

**Einfluss des Cannabinoidsystems auf die exzitotoxische  
neuronale Schädigung: Untersuchungen am Modellsystem  
NMDA geschädigter organotypischer hippocampaler  
Schnittkulturen (OHSC) der Ratte**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Susanne Kreutz  
aus Frankfurt  
(D30)

Frankfurt am Main 2007

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Horst-Werner Korf  
Prof. Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation: 29.8.2007

Für Marco und meine lieben Eltern Monika und Wilfrid

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Cannabinoidsystem.....	1
Entdeckung des endogenen Cannabinoidsystems (ECS) .....	1
Biosynthese und Metabolismus von endogenen Cannabinoiden .....	4
Intrazelluläre Signaltransduktion durch endogene Cannabinoide.....	6
Interzelluläre Kommunikation durch endogene Cannabinoide.....	7
Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems (ECS).....	8
1.2 Neuronale Degeneration.....	10
Primär- und Sekundärschaden .....	10
Die Rolle von Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Prozessen .....	12
1.3 Der Einfluss von Cannabinoiden auf Mikrogliazellen und Astrozyten .....	14
Cannabinoide und Mikrogliazellen.....	15
Cannabinoide und Astrozyten.....	16
1.4 Experimentelle Voraussetzungen.....	16
Die organotypische hippocampale Schnittkultur (OHSC) .....	16
1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	19
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>22</b>
2.1 Verwendete Chemikalien und Pufferlösungen .....	22
2.2 Versuchstiere .....	24
2.3 Vorbereitungen und Medienzusammensetzung zur Präparation und Kulti- vierung von Schnittkulturen .....	25
Präparations- und Kulturmedium.....	25
Herstellung der Agarblöcke .....	25
2.4 Herstellung der organotypischen hippocampalen Schnittkultur (OHSC) .....	25
Vorbereitung des Arbeitsplatzes.....	25
Präparation der OHSC.....	26
Markierung toter Neurone in der OHSC .....	27
Fixierung der OHSC .....	27

---

Darstellung von Mikrogliazellen in der OHSC .....	27
2.5 Gewinnung primärer Makrophagenkulturen aus der Rattenmilz.....	28
Isolation und Kultivierung von Milzmakrophagen .....	28
Migration kultivierter Milzmakrophagen in die OHSC.....	29
2.6 Primärkulturen von Mikrogliazellen und Astrozyten .....	29
Medien zur Präparation und Kultivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten .....	29
Gewinnung einer mikroglären und astrozytären Mischkultur .....	29
Isolierung von Mikrogliazellen .....	30
Isolierung von Astrozyten .....	30
2.7 Experimentelle Gruppen .....	31
Gruppeneinteilung der OHSC.....	31
Experimentelle Gruppen bei der Migration von Milzmakrophagen .....	33
Gruppeneinteilung von mikroglären und astrozytären Primärkulturen .....	34
2.8 Messung der TNF-alpha Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA .....	35
2.9 Datenanalyse und Auswertung.....	35
Bestimmung von Zellzahlen .....	35
Statistik .....	36
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1 Etablierung des Schädigungsmodells .....	37
3.2 Wirkung der Cannabinoide THC, AEA und 2-AG auf aktivierte Mikrogliazellen und degenerierende Neurone in NMDA geschädigten OHSC .....	38
3.3 Einfluss der CB1 und CB2 Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 auf aktivierte Mikrogliazellen und degenerierende Neurone in NMDA geschädigten OHSC .....	45
3.4 Funktionelle Bedeutung des abnormalen (abn) Cannabidiol Rezeptors für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA geschädigten OHSC .....	54
3.5 Funktionelle Bedeutung des WIN Rezeptors für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA geschädigten OHSC .....	60
3.6 Funktionelle Bedeutung von Palmitylethanolamin (PEA) für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA ge-	

---

schädigten OHSC .....	65
3.7 Die Infiltration von Milzmakrophagen in geschädigte OHSC und ihr Einfluss auf die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone .....	68
3.8 Regulation der TNF-alpha Freisetzung aus Mikrogliazellen und Astrozyten durch Cannabinoide.....	75
Freisetzung von TNF-alpha aus Mikrogliazellen .....	75
Freisetzung von TNF-alpha aus Astrozyten .....	77
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>82</b>
4.1 Vergleichende Analyse der Cannabinoide THC, AEA und 2-AG im Schädigungsmodell der OHSC .....	82
4.2 Der Einfluss von Makrophagen auf die neuroprotektiven Eigenschaften von THC, AEA und 2-AG in der OHSC.....	87
4.3 Pharmakologische Untersuchungen zur abnormaler (abn) Cannabidiol Rezeptor vermittelten Neuroprotektion in der OHSC.....	89
4.4 Pharmakologische Untersuchungen zur WIN Rezeptor vermittelten Neuroprotektion in der OHSC .....	91
4.5 Das Endocannabinoid PEA vermittelt seine neuroprotektiven Effekte in der OHSC möglicherweise über den PPAR-alpha Rezeptor .....	94
4.6 Cannabinoide beeinflussen die TNF-alpha Sekretion aus Mikrogliazellen und Astrozyten .....	98
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>105</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>124</b>

## 1 Einleitung

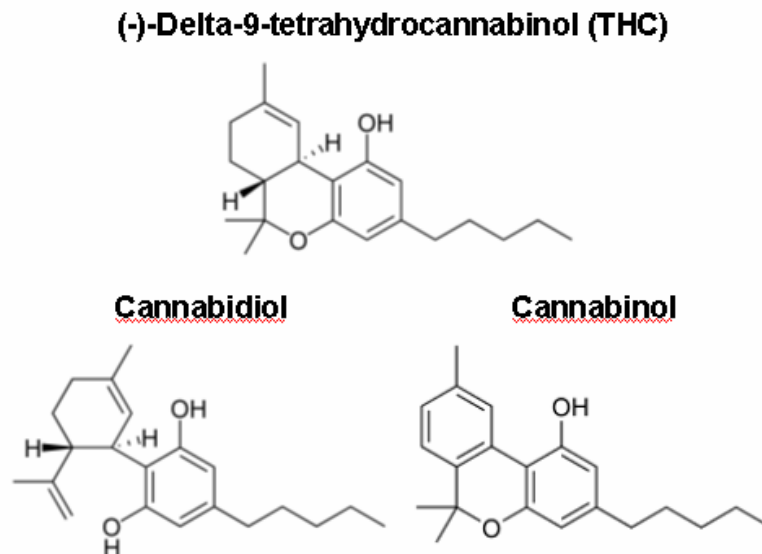
### 1.1 Das Cannabinoidsystem

#### Entdeckung des endogenen Cannabinoidsystems (ECS)

Zubereitungen aus der Hanfpflanze *Cannabis sativa* werden schon seit Jahrhunderten zu medizinischen Zwecken und zur Regeneration angewendet. Erste Aufzeichnungen hierzu stammen aus dem „Shen nung pen Ts'ao king“, einem Buch über Ackerbau und Heilpflanzen aus dem antiken China (ca. 300 v. Chr. bis 200 n. Chr.). Dort wurden solche Zubereitungen zur Therapie von Fieber, Rheuma und Malaria eingesetzt. In Europa dagegen wurde die Hanfpflanze anfangs hauptsächlich wirtschaftlich zur Herstellung von Kleidung und Papier genutzt. Erst vom Mittelalter an bis in die Neuzeit gibt es schriftliche Zeugnisse, die belegen, dass Zubereitungen der Hanfpflanze auch in Europa von zahlreichen Medizinern zu therapeutischen Zwecken aufgegriffen wurden. Im Jahre 1848 fanden schließlich Zubereitungen aus der Hanfpflanze in der Britischen Pharmakopoe Erwähnung. Die chemische Struktur von (-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), der psychoaktiven Komponente der Hanfpflanze, wurde im Jahre 1964 aufgeklärt. Heute weiß man, dass die Hanfpflanze neben der psychoaktiven Hauptkomponente THC etwa 65 weitere biologisch aktive Cannabinoide, so genannte Phytocannabinoide, enthält (Di Marzo et al. 2004). Als Beispiele seien hier die nicht psychoaktiven Substanzen Cannabidiol und Cannabinol erwähnt, die regulatorisch auf den Blutdruck wirken und inflammatorische Reaktionen des Immunsystems beeinflussen (Perez-Reyes et al. 1973). Erst im Jahre 1990 wurde mit dem Cannabinoid (CB)1 Rezeptor ein Rezeptormolekül für THC bei Säugetieren identifiziert (Matsuda et al. 1990). So ließ sich erstmalig belegen, dass THC seine psychotropen Effekte wie Gedächtnisstörungen und Verminderung der Schmerzwahrnehmung über den CB1 Rezeptor, welcher auf Neuronen in den für diese Aufgaben zuständigen Arealen des Gehirns vorzufinden ist, erzielt (Meng et al. 1998; Hampson und Deadwyler 2000; Huestis et al. 2001). Im Jahre 1993 wurde die molekulare Struktur eines weiteren Rezeptors für THC, des CB2 Rezeptors, aufgeklärt (Munro et al. 1993). In folgenden Untersuchungen zeigte sich, dass neben THC auch die Phytocannabinoide Cannabidiol und Cannabinol mit dem CB2 Rezeptor interagieren (Herring und Kaminski, 1999; Jarai et al. 1999; Malfait et al. 2000; Costa et al. 2004). Im Gegensatz zum CB1 Rezeptor ist der CB2

Rezeptor hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems vorzufinden. So lässt sich erklären, dass THC, Cannabidiol und Cannabinol die Pathogenese neuroinflammatorischer Erkrankungen wie Multiple Sklerose beeinflussen (Di Marzo et al. 2000a; Pertwee 2002; Walter und Stella 2004; Witting und Stella 2004).

**Abb. 1.1:** Strukturformeln der drei bekanntesten Phytocannabinoide.



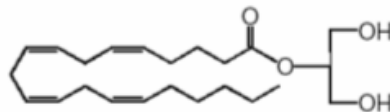
Um die Funktionen von CB Rezeptoren besser untersuchen zu können, wurden zwischenzeitlich synthetische Liganden für CB Rezeptor entwickelt. Mit deren Hilfe wurden neben den beiden klonierten CB1 und 2 Rezeptoren weitere CB Rezeptoren, bisher jedoch nur pharmakologisch, identifiziert (Mackie und Stella 2006). Allen CB Rezeptoren gemein ist ihre Zugehörigkeit zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vom  $G_{i/o}$ -Typ. Der sog. abnormale (abn) Cannabidiol Rezeptor wurde durch Einsatz des Agonisten abn Cannabidiol und der Antagonisten Cannabidiol und O-1918 auf Endothelzellen von Blutgefäßen nachgewiesen und ihm dort eine Funktion bei der Regulation des Blutdrucks über die Beeinflussung des intrazellulären Botenstoffes cyclo (c)GMP zugeschrieben (Jarai et al. 1999; Begg et al. 2003, Offertaler et al. 2003). Mit Hilfe des synthetischen Agonisten WIN 55,212-2 (mesylat) wurde ein CB Rezeptor im Hippokampus identifiziert, welcher die dortige glutamaterge Transmission herabreguliert (Hajos et al. 2001). Dieser Rezeptor wird durch weitere Agonisten wie CP55940 und Capsaizin aktiviert und durch hohe Dosen des CB1 Rezeptor Antagonisten SR141716A (Rimonabant) inhibiert, wie Studien an CB1 Rezeptor defizienten Mäusen belegen (Hajos und Freund 2002).



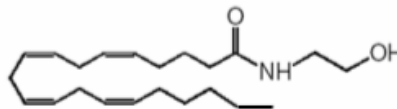
Die zahlreichen Interaktionen von Phytocannabinoiden und synthetischen Cannabinoiden mit entsprechenden CB Rezeptoren und die damit verbundenen Einflussmöglichkeiten auf physiologische Prozesse dieser exogenen Cannabinoide ließ die Frage aufkommen, ob bei Säugetieren und Menschen körpereigene, endogene Cannabinoide (EC) als Liganden für die dortigen CB Rezeptoren existieren. So wurden schließlich verschiedene Derivate der Arachidonsäure als endogene Liganden für CB Rezeptoren ausgemacht, von denen Arachidonylethanolamin (Anandamid, AEA; Devane et al. 1992) und 2-Arachidonylglycerin (2-AG; Mechoulam et al. 1995) mengenmäßig überwiegen und zurzeit am besten untersucht sind. Während AEA für den CB1 Rezeptor ein Partialagonist ist und am CB2 Rezeptor als ein schwacher Agonist fungiert, ist 2-AG an beiden Rezeptoren als Vollagonist wirksam (Howlett 2002).

**Abb. 1.2:** Strukturformel der am besten untersuchten endogenen Cannabinoide.

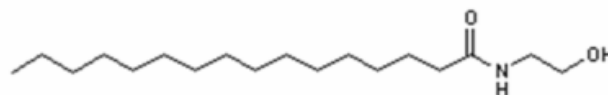
**2-Arachidonglycerin (2-AG)**



**Arachidonylethanolamin (AEA)**



**Palmitylethanolamin (PEA)**



Eine Sonderstellung unter den EC stellt das in Abb. 2 ebenfalls gezeigte Palmitylethanolamin (PEA), ein dem AEA chemisch sehr ähnliches Molekül, dar. Zwar wirkt PEA nicht als ein Agonist an den bisher beschriebenen CB1 und 2 Rezeptoren. Da für PEA jedoch eindeutig eine anti-entzündliche Wirkung beschrieben wurde, indem PEA beispielsweise mit der inflammatorischen Antwort assoziierte Schmerzen reduziert (Calignano et al. 1998; Jaggar et al. 1998; Lambert et al. 2002) und PEA auch weitere typische Effekte anderer EC vermittelt, wird es den EC zugerechnet. Momentan vermutet man, dass PEA als ein möglicher Agonist

am G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) 55 fungiert (Mackie und Stella 2006). Dieser auf Immunzellen lokalisierte Rezeptor könnte die anti-entzündlichen Eigenschaften des PEA vermitteln.

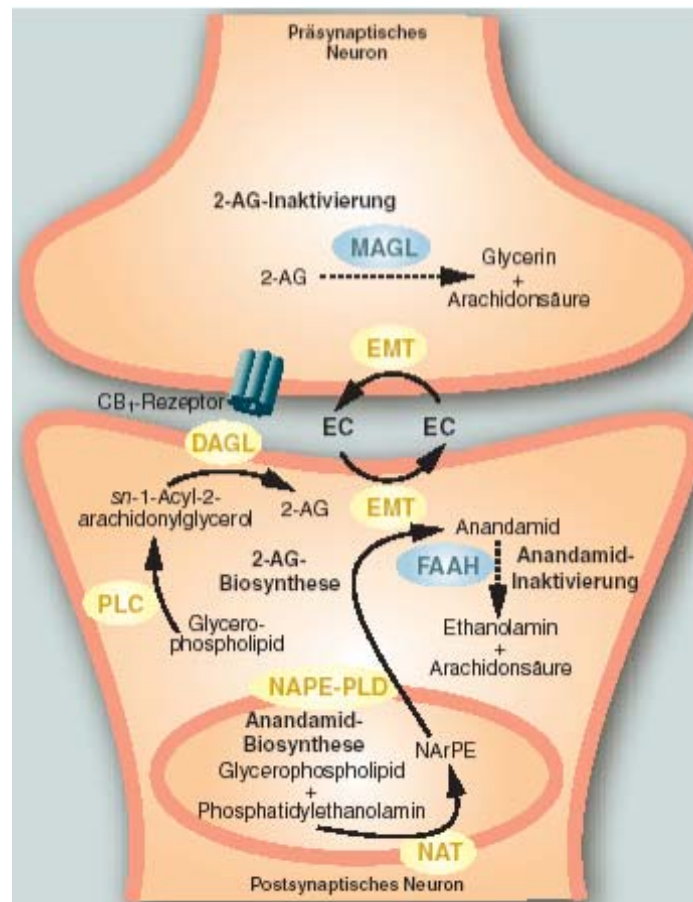
Zusammenfassend ist also festzustellen, dass das ECS mit seinen körpereigenen Liganden für die entsprechend spezifischen CB Rezeptoren bei Säugetieren an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt ist (Di Marzo et al. 2004). Ein im Fokus aktueller Forschungen stehendes Zielgewebe von EC ist das zentrale Nervensystem (ZNS). Dort ist eine hohe Dichte des CB1 Rezeptors auf Neuronen der Basalganglien, des Cerebellums, des Neokortex und des Hippokampus vorzufinden. Wirkungen von EC am CB2 Rezeptor sind hingegen hauptsächlich mit Zellen des Immunsystems wie Mikrogliazellen, Monozyten und T-Zellen assoziiert. Den Mikrogliazellen, die als die ortständigen Immunzellen des ZNS anzusehen sind, kommt eine immense Bedeutung bei pathologischen Veränderungen im ZNS zu. Da EC sowohl auf Neurone als auch auf Mikrogliazellen direkt einwirken können, sind Untersuchungen zum Verhalten dieser beiden unterschiedlichen Zelltypen nach einer Schädigung im ZNS im Zusammenhang mit dem ECS besonders interessant. Im nächsten Abschnitt soll jedoch zunächst zum besseren Verständnis des Vorkommens und der gezielten Bereitstellung von EC auf die Biosynthese und den Abbau von EC eingegangen werden.

### **Biosynthese und Metabolismus von endogenen Cannabinoiden**

EC vermitteln ihre Wirkungen über spezifische Signaltransduktionswege, die an eine Aktivierung von CB Rezeptoren gekoppelt sind (Howlett et al. 2002). Damit die EC ihre Wirkungen zeitlich und räumlich begrenzt entfalten können und so eine spezifische Reaktion auf die Cannabinoide gewährleistet werden kann, muss der Gehalt an EC durch spezifische enzymvermittelte auf- und abbauende Reaktionen gesteuert werden. Entsprechend ihrer stark lipophilen Eigenschaften werden EC nicht wie klassische Neurotransmitter in sekretorischen Vesikeln gespeichert, sondern bei Bedarf, sprich aktivitätsabhängig, aus Lipidvorläufern in der Zellmembran synthetisiert (Piomelli 2003). Die Synthese wird durch einen Anstieg der intrazellulären Konzentration von Kalziumionen und cAMP kontrolliert (Cadas et al. 1996). Im Falle des AEA kommt es zur kalziumabhängigen Aktivierung einer Acyltransferase (NAT), welche die Bildung des AEA Vorläufermoleküls *N*-arachidonylphosphatidylethanolamin (NArPE) katalysiert. NArPE wird anschließend

durch eine spezifische Phospholipase D in das fertige AEA umgewandelt. Im Gegensatz zur AEA Synthese führt der Anstieg von intrazellulären Kalziumionen bei der Bildung von 2-AG zur Aktivierung einer Phospholipase C, an die sich der letzte Syntheseschritt zum fertigen 2-AG, die Aktivierung der Diacylglycerinlipase (DAGL), anschließt. AEA und 2-AG werden nach ihrer Freisetzung in den extrazellulären Raum relativ rasch wieder abgebaut, wodurch ihre Wirkung an den CB Rezeptoren zeitlich begrenzt bleibt. Der Abbau erfolgt intrazellulär, wobei die passive Diffusion von EC zurück in die Zelle durch noch nicht gänzlich charakterisierte Membrantransporter unterstützt wird (Hermann et al. 2006). AEA wird durch die Fettsäureaminhydrolase (FAAH) und 2-AG durch die Monoacylglycerinlipase (MAGL) hydrolysiert (Piomelli 2003).

**Abb. 1.3:** Biosynthese und Abbau von AEA und 2-AG. Nähere Erläuterungen hierzu im obigen Text (verändert nach Di Marzo et al. 2004).

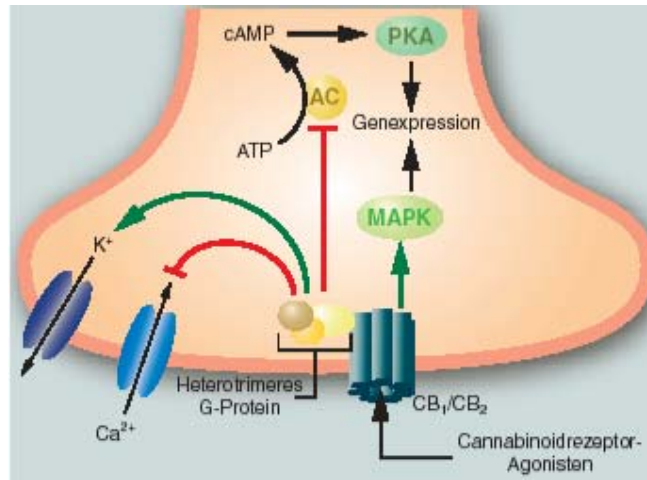


### **Intrazelluläre Signaltransduktion durch endogene Cannabinoide**

Durch die Aktivierung von CB Rezeptoren werden in den unterschiedlichen Zielzellen diverse Signaltransduktionswege moduliert (Childers 2006). So steuern EC beispielsweise Protein Kinase A (PKA) vermittelte Signalwege durch die Inhibierung der Adenylatcyclase (AC) oder sorgen für eine Aktivierung des Mitogen aktivierbare Proteinkinase (MAPK) Signalwegs, wodurch Einfluss auf die Expression von so genannten immediate early genes, in der Regel handelt es sich hier um die Transkriptionsfaktoren c-fos, c-jun und zif268, oder auf das Neurotrophin „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF) genommen wird (Mailleux et al. 1994). Eine Aktivierung des CB1 Rezeptors führt im Gehirn zur Hemmung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen, zur Aktivierung des einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals, zur Aktivierung der Phospholipase C oder zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (Howlett 2005). Interessanterweise bestehen im ZNS auch funktionelle Interaktionen zwischen dem CB1 Rezeptor und Rezeptoren klassischer Neurotransmitter wie dem Typ1-Orexin Rezeptor, dem 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)<sub>2</sub> Rezeptor und dem Dopamin<sub>2</sub> Rezeptor (Devlin und Christopoulos 2002; Hilairat et al. 2003; Kearns et al. 2005).

Im Gegensatz zum Gehirn, wo EC ihre Wirkungen in der Regel über den CB1 Rezeptor vermitteln, greifen EC im Immunsystem hauptsächlich am CB2 Rezeptor an (Walter und Stella 2004). Dadurch kommt es z. B. zur EC vermittelten Unterdrückung der entzündungsfördernden Botenstoffe Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha, Interleukin (IL)-1beta und IL-6 (Massi et al. 2006). Die Aktivierung von CB2 Rezeptoren führt ferner über die Hemmung der AC zur Inaktivierung der PKA und weiter abwärts in der Signalkaskade schließlich zur Einstellung NF-AT (nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten)- und AP-1 abhängiger Transkriptionsprozesse (Yea et al. 2002; Jan et al. 2002). Die hier aufgeführten Beispiele belegen somit, dass EC Einfluss auf eine große Bandbreite an Signalkaskaden nehmen können und somit im ZNS und Immunsystem eine Vielzahl regulativer Prozesse ansteuern.

