

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

Auswirkungen von (-)- Δ^9 -trans- Tetrahydrocannabinol auf Zellzahl und adulte Neurogenese im Hippocampus

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Barbara Silcher (geb. Scheungraber)

aus

Filderstadt

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:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkungen von (-)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol auf Zellzahl und adulte Neurogenese im Hippocampus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

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

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung	1
1.1 THC und das Endocannabinoidsystem.....	1
1.2 Adulte Neurogenese.....	3
1.3 Neuroinflammation.....	5
1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Mäuse.....	8
2.2 Behandlung.....	8
2.3 Quantifizierung der Neurone	9
2.3.1 Schneiden mit dem Kryotom	10
2.3.2 Färbung mit Kresylviolett	10
2.3.3 Stereologie	11
2.4 Quantifizierung der Neurogenese.....	13
2.4.1 <i>Free-floating</i> DAB-Immunfärbung.....	14
2.4.2 Meander Scan.....	15
2.5 Quantifizierung der Expression von Cannabinoidrezeptoren und Markern der Neuroinflammation.....	15
2.5.1 Schneiden am Mikrotom.....	16
2.5.2 DAB-Immunfärbung in Paraffin eingebetteter Schnitte auf Glas.....	17
2.5.3 Quantifizierung der Färbungen.....	19
2.6 Lokalisation der Marker mit Immunfluoreszenz.....	19
2.6.1 Fluoreszenz-Immunfärbung in Paraffin eingebetteter Schnitte auf Glas.....	20
2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	21
2.7 Statistik.....	21
2.8 Software	21
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus.....	23
3.2 Ausmaß der Neurogenese im Gyrus dentatus	24
3.3 Expression von Cannabinoidrezeptoren und Markern der Neuroinflammation	25
3.3.1 Färbung des CB1-Rezeptors.....	25
3.3.2 Färbung des astrozytären Proteins GFAP	28
3.3.3 Färbung des mikroglialen Markers IBA1.....	31

4	Diskussion.....	35
4.1	Auswirkungen von THC auf die hippocampale Neuronenzahl	35
4.2	Auswirkungen von THC auf die adulte Neurogenese.....	36
4.3	Auswirkungen von THC auf die CB1-Expression	37
4.4	Auswirkungen von THC auf die Neuroinflammation	37
4.5	Ausblick.....	39
5	Zusammenfassung.....	40
6	Literaturverzeichnis	41

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von THC.....	2
Abbildung 2: Marker der Neurogenese und zeitliche Abfolge ihrer Expression auf jungen Neuronen.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Behandlungsplanes.....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung ausgewählter koronarer Schnittebenen durch die linke Hemisphäre einer C57BL/6J-Maus, Kresylviolett-färbung des Hippocampus und Zählrahmen.....	12
Abbildung 5: Beispielbilder der DAB-Färbung sagittaler Gehirnschnitte.....	19
Abbildung 6: Keine signifikante Änderung der Neuronenzahl und des Volumens der CA1-Region von THC oder Vehikel konsumierenden sowie abstinenten Mäusen.....	24
Abbildung 7: Beispielbild der Färbung mit DCX. Keine signifikante Änderung der Anzahl DCX-positiver Neurone im Gyrus dentatus von THC oder Vehikel konsumierenden sowie abstinenten Mäusen.....	25
Abbildung 8: CB1 unmittelbar nach THC-Gabe signifikant geringer exprimiert im Cortex.....	26
Abbildung 9: CB1 nach THC-Gabe und nachfolgender Abstinenzphase signifikant stärker exprimiert.....	28
Abbildung 10: GFAP unmittelbar nach THC-Gabe signifikant geringer exprimiert.....	29
Abbildung 11: GFAP nach THC-Gabe und nachfolgender Abstinenzphase signifikant geringer exprimiert.....	31
Abbildung 12: Kein signifikanter Effekt der THC-Gabe auf die IBA1-Expression.....	33
Abbildung 13: IBA1 nach THC-Gabe und anschließender Abstinenzphase signifikant stärker exprimiert.....	34

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Formeln zur Berechnung der Gesamtneuronenzahl in der CA1-Region.....	13
Tabelle 2: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen.....	16
Tabelle 3: Verwendete Software.....	22

Abkürzungsverzeichnis

ACEA	Arachidonyl-2'-chloroethylamid
AEA	Arachidonylethanolamid
2-AG	2-Arachidonylglycerol
asf	<i>area sampling fraction</i>
CA1	<i>cornu ammonis 1</i>
CA3	<i>cornu ammonis 3</i>
CBD	Cannabidiol
CB1	Cannabinoidrezeptor 1
CB2	Cannabinoidrezeptor 2
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCX	Doublecortin
ddH ₂ O	<i>aqua bidest</i> (doppelt destilliertes Wasser)
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
G.d.	Gyrus dentatus
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPR55	<i>G-protein-coupled receptor 55</i>
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IUPHAR	International Union of Pharmacology
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA7	<i>melanoma differentiation-associated 7</i>
NeuN	<i>neuronal nuclei</i> (hexaribonukleotidbindendes Protein 3)
NPC	neuronale Progenitorzelle
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SGZ	subgranuläre Zone
ssf	<i>section sampling fraction</i>
THC	(-)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol
tsf	<i>thickness sampling fraction</i>
Veh.	Vehikel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Bekannt und beliebt aufgrund seiner rauscherzeugenden Wirkung ist Cannabis weltweit die am häufigsten konsumierte illegale Droge. Etwa 3,8 % der erwachsenen Bevölkerung hat im Jahr 2015 Cannabis konsumiert (Peacock et al. 2018). Zum Einsatz kommen dabei in erster Linie Cannabiskraut, bestehend aus getrockneten Blüten und/oder Blättern (umgangssprachlich Marihuana), und das Harz aus den Cannabisblütenständen („Haschisch“). Sowohl in Cannabiskraut als auch in -harz ist seit dem Jahr 2006 der Gehalt an (-)- Δ^9 -trans-Tetrahydrocannabinol (THC), welches hauptsächlich für den psychotropen Effekt verantwortlich ist, deutlich angestiegen, wohingegen der Gehalt an Cannabidiol (CBD) abgenommen hat (Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht 2018). Als Risiken des Konsums sind akute Folgeschäden wie psychotische Symptome, Panikattacken, Konzentrationsschwierigkeiten und Übelkeit sowie nach langjährigem starkem Konsum oder Beginn in jungem Alter auch langfristige gesundheitliche Folgen wie affektive Störungen, Psychosen, Angststörungen, kognitive Einbußen, Abhängigkeit mit Entzugssymptomen sowie respiratorische und kardiovaskuläre Erkrankungen bekannt (Hoch et al. 2015).

Auf der anderen Seite lässt sich seit Jahren ein wachsendes Interesse an Cannabisextrakten und -bestandteilen als mögliche Behandlungsoption diverser Erkrankungs- und Beschwerdebilder beobachten. In Meta-Analysen wurden leicht positive Effekte auf Spastik bei multipler Sklerose, Anorexie in Zusammenhang mit AIDS, Übelkeit und Erbrechen unter Chemotherapie, chronische Schmerzerkrankungen, Angststörungen, Schlafstörungen und Bewegungsstörungen bei Tourette-Syndrom bestätigt (Grotenhermen und Müller-Vahl 2012; Whiting et al. 2015). Dabei traten gehäuft unerwünschte Nebenwirkungen unter dem jeweils verwendeten Cannabis-Derivat im Vergleich zu Placebo auf; insbesondere wurde über das Auftreten psychiatrischer und neurologischer Symptome wie Halluzinationen, Verwirrtheit, Somnolenz, Euphorie, Orientierungsverlust, Verlust des Gleichgewichts, Fatigue, Schwindel, Mundtrockenheit, Übelkeit und Erbrechen berichtet. Studien über Langzeitnebenwirkungen der medizinischen Anwendung von Cannabinoiden fehlen jedoch bislang (Whiting et al. 2015).

Zusammengenommen liefern diese Umstände Anlass, die Auswirkungen von THC auf das Gehirn anhand von Tiermodellen insbesondere in Hinblick auf potentielle Neurotoxizität weiter zu erforschen.

1.1 THC und das Endocannabinoidsystem

Der Einsatz der Pflanze *Cannabis sativa* als Heilmittel reicht mehrere Jahrtausende zurück bis in die chinesische Naturmedizin. Auch im Assyrien des 9. Jhdt. v. Chr., in Indien, im

antiken Persien und in mittelalterlichen arabischen Gesellschaften fanden verschiedene Bestandteile der Pflanze zu medizinischen Zwecken, aber auch mit dem Ziel der Bewusstseinsveränderung, Verwendung (Mechoulam et al. 2014).

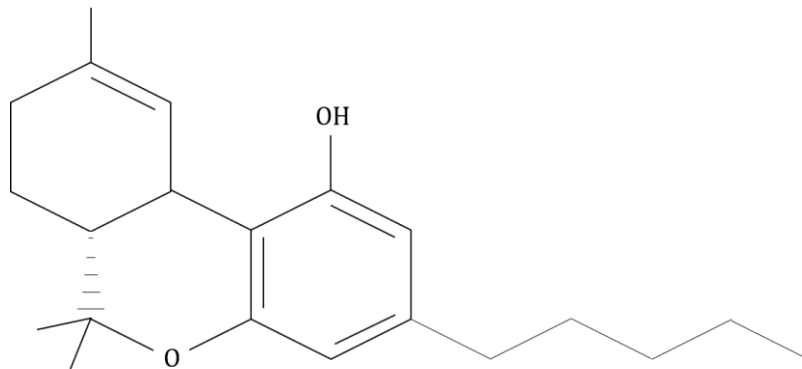


Abbildung 1: Strukturformel von THC. Abbildung erstellt nach Mechoulam *et al.* (2014).

Die Tatsache, dass die Cannabispflanze über 100 strukturell verwandte Cannabinoide enthält, erschwerte es den Forschern des 19. und frühen 20. Jahrhunderts, die Wirkstoffe der Pflanze zu isolieren (Mechoulam et al. 2014). Mithilfe chromatographischer Methoden gelang Gaoni und Mechoulam (1964) die Aufklärung der chemischen Struktur von THC (siehe Abbildung 1). Über zwanzig Jahre später wurde ein spezifischer Rezeptor für Phytocannabinoide, darunter THC, in Hirngewebe von Ratten beschrieben (Devane et al. 1988). Dabei handelte es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der später von einem Subkomitee der International Union of Pharmacology (IUPHAR) den Namen Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) erhalten sollte und dessen Proteinstruktur und Nucleinsäuresequenz kurz darauf bekannt wurde (Matsuda et al. 1990). Die Dichte von CB1 ist innerhalb des Gehirns besonders hoch in Cortex und Hippocampus, Strukturen, die für kognitive Funktionen wie Lernen und Kurzzeitgedächtnis eine entscheidende Rolle spielen, sowie in den für motorische Funktionen verantwortlichen Arealen Kleinhirn und Basalganglien (Pertwee 1997). Die Wirkungen von THC auf Gedächtnis- und Lernleistung sowie Antrieb und Motorik von Konsumenten korrelieren mit dieser Verteilung (Breivogel und Childers 1998) und scheinen zumindest teilweise CB1-vermittelt zu sein.

Ein anderer Cannabinoidrezeptor fand sich auf Makrophagen der Milz (Munro et al. 1993). Diesem Cannabinoidrezeptor 2 (CB2) genannten Rezeptor sehr ähnliche, ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden auf peripheren Nervenendigungen von Mäusen und Ratten beobachtet (Griffin et al. 1997). Durch In-situ-Hybridisierung wurde CB2 außerdem in Thymus, Tonsillen, Knochenmark, Pankreas, Monozyten-Makrophagenpräparaten der Milz, auf Mastzellen, peripheren Blutleukozyten und verschiedenen Immunkulturen nachgewiesen (Howlett 2002). Innerhalb des ZNS wird CB2 auf Neuronen und Glia unter anderem im Cerebellum, Hippocampus, Cortex, Striatum und Thalamus exprimiert (Gong et al. 2006). Anhand eines CB2-defizienten

Mausmodells wurde gezeigt, dass immunmodulierende Effekte von THC CB2-abhängig sind (Buckley et al. 2000).

Beide G-Protein-gekoppelten Cannabinoidrezeptoren besitzen sieben Transmembrandomänen und interagieren mit G-Proteinen der Gi/o-Familie. Aktivierung der Rezeptoren führt zu Phosphorylierung und Aktivierung von p42/p44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), p38 MAPK, und *Jun N-terminal kinase* (JNK), und damit von Signalwegen, welche Kern-Transkriptionsfaktoren regulieren; CB1 reguliert außerdem Kalium- und Calcium-Kanäle (Howlett 2005).

Das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren für Cannabinoide legt nahe, dass es körpereigene Botenstoffe geben muss, die darüber physiologische Funktionen erfüllen. Das für CB1 hochaffine Arachidonylethanolamid (AEA) oder Anandamid wurde 1992 entdeckt (Devane et al. 1992). Es wirkt als Agonist an CB1, als partieller Agonist oder Antagonist an CB2 und wird über Fettsäureamidhydrolase (FAAH) und andere Enzyme des Fettstoffwechsels inaktiviert (Mackie und Stella 2006). Ein zweiter endogener Ligand, der CB1 und CB2 aktiviert, 2-Arachidonylglycerol (2-AG), wurde 1995 beschrieben (Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995). Beide Endocannabinoide werden bei Bedarf aus Phospholipid-Vorläufern an der Zellmembran gebildet (Piomelli 2003).

Cannabinoide wirken aber auch unabhängig von CB1 und CB2, beispielsweise über den G-Protein-gekoppelten vaskulären Rezeptor *G-protein-coupled receptor 55* (GPR55) (Baker et al. 2006). Auch für Endocannabinoide wurden solche Wirkungen nachgewiesen. So interagiert AEA unter anderem mit dem *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), einem Kernrezeptor, der für Adipozytendifferenzierung, Glukosestoffwechsel und Insulinresistenz eine Rolle spielt, aber auch regulierend in Zellproliferation, Apoptose und inflammatorische Prozesse eingreift (Bouaboula et al. 2005).

1.2 Adulte Neurogenese

Für Säugetiere galt lange Zeit das Dogma, dass alle Neurone des zentralen Nervensystems während der Embryonalentwicklung entstünden. Altman und Das erbrachten 1965 den ersten Nachweis, dass Neurone im adulten Hippocampus von Ratten neu gebildet werden (Altman und Das 1965). Auch im Bulbus olfactorius adulter Ratten wurden neu gebildete Neurone gefunden (Altman 1969).

Andere Forschungsarbeiten konnten das Konzept der adulten Neurogenese für Ratten (Cameron et al. 1993) und auch für Mäuse bestätigen (Kempermann et al. 1997).

Neuronale Vorläuferzellen wurden daraufhin auch im Bereich der Seitenventrikel (Lois und Alvarez-Buylla 1993), des Striatum, Thalamus und Hypothalamus von Nagern gefunden (Pencea et al. 2001).

Im adulten menschlichen Gehirn wurde die Neubildung von Neuronen aus Vorläuferzellen zuerst im Gyrus dentatus des Hippocampus beobachtet (Eriksson et al. 1998), später auch im Bereich der Seitenventrikel (Sanai et al. 2004) und im Striatum (Ernst et al. 2014). In sämtlichen Arealen des humanen adulten Neocortex konnte hingegen kein Hinweis auf neuronale Proliferation gefunden werden (Bhardwaj et al. 2006).

Der Prozess der Neurogenese im Gyrus dentatus lässt sich vereinfacht in fünf Phasen einteilen: Proliferation, Differenzierung, Migration, dendritisches und axonales *Targeting* und synaptische Integration, wobei die Neurone der ersten drei Phasen mitotisch, die der letzten zwei postmitotisch sind (von Bohlen und Halbach 2007; Suliman et al. 2018). Abhängig von der jeweiligen Phase exprimieren die jungen Neurone spezifische Marker wie *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Nestin, Doublecortin (DCX) oder *Neuronal Nuclei* (NeuN) (von Bohlen und Halbach 2007) (Abbildung 2). DCX wird davon am längsten exprimiert, und zwar von der Differenzierungs- bis zur Integrationsphase, und wurde daher in der vorliegenden Arbeit als Marker für die Neurogenese im Gyrus dentatus verwendet.

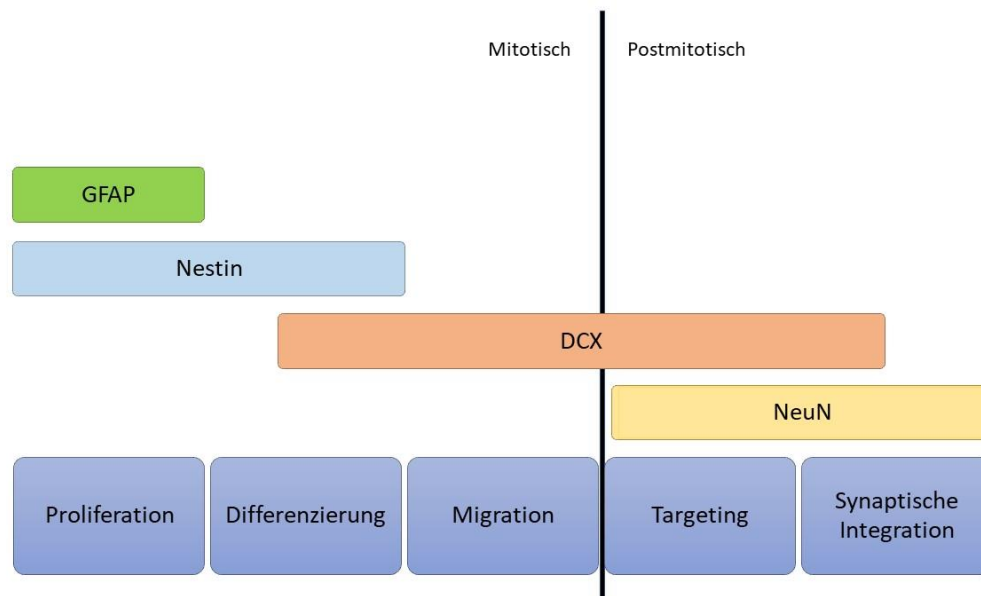


Abbildung 2: Marker der Neurogenese und zeitliche Abfolge ihrer Expression auf jungen Neuronen. Abbildung erstellt nach Bohlen und Halbach (2007).

