

Aus der Klinik für  
Psychiatrie und Psychotherapie  
(Prof. Dr. med. J. Wiltfang)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Auswirkungen auf das adulte Gehirn bei prolongierter Substitution von Cannabidiol**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Melanie Müller**

aus

Wolfsburg

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer/in: PD Dr. rer. nat. Y. Bouter

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. D. Liebetanz

### **Prüfungskommission**

Referent/in: PD Dr. rer. nat. Y. Bouter

Ko-Referent/in: Prof. Dr. D. Liebetanz

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 09.03.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkungen auf das adulte Gehirn bei prolongierter Substitution von Cannabidiol" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....  
.....  
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Schleicher EM, Ott FW, **Müller M**, Silcher B, Sichler ME, Löw MJ, Wagner JM, Bouter Y (2019): Prolonged Cannabidiol Treatment Lacks on Detrimental Effects on Memory, Motor Performance and Anxiety in C57BL/6J Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 13, 94

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Cannabidiol.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Das Endocannabinoidsystem .....	2
1.1.3 Molekulare Wirkung von Cannabidiol.....	3
1.1.4 Rolle von Cannabidiol in der Medizin .....	4
1.2 Aktuelle Cannabispolitik .....	5
1.3 Der Hippocampus.....	6
1.3.1 Anatomie.....	6
1.3.2 Physiologie.....	6
1.3.3 Pathologie .....	6
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	7
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>8</b>
2.1 Primäre Antikörper .....	8
2.2 Sekundäre Antikörper.....	8
2.3 Chemikalien und Lösungen .....	9
2.4 Gebrauchsutensilien.....	10
2.5 Geräte .....	11
2.6 Software .....	11
2.7 Tiermodell.....	12
2.7.1 Tiere.....	12
2.7.2 Haltungsbedingungen .....	12
2.7.3 Behandlung der Tiere.....	12
2.8 Präparation von Hirngewebe.....	13
2.8.1 Anfertigung von Hirnschnitten mittels Kryotom .....	13
2.8.2 Anfertigung von Hirnschnitten mittels Mikrotom.....	13
2.9 Histologische Färbungen .....	14
2.9.1 Kresylviolett-Färbung.....	14
2.9.2 <i>Free-floating</i> 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung .....	15
2.9.3 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung Paraffin-eingebetteter Präparate.....	16
2.9.4 Immunfluoreszenzfärbung Paraffin-eingebetteter Präparate.....	17
2.10 Quantifizierung von Neuronen.....	18
2.10.1 Stereologie .....	18

---

2.10.2	Quantifizierung der Neurogenese.....	21
2.10.3	Analyse von CB1, GFAP und IBA1 .....	22
2.11	Statistik.....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
3.1	Cannabidiol hat keinen negativen Effekt auf die Neuronenzahl in der CA1-Region ...	24
3.1.1	Die frühe Gruppe weist einen Geschlechtsunterschied auf.....	24
3.1.2	Es gab keinen Unterschied durch CBD-Behandlung innerhalb der Geschlechter.....	26
3.2	Die Neurogenese im <i>Gyrus dentatus</i> wird von Cannabidiol nicht negativ beeinflusst ....	28
3.3	Auswirkungen von Cannabidiol auf die CB1-Expression .....	29
3.3.1	CBD erhöht die CB1-Expression im Hippocampus bei früher Behandlung.....	29
3.3.2	CBD erhöht die CB1-Expression im Hippocampus und Cortex bei später Behandlung .....	31
3.4	Veränderungen der IBA1-Expression unter Einfluss von Cannabidiol.....	32
3.4.1	CBD reduziert die mikrogliale IBA1-Expression im Hippocampus bei früher Behandlung.....	32
3.4.2	CBD erhöht die mikrogliale IBA1-Expression im Hippocampus und Cortex bei später Behandlung.....	34
3.5	Effekte der GFAP-Expression unter Cannabidiolbehandlung.....	35
3.5.1	Die frühe Behandlung mit CBD führt zu einem Anstieg der GFAP-Expression im Hippocampus und Cortex.....	35
3.5.2	Die späte Behandlung mit CBD führt zu einem Anstieg der GFAP-Expression im Hippocampus.....	37
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>
4.1	Das gesunde Gehirn wird von CBD nicht negativ beeinflusst.....	39
4.1.1	Effekte von CBD auf Neurogenese und Zellzahl.....	39
4.1.2	Geschlechtsunterschiede bei der Entwicklung des Hippocampus.....	41
4.2	CBD führt zur Erhöhung von Endocannabinoid-Rezeptoren 1 .....	43
4.3	Cannabidiol moduliert neuroinflammatorische Prozesse .....	44
4.4	Ausblick.....	47
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>50</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Cannabidiol.....	2
Abbildung 2: Behandlungsschema.....	13
Abbildung 3: Stereologie. ....	19
Abbildung 4: Graphische Darstellung der Zählareale. ....	20
Abbildung 6: Die Gesamtneuronenzahl war in der frühen Gruppe bei den Männchen höher als bei den Weibchen.....	25
Abbildung 7: Die Gabe von CBD hatte keinen negativen Effekt auf die Neuronenzahl. ....	27
Abbildung 5: CBD-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Neurogenese. ....	29
Abbildung 8: CBD-Behandlung führte zu signifikant erhöhter CB1-Expression im Hippocampus. ....	30
Abbildung 9: Die Behandlung mit CBD führte zu einer signifikanten Erhöhung der CB1-Expression ....	31
Abbildung 10: Im Hippocampus reduzierte sich die IBA1-Expression bei Behandlung mit CBD in der frühen Gruppe.....	33
Abbildung 11: In der späten Gruppe zeigte sich eine Erhöhung der IBA1-Expression im Hippocampus und Cortex bei der Behandlung mit CBD.....	34
Abbildung 12: Kein Unterschied der GFAP-Expression nach CBD-Behandlung .....	36
Abbildung 13: Die GFAP-Expression steigerte sich signifikant im Hippocampus in der späten Gruppe unter der Behandlung mit CBD .....	37

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen .....	8
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen.....	8
Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen für immunhistochemische Färbungen .....	9
Tabelle 4: Gebrauchsutensilien zur Herstellung der Präparate und Färbungen.....	10
Tabelle 5: Verwendete Geräte zur Analyse der Präparate.....	11
Tabelle 6: Verwendete Software.....	11
Tabelle 7: Formeln zur Berechnung der hippocampalen Neuronenzahl .....	21
Tabelle 8: Erläuterung zur Berechnung des Zwischenprodukts P .....	21
Tabelle 9: Formeln zur Berechnung der DCX-markierten Neurone im <i>Gyrus dentatus</i> .....	22

## Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonylglycerol
3M	3 Monate
5M	5 Monate
ABC	<i>Avidin-Biotin Complex</i>
AEA	Arachidonylethanolamid
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
CB1	Cannabinoid-Rezeptor 1
CB2	Cannabinoid-Rezeptor 2
CBD	Cannabidiol
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> (Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
FAAH	Fettsäureamid-Hydrolase
FCS	<i>fetal cow serum</i> (fetales Kälberserum)
GD	<i>Gyrus dentatus</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i> (saures Gliafaserprotein)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i> (ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1)
i. p.	intraperitoneal
Ktrl	Kontrolle
m	männlich
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PNS	peripheres Nervensystem
SGZ	subgranuläre Zone
SOX2	<i>sex determining region Y (SRY)-box 2</i> (geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2)
SVZ	subventrikuläre Zone
THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
w	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Die Hanfpflanze (*Cannabis sativa L.*) ist ein vielseitig anwendbares Produkt unter anderem in der Industrie oder der Naturheilkunde (Li 1974). Teile der weiblichen Pflanze können eine berauschende Wirkung erzeugen, sodass Cannabis, auch bekannt als Marihuana, Gras oder Haschisch, als Rauschmittel verwendet werden kann (Adams 1940; Thomas und ElSohly 2016). Aber auch in der Medizin ist man zunehmend an dessen Wirkung interessiert (Appendino et al. 2011). Cannabidiol (CBD) ist, neben Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC), eine der Hauptkomponenten der Cannabispflanze und wird als potenzielle Therapie für verschiedene Erkrankungen erforscht (Devinsky et al. 2014; Osborne et al. 2017; Zuardi 2008).

Die genauen Wirkmechanismen von CBD sind noch nicht gänzlich geklärt. Allerdings scheint CBD unter anderem neuroprotektiv und antiinflammatorisch zu sein (Hammell et al. 2016; Mecha et al. 2013; Mori et al. 2017; Schiavon et al. 2014). Bei einigen Erkrankungen konnte bereits eine Symptomverbesserung unter CBD-Behandlung belegt werden (Arruza et al. 2017; Hammell et al. 2016; McGuire et al. 2018; Mori et al. 2017; Patra et al. 2018; Sartim et al. 2016; Shrivastava et al. 2011; Vallée et al. 2017). Die Auswirkungen auf das gesunde adulte Gehirn wurden noch nicht hinreichend erforscht.

## 1.1 Cannabidiol

### 1.1.1 Definition

CBD ist ein Phytocannabinoid der Pflanze *Cannabis sativa L.* aus der Familie der *Cannabaceae* (Baron 2015; Gould 2015; Pellati et al. 2018). Bisher wurden drei Spezies (*Cannabis sativa*, *Cannabis indica* und *Cannabis ruderalis*) beschrieben, wobei sich die Spezies untereinander leicht kreuzen und Hybride bilden, sodass heute eine Spezies (*C. sativa*) anerkannt wird, die sich in fünf Chemotypen unterteilt (Pellati et al. 2018; Thomas und ElSohly 2016).

Cannabis setzt sich aus einer großen Vielfalt an chemischen Bestandteilen wie Kohlenhydraten, Fettsäuren und deren Ester, Phenolverbindungen, Phytosterolen, Terpenen und Amiden zusammen (Appendino et al. 2011; Pellati et al. 2018). Außerdem sind über hundert Phytocannabinoide in Cannabis enthalten, welche aus oxygenierten aromatischen C<sub>21</sub>-Kohlenwasserstoffen bestehen (Gould 2015; Morales et al. 2017). Die bekanntesten Cannabinoide sind THC und Tetrahydrocannabivarin (THCV) als psychoaktive Substanzen sowie die nicht-psychoaktiven Substanzen CBD, Cannabinol (CBN) und Cannabigerol (CBG) (Lucas et al. 2018). In dieser Arbeit soll jedoch der Fokus auf das nicht-psychoaktive Cannabinoid CBD gelegt. 1940 wurde CBD erstmals isoliert (Adams 1940), woraufhin dessen Struktur (

Abbildung 1) 1963 nachgewiesen wurde (Mechoulam und Shvo 1963). CBD entsteht aus Acylgruppen, die über n-Hexanoyl-CoA eine Polyketideinheit bildet, die wiederum durch Zyklisierung und Aromatisierung zu Olivetolsäure umgewandelt wird. Durch Kondensation von Olivetolsäure und Geranylpyrophosphat (GPP) entsteht Cannabigerolsäure (CBGA). Das Produkt durch Oxidation und Zyklisierung der CBGA ist schließlich CBD (Appendino et al. 2011; Mechoulam und Shvo 1963).

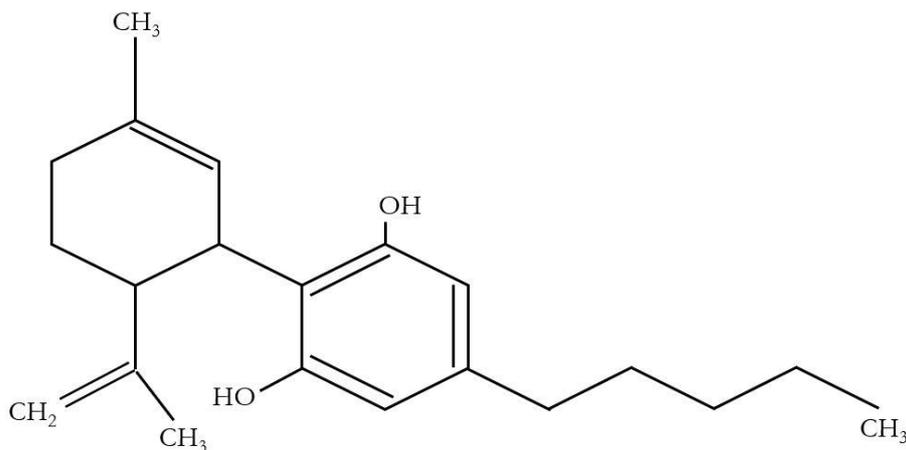


Abbildung 1: Strukturformel von Cannabidiol (eigene Abbildung basierend auf Bisogno et al. 2001)

### 1.1.2 Das Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem wurde mit der Entdeckung und Klonierung des Cannabinoidrezeptors 1 (CB1) erstmals beschrieben (Devane et al. 1988; Matsuda et al. 1990). Ein zweiter Cannabinoidrezeptor (CB2) wurde 1993 isoliert (Munro et al. 1993). Beide Cannabinoidrezeptoren sind aus sieben Transmembrandomänen aufgebaut und an heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine) gekoppelt, deren  $\alpha$ -Untereinheiten die Adenylatzyklase inhibieren und somit die cAMP-Konzentration reduzieren (Console-Bram et al. 2012; Kreitzer and Stella 2009). CB1 wird in unterschiedlichen Konzentrationen sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) unter anderem im Riechkolben, in der *Substantia nigra*, den Basalganglien, im limbischen System, im Hippocampus und im Kleinhirn als auch im peripheren Nervensystem (PNS) in der Nebenniere, Schilddrüse, Adipozyten, Gastrointestinaltrakt, Uterus, Ovarien und Hodengewebe exprimiert (Herkenham et al. 1990; Pagotto et al. 2006). Die Expression von CB2 erfolgt vor allem in Mikroglia, Milz,

Immunzellen, Leukozyten, Gastrointestinaltrakt sowie Hoden und Plazenta (Galiegue et al. 1995; Griffin et al. 2000; Munro et al. 1993).

Die Wirkungen von CB1 und CB2 sind vielfältig. So ist der CB1 an der Regulation von neuronalen Progenitorzellen und deren Differenzierung beteiligt und fördert somit die Neurogenese (Aguado et al. 2007; Jin et al. 2004). Die Aktivierung von CB1 führt zu einer Reduktion sowohl inhibitorischer postsynaptischer Potenziale, die durch  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) vermittelt werden, als auch exzitatorischer postsynaptischer Potenziale, die durch Glutamat ausgelöst werden. Dadurch wird die synaptische Plastizität im Hippocampus kontrolliert, wodurch die Langzeit-Potenzierung ermöglicht wird (Freund et al. 2003; Monory et al. 2015; Ramikie et al. 2014). Die Aktivierung von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) durch CB1 und CB2 führt zu einer Proliferation von neuronalen Stammzellen (Rubio-Araiz et al. 2008). Die CB2-Expression wird in der aktivierten Mikroglia im geschädigten Gehirn - wie zum Beispiel bei Hirntumoren oder M. Alzheimer - hochreguliert, sodass die Aktivierung der Rezeptoren immunmodulierend wirkt (Benito et al. 2003; Carlisle et al. 2002; Ellert-Miklaszewska et al. 2007; López et al. 2018). Weiterhin führt die Aktivierung von CB2 in Tumorzellen zur Apoptose und damit zu einer verminderten Tumorpheriferation (Massi et al. 2004; McKallip et al. 2002; Sánchez et al. 2001).

Die Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren ging mit der Beschreibung endogener Cannabinoide einher. Das Arachidonsäurederivat N-Arachidonylethanolamid (Anandamid, AEA) wurde 1992 identifiziert (Devane et al. 1992). AEA ist lipophil und ein partieller Agonist für Cannabinoidrezeptoren, welcher mit höherer Affinität an CB1 bindet als an CB2 (Devane et al. 1992; Felder et al. 1995; Pertwee et al. 2010). Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) spaltet AEA in Arachidonsäure und Ethanolamin (Deutsch und Chin 1993). Das lipophile 2-Arachidonylglycerol (2-AG) ist ebenfalls ein Derivat der Arachidonsäure und wurde 1995 entdeckt (Mechoulam et al. 1995). Es ist ein voller Agonist an beiden Cannabinoidrezeptoren (Stella et al. 1997; Sugiura et al. 2002) und wird durch Monoacylglycerolipase (MAGL) zu Arachidonsäure und Glycerol abgebaut (Dinh et al. 2002).

### 1.1.3 Molekulare Wirkung von Cannabidiol

Das Phytocannabinoid CBD hat zum einen Effekte auf das Endocannabinoidsystem, wobei die Wirkung von CBD auf die Cannabinoidrezeptoren nicht eindeutig geklärt ist. CBD wurde als inverser Agonist sowohl an CB2 als auch bei geringen Konzentrationen an CB1 beobachtet, obwohl höhere CBD-Konzentrationen eine antagonistische Wirkung auf Cannabinoidrezeptor-Agonisten hervorriefen (Pertwee 2008; Petit et al. 1998; Thomas et al. 2007). Außerdem wurde CBD als negativer allosterischer Modulator für CB1 beschrieben, wobei sich die CB1-Anzahl auf Membranen mit steigender CBD-Konzentration erhöht und die Rezeptoren weniger internalisiert wurden (Laprairie et al. 2015; Tham et al. 2018). CBD

wurde an CB2 einerseits als negativer allosterischer Modulator (Martínez-Pinilla et al. 2017) und andererseits als partieller Agonist (Tham et al. 2018) aufgezeigt.

Zum anderen wirkt sich CBD auch auf weitere neuronale Transmittersysteme aus, was hier in Kürze dargestellt wird. In Bezug auf den Serotoninrezeptor 5HT<sub>1a</sub> (5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1a) handelt es sich bei CBD um einen Agonisten (Russo et al. 2005). Ebenfalls als Agonist agiert CBD für TRP-Kanäle (*transient receptor potential*), was zu einer Desensibilisierung der Kanäle führt (Muller et al. 2018). Auch auf  $\mu$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren wirkt CBD agonistisch (Kathmann et al. 2006). Des Weiteren erhöht CBD die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Neuronen und Gliazellen (Drysdale et al. 2006). CBD inhibiert hingegen ENT1 (*equilibrative nucleoside transporter 1*) und reduziert die Adenosinaufnahme, sodass die endogene Adenosinverfügbarkeit erhöht wird (Carrier et al. 2006). Auf den G-Proteingekoppelten Rezeptor 55 (GPR55) wirkt CBD antagonistisch (Ryberg et al. 2007). Auch auf die N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA), Aminomethylphosphonsäure- (AMPA) und Kainatrezeptoren hat CBD eine antagonistische Wirkung, wodurch die Ausschüttung von Glutamat inhibiert wird (Hampson et al. 1998). CBD führt in Tumorzellen zum Zelltod, indem es in Mitochondrien Caspasen aktiviert und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erhöht, sodass Apoptose eingeleitet wird (Massi et al. 2006; McKallip 2006; Shrivastava et al. 2011). Die Aktivität von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) wird erhöht, was über eine verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), TNF $\alpha$  und Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) zu einer Reduktion von reaktiver Gliese führt (Esposito et al. 2011; Scuderi et al. 2014). Außerdem reduziert CBD die Hydrolyse von AEA durch FAAH und vermindert dessen Wiederaufnahme, infolgedessen steht vermehrt AEA zur Verfügung. AEA wirkt neuroprotektiv und antiinflammatorisch, sodass CBD durch die Interaktion mit AEA diese Wirkung verstärkt (Bisogno et al. 2001).

Der molekulare Einfluss von CBD auf die verschiedenen Rezeptoren bewirkt mehrere intrakorporale Effekte. So wirkt CBD antikonvulsiv, anxiolytisch, antidepressiv, neuroprotektiv, antiinflammatorisch, analgetisch, proapoptotisch und antiproliferativ (1.1.4).

#### 1.1.4 Rolle von Cannabidiol in der Medizin

Hanf wurde bereits vor mehr als 6000 Jahren in Asien unter anderem zur Herstellung von Seilen, Fischernetzen und Textilien sowie in der Medizin verwendet (Li 1974). Auch heute spielt Nutzhanf in der Textilindustrie, für Baustoffe, Tierfutter, Nahrungsmittel und Kosmetikartikel eine Rolle. Außerdem gelten die Bestandteile des Hanfs als Rausch- sowie Arzneimittel.

Für den medizinischen Gebrauch werden seit einigen Jahren die bekanntesten Cannabinoide THC und CBD vielfach untersucht. Hierbei zeigte sich bei THC beispielsweise eine antiemetische Wirkung bei Krebspatienten unter Strahlentherapie (Darmani et al. 2007), sowie

eine Verbesserung der Ticsymptomatik bei Tourette-Syndrom (Müller-Vahl 2013) und ein analgetischer Effekt neuropathischer Schmerzen bei multipler Sklerose (Svendsen et al. 2004).

Untersuchungen mit der Intervention von CBD ergaben bereits vielfach positive Effekte, auch wenn die genauen Mechanismen teilweise noch nicht ganz verstanden sind (Morales et al. 2017). So reduzierte CBD die Anzahl und Dauer epileptischer Anfälle und ihrer assoziierten Komorbiditäten (Jones et al. 2010; Patra et al. 2018; Ryan et al. 2009). Außerdem wirkte es neuroprotektiv bei zerebralen Ischämien (Mori et al. 2017; Schiavon et al. 2014) und M. Alzheimer (Martín-Moreno et al. 2011; Scuderi et al. 2014; Vallée et al. 2017). Der antiinflammatorische Effekt von CBD (Burstein 2015; Kozela et al. 2017) zeigte sich unter anderem bei autoimmun-entzündlichen Erkrankungen wie der multiplen Sklerose (Kozela et al. 2011; Mecha et al. 2013), arthritisch bedingten Entzündungen (Hammell et al. 2016; Malfait et al. 2000) und Lungenschädigungen (Arruza et al. 2017; Ribeiro et al. 2012). Weiterhin wirkte CBD analgetisch bei Chemotherapie-induzierten Schmerzen (King et al. 2017; Ward et al. 2014). Positive Auswirkungen von CBD wurden auch bei psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenie (Leweke et al. 2012; McGuire et al. 2018), Angststörungen (Campos et al. 2013; de Paula Soares et al. 2010; Zuardi et al. 1993) und Depressionen (Sartim et al. 2016; Zanelati et al. 2010) festgestellt. Ein proapoptotischer und antiproliferativer Effekt auf Tumorzellen bei Glioblastomen, Leukämien oder Brustkrebs wurde ebenfalls (Massi et al. 2004; McKallip 2006; Shrivastava et al. 2011; Vaccani et al. 2005) entdeckt.