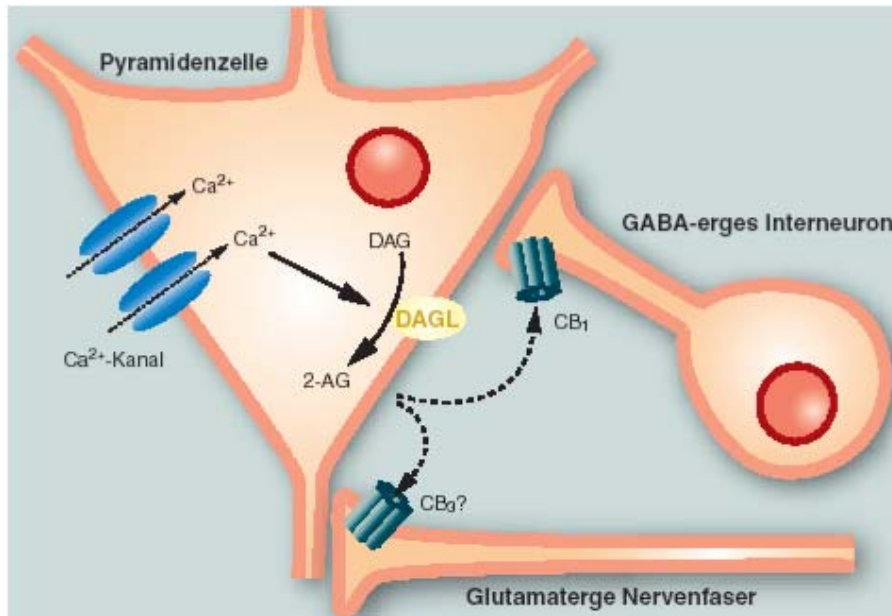
**Abb. 1.4:** Einflussmöglichkeiten von EC auf intrazelluläre Signalwege, die über eine Aktivierung von CB1 und 2 Rezeptoren möglich sind. Weitere Erläuterungen hierzu im obigen Text (verändert nach Di Marzo et al. 2004).



### Interzelluläre Kommunikation durch endogene Cannabinoide

EC beeinflussen nicht nur die Kommunikation innerhalb ihrer Zielzelle sondern sind ebenfalls in der Lage, die Weiterleitung von Informationen zwischen Nervenzellen zu steuern (Diana und Marty 2004). So kommt es nach Erregung eines postsynaptischen Neurons zur Depolarisation und zum Einstrom von Kalziumionen. Dadurch wird die Synthese von EC aktiviert (siehe oben). EC werden darauf in den synaptischen Spalt freigesetzt und gelangen rückwärts gerichtet zur Präsynapse, von der ursprünglich das postsynaptische Neuron aktiviert und zur EC Synthese veranlasst wurde. Dort binden die EC an zahlreich vorhandene CB<sub>1</sub> Rezeptoren. Deren Aktivierung hemmt schließlich die weitere Freisetzung entsprechender Neurotransmitter wie Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin, Serotonin, gamma-Aminobuttersäure (GABA), Glutamat oder Aspartat, welche jeweils für die ursprüngliche Depolarisation oder Hyperpolarisation an der Postsynapse verantwortlich waren (Piomelli 2003). Die in diesem gesamten Kreislauf im Mittelpunkt stehenden EC fungieren hier somit als rückwärtsgerichtete Botenstoffe, sog. „retrograde messenger“ (Wilson und Nicoll 2002). Neben ihrer Funktion als retrograde Neurotransmitter üben EC wahrscheinlich auch autokrine oder parakrine Effekte in Gliazellen, Adipozyten und Hepatozyten aus.

**Abb. 1.5:** Interzelluläre Kommunikation durch endogene Cannabinoide. Nähere Erläuterungen im obigen Text (verändert nach Piomelli 2003).



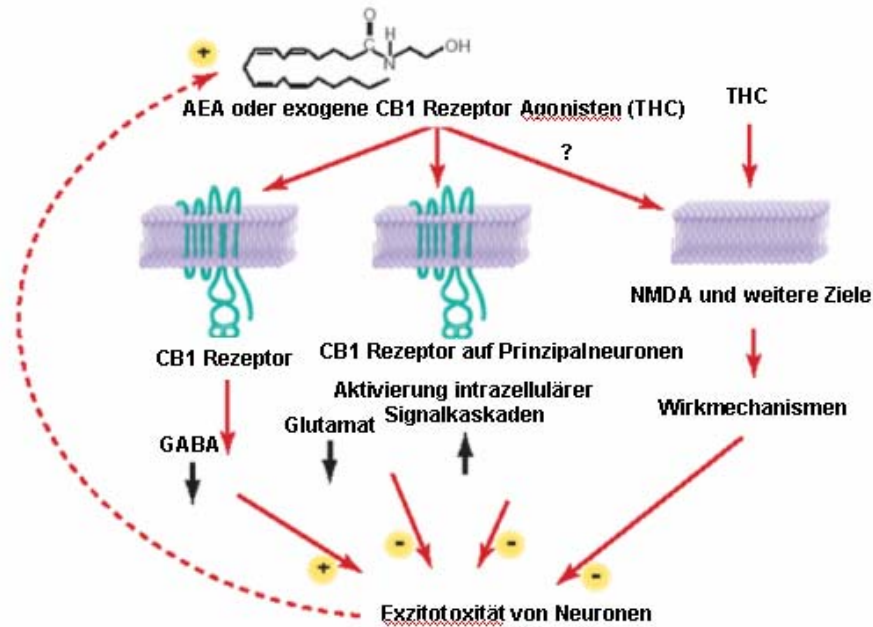
### **Physiologische und pathophysiologische Bedeutung des endogenen Cannabinoidsystems (ECS)**

Im gesunden Gewebe besteht die Hauptaufgabe des endogenen Cannabinoidsystems hauptsächlich in der Aufrechterhaltung physiologischer Basisprozesse, was anhand eines konstitutiven Grundgehalts an EC und an nur geringfügigen Konzentrationsschwankungen des EC-Gehalts belegt werden kann. Dagegen kommt es im Falle pathologischer Veränderungen zu drastischen und gewebespezifischen Veränderungen in den EC-Konzentrationen (Mackie und Stella 2006). Im gesunden ZNS sind EC an der Regulation synaptischer Plastizität und damit an der Regulation kognitiver Funktionen und Emotionen beteiligt (Wotjak 2005). So modulieren EC neuronale Schaltkreise in den entsprechenden Regionen des ZNS, wie der Amygdala, dem Neocortex und dem Hippokampus. Die bekannte Wirkverstärkung von Suchtmitteln durch exogen zugeführte Phytocannabinoide wie THC kann dadurch erklärt werden, dass das ECS in den obigen Regionen des Gehirns prinzipiell modulatorische Aktivitäten ausübt (Gerdeman et al. 2003). In den Basalganglien und im Cerebellum, Orten hoher CB<sub>1</sub> Rezeptor-Dichte, modulieren EC dopaminerge Neurotransmission und üben so Einfluss auf Bewegungskoordination und Körperhaltung beim Menschen aus (Van der Stelt und Di Marzo 2003). Darüber hinaus wirken EC in Bereichen des sensorischen und autonomen Nervensystems, so

dass Schmerzwahrnehmung, kardiovaskuläre und gastrointestinale Prozesse durch EC reguliert werden können (Iversen und Chapman 2002; Randall et al. 2002; Di Carlo und Izzo 2003). Auch in hypothalamischen Regionen sind EC bei der Regulation unterschiedlicher Regelkreise wie der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt (Kreutz et al. 2006). Im Gegensatz zu den im ZNS hauptsächlich am CB1 Rezeptor angreifenden EC ist die Aktivierung des CB2 Rezeptors häufig eng mit der Modulation der zellulären und humoralen Immunantwort verzahnt und besitzt daher eine enorme funktionelle Bedeutung für inflammatorische Prozesse (Klein 2005).

Eine besondere Rolle spielen EC bei Pathologien des ZNS, bei denen in der Regel ein massiver Verlust von Neuronen zu beobachten ist. In solchen Fällen sind beide Typen von CB Rezeptoren beteiligt. Über die primär neuronenspezifischen CB1 Rezeptoren nehmen EC direkt auf die einzelnen Neurone Einfluss. Der CB2 Rezeptor ist dagegen hauptsächlich auf Mikrogliazellen vorzufinden, einer Zellart, die dem Immunsystem zugehörig ist und bei krankhaften Veränderungen im Gehirn eine zentrale Rolle übernimmt. Über den CB2 Rezeptor können EC somit auch indirekt auf das Überleben von Neuronen und somit auf das Ausmaß des neuronalen Schadens Einfluss nehmen. So ist bekannt, dass EC sich hemmend auf die durch den Neurotransmitter Glutamat hervorgerufene erregende (exzitatorische) Neurotransmission auswirken und dadurch einer übermäßigen Aktivierung von Glutamat Rezeptoren entgegenwirken, welche sich schließlich schädlich auf Neurone auswirken könnte (Stella et al. 1997; Ameri et al. 1999; Misner und Sullivan 1999; Marsicano et al. 2003). Im Gegensatz hierzu steht allerdings die Tatsache, dass EC im Hippokampus auch die Neurotransmission des inhibitorischen Botenstoffes GABA herabsenken und dadurch eine exzitatorische Neurotransmission begünstigen (Hajos et al. 2000; Wilson et al. 2001; Mechoulam und Lichtman 2003). Generell weisen verschiedene Untersuchungen an Mäusen auf neuroprotektive Eigenschaften des Phytocannabinoids THC und der EC AEA und 2-AG hin (Panikashvili et al. 2001; Mechoulam et al. 2002; Marsicano et al. 2003). Da Untersuchungen zu neuroprotektiven Eigenschaften von Cannabinoiden auch im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen werden, soll nun im Folgenden auf prinzipielle Abläufe nach einer traumatischen neuronalen Schädigung eingegangen werden.

**Abb. 1.6:** Einfluss des ECS auf neuronale Schädigungsmechanismen. Weitere Erläuterungen im obigen Text (verändert nach Mechoulam und Lichtman 2003).



## 1.2 Neuronale Degeneration

### Primär- und Sekundärschaden

Als Folge traumatischer Schädigungen des ZNS kommt es im Rahmen des sog. Primärschadens unverzüglich zu einem Untergang von Nervengewebe. Dieser Prozess ist nach der ersten Stunde irreversibel. Hierauf folgt im weiteren Verlauf mehrerer Stunden bis hin zu 14 Tagen nach dem ursprünglichen traumatischen Ereignis eine weitere Zerstörung von Nervengewebe, welches durch die initiale Schädigung zunächst nicht beeinträchtigt war. Dieser Vorgang wird als Sekundärschaden bezeichnet (Blight 1985; Tator und Fehlings 1991; Young 1993). Der nach einem Trauma im ZNS auftretende Sekundärschaden resultiert aus einer Vielzahl toxischer Effekte, die durch unterschiedliche Prozesse hervorgerufen werden. Diese Prozesse werden durch verschiedene Zelltypen verursacht und bedingen die enorme Vergrößerung des ursprünglichen traumatischen Schadens. Der Zusammenbruch der Bluthirnschranke führt zu einem deutlich verstärkten Eindringen von immunkompetenten Zellen aus der Blutbahn in das Gehirn. Zusammen mit den ortständigen Immunzellen des ZNS, den Mikrogliazellen, beeinflussen die eindringenden Immunzellen im Verlauf des Sekundärschadens das Überleben von Neuronen. Zunächst soll jedoch auf einen weiteren im Mittelpunkt des



Sekundärschadens stehenden Prozess, die Exzitotoxizität, eingegangen werden. Unter einer exzitotoxischen Schädigung versteht man eine überschießende Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter, insbesondere Glutamat, die zum Zelltod führen kann. So wurde bereits im Jahre 1957 gezeigt, dass eine anhaltende Glutamatexposition retinale Neurone zerstören kann (Lucas und Newhouse 1957). Später zeigte sich, dass das Phänomen der Exzitotoxizität nicht nur auf das Glutamat beschränkt ist, sondern durchaus auch auf viele weitere exzitatorische Neurotransmitter zutrifft (Olney und Sharpe 1969). Mittlerweile gilt es als akzeptiert, dass die Exzitotoxizität die hauptsächliche Ursache sowohl des akuten als auch des verzögerten Neuronentods bei vaskulären, traumatischen und degenerativen Erkrankungen des ZNS darstellt (Choi 1988). Durch die exzitatorische Aminosäure Glutamat werden schließlich solche Faktoren hoch reguliert, die eine Sekundärschädigung manifestieren. So sind hauptsächlich der intrazelluläre Botenstoff Kalzium und der interzelluläre Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) für eine exzitotoxische Schädigung verantwortlich.

Unter besonderer Betrachtung der Exzitotoxizität lassen sich beim Sekundärschaden zwei Subformen des Zelltodes morphologisch unterscheiden: die Apoptose und die Nekrose (Majno und Joris 1995). Während sich die Nekrose durch einen auftretenden ATP-Mangel auszeichnet, welcher schließlich in einem Zusammenbruch membranständiger Ionenpumpen endet, erfordert die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, aktive zelluläre Prozesse wie z. B. die Proteinbiosynthese. Zwar schrumpft bei der Apoptose die betroffene Zelle, ihre Zellmembran bleibt während dieses Prozesses jedoch stets intakt. Ein nekrotischer Zelltod ist hingegen durch eine Anschwellung der Zelle gekennzeichnet, auf welche eine gesteigerte Membranpermeabilität und der Verlust zytoplasmatischer Bestandteile in den Extrazellulärraum folgt (Majno und Joris 1995). Als zentraler Mediator beider Prozesse gilt eine Gruppe von Proteasen, die als Caspasen (Cysteiny-l-aspartat-spezifische Proteinase) bezeichnet werden (Alnemri et al. 1996).

Die pathologisch gesteigerte Freisetzung von Glutamat führt zur übermäßigen Aktivierung des *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA) Rezeptors, wodurch es zu einem toxischen Einstrom von Kalziumionen in die Zelle kommt. Der Einstrom von Kalzium in die betroffenen Neurone geht mit einem massiven Einstrom von Natriumionen einher. Dadurch kommt es zu einer Depolarisation der Zelle. Nachfolgend strömt

Wasser in das Zellinnere und es kommt dadurch zu einer Schwellung des Neurons (Choi 1988). Der massive Kalziumeinstrom führt weiter zur Freisetzung von NO, welches als Zytotoxin die exzitotoxische Schädigung manifestiert (Garthwaite et al. 1988). Eine weitere Gruppe von Effektoren, die bei einer traumatischen Schädigungen eine wichtige Rolle spielen, sind die sog. immediate early genes, Transkriptionsfaktoren, welche relevante Gene während einer traumatischen Schädigung hoch regulieren. Stellvertretend seien hier c-fos, c-jun, jun-B und jun-D aufgeführt, deren Proteingehalt nach ischämischer oder traumatischer Schädigung stark zunimmt (Kießling et al. 1993; Hüll und Bähr 1994).

Der Verlauf des Sekundärschadens wird durch verschiedene Zelltypen beeinflusst. Dazu gehören die Gliazellen, welche sich in die zahlenmäßig überlegenen Astrozyten, die für die Ummantelung der Neurone mit Myelin zuständigen Oligodendrozyten und die ortständigen Immunzellen des ZNS, die Mikrogliazellen aufteilen. Hinzu kämen noch die aus der Blutbahn einwandernden Immunzellen. Zunächst wird an dieser Stelle auf die Effekte von Mikrogliazellen nach einer neuronalen Schädigung eingegangen.

### **Die Rolle von Mikrogliazellen bei neurodegenerativen Prozessen**

Mikrogliazellen repräsentieren 5-20% aller Gliazellen bei gesunden Menschen (Lawson et al. 1992). Im Jahre 1932 wurden erstmalig systematische Untersuchungen auf dem Gebiet der glialen Zellpopulation des ZNS durchgeführt und die Mikrogliazellen von anderen Gliazelltypen im ZNS unterschieden (Del Rio Hortega 1932). Mikrogliazellen entstammen der myelomonozytischen Zelllinie und sind daher Abkömmlinge des hämangioblastischen Mesoderms. Sie bevölkern das Parenchym des ZNS schon frühzeitig in der embryonalen Entwicklung. Ungefähr zum Zeitpunkt der Beendigung der Neurulation treten fetale Makrophagen, die als ursprünglichste Mikroglia-Vorläuferzellen gelten, im primitiven Neuroektoderm auf. Da zu diesem Zeitpunkt die Vaskularisierung dieses Gewebereichs noch nicht stattgefunden hat, können aus dem Blut stammende Monozyten als direkte Vorläufer der Mikrogliazellen ausgeschlossen werden (Streit 2001). Mikrogliazellen besitzen ein großes mitotisches Potential und sind somit zur Selbstvermehrung fähig. Daraus resultiert ein langsamer und kontinuierlicher Umsatz der Mikrogliazellen. Im adulten ZNS lassen sich 4 funktionelle Stadien der Mikrogliazellen unterscheiden (Streit et al. 1988; Wilson und Molliver 1994). Im gesunden ZNS findet man hauptsächlich die

ruhende Form der Mikrogliazellen vor, welche sich durch eine charakteristische Zellform mit einem kleinen Zellkörper und fein verzweigten, ramifizierten und sich in alle Richtungen ausdehnende Zellortsätze auszeichnet. Man spricht in diesem Falle von einer ramifizierten Mikrogliazelle, die in diesem Funktionszustand ihre Umgebung permanent nach biochemischen und bioelektrischen Veränderungen absucht (Kreutzberg 1996). Im Laufe krankhafter Veränderungen des ZNS, z. B. nach einem Trauma, induzieren geschädigte Neurone die Aktivierung der ruhenden, ramifizierten Mikrogliazellen (Heppner et al. 1998). Als Antwort auf Signale, die im extrazellulären Milieu des krankhaft veränderten ZNS auftreten, verändern nun aktivierte Mikrogliazellen nicht nur ihre Morphologie, sondern beginnen auch mit der Sekretion von Entzündungsmediatoren und der Phagozytose. Aufgrund eines veränderten Expressionsmusters lassen sich die aktivierten Mikrogliazellen mit Antikörpern gegen diverse für den Funktionszustand spezifische Markerproteine immunzytochemisch anfärben und dadurch von den ramifizierten Zellen unterscheiden. Das Ausmaß der Aktivierung variiert entsprechend des Schweregrades der neuronalen Schädigung. Leichte Schäden im ZNS führen zunächst zu einer sog. Hyperramifizierung, welche als ein Übergangszustand zwischen ruhender und aktivierter Form beschrieben wird (Wilson und Molliver 1994). Die Mehrzahl neuronaler Schädigungen führt jedoch zu einer vollständigen Aktivierung der Mikrogliazellen. Diese beinhaltet eine Hypertrophie des Zellkörpers sowie ein Zurückziehen der Zellfortsätze. Im Zuge einer weiter gesteigerten Aktivierung entsteht schließlich der vierte mögliche Funktionszustand der Mikrogliazellen, die rundliche, phagozytierende amöboide Mikrogliazelle. In diesem Funktionszustand phagozytieren sie abgestorbene Zellen und lassen sich von gewöhnlichen Makrophagen nicht mehr unterscheiden. Zu den morphologischen Veränderungen der Mikrogliazellen kommen weitere charakteristische Veränderungen nach einer Schädigung des ZNS hinzu. So beginnen Mikrogliazellen 2-3 Tage nach einer Schädigung im ZNS mit der Proliferation und einer enormen Umstellung ihres Genexpressionsmusters (Potucek et al. 2006). Es kommt zur Expression von immunphänotypischen Zelloberflächenmolekülen wie ICAM-1, MHC-I und MHC-II (Sawada et al. 2006). Außerdem wird die Expression des konstitutiv exprimierten CR3 Komplement Rezeptors auf der Oberfläche der Mikrogliazellen hochreguliert (Graeber et al. 1988). Durch diese Moleküle wird die Interaktion mit den immunkompetenten T-Zellen eingeleitet (Pazmany et al. 1999). Im weiteren Verlauf

kommt es nach neuronaler Schädigung zu einer verstärkten mikroglialen Produktion diverser Zytokine wie z. B. IL-1beta, IL-6, TNF-alpha und TNF-beta (Chabot et al. 1997; Lee J et al. 2002; Lee YB et al. 2002). Welches der Zytokine dabei überwiegt, hängt stark von der Art der erfolgten Schädigung ab (Streit et al. 1998). Beispielsweise ist die Freisetzung von IL-1beta und TNF-alpha nach einer Axotomie nur minimal hoch reguliert, wohingegen die Freisetzung dieser Zytokine nach einer traumatischen Schädigung des Rückenmarks sofort stark ansteigt (Bartholdi und Schwab 1997; Streit et al. 1998).

Vor dem Hintergrund, dass Oligodendrozyten nach einer Schädigung des ZNS keine auffälligen Reaktionen zeigen, stellen Astrozyten neben den bereits besprochenen Mikrogliazellen die zweite Gruppe reaktiver Gliazellen dar (Ludwin 1997). Diese beiden Zelltypen weisen in Einzelzell- und Doppelkulturexperimenten mannigfaltige Interaktionen auf. So wurde u. a. beobachtet, dass sich amöboide Mikrogliazellen in ramifizierte Zellen umbilden, wenn sie mit Astrozyten-konditioniertem Kulturmedium oder mit Astrozyten selbst kultiviert werden (Wilms et al. 1997). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Faktoren, die von Astrozyten gebildet und freigesetzt werden, die Proliferation von Mikrogliazellen regulieren (Giulian und Ingeman 1988; Malipiero et al. 1990; Sawada et al. 1990; Thery et al. 1992; Lee et al. 1992; Kloss et al. 1997). Astrozyten scheinen zudem die Produktion von NO durch Mikrogliazellen herabzuregulieren (Vincent et al. 1997, 1998). Außerdem modulieren Astrozyten mit Hilfe von Kalziumionen das Antwortverhalten der Mikrogliazellen in primären Zellkulturen und in Hirnschnitten (Verderio und Matteoli 2001; Schipke et al. 2002). ATP, das aus verletztem Gewebe austritt oder gezielt von Astrozyten freigesetzt wird, verändert über auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen lokalisierte ATPerge P2Y Rezeptoren den Funktionszustand und das Migrationsverhalten der Mikrogliazellen (Stella 2004). Umgekehrt können auch Mikrogliazellen den Funktionszustand von Astrozyten beeinflussen. So steuert das von Mikrogliazellen freigesetzte IL-1 die Proliferation von Astrozyten (Giulian et al. 1988).