Der Hippocampus spielt eine entscheidende Rolle für Lernen und Gedächtnis (Squire 2004). Die in der subgranularen Zone (SGZ) des Gyrus dentatus neu gebildeten Neurone werden bei entsprechender Lernanforderung als Körnerzellen in das hippocampale neuronale Netzwerk integriert und scheinen wesentlich zur Gedächtnisbildung beizutragen; so wurde von Beeinträchtigungen der hippocampalen Gedächtnisbildung nach Blockierung der Neurogenese im Gyrus dentatus berichtet (Shors et al. 2001).

Die neuronalen Stamm- bzw. Progenitorzellen im Gyrus dentatus exprimieren CB1-Rezeptor (Jiang et al. 2005). Zudem zeigen CB1-Knockout-Mäuse eine beeinträchtigte

Neurogenese (Jin et al. 2004), was darauf hindeutet, dass das Endocannabinoidsystem über CB1 an der Regulation von Zellproliferation und Neurogenese im Gehirn von Säugetieren beteiligt sein könnte. Aguado et al. (2005) zeigten, dass neuronale Vorläuferzellen (NPCs) des Hippocampus ein funktionales Endocannabinoidsystem aufweisen, bestehend aus Endocannabinoiden, CB1-Rezeptor und dem Enzym Fettsäureamidhydrolase (FAAH), welches an der Inaktivierung von Endocannabinoiden beteiligt ist. FAAH-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Proliferationsrate neuronaler Progenitorzellen. Dahingegen sind Mäuse ohne funktionale Diacylglycerol-Lipase, ein an der Synthese von 2-AG beteiligtes Enzym, in Bezug auf die Neurogenese eingeschränkt (Gao et al. 2010). Durch die Ausschüttung von AEA erfüllen NPCs der Subventrikularzone für striatale Neurone eine Schutzfunktion vor glutamaterger exzitatorischer Toxizität (Butti et al. 2012). CB1-Aktivierung durch AEA oder Arachidonyl-2'-chloroethylamid (ACEA), einem hochselektiven synthetischen CB1-Agonisten, befördert die Differenzierung neuronaler Stammzellen zu Neuronen und deren Reifung (Compagnucci et al. 2013). In antiepileptisch behandelten Mäusen stimuliert ACEA die hippocampale Neurogenese (Andres-Mach et al. 2015).

Auch die selektive Aktivierung des auf NPCs ebenfalls exprimierten CB2-Rezeptors führt zu gesteigerter Neurogenese, während CB2-Knockout-Mäuse eine verringerte Proliferation neuronaler Vorläuferzellen aufweisen (Palazuelos et al. 2006).

1.3 Neuroinflammation

Das zentrale Nervensystem (ZNS) scheint einem gewissen Immunprivileg zu unterliegen. Daran beteiligt sind neben der physikalischen Gefäßschranke das Fehlen lymphatischen Gewebes sowie antigenpräsentierender Zellen, die Tatsache, dass im ZNS metabolische Bedingungen herrschen, die nicht ideal für die Aktivierung von Immunzellen sind, und die Expression immunregulatorischer Moleküle (Forrester et al. 2018; Niederkorn und Stein-Streilein 2010). Die Blut-Hirn-Schranke dient der Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase sowie der Abschirmung des ZNS von Toxinen, Inflammation und pathogenen Keimen. Sie besteht aus Gefäßwänden mit spezialisiertem Endothel, Perizyten und Basalmembran, die von Astrozyten-Fortsätzen, perivaskulären Makrophagen und Mikroglia umhüllt werden (Daneman und Prat 2015; Abbott et al. 2006). Neuroinflammation tritt jedoch nicht nur im Zusammenhang mit einem Durchtritt von Blutleukozyten durch eine gestörte Blut-Hirn-Schranke auf (Hickey 1991), sondern wird vielmehr von ortsständigen Gliazellen gesteuert, darunter Mikroglia und Astrozyten (Ransohoff und Perry 2009).

Mikrogliazellen sind ZNS-eigene Makrophagen (Ginhoux et al. 2010). Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und reparieren Gewebeschäden, präsentieren aber auch Antigene und regulieren neuronale Entwicklungsprozesse (Streit et al. 2005; Ajami et al. 2007). Abhängig von inflammatorischen oder potentiell neurotoxischen Reizen in der

Umgebung zeigt die Mikroglia unterschiedliche Aktivitätszustände: ruhende Mikroglia zeichnet sich durch eine weit verzweigte Morphologie sowie durch eine niedrige Expression von Oberflächenmarkern wie beispielsweise MHC-Molekülen aus, während die Aktivierung von Mikroglia zu Vermehrung, morphologischen Änderungen und erhöhter Expression typischer Marker führt (Perry et al. 2007; Raivich et al. 1999). *Ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (IBA1) ist ein Calcium bindendes Protein, welches spezifisch von verzweigter Mikroglia exprimiert und bei Aktivierung hochreguliert wird (Ito et al. 1998; Hirasawa et al. 2005).

Ein anderer wichtiger Zelltyp der Glia des ZNS, die Astrozyten, reguliert die lokale Ionenkonzentration, pH-Wert und Stoffwechsel (Verkhatsky et al. 2015) und unterstützt die neuronale Signalübertragung sowie die synaptische Plastizität (Pittà et al. 2016). Immunhistochemische Anfärbung des Astrozyten-typischen GFAP macht die namensgebende sternförmige Anordnung der Intermediärfilamente sichtbar (Seifert et al. 2006; Eng 1985).

Cannabinoidrezeptoren sind auf Glia, Immunzellen und Neuronen im gesamten ZNS lokalisiert und spielen bei der Steuerung neuroinflammatorischer Prozesse eine Schlüsselrolle (Downer 2011). So zeigten Zhang et al. in einem Tiermodell für chronischen neuropathischen Schmerz, dass eine erhöhte CB2-Expression in bestimmten Bereichen des Rückenmarks mit einer Aktivierung von Mikroglia einhergeht (Zhang et al. 2003). Über CB2 werden verschiedene Signalwege, darunter der MAP-Kinase-Signalweg aktiviert. Die resultierende Wirkung ist dabei abhängig von Zelltyp und molekularem Kontext (Demuth und Molleman 2006). Cannabinoide wirken über CB2 antiinflammatorisch auf Leukozyten *in vitro* sowie in verschiedenen Tiermodellen (Ashton 2007).

1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, potentiell neurotoxische Auswirkungen chronischen Cannabiskonsums auf Neuronenzahl, Neurogenese und Neuroinflammation im Hippocampus anhand eines Mausmodells zu untersuchen. Hierfür erhielten adulte Wildtypmäuse eine sechswöchige Behandlung mit THC bzw. dessen Trägerlösung (dem sogenannten Vehikel), ehe sie getötet und für die von mir durchgeführten Experimente zur Verfügung gestellt wurden. Um eine mögliche Reversibilität beobachteter Veränderungen zu erfassen, hielt ein Teil der Tiere zwischen dem Behandlungszeitraum und dem Zeitpunkt der Tötung eine Abstinenzphase ein. Im Hinblick auf einen möglichen hippocampalen Neuronenverlust wurde in einem stereologischen Verfahren die Neuronenzahl der CA1-Region ermittelt. Um eine Beeinträchtigung oder Steigerung der adulten Neurogenese zu erkennen, wurden die mit DCX angefärbten neu entstandenen Neurone im Gyrus dentatus gezählt. Mit immunhistochemischen Färbungen gegen GFAP und IBA1 sollten potentielle Effekte des THC-Konsums auf inflammatorische Prozesse im ZNS erfasst werden. Außerdem wurde eine Färbung von CB1 angefertigt, um das

Verhalten der Rezeptor-Expression bei chronischem THC-Konsum sowie bei Abstinenz von THC zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die vorliegende Arbeit wurden bereits entnommene Gehirne von 51 adulten Mäusen der Spezies Hausmaus (*Mus musculus*) verwendet, 29 davon waren weiblichen und 22 männlichen Geschlechts. Die Mäuse, deren Gehirne für diese Arbeit verwendet wurden, waren ausnahmslos genetische Wildtypiere der Inzucht-Mauslinie C57BL/6 J der Jackson Laboratories. Alle Experimente wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit genehmigt und von hierfür ausgebildeten Personen durchgeführt.

Aus ethischen Gründen wurden die Mäuse, die kein THC erhielten, außer für diese Arbeit auch für die Dissertation von Melanie Müller als Vergleichsgruppen verwendet. Das Anfertigen der entsprechenden Präparate übernahmen wir dabei gemeinsam. Die Auswertungen erfolgten jedoch für jede der Arbeiten getrennt nur durch die jeweilige Doktorandin.

2.2 Behandlung

Zunächst wurden die Mäuse in vier Gruppen mit unterschiedlicher Behandlung aufgeteilt:

A1) Gruppe mit THC-Behandlung und Pause (**abstinente Gruppe**): Die erste Gruppe, bestehend aus sieben Weibchen und sechs Männchen, hatte ab einem Lebensalter von drei Monaten für 42 Tage täglich eine Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht (KG) THC (Dronabinol von THC-Pharm, Frankfurt, Deutschland) in einer Trägerlösung, hergestellt aus 2,5 ml Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 2,5 ml Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), gelöst in 45 ml 0,9-prozentiger Kochsalzlösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland), als intraperitoneale Injektion erhalten (Gruppe A in Abbildung 3).

A2) Gruppe mit Vehikel-Behandlung und Pause: Die **Kontrollgruppe zur Gruppe A1**, bestehend aus sieben Weibchen und sechs Männchen, hatte auf dieselbe Weise wie die erste Gruppe die Trägerlösung (Vehikel) aus Ethanol, Tween und Kochsalz verabreicht bekommen und diente dieser als Vergleichsgruppe.

B1) Gruppe mit THC-Behandlung bis zum Ende (**konsumierende Gruppe**): Die Gruppe B1 bestand ebenfalls aus sieben Weibchen und sechs Männchen und hatte erst ab einem Alter von fünf Monaten für 42 Tage täglich 20 mg/kg KG THC in der Trägerlösung intraperitoneal erhalten (Gruppe B in Abbildung 3).

B2) Gruppe mit Vehikel-Behandlung bis zum Ende: Die vierte Gruppe (**Kontrollgruppe zur Gruppe B1**), bestehend aus acht Weibchen und fünf Männchen, diente der Gruppe B1 zum direkten Vergleich und hatte in der beschriebenen Weise die Trägerlösung ohne THC (Vehikel) injiziert bekommen (siehe Abbildung 3).

Die Behandlung der lebenden Tiere sowie deren Tötung erfolgten durch dafür qualifiziertes Personal. Alle verwendeten Mäuse wurden im Alter von sechseinhalb Monaten mit vierprozentiger Paraformaldehydlösung perfundiert und die Gehirne für die im Folgenden beschriebenen Versuche zur Verfügung gestellt. Die jeweils linken Hemisphären wurden bis zur Verwendung für Stereologie (siehe Abschnitt 2.3) und *Free-floating-Färbung* (siehe Abschnitt 2.4) bei -80°C eingefroren und einige der rechten Hemisphären für immunhistochemische und immunfluoreszierende Färbungen in Paraffin eingebettet gelagert.

Behandlung

20mg/kg THC über 42 Tage

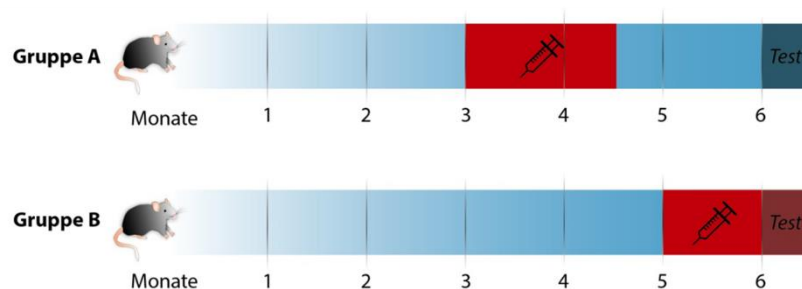


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Behandlungsplanes für die Mäuse, die THC erhielten. Für Gruppe A und B wurde jeweils eine Vehikelgruppe mitbehandelt, die die entsprechende Trägerlösung ohne THC erhielt (Abbildung von Yvonne Bouter, mit freundlicher Genehmigung).

2.3 Quantifizierung der Neurone

Eine quantitative Analyse der Neuronenzahl sowie des Volumens der CA1 -Region der Hippocampi nach Behandlung mit THC bzw. Placebo wurde mithilfe der Design-basierten Stereologie durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine quantitative Analyse morphologischer Kriterien wie Zellzahlen und Volumina definierter anatomischer Areale, die unabhängig von Form, Größe, räumlicher Orientierung und räumlicher Verteilung der

untersuchten Zelltypen ist und so durch Eliminierung systematischer durch die Geometrie bedingter Fehler statistisch stabile Daten generiert (Schmitz und Hof 2005).

Die linken Großhirnhemisphären wurden am Kryotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Kresylviolett gefärbt. Mithilfe eines über eine Kamera mit dem Mikroskop verknüpften Computers wurden die Neurone in der vorab bestimmten Region stichprobenartig gezählt und auf das gesamte Volumen der CA1-Region der jeweiligen Hemisphäre hochgerechnet.

2.3.1 Schneiden mit dem Kryotom

Die nach Entnahme bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefrorenen linken Gehirnhälften wurden am Kryotom CM 1850 UV (Leica, Wetzlar, Deutschland) in je $30\text{ }\mu\text{m}$ dicke koronare Schnitte zerteilt. Hierfür wurden sie mit dem Klebstoff Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Torrance, USA) eingebettet und an der Schneidevorrichtung befestigt. Die verwendeten Klingen waren Microtome Blades C35 (Feather, Osaka, Japan). Die Schnitte wurden der Reihe nach auf zehn Gläschen verteilt, so dass jedes der Gläschen jeden zehnten Schnitt enthielt. Die Schnitte wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und dann auf Superfrost® Objektträger (Thermo scientific Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen.

2.3.2 Färbung mit Kresylviolett

Um die Neurone für die Zählung sichtbar zu machen, wurden die Gehirnschnitte mit Kresylviolett gefärbt. Die Färbung mit Kresylviolett gehört zu den Nissl-Färbungen und bindet an basophile Verbindungen wie RNA und DNA (Kaur et al. 2018; Kádár et al. 2009). Die für die Delipidierung und Anfärbung des Gewebes verwendeten Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Arbeitslösung (1): 13,61 g Natriumacetat-Trihydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden in 100 ml *aqua bidest* (ddH₂O) gelöst. 40 ml von dieser Lösung wurden mit 9,6 ml 100-prozentiger Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Deutschland) gemischt und mit ddH₂O auf 1 l aufgefüllt.

Färbelösung (2): Zu 1 l der Arbeitslösung (1) wurde 0,1 g Kresylviolett-Acetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) gegeben. Die Lösung wurde mit Alufolie vor Licht geschützt und über Nacht gerührt. Unmittelbar vor ihrem Einsatz wurde die Färbelösung gefiltert.

Arbeitslösung (3): 200 μl Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden eine Stunde mit 9,80 ml ddH₂O verrührt. 2,5 ml dieser Lösung wurden anschließend mit 150 ml Ethanol 99 %, vergällt mit 1 % Methyläthylketon (Walter-CMP, Kiel, Deutschland) und 50 ml ddH₂O gemischt.

Zunächst fand die Delipidierung statt. Hierfür wurden die Schnitte zweimal für zehn Minuten in Arbeitslösung (1), anschließend für 20 Minuten in Arbeitslösung (3) und zuletzt

erneut zweimal für 10 Minuten in Arbeitslösung (1) gestellt. Unter Lichtschutz durch eine Styroporkiste erfolgte der Färbeschritt. Die Färbelösung (2) wurde hierfür unmittelbar vor ihrer Verwendung durch Faltenfilter 595 ½ (Th. Geyer, Höxter, Deutschland) gefiltert. Anschließend wurden die Präparate für zweimal acht Minuten in Färbelösung (2) gefärbt. Für die darauffolgende Dehydratation wurden die Präparate dreimal eine Minute in Arbeitslösung (1), drei Minuten in Ethanol, zehn Minuten in Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und zuletzt noch zweimal fünf Minuten in Xylol (Isomere 98 %) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Danach wurden die gefärbten Präparate mit je einem Tropfen Roti-Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und durch Menzel-Gläser Deckgläser 24*60 mm (Thermo scientific Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland) bedeckt. Über Nacht härtete das Einbettmedium unter dem Abzug aus.

2.3.3 Stereologie

Um auch diskrete durch die Behandlung mit THC hervorgerufene morphologische Veränderungen im Hippocampus zu detektieren, wurden Neuronenzahl und Volumen stereologisch bestimmt (West et al. 1991). Stellvertretend und repräsentativ für den ganzen Hippocampus wurde dessen CA1-Region ausgewertet.