## 1.2 Aktuelle Cannabispolitik

Marihuana wurde nicht nur für industrielle Zwecke, sondern bereits in der Antike für die medizinische und halluzinogene Anwendung genutzt (Li 1974). Die Nutzung von Cannabis, vor allem des weiblichen Hanfs, wurde jedoch im 20. Jahrhundert eingeschränkt. Auf der zweiten Opiumkonferenz 1925 wurde Cannabis (damals indischer Hanf genannt) in die Liste der narkotisierenden Mittel aufgenommen und als gefährlich eingestuft. Somit wurde Cannabis mit Opiaten gleichgestellt und dessen Handel und Verwendung reglementiert (Kendell 2003). Der Erwerb, Besitz und Konsum von Cannabis wird in Deutschland seit 1971 durch das Betäubungsmittelgesetz geregelt (Opiumgesetz 1971). Nachdem Cannabis bereits in einigen Ländern wie den Niederlanden, Kanada oder Teilen der USA legalisiert bzw. entkriminalisiert und der positive Effekt des Cannabis bereits bei malignen oder chronischen Erkrankungen belegt wurde, dürfen seit 2017 Ärzte auch in Deutschland medizinisches Marihuana verordnen (Betäubungsmittelgesetz 2017). Der CBD-Anteil in den verordnungspflichtigen Cannabisblüten variiert hierbei von unter 0,05% bis zu 10,2% (Müller-Vahl und Grotenhermen 2017).

Jedoch wird Cannabis als Rauschmittel vor allem bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen in den letzten Jahren mit steigender Tendenz konsumiert. Im Jahr 2018 gaben in Deutschland 7,1% der Menschen im Alter von 18-64 Jahren an, in den letzten zwölf Monaten Cannabis konsumiert zu haben. Wobei die Anzahl der Konsumenten bei den 18-24-Jährigen mit 24,3% am höchsten war. Die Lebenszeitprävalenz im Alter von 18-64 Jahren belief sich auf 28,3%. Außerdem zeigte sich ein höherer Anteil an konsumierenden Männern als konsumierender Frauen (Karachaliou et al. 2019).

Auch deshalb wird aktuell eine Legalisierung des Besitzes und Konsums von Cannabis in Deutschland debattiert (Havemann-Reinecke et al. 2017; Thomasius und Holtmann 2016). Ob allerdings eine Legalisierung den Konsum besser kontrollieren und die Qualität der Produkte verbessern kann, bleibt umstritten. Außerdem ist nicht abschließend erforscht, ob durch Cannabis Psychosen und andere psychiatrische Erkrankungen entwickelt oder bei entsprechender Disposition durch dessen Konsum ausgelöst werden könnten (Havemann-Reinecke et al. 2017).

## 1.3 Der Hippocampus

### 1.3.1 Anatomie

Der Hippocampus befindet sich bilateral im kaudalen Teil des Temporallappens und bildet einen Teil der medialen Wand des Unterhorns des lateralen Ventrikels. Makroskopisch ist der *Pes hippocampi* mit den fingerförmigen Einkerbungen, den *Digitationes hippocampi*, sichtbar. Die Hippocampusformation besteht aus dem *Gyrus dentatus* (GD), dem *Cornu ammonis* (CA, Ammonshorn) und dem *Subiculum*. Histologisch ist er Bestandteil des Archikortex und besteht aus 3-4 Schichten. Afferente Fasern ziehen vom *Cortex entorhinalis* über den *Gyrus dentatus* zum Ammonshorn. Efferente Fasern kommen aus dem *Subiculum* und enden über der *Fornix cerebri* in den *Corpora mamillaria*.

### 1.3.2 Physiologie

Als Teil des limbischen Systems ist der Hippocampus für die Ausbildung des deklarativen Gedächtnisses zuständig. Das Gedächtnis entsteht durch Langzeitpotenzierung in den Pyramidenzellen des Hippocampus. Über sensorische Areale werden Gedächtnisinhalte in das Kurzzeitgedächtnis aufgenommen und durch weitere Reizexposition in das Langzeitgedächtnis überführt. Auf molekularer Ebene werden dazu durch Bindung von Glutamat AMPA-Rezeptoren geöffnet. Dadurch kommt es zu einem Natriumeinstrom und nachfolgend zu einer Depolarisation. Nun wird Magnesium von NMDA-Rezeptoren verdrängt, sodass Glutamat binden kann und der Rezeptor geöffnet wird. Kalzium strömt nach intrazellulär und fördert die Proteinbiosynthese. Die Erregbarkeit der Synapse und somit der Lernprozess

werden verstärkt. Neben der Funktion als Lern- und Gedächtniseinheit ist der Hippocampus auch wichtig für Emotionen.

### 1.3.3 Pathologie

Neurodegenerative Erkrankungen (z. B. Demenzen wie M. Alzheimer), Alkohol, Entzündungen, Ischämien, Traumata und Intoxikationen (z. B. Kohlenmonoxid) können die Strukturen des Hippocampus langfristig lädieren, sodass die deklarative Gedächtnisbildung beeinträchtigt wird. Informationen gelangen dann nicht mehr vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis, was zu einer anterograden Amnesie führt. Liegen Störungen in den assoziativen Kortizes vor, kommt es zu einer retrograden Amnesie.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Pflanze *Cannabis sativa* hat mehr als hundert Wirkstoffe, welche zum Teil psychoaktiv sind. CBD ist eine der Hauptkomponenten der Cannabispflanze und wirkt nicht psychoaktiv. Es kommt vielfach z. B. als Öl in Cremes oder als Nahrungsergänzungsmittel zur Anwendung. Auch in der Medizin wurde die positive Wirkung des CBD bestätigt und eine Besserung der Symptomatik z. B. bei Angststörungen, Epilepsie oder multipler Sklerose aufgezeigt. Bisher wurde allerdings noch nicht geprüft, ob sich CBD positiv oder negativ auf das gesunde Gehirn auswirkt.

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Effekte einer prolongierten CBD-Gabe auf das gesunde adulte Gehirn zu analysieren. Dabei wird untersucht, ob es Veränderungen bezüglich der absoluten Zellzahl in der CA1-Region oder der Anzahl der Progenitorzellen im *Gyrus dentatus* unter dem Einfluss von CBD gibt. Des Weiteren wird die Wirkung von CBD auf die CB1-Expression im *Cortex cerebri* und Hippocampus analysiert. Weiterhin wird gezeigt, inwieweit der Inflammationsprozess durch CBD beeinflusst wird. Hierbei werden sowohl die GFAP- als auch die IBA1-Expression im *Cortex cerebri* untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antiserum	Wirtsspezies	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
Anti-Cannabinoid Receptor 1	Kaninchen	polyklonal	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Doublecortin	Ziege	polyklonal	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas USA
Anti-Doublecortin	Kaninchen	polyklonal	1:4000	Synaptic Systems Biotechnology company, Göttingen, Deutschland
Anti-GFAP	Meerschweinchen	polyklonal	1:1000	Synaptic Systems Biotechnology company, Göttingen, Deutschland
Anti-IBA-1	Meerschweinchen	polyklonal	1:1000	Synaptic Systems Biotechnology company, Göttingen, Deutschland

### 2.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Name	Verdünnung	Hersteller
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Guinea-Pig IgG, 1,5Mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Pennsylvania, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, 1,3Mg/ml	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Pennsylvania, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG, 1,3Mg/ml	1:250	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, Pennsylvania, USA
Donkey anti-Goat IgG Cross Adsorbed, DyLight 488nm, polyclonal, 0,5Mg/ml	1:200	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Goat Anti-Guinea Pig IgG Cross Adsorbed, DyLight 488nm, 0,5Mg/ml, polyklonal	1:200	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Goat Anti-Rabbit IgG, Conjugated Highly Cross Adsorbed, DyLight 594nm, 1mg/ml	1:200	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

## 2.3 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 3: Chemikalien und Lösungen für immunhistochemische Färbungen

<b>Chemikalie/Lösung</b>	<b>Hersteller</b>
2-Propanol, Rotipuran $\geq 99,8\%$ p.a., ACS, ISO	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure 98%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cannabidiol 1g DAC	THC Pharm GmbH, Frankfurt, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat 99,5%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cresylviolett-acetat 25g	Fluka Chemica GmbH, Buchs, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
D(+)-Saccharose 99,5%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAB Peroxidase Substrat Set	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
DPBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Essigsäure 100%	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99%, vergällt m. 1% Methyl-ethylketon	Walter CMP GmbH&Co. KG, Kiel, Deutschland
Ethanol 99,5%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FBS Superior (Fetales Kälberserum)	Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland
Immersionsöl	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat Trihydrat 1 M	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid 99,5%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti Histokitt 4% Formaldehydlösung 4%	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti- Histokitt synth. Einschlussmittel, für die Histologie	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti Mount FluorCare DAPI	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X 100	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Vectastain Avidin-Biotin Complex Staining (ABC) KIT	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) $\geq 98\%$ rein für die Histologie	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2.4 Gebrauchsutensilien

Tabelle 4: Gebrauchsutensilien zur Herstellung der Präparate und Färbungen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Biosphere Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Cellstar 15ml Röhren, PP, graduiert, konischer Boden, steril, blaue Kappe	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar TC-Platte, 12 Kammern, steril, einzelpackung	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einsätze für Cellstar TC-Platten	Corning Netwells inserts, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Faltenfilter 595 1/2	Th. Geyer, Höxter, Deutschland
Feather Mikrotomklinge, carbon steel, C35	pfm medical, Köln, Deutschland
Fettstift, PAP PEN	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Labsolute Gewindeflasche, 45 x 14,7mm, Klarglas, 4ml	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Labsolute Rastereinsätze, Karton f. Cryoboxen, 136 x 136mm, Raster: 8 x 8, h: 30mm	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Labsolute Schraubkappe, 13mm, schwarz geschlossen, PP	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Menzel-Gläser Deckgläser 24 x 60mm	Thermo scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Herkunftsland USA
Menzel-Gläser Superfrost Plus Objektträger	Thermo scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Herkunftsland USA
Pipette 10ml Graduierung 1/10ml, steril	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Rotilabo Cryoboxen, Karton, weiß, wasserabweisend, 163 x 163 x 50mm	Carl-Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek O.C.T. 125ml	Sakura Finetek USA INC., Torrance
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

## 2.5 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte zur Analyse der Präparate

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Automatische Gewebeeinfiltration TP 1020	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Beheizte Paraffinausgießstation EG1140 H	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Kryostat CM 1850 UV	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Mikrom HM 335E	Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland
Mikroskop BX 51 mit mbf CX 9000 und LEP MAC 5000	Olympus, Tokio, Japan
Mikroskop BX 51 mit Moticam Pro 282B	Olympus, Tokio, Japan
Mikrowelle NN-E201WM	Panasonic, Kadoma, Japan
Nikon Eclipse Ti mit Nikon DS-Qi2 und okolab und Nikon TI-S-EJOY	Nikon, Tokio, Japan

## 2.6 Software

Tabelle 6: Verwendete Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller</b>
GraphPad Prism 5 Version 5.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ 1.51f	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, Redmond, WA, USA
Motic Images Plus 2.0	Motic, Wetzlar, Deutschland
NIS-Elements AR	Nikon, Tokio, Japan
StereoInvestigator	MicroBrightField Bioscience, Williston, VT, USA

## 2.7 Tiermodell

### 2.7.1 Tiere

Die für die Experimente in dieser Arbeit verwendeten Tiere waren Mäuse, welche zur Spezies der gemeinen Hausmaus (*Mus musculus*) gehörten. Die Mäuse entsprachen der C57BL/6J-Linie und entstammten ursprünglich den Jackson Laboratories (Maine, USA) (Simon et al. 2013). Alle Tierversuche wurden nach den gültigen Bestimmungen des Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LaVes) genehmigt. Die Haltung sowie alle Manipulationen an den Tieren erfolgten von Personen mit entsprechenden Qualifikationen. Dabei wurde die benötigte Anzahl der Mäuse für die Versuche sowie jegliche Leiden, Schmerzen und Schäden so gering wie möglich gehalten.

### 2.7.2 Haltungsbedingungen

In der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wurden Mäuse unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten, bis sie für tierexperimentelle Versuche ins Labor transportiert wurden. In speziellen Käfigen mit einer Anzahl von fünf bis sechs Tieren pro Käfig wurden die Mäuse im Labor bei umgekehrtem 12/12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Futter und Wasser gab es für die Tiere *ad libitum*.

### 2.7.3 Behandlung der Tiere

Die Tiere wurden in vier Gruppen aufgeteilt mit jeweils fünf bzw. sechs männlichen und weiblichen Mäusen. Den Experimentalgruppen wurden 20mg/kg KG CBD in Verbindung mit einer Trägerlösung, bestehend aus einer Natriumchloridlösung mit jeweils 5% Tween 80 und 100%igem Ethanol intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppen bekamen die Trägerlösung ebenfalls intraperitoneal verabreicht.

Bei der Hälfte der Tiere aus der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden die Injektionen im Alter von drei Monaten (im Folgenden als frühe Gruppe bezeichnet) begonnen und für 42 Tage täglich fortgesetzt (Abbildung 2). Im Anschluss hatten die Mäuse eine Ruhephase. Im Alter von sechseinhalb Monaten erfolgte der Exitus durch Perfusion und die Präparation der Gehirne (2.8).

Dementsprechend erhielt die andere Hälfte der Tiere die Injektionen ab einem Alter von fünf Monaten (nachfolgend als späte Gruppe bezeichnet). Die Injektionen wurden ebenfalls für 42 Tage täglich durchgeführt (Abbildung 2). Auch hier erfolgte der Exitus per Perfusion mit sechseinhalb Monaten, woraufhin die Gehirne präpariert wurden (2.8).

Alle intraperitonealen Injektionen sowie das Töten der Mäuse und die nachfolgende Entnahme der Gehirne erfolgten von entsprechend qualifizierten Personen des Labors anstelle meiner Person. Sowohl die Gehirne der drei Monate als auch die der fünf Monate alten Kontrolltiere wurden gemeinsam mit Barbara Silcher präpariert und gefärbt, wobei die Auswertung getrennt für die jeweiligen Dissertationen erfolgte.

Lebensalter in Monaten	1	2	3	4	5	6 Exitus
Frühe Gruppe			Tägliche Injektion			
Späte Gruppe					Tägliche Injektion	

Abbildung 2: Behandlungsschema. Eine Gruppe erhielt die intraperitonealen Injektionen ab einem Alter von drei Monaten (frühe Gruppe), die andere Gruppe ab einem Alter von fünf Monaten (späte Gruppe). Die Experimentalgruppen erhielten 20mg/kg KG CBD in einer Trägerlösung. Die Kontrollgruppen bekamen nur die Trägerlösung verabreicht.

## 2.8 Präparation von Hirngewebe

### 2.8.1 Anfertigung von Hirschnitten mittels Kryotom

Nach Entnahme der Gehirne wurden die linken Hemisphären für drei Tage in Paraformaldehydlösung und anschließend 48 Stunden in einer 30%igen Saccharoselösung gelagert. Daraufhin wurden die Gehirnhälften bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

Bevor die linken Hemisphären geschnitten wurden, wurden sie bei -20°C für eine halbe Stunde gelagert. Anschließend wurde das Gehirn im Kryotom bei -25°C in 30µm dicke Frontalschnitte geschnitten. Hierfür wurde zuerst der okzipitale Teil des Kleinhirns mit einem Skalpell entfernt, das Gehirn senkrecht auf den Kryotomeinsatz geklebt und anschließend vollständig mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium umschlossen. Die einzelnen Schnitte wurden in insgesamt zehn Glasröhrchen überführt, wobei jeder zehnte Schnitt in ein Röhrchen eingebracht wurde. Sowie das Gehirn bis zum Kleinhirn geschnitten wurde, wurden die Röhrchen bis zum weiteren Gebrauch (2.9) bei -80°C gelagert.

### 2.8.2 Anfertigung von Hirschnitten mittels Mikrotom

Die rechten Hemisphären wurden zunächst über mindestens fünf Tage in 4%igem Histokitt bei 4°C aufbewahrt. Daraufaufgehend wurden die Gehirnhälften in die automatische Gewebefiltration TP 1020 überführt. Dabei wurden sie zuerst in eine 4%ige Paraformaldehydlösung (4% Histofix) für 5 Minuten und anschließend 30 Minuten in Wasser

gegeben. Die Dehydratation erfolgte, indem die Gewebe nacheinander in einer wässrigen Lösung mit 50%, 60%, 70%, 80% und 90% Ethanol für jeweils eine Stunde verbrachten. Anschließend wurden sie zweimal für eine Stunde in 100%igem Ethanol eingetaucht. Die Präparate wurden dann für eine Stunde in Xylol, danach zweimal für eine Stunde in flüssiges Paraffin gegeben. Zum Schluss wurden die Gewebe in der beheizten Paraffinausgießstation EG1140H zu Paraffinblöcken eingebettet.

Nachdem die rechten Hemisphären in Paraffin eingebettet wurden, wurden sie mit dem Mikrom HM 335E in 4µm dicke Sagittalschnitte geschnitten. Für die Färbungen in dieser Arbeit reichten dreißig Schnitte vom Hippocampus pro Gehirn aus. Dazu wurden mit der Mikrotomklinge die Schnitte erstellt und bei Raumtemperatur in ein Wasserbad mit vollständig entsalztem Wasser überführt. Daraufhin wurden die Präparate der Reihenfolge nach auf Objektträger gebracht, in ein Wärmebad mit 52°C warmen *Aqua bidest* getaucht und dreißig Minuten auf den Rand des Wärmebades zum Trocknen gelegt. Im Folgenden wurden die Objektträger über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C gelagert, wobei eine vollständige Trocknung der Präparate erfolgte.

## 2.9 Histologische Färbungen

### 2.9.1 Kresylviolett-Färbung

Bevor mit der Färbung begonnen wurde, wurde ein Glasröhrchen mit den am Kryostaten angefertigten Hirnschnitten (2.8.1) auf einen Objektträger gezogen. Hierzu wurde jenes aus dem Gefrierschrank entnommen und zunächst auf Eis gelagert. Als nächstes wurde kaltes, bei -20°C gelagertes 0,01M PBS in das Röhrchen gegeben, sodass sich das gefrorene Einbettmedium auflöste. Die Lösung mit den enthaltenen Hirnschnitten wurde in eine Petrischale transferiert. Mit einem feinen Pinsel wurden die Präparate faltenfrei auf den Objektträger aufgebracht und zum Trocknen dreißig Minuten auf den Rand eines Wärmebades gelegt. Anschließend wurden die Hirnschnitte auf dem Objektträger über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C restlos getrocknet.

Für die Kresylviolett-Färbung wurden Puffer- und Färbelösungen sowie Lösungen zur Delipidierung hergestellt und die Präparate auf den Objektträgern in einer bestimmten Reihenfolge in Färbeküvetten mit den einzelnen Lösungen überführt.

Hierfür war zunächst für die Pufferlösung eine Stammlösung 1A erforderlich, wobei 13,61g Natriumacetat in 100ml *Aqua bidest* gelöst wurden. Darauffolgend wurde zweimal eine Arbeitslösung 1B angesetzt, für welche jeweils 40ml der Stammlösung 1A mit 9,6ml 100% Essigsäure vermenget und mit *Aqua bidest* auf einen Liter komplettiert wurden. Die Färbelösung 2 wurde einen Tag vor der Färbung der Präparate hergestellt. Dabei wurde 0,1g Kresylviolett in einen Liter Arbeitslösung 1B gegeben und über Nacht auf einem

Magnetrührer lichtgeschützt verrührt. Die Stammlösung 3A für die Delipidierungslösung bestand aus 200µl Triton X 100, welches in 9,8ml *Aqua bidest* unter einstündigem Rühren gelöst wurde. Danach wurden 2,5ml der Stammlösung 3A mit 50ml *Aqua bidest* und 150ml 100% Ethanol zur Arbeitslösung 3B vermischt.

Zu Anfang wurden die Präparate für die Delipidierung zweimal zehn Minuten in Arbeitslösung 1B gegeben. Darauffolgend verblieben die Schnitte zwanzig Minuten in Arbeitslösung 3B und erneut zweimal zehn Minuten in Arbeitslösung 1B. Nachdem die Färbelösung 2 mithilfe von Filterpapier gefiltert wurde, wurden die Präparate, von nun an lichtgeschützt, für zweimal acht Minuten gefärbt. Anschließend erfolgte die Dehydratation, wobei das Gewebe dreimal eine Minute in Arbeitslösung 1B, drei Minuten in 100% Ethanol, zehn Minuten in Isopropanol und zweimal fünf Minuten in Xylol gegeben wurde. Abschließend wurden die Präparate mit Einschlussmittel und einem Deckglas versehen und getrocknet.

### 2.9.2 *Free-floating* 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung

Zuerst wurden die am Kryostaten angefertigten und gefrorenen Hirnschnitte (2.8.1) im Röhrchen auf Eis gelagert und mit -20°C kaltem 0,01M PBS für fünf Minuten umspült, bis sich das Einbettmedium auflöste. Die Lösung mit den Präparaten wurde als nächstes in Kammerensätze auf Zellkulturplatten mit zwölf Kammern überführt. Die Präparate wurden für zehn Minuten in 0,01M PBS hydriert. Danach erfolgte ein Peroxidaseblock mit einem Gemisch aus 0,01M PBS und einem Prozent 30%igem Wasserstoffperoxid über dreißig Minuten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal zehn Minuten mit 0,01M PBS und 0,1% Triton X 100 permeabilisiert sowie für eine Minute mit reinem 0,01M PBS gewaschen. Darauffolgend wurde das Gewebe in einem unspezifischen Block aus 0,01M PBS, 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 4% Milchpulver für eine Stunde und über Nacht bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 0,01M PBS, 10% FCS und dem primären Antikörper anti-Doublecortin (DCX) (Tabelle 1) in einer Verdünnung von 1:4000 inkubiert.