### **1.3 Der Einfluss von Cannabinoiden auf Mikrogliazellen und Astrozyten**

Die Einflussmöglichkeiten des ECS auf Neurone unter physiologischen und pathologischen Zuständen wurden bereits erwähnt. Im Folgenden soll nun der

Einfluss von Cannabinoiden auf Mikrogliazellen und Astrozyten, insbesondere nach krankhaften Veränderungen des ZNS, skizziert werden.

### **Cannabinoide und Mikrogliazellen**

Um auf Cannabinoide adäquat reagieren zu können, müssen Mikrogliazellen mit CB Rezeptoren ausgestattet sein. Tatsächlich besitzen Mikrogliazellen funktionell aktive CB1- und 2 Rezeptoren (Facchinetti et al. 2003; Walter et al. 2003). So wurden CB1 Rezeptoren auf Mikrogliazellen von Schnecken, Mäusen und Ratten nachgewiesen. Allerdings wird dieser Rezeptor interessanterweise nicht auf humanen Mikrogliazellen exprimiert (Stella 2004). Bei Nagetieren sind CB1 Rezeptoren auch nur in geringer Anzahl auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen vorzufinden. Hauptsächlich ist der Rezeptor in intrazellulären Kompartimenten, wie dem rauen endoplasmatischen Retikulum und dem Golgiapparat der Mikrogliazellen lokalisiert (Walter et al. 2003). Der CB2 Rezeptor ist ebenfalls auf Mikrogliazellen vorhanden. Analog zu den Makrophagen in der Peripherie wird die Expression des CB2 Rezeptors auch auf Mikrogliazellen im ZNS stark vom örtlichen Gehalt an inflammatorischen Mediatoren beeinflusst. So verstärken entzündliche Veränderungen und damit einhergehend ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins Interferon (IFN)-gamma die CB2 Rezeptor Expression (Carlisle et al. 2002). In diesem Zusammenhang steigerte 2-AG über einen Agonismus am mikroglialen CB2 Rezeptor durch Aktivierung des MAPK Signalwegs die Migration der Mikrogliazellen und regulierte zudem die Proliferation der Zellen (Walter et al. 2003). Die Fähigkeit der Mikrogliazellen zur Phagozytose ist hingegen nicht durch Cannabinoide beeinflussbar (Franklin et al. 2003). Die Aktivierung des CB2 Rezeptors auf Mikrogliazellen hemmt an Orten neuronaler Schädigung deren Produktion und Freisetzung von Zytotoxinen und Zytokinen, wodurch Cannabinoide über die Regulation der Mikrogliazellen indirekt auf das Überleben von Neuronen positiv Einfluss nehmen (Klegeris et al. 2003; Walter et al. 2003).

Pharmakologische Evidenzen legen nahe, dass aktivierte Mikrogliazellen neben den beiden erwähnten CB1 und 2 Rezeptoren auch den abn Cannabidiol Rezeptor besitzen. Über diesen Rezeptor steuern 2-AG und AEA ebenfalls die Migration der Mikrogliazellen (Franklin und Stella 2003; Walter et al. 2003). Möglicherweise basiert diese Regulation auf dem abn Cannabidiol Rezeptor abhängigen Anstieg des cGMP-Gehalts innerhalb der Zelle (Begg et al. 2003; Duan et al. 2003). Neben dem

Vorkommen diverser CB Rezeptor Typen sind Mikrogliazellen auch in der Lage, EC zu produzieren und diese gezielt freizusetzen. So setzen Mikrogliazellen ungefähr 20mal mehr EC frei als Neurone oder Astrozyten (Walter et al. 2003). Die Produktion von 2-AG wird dabei durch ATP über Aktivierung von ionotropen P2X7 Rezeptoren induziert (Witting et al. 2004). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass freigesetztes AEA Neurone während einer akuten Entzündung des ZNS durch Induktion der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Phosphatase1 (MKP1) vor dem Untergang schützt (Eljaschewitsch et al. 2006). Dieser Vorgang interferiert mit einer Lipopolysaccharid (LPS) induzierten Signalkaskade, die an den „(Toll)-like“ Rezeptor 4 in der Zellmembran von Mikrogliazellen gekoppelt ist und über diese die Schädigung des ZNS nach einer durch NMDA hervorgerufenen Exzitotoxizität abschwächt. Die dargelegten Befunde werfen somit die Frage auf, inwieweit Cannabinoide Mikrogliazellen und deren Rolle im Gesamtkonzert des sekundären neuronalen Schadens beeinflussen können.

### **Cannabinoide und Astrozyten**

Der CB1 Rezeptor konnte auch auf Astrozyten nachgewiesen werden (Bouaboula et al. 1995; Salio et al. 2002). Diese befinden sich verstärkt an den Endfüßen der Astrozyten. Ihre Aktivierung ist mit der Steuerung des Energiemetabolismus assoziiert (Stella 2004). Astrozyten exprimieren hingegen keine CB2 Rezeptoren. Es ist noch nicht bekannt, ob Astrozyten den abn Cannabidiol Rezeptor besitzen (Walter und Stella 2003). Dagegen ist die Existenz des WIN Rezeptors belegt (Shivachar et al. 1996). So kann THC beispielsweise unabhängig vom CB1 Rezeptor die Freisetzung von Arachidonsäure in primären Kulturen von Astrozyten induzieren. Die Aufhebung dieses THC-Effekts nur durch hohe Dosen von SR141716A ist ein weiteres pharmakologisches Indiz für die Existenz des WIN Rezeptors auf Astrozyten (Shivachar et al. 1996). Kultivierte Astrozyten produzieren 2-AG und AEA in vergleichbaren Mengen wie Neurone (Walter et al. 2002; Walter und Stella 2003).

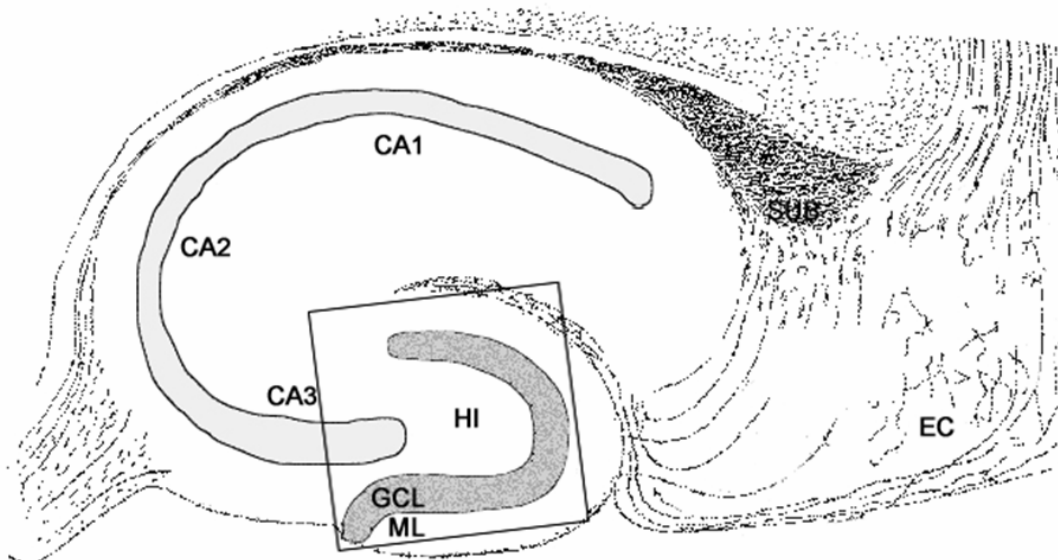
## **1.4 Experimentelle Voraussetzungen**

### **Die organotypische hippocampale Schnittkultur (OHSC)**

Um einen direkten Effekt von Cannabinoiden auf das Ausmaß der neuronalen Schädigung sowie auf das Verhalten der Mikrogliazellen untersuchen zu können,

wurde in der vorliegenden Arbeit die organotypische hippocampale Schnittkultur (OHSC) als Untersuchungsmodell ausgewählt. Dieses Modellsystem ist zur Erforschung neuronaler Plastizität und neuropharmakologischer Fragestellungen fest etabliert, da sowohl Zytoarchitektur als auch synaptische Aktivität in der OHSC über längere Zeiträume *in vitro* intakt bleiben und dadurch *in vivo* Bedingungen („Organotypie“) nachgestellt werden können (Stoppini et al. 1991; Gähwiler et al. 1997; Holopainen 2005). Die in der Schnittkultur enthaltenen Neurone weisen ihre typischen morphologischen Eigenschaften auf und auch andere zelluläre Elemente bleiben zumindest teilweise erhalten. So zeigen z. B. Astrozyten ähnliche strukturelle Merkmale wie unter *in situ* Bedingungen (Kunkler und Kraig 1997). In der hippocampalen Schnittkultur sind die Strukturen des Ammonshorns (Cornu ammonis, CA) und des Gyrus dentatus (GD) enthalten, welche zusammen mit der Hilusregion (HI), dem Subiculum (SUB), dem Prä- und Parasubiculum sowie dem entorhinalen Kortex (EC) die Hippokampusformation ausbilden. Das Cornu ammonis wird in die Felder CA1-CA4 eingeteilt. Das Feld CA1 enthält viele kleine Pyramidenzellen, das Feld CA2 hingegen zeichnet sich durch besonders große Pyramidenzellen aus, die im Feld CA3 etwas lockerer angeordnet sind. Das Ammonshorn endet mit dem strukturell besonders aufgelockerten Feld CA4. Es wird umrundet von den Neuronen des GD, die ein dichtes Zellband bilden.

**Abb. 1.7:** Die Hippokampusformation: CA (Cornu ammonis), EC (Entorhinaler Kortex), GCL (Körnerzellschicht), HI (Hilus), ML (Molekularschicht), SUB (Subiculum). Nähere Erläuterungen hierzu im Text (verändert nach Kohl et al. 2003).



Histologisch betrachtet weist der Hippokampus eine charakteristische laminierte Struktur auf (Forster et al. 2006). Oberflächlich findet man eine Faserschicht (Alveus), darauf folgend eine Korbzellschicht (Stratum oriens), ferner eine großzellige Pyramidenschicht (Stratum pyramidale) mit glutamatergen Neuronen. Nach innen schließt sich das Stratum radiatum, das Stratum lacunosum und letztendlich eine zellarme Molekularschicht (Stratum moleculare), die hauptsächlich der inter-neuronalen Verschaltung zwischen Pyramiden- und anderen Zellen dient, an. Die Erregung erreicht die Dendriten der Körnerzellen des GD über den Tractus perforans, verläuft dann weiter über die Axone der Körnerzellen zu den Moosfasern und dann weiter zu den Dendriten der Pyramidalzellen in der CA3 Region, welche die Information durch die sog. Schaffer-kollaterale zu den CA1 Neuronen weiterleiten. Danach verlässt die Erregung den Hippokampus durch Alveus und Fimbria. Diese trisynaptische Erregungsleitung ist auch in der OHSC funktionell in Takt. Der primäre Neurotransmitter dieser exzitatorischen Erregung ist Glutamat, es findet jedoch eine Modulation des exzitatorischen Signals durch GABAerge Interneurone statt (Lothman et al. 1991; Freund und Buzsaki 1996).

Das beschriebene Modellsystem wurde aus den folgenden zwei Gründen für die vorliegende Arbeit verwendet: Da in der OHSC mit Neuronen, Mikrogliazellen und Astrozyten im wesentlichen drei unterschiedliche Zelltypen vorhanden sind, kann zum einen nach exzitotoxischer Schädigung von Neuronen insbesondere das Verhalten von Mikrogliazellen im Zellverband beobachtet werden. Zum anderen wird durch die experimentellen Bedingungen ausgeschlossen, dass nach einer Läsion periphere Makrophagen aus dem Blut in das Gewebe einwandern. Somit kann in der OHSC die pharmakologische Wirkung verschiedener Substanzen ausschließlich für die in der Kultur residenten Mikrogliazellen untersucht werden, ohne dass aufgrund ihrer Abwesenheit mögliche Effekte anderer, aus der Blutbahn stammende immunkompetente Zellen in Betracht gezogen werden müssen.

Die exzitotoxische neuronale Schädigung der Schnittkulturen wurde mittels Applikation von *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA) herbeigeführt. NMDA ist ein Agonist des NMDA-Rezeptors, bei dem es sich um einen ionotropen Glutamatrezeptor handelt. Durch Bindung von NMDA (und Glycin als Co-Aktivatoren) an seinen Rezeptor kommt es zu einem Einstrom von Kalziumionen in die Zellen und damit zur Erhöhung des intrazellulären Kalziumionenspiegels. Eine Überaktivierung dieses Rezeptortyps durch eine länger anhaltende Stimulation mit NMDA führt zum übermäßigen



Kalziumeinstrom, der nachfolgend die sog. exzitotoxischen Zellschädigung herbeiführt. In OHSC findet man eine besonders hohe Dichte an NMDA Rezeptoren in den Pyramidenzellen des CA und in den Körnerzellen des GD. Somit können die Neurone in diesen beiden Schichten durch die Verwendung von NMDA selektiv geschädigt werden.

Generell werden durch die Präparation von Schnittkulturen neuronale Afferenzen und Efferenzen durchtrennt. Somit stellt dieser Vorgang auch eine mechanische Schädigung für die in der OHSC anwesenden Zelltypen dar. Ferner führt die Präparation zu einer spontanen Aktivierung der Gliazellen. Diese werden zusätzlich durch den präparationsbedingten Untergang von Neuronen aktiviert (Hailer et al. 1996). Erst während der weiteren Kulturphase kehren die Gliazellen, vor allem aktivierte Mikrogliazellen, langsam wieder in ihren Ruhezustand zurück. Da in dem hier vorgestellten Modellsystem durch eine NMDA-Schädigung die Mikrogliazellen aus ihrer Ruheform in einen aktivierten Zustand versetzt werden sollten, musste die NMDA-Schädigung am 6. Tag in Kultur erfolgen, da erst zu diesem Zeitpunkt die Mikrogliazellen in den inneren Schichten der Schnittkultur in den inaktiven Zustand zurückgekehrt waren.

### **1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte generell untersucht werden, ob und inwieweit unterschiedliche Cannabinoide das Absterben von Neuronen in der Körnerzellschicht (KZS) im GD des Hippokampus nach exzitotoxischer Schädigung mit NMDA beeinflussen. Parallel dazu sollte überprüft werden, ob die Applikation unterschiedlicher Cannabinoide sich auf das Verhalten und die Anzahl der Mikrogliazellen in ungeschädigten oder NMDA geschädigten OHSC im Bereich der KZS des GD im Hippokampus auswirkt. Dabei sollte vor allem die These überprüft werden, ob das Ausmaß des Neuronentods mit dem Funktionszustand von Mikrogliazellen korrelierbar ist. Die OHSC stellt ein sehr geeignetes Untersuchungsmodell dar, da mit den Mikrogliazellen nur eine einzige Gruppe immunkompetenter Zellen in der OHSC vorzufinden ist und mögliche Interaktionen mit weiteren immunkompetenten Zellen, die aus der Blutbahn stammen, ausgeschlossen werden können.

Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden NMDA geschädigte OHSC entweder mit pflanzlichen, synthetischen oder EC parallel behandelt und die Anzahl der toten Neurone in der KZS des GD mit der Anzahl toter Neurone in OHSC verglichen, die nur mit NMDA geschädigt wurden. Da in ungeschädigten OHSC nur eine geringe Anzahl toter Neurone im zu untersuchenden Gebiet des GD vorhanden ist, sollte gleichzeitig überprüft werden, wie sich eine Behandlung dieser ungeschädigten OHSC mit Cannabinoiden auf das Ausmaß des Neuronentods auswirkt. Dadurch sollte geprüft werden, ob die Applikation von Cannabinoiden per se zu einer Veränderung der Anzahl toter Neurone führt.

Neben dem Ausmaß der neuronalen Schädigung sollten mögliche Effekte von Cannabinoiden auf die Anzahl von Mikrogliazellen in der KZS des GD untersucht werden. Dabei interessierte vor allem die Frage, ob Cannabinoide auf ruhende und/oder aktivierte Mikrogliazellen unterschiedliche Effekte ausüben. Um zunächst die Wirkung auf ruhende Mikrogliazellen zu beschreiben, wurde die Anzahl der Mikrogliazellen in ungeschädigten Kontrollen untersucht, welche mit verschiedenen Cannabinoiden behandelt wurden. Dann sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Cannabinoide die Anzahl der Mikrogliazellen in NMDA geschädigten OHSC beeinflussen. Abschließend sollten die Ergebnisse zum Verhalten der Neurone nach Behandlung mit Cannabinoiden mit der Zellzahl der Mikrogliazellen, ebenfalls nach Applikation mit Cannabinoiden, verglichen werden, um mögliche Korrelationen zwischen Mikrogliazellzahl und Neuronentod herzustellen.

Nach dem Aufdecken möglicher Wirkungen von Cannabinoiden sollten deren Wirkungsmechanismen näher beleuchtet werden. Dies sollte durch den Einsatz spezifischer CB Rezeptor Antagonisten erreicht werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Untersuchung des Verhaltens aus der Blutbahn stammender immunkompetenter Zellen, die nicht wie die Mikrogliazellen ortständig im ZNS vorhanden sind, sondern erst nach einer Schädigung des ZNS sekundär in das verletzte Gewebe eindringen. Die Makrophagen stellen eine Zellgruppe der aus der Blutbahn stammenden immunkompetenten Zellen dar und sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet werden. Aus der Milz isolierte Makrophagen wurden in die akut präparierten OHSC infiltriert und ihre Auswirkungen auf den Neuronentod und die Anzahl der Mikrogliazellen in der KZS des GD analysiert. Zusätzlich wurde durch Applikation von Cannabinoiden geklärt, ob die Migration der Makrophagen hin zum

Ort eines neuronalen Schadens und deren Wirkungsweise auf einen neuronalen Schaden durch Cannabinoide beeinflusst werden.

Der dritte Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte in der Untersuchung zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Astrozyten und Mikrogliazellen liegen. Zytokine werden bekanntermaßen nach Verletzungen des ZNS von unterschiedlichen Zellgruppen freigesetzt und üben bei neuroinflammatorischen Prozessen eine bedeutende Funktion aus. Mit TNF-alpha sollte die Sekretion eines Zytokins untersucht werden, das sich bekanntermaßen auf das Überleben von Neuronen auswirken kann und dessen Wirkung gegebenenfalls durch Cannabinoide beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck sollten die Kulturüberstände von astrozytären und mikroglären Primärkulturen nach unterschiedlichen Stimulationsschemata mit verschiedenen Cannabinoiden auf den TNF-alpha Gehalt vergleichend untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien und Pufferlösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle eingesetzten Feinchemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Schnelldorf) bezogen. Alle Chemikalien und Medien, die in der Zellkulturtechnik zum Einsatz kamen, wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) geliefert.

In folgender Tabelle sind alle Cannabinoide aufgeführt, mit denen Schnittkulturen und Einzelzellen behandelt wurden. Die lipophilen Cannabinoide wurden in den Lösungsmitteln Ethanol oder Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und langfristig bei -20° C gelagert. Zur Anwendung wurden die Cannabinoide aus der Stammlösung weiter in Kulturmedium verdünnt, so dass die maximale Lösungsmittelkonzentration 0,1% (v/v) betrug. Um Lösungsmittelleffekte auszuschließen, wurden Kontrollexperimente mit äquivalenten Konzentrationen an Ethanol und DMSO durchgeführt.

**Tabelle 2.1** Liste aller verwendeten Cannabinoide

Bezeichnung	Beschreibung	Endkonzentration	Lösungsmittel
(-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)	Phytocannabinoid; Cannabinoid (CB)1 und 2 Rezeptor Agonist	0,03; 0,3; 3 und 15µM	DMSO
2-Arachidonylglycerin (2-AG)	Endocannabinoid (EC); CB1, 2 und abn Cannabidiol Rezeptor Agonist	0,001; 0,01; 0,1 und 1µM	Ethanol
Arachidonylethanolamin (AEA)	EC; CB1, 2 und WIN Rezeptor Agonist	0,001; 0,01; 0,1 und 1µM	Ethanol
Palmitylethanolamin (PEA)	EC; GPCR 55 und PPAR-alpha Rezeptor Agonist	0,001; 0,01; 0,1 und 1µM	Ethanol

WY-14643	Synthetischer PPAR-alpha Re- zeptor Agonist	0,01; 0,1; 1 und 10µM	DMSO
AM251	Synthetischer CB1 Rezeptor An- tagonist	10 µM	DMSO
AM630	Synthetischer CB2 Rezeptor An- tagonist	10 µM	DMSO
WIN-55,212-2 (mesylat)	Synthetischer TRPV1 Rezeptor Agonist	0,1; 1 und 10µM	Ethanol
Capsazepin	Synthetischer TRPV1 Rezeptor Antagonist	0,1; 1 und 10µM	Ethanol
Abn Can- nabidiol	Abn Cannabidiol Rezeptor Ago- nist	0,1; 1 und 10µM	Ethanol
Cannabidiol	Phytocannabinoid; Antagonist am abn-Cannabidiol Rezeptor	0,1; 1 und 10µM	Ethanol
O-1918	Synthetischer abn Cannabidiol Rezeptor Antagonist	30µM	Ethanol

Nach Beendigung der Versuche wurden die Schnittkulturen und Zellen mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert und die Zellstrukturen entsprechend mit den in der folgenden Tabelle aufgeführten Chemikalien (Antikörper, Lektine und Färbereagenzien) dargestellt.

**Tabelle 2.2** Liste aller verwendeten Antikörper, Lektine und Färbereagenzien.

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnung
<i>Griffonia simplicifolia</i> Isolek- tin B <sub>4</sub> (IB <sub>4</sub> ), FITC konjugiert (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)	Lektin	1:50
<i>Griffonia simplicifolia</i> IB <sub>4</sub> , Alexa Fluor 647 konjugiert (Invitrogen)	Lektin	1:50
Esel anti-Schaf IgG, Alexa	Polyklonaler Sekundäranti-	1:200

Fluor 488 konjugiert (Invitrogen)	körper	
Propidium Iodid (PI; Sigma)	Fluorochrom	5µg/ml

Folgende Pufferlösungen wurden in den Versuchsansätzen eingesetzt. Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Lösung in einem Liter Aqua destillata. Alle Pufferlösungen wurden auf einen pH-Wert zwischen 7,35-7,4 eingestellt.