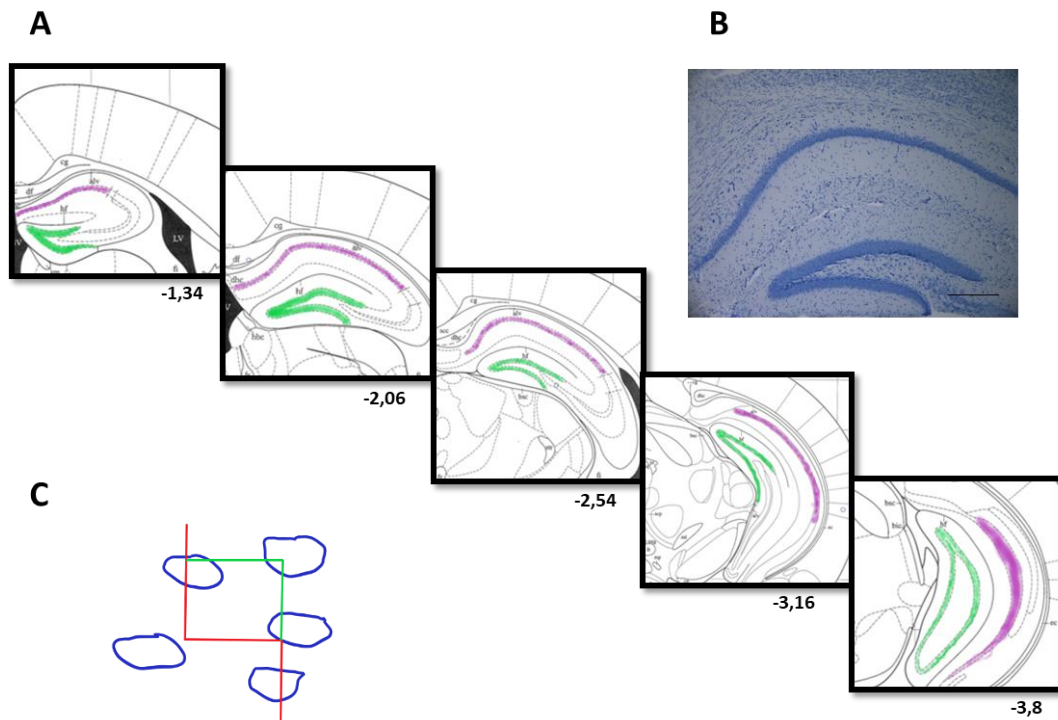


Abbildung 4: **(A)** Schematische Darstellung ausgewählter koronarer Schnittebenen durch die linke Hemisphäre einer C57BL/6J-Maus. Unter dem jeweiligen Schnitt ist der Abstand vom Bregma in mm vermerkt. In Violett die CA1-Region, in Grün der Gyrus dentatus (modifiziert nach Paxinos und Franklin 2004). **(B)** Kresylviolett-färbung des Hippocampus. Maßstab 200 µm. **(C)** Schematische Darstellung des Zählrahmens von 14*14 µm, in dem sich dort befindliche Neurone gezählt wurden (Neurone in lila).

Vor Verwendung für die Stereologie wurden alle Präparate von einer anderen Person verblindet. Die CA1-Region des Hippocampus wurde an einem Olympus BX51-Mikroskop (Olympus, Tokio, Japan) mit motorisiertem Objektisch mithilfe der Software Stereo Investigator 7 (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA) nach dem Prinzip der Design-basierten Stereologie ausgezählt (Schmitz und Hof 2005). Berücksichtigt wurden dabei Schnitte im Abstand von -1,22 bis -3,80 mm zum Bregma (siehe Abbildung 4 A). Die beschriebene Region wurde dabei zunächst unter einem vierfach-Objektiv umrandet. Nach der Optical-Dissector-Methode wurden Zählrahmen von 14*14 µm Kantenlänge mithilfe eines zufällig über die Region gelegten Gitternetzes der Maschenweite 50*105 µm verteilt. Anschließend wurden unter einem 100-fach vergrößernden Objektiv mit Immersionsöl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) diejenigen Neurone gezählt, die sich innerhalb der Zählrahmen befanden und deren linke und untere Umrandung nicht überragten (rot in Abbildung 4 C). Für jeden Zählrahmen wurde die Dicke des Schnittes gemessen. Die *optical dissector height* wurde auf 5 µm, die *top guard zone* auf 2 µm festgelegt. Schließlich wurde die Gesamtzahl der Neurone nach den in Tabelle 1 aufgeführten Formeln der Optical-Fractionator-Methode näherungsweise bestimmt (West et al. 1991).

Tabelle 1: Formeln zur Berechnung der Gesamtneuronenzahl in der CA1-Region

Schritt 1	Berechnung des Produktes P	$P = asf * ssf * tsf$ (Erläuterungen siehe unten)
Schritt 2	Berechnung der Neuronenzahl jedes einzelnen Schnittes eines Gehirns	$N_{Schnitt_x} = P * \text{ermittelte Neuronenzahl des Schnittes } x$
Schritt 3	Berechnung der Gesamtneuronenzahl der untersuchten Hirnregion	$N_{gesamt} = \sum_{x=1}^n N_{Schnitt_x}$
Berechnung der Faktoren von P		
	asf	$50 \mu m * 105 \mu m / (14 \mu m * 14 \mu m) = 26,79$
	ssf	10
	tsf	Gemessene Schnittdicke [μm]/5 μm

Hierbei war die *area sampling fraction* (asf) 26,79 und errechnete sich als Quotient der Fläche einer Masche des Gitternetzes in μm^2 zur Fläche eines Zählrahmens in μm^2 . Die *section sampling fraction* (ssf) war 10, da jeder zehnte Schnitt einer Gehirnhälfte ausgewertet wurde. Die *thickness sampling fraction* (tsf) errechnete sich als Quotient der jeweiligen Schnittdicken in μm und der *optical dissector heigh* in μm (Schmitz und Hof 2005).

Das Volumen der CA1-Region wurde nach dem Cavalieri-Prinzip berechnet (Rosen und Harry 1990).

2.4 Quantifizierung der Neurogenese

Um festzustellen, ob sich die chronische Behandlung mit THC auf das Ausmaß der adulten Neurogenese im Gyrus dentatus auswirkt, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen DCX an frei schwimmenden Gehirnschnitten durchgeführt. Die Quantifizierung DCX-exprimierender Neurone erlaubt eine genaue Erfassung von Änderungen in der Rate der adulten Neurogenese (Couillard-Despres et al. 2005).

Die Herstellung der Gehirnschnitte erfolgte wie in Absatz 2.3.1 beschrieben. Die Färbung erfolgte mittels eines spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen DCX nach der Avidin-

Biotin-Komplex-Methode (Hsu et al. 1981). Sichtbar gemacht wurden die so markierten jungen Neurone mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Mithilfe eines Computers wurde am mikroskopischen Bild der Bereich des Gyrus dentatus aufgesucht und die darin befindlichen DCX-positiven Neurone gezählt.

2.4.1 *Free-floating* DAB-Immunfärbung

Bei der *free-floating*-Färbung wurden die Schnitte nicht zuvor auf Objektträger aufgezogen, sondern schwammen frei in den jeweiligen Lösungen. Hierfür wurden Cellstar TC-Platten mit zwölf Kammern (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) und passende Einsätze (Corning Netwells inserts, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet.

0,01 M phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) löste den die Schnitte umhüllenden Klebstoff (siehe Absatz 2.3.1) und ermöglichte deren Transfer in die mit Einsätzen versehene Zellkulturplatte. Nach fünf Minuten wurden die Einsätze für weitere zehn Minuten in neue Kammern mit PBS gestellt, um eine ausreichende Hydratation zu gewährleisten. Die Blockierung der zelleigenen Peroxidase erfolgte mit 20 µl 30-prozentiger Wasserstoffperoxidlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie 2 ml PBS pro Kammer. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für zehn Minuten in einer Lösung aus 0,01 M PBS plus 0,1 Prozent Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen, um die Zellwände zu permeabilisieren. Nach einer Minute Waschen in PBS folgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für eine Stunde in 0,01 M PBS mit zehn Prozent fetalem Kälberserum (FBS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) und vier Prozent fettarmem Milchpulver (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Direkt anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper Anti-Doublecortin polyclonal rabbit (Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:2000 in 0,01 M PBS und 10 Prozent FBS inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst erneut dreimal zehn Minuten in 0,01 M PBS mit 0,1 Prozent Triton, dann eine Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:250 mit 0,01 M PBS sowie 10 Prozent FBS gemischt und die Gehirnschnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur darin inkubiert. Für die ABC-Inkubation nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode wurde das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Eine Lösung bestehend aus Lösung A und Lösung B, jeweils im Verhältnis von 1:300, in 0,01 M PBS und 10 Prozent FBS, wurde 30 Minuten vor ihrer Verwendung angesetzt. Es folgten drei zehnminütige Waschschrte mit 0,01 M PBS mit anschließender 90-minütiger ABC-Inkubation. Nach drei weiteren zehnminütigen Waschschrten wurden die Schnitte zwei Minuten mit einer Diaminobenzidin-haltigen Lösung eingefärbt. Dafür wurde das DAB Peroxidase Substrate Kit SK-4100 (Vector Laboratories, Burlingame,

USA) nach Herstellerangaben genutzt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für zehn Minuten in 0,01 M PBS gewaschen und auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen. Die Schnitte aus einer Kammer wurden jeweils auf zwei Objektträgern platziert. Über Nacht trockneten die Präparate bei 37 °C.

Am dritten Tag fand nach zehnminütiger Hydratation in 0,01 M PBS die Gegenfärbung mit Hämatoxylin statt, die 40 Sekunden dauerte. Anschließend wurden die Präparate in ddH₂O getunkt und fünf Minuten unter laufendem Leitungswasser gespült. Es folgte eine Alkoholreihe bestehend aus einer Minute 70-prozentigem, fünf Minuten 95-prozentigem und zehn Minuten 100-prozentigem Ethanol und zweimal fünf Minuten Xylol. Die Präparate wurden abschließend in Roti-Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingebettet und mit Deckgläschen bedeckt. Über Nacht härtete das Einbettmedium unter dem Abzug aus.

2.4.2 Meander Scan

Für die Zählung der Doublecortin-positiven Neurone im Gyrus dentatus wurde ein Olympus BX51-Mikroskop mit motorisiertem Objektisch und die Software StereoInvestigator 7 verwendet. Zuvor wurden alle zu zählenden Präparate von einer anderen Person verblindet. Die Gehirnschnitte im Abstand von -1,22 bis -3,80 mm zum Bregma wurden berücksichtigt (siehe Abbildung 4 A). Unter einem vierfach-Objektiv wurde der Gyrus dentatus umrandet. Der Meander Scan wurde mit einem 100-fach-Objektiv und Immersionsöl durchgeführt und ermöglichte eine lückenlose und überlappungsfreie Durchsicht der gewünschten Region. Um die Gesamtzahl der in der subgranularen Zellschicht eines Gyrus dentatus befindlichen Doublecortin-positiven Neurone näherungsweise anzugeben, wurden die Resultate aller Schnitte eines Gehirns summiert und bei Verwendung jedes zehnten Gehirnschnittes verzehnfacht (siehe Absatz 2.3.1).

2.5 Quantifizierung der Expression von Cannabinoidrezeptoren und Markern der Neuroinflammation

Zur Bestimmung von Mikrogliaaktivität und Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren wurden immunhistochemische Färbungen gegen CB1, IBA1 und GFAP durchgeführt. Hierfür wurden in Paraffin eingebettete sagittale Gehirnschnitten erstellt und mit jeweils spezifischen polyklonalen Antikörpern (Tabelle 2) inkubiert. Am Mikroskop wurden mit einer Kamera Bilder aufgenommen und von einer Graphiksoftware quantitativ ausgewertet.

Tabelle 2: Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-CB1 (Rabbit)	Abcam, Cambridge, UK	1:2000
Anti-GFAP (Guinea Pig)	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	1:1000
Anti-IBA1 (Guinea Pig)	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland	1:1000
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat Anti-Rabbit IgG biotinyliert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	1:200
Goat Anti-Guinea Pig IgG biotinyliert	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA	1:200
Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz	Hersteller	Verdünnung
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight 594 Conjugated Highly Cross-adsorbed	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	1:200
Goat Anti-Guinea Pig IgG, DyLight 488 Cross-adsorbed	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA	1:200

2.5.1 Schneiden am Mikrotom

Die rechten Hemisphären von insgesamt zwölf weiblichen Mäusen (drei aus jeder der vier Behandlungsgruppen, siehe Abschnitt 2.2) wurden nach der Entnahme in Paraffin eingebettet: hierfür wurde das Gewebe 72 Stunden in einer 4-prozentigen Paraformaldehyd-Lösung (Roti®-Histofix 4 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 4 °C fixiert. Zur anschließenden Dehydratation wurde folgendes Protokoll verwendet: 5 Minuten in 4-prozentiger Paraformaldehyd-Lösung; 30 Minuten in Leitungswasser; jeweils eine Stunde in 50-, 60-, 70-, 80- und 90-prozentigem Ethanol, zweimal eine Stunde in 100-prozentigem Ethanol, eine Stunde in Xylol und zweimal eine Stunde in geschmolzenem Paraffin. Anschließend wurden die Hemisphären an einer EG1140 H Embedding Station (Leica, Wetzlar, Deutschland) in Paraffinblöcke eingebettet und mir zur weiteren

Verarbeitung zur Verfügung gestellt: Am Mikrotom HM 335 E (Microm, Walldorf, Deutschland) wurden die Gewebeblöcke mit Mictotome Blades S35 (Feather, Osaka, Japan) in sagittaler Ebene in 4 µm dicke paraffinierte Gehirnschnitte zerteilt. Die Schnitte wurden in einem Wasserbad bei Raumtemperatur auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen und in einem zweiten Wasserbad bei 60 °C entfaltet. Die Objektträger wurden nach etwa zehnmütigem Antrocknen bei Raumtemperatur über Nacht bei 37 °C getrocknet.

2.5.2 DAB-Immunfärbung in Paraffin eingebetteter Schnitte auf Glas

Von jedem der zwölf Tiere wurden drei Objektträger für die Färbung ausgewählt. Dafür wurde mikroskopisch eine Schnittebene in der Mitte des Hippocampus aufgesucht und von dort jeweils drei Schnitte im Abstand von etwa 20 µm verwendet. Diese wurden zunächst zweimal für fünf Minuten in Xylol entparaffiniert. Es folgte zur Hydratisierung eine Alkoholreihe, bestehend aus zehn Minuten 100-prozentigem, fünf Minuten 95-prozentigem und fünf Minuten 70-prozentigem Ethanol, sowie eine Minute ddH₂O.

Die zelleigene Peroxidase wurde durch eine Lösung aus 200 ml 0,01 M PBS und 2 ml 30-prozentigem Wasserstoffperoxid blockiert. Dieser Schritt dauerte 30 Minuten. Anschließend wurden die Präparate eine Minute in ddH₂O gewaschen.

Danach folgte die Antigendemaskierung: In der Mikrowelle NN-E201WM (Panasonic, Kadoma, Japan) wurde 10 mM Citratpuffer (pH-Wert 6), hergestellt aus 2 l ddH₂O, Natriumhydroxid und 4,2 g Zitronensäure-Monohydrat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), zum Kochen gebracht und anschließend bei 200 W für acht Minuten köcheln gelassen.

Nach 15-minütiger Abkühlungszeit bei Raumtemperatur wurden die Schnitte eine Minute in ddH₂O gewaschen. Um die Zellmembranen permeabel zu machen wurden die Präparate für 15 Minuten in einer Lösung aus 0,01 M PBS und 0,1 Prozent Triton gewaschen. Nach fünf Minuten in 0,01 M PBS folgte die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für eine Stunde mit einer Mischung aus 0,01 M PBS, zehn Prozent FBS und vier Prozent Milchpulver. Die Gehirnschnitte wurden mit einem Fettstift (PAP PEN, Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland) eingekreist und mit der Lösung inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen von den Objektträgern abgekippt und eine Lösung aus 0,01 M PBS und zehn Prozent FBS mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 2) in der entsprechenden Verdünnung auf die Präparate gegeben und über Nacht darauf stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst unter gelegentlichem leichten Schwenken des Glasträgers für 15 Minuten in 0,01 M PBS und 0,1 Prozent Triton, anschließend für eine Minute in 0,01 M PBS in der Küvette gewaschen. Der jeweilige sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 2) wurde in einem Verhältnis von 1:200 in 0,01 M PBS und zehn Prozent

FBS gelöst und in der oben beschriebenen Weise auf die erneut in den Plastikboxen platzierten Präparate aufgebracht. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C.

Für die ABC-Inkubation wurde erneut das Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet. Die Lösung aus Lösung A und Lösung B, beide im Verhältnis von 1:300 in 0,01 M PBS und zehn Prozent FBS, wurde 30 Minuten vor ihrer Verwendung angesetzt. Nach dem Waschen für 15 Minuten in einer Küvette mit 0,01 M PBS unter gelegentlichem leichtem Schwenken folgte die 90-minütige ABC-Inkubation wiederum bei 37 °C. Nach einem weiteren 15-minütigen Waschschrift in 0,01 M PBS, auch hier unter leichtem Schwenken, wurden die Objektträger mit der Diaminobenzidin-haltigen Lösung eingefärbt, wobei die jeweilige Färbezeit je nach verwendetem Antikörper variierte. Auch hierfür wurde das DAB Peroxidase Substrate Kit SK-4100 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) laut Herstellerangaben genutzt. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten unter gelegentlichem Schwenken in 0,01 M PBS gewaschen.