Danach wurden die Hirnschnitte dreimal für fünf Minuten in 0,01M PBS und 0,01% Triton X 100 sowie einmalig für eine Minute in 0,01M PBS gewaschen. Anschließend fand eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper *Goat Anti-Rabbit* (Tabelle 2) in einer Verdünnung von 1:250 in 0,01M PBS und 10% FCS statt. Nachdem die Präparate wieder dreimal für zehn Minuten mit 0,01M PBS gewaschen wurden, erfolgte bei Raumtemperatur eine eineinhalbstündige Inkubation mit 0,01M PBS, 10% FCS und den Lösungen A und B in einer Verdünnung von jeweils 1:300. Diese ABC-Lösung wurde dreißig Minuten vor Benutzung hergestellt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Nach der ABC-Inkubation wurden die Schnitte dreimal für zehn Minuten gewaschen. Anschließend wurden diese in einer DAB-Lösung solange gefärbt, bis die DCX-haltigen Zellen sichtbar wurden. Hierfür wurden *Aqua bidest* und die Flüssigkeiten aus dem DAB-Set, welches eine Pufferlösung mit pH 7,5, eine DAB-Stammlösung und Wasserstoffperoxid

enthielt, nach Herstellerangaben vermischt. Abschließend wurden die Hirnschnitte nochmals dreimal zehn Minuten gewaschen, mit einem feinen Pinsel vorsichtig auf Objektträger aufgetragen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

Die Dehydrierung erfolgte für eine Minute mit 70% Ethanol, fünf Minuten mit 95% Ethanol, zehn Minuten mit 100% Ethanol und zweimal fünf Minuten mit Xylol. Zum Schluss wurden die Präparate mit Einschlussmittel und einem Deckglas abgedichtet und getrocknet.

### 2.9.3 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung Paraffin-eingebetteter Präparate

Als Erstes wurde von den am Mikrotom hergestellten Paraffinschnitten (2.8.2) das Paraffin gelöst und die Präparate hydriert. Hierzu wurde der Objektträger zweimal fünf Minuten in eine Küvette mit Xylol gestellt und danach zehn Minuten in 100% Ethanol, fünf Minuten in 95% Ethanol, fünf Minuten in 70% Ethanol und schließlich eine Minute in *Aqua bidest.* Anschließend erhielten die Schnitte einen Peroxidaseblock mit 0,01M PBS und einem Prozent 30%igem Wasserstoffperoxid für dreißig Minuten, woraufhin diese eine Minute mit *Aqua bidest* gespült wurden. Weiterhin wurde das Gewebe in einem Citratpuffer mit pH 6 für insgesamt zehn Minuten in der Mikrowelle erwärmt. Dabei war darauf zu achten, dass die Flüssigkeit zunächst bei 1000W zum Kochen gebracht wurde und die restlichen Minuten bei 200W vollendet wurden. Nach einer Abkühlphase von 15 Minuten wurden die Schnitte eine Minute in *Aqua bidest* gewaschen, 15 Minuten mit 0,01M PBS und 0,01% Triton X 100 permeabilisiert und eine Minute mit 0,01M PBS gespült. Daraufhin verblieben die Präparate für drei Minuten in 88% Ameisensäure und eine Minute im bereits vorher verwendeten 0,01M PBS. In frischem 0,01M PBS wurden die Schnitte fünf Minuten gewaschen, bevor diese mit einem Fettstift umrandet und in einem unspezifischen Block aus 0,01M PBS, 10% FCS und 4% Milchpulver inkubiert wurden. Der primäre Antikörper wurde in 0,01M PBS und 10% FCS gegeben und verblieb über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Gewebe. Hierfür wurden in dieser Arbeit die Antikörper Anti-IBA1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), Anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Anti-CB1 (Tabelle 1) in der entsprechenden Verdünnung verwendet.

Darauffolgend wurden die Hirnschnitte dreimal fünf Minuten mit 0,01M PBS und 0,01% Triton X 100 und eine Minute nur mit 0,01M PBS gewaschen. Als nächstes erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C mit dem passenden sekundären Antikörper (Tabelle 2), welcher in 0,01M PBS und 10% FCS 1:200 verdünnt wurde und die Vorbereitung der ABC-Lösung. Nachdem dreimal fünf Minuten mit 0,01M PBS gewaschen wurde, wurden die Schnitte für eineinhalb Stunden bei 37°C mit 0,01M PBS, 10% FCS und Lösung A und B in einer Verdünnung von jeweils 1:100 inkubiert und erneut dreimal fünf Minuten in 0,01M PBS gespült. Nun folgte die Färbung mit DAB. Dazu wurde die Lösung nach Herstellerangaben vorbereitet und, die Schnitte solange mit DAB benetzt, bis die DCX-positiven Zellen

unter dem Mikroskop gut sichtbar waren. Anschließend wurde das Gewebe dreimal fünf Minuten in 0,01M PBS gereinigt, woraufhin die Präparate dehydriert wurden, was mit 70% Ethanol für eine Minute, 95% Ethanol für fünf Minuten, 100% Ethanol für zehn Minuten und zweimal mit Xylol für jeweils fünf Minuten geschah. Schließlich wurde auf die Sektionen Einschlussmittel und ein Deckglas gegeben und das Präparat zum Trocknen gelegt.

#### 2.9.4 Immunfluoreszenzfärbung Paraffin-eingebetteter Präparate

Zunächst musste das Paraffin von den am Mikrotom hergestellten Präparaten (2.8.2) mobilisiert werden. Dazu wurden diese zweimal für jeweils fünf Minuten in Xylol gestellt. Anschließend erfolgte die Hydratation mit 100% Ethanol für zehn Minuten, 95% Ethanol über fünf Minuten, 70% Ethanol für ebenfalls fünf Minuten und für eine Minute mit *Aqua bidest*. Um die Immunreaktivität wiederherzustellen, wurden die Schnitte in einen Citratpuffer mit einem pH-Wert von 6, hergestellt aus 2000ml *Aqua bidest*, Natriumhydroxid und 4,2g Citronensäure-Monohydrat, gestellt. In der Mikrowelle wurde dieser zunächst bei 800W für zwei Minuten zum Kochen gebracht, danach für weitere acht Minuten bei 200W erwärmt. Schließlich konnten die Präparate in der Lösung für fünfzehn Minuten abkühlen. Um die Membranen zu permeabilisieren wurden die Schnitte eine Minute in *Aqua bidest*, fünfzehn Minuten in 0,01M PBS mit 0,1% Triton X 100 und eine Minute in 0,01M PBS gewaschen. Nun kamen die Präparate in 88%ige Ameisensäure für drei Minuten und eine Minute erneut in 0,01M PBS. Als nächstes wurden die Sektionen mit einem Fettstift umrandet und mit einem unspezifischen Block, welcher aus 0,01M PBS, 10% FCS und 4% Milchpulver bestand, für eine Stunde benetzt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern Anti-DCX, Anti-IBA1, Anti-GFAP und Anti-CB1 (Tabelle 1) erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte das Waschen der Gewebe in 0,01M PBS mit 1% Triton X 100 für je fünf Minuten in drei Durchgängen und eine Minute in 0,01M PBS. Daraufhin wurden die Präparate mit einem Fettstift umrandet. In einer Verdünnung von 1:200 wurden die passenden zweiten Antikörper (Tabelle 2) mit entsprechenden Wellenlängen in 0,01M PBS und 10% FCS gegeben, etwa 100µl auf jede Sektion gebracht und die Präparate bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die letzten Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Nach der Inkubation wurden die Gewebe dreimal für fünf Minuten in 0,01M PBS gewaschen. Abschließend wurde die Markierung des Fettstifts mithilfe von Xylol entfernt und die Präparate mit einem entsprechenden Medium, welches DAPI enthielt, um die Zellkerne zusätzlich anzufärben, eingebettet.

## 2.10 Quantifizierung von Neuronen

### 2.10.1 Stereologie

Mithilfe der computergesteuerten, unvoreingenommenen, Design-basierten Stereologie wurde die Anzahl der Neurone in der CA1-Region des Hippocampus quantifiziert. Mit dieser Methode können Neurone in dreidimensionalen Objekten unabhängig von ihrer Größe, Form und Orientierung im Raum gezählt werden (West 1993). Die stereologiebasierte Neuronenquantifizierung der Schnitte erfolgte unter verblindeten Bedingungen.

Die Gehirne von 5-6 weiblichen bzw. männlichen Mäusen aus jeder Gruppe wurden dafür mithilfe des Kryostats geschnitten (2.8.1) und alle Schnitte aus einem Gläschen wurden mit Kresylviolett gefärbt (2.9.1). Für die Stereologie wurde das Mikroskop BX 51 mit dem automatisiertem Stelltisch LEP MAC 5000 verwendet. Mithilfe des Programms Stereo Investigator wurden die zu untersuchenden Areale der CA1-Region erfasst, die Neurone nach dem Prinzip des *optical disector* und des *optical fractionator* gezählt sowie die Gesamtneuronenzahl berechnet (Schmitz and Hof 2005; West et al. 1991; West 1993).

Zunächst wurde bei dem zu untersuchenden Schnitt mit dem 4er Objektiv die CA1-Region umrandet (Abbildung 3A). Daraufhin wurde durch das Programm ein Probenraster über den umrandeten Bereich gelegt, dessen Größe variabel war und sich auf einen vorher festgelegten Bereich von  $50\mu\text{m} \times 105\mu\text{m}$ , in denen sich zwanzig Zählkästchen befanden, bezog (Abbildung 3B). Für den *optical disector* wurde eine Höhe von  $5\mu\text{m}$  eingestellt, dessen obere Schutzzone eine Höhe von  $2\mu\text{m}$  hatte. Die Zählrahmen hatten jeweils eine Größe von  $14\mu\text{m} \times 14\mu\text{m}$  und wurden zufällig durch das Programm über das Probenraster gelagert (Abbildung 3B), sodass alle Regionen der studierten Hirnregion die Möglichkeit hatten, in die Zählung mit aufgenommen zu werden (West 2012). Außerdem wurde die Schichtdicke für jeden Zählrahmen individuell eingestellt und sollte sich in einem definierten Bereich befinden. Die Markierung der Neurone erfolgte mit der 100er- Immersionslinse. Die Nervenzellen wurden gekennzeichnet, wenn sie sich im Zählrahmen befanden, der Fokus eingehalten wurde und sie den rot-markierten Bereich nicht berührten (Abbildung 3C und 3D).

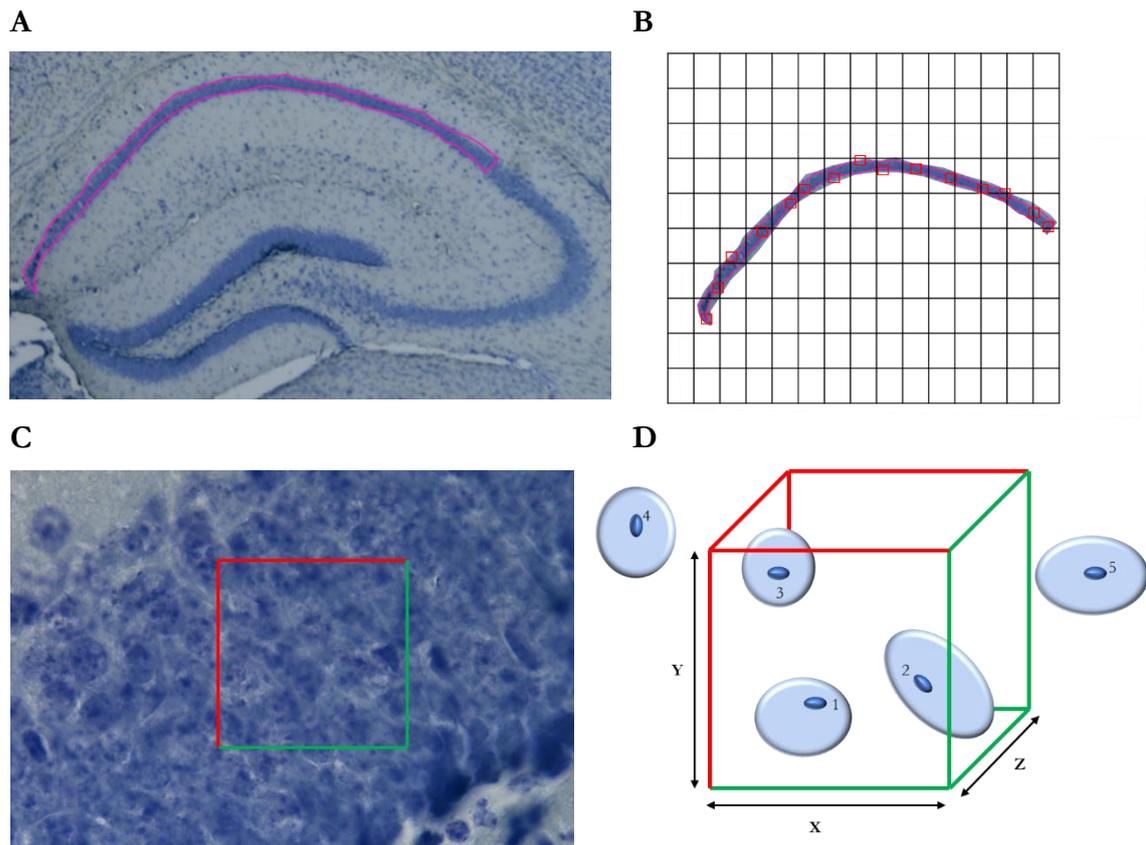


Abbildung 3: Stereologie. Im Hippocampus wurde die CA1-Region (A) mit dem Programm StereoInvestigator umrandet (4-fache Vergrößerung). Über die zu untersuchende CA1-Region wurde durch das Programm ein Probenraster (B) gelegt. Anschließend wurden durch das Programm Zählrahmen mit einer Größe von jeweils  $14\mu\text{m} \times 14\mu\text{m}$  in den umrandeten Bereich gelagert. Mit der 100er Immersionslinse sind die Neurone und der Zählrahmen (C) sichtbar. In die Zählung werden ausschließlich Neurone mit scharfem Nucleus, die innerhalb des Zählrahmens (D) liegen oder die grüne Linie berühren (1,2), einbezogen. Neurone, die sich außerhalb des Zählrahmens befinden oder Kontakt zur roten Linie haben (3,4,5), werden nicht gezählt.

In die Auswertung wurden die Neurone der Hippocampi von Bregma -1,34mm bis -3,8mm (Abbildung 4) (Paxinos und Franklin 2004) einbezogen.

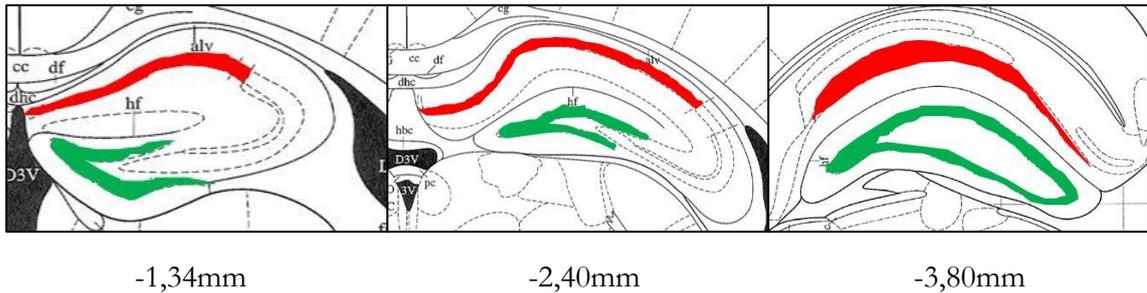


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Zählareale. Die CA1-Region (rot) wurde von Bregma -1,34mm bis -3,80mm in die Zählung einbezogen. Die Zellen des GD (grün) wurde von Bregma -1,34mm -3,80mm gezählt (Mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach Paxinos und Franklin 2004)

Anschließend wurde die hippocampale Neuronenzahl berechnet (Tabelle 7). Hierzu wurde zuerst das Zwischenprodukt P (Tabelle 8) errechnet. Indem die Stichprobengröße (XY) in  $\mu\text{m}$  durch den Zählrahmenbereich (XY) in  $\mu\text{m}$  dividiert wird, berechnet sich die *area sampling fraction* (asf). Die *section sampling fraction* (ssf) beschreibt, der jeweils wievielte Schnitt eines Gehirns analysiert wird. In dieser Arbeit wurde jeder 10. Gehirnschnitt in die Analyse einbezogen (2.8.1). Die *thickness sampling fraction* (tsf) berechnet sich durch Division der jeweiligen Schichtdicke für jeden Schnitt in  $\mu\text{m}$  durch die *disector height* in  $\mu\text{m}$ . Die Summe aus asf, ssf und tsf ergibt schließlich das Zwischenprodukt P.

Anschließend wurde die Neuronenzahl des untersuchten Schnitts  $N_{\text{Schnitt}}$  berechnet. Die Neuronenzahl des untersuchten Gehirnschnitts ergibt sich aus der Multiplikation des Zwischenprodukts P und aller gezählten Marker.

Mit der Neuronenzahl jedes einzelnen Schnitts konnte nachfolgend die Gesamtneuronenzahl  $N_{\text{gesamt}}$  eines Gehirns bestimmt werden. Die Summe aus der Neuronenzahl der einzelnen Schnitte ergibt die Gesamtneuronenzahl  $N_{\text{gesamt}}$ .

Tabelle 7: Formeln zur Berechnung der hippocampalen Neuronenzahl

1) Errechnung des Zwischenprodukts P	$P = asf * ssf * tsf$
2) Berechnung der Neuronenzahl des untersuchten Schnitts $N_x$	$N_x = P * \text{„alle gezählten Marker“}$
3) Berechnung der Gesamtneuronenzahl $N_{gesamt}$	$N_{gesamt} = \sum_{i=1}^n N_{Schnitt i}$

Tabelle 8: Erläuterung zur Berechnung des Zwischenprodukts P

asf	<i>area sampling fraction</i>  $\frac{\text{Stichprobengröße (XY) } [\mu\text{m}]}{\text{Zählrahmenbereich (XY) } [\mu\text{m}]}$
ssf	<i>section sampling fraction</i>  der jeweils wievielte Schnitt eines Gehirns wird gezählt, $ssf = 10$
tsf	<i>thickness sampling fraction</i>  $\frac{\text{die jeweilige Schichtdicke für jeden Schnitt } [\mu\text{m}]}{\text{disector height } [\mu\text{m}]}$

### 2.10.2 Quantifizierung der Neurogenese

Um die Neurogenese in den Gruppen zu beurteilen, wurden die DCX-markierten Neurone quantifiziert. Dafür wurden die 5-6 Gehirne beider Geschlechter pro Gruppe mit dem Kryostaten (2.8.1) geschnitten und mit der *free-floating* 3,3'Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung (2.9.2) angefärbt. Der zu untersuchende Bereich wurde unter das Mikroskop in der 4er Vergrößerung gelegt und der *Gyrus dentatus* identifiziert. In dieser Arbeit wurden dabei die Bregma von -1,34mm bis -3,8mm (Abbildung 4) (Paxinos und Franklin 2004) berücksichtigt. Die Quantifizierung der DCX-markierten Zellen erfolgte verblindet.

Nachdem der *Gyrus dentatus* mit dem Programm StereoInvestigator vollständig gekennzeichnet wurde, wurde ein 100er Objektiv verwendet, um den gekennzeichneten Bereich computergesteuert mäanderförmig zu prüfen und alle DAB-angefärbten Neurone in diesem Bereich zu markieren und zu zählen.

Anschließend wurde die Gesamtzahl der DCX-markierten Neurone berechnet (Tabelle 9). Wurden alle Neurone im entsprechenden *Gyrus dentatus* ermittelt ( $N_{\text{Neuron}}$ ), musste die Summe aus den einzelnen Schnitten gebildet werden, um den Anteil der Neuronen im entsprechenden Gehirn  $N_{\text{Schnitt}}$  zu erhalten. Das Ergebnis wurde mit Faktor zehn multipliziert, um die Neuronenanzahl  $N_{\text{gesamt}}$  für das gesamte Gehirn zu erhalten.

Tabelle 9: Formeln zur Berechnung der DCX-markierten Neurone im *Gyrus dentatus*

1) Berechnung der Neurone im entsprechenden <i>Gyrus dentatus</i>	$N_{\text{Schnitt}} = \sum_{i=1}^n N_{\text{Neuron } i}$
2) Berechnung der Gesamtneuronenzahl des Gehirns	$N_{\text{gesamt}} = N_{\text{Schnitt}} * 10$

### 2.10.3 Analyse von CB1, GFAP und IBA1

Der prozentuale Anteil der Expression von CB-1, GFAP oder IBA-1 wurde sowohl im Hippocampus als auch im Cortex ermittelt und verglichen. Dazu wurden als erstes die in Paraffin eingebetteten rechten Hemisphären mit dem Mikrotom geschnitten (2.8.2) und eine DAB-Immunfärbung mit dem entsprechenden Antikörper durchgeführt (2.9.3). Für die Analyse wurden jeweils drei weibliche Gehirne pro Gruppe und pro Gehirn jeweils drei Schnitte mit einem Abstand von 20 $\mu\text{m}$  verwendet. Nachdem die Schnitte gefärbt wurden, wurden sie mithilfe des Mikroskops BX 51 mit der integrierten Kamera Moticam Pro 282B fotografiert. Hierzu wurde der Hippocampus mit dem 10er Objektiv aufgenommen, wohingegen der Cortex mit einem 20er Objektiv und mit jeweils drei Bildern abgebildet wurde. Dafür wurde der Cortex direkt mittig (parietal) über dem *Gyrus dentatus* und jeweils 30° links und rechts (frontal und okzipital) davon fotografiert. Die Mikroskopeinstellungen sowie die Raumbelichtung blieben während des Prozesses konstant.