**Tabelle 2.3** Liste aller verwendeten Pufferlösungen.

<b>Phosphatpufferlösung (PB) 0,1M :</b>	<b>Phosphatpufferlösung (PB) 0,2M :</b>
11,36g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	22,72g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,72g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,44g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Phosphatpufferlösung (PBS) 0,02M:</b>	<b>Phosphatpufferlösung (PBS/Triton) 0,02M mit 0,3% (v/v) Triton X-100:</b>
9g NaCl	9g NaCl
0,54g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,54g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2,27g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,27g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3ml Triton X-100

## 2.2 Versuchstiere

Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC). Muttertiere mit Wurf (*Rattus norvegicus*) des Wistar Inzucht-Stamms wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die Ratten wurden in einem Hell/Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (12:12 LD, Beginn der Lichtphase um 7.00 Uhr MEZ) für 1 bis 5 Tage gehalten. Den Tieren stand Futter (Altromin Zucht- und Diätfutter) und Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung. Die Jungtiere wurden am Tag 8 nach ihrer Geburt (postnatal 8, p8) mit Isofluran betäubt und durch Dekapitation getötet.

## **2.3 Vorbereitungen und Medienzusammensetzung zur Präparation und Kultivierung von Schnittkulturen**

### **Präparations- und Kulturmedium**

Das Präparationsmedium wurde aus 99ml Minimum Essential Medium (MEM) und 1ml Glutamin hergestellt. Für die Dauer der Experimente wurde die Temperatur des Präparationsmediums bei 4° C gehalten und der pH Wert auf 7,36-7,38 eingestellt. Das Kulturmedium bestand aus 50ml MEM, 25ml Hanks' Balanced Salt Solutions (HBSS), 25ml normales Pferdeserum (NHS), 2ml Glutamin, 1µg/ml Insulin, 7,5% (w/v) Natriumbikarbonat, 1,2mg/ml Glukose, 0,1mg/ml Streptomycin, 100U/ml Penicillin und 0,8µg/ml Vitamin C. Der pH Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Vor Gebrauch wurde das Kulturmedium auf 35° C erwärmt.

### **Herstellung der Agarblöcke**

Um die Agarblöcke für die Präparation herzustellen, wurde eine Lösung angesetzt, die sich aus den folgenden Bestandteilen zusammensetzte: 725mg NaCl; 37mg KCl; 17mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 49mg MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 218mg NaHCO<sub>3</sub>; 180mg Glukose; 29mg CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O und 5g Agar. Nach Lösung und Vermischung der Bestandteile in 100ml Aqua destillata wurde die fertige Lösung für 30 Minuten bei 70° C auf einem Magnetrührer erhitzt, in Gewebekulturschalen (35mm Durchmesser) abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert.

## **2.4 Herstellung der organotypischen hippokampalen Schnittkultur (OHSC)**

### **Vorbereitung des Arbeitsplatzes**

Zur Präparation wurde folgendes Präparierbesteck verwendet: zwei kleine Scheren, eine große Verbandsschere, eine feine chirurgische Pinzette, zwei gebogene Pinzetten, je zwei gebogene chirurgische Einmalklingen (Größe 15) und zwei gerade chirurgische Einmalklingen (Größe 11), zwei Skalpellhalter, eine halbierte Rasierklinge, eine Pasteurpipette aus Glas, zwei Pasteurpipetten, bei denen die Spitzen abgesägt wurden und drei Rundfilter (55mm Durchmesser). Alle benötigten Materialien wurden vor dem Gebrauch sterilisiert. Zur Kühlung des Gewebes während und nach der Präparation wurde Eis in einem Behälter bereitgestellt, das Präparationsmedium wurde ebenfalls auf Eis aufbewahrt. Das Präparationsmedium diente zur Versorgung

des entnommenen Hirngewebes während der Präparation, außerdem wurden die gewonnenen Schnittkulturen bis zur Überführung in den Zellkultureinsatz und damit bis zur Versorgung mit Kulturmedium in dem Präparationsmedium aufbewahrt. Eine Gewebekulturschale (35mm Durchmesser) wurde mit Präparationsmedium gefüllt, zwei weitere Gewebekulturschalen wurden am Arbeitsplatz bereitgestellt und dienen dazu, das geschnittene Gewebe aufzubewahren. Eine vierte Gewebekulturschale diente bis zur Überführung des Gewebes in das Kulturmedium zur Aufbewahrung und wurde auf Eis gestellt. Vor der Präparation der Schnittkulturen wurden auf dem Metallteller-Einsatz des Vibratoms (Typ Leica VT 1000 S, Wetzlar, Deutschland) zwei zugeschnittene Stücke des Agars mit Histoacryl-Kleber (Braun, Melsungen) befestigt. Ein drittes Stück Agar wurde zugeschnitten und nach der Befestigung des Gewebes auf dem Metallteller zur zusätzlichen Stabilisierung des Gewebes aufgeklebt. Am Vibratom wurden die folgenden Parameter eingestellt: Frequenz, 100Hz; Schnittwinkel, 5°; Amplitude, 0,6mm und Geschwindigkeit: 0,1mm/s.

### **Präparation der OHSC**

Zur Gewinnung der OHSC wurden die Gehirne von 8 Tage alten Wistar-Ratten verwendet. Nach der Dekapitation der Tiere mit der Verbandsschere wurde die Kopfhaut entfernt. Die folgenden Schritte der Präparation erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Mit einer feinen Schere wurde die Kalotte eröffnet und das Gehirn freigelegt. Zur Präparation des Temporallappens wurde mit einem scharfen Skalpell zunächst das Kleinhirn entfernt, danach wurden ungefähr 2mm des frontalen Gehirnteils abpräpariert. Der so gewonnene Hirnanteil, der den Hippokampus enthielt, wurde mittels eines Metallspatels in die vorbereitete Gewebekulturschale, die mit Präparationsmedium gefüllt war, überführt. Anschließend wurde das Gewebe mit der apikalen Seite für zehn Sekunden auf einen Filter gelegt, um es leicht anzutrocknen. Danach wurde das Gewebe mit einem Metallspatel auf den vorbereiteten Metallteller mit Histoacryl-Kleber aufgeklebt und mit den Agarblöcken stabilisiert, um ein Verschieben des Gewebes während des Schneidens zu verhindern. Nun wurde der Metallteller in das zugehörige Metallbecken geschraubt und dieses mit etwa 150ml Präparationsmedium gefüllt, um das Gewebe während der Präparation zu versorgen. Mit Hilfe des Vibratoms wurden 350µm starke Horizontalschnitte der Hippokampusregion des Rattenhirns gewonnen. Dazu wurden zuerst die obersten 500µm des Gehirns entfernt und verworfen. Nach der Anfertigung der einzelnen Schnitte wurden diese so-



fort unter einem binokularen Mikroskop begutachtet, mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und in dem Präparationsmedium zur Kühlung auf Eis gelegt. Im Durchschnitt konnten aus einem Rattenhirn 6-8 Schnittkulturen gewonnen werden. Die so gewonnenen Schnittkulturen wurden nach Beendigung des Vorgangs in Zellkultureinsätze überführt und in 6-Loch Platten mit jeweils 1ml Kulturmedium, dem je nach Bedarf verschiedene Substrate in der entsprechenden Verdünnung zugesetzt wurden, in einem Brutschrank bei 35° C und 5% CO<sub>2</sub> in einer voll gesättigten Atmosphäre bis zur Fixierung kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte stets nach zwei Tagen.

### **Markierung toter Neurone in der OHSC**

Zur Darstellung abgestorbener Neurone wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in nicht fixiertem Gewebe selektiv in geschädigte Neurone eindringt und im Zellkern mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) interkaliert und diese somit spezifisch markiert. PI wurde zwei Stunden vor der Fixierung in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zum Kulturmedium der OHSC hinzugefügt. Um das Ausmaß der neuronalen Schädigung, bzw. den neuronalen Erhalt zu erfassen, wurde die Anzahl PI positiver Zellkerne in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen nach der PI-Markierung bestimmt.

### **Fixierung der OHSC**

Die Fixierung der OHSC erfolgte nach 9 Tagen in Kultur. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die OHSC mit einer 4% (w/v) Paraformaldehydlösung für mindestens 3 Stunden fixiert. Daraufhin wurden die OHSC mit 0.1M PBS 30 Minuten lang gespült und im Anschluss mit einem feinen Pinsel von der Membran des Einsatzes gelöst und in 0,1M PBS transferiert, zu welchem 0,1% (v/v) Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) zugesetzt wurde. In dieser Lösung wurden die OHSC dann bis zur weiteren Verarbeitung bei 4° C aufbewahrt.

### **Darstellung von Mikrogliazellen in der OHSC**

Mit Hilfe des Lektins Isolektin B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>), welches mit dem Fluorochrom FITC oder Alexa 647 konjugiert war und mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen interagiert, wurden Mikrogliazellen in der OHSC sichtbar gemacht. Dazu wurden die fixierten OHSC zunächst für 30 Minuten mit normalem Ziegen Serum (1:20 in PBST)

inkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit FITC- bzw. Alexa 647 konjugierten IB<sub>4</sub> (1:50 in 0,5% (w/v) BSA in PBST) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die OHSC mit PBST gespült (3x 10 Minuten) und mit dem Fluoreszenz Eindeckmedium Dako-mount (DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet und bis zur Analyse bei 4° C aufbewahrt.

## **2.5 Gewinnung primärer Makrophagenkulturen aus der Rattenmilz**

### **Isolation und Kultivierung von Milzmakrophagen**

Zur Gewinnung von Makrophagen wurde die Milz einer adulten Ratte verwendet. Zunächst wurden 900µl RPMI Medium in eine sterile unbeschichtete Petrischale (35mm Durchmesser) vorgelegt und die entnommene Milz in diese Petrischale überführt. Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Skalpell mechanisch zerkleinert. Durch Zerstampfen mit dem Deckel eines Eppendorfreaktionsgefäßes und wiederholtes Pipetieren der kleinen Gewebestücke wurden die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und in Suspension gebracht. Diese Zellsuspension wurde anschließend auf 900µl Ficoll-Paque Plus Lösung (Ficoll, spezifische Dichte 1,077 g/ml; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), welche in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt wurde, gegeben, wobei eine Phasenvermischung von Ficoll und Zellsuspension unbedingt vermieden wurde. Bei Präparation mehrerer Organe wurden die Überstände zusammen in ein 15er oder 50er Greiner Röhrchen auf das entsprechend angepasste Volumen Ficoll gegeben. Dieser Gradient wurde im Anschluss für 45 Minuten bei 300g und Raumtemperatur (RT) sowie ausgeschalteter Zentrifugengremse zentrifugiert. Danach wurden die Milzmakrophagen, welche sich in der weißen, dritten Schicht von unten angesammelt haben, mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen. Diese Phase wurde daraufhin einmal mit PBS für 5 Minuten bei 300g und RT zentrifugiert. Zu den sedimentierten Zellen wurde 1ml 50% (v/v) normales Kälberserum-haltiges RPMI Medium zugegeben und die suspendierten Zellen für ein bis zwei Stunden in einer Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Kulturflasche bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden nun mit 2ml 10% (v/v) normalem Kälberserum haltigen RPMI Medium weiter inkubiert. Um die Milzmakrophagen später identifizieren zu können, wurde diesem RPMI Medium ein Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper zugegeben (Esel anti-Schaf IgG, Alexa 488 konjugiert). Dieser AK wurde von den Makrophagen

phagozytiert und dadurch eine Markierung dieser Zellen mit Alexa 488 erreicht. Der Mediumwechsel erfolgte unter erneuter Antikörperzugabe alle zwei Tage, wobei die maximale Kulturdauer 6 Tage betrug.

### **Migration kultivierter Milzmakrophagen in die OHSC**

Um die kultivierten und mit Alexa 488 markierten Makrophagen in die OHSC infiltrieren zu lassen, wurden die adhärennten Makrophagen zunächst vom Boden der Kulturflasche in Suspension gebracht. Dies geschah mit Hilfe einer Trypsin-EDTA Lösung, von der 2ml in die Kulturflasche gegeben wurden und mit der die Zellen für 2 Minuten inkubiert wurden. Anschließend wurden die suspendierten Zellen für 5 Minuten bei 300g und 4° C zentrifugiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt und die Makrophagen in definierter Zellzahl auf die akut angefertigten OHSC gegeben und mit diesen für 9 Tage kultiviert. In dieser Zeit sollte das Einwandern der Makrophagen in die inneren Schichten der Schnittkultur erfolgen.

## **2.6 Primärkulturen von Mikrogliazellen und Astrozyten**

### **Medien zur Präparation und Kultivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten**

Als Grundlösung diente Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), welchem 10% (v/v) normales Kälberserum, Glutamin und Penicillin/Streptomycin zugegeben wurden. Das Medium wurde auf einen pH Wert von 7,4 eingestellt. Aus dieser Grundlösung wurde ein 2% (v/v) Kälberserum-haltiges Kulturmedium hergestellt.

### **Gewinnung einer mikroglären und astrozytären Mischkultur**

Bevor man isolierte Primärkulturen von Astrozyten und Mikrogliazellen gewinnen kann, muss zunächst eine Mischkultur aus Astrozyten und Mikrogliazellen hergestellt werden. Diese wurde aus 2 Tage alten Wistar-Ratten gewonnen. Die Gehirne (i. d. R. 12-18 Stück) wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in Petrischalen überführt, in welcher kalzium- und magnesiumfreies HBSS vorgelegt wurde. Dem HBSS wurde noch Vitamin E zugegeben. Zunächst wurden die Meningen unter optischer Kontrolle entfernt und danach das Cerebellum sowie der Hirnstamm entfernt. Das verbliebene Gewebe wurde anschließend mit kalzium- und magnesiumfreiem HBSS dreimal kurz gespült. Nun wurden jeweils zwei präparierte Gehirne zusammen in 1ml HBSS gebracht, welches Kalzium, Magnesium, 4mg/ml

Trypsin und 0.5mg/ml DNase enthielt. Darin wurde das Gewebe zunächst für 5 Minuten bei 4° C vorverdaut. Um die Zellen aus dem Gewebe heraus zu lösen, wurde anschließend mit kalzium- und magnesiumfreiem HBSS dreimal gespült, um dann das angedaute Gewebe auf jeweils 100ml DNase-Lösung zu verteilen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde nun eine Zellsuspension hergestellt. Die Suspension wurde bei 133g und 4° C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände verworfen und die Sedimente in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde schließlich in PLL-beschichtete Kulturflaschen transferiert und mit 9ml Kulturmedium aufgefüllt. Da die eingesetzten Medien für Neurone und Oligodendrozyten ungeeignet sind, ist ein Wachstum dieser Zelltypen unter den gewählten Umständen nicht möglich und somit ausschließlich eine Mischkultur aus Astrozyten und Mikrogliazellen gewährleistet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Nach 10 Tagen waren die Kulturen für die geplanten Experimente einsatzbereit.

### **Isolierung von Mikrogliazellen**

Da die Mikrogliazellen relativ locker auf den Astrozyten aufsitzen, ließen sich diese durch die Methode des Abschüttelns isolieren. Hierzu wurden die Kulturflaschen mit zuvor frisch zugefügtem Medium für 2 Minuten leicht gegen einen Gegenstand geschlagen. Aus dem Kulturüberstand ließen sich so die Mikrogliazellen gewinnen, die Astrozyten blieben auf dem Flaschenboden haften. Die Überstände mit den Mikrogliazellen wurden bei 150g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und die Sedimente in Kulturmedium aufgenommen. Diese Suspensionen wurden auf PLL beschichtete Glasobjektträger in definierter Zellzahl in 24-Loch Platten ausgesät und mindestens eine Stunde im Inkubator ruhen gelassen. Erst danach wurden die Zellen mit den entsprechenden Stimulanzen behandelt.

### **Isolierung von Astrozyten**

Zur Gewinnung von astrozytären Einzelzellkulturen mussten zunächst die Mikrogliazellen aus der Mischkultur entfernt werden. Hierzu erfolgte zu Beginn ein Mediumwechsel, dem sich das mechanische Ablösen der Mikrogliazellen durch die oben beschriebene Methode des Abschüttelns anschloß. Dieser Prozess der Abschüttlung wurde 2 Tage später wiederholt, um noch restliche Mikrogliazellen zu entfernen. Um die Astrozyten nun von der Kulturflasche zu lösen, wurden die Zellen

mit 10ml kalzium- und magnesiumfreiem PBS gespült und dann mit 2,5ml Trypsin/EDTA-Lösung für 3 Minuten inkubiert. Danach wurde mit PBS auf 10ml aufgefüllt und die Astrozyten vom Kulturflaschenboden heruntergespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Sediment in Kulturmedium aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und die Astrozyten in definierter Zellzahl auf PLL beschichtete Glasobjektträger in Vertiefungen einer 24-Loch Platte ausplattiert. Nach einem Tag konnten dann die Experimente mit den isolierten Astrozyten durchgeführt werden.

## **2.7 Experimentelle Gruppen**

Im Folgenden sind die einzelnen experimentellen Gruppen für die OHSC und die Einzelzellkulturen aufgeführt.

### **Gruppeneinteilung der OHSC**

Nach der Präparation wurden die Schnittkulturen in verschiedene experimentelle Gruppen eingeteilt und wie folgend beschrieben entsprechend behandelt. Die experimentellen Ausführungen für die OHSC sind zusätzlich in Abbildung (Abb.) 2.1 schematisch dargestellt.



kurz mit Kulturmedium gespült und vom 6. div bis zur Fixierung am 9. div mit dem entsprechenden Cannabinoid allein behandelt.

NMDA+Cannabinoid+Antagonist: Hier wurden die OHSC am 6. div zunächst für 15 Minuten mit dem entsprechenden Antagonisten präinkubiert. Darauf folgte eine Inkubation mit 50µM NMDA plus entsprechendem Cannabinoid und Antagonist zusammen für 4 Stunden. Nach diesen 4 Stunden wurden die OHSC einmal kurz mit Kulturmedium gespült, dann wiederum für 15 Minuten mit dem Antagonisten präinkubiert und anschließend bis zur Fixierung am 9. div mit Antagonist plus entsprechendem Cannabinoid behandelt.

Ein Mediumwechsel erfolgte bei allen experimentellen Gruppen jeden zweiten Tag.

### **Experimentelle Gruppen bei der Migration von Milzmakrophagen**

Die isolierten und kultivierten Milzmakrophagen sollten in die OHSC infiltrieren und ihr Einfluss auf das Verhalten von Mikrogliazellen und den neuronalen Zelltod analysiert werden. Im Zusammenhang mit dem Cannabinoidsystem wurde weiterhin untersucht werden, ob Cannabinoide die Migration der Makrophagen in unbehandelten und NMDA geschädigten OHSC beeinflussen. Dazu wurden folgende experimentelle Gruppen untersucht:

CTL, Kontrollgruppen: Es handelt sich um unbehandelte OHSC, die vom 0. div bis zur Fixierung am 9. div in Kulturmedium allein gehalten wurden.

CTL, Kontrollgruppen+Makrophagen: Den OHSC dieser Kontrollgruppen wurde akut nach der Präparation eine bestimmte Zellzahl Makrophagen auf ihre Oberfläche appliziert. Diese sollten innerhalb von 9 div in die OHSC infiltrieren.

NMDA: Die OHSC wurden am 6. div mit 50µM NMDA für 4 Stunden geschädigt. Nach den 4 Stunden wurden die OHSC einmal kurz mit Kulturmedium gewaschen und anschließend bis zur Fixierung am 9. div in Kulturmedium belassen.

NMDA+Makrophagen: Den OHSC dieser Versuchsgruppe wurden akut nach der Präparation eine bestimmte Anzahl von Makrophagen auf ihre Oberfläche appliziert. Diese Schnittkulturen wurden dann am 6. div wie die NMDA-Gruppe geschädigt und parallel wie diese weiterbehandelt.

NMDA+Cannabinoid: In dieser Gruppe wurden die OHSC vom 0. div bis 6. div mit Kulturmedium behandelt und am 6. div mit 50µM NMDA für 4 Stunden geschädigt. Parallel zur Applikation des NMDA wurde das entsprechende Cannabinoid ebenfalls für 4 Stunden zugegeben. Nach Beendigung der Schädigung wurden die OHSC

einmal kurz mit Kulturmedium gespült und vom 6. div bis zur Fixierung am 9. div mit dem entsprechenden Cannabinoid allein behandelt.

NMDA+Cannabinoid+Makrophagen: Den OHSC der vorliegenden Gruppe wurde akut nach der Präparation eine bestimmte Zellzahl Makrophagen auf die Oberfläche appliziert. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden diese OHSC genau wie die OHSC der NMDA+Cannabinoid Gruppe behandelt.

Es wurden insgesamt 2 unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. In einer Versuchsreihe wurden 40.000 Makrophagen pro OHSC appliziert. In der zweiten Versuchsreihe wurden 100.000 Makrophagen pro OHSC zugegeben.

### **Gruppeneinteilung von mikroglären und astrozytären Primärkulturen**

Um der Fragestellung nachzugehen, ob Cannabinoide die Sekretion des Tumornekrosefaktors (TNF)-alpha beeinflussen, wurden die isolierten Astrozyten und Mikrogliazellen jeweils in unten aufgeführte experimentelle Gruppen unterteilt. Mikrogliazellen und Astrozyten wurden mit 10ng/ml des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) zur Sekretion von TNF-alpha angeregt.

CTL, Kontrollgruppe: In diesem Fall wurden die Zellen während der gesamten Versuchsdauer nur mit Kulturmedium behandelt.

Cannabinoid/Antagonist: Den Zellen dieser Versuchsgruppe wurde für die gesamte Versuchsdauer von 2 bzw. 48 Stunden das entsprechende Cannabinoid bzw. der entsprechende CB Rezeptor Antagonist zugegeben.

LPS: Hier wurden die Zellen zur maximalen Sekretion von TNF-alpha für 2 bzw. 48 Stunden mit 10ng/ml LPS stimuliert.

LPS+Cannabinoid: Zellen dieser experimentellen Gruppe wurde neben LPS parallel das entsprechende Cannabinoid für 2 bzw. 48 Stunden appliziert, um eine Auswirkung von Cannabinoiden auf die LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha zu untersuchen.