Zur Dehydratation durchliefen die Präparate eine Alkoholreihe: eine Minute in 70-prozentigem, fünf Minuten in 95-prozentigem und zehn Minuten in 100-prozentigem Ethanol, dann zweimal fünf Minuten in Xylol, um Reste des Fettstiftes zu entfernen und die Aushärtung des Einbettmediums zu fördern. Die gefärbten Präparate wurden mit Roti-Histokitt und einem Deckgläschen eingedeckt und über Nacht zum Trocknen unter den Abzug gestellt.

2.5.3 Quantifizierung der Färbungen

Von den so gefärbten Präparaten wurden an einem Olympus BX-51 Mikroskop, ausgestattet mit einer Moticam Pro 282A-Kamera, Fotos angefertigt. Dabei wurden die Hippocampi einer Färbung bei jeweils gleichbleibenden Belichtungsverhältnissen und 50-facher Vergrößerung aufgenommen. Von der an den Hippocampus angrenzenden Cortexregion wurden drei Bilder, ein frontales, ein parietales und ein occipitales (Abbildung 5 A, B, C), unter 100-facher Vergrößerung gemacht, wobei wiederum die Einstellungen für die Bilder einer Färbung beibehalten wurden.

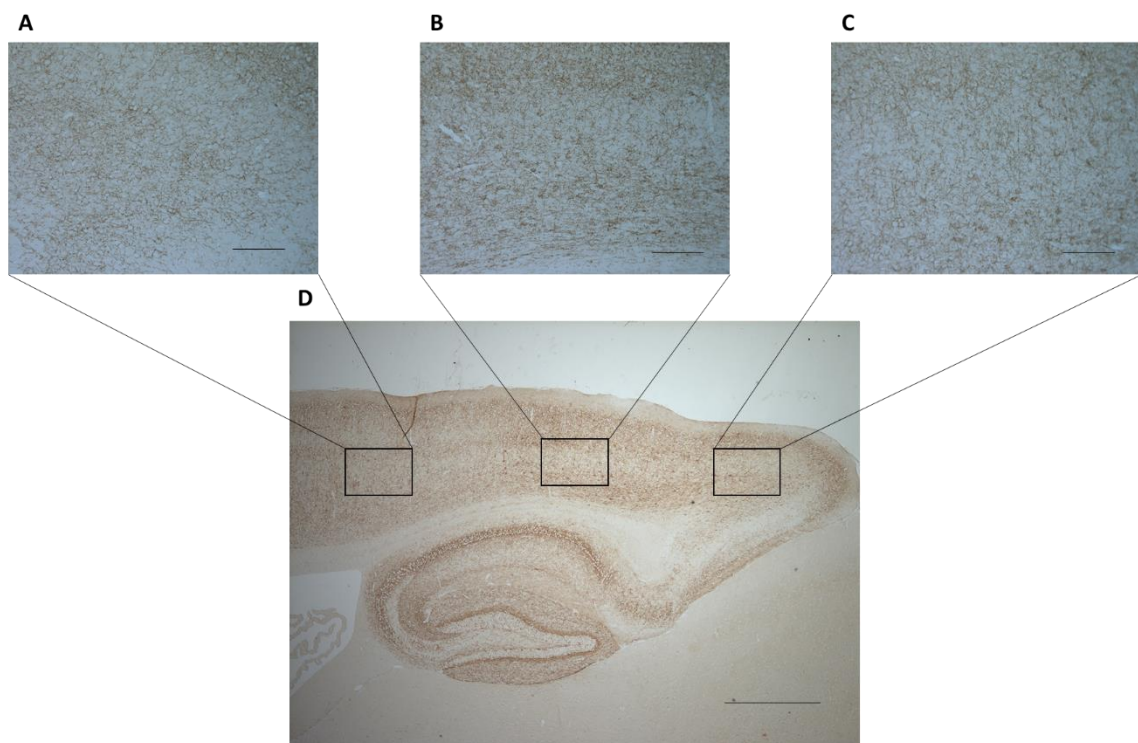


Abbildung 5: Beispielbilder der DAB-Färbung sagittaler Gehirnschnitte. **(A, B, C)** Ausschnitte aus dem frontalen, parietalen und occipitalen Cortex cerebri. Maßstab 100 μm . **(D)** Hippocampus. Maßstab 500 μm .

In dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.51w, open source) wurden die Fotos in binäre 8-Bit Schwarz-weiß-Bilder umgewandelt und ein Schwellenwert für die Helligkeit festgelegt, bei dem die jeweils spezifisch angefärbten Strukturen zu erkennen waren, der Hintergrund aber ungefärbt blieb. Das Programm berechnete den Anteil der gefärbten Fläche zur Fläche des Bildes.

2.6 Lokalisation der Marker mit Immunfluoreszenz

Mithilfe von Immunfluoreszenz wurde die Expression der in Abschnitt 2.5 beschriebenen Marker sichtbar gemacht und deren Lokalisation im Gewebe und zueinander untersucht.

Beispielhaft wurde aus jeder der vier Behandlungsgruppen (siehe Abschnitt 2.2) ein Weibchen gewählt. Die Schnitte wurden, wie im Teil 2.5.1 erklärt, angefertigt.

2.6.1 Fluoreszenz-Immunfärbung in Paraffin eingebetteter Schnitte auf Glas

Um Paraffinreste zu entfernen, wurden die Schnitte zunächst zweimal für fünf Minuten in Xylol gestellt. Zur Hydratisierung folgte eine Alkoholreihe bestehend aus zehn Minuten 100-prozentigem, fünf Minuten 95-prozentigem und fünf Minuten 70-prozentigem Ethanol, dann eine Minute ddH₂O.

Es folgte die Antigendemaskierung: Der Glaträger wurde in eine Plastikkuvette mit 10 mM Citratpuffer (pH-Wert sechs) gestellt. In der Mikrowelle wurde die Lösung bei 800 W zum Kochen gebracht und anschließend bei 200 W köcheln gelassen. Nach zehn Minuten wurde die Küvette herausgenommen und etwa 15 Minuten abkühlen gelassen.

Im Anschluss wurden die Schnitte eine Minute in ddH₂O gewaschen. Um die Zellmembranen permeabel zu machen, wurden die Präparate für 15 Minuten in einer Lösung aus 0,01 M PBS und 0,1 Prozent Triton, anschließend für fünf Minuten in 0,01 M PBS gewaschen. Es folgte die einstündige Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen. Hierfür wurden die Objektträger aus dem Glaträger genommen und in die speziell angefertigten Plastikboxen (siehe Absatz 2.5.2) gelegt, die Gehirnschnitte mit dem Fettstift eingekreist und mit der Lösung aus 0,01 M PBS, zehn Prozent FBS und vier Prozent Milchpulver inkubiert. Im Anschluss wurde eine Lösung aus 0,01 M PBS und zehn Prozent FBS mit dem jeweiligen primären Antikörper (siehe Tabelle 2) in der entsprechenden Verdünnung auf die Präparate gegeben und über Nacht darauf stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurden die Präparate zunächst unter gelegentlichem leichten Schwenken des Glaträgers in der Küvette für 15 Minuten in 0,01 M PBS und 0,1 Prozent Triton, anschließend für eine Minute in 0,01 M PBS gewaschen. Der jeweilige sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 2) wurde in einem Verhältnis von 1:200 in 0,01 M PBS und zehn Prozent FBS gelöst und unter Lichtschutz auf die erneut in die Plastikboxen gelegten Präparate aufgebracht. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 90 Minuten bei 37 °C.

Nach drei fünfminütigen Waschschrritten in 0,01 M PBS unter Lichtschutz durch eine Styroporbox zur Vermeidung von Hintergrundfluoreszenz wurden die Spuren des Fettstiftes mit Xylol-getränkten Wattestäbchen (NOBA Verbandmittel Danz, Wetter, Deutschland) entfernt. Die Präparate wurden mit dem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) enthaltenden wasserbasierten Medium Roti-Mount FluorCare DAPI (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) beträufelt, mit Deckgläschen versehen und, weiterhin vor Licht geschützt, über Nacht unter dem Abzug trocknen gelassen.

2.6.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit dem Mikroskop Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Tokio, Japan) wurden aus dem Bereich der CA1-Region der Präparate bei 100-facher Vergrößerung Bilder aufgenommen. Als Lampensystem diente das Nikon Intensilight c-hgfi (Nikon, Tokio, Japan). Die drei Fluoreszenz-Kanäle für DAPI, grün fluoreszierendes Protein (GFP) und rot fluoreszierendes Protein (RFP) wurden nacheinander eingestellt und die entsprechenden Bilder konnten danach mithilfe der Software NIS (Nikon, Tokio, Japan) überlagert werden.

2.7 Statistik

Die gewonnenen Daten wurden mithilfe der Software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, USA) statistisch ausgewertet. Dabei kam der zweiseitige t-Test mit ungepaarten Stichproben zum Einsatz.

Das Signifikanzniveau wurde standardmäßig auf $p < 0,05$ festgelegt. Signifikante Ergebnisse wurden in den Abbildungen mit einem Stern (*) gekennzeichnet; bei $p < 0,01$ erfolgte die Kennzeichnung mit zwei (**), bei $p < 0,001$ mit drei (***) Sternen. Alle Ergebnisse wurden als numerischer Mittelwert mit Standardfehler (SEM: *standard error of the mean*) angegeben. Die Variable n beschreibt die Anzahl der in den Test eingeschlossenen Gehirne oder Fotos.

Mithilfe des *Outlier Calculators* von GraphPad (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) wurden die Ergebnisse aller Gruppen auf potentielle statistische Ausreißer überprüft. Diese wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

2.8 Software

Tabelle 3 gibt Überblick über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendete Software.

Tabelle 3: Verwendete Software

Verwendete Software	Hersteller
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Stereo Investigator 7	MicroBrightField Bioscience, Williston, Vermont, USA
Motic Images ver.2.0	Motic, Wetzlar, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA
ImageJ 1.51w	Entwickelt von Wayne Rasband, open source (https://imagej.nih.gov/ij/download.html)
NIS-Elements Imaging Software	Nikon, Tokio, Japan

3 Ergebnisse

3.1 Neuronenzahl in der CA1-Region des Hippocampus

Mittels designbasierter Stereologie (siehe Abschnitt 2.3) wurde die Auswirkung von THC auf die Anzahl der Neurone und das Volumen der CA1-Region des Hippocampus untersucht.

Im Vergleich der ab einem Lebensalter von fünf Monaten mit THC (Mittelwert = 244000; SEM \pm 8320; n=11) und Vehikel (Mittelwert = 257300; SEM \pm 8418; n=11) behandelten, zum Testzeitpunkt konsumierenden Tieren fand sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Neurone (Abbildung 6 A; p=0,2733; zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben). Ebenfalls zeigte sich keine signifikante Änderung der Neuronenzahl in der im Alter von drei Monaten mit THC behandelten, zum Testzeitpunkt abstinenten Gruppe (Mittelwert = 260300; SEM \pm 8564; n=11) im Vergleich zur zum selben Zeitpunkt mit Vehikel behandelten Gruppe (Mittelwert = 260700; SEM \pm 10370; n=9; Abbildung 6 B; p=0,9721 im zweiseitigen t-Test).

Auch das Volumen der CA1-Region zeigte keine signifikante Änderung nach Gabe von THC. Weder bei den THC konsumierenden (Mittelwert = $2,818e+008 \mu\text{m}^3$; SEM \pm $1,482e+007 \mu\text{m}^3$; n=11) verglichen mit den Vehikel konsumierenden Mäusen (Mittelwert = $3,274e+008 \mu\text{m}^3$; SEM \pm $3,260e+007 \mu\text{m}^3$; n=11)(Abbildung 6 C; p=0,2169 im zweiseitigen t-Test), noch bei den zum Testzeitpunkt bereits zwei Monate von THC abstinenten (Mittelwert = $3,191e+008 \mu\text{m}^3$; SEM \pm $1,639e+007 \mu\text{m}^3$; n=11) verglichen mit den von Vehikel abstinenten Tieren (Mittelwert = $3,013e+008 \mu\text{m}^3$; SEM \pm $2,026e+007 \mu\text{m}^3$; n=9) bewirkte die sechswöchige tägliche intraperitoneale Gabe von 20 mg/kg KG THC einen signifikanten Effekt auf das CA1-Volumen (Abbildung 6 D; p=0,4986 im zweiseitigen t-Test).

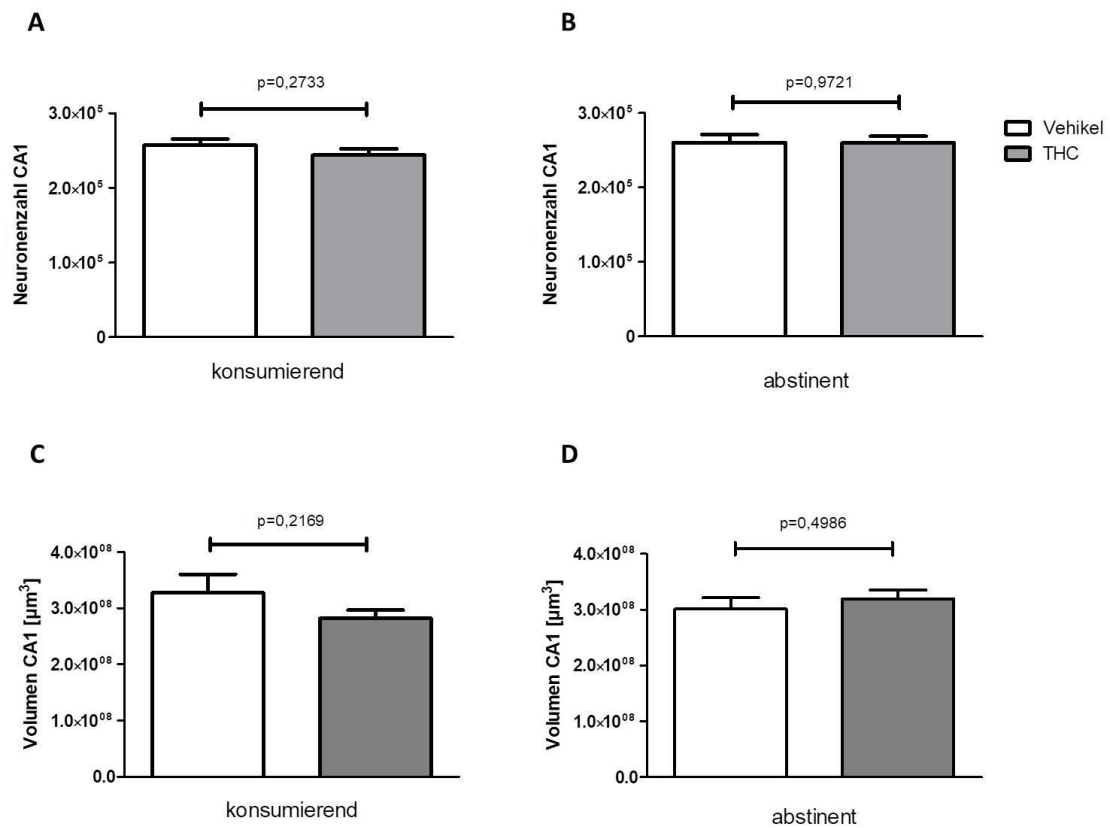


Abbildung 6: Keine signifikante Änderung der Neuronenzahl (**A, B**) und des Volumens (**C, D**) der CA1-Region von THC oder Vehikel konsumierenden sowie abstinenteren Mäusen. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. n=9-11 pro Gruppe. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Die untersuchten Gruppen bestanden aus weiblichen und männlichen Tieren. Signifikante durch das Geschlecht bedingte Effekte wurden durch zweiseitige t-Tests mit den jeweils entsprechend behandelten Gruppen ausgeschlossen.

3.2 Ausmaß der Neurogenese im Gyrus dentatus

Mithilfe von DCX als Marker für die adulte Neurogenese wurde die Auswirkung der Behandlung mit THC auf die Anzahl der neu gebildeten Neurone im Gyrus dentatus untersucht (siehe Abschnitt 2.4).

Im Vergleich der mit fünf Monaten mit THC (Mittelwert = 4788; SEM \pm 332.3; n=11) oder Vehikel (Mittelwert = 5616; SEM \pm 530.3; n=11) behandelten, konsumierenden Mäuse (Abbildung 7 B; p=0,2007 im zweiseitigen t-Test) sowie der im Alter von drei Monaten mit THC (Mittelwert = 6121; SEM \pm 440.0; n=11) bzw. Vehikel (Mittelwert = 5782; SEM \pm 339.7; n=10) behandelten, zum Testzeitpunkt abstinenteren Mäuse zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Anzahl DCX-positiver Neurone (Abbildung 7 C; p=0,5552 im zweiseitigen t-Test).