Mit ImageJ wurde jedes Bild in eine Auflösung von 8-Bit binärisiert, sodass ein möglichst hoher Kontrast im Bild geschaffen wurde. Die jeweilige Schwelle für eine Gruppe von Bildern wurde anhand der zu untersuchenden Zellen, die den entsprechenden Antikörper exprimierten, definiert. Dabei wurde die DAB-gefärbte Fläche proportional zur Expression von IBA-1, CB-1 oder GFAP angenommen. Die Ergebnisse für jede Gruppe wurden in Relation zur Kontrollgruppe gebracht, wobei die Kontrollgruppe als 100% gewertet wurde.

Beispielhaft wurden Bilder der Immunfluoreszenzfärbung dieser Marker mit dem Mikroskop Nikon Eclipse Ti-E mit dem Lampensystem Nikon Intensilight c-hgfi und der Software NIS angefertigt. Dazu wurde in 100facher Vergrößerung jeweils der Cortex und der

Hippocampus mit den Kanälen für Immunfluoreszenz DAPI (blaue Gegenfärbung), GFP (grün fluoreszierendes Protein) und RFP (rot fluoreszierendes Protein) aufgenommen.

## 2.11 Statistik

Statistische Unterschiede aus den erhobenen Daten der Gruppen wurden mithilfe von GraphPad Prism 5.01 ausgewertet. Mittels ungepaartem Zweistichproben-t-Test bzw. einfacher Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur wurden die Gruppen miteinander verglichen. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM = *standard error of the mean*) des Mittelwertes angegeben. Die Signifikanzniveaus aller statistischen Auswertungen betragen \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  und \* $p < 0.05$ . Mithilfe des *outlier calculator* von GraphPad (vgl. 2.5) wurden mögliche Ausreißer ermittelt, die der Auswertung entzogen wurden. Die Anzahl der verwendeten Tiere (n) ist im jeweiligen Abschnitt im Ergebnisteil aufgeführt.

## 3 Ergebnisse

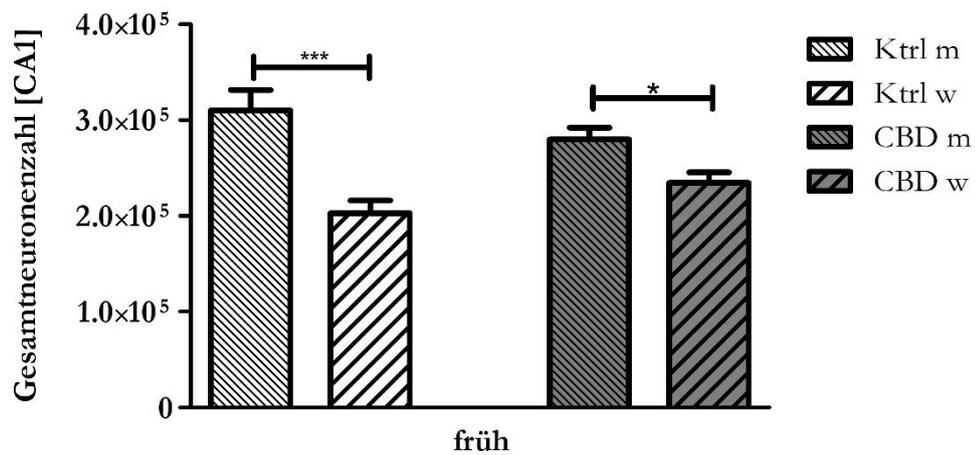
### 3.1 Cannabidiol hat keinen negativen Effekt auf die Neuronenzahl in der CA1-Region

Mithilfe Design-basierter Stereologie (2.10.1) wurde die Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus bei früher und später Gabe von CBD im Vergleich zu Kontrolltieren differenziert.

#### 3.1.1 Die frühe Gruppe weist einen Geschlechtsunterschied auf

Zuerst wurde ermittelt, ob in der frühen oder der späten Gruppe Geschlechtsunterschiede auftraten (Abbildung 5). Einen Unterschied gab es in der Anzahl der Neurone in der frühen Gruppe sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei der CBD-behandelten Gruppe, wobei die männlichen Tiere signifikant mehr Nervenzellen als die weiblichen Tiere aufwiesen (Abbildung 5A, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,0004; Mittelwert Ktrl 3M m = 310254, SEM  $\pm$  21392; Mittelwert Ktrl 3M w = 202697, SEM  $\pm$  13316; Mittelwert CBD 3M m = 279946, SEM  $\pm$  12079; Mittelwert CBD 3M w = 279946, SEM  $\pm$  10755). In der späten Gruppe gab es weder bei den Kontrolltieren noch bei den Cannabidioltieren einen signifikanten Unterschied (Abbildung 5B, einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,7495; Mittelwert Ktrl 5M m = 272760, SEM  $\pm$  10915; Mittelwert Ktrl 5M w = 254273, SEM  $\pm$  15320; Mittelwert CBD 5M m = 256181, SEM  $\pm$  19039; Mittelwert CBD 5M w = 246801, SEM  $\pm$  20147). Dementsprechend wurde eine getrennte Analyse der Geschlechter bezüglich der Gesamtneuronenzahl durchgeführt.

A



B

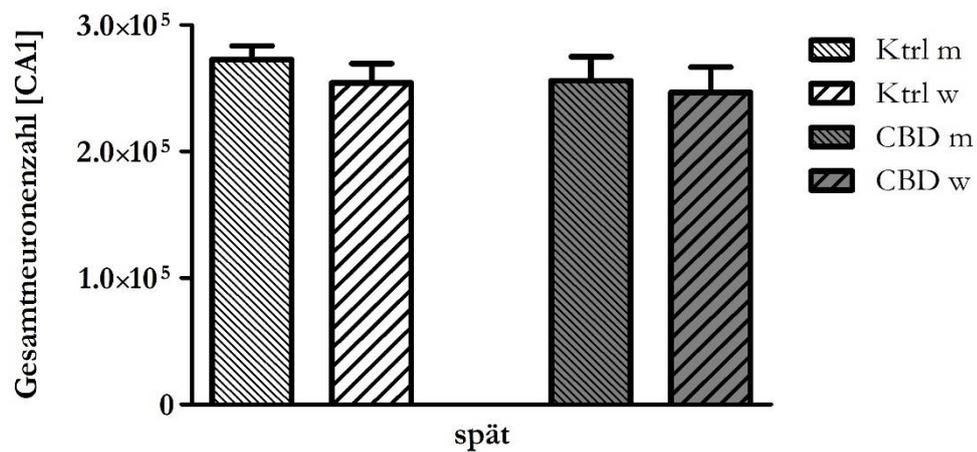


Abbildung 5: Die Gesamtneuronenzahl war in der frühen Gruppe bei den Männchen höher als bei den Weibchen. Die Anzahl der Neurone bei den männlichen Tieren in der frühen Gruppe war signifikant höher als bei den weiblichen Tieren - sowohl mit als auch ohne CBD-Behandlung (A) (einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,0004). In der späten Gruppe wurde kein Geschlechtsunterschied bei der Kontroll- oder der CBD-behandelten Gruppe festgestellt (B) (einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,7495). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert; n = 5-6 pro Gruppe.

### 3.1.2 Es gab keinen Unterschied durch CBD-Behandlung innerhalb der Geschlechter

Die weitere Analyse ergab, dass in der frühen Gruppe die Behandlung mit CBD keinen Nervenzellverlust in Bezug auf die unbehandelten Kontrolltiere weder bei den Männchen (Abbildung 6A, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,2523; Mittelwert Ktrl 3M m = 310300, SEM  $\pm$  21390, Mittelwert CBD 3M m = 279900, SEM  $\pm$  12080) noch bei den Weibchen (Abbildung 6B, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0913; Mittelwert Ktrl 3M w = 202700, SEM  $\pm$  13320, Mittelwert CBD 3M w = 234700, SEM  $\pm$  10750) hervorrief. Ebenso konnte kein negativer Effekt in der späten Gruppe bei den CBD-behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren sowohl bei den Männchen (Abbildung 6C, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,4716; Mittelwert Ktrl 5M m = 272800, SEM  $\pm$  10910, Mittelwert CBD 5M m = 256200, SEM  $\pm$  19040) als auch bei den Weibchen (Abbildung 6D, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,7821; Mittelwert Ktrl 5M w = 254300, SEM  $\pm$  15320, Mittelwert CBD 5M w = 246800, SEM  $\pm$  20150) festgestellt werden.

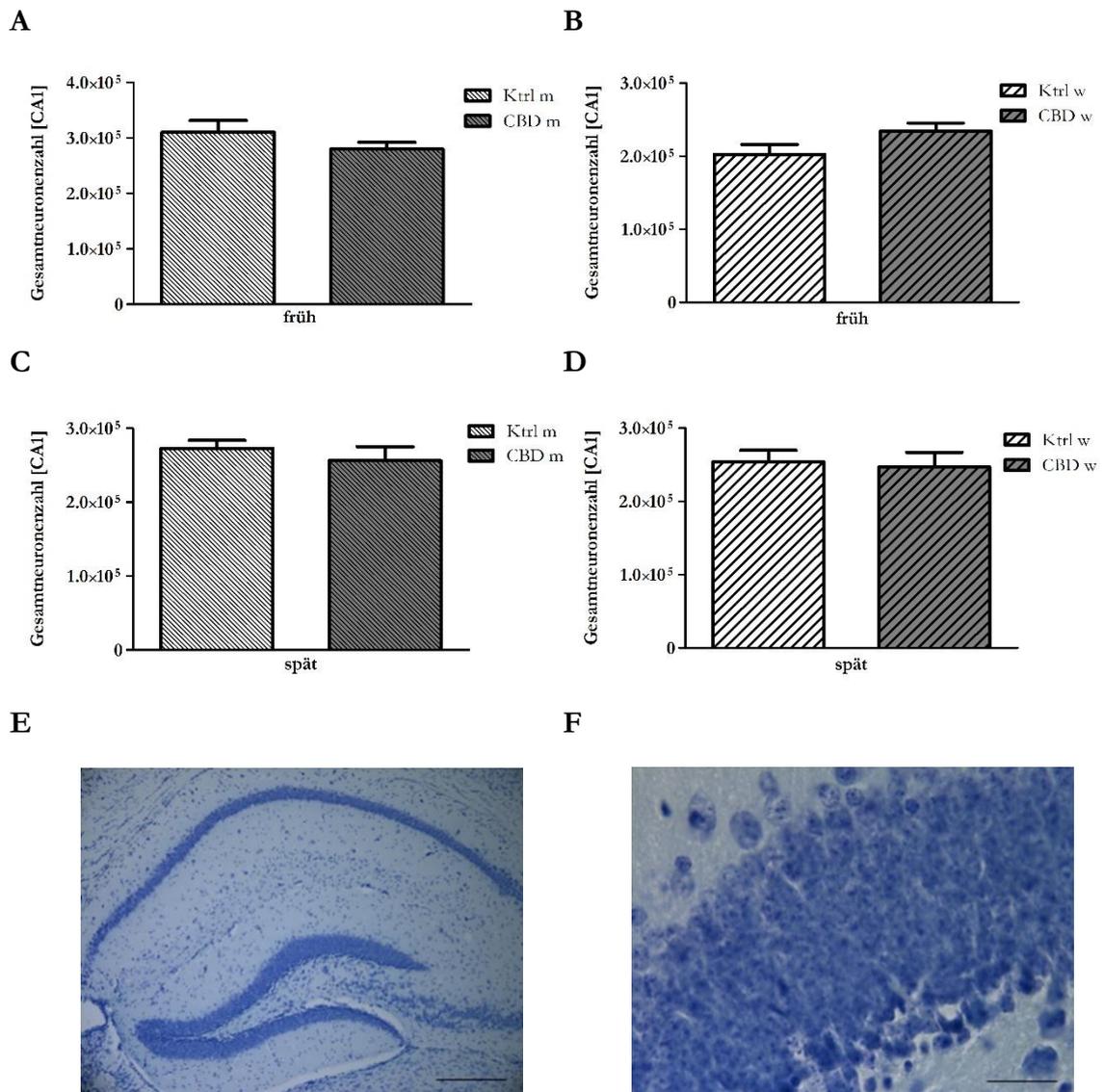


Abbildung 6: Die Gabe von CBD hatte keinen negativen Effekt auf die Neuronenzahl. Es gab keinen Neuronenverlust bei Tieren mit CBD-Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren in der frühen Gruppe bei den Männchen (A) (ungepaarter t-Test;  $p = 0,2523$ ) oder bei den Weibchen (B) (ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert =  $0,0913$ ). Auch in der späten Gruppe führte die Behandlung mit CBD zu keinem Verlust der Neurone, weder bei den Männchen (C) (ungepaarter t-Test;  $p = 0,4716$ ) noch bei den Weibchen (D) (ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert =  $0,7821$ ). Beispielbilder der CA1-Region mit Kresylviolett-Färbung mit einem Maßstab von  $200\mu\text{m}$  (E) und  $20\mu\text{m}$  (F). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n = 5-6$  pro Gruppe.

### 3.2 Die Neurogenese im *Gyrus dentatus* wird von Cannabidiol nicht negativ beeinflusst

Doublecortin (DCX) ist ein Marker zur Diskriminierung von Neuroblasten und frühen postmitotischen Neuronen (Brown et al. 2003). Die Neurogenese findet im *Gyrus dentatus* des Hippocampus statt und lässt sich durch Quantifizierung aller DCX-markierten Zellen, die mittels *Free-floating* 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung (vgl. 2.9.2) sichtbar werden, ermitteln und vergleichen (Couillard-Despres et al. 2005). In der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur konnte weder in der frühen Gruppe noch in der späten Gruppe ein Geschlechtsunterschied bei den entsprechend behandelten Tieren beobachtet werden (frühe Gruppe: einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,1488; Mittelwert Ktrl 3M m = 6518, SEM  $\pm$  331,9; Mittelwert Ktrl 3M w = 5352, SEM  $\pm$  325,8; Mittelwert CBD 3M m = 5319, SEM  $\pm$  215,0; Mittelwert CBD 3M w = 5708, SEM  $\pm$  510,6; späte Gruppe: einfache Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur; p-Wert = 0,0506; Mittelwert Ktrl 5M m = 4358, SEM  $\pm$  277,5; Mittelwert Ktrl 5M w = 6353, SEM  $\pm$  748,7; Mittelwert CBD 5M m = 6336, SEM  $\pm$  495,0; Mittelwert CBD 5M w = 5882, SEM  $\pm$  308,1). Dementsprechend wurden diese zusammengefasst analysiert (Abbildung 7). Betrachtete man die Neuronenentwicklung in der frühen Gruppe, so ließ sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und CBD-Gruppe feststellen (Abbildung 7A, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0908; Mittelwert Ktrl 3M = 5935, SEM  $\pm$  293; Mittelwert CBD 3M = 5304, SEM  $\pm$  197,1) Gleichmaßen führte auch die Behandlung mit CBD in der späten Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren zu keiner veränderten Neurogenese (Abbildung 7B, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,2850; Mittelwert Ktrl 5M = 5446, SEM  $\pm$  515,4; Mittelwert CBD 5M = 6088, SEM  $\pm$  274,9).

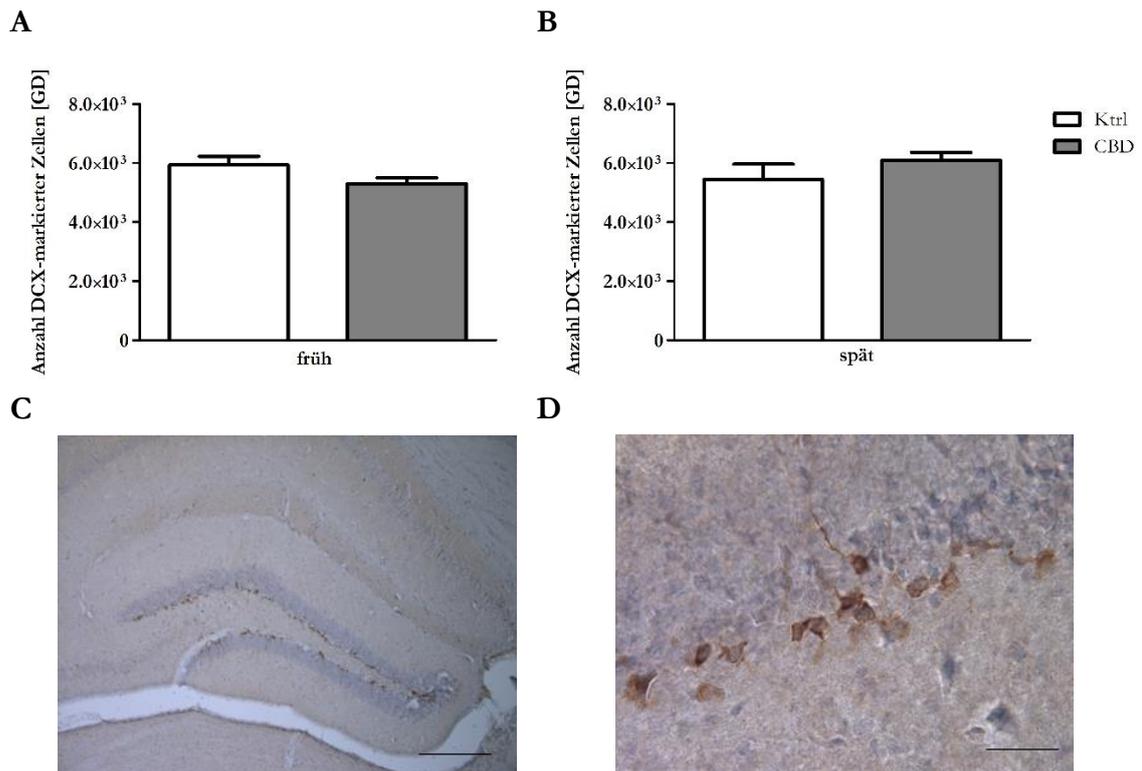


Abbildung 7: CBD-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Neurogenese. In der frühen Gruppe gab es keinen Unterschied in der Neurogenese zwischen Kontrolltieren und CBD-behandelten Tieren (A) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0908). Auch in der späten Gruppe hat sich die Neurogenese zwischen behandelten und unbehandelten Tieren nicht unterschieden (B) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,2850). Beispielbilder des Gyrus dentatus mit Anfärbung DCX-haltiger Zellen mit einem Maßstab von 200µm (C) und 20µm (D). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert; n = 10-11 pro Gruppe.

### 3.3 Auswirkungen von Cannabidiol auf die CB1-Expression

CB1 sind vor allem im ZNS lokalisiert und sowohl an der Modulation von Motorik und Lernprozessen als auch an der Homöostase der synaptischen Plastizität beteiligt (Monory et al. 2015). In dieser Arbeit wurde der Effekt auf die CB1-Expression in der frühen und späten Gruppe im Hippocampus und auch im Cortex analysiert.

#### 3.3.1 CBD erhöht die CB1-Expression im Hippocampus bei früher Behandlung

Nachdem die Mäuse in der frühen Gruppe für einen Zeitraum von sechs Wochen mit CBD behandelt wurden, wurde die CB1-Expression nach längerer Abstinenz von CBD mit der von unbehandelten Weibchen verglichen. In der Folge zeigte sich eine signifikante Vermehrung der Rezeptorexpression im Hippocampus um  $34,56\% \pm 11,68\%$  (Abbildung 8A,

ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert = 0,0098). Im Gegensatz dazu blieb die CB1-Expression im Cortex unverändert (Abbildung 8B, ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert = 0,3129).