LPS+Cannabinoid+Antagonist: 15 Minuten bevor die Zellen zusammen mit LPS und einem entsprechenden Cannabinoid für 2 bzw. 48 Stunden inkubiert wurden, wurde der entsprechende CB Rezeptor Antagonist zugegeben wurden. Dieser Antagonist wurde dann für 2 bzw. 48 Stunden zusammen mit dem LPS und den Cannabinoiden im Kulturmedium belassen.



## 2.8 Messung der TNF-alpha Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kommerziell erhältlicher ELISA Kit zur Bestimmung der TNF-alpha Konzentrationen im Kulturüberstand verwendet (Quantikine rat TNF-alpha/TNFSF1A immunoassay, R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Nach 2 bzw. 48 Stunden Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand von den unterschiedlichen Versuchsgruppen abgezogen und langfristig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Prinzip dieses ELISA beruhte auf der sog. quantitativen Sandwich-Enzym-Immunanalyse Technik, bei welcher zunächst ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen TNF-alpha an die Wände der Vertiefungen einer 96-Loch Platte konjugiert wurde. In diesen Vertiefungen wurden  $50\mu\text{l}$  Kulturüberstand pro Versuchswert eingesetzt. Diese Überstände wurden zuvor 3fach in einer Kalibrierungsflüssigkeit (Calibrator Diluent RD5-17) verdünnt. In dieser Flüssigkeit wurde auch die Eichreihe erstellt. Der Nachweisbereich für TNF-alpha lag zwischen  $12,5\text{-}800\text{pg/ml}$ . Nach 2 Stunden wurden alle nicht an den monoklonalen Antikörper gebundenen Substanzen abgezogen und die Vertiefungen 4mal kurz gewaschen. Darauf folgte eine zweistündige Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper gegen TNF-alpha. Dieser Antikörper war mit einem Enzym konjugiert, welches später die Substratlösung umsetzte. Es folgten wiederum 4 kurze Waschschriffe. Daraufhin konnte für 30 Minuten mit der Substratlösung inkubiert werden. Die Enzymreaktion ergab ein blaues Reaktionsprodukt, welches durch Zugabe einer Stopplösung nach gelb umschlug. Die Intensität der gelben Farbe ist proportional zur TNF-alpha Konzentration und diese konnte mit Hilfe eines ELISA Readers (Labsystems, Frankfurt am Main) bei einer Wellenlänge von  $450\text{nm}$  und über die erstellte Eichreihe bestimmt werden.

## 2.9 Datenanalyse und Auswertung

### Bestimmung von Zellzahlen

Um eine Aussage darüber machen zu können, wie sich die Behandlung ungeschädigter und NMDA geschädigter OHSC mit den unterschiedlichen Cannabinoiden auf die Mikrogliazellen und das Überleben der Neurone auswirkt, wurde die Anzahl  $\text{IB}_4^+$  Mikrogliazellen und  $\text{PI}^+$  Neurone in der KZS des GD ausgezählt. Die Zellzahlen der jeweiligen Zelltypen wurden immer in Zellen pro KZS angegeben. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte an Aufnahmen, die an einem konfokalen Laserscanning-

mikroskop (CLSM; LSM 500/Axiovert 100, Zeiss, Jena) gemacht wurden. Das CLSM wurde verwendet, um Fluoreszenzsignale in einer konfokalen Ebene darzustellen. Das Lasermodul dieses Geräts enthielt drei Laserrohre, bestehend aus zwei Helium/Neon Lasern (Anregungswellenlängen: 543nm, beziehungsweise 633nm) und einem Argon Laser (Anregungswellenlängen: 458nm und 488nm). Um die Zellpopulation der IB<sub>4</sub>-markierten Mikrogliazellen sichtbar zu machen, wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 488nm verwendet, außerdem wurden ein Farbteiler (FT 488/543) und ein Emissions-Bandpassfilter mit 505-530nm eingesetzt. Um die toten Neurone sichtbar zu machen, in deren Zellkernen PI an die DNA gebunden hatte, wurde monochromatisches Licht der Wellenlänge 543nm und ein Emissions-Bandpassfilter mit 585-615nm verwendet. Über die Verbindung zu einem Rechner konnten die Module gesteuert und die Bilddaten bis zur weiteren Verarbeitung gespeichert werden. Mit Hilfe des CLSM wurden die OHSC optisch in 2µm dicke Schnitte zerlegt und Aufnahmen in der Übersicht bei 16- und 40facher Vergrößerung angefertigt. Die Auswertung der PI<sup>+</sup> Zellkerne toter Neuronen erfolgte an konfokalen Bildern mit Hilfe des Zeiss KS 400 Systems. Mit diesem System wurden die konfokalen Bilder in ein Binärbild umgewandelt und die mit PI markierten Zellkerne in der KZS des GD heraussegmentiert. Die quantitative Auswertung erfolgte nur in jeder dritten optischen Schnittebene, um zu verhindern, dass die Zellen auf mehreren Schnittebenen doppelt abgebildet werden.

### **Statistik**

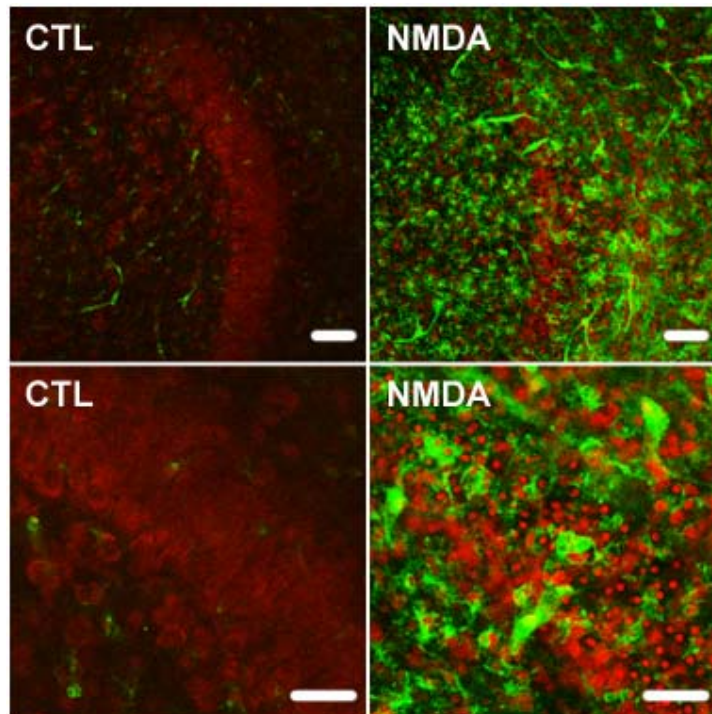
Die statistische Auswertung von mindestens drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism (Graph Pad, San Diego, CA, USA). Es wurde eine Einweganalyse der Varianz (one-way analysis of variance, ANOVA) mit einem Zusatztest nach Bonferroni oder Dunnet für mehrfache Vergleiche angewendet. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben ( $\pm$ SEM).

### 3 Ergebnisse

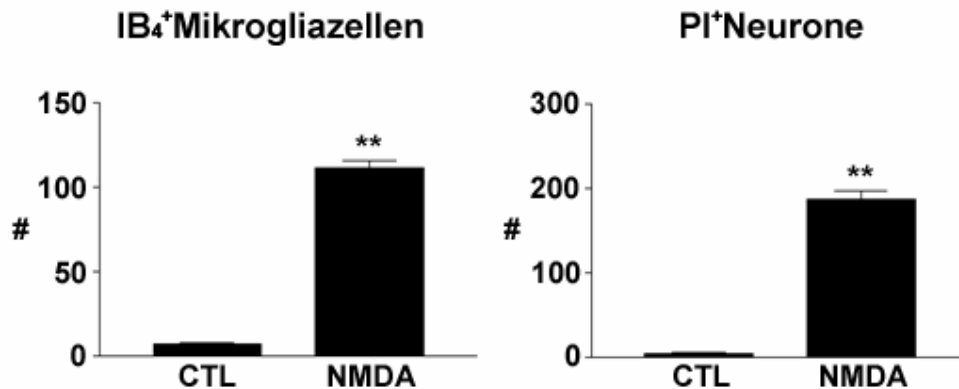
#### 3.1 Etablierung des Schädigungsmodells

Es wurde die Auswirkung einer NMDA verursachten exzitotoxischen Schädigung auf Mikrogliazellen und Neurone in der Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus (GD) von organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) untersucht.

Abbildung (Abb.) 3.1a zeigt hierzu exemplarisch eine ungeschädigte Kontrolle (CTL) und eine mit NMDA geschädigte OHSC. Ungeschädigte Kontrollen wiesen generell eine sehr gute Strukturserhaltung mit extrem wenigen Propidiumiodid (PI) positiven Neuronen (4,2 Zellen/KZS), zu erkennen an den deutlich rot gefärbten Zellkernen, auf. Außerdem lagen nur sehr wenige, grün gefärbte Isolektin B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub>) positive, ramifizierte Mikrogliazellen (6,9 Zellen/KZS) vor. Dagegen führte die 4stündige Schädigung von OHSC mit 50µM NMDA zu einem drastischen Anstieg IB<sub>4</sub> positiver, amöboider Mikrogliazellen (110 Zellen/KZS) und PI positiver Neurone (187,2 Zellen/KZS). Durch die statistische Auswertung der Anzahl IB<sub>4</sub> markierter Mikrogliazellen und PI positiver Neurone wurden diese Beobachtungen bestätigt: NMDA führte im Vergleich zu den ungeschädigten Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg amöboider Mikrogliazellen ( $p < 0,01$  gegenüber CTL) und PI positiver Neurone im GD der OHSC ( $p < 0,01$  gegenüber CTL; Abb. 3.1b).



**Abb. 3.1a:** Die beiden oberen Bilder zeigen eine Übersicht, die beiden unteren Bilder stellen die entsprechenden Vergrößerungen der KZS des GD dar. In den ungeschädigten Kontrollen (CTL) waren nur sehr wenige IB<sub>4</sub> markierte, ramifizierte Mikrogliazellen, hier grün dargestellt, und fast keine PI positiven Neurone, rot markiert, zu erkennen. Hingegen war in NMDA geschädigten OHSC im Bereich der KZS eine Akkumulation amöboider Mikrogliazellen und eine drastische Erhöhung PI positiver Neurone zu beobachten. Die Maßstäbe betragen 50µm.



**Abb. 3.1b:** Die statistische Auswertung der Mikrogliazellzahl und Anzahl PI positiver Neurone belegt, dass es nach NMDA Schädigung gegenüber den ungeschädigten Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg der IB<sub>4</sub> positiven Mikrogliazellen und PI positiven Neurone in der KZS des GD kam ( $p < 0,01$  gegenüber CTL).

### 3.2 Wirkung der Cannabinoide THC, AEA und 2-AG auf aktivierte Mikrogliazellen und degenerierende Neurone in NMDA geschädigten OHSC

In ungeschädigten OHSC zeigte sich, dass weder die beiden Endocannabinoide (EC) AEA und 2-AG noch das Phytocannabinoid THC die Mikrogliazellzahl und die Anzahl PI positiver Neurone im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen beeinträchtigten. In NMDA geschädigten OHSC kam es dagegen zu einer Akkumulation amöboider Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in der KZS des GD (Abb. 3.2 und 3.3, Tabelle 3.1 und 3.2). Die Behandlung geschädigter OHSC mit 2-AG führte bei allen gewählten 2-AG-Konzentrationen zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl und PI positiver Neurone in der KZS (Abb. 3.2, 3.3E und 3.3F, Tabelle 3.1 und 3.2). Im Gegensatz zu 2-AG bewirkten AEA und THC zwar eine Reduktion der Anzahl amöboider Mikrogliazellen, führten jedoch zu keiner

Verminderung der PI positiven Neurone in NMDA geschädigten OHSC. THC bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Mikrogliazellzahl in der KZS. Die maximale Reduktion wurde bei einer Konzentration von 15 $\mu$ M THC erzielt. Die verbliebenen Mikrogliazellen besaßen eine amöboide Morphologie (Abb. 3.2, 3.3A und 3.3B, Tabelle 3.1 und 3.2). AEA reduzierte bei allen eingesetzten AEA-Konzentrationen signifikant die Anzahl amöboider Mikrogliazellen in NMDA geschädigten OHSC (Abb. 3.2, 3.3C und 3.3D, Tabelle 3.1 und 3.2).

**Tabelle 3.1** Wirkung von THC, AEA und 2-AG auf die Mikrogliazellzahl in ungeschädigten und NMDA geschädigten OHSC

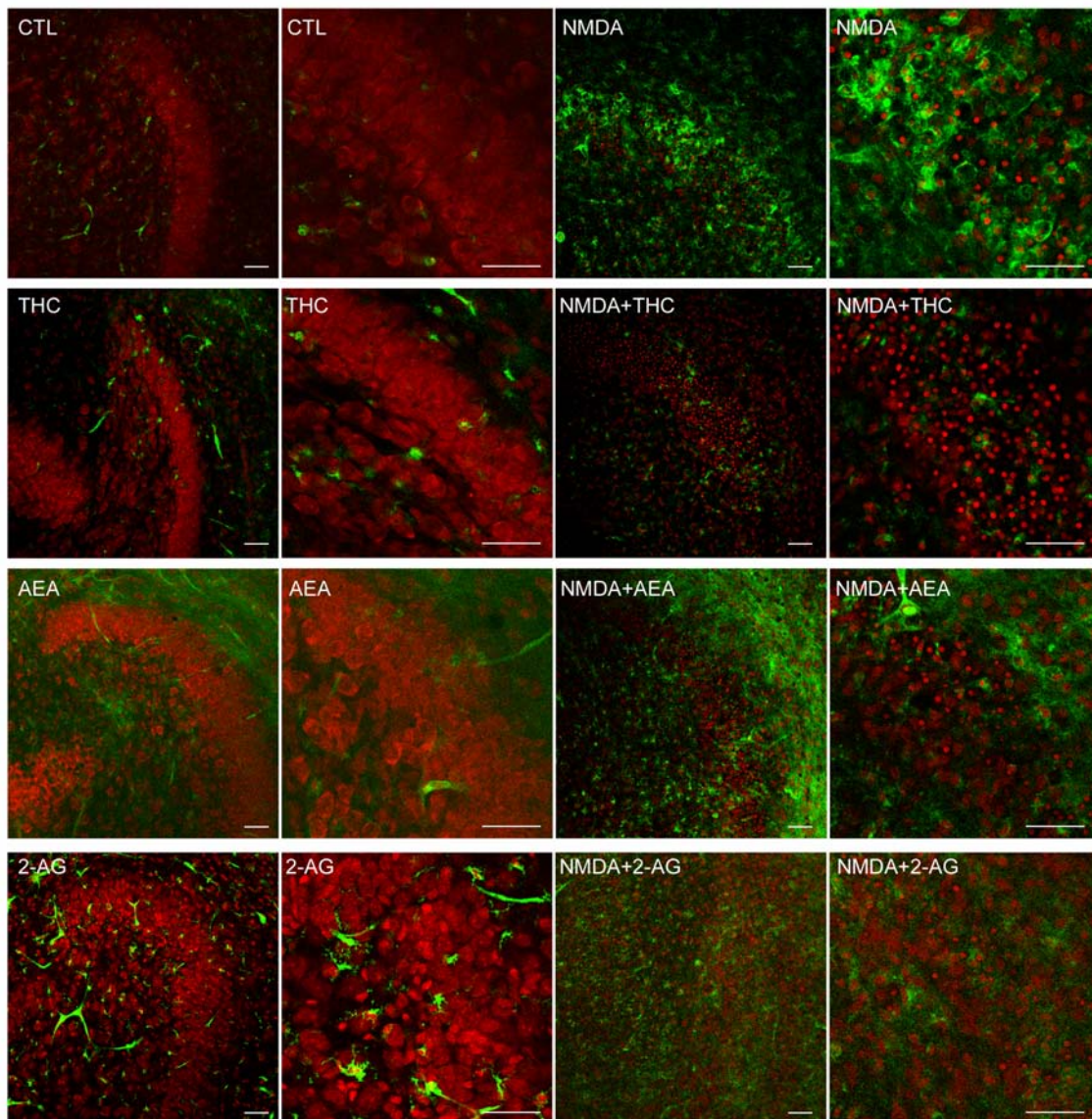
Experimentelle Gruppe	Konzentration ( $\mu$ M)	Zellzahl/KZS	Statistik
CTL		6,9	
THC	0,03	18,6	p>0,05 vs CTL
	0,3	20,6	p>0,05 vs CTL
	3	17,3	p>0,05 vs CTL
	15	6,3	p>0,05 vs CTL
AEA	0,001	19	p>0,05 vs CTL
	0,01	16,8	p>0,05 vs CTL
	0,1	13,6	p>0,05 vs CTL
	1	12,7	p>0,05 vs CTL
2-AG	0,001	16,6	p>0,05 vs CTL
	0,01	17,3	p>0,05 vs CTL
	0,1	12,6	p>0,05 vs CTL
	1	10,6	p>0,05 vs CTL
NMDA	50	116,3	
NMDA+THC	0,03	124,6	p>0,05 vs NMDA
	0,3	106,3	p>0,05 vs. NMDA
	3	52,9	p<0,01 vs. NMDA
	15	33,3	p<0,01 vs. NMDA
NMDA+AEA	0,001	101,3	p<0,01 vs. NMDA
	0,01	92,7	p<0,01 vs. NMDA
	0,1	108	p<0,05 vs. NMDA
	1	96,6	p<0,01 vs. NMDA

NMDA+2-AG	0,001	91,4	p<0,01 vs. NMDA
	0,01	90,5	p<0,01 vs. NMDA
	0,1	92,8	p<0,01 vs. NMDA
	1	87,5	p<0,01 vs. NMDA

**Tabelle 3.2** Wirkung von THC, AEA und 2-AG auf die Anzahl PI positiver Neurone in ungeschädigten und NMDA geschädigten OHSC

Experimentelle Gruppe	Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Zellzahl/KZS	Statistik
CTL		4,2	
THC	0,03	0,8	p>0,05 vs CTL
	0,3	0,6	p>0,05 vs CTL
	3	1,6	p>0,05 vs CTL
	15	1,3	p>0,05 vs CTL
AEA	0,001	6,6	p>0,05 vs CTL
	0,01	3,4	p>0,05 vs CTL
	0,1	2,6	p>0,05 vs CTL
	1	1,2	p>0,05 vs CTL
2-AG	0,001	5,3	p>0,05 vs CTL
	0,01	1,3	p>0,05 vs CTL
	0,1	2,0	p>0,05 vs CTL
	1	6,8	p>0,05 vs CTL
NMDA	50	200	
NMDA+THC	0,03	171,8	p>0,05 vs NMDA
	0,3	201,6	p>0,05 vs. NMDA
	3	245,1	p>0,05 vs. NMDA
	15	241,8	p>0,05 vs. NMDA
NMDA+AEA	0,001	205,1	p>0,05 vs. NMDA
	0,01	150,5	p>0,05 vs. NMDA
	0,1	178,2	p>0,05 vs. NMDA
	1	179,9	p>0,05 vs. NMDA
NMDA+2-AG	0,001	123,4	p<0,01 vs. NMDA
	0,01	158,6	p<0,05 vs. NMDA
	0,1	150,7	p<0,05 vs. NMDA

	1	134,2	p<0,01 vs. NMDA
--	---	-------	-----------------

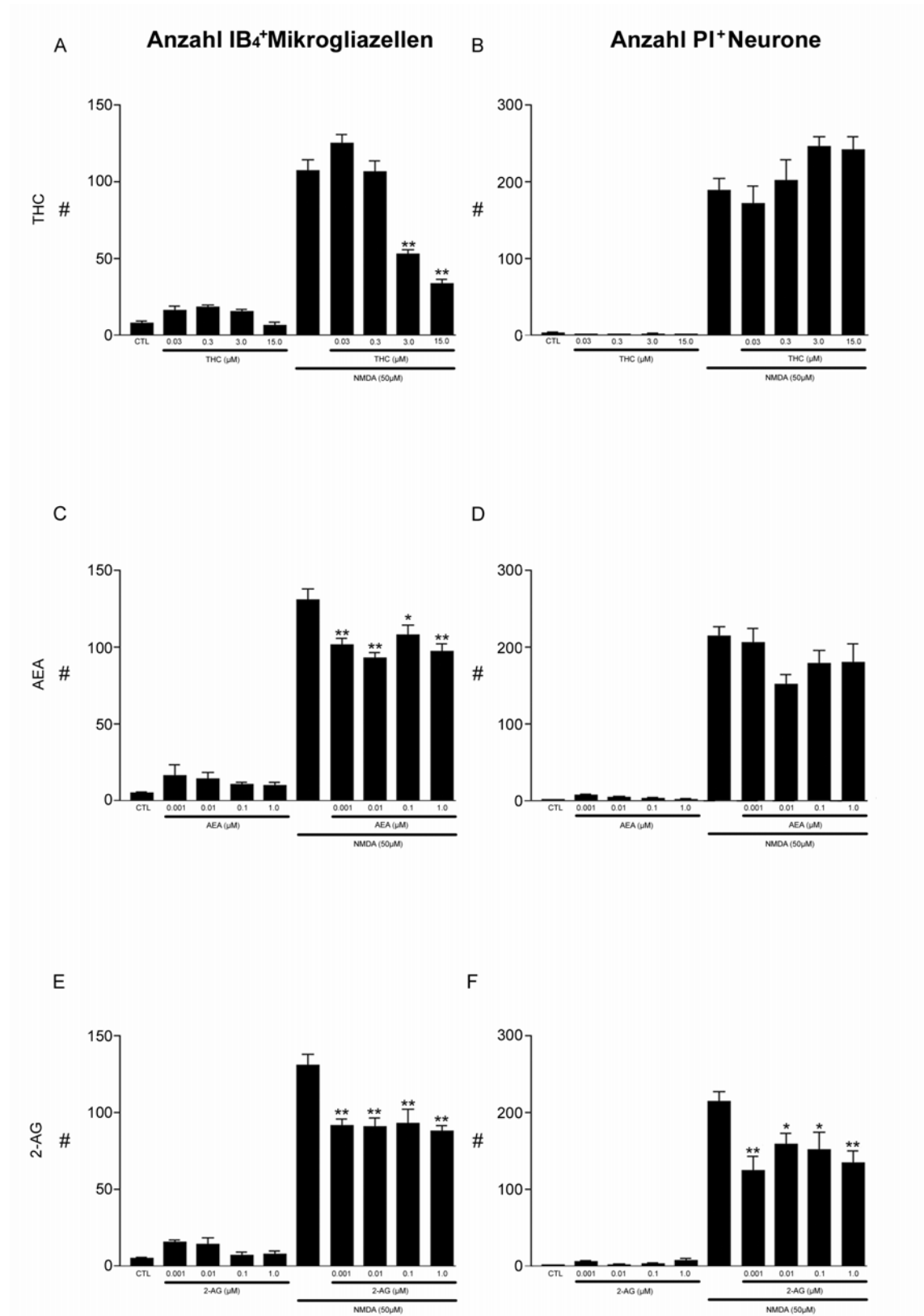


**Abb. 3.2:** Effekte von THC, AEA und 2-AG in der OHSC. CLSM Bilder der untersuchten Gruppen jeweils links im Überblick und rechts in Vergrößerung. Zu sehen sind Doppelfärbungen mit IB<sub>4</sub> (Mikrogliazellen, grün) und PI (degenerierende Neurone, rot). Unbehandelte Kontrollen (CTL) zeigten eine sehr gute Strukturhaltung: so wurden annähernd keine PI positiven Neurone und nur wenige ramifizierte IB<sub>4</sub> positive Mikrogliazellen gefunden. Mit 50µM NMDA behandelte OHSC zeigten eine massive Akkumulation amöboider, IB<sub>4</sub> markierter Mikrogliazellen und einen dramatischen Anstieg in der Anzahl PI positiver Neurone. OHSC, welche nur mit THC (3µM) behandelt wurden, zeigten fast keine PI positiven Neurone und

nur sehr wenige IB<sub>4</sub> markierte, ramifizierte Mikrogliazellen. Die gleichzeitige Behandlung von OHSC mit NMDA+THC (3µM) resultierte in einer starken Reduktion der Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen, es waren jedoch zahlreiche PI positive Neurone nach wie vor sichtbar. In OHSC, welche ausschließlich mit AEA (0.01µM) behandelt wurden, konnten praktisch keine PI markierten Neurone und nur sehr wenige IB<sub>4</sub> gefärbte Mikrogliazellen nachgewiesen werden. Die gleichzeitige Behandlung von OHSC mit NMDA+AEA (0.01µM) resultierte in einer starken Reduktion der Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen, die Anzahl PI positiver Neurone blieb jedoch erhöht. Allein mit 2-AG (0.001µM) behandelte OHSC zeigten annähernd keine PI positiven Neurone und sehr wenige IB<sub>4</sub> markierte, ramifizierte Mikrogliazellen. Eine simultane Behandlung von OHSC mit NMDA+2-AG (0.001µM) resultierte in einer starken Reduktion sowohl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen als auch PI positiver Neurone. Die Maßstäbe betragen 50µm.