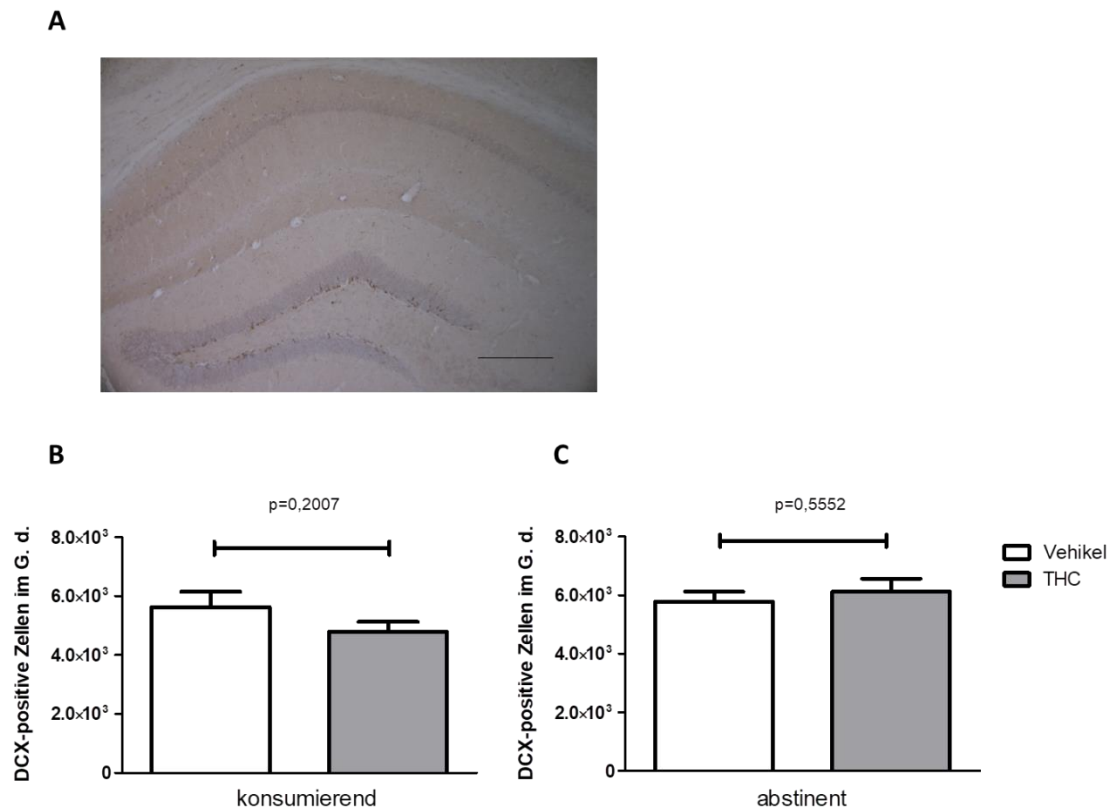


Abbildung 7: Beispielbild der Färbung mit DCX. Maßstab 200 μm (**A**). Keine signifikante Änderung der Anzahl DCX-positiver Neurone im Gyrus dentatus von THC oder Vehikel konsumierenden (**B**) sowie abstinenten Mäusen (**C**). Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=10-11$ pro Gruppe. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM. G.d. = Gyrus dentatus.

3.3 Expression von Cannabinoidrezeptoren und Markern der Neuroinflammation

Durch die graphische Auswertung bestimmter Regionen von immunhistochemisch angefärbten Gehirnschnitten (siehe Abschnitt 2.5) konnten Rückschlüsse auf die Stärke der Expression gewählter Marker gezogen werden. Verglichen wurden hier wiederum die im Alter von drei bzw. fünf Monaten mit THC behandelten Mäuse mit ihrer jeweiligen Vergleichsgruppe, die Vehikel erhalten hatte, wobei alle Tiere weiblich waren und jede Gruppe aus drei Tieren bestand.

3.3.1 Färbung des CB1-Rezeptors

Die Färbung des Cannabinoidrezeptors CB1 war bei den ab einem Lebensalter von fünf Monaten mit THC behandelten und direkt im Anschluss an die Behandlung getesteten Mäusen signifikant geringer ausgeprägt. In den untersuchten Cortexarealen betrug die gefärbte Fläche nach Gabe von THC (Mittelwert=14,80 %; SEM \pm 1,874 %; $n=27$) weniger als ein Siebtel der gefärbten Fläche nach Gabe von Vehikel (Mittelwert=100,0 %;

SEM \pm 6.455 %; n=27) (Abbildung 8 A, C, D; $p < 0,0001$ im zweiseitigen t-Test). Noch größer war der Effekt bei den konsumierenden Tieren im Hippocampus: Hier maß die gefärbte Fläche nach chronischer Behandlung mit THC (Mittelwert=5.483 %; SEM \pm 1.129 %; n=9) nur noch rund ein Zwanzigstel der Fläche, welche durch Färbung nach derselben Behandlung mit Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 13.29 %; n=9) resultierte. Wie auch im Cortex war ein signifikanter Abfall der CB1-Expression der mit THC behandelten Mäuse im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Artgenossen festzustellen (Abbildung 8 B, E, F; $p < 0,0001$ im zweiseitigen t-Test).

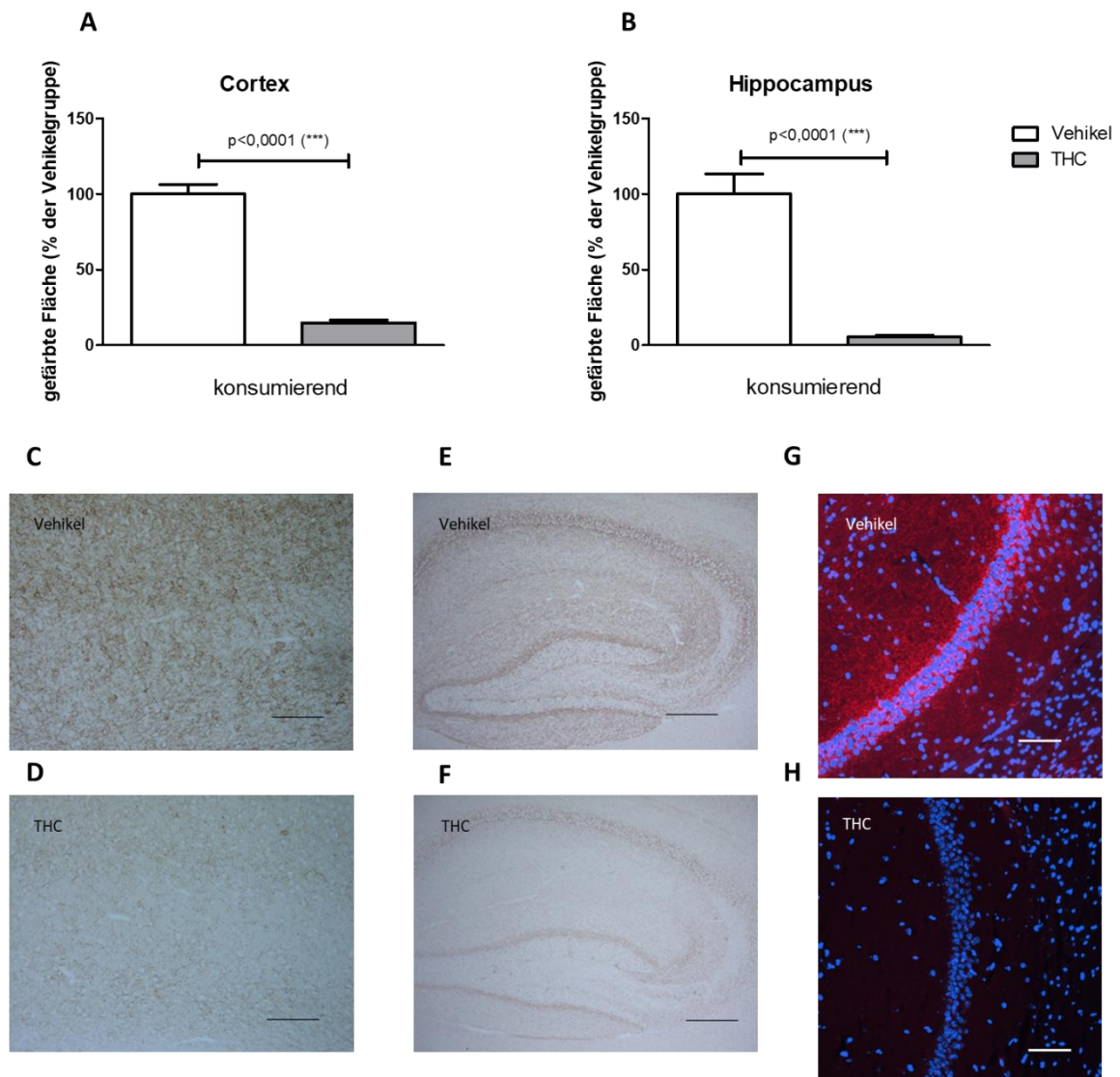


Abbildung 8: CB1 unmittelbar nach THC-Gabe signifikant geringer exprimiert im Cortex **(A)** sowie im Hippocampus **(B)**. Beispielbilder der Färbung des CB1-Rezeptors in Cortex **(C, D)** sowie Hippocampus **(E, F)** von THC oder Vehikel konsumierenden Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und CB1 (rot) im Hippocampus **(G, H)**. Maßstab 100 μ m **(C, D, G, H)** bzw. 200 μ m **(E, F)**. $p^{***} < 0,001$. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. n=27 pro Gruppe **(A)** bzw. n=9 pro Gruppe **(B)**. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Durch eine Immunfluoreszenzfärbung wurde der in der konsumierenden Gruppe beobachtete Effekt der THC-Gabe anhand eines Ausschnitts der CA1-Region eindrucksvoll sichtbar gemacht (Abbildung 8 G, H).

Die ab einem Alter von drei Monaten mit THC behandelten und nachfolgend abstinenten Mäuse exprimierten hingegen signifikant mehr CB1. Im Cortex war die gefärbte Fläche nach Abstinenz von THC (Mittelwert=134,4 %; SEM \pm 10,41 %; n=27) um ein Drittel größer als nach Abstinenz von Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 8,676 %; n=27) (Abbildung 9 A, C, D; p=0,0140 im zweiseitigen t-Test). Im Hippocampus konnte bei den abstinenten Tieren derselbe signifikante Effekt wie im Cortex beobachtet werden: Abstinenz nach THC-Gabe führte hier zu einer mehr als doppelt so großen gefärbten Fläche (Mittelwert=217,8 %; SEM \pm 33,24 %; n=9) wie diejenige nach entsprechender Behandlung mit Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 19,43 %; n=9) (Abbildung 9 B, E, F; p=0,0075 im zweiseitigen t-Test).

Mithilfe von Immunfluoreszenz ließ sich auch dieser Effekt der THC-Gabe nochmals deutlich visualisieren (Abbildung 9 G, H).

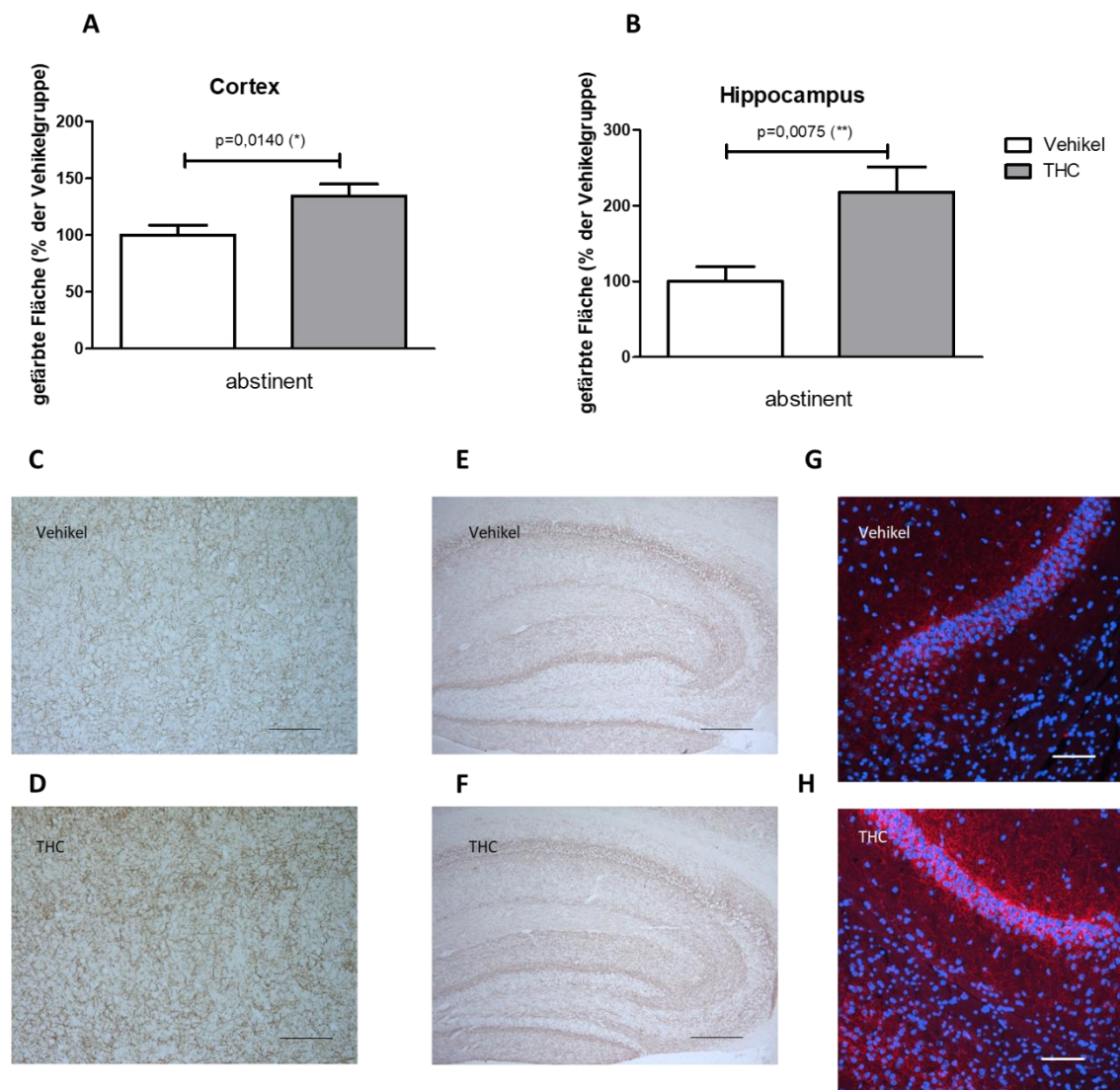


Abbildung 9: CB1 nach THC-Gabe und nachfolgender Abstinenzphase signifikant stärker exprimiert im Cortex (**A**) sowie im Hippocampus (**B**). Beispielbilder der Färbung des CB1-Rezeptors in Cortex (**C**, **D**) sowie Hippocampus (**E**, **F**) von THC- und Vehikel-abstinenten Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und CB1 (rot) im Hippocampus (**G**, **H**). Maßstab 100 μm (**C**, **D**, **G**, **H**) bzw. 200 μm (**E**, **F**). $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=27$ pro Gruppe (**A**) bzw. $n=9$ pro Gruppe (**B**). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

3.3.2 Färbung des astrozytären Proteins GFAP

Mit der Färbung gegen GFAP wurde evaluiert, ob die Astroglia nach chronischem THC-Konsum aktiviert oder in ihrer Aktivität gedämpft wird.

Die THC konsumierenden Tiere zeigten im Cortex unmittelbar nach der chronischen THC-Gabe (Mittelwert=74,42 %; SEM \pm 7,229 %; $n=27$) signifikant weniger Färbung von GFAP als nach Verabreichung von Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 7,521 %; $n=27$)

(Abbildung 10 A, C, D; $p=0,0391$ im zweiseitigen t-Test). Im Hippocampus konnte keine signifikante Änderung der Färbung von GFAP durch THC-Konsum nachgewiesen werden. Nach THC-Gabe zeigten die konsumierenden Mäuse eine nicht signifikant verminderte GFAP-Färbung (Mittelwert=86,39 %; SEM \pm 11,55 %; $n=9$) im Vergleich zur mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 18,23 %; $n=9$) (Abbildung 10 B, E, F; $p=0,5371$ im zweiseitigen t-Test).