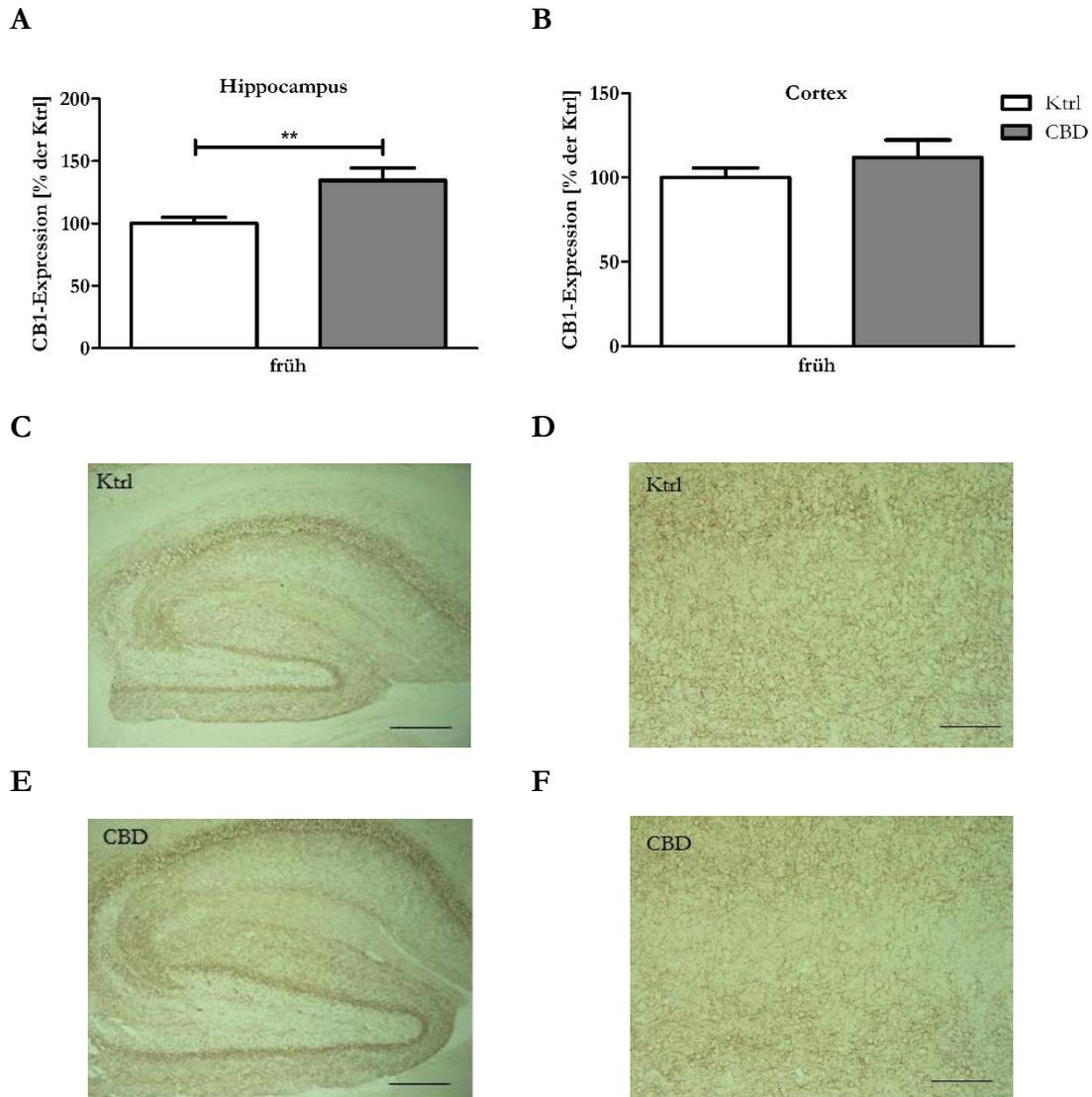


Abbildung 8: CBD-Behandlung führte zu signifikant erhöhter CB1-Expression im Hippocampus. Die Behandlung mit CBD bewirkte eine signifikante Erhöhung der CB1-Expression im Hippocampus (A) (ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert = 0,0098). Im Cortex veränderte sich die CB1-Expression hingegen nicht (B) (ungepaarter t-Test;  $p$ -Wert = 0,3129). Immunohistochemische Färbung der Kontrolltiere mit CB1 im Hippocampus (C) (Maßstab 200 $\mu$ m) und im Cortex (D) (Maßstab 100 $\mu$ m). Immunohistochemische Färbung mit CB1 bei CBD-Behandlung im Hippocampus (E) (Maßstab 200 $\mu$ m) und im Cortex (F) (Maßstab 100 $\mu$ m). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$ . Das Signifikanzniveau liegt bei  $**p < 0.01$ .

### 3.3.2 CBD erhöht die CB1-Expression im Hippocampus und Cortex bei später Behandlung

In der späten Gruppe wiesen die Weibchen, welche mit CBD behandelt wurden, eine gegenüber den Kontrolltieren um  $63,11\% \pm 18,90\%$  signifikant erhöhte CB1-Expression im Hippocampus auf (Abbildung 9A, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0042). Gegenüber der frühen Behandlung ließ sich bei später Intervention auch eine Erhöhung der Rezeptorexpression im Cortex um  $40,83\% \pm 18,36\%$  erkennen (Abbildung 9B, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0298).

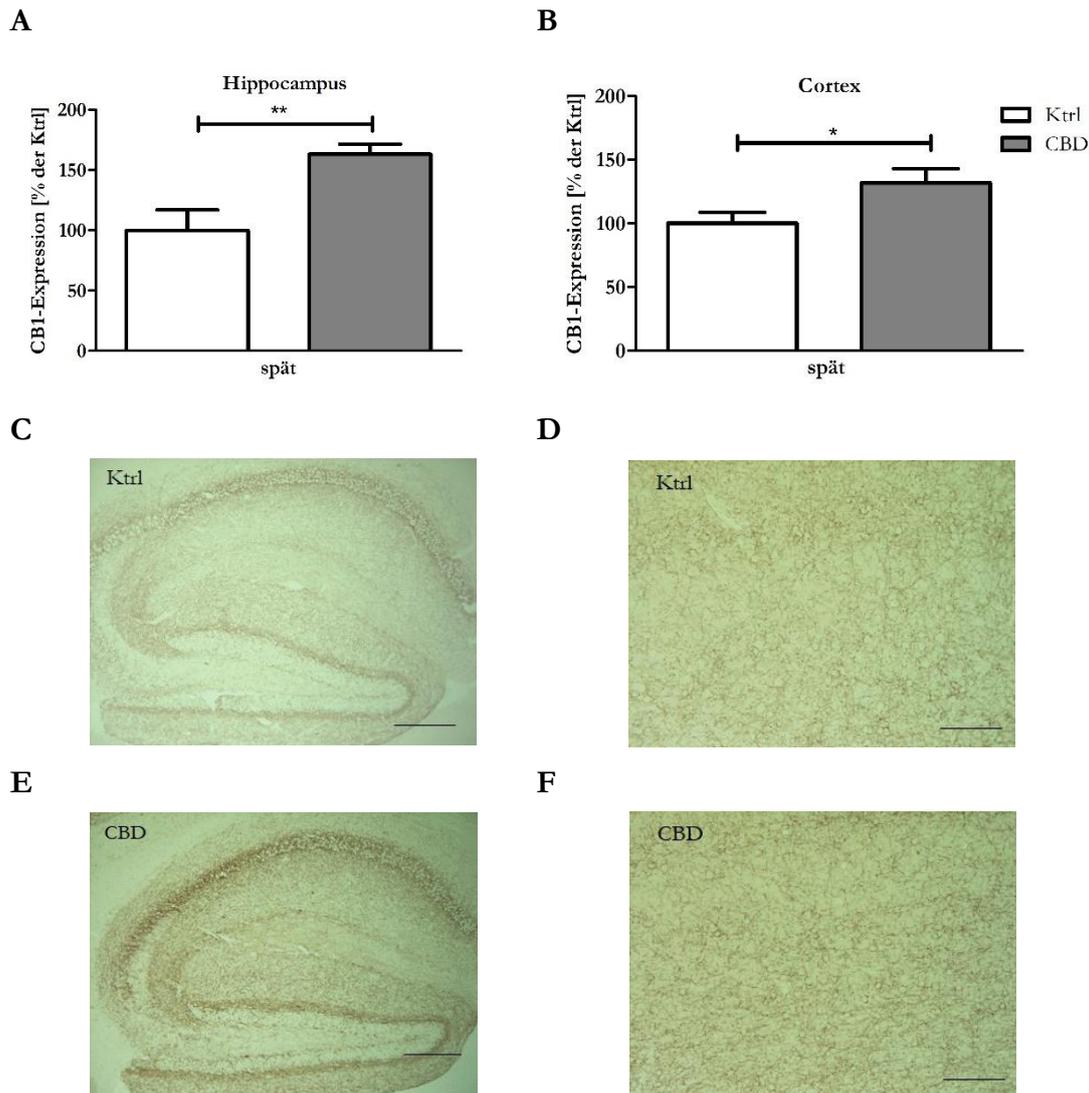


Abbildung 9: Die Behandlung mit CBD führte zu einer signifikanten Erhöhung der CB1-Expression. CBD-Behandlung führte zur signifikanten Vermehrung der CB1-Expression im Hippocampus (A) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0042). Auch im Cortex kam es zu einer signifikanten Erhöhung der CB1-Expression (B) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0298). Immunhistochemische Färbung der Kontrolltiere mit CB1 im Hippocampus (C) (Maßstab

200 $\mu\text{m}$ ) und im Cortex (D) (Maßstab 100 $\mu\text{m}$ ). Immunhistochemische Färbung mit CB1 bei CBD-Behandlung im Hippocampus (E) (Maßstab 200 $\mu\text{m}$ ) und im Cortex (F) (Maßstab 100 $\mu\text{m}$ ). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$  pro Gruppe. Das Signifikanzniveau liegt bei  $*p < 0.05$  und  $**p < 0.01$ .

### **3.4 Veränderungen der IBA1-Expression unter Einfluss von Cannabidiol**

IBA1 wird in der Mikroglia exprimiert und ist somit ein Marker für Entzündung (Imai et.al. 1996). Um zu beurteilen wie sich die Behandlung mit CBD auf die Mikroglia im Hippocampus und im Cortex auswirkt, wurden behandelte Weibchen mit unbehandelten Weibchen verglichen.

#### **3.4.1 CBD reduziert die mikrogliale IBA1-Expression im Hippocampus bei früher Behandlung**

Unter CBD-Behandlung in der frühen Gruppe verminderte sich die Exprimierung von IBA1 in der Mikroglia im Hippocampus signifikant um  $32,90\% \pm 14,28\%$  im Vergleich zu der IBA1-Expression bei den Kontrolltieren (Abbildung 10A, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0349). Dagegen manifestierte sich im Cortex kein Unterschied (Abbildung 10B, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,7339).

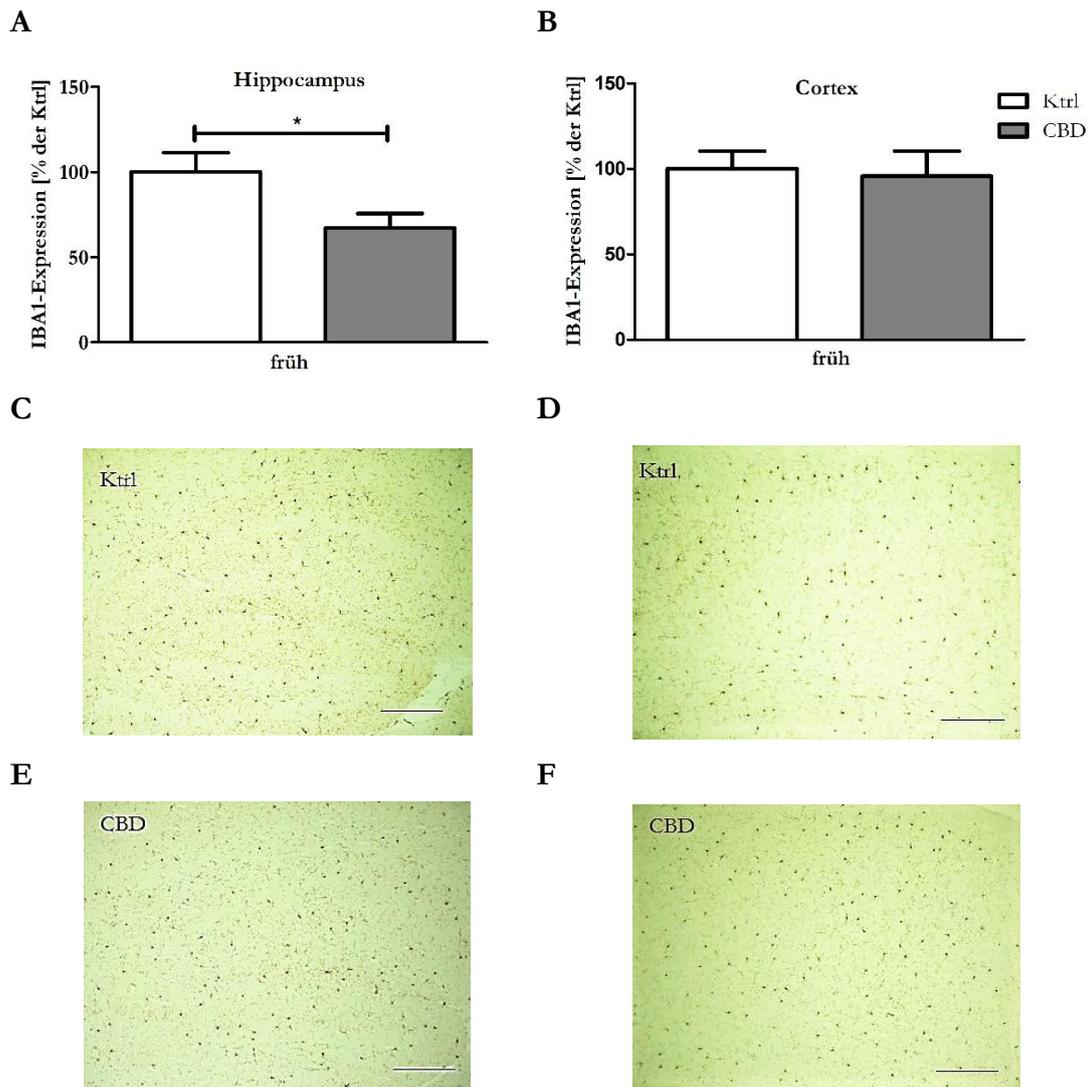


Abbildung 10: Im Hippocampus reduzierte sich die IBA1-Expression bei Behandlung mit CBD in der frühen Gruppe. CBD-Behandlung ergab eine signifikante Verminderung der IBA1-Expression im Hippocampus in der frühen Gruppe (A) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0349). Im Cortex wirkte sich die Behandlung mit CBD nicht auf die IBA1-Expression aus (B) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,7339). Immunhistochemische Färbung der Kontrolltiere mit IBA1 im Hippocampus (C) (Maßstab 200µm) und im Cortex (D) (Maßstab 100µm). Immunhistochemische Färbung mit IBA1 bei CBD-Behandlung im Hippocampus (E) (Maßstab 200µm) und im Cortex (F) (Maßstab 100µm). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$  pro Gruppe. Das Signifikanzniveau liegt bei  $*p < 0.05$ .

### 3.4.2 CBD erhöht die mikrogliale IBA1-Expression im Hippocampus und Cortex bei später Behandlung

Behandelte man die Mäuse in der späten Gruppe mit Cannabidiol, so ließ sich im Hippocampus im Vergleich zu der Kontrollgruppe ein nicht signifikanter Anstieg der IBA1-Expression erkennen (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,1529). Die IBA1-Expression im Cortex erhöhte sich signifikant um  $35,26\% \pm 15,22\%$  in der CBD-behandelten Gruppe (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0245).

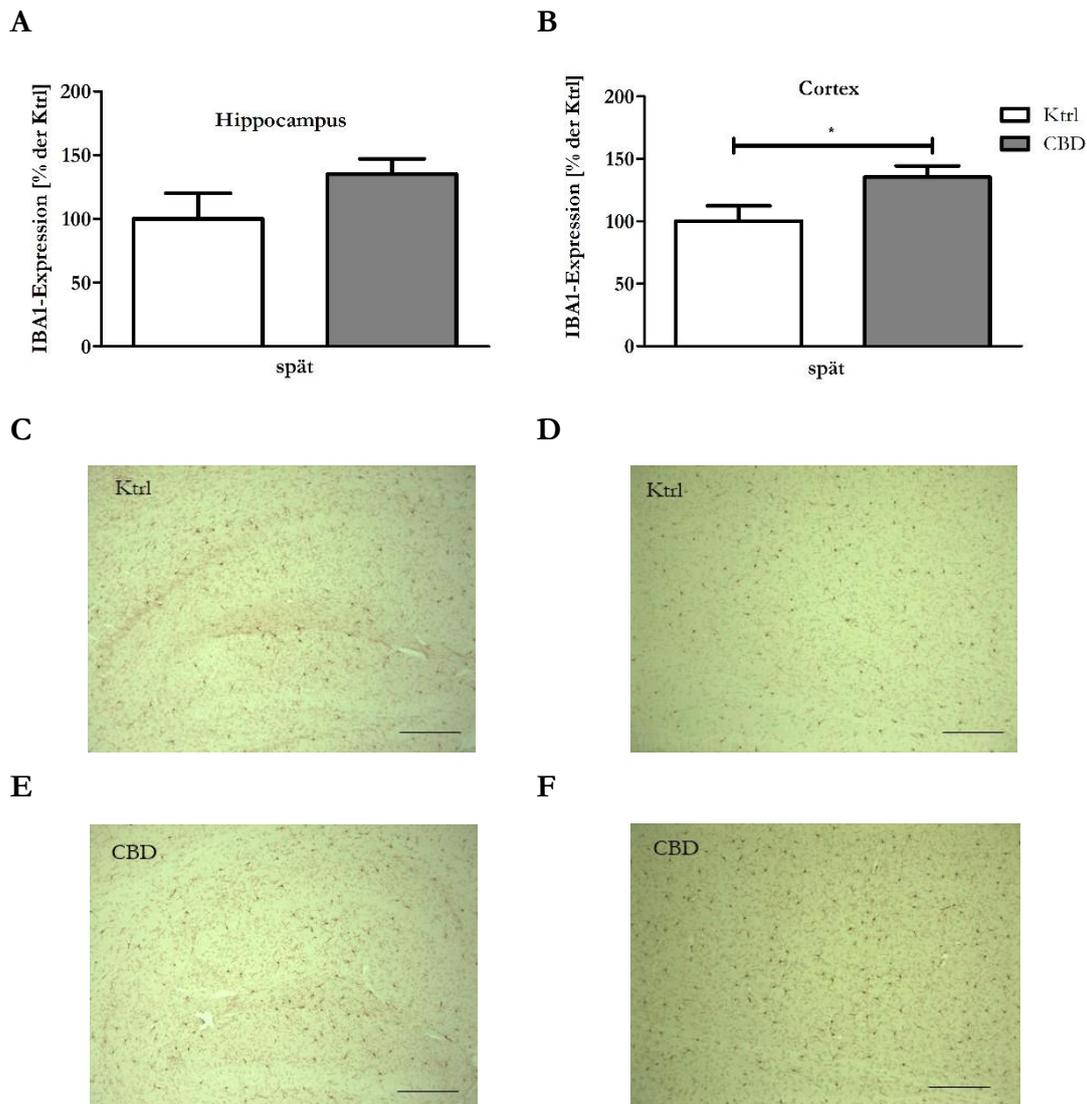


Abbildung 11: In der späten Gruppe zeigte sich eine Erhöhung der IBA1-Expression im Hippocampus und Cortex bei der Behandlung mit CBD. Im Hippocampus kam es zu einer nicht signifikanten Erhöhung der IBA1-Expression (A) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,1529). Es präsentierte sich eine signifikante Erhöhung der IBA1-Expression im Cortex unter Einfluss von CBD (B) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,0245). Immunhistochemische Färbung der Kontrolltiere mit IBA1 im Hippocampus (C) (Maßstab 200µm) und im Cortex (D) (Maßstab 100µm). Immunhistochemische Färbung mit IBA1 bei CBD-Behandlung im

Hippocampus (E) (Maßstab 200 $\mu$ m) und im Cortex (F) (Maßstab 100 $\mu$ m). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$  pro Gruppe. Das Signifikanzniveau liegt bei  $*p < 0.05$ .

### **3.5 Effekte der GFAP-Expression unter Cannabidiolbehandlung**

Das Intermediärfilament GFAP kommt insbesondere in Astrozyten vor und ist ein Marker für Stamm- und Progenitorzellen, sowie für Proliferation als auch Inflammation (Middeldorp und Hol 2011). Die Expression von GFAP wird zwischen CBD-behandelten und unbehandelten Weibchen differenziert.

#### **3.5.1 Die frühe Behandlung mit CBD führt zu einem Anstieg der GFAP-Expression im Hippocampus und Cortex**

Eine nicht signifikante Erhöhung um  $37,51\% \pm 32,68\%$  der GFAP-Expression ergab sich in der frühen Gruppe bei Gabe von CBD im Hippocampus (Abbildung 12A, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,2690). Im Cortex resultierte ebenfalls ein nicht signifikanter Anstieg von GFAP unter CBD-Behandlung um  $49,23\% \pm 47,47\%$  (Abbildung 12B, ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,3048).

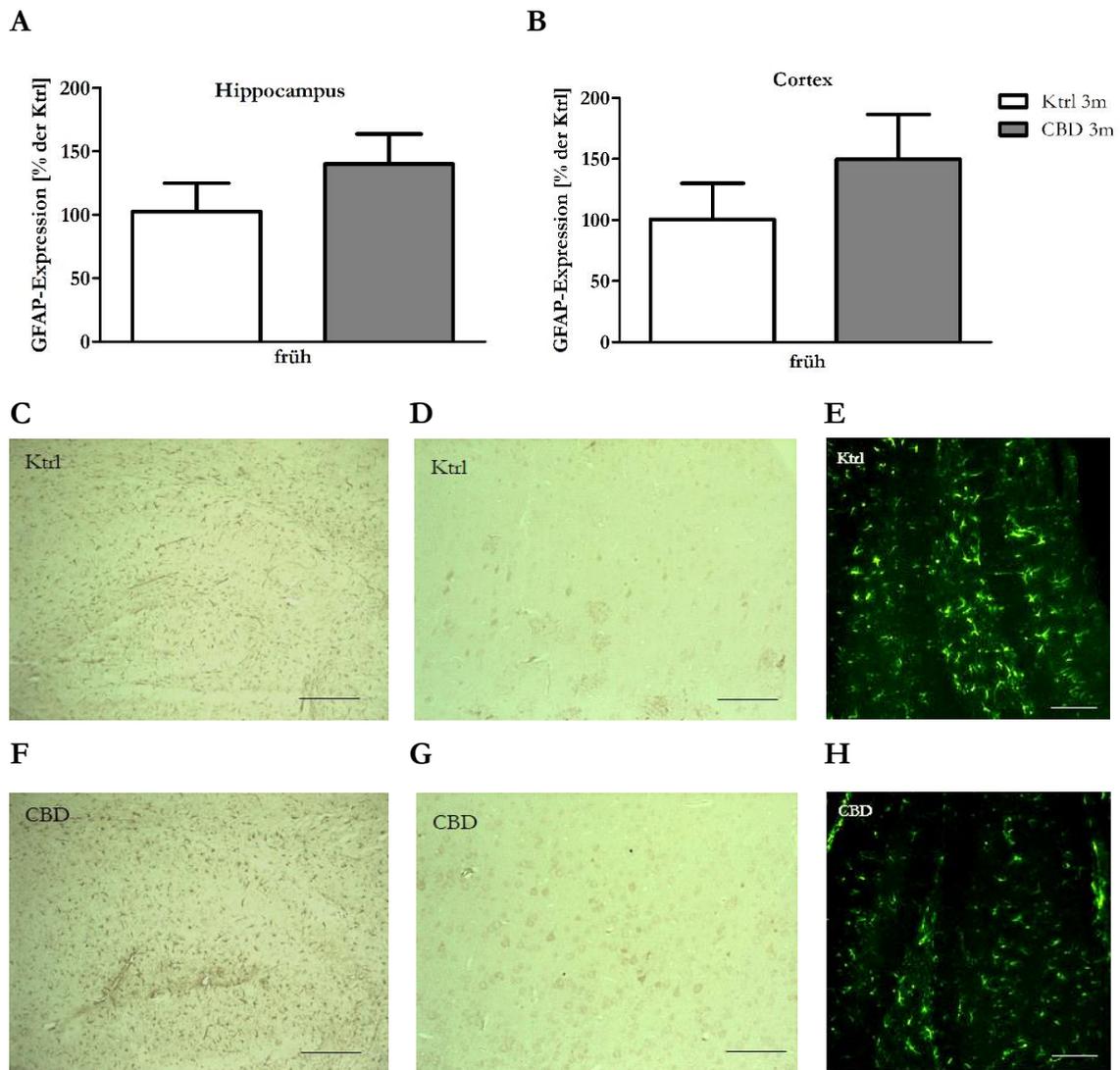


Abbildung 12: Kein Unterschied der GFAP-Expression nach CBD-Behandlung. Unter CBD-Behandlung kam es zu keinem signifikanten Anstieg der GFAP-Expemierung in der behandelten Gruppe im Hippocampus (A) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,2690). Ebenso gab es im Cortex keinen Unterschied bei den Cannabidioltieren zu den Kontrolltieren (B) (ungepaarter t-Test; p-Wert = 0,3048). Immunhistochemische Färbung der Kontrolltiere mit GFAP im Hippocampus (C) (Maßstab 200µm) und im Cortex (D) (Maßstab 100µm). Immunfluoreszenzfärbung mit GFAP im Hippocampus der Kontrolltiere (E) (Maßstab 100µm) Immunhistochemische Färbung mit GFAP bei CBD-Behandlung im Hippocampus (F) (Maßstab 200µm) und im Cortex (G) (Maßstab 100µm). Immunfluoreszenzfärbung mit GFAP im Hippocampus bei CBD-Behandlung (H) (Maßstab 100µm). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$  pro Gruppe.