---





**Abb. 3.3:** Statistische Analyse der Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in ungeschädigten OHSC, die mit THC, AEA oder 2-AG behandelt wurden, sowie in geschädigten OHSC, die mit THC, AEA oder 2-AG behandelt wurden.

A: Ungeschädigte OHSC, die mit unterschiedlichen THC-Konzentrationen behandelt wurden, enthielten nur sehr wenige IB<sub>4</sub> positive Mikrogliazellen. In geschädigten OHSC, die mit THC behandelt wurden, war gegenüber NMDA geschädigten OHSC die durchschnittliche Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen signifikant reduziert. Diese Reduktion war konzentrationsabhängig. Die maximale Reduktion der Mikrogliazellzahl (67.3%) wurde bei einer THC Konzentrationen von 15µM beobachtet. B: Ungeschädigte OHSC, die mit THC behandelt wurden, enthielten annähernd keine PI positive Neurone. Die Behandlung von geschädigten OHSC mit unterschiedlichen Konzentrationen an THC übte keinen Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl PI positiver Neurone aus. C: Die Behandlung ungeschädigter OHSC mit unterschiedlichen AEA-Konzentrationen resultierte in einer sehr niedrigen Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen. In geschädigten OHSC, die mit AEA behandelt wurden, war die durchschnittliche Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC signifikant reduziert. Die signifikante Reduktion der IB<sub>4</sub> positiven Mikrogliazellen wurde für alle verwendeten AEA-Konzentrationen beobachtet. D: Ungeschädigte OHSC, die mit AEA behandelt wurden, zeigten nur sehr wenige PI positive Neurone. Eine Behandlung geschädigter OHSC mit unterschiedlichen AEA-Konzentrationen hatte keinen Effekt auf die durchschnittliche Anzahl PI positiver Neurone. E: Die Behandlung ungeschädigter OHSC mit 2-AG resultierte in einer sehr geringen Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen. In geschädigten und mit 2-AG behandelten OHSC war die durchschnittliche Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen verglichen mit NMDA geschädigten OHSC signifikant reduziert. Diese signifikante Reduktion IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen Zellen wurde für alle verwendeten 2-AG-Konzentrationen beobachtet. F: Die Behandlung ungeschädigter OHSC mit unterschiedlichen 2-AG-Konzentrationen resultierte in einer sehr niedrigen Anzahl PI positiver Neurone. Die simultane Behandlung geschädigter OHSC mit 2-AG-Konzentrationen von 0.001µM, 0.1µM oder 1µM reduzierte die durchschnittliche Anzahl PI positiver Neurone signifikant. \*\*p<0.01, \*p<0.05 gegenüber NMDA. Die Fehlerbalken repräsentieren die mittlere Standardabweichung (SEM).

### **3.3 Einfluss der CB1 und CB2 Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 auf aktivierte Mikrogliazellen und degenerierende Neurone in NMDA geschädigten OHSC**

Die 15minütige Behandlung von OHSC mit dem CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, gefolgt von einer 4stündigen NMDA Schädigung bei gleichzeitiger Inkubation der OHSC mit AM251 und THC (3 $\mu$ M), hatte keinen signifikanten Einfluss auf die von THC verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl in der KZS des GD von geschädigten OHSC (10 $\mu$ M AM251+3 $\mu$ M THC+NMDA, 51,8 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber 3 $\mu$ M THC+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5A).

Dagegen führte die 15minütige Präinkubation von OHSC mit AM251, gefolgt von einer gemeinsamen Inkubation mit AM251+THC (3 $\mu$ M) und NMDA zu einer signifikanten Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS des GD im Vergleich zu geschädigten OHSC, die mit THC allein behandelt wurden (10 $\mu$ M AM251+3 $\mu$ M THC+NMDA, 132,2 Zellen/KZS,  $p<0,01$  gegenüber 3 $\mu$ M THC+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5B).

Die Vorbehandlung geschädigter OHSC mit AM251, gefolgt von einer parallelen Behandlung der OHSC mit AM251+AEA (0,01 $\mu$ M) und NMDA, verursachte keine signifikante Veränderung der Mikrogliazellzahl im Vergleich zu allein mit AEA behandelten, geschädigten OHSC (10 $\mu$ M AM251+0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, 72,8 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber 0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5C).

Hingegen bewirkte die Vorinkubation von OHSC mit AM251, gefolgt von einer gemeinsamen Inkubation mit AM251+AEA (0,01 $\mu$ M) und NMDA, eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone (10 $\mu$ M AM251+0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, 84,6 Zellen/KZS,  $p<0,01$  gegenüber 0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5D).

Eine Präinkubation von OHSC mit AM251, gefolgt von einer parallelen Behandlung der OHSC mit AM251+2-AG (0,001 $\mu$ M) und NMDA, führte zu einer weiteren Reduktion der Mikrogliazellzahl im Vergleich zu geschädigten OHSC, die mit 2-AG allein behandelt wurden (10 $\mu$ M AM251+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 60,8 Zellen/KZS,  $p<0,01$  gegenüber 0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5E).

Die 15minütige Vorbehandlung geschädigter OHSC mit den CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, gefolgt von einer gemeinsamen Applikation mit AM251+2-AG (0,001 $\mu$ M) und NMDA, führte, verglichen mit geschädigten OHSC, die mit 2-AG allein behandelt wurden, zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl degenerierender

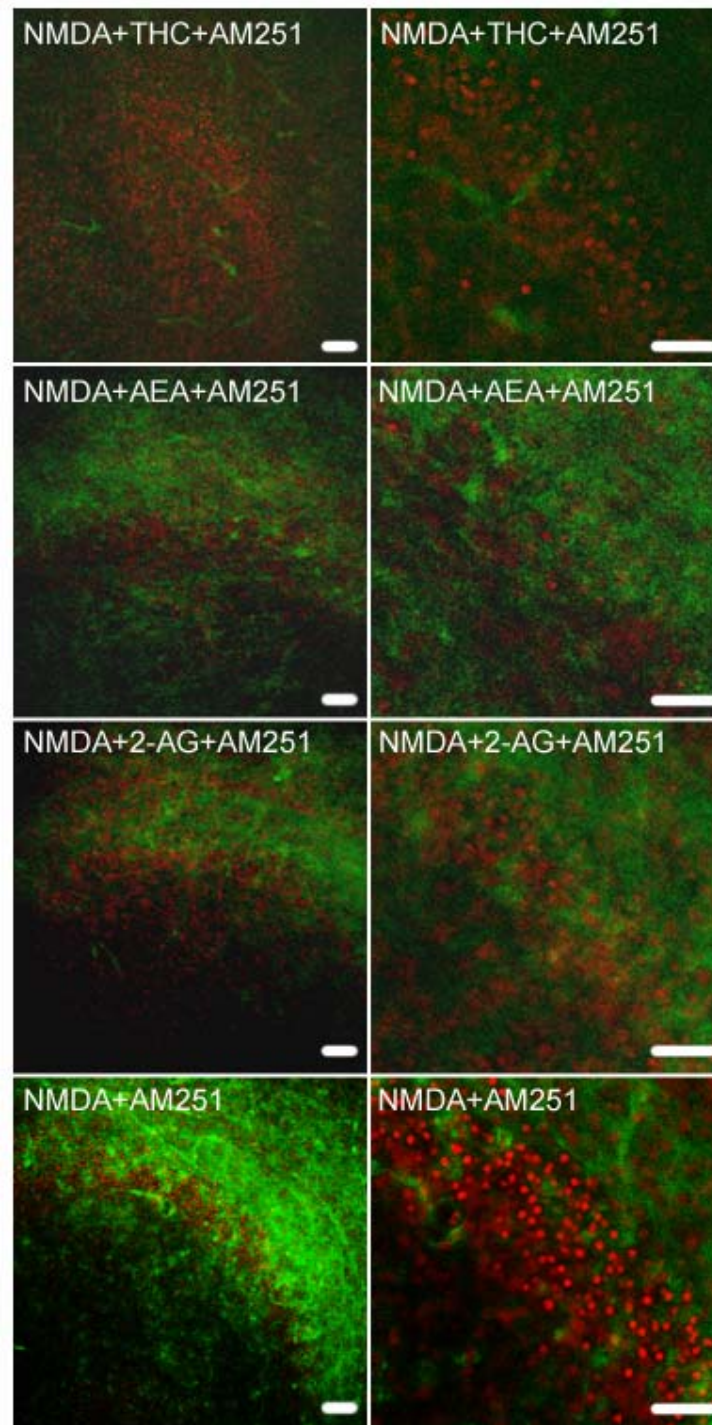
Neurone in der KZS des GD ( $10\mu\text{M}$  AM251+ $0,001\mu\text{M}$  2-AG+NMDA, 74,3 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber  $0,001\mu\text{M}$  2-AG+NMDA, Abb. 3.4 und 3.5F).

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (CTL) verursachte die Behandlung von ungeschädigten OHSC mit AM251 keine signifikanten Veränderungen der Anzahl der Mikrogliazellen ( $10\mu\text{M}$  AM251, 5,7 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.4 und 3.5G). Im Vergleich zu geschädigten OHSC verursachte die Behandlung geschädigter OHSC mit AM251 ebenfalls keine signifikante Veränderung der Mikrogliazellzahl ( $10\mu\text{M}$  AM251+NMDA, 113 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber NMDA, Abb.3.4 und 3.5G).

Nach Applikation des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 auf unbehandelte OHSC kam es verglichen mit unbehandelten Kontrollen zu keiner signifikanten Veränderung der Anzahl PI positiver Neurone ( $10\mu\text{M}$  AM251, 0,3 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.4 und 3.5H). Auch nach NMDA Schädigung beeinflusste AM251 die Anzahl der PI positiven Neurone nicht ( $10\mu\text{M}$  AM251+NMDA, 207,8 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber NMDA, Abb. 3.4 und 3.5H).

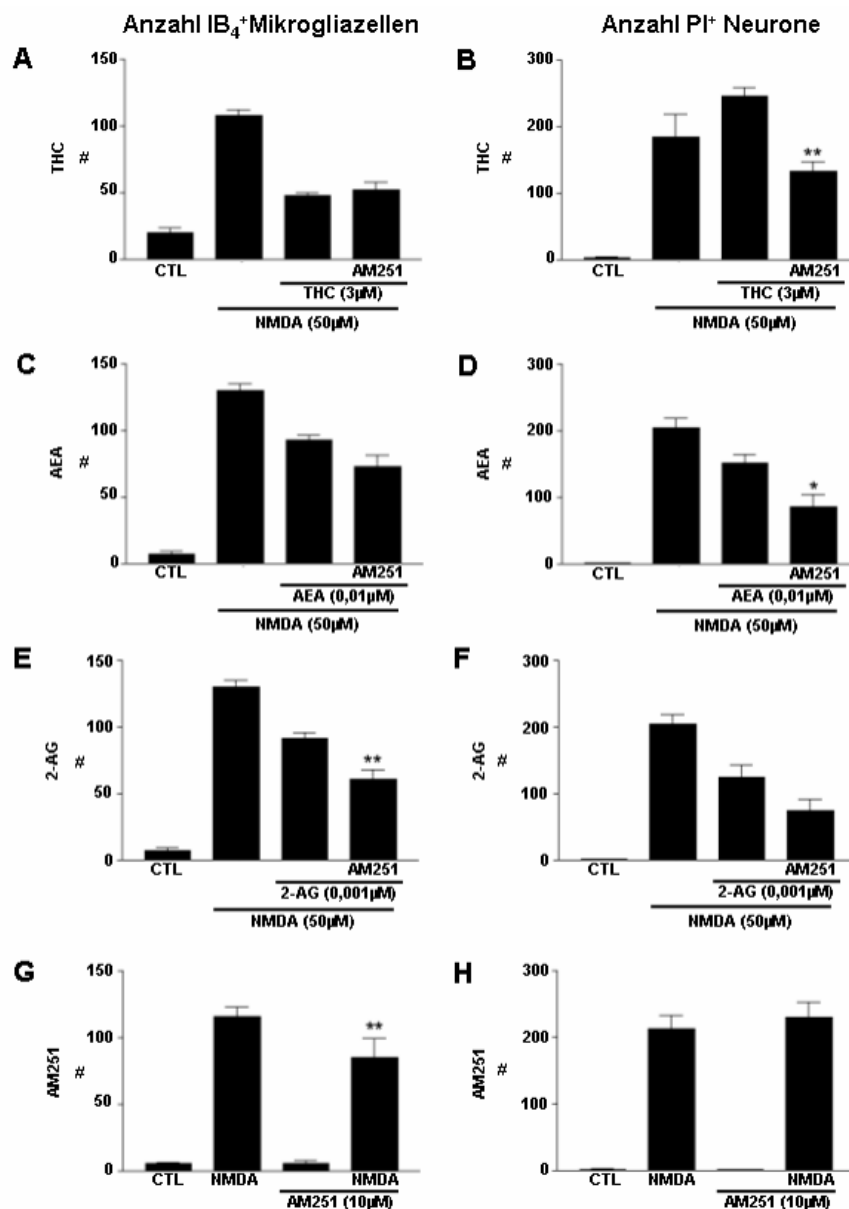
---

**Abb. 3.4:** Auf der linken Seite sind Übersichtsbilder, auf der rechten Seite die entsprechenden Vergrößerungen der KZS des GD von NMDA geschädigten OHSC zu sehen. Geschädigte OHSC, die mit AM251+THC ( $3\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, wiesen einige wenige amöboide Mikrogliazellen und PI positive Neurone im Bereich des GD auf. Auch in geschädigten OHSC, die mit AM251+AEA bzw. AM251+2-AG behandelt wurden, sind wenige PI positive Neurone nachweisbar. Die in der KZS markierten Mikrogliazellen zeigten bei beiden Gruppen durchweg eine amöboide Morphologie. Geschädigte OHSC, die mit AM251 behandelt wurden, zeigten in der KZS eine Vielzahl PI positiver Neurone und amöboider Mikrogliazellen im Bereich des GD. Die Maßstäbe betragen  $50\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.5:** Die statistische Auswertung der Mikrogliazellzahl und der Anzahl PI positiver Neurone zeigte, dass AM251 den reduzierenden Effekt von THC und AEA auf die Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC nicht beeinträchtigte. Hingegen bewirkte AM251 in NMDA+THC bzw. NMDA+AEA behandelten OHSC eine

signifikante Reduktion ( $p < 0,01$ ) der PI positiven Neurone im Vergleich zu NMDA+THC bzw. NMDA+AEA behandelten Gruppen. Im Falle von 2-AG führte die Applikation von AM251 zu NMDA+2-AG behandelten OHSC zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,01$ ) der Mikrogliazellzahl im Vergleich zu NMDA+2-AG behandelten Gruppen. Die Behandlung von OHSC mit AM251+2-AG+NMDA beeinflusste dagegen im Vergleich zu NMDA+2-AG behandelten OHSC die Anzahl PI positiver Neurone nicht ( $p > 0,05$ ). In geschädigten OHSC, die mit AM251 inkubiert wurden, kam es im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl ( $p < 0,01$ ), jedoch nicht zu einer Veränderung der Anzahl PI positiver Neurone ( $p > 0,05$ ).



Die 15minütige Vorbehandlung von OHSC mit dem CB2 Rezeptor Antagonisten AM630, gefolgt von einer gemeinsamen Behandlung mit AM630, THC (3 $\mu$ M) und NMDA, führte zu einer signifikanten Abschwächung der durch THC verursachten Reduktion der Mikrogliazellzahl in der KZS des GD von geschädigten OHSC (10 $\mu$ M AM630+3 $\mu$ M THC+NMDA, 69,9 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber 3 $\mu$ M THC+NMDA, Abb. 3.6 und 3.7A).

Bezogen auf die Anzahl degenerierender Neurone bewirkte die Präinkubation mit AM630, gefolgt von einer gleichzeitigen Inkubation mit AM630, THC (3 $\mu$ M) und NMDA, eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS des GD im Vergleich geschädigten OHSC, die mit THC (3 $\mu$ M) und NMDA behandelt wurden (10 $\mu$ M AM630+3 $\mu$ M THC+NMDA, 162,8 Zellen/KZS,  $p < 0,05$  gegenüber 3 $\mu$ M THC+NMDA, Abb. 3.6 und 3.7B).

Eine Präinkubation von OHSC mit AM630, gefolgt von einer gemeinsamen Behandlung mit AM630, AEA (0,01 $\mu$ M) und NMDA, führte zu keiner signifikanten Veränderung der Mikrogliazellzahl in der KZS des GD im Vergleich zu OHSC, die mit AEA und NMDA behandelt wurden (10 $\mu$ M AM630+0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, 95,7 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber 0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, Abb.3.6 und 3.7C).

Die Applikation des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 bewirkte eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS des GD von geschädigten OHSC, wobei die Applikation von 0,01 $\mu$ M AEA allein keinen Einfluss auf die Anzahl PI positiver Neurone in geschädigten OHSC besaß (10 $\mu$ M AM630+0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, 79,8 Zellen/KZS,  $p < 0,05$  gegenüber 0,01 $\mu$ M AEA+NMDA, Abb.3.6 und 3.7D).

Die 15minütige Präinkubation von AM630, gefolgt von einer gleichzeitigen Inkubation der OHSC mit AM630, 2-AG (0,001 $\mu$ M) und NMDA führte verglichen mit 2-AG und NMDA behandelten OHSC zu einer Reduktion der Mikrogliazellzahl in der KZS des GD (10 $\mu$ M AM630+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 58,8 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber 0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, Abb. 3.6 und 3.7E).

Auf die 2-AG vermittelte Neuroprotektivität in geschädigten OHSC hatte die Applikation von AM630 keinen Einfluss: geschädigte OHSC, die mit AM630 und 2-AG (0,001 $\mu$ M) behandelt wurden, hatten gegenüber geschädigten OHSC, die ausschließlich mit 2-AG inkubiert wurden, keine signifikant veränderte Anzahl PI positiver Neurone in der KZS des GD (10 $\mu$ M AM630+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 110,8 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber 2-AG (0,001 $\mu$ M)+NMDA, Abb.3.6 und 3.7F).

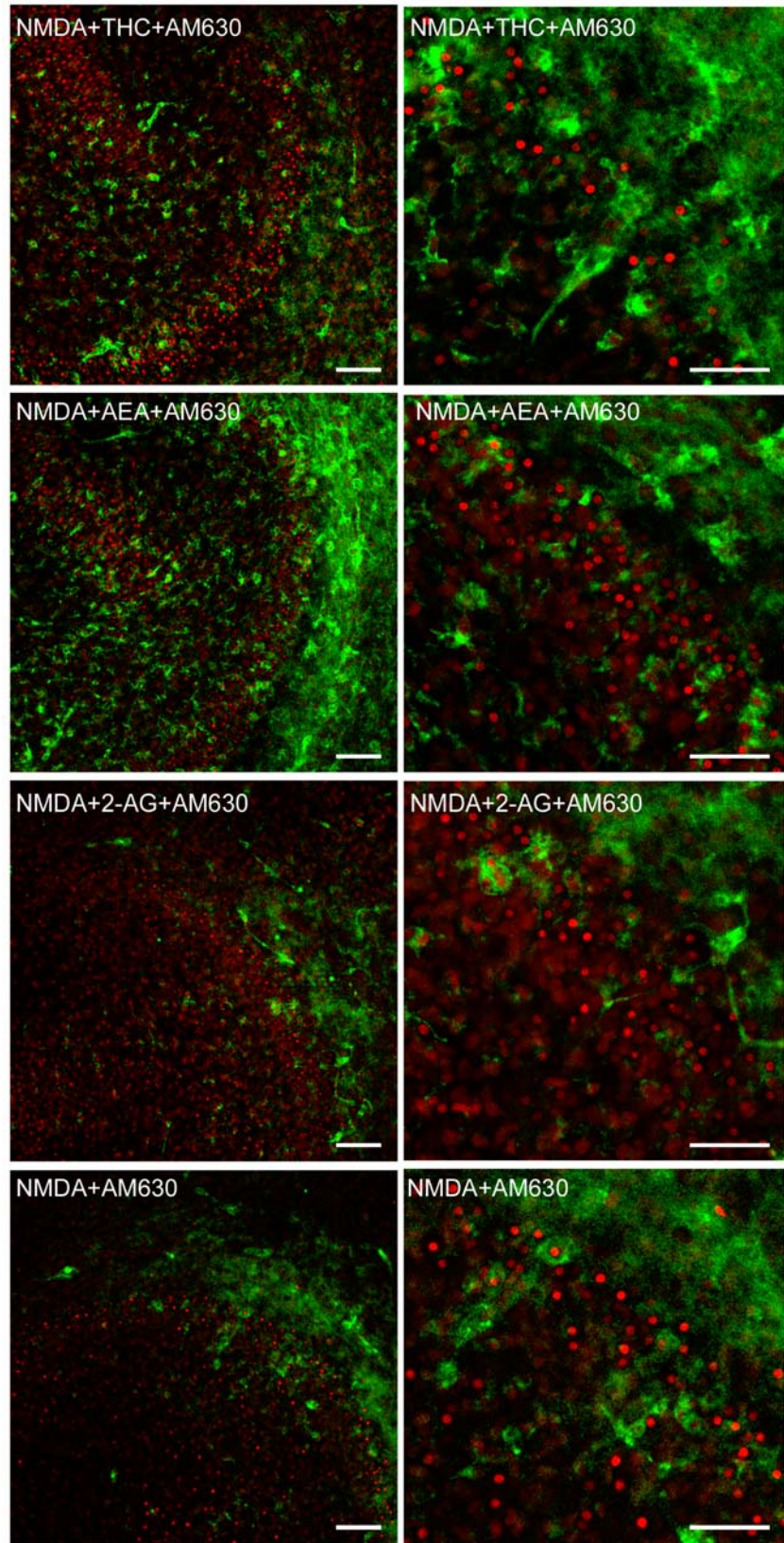
Die Behandlung ungeschädigter OHSC mit dem CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 beeinflusste die Anzahl der Mikrogliazellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nicht (10 $\mu$ M AM630, 2,4 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.6 und 3.7G). AM630 führte in geschädigten OHSC hingegen zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl (10 $\mu$ M AM630+NMDA, 63,5 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.6 und 3.7G).