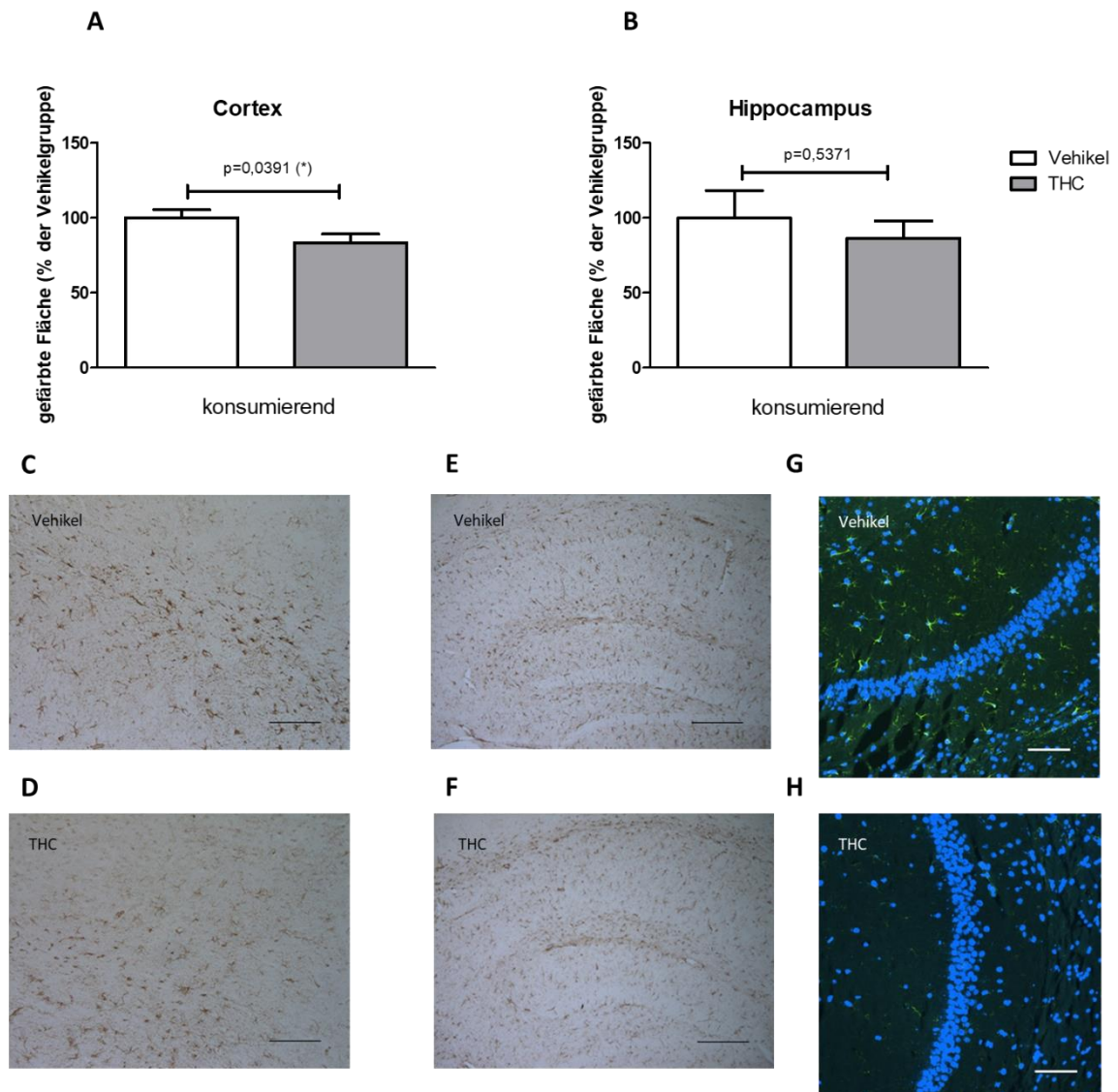


Abbildung 10: GFAP unmittelbar nach THC-Gabe signifikant geringer exprimiert im Cortex (**A**), nicht jedoch im Hippocampus (**B**). Beispielbilder der Färbung von GFAP in Cortex (**C**, **D**) sowie Hippocampus (**E**, **F**) von THC oder Vehikel konsumierenden Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und GFAP (grün) im Hippocampus (**G**, **H**). Maßstab 100 μ m (**C**, **D**, **G**, **H**) bzw. 200 μ m (**E**, **F**). $p^*<0,05$. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=27$ pro Gruppe (**A**) bzw. $n=9$ pro Gruppe (**B**). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

In der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigte sich nochmals die typische sternförmige Morphologie der durch GFAP markierten Astrozyten im Bereich der CA1-Region (Abbildung 10 G, H).

Auch bei den ab drei Monaten behandelten und anschließend abstinenten Tieren wurde GFAP im Cortex signifikant vermindert nachgewiesen nach Gabe von THC (Mittelwert=74.42 %; SEM \pm 7.229 %; n=27) im Vergleich zur entsprechend mit Vehikel behandelten Gruppe (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 7.521 %; n=27) (Abbildung 11 A, C, D; $p=0,0176$ im zweiseitigen t-Test). Im Hippocampus wiederum zeigte sich im Vergleich derselben Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression von GFAP: Bei den abstinenten Tieren fiel die GFAP-Färbung nach THC-Gabe (Mittelwert=80.98 %; SEM \pm 22.32 %; n=9) nicht signifikant geringer aus als nach Gabe von Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 8.910 %; n=8) (Abbildung 11 B, E, F; $p=0,4618$ im zweiseitigen t-Test).

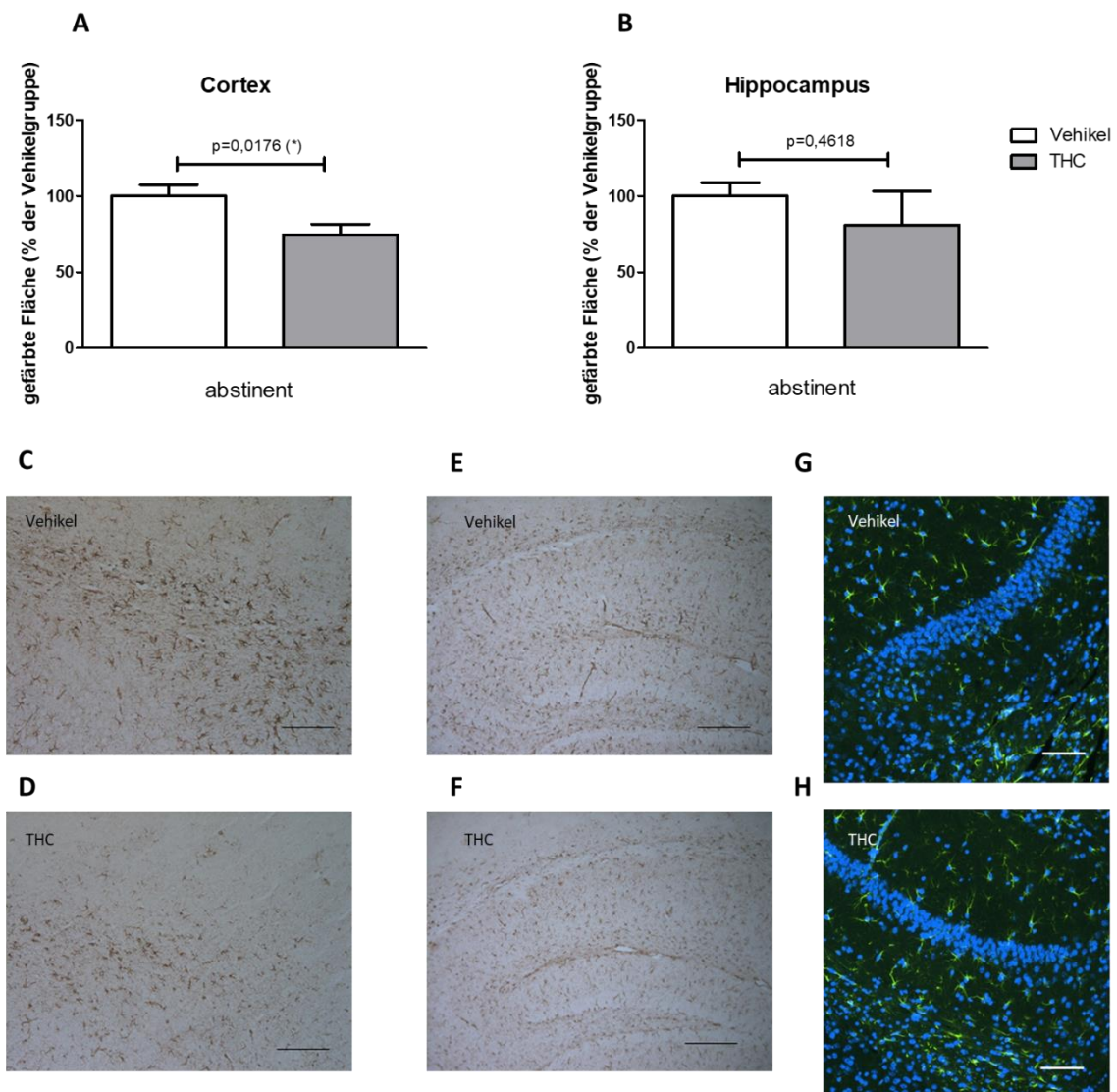


Abbildung 11: GFAP nach THC-Gabe und nachfolgender Abstinenzphase signifikant geringer exprimiert im Cortex **(A)**, nicht jedoch im Hippocampus **(B)**. Beispielbilder der Färbung von GFAP in Cortex **(C, D)** sowie Hippocampus **(E, F)** von THC- und Vehikel-abstinenten Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und GFAP (grün) im Hippocampus **(G, H)**. Maßstab 100 μm **(C, D, G, H)** bzw. 200 μm **(E, F)**. $p^* < 0,05$. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=27$ pro Gruppe **(A)** bzw. $n=9$ pro Gruppe **(B)**. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Die lokale Verteilung von GFAP im Bereich der CA1-Region ließ sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie ebenfalls darstellen (Abbildung 11 G, H).

3.3.3 Färbung des mikroglialen Markers IBA1

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen gegen das in Makrophagen und Mikroglia exprimierte Protein IBA1 wurde die reaktive Mikroglie in Cortex und Hippocampus nach THC-Behandlung untersucht.

Anders als für GFAP war für IBA1 bei den konsumierenden Tieren kein signifikanter Unterschied in der Färbung von IBA1 im Cortex zwischen denjenigen, die THC (Mittelwert=79.94 %; SEM \pm 4.483 %; n=27) und denjenigen, die Vehikel (Mittelwert=100.0 %; SEM \pm 10.36 %; n=27) erhalten hatten, zu verzeichnen (Abbildung 12 A, C, D; $p=0,0813$ im zweiseitigen t-Test). Bei den konsumierenden Testgruppen zeigte sich auch im Hippocampus kein signifikanter Unterschied der IBA1-Färbung zwischen der mit THC (Mittelwert=137.4 %; SEM \pm 17.58 %; n=9) und der mit Vehikel (Mittelwert=100.0 %; SEM \pm 17.53 % n=9) behandelten Gruppe (Abbildung 12 B, E, F; $p=0,1515$ im zweiseitigen t-Test).

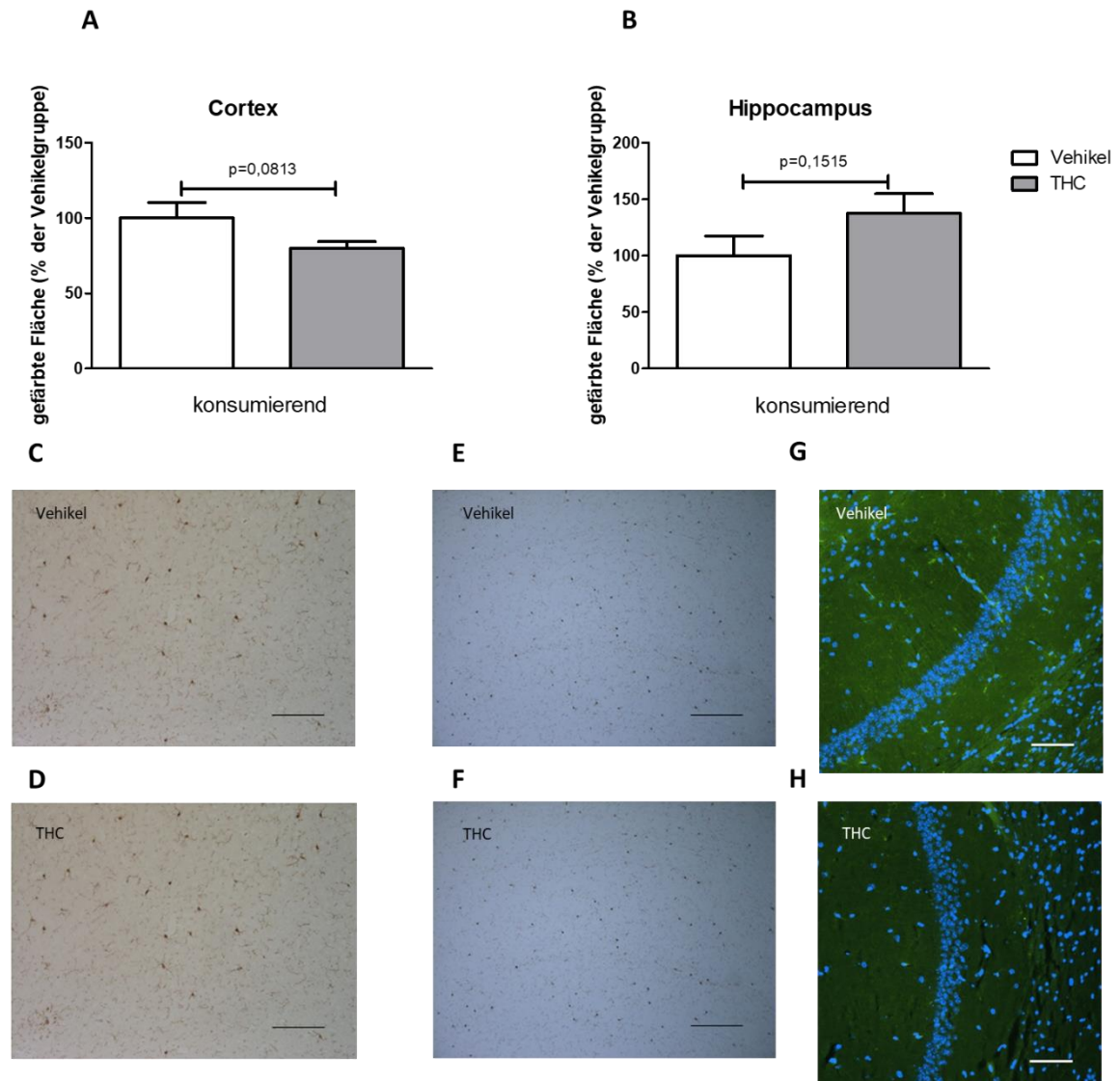


Abbildung 12: Kein signifikanter Effekt der THC-Gabe auf die IBA1-Expression in Cortex **(A)** sowie Hippocampus **(B)** unmittelbar nach Beendigung des chronischen Konsums. Beispielbilder der Färbung von IBA1 in Cortex **(C, D)** sowie Hippocampus **(E, F)** von THC oder Vehikel konsumierenden Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und IBA1 (grün) im Hippocampus **(G, H)**. Maßstab 100 μm **(C, D, G, H)** bzw. 200 μm **(E, F)**. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=27$ pro Gruppe **(A)** bzw. $n=9$ pro Gruppe **(B)**. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Bei den ab drei Monaten behandelten Mäusen wurde im Cortex eine signifikant höhere Expression gemessen, wenn THC (Mittelwert=158,7 %; SEM \pm 15,22 %; $n=27$) als wenn Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 14,36 %; $n=27$) gegeben wurde (Abbildung 13 A, C, D; $p=0,0071$ im zweiseitigen t-Test). Dieser signifikante Effekt bei den abstinenten Tieren ließ sich auch im Hippocampus feststellen: Die durch die DAB-Immunfärbung gegen IBA1 gefärbte Fläche war doppelt so groß nach Abstinenz von THC (Mittelwert=200,9 %; SEM \pm 31,63 %; $n=9$) wie nach Abstinenz von Vehikel (Mittelwert=100,0 %; SEM \pm 16,96 %; $n=9$) (Abbildung 13 B, E, F; $p=0,0126$ im zweiseitigen t-Test). THC-Gabe führte

demnach nur bei den abstinenten Mäusen zu einer Aktivierung von Mikroglia. Der Behandlungseffekt im Sinne einer Erhöhung der reaktiven Mikrogliose nach THC-Gabe in der abstinenten Gruppe könnte also möglicherweise durch den Entzug von THC bedingt sein.

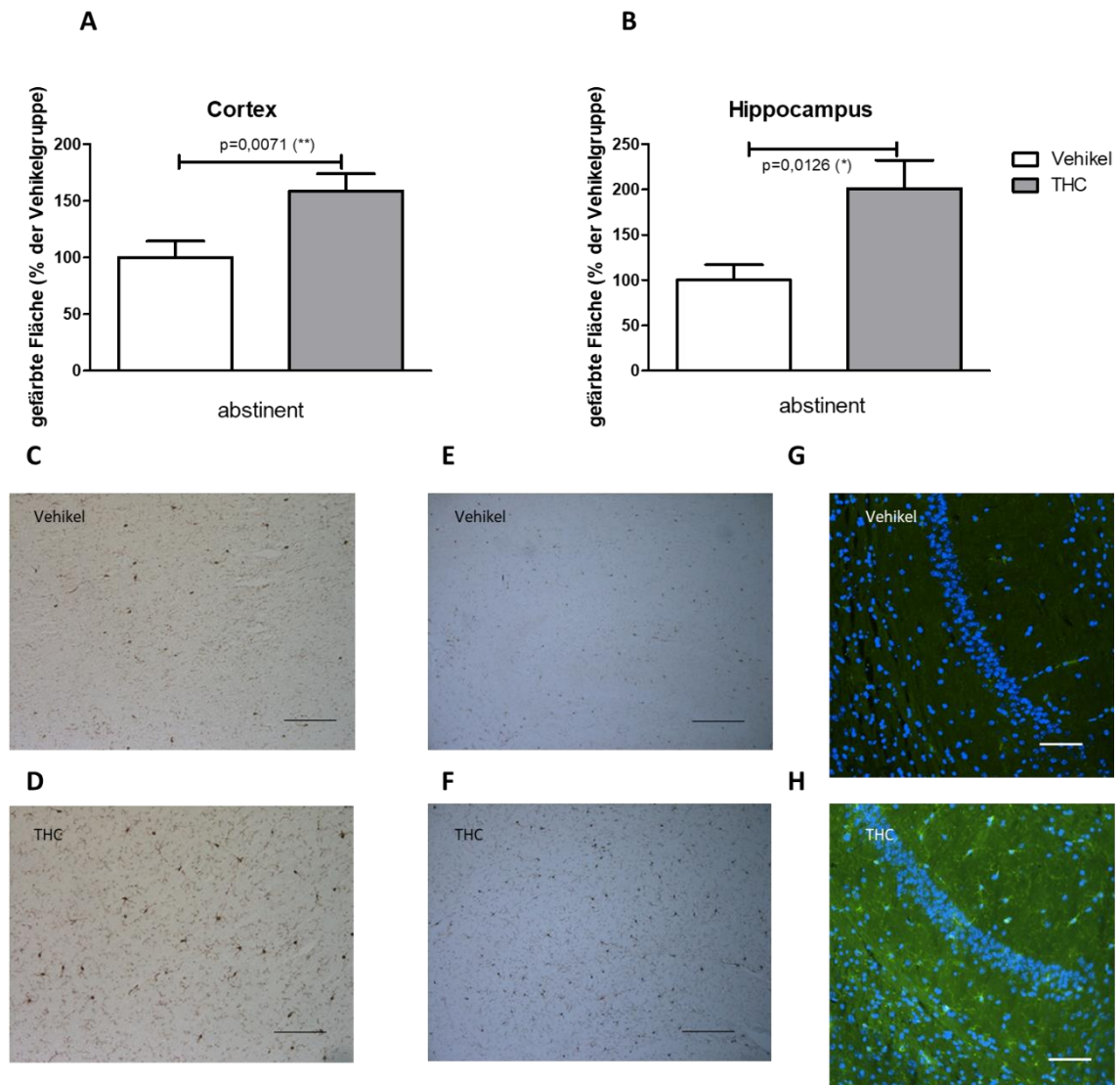


Abbildung 13: IBA1 nach THC-Gabe und anschließender Abstinentenphase signifikant stärker exprimiert im Cortex (A) sowie im Hippocampus (B). Beispielbilder der Färbung von IBA1 in Cortex (C, D) sowie Hippocampus (E, F) von THC- und Vehikel-abstinenten Mäusen. Immunfluoreszenzfärbung von Zellkernen (blau) und IBA1 (grün) im Hippocampus (G, H). Maßstab 100 μm (C, D, G, H) bzw. 200 μm (E, F). $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$. Zweiseitiger t-Test mit ungepaarten Stichproben. $n=27$ pro Gruppe (A) bzw. $n=9$ pro Gruppe (B). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

Der bei der DAB-Immunfärbung beobachtete signifikante Effekt im Hippocampus der abstinenten Tiere war auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar (Abbildung 13 G, H).

