0,018)	/
TNF	10 (< 0,001)	

HC3	25 (< 0,001)	
PBS	1 (0,001)	/
TNF	5 (0,005)	
Rim	10 (0,002)	
	25 (< 0,001)	
PBS	1 (< 0,001)	/
TNF	10 (< 0,001)	
RR	25 (< 0,001)	
PBS	10 (< 0,001)	/
TNF	25 (< 0,001)	
THC		