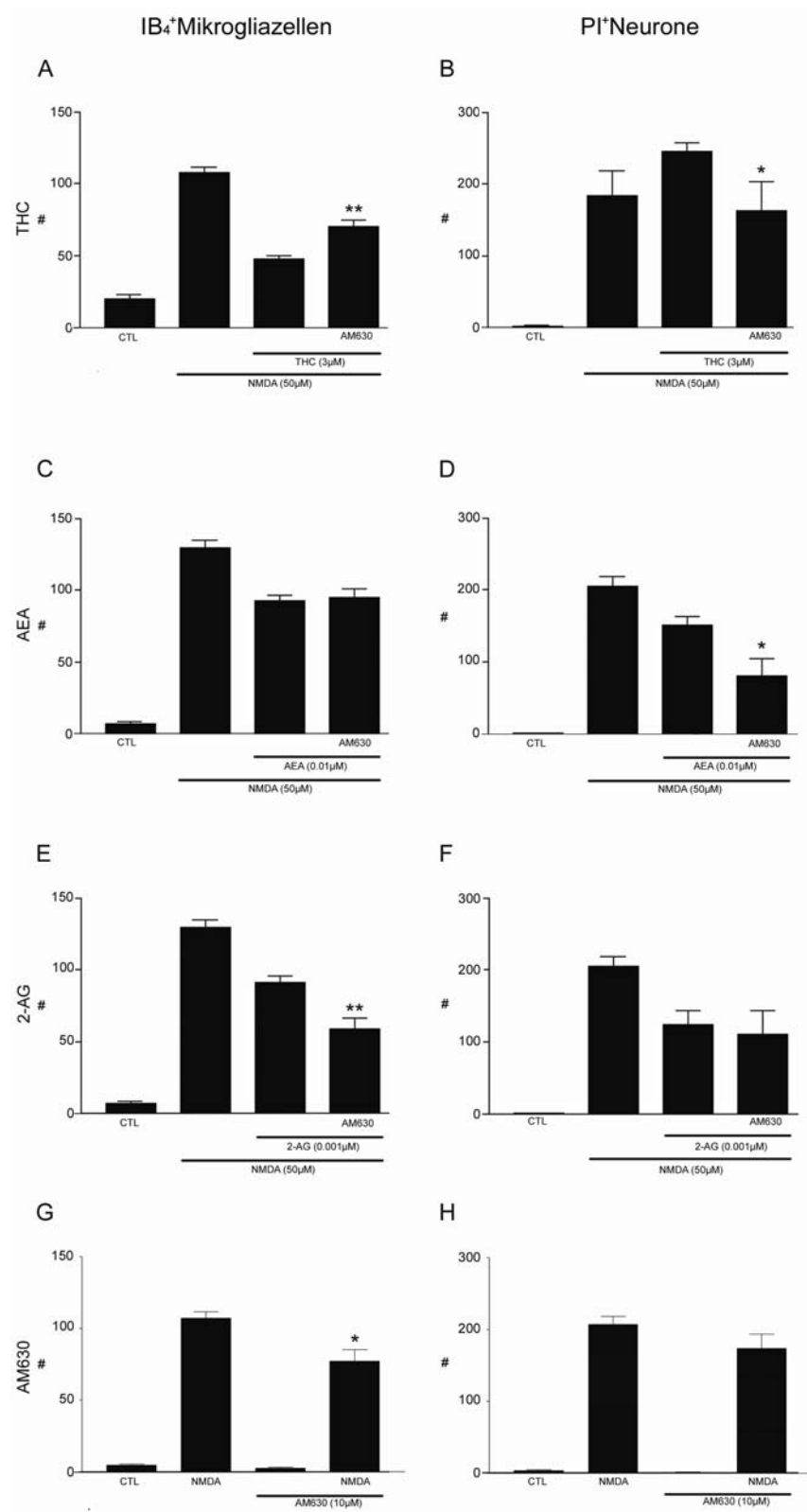
In ungeschädigten OHSC bewirkte AM630 keine signifikante Veränderung der Anzahl PI positiver Neurone im Vergleich zu den Kontrollen (10 $\mu$ M AM630, 4,6 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.6 und 3.7H).

Wurde AM630 vor und während einer NMDA Schädigung auf die OHSC gegeben, so kam es zu keiner signifikanten Veränderung in der Anzahl PI-positiver Neurone (10 $\mu$ M AM630+NMDA, 174,2 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber NMDA, Abb. 3.6 und 3.7H).

**Abb. 3.6:** Effekte des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 (10 $\mu$ M) auf THC+NMDA, AEA+NMDA und 2-AG+NMDA behandelte OHSC. Mit AM630+THC (3 $\mu$ M)+NMDA behandelte OHSC zeigten verglichen mit NMDA+THC (3 $\mu$ M) behandelten OHSC eine gesteigerte Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen. Die Anzahl PI positiver Neurone war in AM630+THC (3 $\mu$ M)+NMDA behandelten OHSC im Vergleich zu OHSC, die nur mit THC (3 $\mu$ M)+NMDA behandelt wurden, reduziert. Die Inkubation von OHSC mit AM630+AEA (0.01 $\mu$ M)+NMDA hatte keinen Effekt auf die Anzahl der Mikrogliazellen, führte aber, verglichen mit OHSC, welche mit AEA (0.01 $\mu$ M)+NMDA inkubiert wurden zu einer starken Reduktion PI positiver Neurone innerhalb der KZS des GD. OHSC, welche mit AM630+2-AG (0.001 $\mu$ M)+NMDA behandelt wurden, zeigten noch weniger IB<sub>4</sub> markierte Mikrogliazellen als OHSC, die mit 2-AG (0.001 $\mu$ M)+NMDA behandelt wurden. Die Inkubation von OHSC mit AM630+2-AG (0.001 $\mu$ M)+NMDA resultierte in einer starken Reduktion PI positiver Neurone, welche vergleichbar mit der Reduktion war, die nach einer 2-AG (0.001 $\mu$ M)+NMDA Behandlung erfolgte. OHSC, die mit AM630 (10 $\mu$ M)+NMDA behandelt wurden, zeigten eine starke Akkumulation von IB<sub>4</sub> positiven Mikrogliazellen und einem massiven Anstieg der Anzahl PI positiver Neurone. Die Maßstäbe betragen 50 $\mu$ m.







**Abb. 3.7:** Statistische Analyse der durchschnittlichen Anzahl von IB<sub>4</sub> positiven Mikrogliazellen und PI positiven Neuronen in OHSC, welche mit 10µM AM630+THC (3µM)+NMDA bzw. AEA (0.01µM)+NMDA oder 2-AG (0.001µM)+NMDA behandelt wurden. A: Der reduzierende Effekt des THC auf die Mikrogliazellzahl wurde durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 signifikant antagonisiert. B: Die Inkubation von NMDA+THC (3µM) behandelten OHSC mit AM630 führte zu einer signifikanten Reduktion PI positiver Neurone im Vergleich zu OHSC, die nur mit NMDA+THC (3µM) behandelt wurden. C: In geschädigten OHSC antagonisierte AM630 die AEA-induzierte Reduktion der Mikrogliazellzahl nicht. D: Die Anzahl PI positiver Neurone wurde durch zusätzliche Applikation von AM630 zu AEA (0.01µM)+NMDA behandelten OHSC signifikant reduziert. E: Die Inkubation von 2-AG (0.001µM)+NMDA behandelten OHSC mit AM630 führte, verglichen mit OHSC, die nur mit 2-AG (0.001µM)+NMDA behandelt wurden, zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl. F: AM630 übte keinen Effekt auf die 2-AG induzierte Reduktion PI positiver Neurone in geschädigten OHSC aus. G: AM630 reduzierte die Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen. H: Die durchschnittliche Anzahl PI positiver Neurone in geschädigten OHSC, welche mit AM630 (10µM) behandelt wurden, war nicht signifikant unterschiedlich als in OHSC, welche nur mit NMDA behandelt wurden. \*\*<0.01, \*<0.05 gegenüber THC+NMDA, AEA+AEA oder 2-AG+NMDA. Die Fehlerbalken repräsentieren die Durchschnittswerte.

### **3.4 Funktionelle Bedeutung des abnormalen (abn) Cannabidiol Rezeptors für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA geschädigten OHSC**

Kontrollschnitte, die mit abn Cannabidiol (10 $\mu$ M) behandelt wurden, wiesen keine signifikanten Veränderungen in der Mikrogliazellzahl gegenüber unbehandelten Kontrollschnitten auf (10 $\mu$ M abn Cannabidiol, 8,4 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.8a und 3.9A). Die Behandlung geschädigter OHSC mit abn Cannabidiol (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M oder 10 $\mu$ M) führte im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Mikrogliazellzahl im GD der OHSC (abn Cannabidiol: 0,1 $\mu$ M, 99,2 Zellen/KZS; 1 $\mu$ M, 82,3 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M, 67,1 Zellen/KZS, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.8a und 3.9A).

Ungeschädigte OHSC, die mit abn Cannabidiol (10 $\mu$ M) behandelt wurden, wiesen fast keine PI positiven Neurone in der KZS des GD auf (10 $\mu$ M abn Cannabidiol, 2,1 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.8a und 3.9B).

Nach einer NMDA Schädigung kam es in der OHSC zu einem massiven Anstieg degenerierender Neurone in der KZS des GD. Die Applikation von abn Cannabidiol (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M oder 10 $\mu$ M) verursachte eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone. Die effektivste abn Cannabidiol Konzentration betrug dabei 1 $\mu$ M (abn Cannabidiol: 0,1 $\mu$ M, 94,5 Zellen/KZS; 1 $\mu$ M, 67,8 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M, 102,5 Zellen/KZS, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.8a und 3.9B).

Die durch abn Cannabidiol (10 $\mu$ M) verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC konnte durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 (30 $\mu$ M) und Cannabidiol (10 $\mu$ M) signifikant aufgehoben werden (30 $\mu$ M O-1918+10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, 117,6 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, 108,3 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber 10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, Abb.3.8b und 3.9C).

Auch die durch abn Cannabidiol (10 $\mu$ M) verursachte Reduktion der PI positiven Neurone in geschädigten OHSC konnte durch die Antagonisten O-1918 (30 $\mu$ M) und Cannabidiol (10 $\mu$ M) signifikant aufgehoben werden (30 $\mu$ M O-1918+10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, 144,8 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, 145 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber 10 $\mu$ M abn Cannabidiol+NMDA, Abb.3.8b und 3.9D).

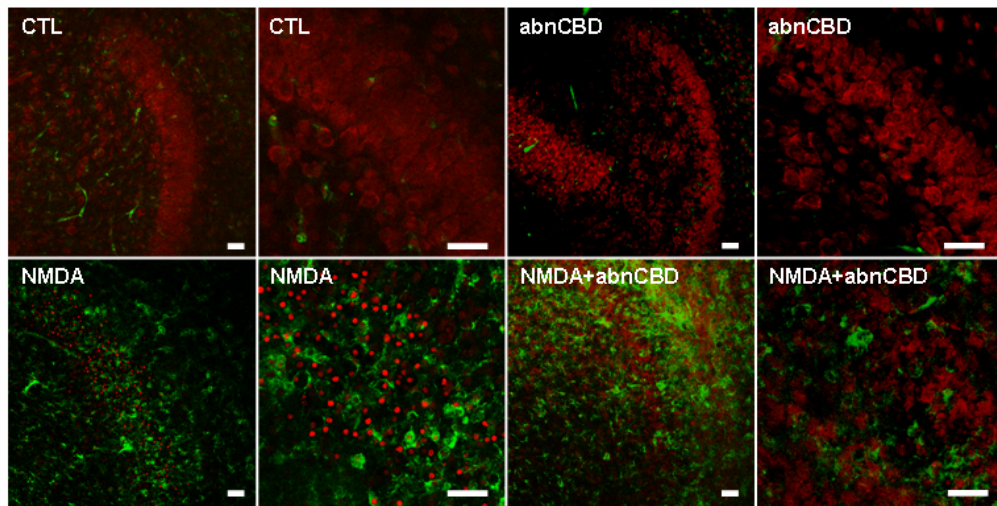
2-AG reduzierte in geschädigten OHSC signifikant die Anzahl der Mikrogliazellen (63,1 Zellen/KZS). Die beiden Antagonisten O-1918 (30 $\mu$ M) und Cannabidiol (10 $\mu$ M) konnten die 2-AG verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl signifikant aufheben (30 $\mu$ M O-1918+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 111,6 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 112,9 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber 0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, Abb.3.8c und 3.9E).

Die durch 2-AG verursachte Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS von geschädigten OHSC (114,5 Zellen/KZS) konnte durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 (30 $\mu$ M) und Cannabidiol (10 $\mu$ M) signifikant aufgehoben werden (30 $\mu$ M O-1918+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 148 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, 159,7 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber 0,001 $\mu$ M 2-AG+NMDA, Abb.3.8c und 3.9F).

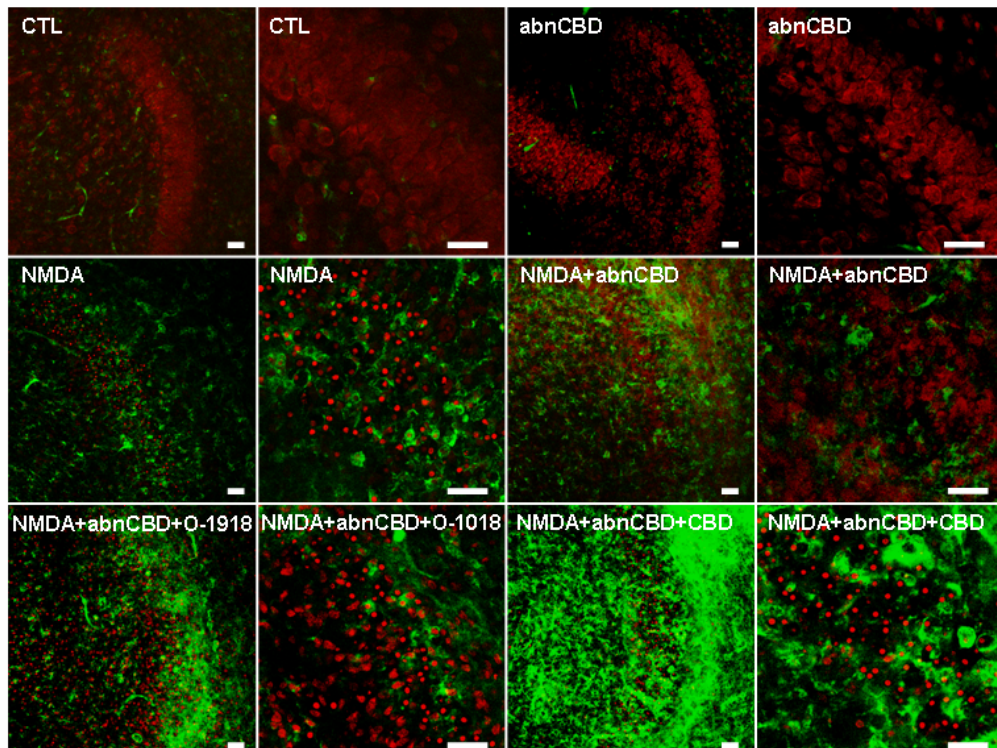
Auf den Anstieg der Mikrogliazellzahl in der KZS des GD von geschädigten OHSC hatte die Applikation der abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol selbst keinen signifikanten Effekt (30 $\mu$ M O-1918+NMDA, 109,4 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+NMDA, 113,7 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber NMDA, Abb.3.8d und 3.9G).

Allerdings führte die Zugabe der beiden Antagonisten zu geschädigten OHSC jeweils zu einer signifikanten Reduktion der PI-positiven Neurone in der KZS des GD (30 $\mu$ M O-1918+NMDA, 155,5 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M Cannabidiol+NMDA, 136 Zellen/KZS, für beide Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.8d und 3.9H).

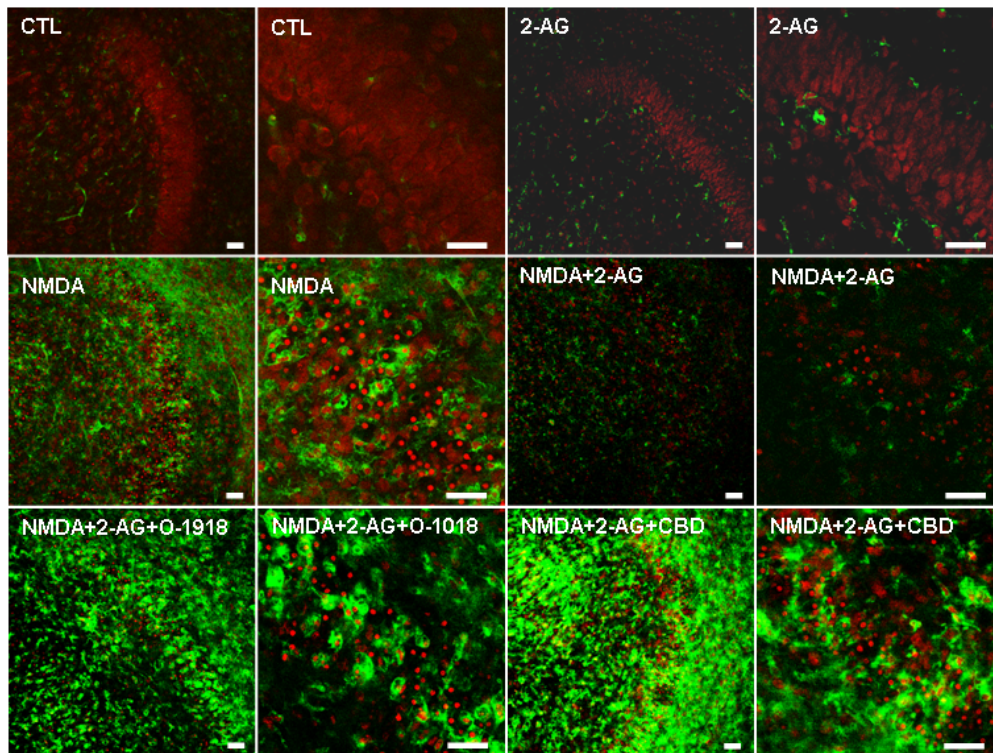
**Abb. 3.8a:** Zu allen gezeigten Gruppen sind stets links Übersichtsbilder und rechts daneben die entsprechenden Vergrößerungen gezeigt. Verglichen mit den unbehandelten Kontrollen wiesen die abn Cannabidiol behandelten OHSC eine gute Strukturhaltung mit fast keinen sichtbaren Mikrogliazellen und PI-positiven Neuronen in der KZS GD auf. Im Vergleich zu geschädigten OHSC führte die Applikation von abn Cannabidiol zu einer deutlichen Verminderung amöboider Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in der KZS des GD von geschädigten OHSC. Die Maßstäbe betragen 50 $\mu$ m.



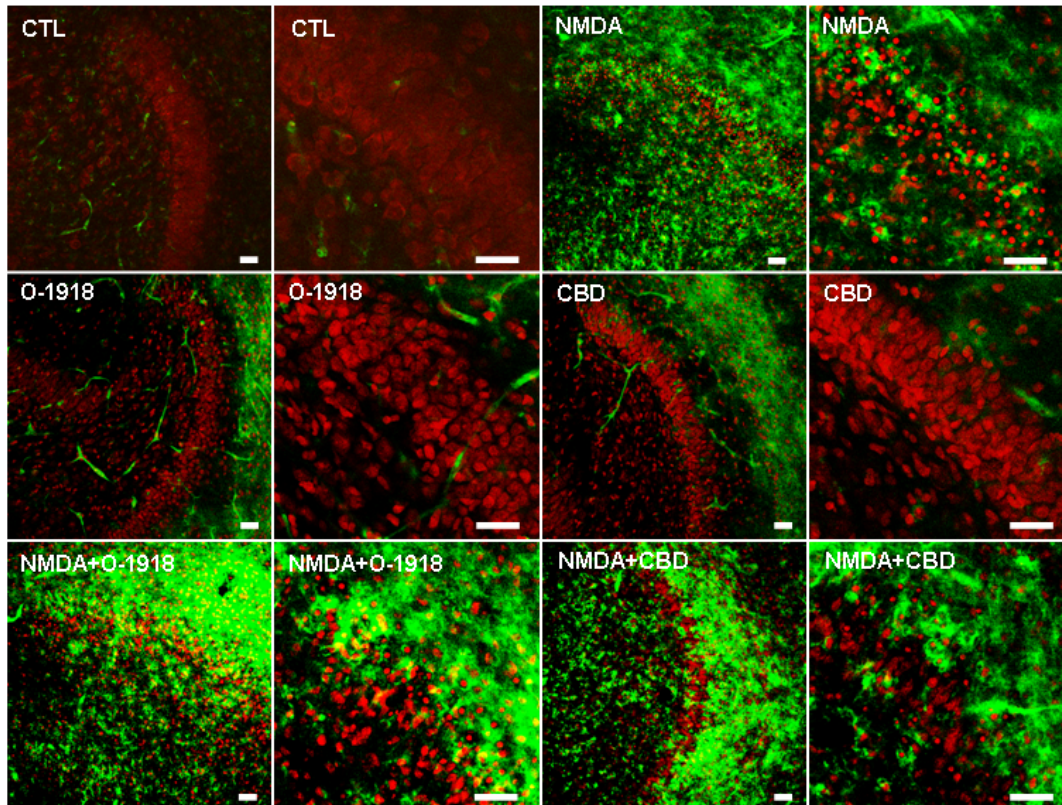
**Abb. 3.8b:** Die abn Cannabidiol verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl und der Anzahl PI positiver Neurone wurde durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol aufgehoben: so waren in NMDA+abn Cannabidiol+O-1918 bzw. NMDA+abn Cannabidiol+Cannabidiol behandelten OHSC im GD zahlreiche amöboide Mikrogliazellen und PI positive Neurone vorzufinden. Die Maßstäbe entsprechen 50µm.