### 3.5.2 Die späte Behandlung mit CBD führt zu einem Anstieg der GFAP-Expression im Hippocampus

Im Hippocampus wurde eine signifikante Erhöhung um  $105,0\% \pm 32,44\%$  der Expression von GFAP in den Astrozyten bei den mit CBD behandelten Tieren deutlich ( $p$ -Wert = 0,0052, ungepaarter  $t$ -Test). Im Cortex hingegen vermehrte sich die GFAP-Expression in den Astrozyten unter CBD nur um  $10,15\% \pm 29,96\%$  ( $p$ -Wert = 0,7361, ungepaarter  $t$ -Test).

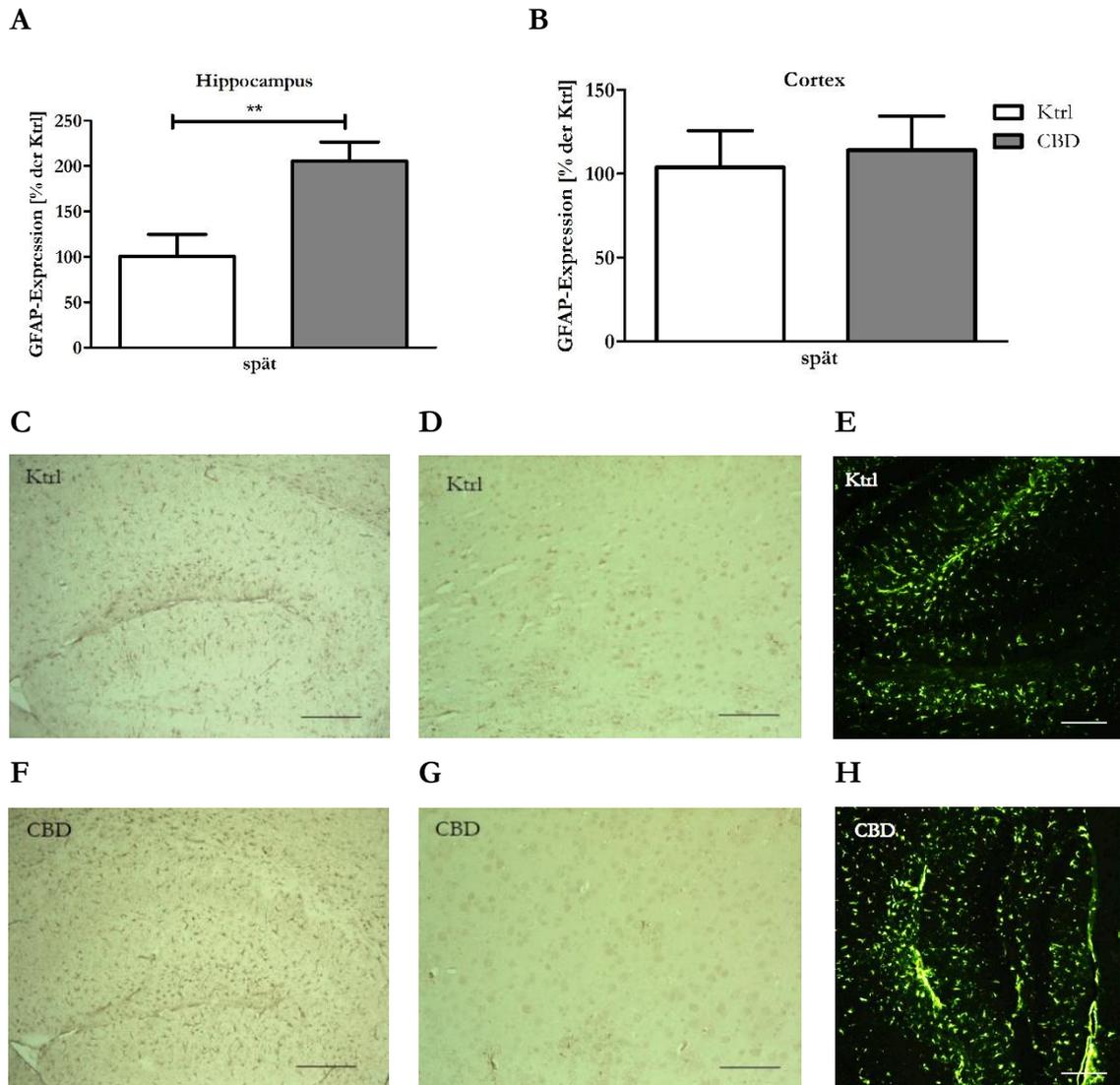


Abbildung 13: Die GFAP-Expression steigerte sich signifikant im Hippocampus in der späten Gruppe unter der Behandlung mit CBD. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg im Hippocampus bei der Behandlung mit CBD (A) (ungepaarter  $t$ -Test;  $p$ -Wert = 0,0052). Im Cortex gab es keinen Unterschied in der GFAP-Expression (B) (ungepaarter  $t$ -Test;  $p$ -Wert = 0,7361). Immunhistochemische Färbung der Kontrolltiere mit GFAP im Hippocampus (C) (Maßstab  $200\mu\text{m}$ ) und im Cortex (D) (Maßstab  $100\mu\text{m}$ ). Immunfluoreszenzfärbung mit GFAP im Hippocampus der Kontrolltiere (E) (Maßstab  $100\mu\text{m}$ ). Immunhistochemische

Färbung mit GFAP bei CBD-Behandlung im Hippocampus (F) (Maßstab 200µm) und im Cortex (G) (Maßstab 100µm). Immunfluoreszenzfärbung mit GFAP im Hippocampus bei CBD-Behandlung (H) (Maßstab 100µm). Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM präsentiert;  $n_{\text{Hippocampus}} = 9$  pro Gruppe,  $n_{\text{Cortex}} = 27$  pro Gruppe. Das Signifikanzniveau liegt bei  $**p < 0.01$ .

## 4 Diskussion

Ob Cannabiskonsum gesundheitsschädlich ist, wird in der heutigen Zeit, gerade in Bezug auf die potenzielle Legalisierung in Deutschland, kontrovers diskutiert (1.2). Daher wurde in dieser Arbeit analysiert, wie sich eine CBD-Behandlung auf das gesunde adulte Mausgehirn bezüglich Neuroproliferation, Neuronenzahl und Neuroinflammation auswirkt. Dazu wurden Wildtyp-Mäusen der C57BL/6J-Linie im Alter von drei bzw. fünf Monaten über 42 Tage 20mg/kg KG CBD intraperitoneal injiziert, wobei die frühe CBD-behandelte Gruppe einer Behandlungspause von acht Wochen ausgesetzt war. Die intraperitoneale Gabe gewährleistete eine kontinuierliche Dosis des CBD. Alle Mäuse wurden im Alter von sechseinhalb Monaten getötet, damit altersabhängige Fehler möglichst vermieden wurden.

Untersuchungen mit CBD wurden bei Mäusen bis zu einer Dosis von 100mg/kg KG vorgenommen, daher entspricht die Gabe von 20mg/kg KG CBD einer geringen bis mittleren Dosis, wobei bei CBD-Einnahme generell wenig Nebenwirkungen zu erwarten sind (Bergamaschi et al. 2011). Bei *In-vivo*-Studien mit Menschen wurden bis zu 600mg CBD oral verabreicht, sodass 20mg/kg KG eine sehr hohe Dosis darstellen würden.

Hausmäuse sind ab einem Alter von ca. 60 Tagen körperlich und behavioral vollständig entwickelt und werden somit als adult bezeichnet (Brust et al. 2015). Ihre reproduktive Phase kann sich bis zu einem Alter von ungefähr 750 Tagen fortsetzen und mit einem Alter von ca. 1100 Tagen endet die Lebenszeit der Mäuse. Das Alter der Mäuse in dieser Arbeit betrifft demnach das frühe Erwachsenenalter. So kann man annehmen, dass die Gehirne zum Zeitpunkt der CBD-Gabe vollständig ausgereift waren, jedoch noch keinen biologischen neurodegenerativen Prozessen unterlagen.

### 4.1 Das gesunde Gehirn wird von CBD nicht negativ beeinflusst

#### 4.1.1 Effekte von CBD auf Neurogenese und Zellzahl

Diese Arbeit analysiert die Beeinflussung der adulten Neurogenese bei Mäusen. Adulte Neurogenese konnte bereits bei vielen Säugetieren nachgewiesen werden und unterscheidet sich von der embryonalen Entwicklung des Gehirns, da sie im ausgereiften Gehirn stattfindet. (Altman 1962; Eriksson et al. 1998).

Neurogenese und synaptische Plastizität sind aktivitätsabhängig und werden von Stress, Umweltfaktoren, Alter und Schädigungen des Gehirns beeinflusst (Gould et al. 1997; Kempermann et al. 2002; van Praag et al. 1999). Dabei ist die adulte Neurogenese ein komplex multigradueLLer Prozess aus Proliferation, Differenzierung, Migration und neuronaler Reifung, bei dem unterschiedliche Proteine exprimiert werden (Lugert et al. 2010; von Bohlen und Halbach 2011). Sie findet vorwiegend in der subventrikulären Zone (SVZ) der

lateralen Ventrikel und in der subgranulären Zone (SGZ) des *Gyrus dentatus* im Hippocampus statt (Altman und Das 1966; Balu und Lucki 2009; Zhao et al. 2008).

Aufgrund der transienten Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins DCX in Progenitorzellen und Neuroblasten, kann DCX als Marker für die adulte Neurogenese verwendet werden (Brown et al. 2003; Couillard-Despres et al. 2005; Francis et al. 1999; Gleeson et al. 1999). Da DCX während einer langen Phase der neuronalen Entwicklung exprimiert wird, wurde die Markierung der proliferativen Zellen mit DCX in dieser Arbeit zur Analyse der Neurogenese verwendet. Die Verwendung von nur einem Marker für die Neurogenese limitiert die Aussagekraft der Ergebnisse, da sich Zellen in verschiedenen Stadien der Entwicklung befinden könnten und diese dann nicht berücksichtigt würden. Weitere Untersuchungen mit Markern wie Nestin oder Sox2, die die sehr frühen Phasen (Stammzellen) oder NeuN (Hexaribonukleotid bindendes Protein-3) und Calretinin, die die späten Phasen (postmitotische Zellen) der neuronalen Reifung anzeigen, könnten ausgeführt werden, um alle Stadien der Neurogenese zu analysieren und so die Ergebnisse zu stützen (Filippov et al. 2003; Jinno 2011; Lendahl et al. 1990; Lugert et al. 2010; Seri et al. 2001; von Bohlen und Halbach 2011).

Neuronale Erkrankungen manifestieren sich unter anderem an einer Abnahme der Zellzahl in der entsprechenden Hirnregion (Giacoppo et al. 2015; Martín-Moreno et al. 2011). Ein schützender Effekt von CBD wurde bereits bei verschiedenen Erkrankungen wie Epilepsie, M. Alzheimer oder multipler Sklerose dargestellt (1.1.4). Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl DCX-markierter Zellen nach einer Ischämie-induzierten Operation bei akuter CBD-Behandlung signifikant erhöht war und es weniger neurodegenerative Zellen gab im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Mori et al. 2017). Ebenso wurde beschrieben, dass die hippocampale Zellzahl nach Induktion einer zerebralen Ischämie nach CBD-Gabe signifikant höher war als bei den Kontrolltieren (Schiavon et al. 2014). Bei Angststörungen führte CBD ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der DCX-markierten Zellen und somit zu einer anxiolytischen und antidepressiven Wirkung (Campos et al. 2013; Fogaça et al. 2018; Schiavon et al. 2016).

In Bezug auf die adulte Neurogenese im gesunden Gehirn wurden bisher verschiedene Effekte gezeigt. So wurde bei der Behandlung von Mäusen mit CBD unter anderem eine Dosisabhängigkeit festgestellt. Dabei gab es einen signifikanten Anstieg von Progenitorzellen bei einer Dosis von 3mg/kg KG CBD. Bei einer Dosis von 30mg/kg KG CBD hingegen reduzierte sich die Anzahl DCX-markierter Zellen signifikant (Schiavon et al. 2016).

Neurogenese wurde auch bei gestressten und nicht gestressten Mäusen untersucht. Die DCX-Markierung im GD zeigte bei nicht gestressten Mäusen keinen Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Tieren in der Neurogenese. Bei Mäusen, die chronisch unvorhersehbarem Stress (CUS) ausgesetzt waren, konnte eine signifikante Steigerung der Neurogenese bei der CBD-behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden (Fogaça et al. 2018). In einer anderen Arbeit zeigte sich bei nicht gestressten Mäusen

ein signifikanter Anstieg der Neurogenese über DCX-markierte Zellen im GD bei den mit CBD behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Gestresste Mäuse zeigten insgesamt eine Inhibierung der Neurogenese, jedoch war die Anzahl der DCX-markierten Zellen auch hier bei der Behandlung mit CBD signifikant höher als ohne Behandlung (Campos et al. 2013).

Auch die Auswirkungen einer langfristigen oralen Gabe von CBD direkt nach der Geburt wurde untersucht. Dabei wurde zwar eine verminderte Proliferation, aber eine Zunahme des Zellüberlebens gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt (Wolf et al. 2010).

In dieser Arbeit wurde drei und fünf Monate alten Mäusen eine prolongierte intraperitoneale Gabe von 20mg/kg KG CBD bzw. eine Kontrolllösung über sechs Wochen verabreicht, wobei jeweils eine Behandlungsgruppe eine Behandlungspause von acht Wochen vor ihrem Tod hatte. Damit waren die Tiere sowohl bei der Behandlung als auch bei ihrem Exitus zum Teil älter als in den vorangegangenen Untersuchungen. Hier wurde in beiden Gruppen kein Unterschied in der Neurogenese und der Zellzahl zwischen CBD-behandelten Tieren und Kontrolltieren festgestellt. Daraus resultiert, dass langanhaltender Einfluss von 20mg/kg KG Cannabidiol über sechs Wochen im gesunden früherwachsenen Mausgehirn keine negativen Auswirkungen auf die adulte Neurogenese hat. Im Gegensatz dazu scheint sich CBD bei Erkrankungen im Tiermodell positiv auszuwirken, die Proliferation von Neuronen anzuregen und das Zellüberleben zu sichern. Um diese Ergebnisse zu validieren, müssten weitere Untersuchungen mit variablen Zeiträumen und Dosierungen sowie unterschiedlichen Altersgruppen erfolgen. Außerdem könnte man zusätzlich weitere Teile des Gehirns betrachten.

#### **4.1.2 Geschlechtsunterschiede bei der Entwicklung des Hippocampus**

Bei Säugetieren wurden, in Abhängigkeit der Art, Unterschiede zwischen den Geschlechtern in Bezug auf die Neurogenese festgestellt (Duarte-Guterman et al. 2015; Galea et al. 2013). So gab es eine vermehrte Proliferation bei den weiblichen Tieren unter anderem bei Ratten und Wühlmäusen. Bei Labormäusen, wie der auch in dieser Arbeit verwendeten Mauslinie C57BL/6J, wurden verschiedene Ergebnisse gezeigt. So wurde herausgefunden, dass sich die Anzahl der DCX-markierten Zellen bei Männchen und Weibchen zwar nicht unterschied, im Alter jedoch erheblich sank (Ben Abdallah et al. 2010). Auch der Einfluss von Hormonen erbrachte keinen Unterschied bezüglich der Neurogenese, sodass davon ausgegangen wurde, dass der weibliche Zyklus keine Rolle bei der Neurogenese spielte (Lagace et al. 2007).

Stress wirkte sich erst bei neun Monate alten Mäusen auf die Neurogenese aus (Tzeng et al. 2016). Dabei reduzierte Stress die Anzahl proliferativer Zellen signifikant bei den Weibchen. Dieser Effekt wurde durch das gemeinsame Wohnen mit jungen Mäusen aufgehoben. Allerdings konnte auch bereits eine erhöhte Neurogenese bei weiblichen Mäusen gegenüber der Männchen festgestellt werden (Roughton et al. 2012). Auch in dieser Arbeit gab es weder bei den Kontrolltieren noch bei den Tieren mit CBD-Behandlung, einen

Geschlechtsunterschied in Bezug auf die Neurogenese. Da die Mäuse mit den täglichen intraperitonealen Injektionen nur wenig Stress ausgesetzt und der weibliche Zyklus keinen Einfluss auf die Neurogenese zu haben scheint, geht dieses Ergebnis mit den anderen Arbeiten konform.

Zellüberleben in der CA1-Region wurden überwiegend an Ratten getestet. Dabei war die Anzahl GFAP-markierter Zellen im Hippocampus im Alter von drei Monaten bei Männchen und Weibchen gleich (Garcia-Segura et al. 1988). Die Proliferation von Zellen und das Zellüberleben, welche mithilfe der Proliferationsproteine Bromdesoxyuridin (BrdU) und Ki-67 ermittelt wurden, war bei neugeborenen Ratten bei Männchen größer als bei Weibchen, wobei die Anzahl proliferativer und überlebender Zellen unter Hormoneinfluss bei den Weibchen anstieg (Bowers et al. 2010; Zhang et al. 2008). Weibliche Hormone scheinen hierbei Neurogenese und Zellüberleben zu beeinflussen, was im Widerspruch zu den Ergebnissen mit C57BL/6J-Mäusen steht. Jedoch unterschied sich nicht nur die Art, sondern auch das Alter der verwendeten Tiere, sodass der Unterschied darauf zurückzuführen sein könnte. Da sich, bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren, die Neurogenese im *Gyrus dentatus* zwischen den Geschlechtern nicht unterschied, wurde auch kein Unterschied bezüglich der Neuronenanzahl in der CA1-Region erwartet. Überraschenderweise wurden bei den drei Monate alten Tieren signifikant weniger Zellen bei den Weibchen als bei den Männchen festgestellt. Dies war sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Gruppe mit CBD-Behandlung der Fall. Allerdings gab es keine Unterschiede bei dem Vergleich unter denselben Geschlechtern zwischen Kontrolltieren und CBD-behandelten Tieren. In der späten Gruppe gab es sowohl keinen Geschlechts- als auch keinen Behandlungsunterschied bezüglich der Neuronenanzahl. Die Mechanismen für ein erhöhtes Zellüberleben sind entweder eine erhöhte Anzahl proliferativer Zellen oder ein vermindertes Sterben reifer Zellen (Bowers et al. 2010). Die DCX-Markierung zeigte keinen Unterschied bei den Geschlechtern, sodass nicht von einer erhöhten Proliferation bei den Männchen ausgegangen werden konnte. Auch gab es bei den Tieren der späten Gruppe keinerlei Unterschiede. Dafür könnte es verschiedene Erklärungen geben. Zum einen könnten in der frühen Gruppe nicht alle Zellen bei den Männchen, die sich in der Proliferation befanden, angefärbt worden sein, weil sie sich in Phasen befanden, die nicht mit DCX markiert werden konnten oder schon zu reifen Zellen ausgebildet waren. Zum anderen könnte die Proliferation der Zellen bei den Weibchen auch erst zu einem späteren Zeitpunkt vermehrt stattfinden, sodass sich die Neuronenanzahl erst in der späten Gruppe nicht mehr von den Männchen unterschied. Da sich die Neuronenanzahl jedoch sowohl in der Kontroll- als auch in der CBD-behandelten Gruppe unterschied, lässt der Unterschied nicht auf einen Behandlungseffekt schließen.

## 4.2 CBD führt zur Erhöhung von Endocannabinoid-Rezeptoren 1

CB1 können transkriptionell und translational unterschiedlich ausgebildet sein und sind in verschiedenen Zelltypen lokalisiert, wobei die Höhe der Expression variiert. Dabei spielen sie nicht nur bei der Regulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, sondern auch der von Ionenkanälen und anderen Signalwegen eine Rolle (Busquets-Garcia et al. 2018). Sie können Homodimere und Heterodimere mit anderen Rezeptoren bilden, was zu multiplen, intrazellulären Signalwegen führen und das weite Spektrum der Wirkweisen erklären könnte (Glass und Felder 1997; Wager-Miller et al. 2002).