4 Diskussion

Um potentiell neurotoxische Auswirkungen chronischen THC-Konsums auf Neuronenzahl, adulte Neurogenese und Neuroinflammation im Hippocampus gesunder Wildtyp-Mäuse zu beobachten, wurden diese für 42 Tage täglich mit einer verhältnismäßig hohen THC-Dosis von 20 mg/kg KG intraperitoneal behandelt. Verglichen mit der maximal zulässigen Dosierungen bei der medizinischen Anwendung an Patienten beträgt diese von uns an Mäusen eingesetzte Dosis ein Vielfaches: Bei einer in Deutschland vorgeschriebenen Verschreibungshöchstmenge von 100 000 mg Cannabis für 30 Tage und einem maximalen THC-Gehalt der verschreibbaren Sorten von etwa 22 % beträgt die maximale tägliche Dosis für einen 70 kg schweren Menschen rund 10 mg/kg KG, wobei davon wiederum je nach Art des Konsums nur ein Bruchteil ins Blut aufgenommen wird (Müller-Vahl und Grotenhermen 2017). Durch die intraperitoneale Gabe wurde die genaue Einhaltung der Dosierung gewährleistet. Zum Beginn der Behandlung waren die Mäuse drei bzw. fünf Monate alt; die drei Monate alten Mäuse blieben nach Abschluss der sechswöchigen Behandlung noch für zwei Monate abstinent, bevor sie getötet wurden. Die fünf Monate alten Mäuse hingegen wurden direkt im Anschluss an die Behandlung getötet. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass zum Zeitpunkt des Todes alle Mäuse gleich alt waren, wodurch altersbedingte systematische Fehler ausgeschlossen wurden. Im Alter zwischen 70 und 450 Tagen werden Mäuse als adult betrachtet (Dutta und Sengupta 2016), sodass einerseits bei drei Monate alten Mäusen bereits sicher von einem vollständig ausgereiften Gehirn ausgegangen werden kann, andererseits aber auch am Ende der Behandlungsdauer noch keinerlei altersbedingte degenerative Prozesse des ZNS zu erwarten sind.

4.1 Auswirkungen von THC auf die hippocampale Neuronenzahl

Es sind insgesamt wenig Arbeiten über die Effekte von Cannabinoiden auf die Neuronenzahl veröffentlicht und so gut wie keine aus den letzten beiden Jahrzehnten. Ratten, die für 90 Tage mit einer oral verabreichten Dosis von 20 mg/kg THC an vier Tagen und 60 mg/kg am fünften Tag der Woche behandelt wurden, zeigten sieben Monate nach Beendigung dieser Behandlung morphologische Veränderungen im Hippocampus, die sich in kleineren Neuronen und reduzierter Synapsendichte in der CA3-Region bemerkbar machten (Scallet et al. 1987). Eine Dosierung von fünfmal wöchentlich 8 bis 10 mg/kg subkutan appliziertem THC für acht Monate führte zu verringerten Neuronenzahlen in der CA1-Region von behandelten Ratten (Landfield et al. 1988). In Konzentrationen von 0,5 bis 1 μ M zeigte THC zytotoxische Effekte auf Nervenzellkulturen aus dem Hippocampus von Ratten (Chan et al. 1998).

Im Widerspruch zu diesen vor über 20 Jahren gewonnenen Resultaten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe der Design-basierten Stereologie kein signifikanter

Neuronenverlust beobachtet werden: Die Mäuse, denen 42 Tage lang täglich eine Dosis von 20 mg/kg THC intraperitoneal verabreicht worden war, zeigten weder direkt noch zwei Monate nach Beendigung der Behandlung eine signifikante Reduktion der Neuronenzahl in der untersuchten Hirnregion. Allerdings wurde hier exemplarisch nur die CA1-Region ausgewertet; um einen hippocampalen Neuronenverlust durch chronischen THC-Konsum bei gesunden adulten Wildtyp-Mäusen mit größerer Sicherheit auszuschließen, müssten auch die übrigen Regionen des Hippocampus mit in Betracht gezogen werden.

In mehreren Magnetresonanztomographie-Studien mit Cannabis konsumierenden Menschen wurde ein im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziertes Hippocampusvolumen sowie eine verringerte Dichte der grauen Substanz gemessen; diese Veränderungen betrafen alle Regionen des Hippocampus und waren durch lange Abstinenz reversibel (Lorenzetti et al. 2016; Yücel et al. 2016). Dabei war das Ausmaß der strukturellen Veränderung vom Verhältnis der Wirkstoffe THC und CBD abhängig: hohe THC-Konzentrationen führten zu stärkerer Volumenreduktion und Formänderung, während höhere CBD-Konzentrationen protektiv gegenüber den Veränderungen waren (Beale et al. 2018). Chye *et al.* fanden, dass diese morphologischen Veränderungen nur abhängige Konsumierende betraf (Chye et al. 2018).

Mit der hier angewandten Methode der Design-basierten Stereologie wurde hingegen keine signifikante Verringerung des Volumens der hippocampalen CA1-Region nach THC-Konsum festgestellt: weder die abstinenten, noch die konsumierenden Mäuse zeigten nach der 42-tägigen Behandlung mit täglich 20 mg/kg THC eine Änderung des CA1-Volumens. Um dieses Ergebnis in Bezug auf die in eine andere Richtung weisenden humanen Bildgebungsdaten zu überprüfen, wäre es erforderlich, den gesamten Hippocampus miteinzubeziehen und in weiteren Versuchen die Dosierung sowie den Behandlungszeitraum zu variieren.

4.2 Auswirkungen von THC auf die adulte Neurogenese

Die Auswirkungen von THC auf die adulte Neurogenese scheinen abhängig von Dosis und Dauer des Konsums zu sein: eine dreiwöchige orale Verabreichung einer wöchentlich gesteigerten THC-Dosis führte nicht zu signifikanten Änderungen der Zellproliferation im Gyrus dentatus (Kochman et al. 2006), während eine sechs Wochen gleichbleibende oral verabreichte THC-Dosis eine verringerte Vorläuferzellproliferation zur Folge hatte, die sich unter anderem in der Anzahl DCX-positiver Zellen zeigte, wobei die Überlebenszeit der Neurone unbeeinträchtigt blieb (Wolf et al. 2010). Im Gegensatz dazu beobachteten Suliman *et al.* bei jungen Ratten nach intraperitonealer Gabe von täglich 1,5 mg/kg THC für sieben bzw. 21 Tage einen signifikanten Anstieg der Marker aller Neurogenesephasen bei zugleich signifikant verbesserten Lern- und Gedächtnisfunktionen in den durchgeführten Verhaltensexperimenten (Suliman et al. 2018).

Unter der hier verwendeten verhältnismäßig hohen Dosis von 20 mg/kg THC für 42 Tage war keine signifikante Veränderung der Anzahl DCX-positiver Neurone festzustellen. Um sicherzugehen, dass chronischer THC-Konsum die adulte Neurogenese tatsächlich nicht beeinträchtigt, müssten allerdings weitere Marker zur Beurteilung herangezogen werden: DCX wird von der Differenzierungs- bis zur Integrationsphase exprimiert (Bohlen und Halbach 2007); insbesondere müssten daher GFAP und Nestin als Marker der frühen Phasen der adulten Neurogenese noch zusätzlich untersucht werden.

4.3 Auswirkungen von THC auf die CB1-Expression

Es ist oftmals beschrieben worden, dass der Konsum von THC zu einer verringerten Expression des CB1-Rezeptors in sämtlichen Hirnregionen führt (Sim-Selley 2003; Farquhar et al. 2019). Die Verringerung im Hippocampus von Ratten, die fünf Tage lang täglich 10 mg /kg THC intraperitoneal erhalten hatten, betrug etwa 39 % im Gyrus dentatus, rund 46 % in CA1, CA2 und CA4, und über 50 % in der CA3-Region (Romero et al. 1997). Mäuse, die für fünfeinhalb Tage zweimal täglich eine Dosis von 20 mg/kg THC intraperitoneal verabreicht bekommen hatten, zeigten signifikant niedrigere CB1-Expressionslevel im Cerebellum (Cutando et al. 2013).

Im Einklang mit diesen Beobachtungen zeigte die Gruppe von Mäusen, die in unserem Experiment die aktuellen THC-Konsumenten darstellt, eine signifikant niedrigere CB1-Expression im Hippocampus, verglichen mit ihrer Kontrollgruppe. Die Gruppe der ehemaligen Konsumenten, bestehend aus Mäusen, die zwei Monate nach Beendigung der Behandlung mit THC getestet wurden, fiel hingegen durch signifikant höhere CB1-Expression gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe auf, was ein Hinweis auf eine Stimulierung der CB1-Expression durch THC-Abstinenz sein könnte.

Mithilfe von Positronen-Emissions-Tomographie durchgeführte Messungen zeigen, dass CB1 auch im menschlichen Gehirn nach chronischem Cannabiskonsum herabreguliert wird (Weinstein et al. 2016). Abstinenz führte in allen von dieser Veränderung betroffenen Hirnregionen zur Regeneration der CB1-Expression auf das Niveau der Kontrollgruppe; nicht jedoch im Hippocampus: dort blieb CB1 auch nach der Abstinenzphase herabreguliert (Hirvonen et al. 2012). Um die Mechanismen der Abhängigkeit und Abstinenz von Cannabis zu verstehen, wird weitere Forschungsarbeit nötig sein. Außerdem muss noch aufgeklärt werden, in welchem zeitlichen Rahmen mit Reversibilität der molekularen und behavioralen Änderungen durch chronischen Cannabiskonsum zu rechnen ist.

4.4 Auswirkungen von THC auf die Neuroinflammation

Die Effekte von THC auf neuroinflammatorische Prozesse sind vielfältig und scheinen von mehreren Faktoren abzuhängen, darunter Geschlecht, Dosierung, Hirnregion,

Vorschädigung und Entwicklungsalter. THC-Gabe in der prä- und postnatalen Entwicklung führt zu verminderter Expression von GFAP und gestörter Reifung von Astrozyten im Cerebellum (Suárez et al. 2002). Bei männlichen Ratten führte eine Behandlung mit THC während der Adoleszenz zu einem andauernden inflammatorischen Zustand des Hippocampus mit erhöhtem GFAP-Level (Zamberletti et al. 2016). Adoleszente Ratten, die 2,5 bis 40 mg/kg THC intraperitoneal für 18 Tage erhalten hatten, zeigten als adulte Tiere in der Immunfixation eine vermehrte Färbung von GFAP, die Männchen zugleich auch von IBA1, die Weibchen hingegen zeigten eine verringerte Anfärbung von IBA1 (Lopez-Rodriguez et al. 2014).

Rubino et al. (2009) beobachteten bei adulten Ratten nach THC-Gabe eine verringerte Immunfärbung gegen GFAP im Hippocampus und brachten diese in Verbindung mit den in Verhaltensexperimenten sichtbaren Verschlechterungen des räumlichen Erinnerungsvermögens, indem sie eine Verringerung der synaptischen Kontakte postulierten.

In einem Tiermodell der Huntington-Erkrankung bewirkte eine Kombination aus THC und CBD einen Rückgang der durch Malonat verursachten Astrozytose und der Aktivierung von Mikroglia, welcher sich durch eine geringere IBA1- und GFAP-Expression bemerkbar machte (Valdeolivas et al. 2012). Dieselbe Kombination pflanzlicher Cannabinoide führte in einem Mausmodell einer komplexen frontotemporalen Demenzform zu geringer GFAP- und IBA1-Expression in Hippocampus und Cortex (Casarejos et al. 2013). Auch die durch Metamphetamingabe erhöhte GFAP-Immunreaktivität ließ sich bei Ratten durch Vor- und Nachbehandlung mit 1 bzw. 3 mg/kg KG THC verringern (Castelli et al. 2014).

In dem hier durchgeführten Experiment mit adulten weiblichen Mäusen ohne neuronale Vorschädigung verringerte sich die GFAP-Immunfärbung nach 42-tägiger Behandlung mit täglich 20 mg/kg KG THC im Vergleich zur Behandlung mit Vehikel ebenfalls. Signifikant war der Effekt jedoch aufgrund der kleinen Zahl der Versuchsobjekte nur im Cortex, nicht hingegen im Hippocampus. Der zweimonatige Abstinenz-Zeitraum, den die eine Gruppe einhielt, bewirkte dabei keinen Unterschied in Richtung oder Stärke des Effekts.

Die IBA1-Färbung im Hippocampus und Cortex adulter weiblicher Mäuse fiel signifikant stärker aus nach THC-Behandlung und anschließender zweimonatiger Abstinenz als nach entsprechender Gabe von Vehikel. Bei den Mäusen, die direkt nach Beendigung des Konsums getötet worden waren, konnte kein signifikanter Unterschied zur mit Vehikel mitbehandelten Gruppe festgestellt werden.

Der regulierende Einfluss von Cannabinoiden auf Neuroinflammation und insbesondere auf die Aktivierung von Mikroglia scheint CB2-vermittelt zu sein. So führte der synthetische selektive CB2-Agonist JWH-133 in Mausmodellen sowohl der Alzheimer-Erkrankung (Martín-Moreno et al. 2012) als auch des ischämischen Schlaganfalls (Zarruk et al. 2012) zu einer verminderten Aktivierung von Mikroglia mit geringerer IBA1-

Expression, einhergehend mit Verbesserung der jeweiligen Symptome, und wirkte damit neuroprotektiv (Zarruk et al. 2012; Martín-Moreno et al. 2012).

An einem Modell für operationsbedingten Gedächtnisverlust wurde ebenfalls eine Symptomlinderung durch die neuroprotektive Wirkung von JWH-133 nachgewiesen (Sun et al. 2017). Dabei war die durch die Operation erhöhte Expression des CB2-Rezeptors im Hippocampus und präfrontalen Cortex nach postoperativer Gabe von JWH-133 am dritten und siebten Tag signifikant niedriger im Vergleich zur postoperativ mit Vehikel behandelten Kontrollgruppe (Sun et al. 2017). Derselbe Effekt auf die CB2-Expression trat bei einem Alzheimer-Mausmodell nach Gabe eines anderen CB2-Agonisten, *melanoma differentiation-associated 7* (MDA7), auf (Wu et al. 2013). Es wird angenommen, dass der Herabregulation des durch inflammatorische Reize hochregulierten CB2-Rezeptors ein negativer Feedback-Mechanismus zugrunde liegt (Wu et al. 2013; Sun et al. 2017).

Die THC zugeschriebene neuroprotektive Wirkung scheint hingegen unabhängig von CB2 zu sein. Die Blockade von CB1, nicht aber von CB2 verhinderte bei Mäusen die protektive Wirkung einer extrem niedrigen Dosis (0,002 mg/kg) THC gegenüber der durch Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) verursachten neuronalen Schädigung (Fishbein-Kaminietsky et al. 2014).

4.5 Ausblick

Das Endocannabinoidsystem ist regulierend an unzähligen physiologischen sowie pathophysiologischen Prozessen innerhalb und außerhalb des ZNS beteiligt. THC als Agonist an beiden Cannabinoidrezeptoren kommt daher als potentielles Heilmittel einer Vielzahl von insbesondere neurodegenerativ oder neuroinflammatorisch mitbedingten Erkrankungen infrage. Gleichzeitig hat es einen unbestreitbaren Stellenwert als Rauschmittel und birgt möglicherweise gesundheitliche Risiken. Um diese klar zu umreißen und THC gegebenenfalls als sicheres Medikament einsetzen zu können, müssen einige Details noch weiter aufgeklärt werden: Ab welcher Dosierung und in welchen Regionen es *in vivo* zu einem Neuronenverlust kommt; auf welche Phasen der Neurogenese sich THC-Konsum in welcher Dosierung auswirken könnte; über welche Rezeptoren und molekularen Mechanismen die Regulation neuroinflammatorischer Prozesse erfolgt; und inwieweit und in welchem zeitlichen Rahmen die durch THC hervorgerufenen strukturellen und funktionellen Änderungen nach Abstinenz reversibel sind. Dazu werden weitere Experimente mit einer Reihe verschiedener Dosierungen sowie unterschiedlich langen Behandlungs- und Abstinenzzeiträumen benötigt.