Kaliumkanäle modulieren die Erregungsleitung und schützen Neurone vor einer Übererregung. Es konnte gezeigt werden, dass LPS A-Typ-Kaliumkanäle inhibierten und so zu einer Neurodegeneration führten. Über 2-AG konnte die Inhibierung der Kaliumkanäle verhindert werden, sodass 2-AG neuroprotektiv wirkte. Bei einer Blockade von CB1 konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden, was auf einen neuroprotektiven Effekt durch CB1 schließen ließ (Zou et al. 2016). Eine Induktion der CB1-Expression wurde nicht nur durch CBD hervorgerufen, sondern auch zum Beispiel durch die stark exzitatorisch wirkende Kainsäure. Kainsäure führte bei CB1<sup>-/-</sup>-Mäusen durch Exzitotoxizität zu Hirnschäden bis hin zum Tod. Bei CB1<sup>\*/\*</sup>-Mäusen erhöhte Kainsäure die Rezeptoranzahl, sodass exzitatorische Anfälle verhindert wurden, was einen neuroprotektiven Effekt durch CB1 erklärte (Aguado et al. 2007; Jin et al. 2004; Marsicano et al. 2003). Auch bei Wolf et. al (2010) konnte bei CB1<sup>-/-</sup>-Mäusen kein erhöhtes Zellüberleben unter CBD festgestellt werden. Weiterhin führte die Aktivierung von CB1 zu einer Reduktion inhibitorischer und exzitatorischer postsynaptischer Potenziale durch GABA und Glutamat. Dadurch wurde die Balance zwischen Exzitation und Inhibition gewährleistet, was für die Langzeitpotenzierung und damit für das Lernen und Erinnern wichtig ist (Freund et al. 2003; Monory et al. 2015; Ramikie et al. 2014). Ein anxiolytischer und antidepressiver Effekt wird durch CB1 und den erhöhten Endocannabinoidspiegel herbeigeführt (Campos et al. 2013). Obwohl CBD nur mit einer geringen Affinität an CB1 bindet (Pertwee 2006), führte die Gabe von 20mg/kg KG CBD über sechs Wochen in dieser Arbeit zu einer erhöhten Rezeptorexpression im Hippocampus und Cortex. Diese Ergebnisse passen mit denen anderer Arbeiten zusammen. Unter Einfluss von CBD zeigte sich bei Mäusen ein signifikanter CB1-Anstieg im Hippocampus und im Zuge dessen eine signifikant erhöhte Neuroproliferation (Luján et al. 2018). Außerdem wurde bei steigender CBD-Konzentration in der Zellkultur eine verminderte CB1-Internalisierung und eine Erhöhung der Rezeptoranzahl auf Membranen beobachtet (Laprairie et al. 2015). Des Weiteren war bei Neurodegeneration und einer Abnahme der Zellzahl eine Erhöhung der CB1-Expression mit einer Zunahme der Neurogenese vergesellschaftet (Aguado et al. 2007; Campos et al. 2013; Fogaça et al. 2018). CB1 scheint deshalb an der Proliferation von Neuronen beteiligt zu sein.

Cannabidiol ist pleiotrop und wirkt über viele verschiedene Rezeptoren (Morales et al. 2017). Die Erhöhung der Cannabinoid-Rezeptoren 1 durch CBD, die in diesem Experiment beobachtet wurde, scheint im gesunden Gehirn bei Mäusen jedoch keinen Einfluss auf die Neurogenese oder die absolute Zellzahl zu haben. Im gesunden Gehirn gab es kein Defizit, das kompensiert werden müsste, sodass die erhöhte CB1-Expression keinen Effekt hatte oder eine potenzielle Schädigung durch CBD über reaktive Astroglieose verhindert wurde. Die genauen Ursachen und Mechanismen der CB1-Erhöhung müssten deshalb noch weiter hinterfragt werden.

### 4.3 Cannabidiol moduliert neuroinflammatorische Prozesse

Im Gehirn kommen neben Neuronen Gliazellen vor, welche sich in Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, Ependymzellen, und weiteren Zellen aufteilen.

Astrozyten sind Stütz- und Hilfszellen und an multiplen Mechanismen im Gehirn beteiligt. So halten sie die Homöostase für Ionen wie Natrium, Kalium und Kalzium und Neurotransmitter wie Glutamat und GABA aufrecht (Verkhratsky et al. 2017). Des Weiteren regulieren sie die Leukozyteninfiltration, bilden und reparieren die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und schützen Neurone vor neurotoxischen Stoffen (Bush et al. 1999; Chen et al. 2001). Astrozyten sind für die Myelinisierung der Axone, die synaptische Plastizität und das Wachstum von Neuriten zuständig (Brenner 2014; Middeldorp und Hol 2011; Sofroniew 2009) und bilden das saure Gliafaserprotein (*glial fibrillary acid protein*, GFAP), ein 8-9 nm dickes Intermediärfilament (Eng et al. 1971). GFAP wird auch von putativen Stammzellen im Hippocampus gebildet und ist an der Migration und Proliferation von Zellen beteiligt (Doetsch et al. 1997; Filippov et al. 2003; Seri et al. 2001). Im geschädigten Gehirn bei Trauma, Ischämie, Infektion oder Neurodegeneration kommt es zur reaktiven Astroglieose, die mit einer phänotypischen und molekularen Veränderung der Astrozyten einhergeht und damit auch zu einer Zunahme der GFAP-Expression (Ben Haim et al. 2015; Middeldorp und Hol 2011; Seifert et al. 2006). Durch die Astroglieose kommt es zur Narbenbildung, sie ist somit ein Indikator für Schädigungen des ZNS. Jedoch könnte die Narbe das Fortschreiten von Infektionen und Neurodegenerationen auch eindämmen und somit zur Neuroprotektion führen (Kozela et al. 2017; Sofroniew 2009).

Das ionisierte Calciumbindungsadaptermolekül 1 (IBA1) ist in der Mikroglia exprimiert und reguliert dessen Funktion, wobei die IBA1-Expression in der reaktiven Mikroglia hochreguliert wird (Imai et al. 1996; Ito et al. 1998). Mikroglia scheint sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Effekte zu haben (Biber et al. 2014; Chen und Trapp 2016; Wolf et al. 2017). Dabei ist der Wechsel zwischen ruhendem und reaktivem Zustand der Mikroglia ein dynamischer Prozess. Im gesunden Gehirn phagozytiert Mikroglia geschädigte oder apoptotische Zellen und Debris und unterstützt Neurone bei der postnatalen Entwicklung (Derecki et al.

2014; Morgan et al. 2004; Paolicelli et al. 2011; Ueno et al. 2013). Jedoch ist sie auch an neurodegenerativen oder inflammatorischen Prozessen beteiligt (Michell-Robinson et al. 2015; Wolf et al. 2017). Etwa bei multipler Sklerose wurde eine Erhöhung der aktivierten Mikroglia mit einem Verlust der Homöostase festgestellt, die eine Veränderung der Ausschüttung von Molekülen zugunsten von proinflammatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen bewirkte (Zrzavy et al. 2017). Bei an Alzheimer erkrankten Mäusen war die Funktionalität der Mikroglia ebenso beeinträchtigt (Krabbe et al. 2013).

Der Einfluss von Cannabidiol auf die GFAP- sowie IBA1-Expression wurde bereits an vielen Tiermodellen mit Schädigungen des Nervensystems getestet. Für die Expression inflammatorischer neuronaler Marker im gesunden Gehirn gibt es nur wenig Daten, weshalb ein Schwerpunkt dieser Arbeit hierauf gelenkt wurde.

Unter CBD-Behandlung wurde bereits gezeigt, dass die GFAP-Expression und somit die Ausbildung einer Astroglieose bei Erkrankungen wie M. Alzheimer, multipler Sklerose und zerebraler Ischämie reduziert wurde, sodass ein neuroprotektiver und antiinflammatorischer Effekt von CBD angenommen wurde (Gomes et al. 2015; Kozela et al. 2011; Perez et al. 2013).

Bei einer kurzfristigen intraperitonealen CBD-Behandlung von gesunden Kontrolltieren sowohl mit einer niedrigen Dosis von 5mg/kg KG CBD als auch mit einer hohen Dosis von 60mg/kg KG CBD wurde eine nicht signifikante Erhöhung der GFAP-Konzentration im Vergleich zu den unbehandelten gesunden Kontrolltieren beobachtet (Avraham et al. 2011; Gomes et al. 2015). Betrachtete man das erkrankte Gehirn nach Induktion einer hepatischen Enzephalopathie, reduzierte die einmalige Gabe von 5mg/kg KG CBD i. p. die GFAP-Expression signifikant im Vergleich zu den erkrankten Kontrolltieren (Avraham et al. 2011). Auch bei Induktion einer zerebralen Ischämie reduzierte CBD i. p. konzentrationsunabhängig die Ausbildung von GFAP (Mori et al. 2017; Schiavon et al. 2014). Bei  $\beta$ -Amyloid induzierter Neuroinflammation wurde die GFAP-Expression konzentrationsabhängig mit steigender CBD-Dosis herabgesetzt. (Esposito et al. 2007). Nicht nur die intraperitoneale Injektion von CBD, sondern auch die topische Anwendung führte im Tiermodell bei multipler Sklerose zu einer Reduktion von GFAP und damit zur verminderten Inflammation und reduzierten Neurodegeneration (Giacoppo et al. 2015).

Auch die Veränderungen der IBA1-Expression im Gehirn unter Cannabidiol wurden an Tiermodellen untersucht. So wurde bei Mäusen, die einer Ischämie-induzierten Operation ausgesetzt waren, der inflammatorische Zustand geprüft (Mori et al. 2017). Im Zeitraum dieser Operation erhielten die Tiere entweder 10mg/kg KG CBD oder eine Kontrolllösung. Bei den CBD-behandelten Mäusen konnte eine Verminderung der IBA1-Expression und der reaktiven Mikroglia festgestellt werden. Die IBA1-Expression entsprach dabei der von den nicht-ischämischen scheinoperierten Tieren. Der Effekt von CBD wurde auch bei psychischen Störungen getestet (Gomes et al. 2015). Die Gabe von 30 oder 60mg/kg KG CBD

brachte keine Veränderung bezüglich der IBA1-Expression hervor. Allerdings konnte bei Gabe eines NMDA-Antagonisten eine Erhöhung der reaktiven Mikroglia bei den Kontrolltieren beobachtet werden, was bei den CBD-behandelten Tieren nicht der Fall war. Bei inflammatorischen Erkrankungen wie der multiplen Sklerose wurde im Mausmodell bei CBD-Behandlung eine Reduktion der reaktiven Mikroglia im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (Kozela et al. 2011; Mecha et al. 2013). Ebenso bewirkte eine Behandlung mit 20mg/kg KG CBD im Tiermodell bei der Alzheimer-Krankheit eine Reduktion der Mikroglia-Reaktion (Martín-Moreno et al. 2011).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer langfristigen Cannabidiolbehandlung mit 20mg/kg KG CBD über sechs Wochen im Gehirn der C57BL/6J-Linie mit und ohne Behandlungspause untersucht. Die GFAP-Expression war bei den CBD-behandelten Tieren sowohl im Cortex als auch im Hippocampus im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht, wobei die Erhöhung nur bei der späten CBD-behandelten Gruppe signifikant war. Weder die Neurogenese noch die absolute Zellzahl der Tiere, die mit CBD behandelt wurden, ergaben einen Unterschied im Vergleich zu denen, die die Kontrolllösung erhalten haben (3.1, 3.2). Aus diesen Ergebnissen ließe sich schließen, dass ein Anstieg der GFAP-Expression im gesunden Gehirn nicht auf eine reaktive Astroglie und somit auf einen Schaden des Nervengewebes hindeuten muss. Es könnte sein, dass die Astrozyten die BHS erhöhen und somit einen potenziellen Schaden verhindern. Es könnte allerdings auch im zunehmenden Alter zu einer vermehrten Astroglie durch CBD kommen und das Gehirn so geschädigt werden. Andererseits könnte CBD durch den GFAP-Anstieg dazu führen, dass mehr Synapsen gebildet werden und dadurch die Plastizität erhöht wird. Da CBD viele molekulare Wirkungen z. B. auf die Kalzium- und die Glutamatkonzentration hat (Drysdale et al. 2006; Hampson et al. 1998), könnte die erhöhte GFAP-Expression ein Zeichen dafür sein, dass vermehrt Astrozyten die Homöostase aufrecht erhalten. Ob die GFAP-Expression unter CBD-Behandlung einen negativen oder positiven Einfluss auf das Nervengewebe hat, wie sich die GFAP-Expression bei CBD-Abstinenz entwickelt und welchen Einfluss die Gabe von CBD im frühen Erwachsenenalter auf die Gehirnentwicklung im hohen Alter hat, erfordert weitere Untersuchungen. Wenn man bedenkt, dass Astroglie Inflammation und Neurodegeneration eindämmen könnte (Kozela et al. 2017; Sofroniew 2009), könnte CBD protektiv bei neurodegenerativen Erkrankungen sein.

Andererseits konnte eine signifikante Verringerung der IBA1-Expression im Hippocampus der frühen Gruppe eruiert werden, woraus eine verminderte Aktivität der Mikroglia resultiert. Langfristig könnte CBD also Mikroglia in einen ruhenden Zustand versetzen. Zum einen könnte das bedeuten, dass die Mikroglia das ZNS nicht mehr vor schädlichen Substanzen schützt und es dadurch zu Beeinträchtigungen des Gehirns kommt. Zum anderen könnte dies eine verminderte Reaktivität darstellen und eine Verminderung der proinflammatorischen Signalauslösung bedeuten, sodass CBD das Nervensystem vor Degeneration

schützt. IBA1 wurde jedoch im Hippocampus und Cortex bei der späten Gruppe vermehrt exprimiert. Im Alter verändert sich die Mikroglia (Damani et al. 2011; Koellhoffer et al. 2017; Niraula et al. 2017). So ist die Motilität und Aktivität der Mikroglia eingeschränkt und es werden vermehrt inflammatorische Signale ausgeschüttet, was wiederum zu degenerativen Prozessen führt. Da sich weder Neurogenese oder Zellzahl bei den hier verwendeten Mäusen der späten Gruppe änderte (3.1,3.2), ließe sich in diesem Kontext daraus schlussfolgern, dass die akute Gabe von 20mg/kg KG CBD im gesunden Mausgehirn zwar Mikroglia aktiviert, sich dieses jedoch nicht negativ auf das Gehirn auswirkt.

Alles in Allem moduliert CBD die Expression von inflammatorischen Markern wie GFAP oder IBA1 im Mausgehirn der C57BL/6J-Linie sowohl in der frühen als auch in der späten Gruppe. Allerdings scheinen sich diese Veränderungen weder auf die Neurogenese oder die Neuroproliferation, noch auf das Verhalten (welches in der Publikation von Schleicher et al. 2019 untersucht wurde) negativ auszuwirken. Da hierbei jedoch nur weibliche Gehirne verwendet wurden, müssten die Versuche mit männlichen Gehirnen erweitert werden. Außerdem könnte man weitere Gehirnareale untersuchen sowie verschiedene Dosierungen testen.

#### **4.4 Ausblick**

Cannabis wird seit Jahrhunderten sowohl als Heil- als auch als Rauschmittel verwendet. Dabei ist erst seit ca. 30 Jahren das Endocannabinoidsystem bekannt und wird seitdem erforscht. CBD ist ein Phytocannabinoid der Cannabispflanze, das multiple molekulare Effekte erzielt. Die genauen Wirkmechanismen sind dennoch nicht gut verstanden. Es scheint wenig Nebenwirkungen zu haben und sich bei vielen Erkrankungen positiv auszuwirken. Trotzdem sollte sichergestellt werden, ob CBD einen neurotoxischen Effekt im gesunden Gehirn hat oder ob es als potenzielles Medikament zugelassen werden könnte. Dazu sollten die Zeiträume der CBD-Gabe variiert werden, ebenso wie die Dosierungen. Außerdem müssten das Alter der Mäuse und die Behandlungspausen verändert werden. Im Zuge dessen bedürfte es einer Klärung der Reversibilität möglicher Schäden bzw. der strukturellen oder funktionellen Veränderungen. Die Neuronenzahl sollte ebenfalls in weiteren Gehirnarealen bestimmt werden. Hierbei könnte auch interessant sein, inwieweit sich die CBD-Behandlung auf das adoleszente Gehirn auswirkt. Des Weiteren wären die genauen molekularen Mechanismen der Rezeptorregulation von CB1, IBA1 und GFAP unter CBD-Einfluss zu klären.

## 5 Zusammenfassung

Cannabidiol (CBD) ist neben Delta-9-Tetrahydrocannabinol (THC) einer der Hauptbestandteile der Pflanze *Cannabis sativa* L. und kann als Marihuana zum Beispiel in Form von Rauchen konsumiert werden. Aktuell wird in Deutschland eine Legalisierung des Cannabiskonsums diskutiert, was die Frage nach einer potenziellen Toxizität aufwirft. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Neurogenese und Neuroinflammation im Mausgehirn der C57BL/6J-Linie unter CBD-Behandlung zu untersuchen.

Dazu wurden drei sowie fünf Monate alten Mäusen 20mg/kg KG CBD täglich intraperitoneal über 42 Tage injiziert. Die drei Monate alten Mäusen hatten eine achtwöchige Behandlungspause bevor alle Tiere im Alter von sechseinhalb Monaten getötet und ihre Gehirne für stereologische und immunhistochemische Untersuchungen entnommen wurden.

Mittels Kresylviolett-Färbung und Design-basierter Stereologie konnte die Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus ermittelt werden. Dabei zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Gesamtneuronenzahl zwischen CBD-behandelten und Kontrolltieren.

Für die Darstellung der Neurogenese im *Gyrus dentatus* des Hippocampus wurden Zellen, die Doublecortin exprimierten, dargestellt. Dazu wurden die Hemisphären mit einer *free-floating* 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung gefärbt und anschließend quantifiziert. Auch hier wurden keine Unterschiede bei CBD-Behandlung festgestellt.

Mithilfe der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung und anschließender Quantifizierung konnte die CB1-Expression unter CBD-Wirkung analysiert werden. Hierbei kam es sowohl in der frühen als auch in der späten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der CB1-Expression im Hippocampus und Cortex.

Um die Neuroinflammation zu untersuchen, wurden GFAP- und IBA1-markierte Zellen mithilfe der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Immunfärbung angefärbt und quantifiziert. GFAP wurde dabei als Marker für die Astrozyten eingesetzt, wohingegen IBA1 einen Marker der Mikroglia darstellte. Dabei wurde ein signifikanter Abfall der IBA1-Expression im Hippocampus der frühen Gruppe ermittelt, wobei ein signifikanter Anstieg im Cortex der späten Gruppe zu beobachten war. Ebenfalls kam es zu einem signifikanten Anstieg der GFAP-Expression im Hippocampus der späten Gruppe.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint es in der Zusammenschau keine negativen Effekte bei der Behandlung mit CBD zu geben. Die Neuronenzahl sowie die Neurogenese blieben bei CBD-Konsum unverändert, sodass von keiner neurotoxischen Komponente des Cannabisbestandteils CBD ausgegangen werden kann. Nichtsdestotrotz gibt es Modulationen bei der Expression inflammatorischer Marker sowie der CB1-Expression. Diese funktionellen Veränderungen könnten auf eine Entwicklung einer Astrogliose hinweisen, die langfristig zu einer potenziellen Schädigung führen könnte. Andererseits

könnte die Homöostase im Gehirn durch vermehrte Astrozyten aufrecht erhalten bleiben. Die verminderte IBA1-Expression nach der Abstinenzzeit könnte auf eine langfristige protektive Wirkung des CBD hindeuten.

## 6 Literaturverzeichnis

Adams R (1940): Marihuana. *Science* 92, 115-119

Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I (2007): The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem* 282, 23892-23898

Altman J (1962): Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-1128

Altman J, Das GD (1966): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis.: I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126, 337-390

Appendino G, Chianese G, Tagliatalata-Scafati O (2011): Cannabinoids: occurrence and medicinal chemistry. *CMC* 18, 1085-1099

Arruza L, Pazos MR, Mohammed N, Escribano N, Lafuente H, Santos M, Alvarez-Díaz FJ, Hind W, Martínez-Orgado J (2017): Cannabidiol reduces lung injury induced by hypoxic-ischemic brain damage in newborn piglets. *Pediatr Res* 82, 79-86

Avraham Y, Grigoriadis N, Poutahidis T, Vorobiev L, Magen I, Ilan Y, Mechoulam R, Berry E (2011): Cannabidiol improves brain and liver function in a fulminant hepatic failure-induced model of hepatic encephalopathy in mice. *Br J Pharmacol* 162, 1650-1658

Balu DT, Lucki I (2009): Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 232-252

Baron EP (2015): Comprehensive review of medicinal marijuana, cannabinoids, and therapeutic implications in medicine and headache: what a long strange trip it's been ... *Headache* 55, 885-916

Ben Abdallah NMB, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp HP (2010): Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol Aging* 31, 151-161

Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C (2015): Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci* 9, 278

Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, Romero J (2003): Cannabinoid CB 2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease Brains. *J. Neurosci.* 23, 11136-11141

- Bergamaschi MM, Queiroz RHC, Zuardi AW, Crippa JAS (2011): Safety and side effects of cannabidiol, a cannabis sativa constituent. *CDS* 6, 237-249
- Betäubungsmittelgesetz 2017: Gesetz zur Änderung betäubungsmittelrechtlicher und anderer Vorschriften vom 06. März 2017 in der Fassung der Bekanntmachung vom 01. März 1994, zuletzt geändert am 16. August 2019
- Biber K, Owens T, Boddeke E (2014): What is microglia neurotoxicity (not)? *Glia* 62, 841-854
- Bisogno T, Hanuš L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Schiano Moriello A, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V (2001): Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 134, 845-852
- Bowers JM, Waddell J, McCarthy MM (2010): A developmental sex difference in hippocampal neurogenesis is mediated by endogenous oestradiol. *Biol Sex Differ* 1, 8
- Brenner M (2014): Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett* 565, 7-13
- Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003): Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467, 1-10
- Brust V, Schindler PM, Lewejohann L (2015): Lifetime development of behavioural phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front Zool* 12, 17
- Burstein S (2015): Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorg Med Chem* 23, 1377-1385
- Bush TG, Puvanachandra N, Horne CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999): Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297-308
- Busquets-García A, Bains J, Marsicano G (2018): CB1 receptor signaling in the brain: extracting specificity from ubiquity. *Neuropsychopharmacology* 43, 4-20
- Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, Ortega-Gutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M et al. (2013): The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 1407-1419
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002): Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2, 69-82

- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ (2006): Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7895-7900
- Chen Y, Vartiainen NE, Ying W, Chan PH, Koistinaho J, Swanson RA (2001): Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *J Neurochem* 77, 1601-1610
- Chen Z, Trapp BD (2016): Microglia and neuroprotection. *J Neurochem* 136, 10-17
- Console-Bram L, Marcu J, Abood ME (2012): Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 38, 4-15
- Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L (2005): Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21, 1-14
- Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT (2011): Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10, 263-276
- Darmani NA, Janoyan JJ, Crim J, Ramirez J (2007): Receptor mechanism and antiemetic activity of structurally-diverse cannabinoids against radiation-induced emesis in the least shrew. *Eur J Pharmacol* 563, 187-196
- de Paula Soares V, Campos AC, Bortoli VCd, Zangrossi H, Guimarães FS, Zuardi AW (2010): Intra-dorsal periaqueductal gray administration of cannabidiol blocks panic-like response by activating 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Behav Brain Res* 213, 225-229
- Derecki NC, Katzmarski N, Kipnis J, Meyer-Luehmann M (2014): Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta Neuropathol* 128, 333-345
- Deutsch DG, Chin SA (1993): Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochemical Pharmacology* 46, 791-796
- Devane WA, Dysarz III FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34, 605-613
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee R, Stevenson L, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258, 1946-1949
- Devinsky O, Cilio MR, Cross H, Fernandez-Ruiz J, French J, Hill C, Katz R, Di Marzo V, Jutras-Aswad D, Notcutt WG et al. (2014): Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia* 55, 791-802

- Dinh TP, Carpenter D, Leslie FM, Freund TF, Katona I, Sensi SL, Kathuria S, Piomelli D (2002): Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10819-10824
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997): Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 17, 5046-5061
- Drysdale AJ, Ryan D, Pertwee RG, Platt B (2006): Cannabidiol-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevations in hippocampal cells. *Neuropharmacology* 50, 621-631
- Duarte-Guterman P, Yagi S, Chow C, Galea LAM (2015): Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: effects of sex and estrogens across the lifespan in adults. *Horm Behav* 74, 37-52
- Ellert-Miklaszewska A, Grajkowska W, Gabrusiewicz K, Kaminska B, Konarska L (2007): Distinctive pattern of cannabinoid receptor type II (CB2) expression in adult and pediatric brain tumors. *Brain Res* 1137, 161-169
- Eng L, Vanderhaeghen J, Bignami A, Gerstl B (1971): An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351-354
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317
- Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo Jr L, De Filippis D, Cottone P, Iuvone T, Cuomo V, Steardo L (2007): Cannabidiol in vivo blunts  $\beta$ -amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1 $\beta$  and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 151, 1272-1279
- Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, Filippis D de, Cipriano M, Carratù MR, Iuvone T, Steardo L (2011): Cannabidiol reduces A $\beta$ -induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPAR $\gamma$  involvement. *PLoS ONE* 6, e28668
- Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995): Comparison of the Pharmacology and Signal Transduction of the Human Cannabinoid CB1 and CB2 Receptors. *Mol Pharmacol* 48, 443-450
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003): Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23, 373-382
- Fogaça MV, Campos AC, Coelho LD, Duman RS, Guimarães FS (2018): The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology* 135, 22-33

- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A (1999): Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23, 247-256
- Freund TF, Katona I, Piomelli D (2003): Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83, 1017-1066
- Galea LAM, Wainwright SR, Roes MM, Duarte-Guterman P, Chow C, Hamson DK (2013): Sex, hormones and neurogenesis in the hippocampus: hormonal modulation of neurogenesis and potential functional implications. *J Neuroendocrinol* 25, 1039-1061
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, 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
- Garcia-Segura L, Suarez I, Segovia S, Tranque P, Calés J, Aguilera P, Olmos G, Guillamón A (1988): The distribution of glial fibrillary acidic protein in the adult rat brain is influenced by the neonatal levels of sex steroids. *Brain Res* 456, 357-363
- Giacoppo S, Galuppo M, Pollastro F, Grassi G, Bramanti P, Mazzon E (2015): A new formulation of cannabidiol in cream shows therapeutic effects in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Daru* 23, 48
- Glass M, Felder C (1997): Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17, 5327-5333
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999): Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23, 257-271
- Gomes FV, Llorente R, Del Bel EA, Viveros MP, López-Gallardo M, Guimarães FS (2015): Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophr Res* 164, 155-163
- Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E (1997): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492-2498
- Gould J (2015): The cannabis crop. *Nature* 525, 2-3
- Griffin G, Tao Q, Abood ME (2000): Cloning and Pharmacological Characterization of the Rat CB2 Cannabinoid Receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 886-894
- Hammell DC, Zhang LP, Ma F, Abshire SM, McIlwrath SL, Stinchcomb AL, Westlund KN (2016): Transdermal cannabidiol reduces inflammation and pain-related behaviours in a rat model of arthritis. *Eur J Pain* 20, 936-948

- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998): Cannabidiol and (-) 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8268-8273
- Havemann-Reinecke U, Hoch E, Preuss UW, Kiefer F, Batra A, Gerlinger G, Hauth I (2017): Zur Legalisierungsdebatte des nichtmedizinischen Cannabiskonsums DGPPN-Positionspapier. *Nervenarzt* 88, 291-298
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, Costa BR de, Rice KC (1990): Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1932-1936
- Imai I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S (1996): A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 224, 855-862
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, *Iba1*. *Brain Res Mol* 57, 1-9
- Jin K, Xie L, Kim SH, Parmentier-Batteur S, Sun Y, Mao XO, Childs J, Greenberg DA (2004): Defective adult neurogenesis in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 66, 204-208
- Jinno S (2011): Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus* 21, 467-480
- Jones NA, Hill AJ, Smith I, Bevan SA, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ (2010): Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 332, 569-577
- Karachaliou K, Seitz NN, Neumeier E, Schneider F, Tönsmeise C, Friedrich M und Pfeiffer-Gerschel T (2019): Drogen Workbook Drugs Deutschland. Bericht 2019 des nationalen REITOX-Knotenpunkts an die EMCDDA (Datenjahr 2018/2019)  
[https://www.dbdd.de/fileadmin/user\\_upload\\_dbdd/05\\_Publikationen/PDFs/REITOX\\_BERICHT\\_2019/WB\\_03\\_Drogen\\_2019.pdf](https://www.dbdd.de/fileadmin/user_upload_dbdd/05_Publikationen/PDFs/REITOX_BERICHT_2019/WB_03_Drogen_2019.pdf); abgerufen am 28.04.2020
- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E (2006): Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, 354-361
- Kempermann G, Gast D, Gage FH (2002): Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol* 52, 135-143
- Kendell R (2003): Cannabis condemned: the proscription of Indian hemp. *Addiction* 98, 143-151

- King KM, Myers AM, Soroka-Monzo AJ, Tuma RF, Tallarida RJ, Walker EA, Ward SJ (2017): Single and combined effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in a mouse model of chemotherapy-induced neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 174, 2832-2841
- Koellhoffer EC, McCullough LD, Ritzel RM (2017): Old maids: aging and its impact on microglia function. *Int J Mol Sci* 18, 1-25
- Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z (2011): Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. *Br J Pharmacol* 163, 1507-1519
- Kozela E, Juknat A, Vogel Z (2017): Modulation of astrocyte activity by cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid. *Int J Mol Sci* 18, 1-20
- Krabbe G, Halle A, Matyash V, Rinnenthal JL, Eom GD, Bernhardt U, Miller KR, Prokop S, Kettenmann H, Heppner FL (2013): Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS ONE* 8, e60921
- Kreitzer FR, Stella N (2009): The therapeutic potential of novel cannabinoid receptors. *Pharmacol Ther* 122, 83-96
- Lagace DC, Fischer SJ, Eisch AJ (2007): Gender and endogenous levels of estradiol do not influence adult hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 17, 175-180
- Laprairie RB, Bagher AM, Kelly MEM, Denovan-Wright EM (2015): Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 172, 4790-4805
- Lendahl U, Zimmermann LB, McMay RD (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595
- Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, Koethe D (2012): Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry* 2, e94
- Li HL (1974): An archaeological and historical account of cannabis in china. *Economic Botany* 28, 437-448
- López A, Aparicio N, Pazos MR, Grande MT, Barreda-Manso MA, Benito-Cuesta I, Vázquez C, Amores M, Ruiz-Pérez G, García-García E et al. (2018): Cannabinoid CB2 receptors in the mouse brain: relevance for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 15, 158
- Lucas CJ, Galettis P, Schneider J (2018): The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *Br J Clin Pharmacol* 84, 2477-2482

- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Götz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010): Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445-456
- Luján MÁ, Castro-Zavala A, Alegre-Zurano L, Valverde O (2018): Repeated cannabidiol treatment reduces cocaine intake and modulates neural proliferation and CB1R expression in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology* 143, 163-175
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000): The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9561-9566
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Ortega Gutiérrez S, van der Stelt M (2003): CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302, 84-88
- Martínez-Pinilla E, Varani K, Reyes-Resina I, Angelats E, Vincenzi F, Ferreiro-Vera C, Oyarzabal J, Canela EI, Lanciego JL, Nadal X et al. (2017): Binding and Signaling Studies Disclose a Potential Allosteric Site for Cannabidiol in Cannabinoid CB2 Receptors. *Front Pharmacol* 8, 744
- Martín-Moreno AM, Reigada D, Ramírez BG, Mechoulam R, Innamorato N, Cuadrado A, Ceballos ML de (2011): Cannabidiol and other cannabinoids reduce microglial activation in vitro and in vivo: relevance to Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* 79, 964-973
- Massi P, Vaccani A, Ceruti S, Colombo A, Abbracchio MP, Parolaro D (2004): Antitumor effects of cannabidiol, a nonpsychoactive cannabinoid, on human glioma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 308, 838-845
- Massi P, Vaccani A, Bianchessi S, Costa B, Macchi P, Parolaro D (2006): The non-psychoactive cannabidiol triggers caspase activation and oxidative stress in human glioma cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2057-2066
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346, 561-564
- McGuire P, Robson P, Cubala WJ, Vasile D, Morrison PD, Barron R, Taylor A, Wright S (2018): Cannabidiol (CBD) as an adjunctive therapy in schizophrenia: a multicenter randomized controlled trial. *Am J Psychiatry* 175, 225-231
- McKallip RJ (2006): Cannabidiol-induced apoptosis in human leukemia cells: a novel role of cannabidiol in the regulation of p22phox and Nox4 expression. *Mol Pharmacol* 70, 897-908

- McKallip RJ, Lombard C, Fisher M, Martin BR, Ryu S, Grant S, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2002): Targeting CB2 cannabinoid receptors as a novel therapy to treat malignant lymphoblastic disease. *Blood* 100, 627-634
- Mecha M, Feliú A, Iñigo PM, Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Guaza C (2013): Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: a role for A2A receptors. *Neurobiol Dis* 59, 141-150
- Mechoulam R, Shvo Y (1963): Hashish-I: The structure of cannabidiol. *Tetrahedron* 19, 2073-2078
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanuš L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher DR, Pertwee RG, Griffin G, Bayewitch M et al. (1995): Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83-90
- Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, Antel JP, Moore CS (2015): Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain* 138, 1138-1159
- Middeldorp J, Hol EM (2011): GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 93, 421-443
- Monory K, Polack M, Remus A, Lutz B, Korte M (2015): Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 35, 3842-3850
- Morales P, Hurst DP, Reggio PH (2017): Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Prog Chem Org Nat Prod* 103, 103-131
- Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004): Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90, 89-101
- Mori MA, Meyer E, Soares LM, Milani H, Guimarães FS, Oliveira RMW de (2017): Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 75, 94-105
- Muller C, Morales P, Reggio PH (2018): Cannabinoid ligands targeting TRP channels. *Front Mol Neurosci* 11, 487
- Müller-Vahl KR (2013): Treatment of tourette syndrome with cannabinoids. *Behav Neurol* 27, 119-124
- Müller-Vahl KR, Grotenhermen F (2017): Medizinisches Cannabis - Die wichtigsten Änderungen. *Dtsch Arztebl* 114, 352-356

- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365, 61-65
- Niraula A, Sheridan JF, Godbout JP (2017): Microglia priming with aging and stress. *Neuropsychopharmacology* 42, 318-333
- Opiumgesetz 1971: Gesetz zur Änderung des Gesetzes über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Opiumgesetz) vom 22. Dezember 1971 in der Fassung der Bekanntmachung vom 10. Dezember 1929. *Bundesgesetzblatt Teil I* 134, 2092-2097
- Osborne AL, Solowij N, Weston-Green K (2017): A systematic review of the effect of cannabidiol on cognitive function: Relevance to schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 72, 310-324
- Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R (2006): The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev* 27, 73-100
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L et al. (2011): Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458
- Patra PH, Barker-Haliski M, White HS, Whalley BJ, Glyn S, Sandhu H, Jones N, Bazelot M, Williams CM, McNeish AJ (2018): Cannabidiol reduces seizures and associated behavioral comorbidities in a range of animal seizure and epilepsy models. *Epilepsia* 00, 1-12
- Paxinos G, Franklin KBJ: *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2. Auflage; Elsevier Amsterdam 2004
- Pellati F, Borgonetti V, Brighenti V, Biagi M, Benvenuti S, Corsi L (2018): Cannabis sativa L. and nonpsychoactive cannabinoids: their chemistry and role against oxidative stress, inflammation, and cancer. *Biomed Res Int* 2018, 1691428
- Perez M, Benitez SU, Cartarozzi LP, Del Bel E, Guimarães FS, Oliveira ALR (2013): Neuroprotection and reduction of glial reaction by cannabidiol treatment after sciatic nerve transection in neonatal rats. *Eur J Neurosci* 38, 3424-3434
- Pertwee RG (2006): The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes* 30, 13-18
- Pertwee RG (2008): The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol* 153, 199-215
- Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K et al. (2010): International union of basic and

clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. *Pharmacol Rev* 62, 588-631

Petitot F, Jeantaud B, Reibaud M, Imperato A, Dubroeuq MC (1998): Complex pharmacology of natural cannabinoids: Evidence for partial agonist activity of Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci* 63, 1-6

Ramikie TS, Nyilas R, Bluett RJ, Gamble-George JC, Hartley ND, Mackie K, Watanabe M, Katona I, Patel S (2014): Multiple mechanistically distinct modes of endocannabinoid mobilization at central amygdala glutamatergic synapses. *Neuron* 81, 1111-1125

Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretto LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, Akamine AT, Almeida VI, Quevedo J, Dal-Pizzol F et al. (2012): Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A<sub>2A</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 678, 78-85

Roughton K, Kalm M, Blomgren K (2012): Sex-dependent differences in behavior and hippocampal neurogenesis after irradiation to the young mouse brain. *Eur J Neurosci* 36, 2763-2772

Rubio-Araiz A, Arévalo-Martín A, Gómez-Torres O, Navarro-Galve B, García-Ovejero D, Suetterlin P, Sánchez-Heras E, Molina-Holgado E, Molina-Holgado F (2008): The endocannabinoid system modulates a transient TNF pathway that induces neural stem cell proliferation. *Mol Cell Neurosci* 38, 374-380

Russo EB, Burnett A, Hall B, Parker KK (2005): Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT<sub>1a</sub> receptors. *Neurochem Res* 30, 1037-1043

Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee RG, Platt B (2009): Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. *J Neurosci* 29, 2053-2063

Ryberg E, Larsson N, Sjörger S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley P (2007): The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152, 1092-1101

Sánchez C, de Ceballos ML, Gómez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, y Cajal SR, Guzmán M (2001): Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61, 5784-5789

Sartim AG, Guimarães FS, Joca SRL (2016): Antidepressant-like effect of cannabidiol injection into the ventral medial prefrontal cortex-Possible involvement of 5-HT<sub>1A</sub> and CB<sub>1</sub> receptors. *Behav Brain Res* 303, 218-227

Schiavon AP, Soares LM, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM (2014): Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive

impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Neurotox Res* 26, 307-316

Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM (2016): Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64, 27-34

Schleicher EM, Ott FW, Müller M, Silcher B, Sichler ME, Löw MJ, Wagner JM, Bouter Y (2019): Prolonged cannabidiol treatment lacks on detrimental effects on memory, motor performance and anxiety in C57BL/6J Mice. *Front Behav Neurosci* 13, 94

Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813-831

Scuderi C, Steardo L, Esposito G (2014): Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in SHSY5YAPP+ cells through PPAR $\gamma$  involvement. *Phytother Res* 28, 1007-1013

Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C (2006): Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7, 194-206

Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001): Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153-7160

Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A (2011): Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther* 10, 1161-1172

Simon MM, Greenaway S, White JK, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wells S, Sorg T, Wong K, Bedu E, Cartwright EJ et al. (2013): A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol* 14, 82

Sofroniew MV (2009): Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32, 638-647

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D (1997): A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature* 388, 773-778

Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002): Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66, 173-192

Svendsen KB, Jensen TS, Bach FW (2004): Does the cannabinoid dronabinol reduce central pain in multiple sclerosis? Randomised double blind placebo controlled crossover trial. *BMJ* 329, 1-8

- Tham M, Yilmaz O, Alaverdashvili M, Kelly MEM, Denovan-Wright EM, Laprairie RB (2018): Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol*, 176 1455-1469
- Thomas A, Baillie G, Phillips A, Razdan R, Ross R, Pertwee R (2007): Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 150, 613-623
- Thomas BF, ElSohly MA: The botany of cannabis sativa L. In: Thomas B, ElSohly MA (Hrsg.): The analytical chemistry of cannabis: quality assessment, assurance, and regulation of medicinal marijuana and cannabinoid preparations. Elsevier. Amsterdam 2016, 1-26
- Thomasius R, Holtmann M (2016): Sind Jugendschutz und Cannabis-freigabe miteinander vereinbar? - Die Legalisierungsdebatte aus kinder- und jugendpsychiatrischer Sicht. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 44, 95-100
- Tzeng WY, Wu HH, Wang CY, Chen JC, Yu L, Cherng CG (2016): Sex differences in stress and group housing effects on the number of newly proliferated cells and neuroblasts in middle-aged dentate gyrus. *Front Behav Neurosci* 10, 249
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T (2013): Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci* 16, 543-551
- Vaccani A, Massi P, Colombo A, Rubino T, Parolaro D (2005): Cannabidiol inhibits human glioma cell migration through a cannabinoid receptor-independent mechanism. *Br J Pharmacol* 144, 1032-1036
- Vallée A, Lecarpentier Y, Guillevin R, Vallée JN (2017): Effects of cannabidiol interactions with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and PPAR $\gamma$  on oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Acta Biochim Biophys Sin* 49, 853-866
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999): Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-13431
- Verkhatsky A, Zorec R, Parpura V (2017): Stratification of astrocytes in healthy and diseased brain. *Brain Pathol* 27, 629-644
- von Bohlen und Halbach O (2011): Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345, 1-19
- Wager-Miller J, Westenbroek R, Mackie K (2002): Dimerization of G protein-coupled receptors: CB1 cannabinoid receptors as an example. *Chem Phys Lipids* 121, 83-89
- Ward SJ, McAllister SD, Kawamura R, Murase R, Neelakantan H, Walker EA (2014): Cannabidiol inhibits paclitaxel-induced neuropathic pain through 5-HT(1A) receptors

- without diminishing nervous system function or chemotherapy efficacy. *Br J Pharmacol* 171, 636-645
- West MJ (1993): New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol Aging* 14, 275-285
- West MJ (2012): Introduction to stereology. *Cold Spring Harb Protoc* 2012, 843-851
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ (1991): Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231, 482-497
- Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, Müller A, Melnik A, Waltinger TP, Ullrich O et al. (2010): Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal* 8, 12
- Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H (2017): Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol* 79, 619-643
- Zanelati T, Biojone C, Moreira F, Guimarães F, Joca S (2010): Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 159, 122-128
- Zhang JM, Konkle ATM, Zup SL, McCarthy MM (2008): Impact of sex and hormones on new cells in the developing rat hippocampus: a novel source of sex dimorphism? *Eur J Neurosci* 27, 791-800
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008): Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660
- Zou Z, Lu Y, Zha Y, Yang H (2016): Endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol suppresses LPS-induced inhibition of A-type potassium channel currents in caudate nucleus neurons through CB1 receptor. *J Mol Neurosci* 59, 493-503
- Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H (2017): Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain* 140, 1900-1913
- Zuardi AW (2008): Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action. *Rev Bras Psiquiatr.* 30, 271-280
- Zuardi AW, Cosme R, Graeff F, Guimarães F (1993): Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol* 7, 82-88

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Yvonne Bouter bedanken, die mir dieses aktuelle und vielseitige Thema zur Verfügung gestellt hat. Sowohl während der Laborarbeit als auch bei der Verschriftlichung der Dissertation stand sie mir stets geduldig, hilfsbereit und engagiert mit Rat und Tat zur Seite.

Ich bedanke mich auch bei Prof. Dr. Thomas A. Bayer, der mir die Arbeit im Labor der molekular-psychiatrischen Abteilung ermöglicht und mir für die Dissertation hilfreiche Anregungen und Ideen geliefert hat.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe für molekulare Psychiatrie für die Hilfsbereitschaft und angenehme Atmosphäre. Insbesondere bei Barbara Silcher und Petra Tucholla möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.