5 Zusammenfassung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, potentiell schädliche Effekte chronischen Cannabiskonsums auf Neuronenzahl, Neurogenese und Neuroinflammation anhand eines Mausmodells zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Gehirne gesunder adulter Wildtyp-Mäuse nach intraperitonealer Injektion von 20 mg/kg THC über 42 Tage und anschließender zweimonatiger Abstinenz bei der Hälfte der Tiere entnommen und für stereologische sowie immunhistochemische Analysen zur Verfügung gestellt.

Mithilfe von designbasierter Stereologie wurde die Gesamtneuronenzahl der CA1-Region des Hippocampus sowie deren Volumen ermittelt. Es ergaben sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen.

Als Marker für die adulte Neurogenese wurde DCX in einer *Free-floating*-Färbung immunhistochemisch angefärbt. Die Zählung der DCX-positiven Neurone im Gyrus dentatus zeigte keinen signifikanten Effekt des chronischen THC-Konsums.

Um neuroinflammatorische Effekte der THC-Behandlung auszuleuchten, wurde in weiblichen Gehirnen aller Behandlungsgruppen GFAP als Markerprotein der Astrozyten und IBA1 als Marker für die Mikroglia angefärbt. In der Analyse der von diesen Färbungen angefertigten mikroskopischen Bilder von Hippocampus und Cortex cerebri wurde eine Herabregulation des Astrozytenmarkers GFAP nach THC-Gabe sowohl mit als auch ohne nachfolgende Abstinenzphase sichtbar. Der Marker für aktivierte Mikroglia, IBA1, wurde nach THC-Gabe und anschließender Abstinenz signifikant stärker exprimiert. Die Färbung des CB1-Rezeptors zeigte die deutlichsten Unterschiede: Unmittelbar nach THC-Konsum war der Rezeptor stark herabreguliert, nach der zweimonatigen Abstinenzphase war er dagegen deutlich über das Maß der Kontrollgruppe hinaus hochreguliert.

Insgesamt ließ sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine direkte Neurotoxizität im Sinne eines hippocampalen Neuronenverlustes oder einer gestörten Neurogenese im Gyrus dentatus durch den verhältnismäßig intensiven THC-Konsum nachweisen. Dennoch weisen die Veränderungen in der Expression von CB1 sowie der Inflammationsmarker auf funktionelle Veränderungen des Gehirns nach THC-Exposition hin, die einerseits unter inflammatorischen Bedingungen neuroprotektiv wirken, auf der anderen Seite aber auch noch lange über den Zeitpunkt der Abstinenz hinaus die Homöostase des neuroglialen Netzwerkes beeinträchtigen könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53
- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I (2005): The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J* 19, 1704–1706
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV (2007): Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* 10, 1538–1543
- Altman J (1969): Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137, 433–457
- Altman J, Das GD (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319–335
- Andres-Mach M, Haratym-Maj A, Zagaja M, Rola R, Maj M, Chrościńska-Krawczyk M, Luszczki JJ (2015): ACEA (a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist) stimulates hippocampal neurogenesis in mice treated with antiepileptic drugs. *Brain Res* 1624, 86–94
- Ashton JC (2007): Cannabinoids for the treatment of inflammation. *Curr Opin Invest Drugs* 8, 373–384
- Baker D, Pryce G, Davies WL, Hiley CR (2006): In silico patent searching reveals a new cannabinoid receptor. *Trends Pharmacol Sci* 27, 1–4
- Beale C, Broyd SJ, Chye Y, Suo C, Schira M, Galettis P, Martin JH, Yücel M, Solowij N (2018): Prolonged Cannabidiol Treatment Effects on Hippocampal Subfield Volumes in Current Cannabis Users. *Cannabis Cannabinoid Res* 3, 94–107
- Bhardwaj RD, Curtis MA, Spalding KL, Buchholz BA, Fink D, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Gage FH, Druid H, Eriksson PS et al. (2006): Neocortical neurogenesis in humans is restricted to development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12564–12568
- Bouaboula M, Hilairat S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P (2005): Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 517, 174–181
- Breivogel CS, Childers SR (1998): The functional neuroanatomy of brain cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis* 5, 417–431

Buckley NE, McCoy KL, Mezey É, Bonner T, Zimmer A, Felder CC, Glass M, Zimmer A (2000): Immunomodulation by cannabinoids is absent in mice deficient for the cannabinoid CB2 receptor. *Eur J Pharmacol* 396, 141–149

Butti E, Bacigaluppi M, Rossi S, Cambiaghi M, Bari M, Cebrian Silla A, Brambilla E, Musella A, Ceglia R de, Teneud L et al. (2012): Subventricular zone neural progenitors protect striatal neurons from glutamatergic excitotoxicity. *Brain* 135, 3320–3335

Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993): Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337–344

Casarejos MJ, Perucho J, Gomez A, Muñoz MP, Fernandez-Estevéz M, Sagredo O, Fernandez Ruiz J, Guzman M, Yebenes JG de, Mena MA (2013): Natural cannabinoids improve dopamine neurotransmission and tau and amyloid pathology in a mouse model of tauopathy. *J Alzheimers Dis* 35, 525–539

Castelli MP, Madeddu C, Casti A, Casu A, Casti P, Scherma M, Fattore L, Fadda P, Ennas MG (2014): Δ^9 -tetrahydrocannabinol prevents methamphetamine-induced neurotoxicity. *PLoS ONE* 9, e98079

Chan GC-K, Hinds TR, Impey S, Storm DR (1998): Hippocampal Neurotoxicity of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *J Neurosci* 18, 5322–5332

Chye Y, Lorenzetti V, Suo C, Batalla A, Cousijn J, Goudriaan AE, Jenkinson M, Martin-Santos R, Whittle S, Yücel M et al. (2018): Alteration to hippocampal volume and shape confined to cannabis dependence: A multi-site study. *Addict Biol* 24, 822–834

Compagnucci C, Di Siena S, Bustamante MB, Di Giacomo D, Di Tommaso M, Maccarrone M, Grimaldi P, Sette C (2013): Type-1 (CB1) cannabinoid receptor promotes neuronal differentiation and maturation of neural stem cells. *PLoS ONE* 8, e54271

Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn H-G, Aigner L (2005): Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci* 21, 1–14

Cutando L, Busquets-García A, Puighearnal E, Gomis-González M, Delgado-García JM, Gruart A, Maldonado R, Ozaita A (2013): Microglial activation underlies cerebellar deficits produced by repeated cannabis exposure. *J Clin Invest* 123, 2816–2831

Daneman R, Prat A (2015): The blood-brain barrier. *CSH Perspect Biol* 7, a020412

de Pittà M, Brunel N, Volterra A (2016): Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience* 323, 43–61

Demuth DG, Molleman A (2006): Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78, 549–563

Devane WA, Dysarz 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 RG, Stevenson LA, 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
- Downer EJ (2011): Cannabinoids and innate immunity: Taking a toll on neuroinflammation. *Sci World J* 11, 855–865
- Dutta S, Sengupta P (2016): Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* 152, 244–248
- Eng LF (1985): Glial fibrillary acidic protein (GFAP): The major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J Neuroimmunol* 8, 203–214
- 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
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J (2014): Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156, 1072–1083
- Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (2018): Drogenangebot in Europa (EMCDDA). Europäischer Drogenbericht 2018: Trends und Entwicklungen. Amt für Veröffentlichungen der Europäischen Union, Luxemburg 2018
- Farquhar CE, Breivogel CS, Gamage TF, Gay EA, Thomas BF, Craft RM, Wiley JL (2019): Sex, THC, and hormones: Effects on density and sensitivity of CB1 cannabinoid receptors in rats. *Drug Alcohol Depen* 194, 20–27
- Fishbein-Kaminietsky M, Gafni M, Sarne Y (2014): Ultralow doses of cannabinoid drugs protect the mouse brain from inflammation-induced cognitive damage. *J Neurosci Res* 92, 1669–1677
- Forrester JV, McMenamin PG, Dando SJ (2018): CNS infection and immune privilege. *Nat Rev Neurosci* 19, 655
- Gao Y, Vasilyev DV, Goncalves MB, Howell FV, Hobbs C, Reisenberg M, Shen R, Zhang M-Y, Strassle BW, Lu P et al. (2010): Loss of retrograde endocannabinoid signaling and reduced adult neurogenesis in diacylglycerol lipase knock-out mice. *J Neurosci* 30, 2017–2024
- Gaoni Y, Mechoulam R (1964): Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 86, 1646–1647
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER et al. (2010): Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845
- Gong J-P, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu Q-R, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR (2006): Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071, 10–23

- Griffin G, Fernando SR, Ross RA, McKay NG, Ashford MLJ, Shire D, Huffman JW, Yu S, Lainton JAH, Pertwee RG (1997): Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 339, 53–61
- Grotenhermen F, Müller-Vahl K (2012): The therapeutic potential of cannabis and cannabinoids. *Dtsch Arztebl Int* 109, 495–501
- Hickey WF (1991): Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1, 97–105
- Hirasawa T, Ohsawa K, Imai Y, Ondo Y, Akazawa C, Uchino S, Kohsaka S (2005): Visualization of microglia in living tissues using Iba1-EGFP transgenic mice. *J Neurosci Res* 81, 357–362
- Hirvonen J, Goodwin RS, Li C-T, Terry GE, Zoghbi SS, Morse C, Pike VW, Volkow ND, Huestis MA, Innis RB (2012): Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry* 17, 642–649
- Hoch E, Bonnet U, Thomasius R, Ganzer F, Havemann-Reinecke U, Preuss UW (2015): Risks associated with the non-medicinal use of cannabis. *Dtsch Arztebl Int* 112, 271–278
- Howlett AC (2002): The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Media* 68-69, 619–631
- Howlett AC (2005): Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 168, 53–79
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981): Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 577–580
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998): Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res* 57, 1–9
- Jiang W, Zhang Y, Xiao L, van Cleemput J, Ji S-P, Bai G, Zhang X (2005): Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest* 115, 3104–3116
- 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
- Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C (2009): Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. *J Neurosci Meth* 184, 115–118
- Kaur C, Pal I, Saini S, Jacob TG, Nag TC, Thakar A, Bhardwaj DN, Roy TS (2018): Comparison of unbiased stereological estimation of total number of cresyl violet stained neurons and parvalbumin positive neurons in the adult human spiral ganglion. *J Chem Neuroanat* 93, 30–37

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997): More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493
- Kochman LJ, dos Santos AA, Fornal CA, Jacobs BL (2006): Despite strong behavioral disruption, Delta9-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Brain Res* 1113, 86–93
- Landfield PW, Cadwallader LB, Vinsant S. (1988): Quantitative changes in hippocampal structure following long-term exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol: possible mediation by glucocorticoid systems. *Brain Res* 443, 47-62
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1993): Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2074–2077
- Lopez-Rodriguez AB, Llorente-Berzal A, Garcia-Segura LM, Viveros M-P (2014): Sex-dependent long-term effects of adolescent exposure to THC and/or MDMA on neuroinflammation and serotonergic and cannabinoid systems in rats. *Br J Pharmacol* 171, 1435–1447
- Lorenzetti V, Solowij N, Yücel M (2016): The Role of Cannabinoids in Neuroanatomic Alterations in Cannabis Users. *Biol Psychiatry* 79, e17-31
- Mackie K, Stella N (2006): Cannabinoid receptors and endocannabinoids: Evidence for new players. *AAPS J* 8, E298-306
- Martín-Moreno AM, Brera B, Spuch C, Carro E, García-García L, Delgado M, Pozo MA, Innamorato NG, Cuadrado A, Ceballos ML de (2012): Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J Neuroinflammation* 9, 8
- 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
- Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR (1995): Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50, 83–90
- Mechoulam R, Hanuš LO, Pertwee R, Howlett AC (2014): Early phytocannabinoid chemistry to endocannabinoids and beyond. *Nat Rev Neurosci* 15, 757–764
- Müller-Vahl K, 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

- Nieder Korn JY, Stein-Streilein J (2010): History and physiology of immune privilege. *Ocul Immunol Inflamm* 18, 19–23
- Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I (2006): Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J* 20, 2405–2407
- Paxinos G, Franklin KBJ: The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 2. Auflage; Academic Press, Amsterdam 2004
- Peacock A, Leung J, Larney S, Colledge S, Hickman M, Rehm J, Giovino GA, West R, Hall W, Griffiths P et al. (2018): Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction* 113, 1905–1926
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001): Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus. *J Neurosci* 21, 6706–6717
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C (2007): Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nat Rev Immunol* 7, 161–167
- Pertwee RG (1997): Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74, 129–180
- Piomelli D (2003): The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4, 873–884
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999): Neuroglial activation repertoire in the injured brain: Graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 30, 77–105
- Ransohoff RM, Perry VH (2009): Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119–145
- Romero J, Garcia-Palomero E, Castro JG, Garcia-Gil L, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ (1997): Effects of chronic exposure to Δ^9 -tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor binding and mRNA levels in several rat brain regions. *Mol Brain Res* 46, 100–108
- Rosen GD, Harry JD (1990): Brain volume estimation from serial section measurements: A comparison of methodologies. *J Neurosci Meth* 35, 115–124
- Rubino T, Realini N, Braidà D, Guidi S, Capurro V, Viganò D, Guidali C, Pinter M, Sala M, Bartsaghi R et al. (2009): Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19, 763–772

- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J et al. (2004): Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744
- Scallet AC, Uemura E, Andrews A, Ali SF, McMillan DE, Paule MG, Brown RM, Slikker W (1987): Morphometric studies of the rat hippocampus following chronic delta-9-tetrahydrocannabinol (THC). *Brain Res* 436, 193–198
- Schmitz C, Hof PR (2005): Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 130, 813–831
- Seifert G, Schilling K, Steinhäuser C (2006): Astrocyte dysfunction in neurological disorders: A molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7, 194–206
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001): Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372–376
- Sim-Selley LJ (2003): Regulation of cannabinoid CB1 receptors in the central nervous system by chronic cannabinoids. *Crit Rev Neurobiol* 15, 91–119
- Squire LR (2004): Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82, 171–177
- Streit WJ, Conde JR, Fendrick SE, Flanary BE, Mariani CL (2005): Role of microglia in the central nervous system's immune response. *Neurol Res* 27, 685–691
- Suárez I, Bodega G, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Rubio M, Fernández B (2002): Reduced glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase expression in astrocytes and Bergmann glial cells in the rat cerebellum caused by delta(9)-tetrahydrocannabinol administration during development. *Dev Neurosci* 24, 300–312
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995): 2-Arachidonoylglycerol: A possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 89–97
- Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R (2018): Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotox Res* 33, 402–411
- Sun L, Dong R, Xu X, Yang X, Peng M (2017): Activation of cannabinoid receptor type 2 attenuates surgery-induced cognitive impairment in mice through anti-inflammatory activity. *J Neuroinflammation* 14, 138
- Valdeolivas S, Satta V, Pertwee RG, Fernández-Ruiz J, Sagredo O (2012): Sativex-like combination of phytocannabinoids is neuroprotective in malonate-lesioned rats, an inflammatory model of Huntington's disease: Role of CB1 and CB2 receptors. *ACS Chem Neurosci* 3, 400–406

- Verkhatsky A, Nedergaard M, Hertz L (2015): Why are astrocytes important? *Neurochem Res* 40, 389–401
- von Bohlen und Halbach O (2007): Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329, 409–420
- Weinstein A, Livny A, Weizman A (2016): Brain Imaging Studies on the Cognitive, Pharmacological and Neurobiological Effects of Cannabis in Humans: Evidence from Studies of Adult Users. *Curr Pharm Des* 22, 6366–6379
- 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
- Whiting PF, Wolff RF, Deshpande S, Di Nisio M, Duffy S, Hernandez AV, Keurentjes JC, Lang S, Misso K, Ryder S et al. (2015): Cannabinoids for Medical Use: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA* 313, 2456–2473
- 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
- Wu J, Bie B, Yang H, Xu JJ, Brown DL, Naguib M (2013): Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiol Aging* 34, 791–804
- Yücel M, Lorenzetti V, Suo C, Zalesky A, Fornito A, Takagi MJ, Lubman DI, Solowij N (2016): Hippocampal harms, protection and recovery following regular cannabis use. *Transl Psychiatry* 6, e710
- Zamberletti E, Gabaglio M, Grilli M, Prini P, Catanese A, Pittaluga A, Marchi M, Rubino T, Parolaro D (2016): Long-term hippocampal glutamate synapse and astrocyte dysfunctions underlying the altered phenotype induced by adolescent THC treatment in male rats. *Pharmacol Res* 111, 459–470
- Zarruk JG, Fernández-López D, García-Yébenes I, García-Gutiérrez MS, Vivancos J, Nombela F, Torres M, Burguete MC, Manzanares J, Lizasoain I et al. (2012): Cannabinoid type 2 receptor activation downregulates stroke-induced classic and alternative brain macrophage/microglial activation concomitant to neuroprotection. *Stroke* 43, 211–219
- Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D (2003): Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17, 2750–2755