**Abb. 3.8c:** Ungeschädigte OHSC, die mit 2-AG behandelt wurden, wiesen wie die Kontrollen (CTL) nur sehr wenige, ramifizierte Mikrogliazellen und fast keine PI positiven Neurone in der KZS des GD auf. Geschädigte OHSC, die mit 2-AG behandelt wurden, zeigten wenige amöboide Mikrogliazellen und PI positive Neurone im GD. Dagegen waren in geschädigten OHSC, die mit den abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918+2-AG bzw. Cannabidiol+2-AG behandelt wurden, wie in NMDA geschädigten OHSC zahlreiche amöboide Mikrogliazellen und PI positive Neurone in der KZS des GD sichtbar. Die Maßstäbe betragen 50µm.



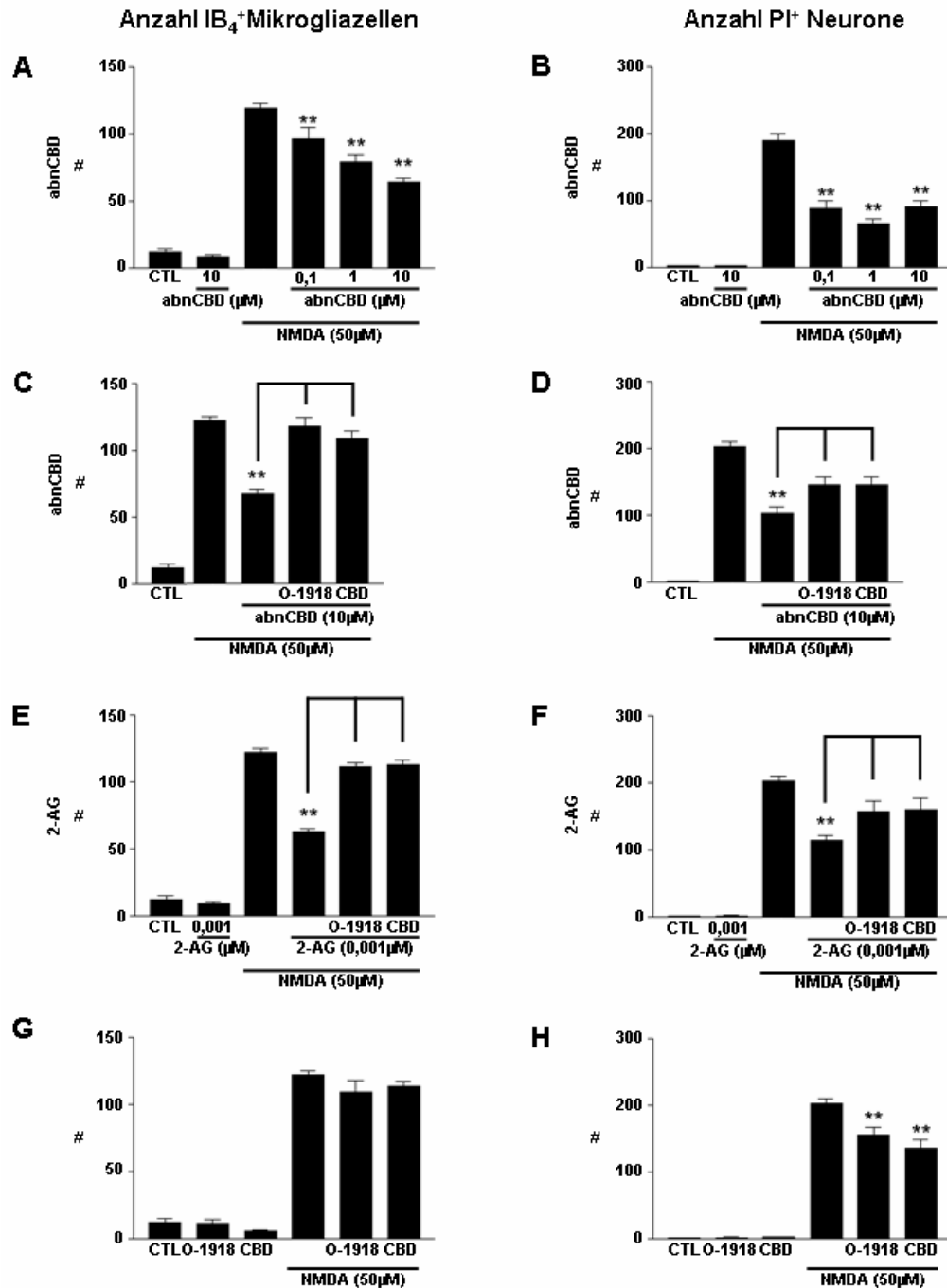
**Abb. 3.8d:** Ungeschädigte OHSC, die mit O-1918 oder Cannabidiol behandelt wurden, wiesen wie die Kontrollen (CTL) sehr wenige, ramifizierte Mikrogliazellen und fast keine PI positiven Neurone auf. NMDA+O-1918 bzw. NMDA+Cannabidiol behandelte OHSC zeigten wie die NMDA geschädigten OHSC zahlreiche amöboide Mikrogliazellen im Bereich des GD. Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC waren in NMDA+O-1918 bzw. NMDA+Cannabidiol behandelten OHSC weniger PI positive Neurone im Bereich der KZS des GD sichtbar. Die Maßstäbe betragen 50µm.



**Abb. 3.9:** Statistische Analyse zur Pharmakologie des abn Cannabidiol Rezeptors. A: Auf ungeschädigte OHSC verabreichtes abn Cannabidiol beeinflusste im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (CTL) die Mikrogliazellzahl nicht ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). In geschädigten OHSC führte abn Cannabidiol zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Mikrogliazellzahl im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA). B: In ungeschädigten OHSC beeinflusste abn Cannabidiol die Anzahl PI-positiver Neurone im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (CTL) nicht ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). Dagegen führte abn Cannabidiol in geschädigten OHSC zu einer signifikanten Reduktion der PI positiven Neurone, wobei eine Konzentration von  $1\mu\text{M}$  die Anzahl der PI positiven Neurone am stärksten reduzierte ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA). C, D: Die reduzierenden Effekte von abn Cannabidiol auf die Mikrogliazellzahl und die Anzahl PI positiver Neurone wurden durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol signifikant aufgehoben ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA+abn Cannabidiol). E, F: Ebenso hoben O-1918 und Cannabidiol die 2-AG verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl



und Anzahl PI positiver Neurone in geschädigten OHSC signifikant auf ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA+2-AG). G, H: In ungeschädigten Kontrollen übten beide Antagonisten keinen Einfluss auf Mikrogliazellzahl und PI positive Neurone aus ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). In geschädigten OHSC sorgte die Verabreichung der Antagonisten O-1918 bzw. Cannabidiol für eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA), wohingegen die Mikrogliazellzahl von beiden Antagonisten unbeeinflusst blieb ( $p > 0,05$  gegenüber NMDA).



### **3.5 Funktionelle Bedeutung des WIN Rezeptors für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA geschädigten OHSC**

Die Behandlung ungeschädigter Kontrollen (CTL) mit WIN (10 $\mu$ M) führte gegenüber unbehandelten Kontrollen zu keiner signifikanten Veränderung der Mikrogliazellzahl (7,7 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.10a und 3.11A). Der nach NMDA Schädigung verursachte Anstieg amöboider Mikrogliazellen wurde durch unterschiedliche WIN-Konzentrationen (0,1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M oder 10 $\mu$ M) signifikant und konzentrationsabhängig reduziert (WIN: 0,1 $\mu$ M, 97,8 Zellen/KZS; 1 $\mu$ M, 91,8 Zellen/KZS; 10 $\mu$ M, 70,7 Zellen/KZS, für allen Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.10a und 3.11A).

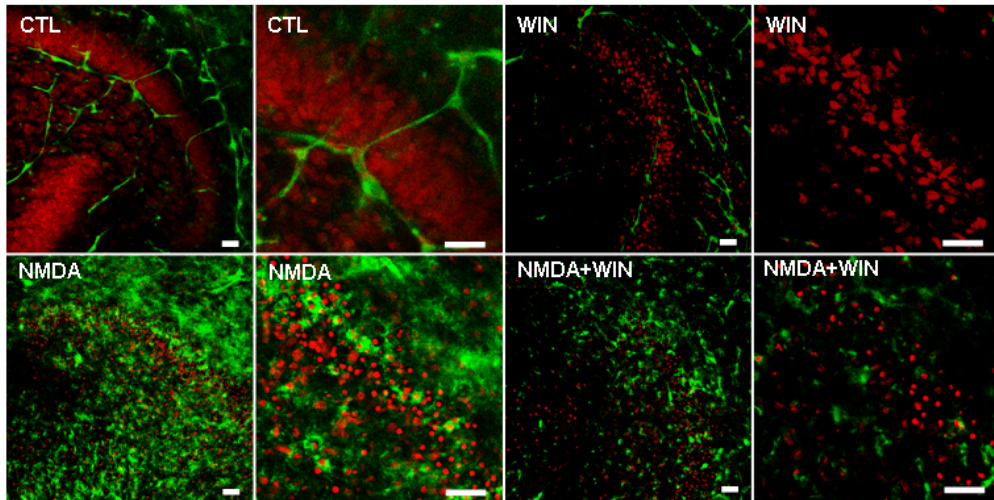
Parallel dazu verursachte die Behandlung ungeschädigter Kontrollen mit WIN (10 $\mu$ M) keine Veränderung der Anzahl PI positiver Neurone in der KZS des GD (6,9 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb.3.10a und 3.11B). Der durch NMDA verursachte starke Anstieg der PI positiven Zellen konnte durch Zugabe von unterschiedlichen WIN-Konzentrationen zu den geschädigten OHSC signifikant reduziert werden (WIN: 0,1 $\mu$ M, 65,5 Zellen/KZS; 1 $\mu$ M, 73,4 Zellen/KZS; 10  $\mu$ M, 92,1 Zellen/KZS, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.10a und 3.11B).

Die Applikation des TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin, des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 und des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 hatte keinen Einfluss auf die WIN induzierte Reduktion der Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC (NMDA+10 $\mu$ M WIN+1 $\mu$ M Capsazepin, 86,1 Zellen/KZS; NMDA+10 $\mu$ M WIN+10 $\mu$ M AM251, 82,1 Zellen/KZS; NMDA+10 $\mu$ M WIN+10 $\mu$ M AM630, 61,1 Zellen/KZS, für alle Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber NMDA+10 $\mu$ M WIN, Abb. 3.10b und 3.11C).

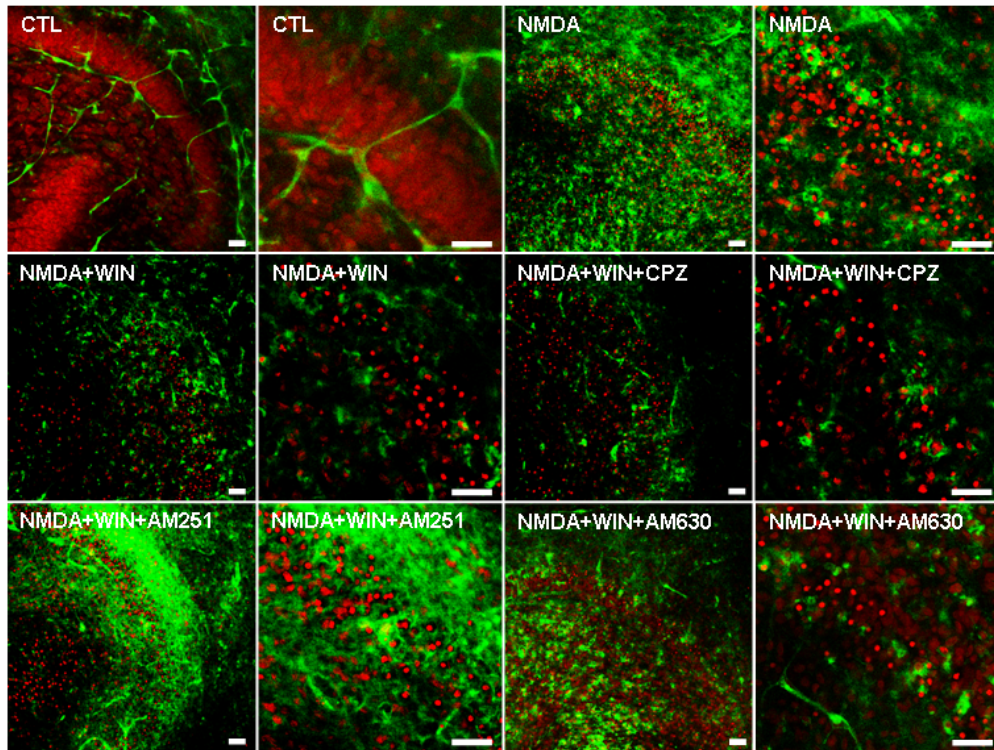
Die durch WIN verursachte Reduktion der Anzahl degenerierender Neurone in der KZS des GD von geschädigten OHSC konnte durch den TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin und den CB1 Rezeptor Antagonisten AM251 signifikant aufgehoben werden, wogegen der CB2 Rezeptor Antagonist AM630 keinen Einfluss auf die WIN verursachte Reduktion PI positiver Neurone ausübte (NMDA+10 $\mu$ M WIN+1 $\mu$ M Capsazepin, 123,5 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA+10 $\mu$ M WIN; NMDA+10 $\mu$ M WIN+10 $\mu$ M AM251, 166,7 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA+10 $\mu$ M WIN; NMDA+10 $\mu$ M WIN+10 $\mu$ M AM630, 98,4 Zellen/ KZS,  $p > 0,05$  gegenüber NMDA+10 $\mu$ M WIN, Abb. 3.10b und 3.11D).

Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (CTL) verursachte die Applikation von Capsazepin (CPZ) auf ungeschädigte OHSC keine signifikante Änderung der Mikrogliazellzahl ( $1\mu\text{M}$  Capsazepin, 16 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.10c und 3.11E). Die Zugabe von Capsazepin zu NMDA geschädigten OHSC verursachte hingegen eine signifikante Reduktion der Mikrogliazellzahl im Vergleich zu allein mit NMDA behandelten OHSC (NMDA+ $1\mu\text{M}$  Capsazepin, 84,17 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.10c und 3.11E).

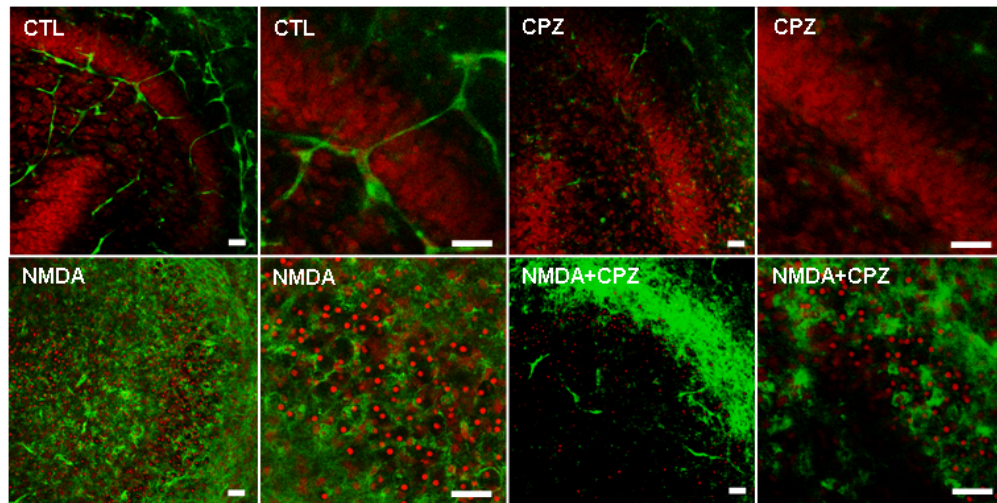
In ungeschädigten OHSC verursachte Capsazepin keine signifikante Veränderung der Anzahl PI positiver Neurone im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen ( $1\mu\text{M}$  Capsazepin, 2,8 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.10c und 3.11F). In NMDA geschädigten OHSC sorgte Capsazepin für eine signifikante Reduktion der degenerierenden Neurone in der KZS des GD (NMDA+ $1\mu\text{M}$  Capsazepin, 111,4 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.10c und 3.11F).



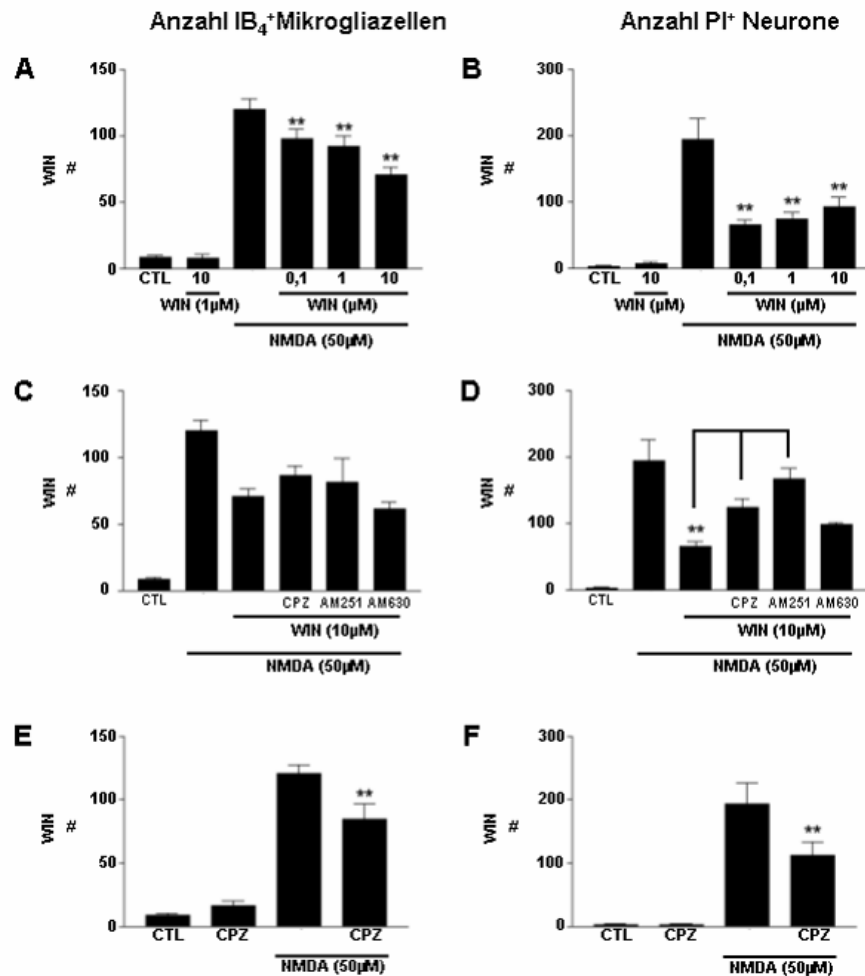
**Abb. 3.10a:** Einfluss des synthetischen Cannabinoids WIN auf Mikrogliazellzahl und degenerierende Neurone in ungeschädigten und NMDA geschädigten OHSC. In ungeschädigten OHSC, die mit WIN ( $10\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, waren wie in den unbehandelten Kontrollen (CTL) wenige ramifizierte,  $\text{IB}_4$  positive Mikrogliazellen und fast keine PI positiven Neurone in der KZS des GD zu erkennen. Im Vergleich zu NMDA geschädigten OHSC führte die Behandlung geschädigter OHSC mit WIN ( $10\mu\text{M}$ ) zu einer deutlich sichtbaren Reduktion amöboider,  $\text{IB}_4$  markierter Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in der KZS des GD. Die Maßstäbe betragen  $50\mu\text{m}$ .



**Abb. 3.10b:** Einsatz der CB Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 und des TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin (CPZ) in geschädigten und WIN behandelten OHSC. Die drei verwendeten Antagonisten AM251, AM630 und Capsazepin konnten die durch WIN verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC nicht beeinträchtigen. In den entsprechenden OHSC waren daher nur wenige amöboide Mikrogliazellen wie in den geschädigten OHSC, die mit WIN behandelt wurden, zu erkennen. Die durch WIN verursachte Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone in geschädigten OHSC wurde durch AM251 und CPZ aufgehoben, so dass in den entsprechenden OHSC deutlich mehr PI positive Neurone in der KZS des GD nachzuweisen waren. Dagegen führte die Behandlung mit AM630+WIN in geschädigten OHSC zu keiner Aufhebung der reduzierenden Wirkung von WIN, so dass in den entsprechenden OHSC wenige PI positive Neurone im Bereich des KZS nachweisbar waren. Die Maßstäbe betragen 50µm.



**Abb. 3.10c:** Untersuchungen zur alleinigen Wirkung von Capsazepin (CPZ) auf Mikrogliazellen und Neurone in ungeschädigten und geschädigten OHSC. In ungeschädigten OHSC, die mit Capsazepin behandelt wurden, waren bei sehr guter Strukturhaltung der OHSC nur wenige IB<sub>4</sub>-positive Mikrogliazellen und fast keine PI-positiven Neurone nachweisbar und glichen damit dem Erscheinungsbild der unbehandelten Kontrollen (CTL). In NMDA behandelten OHSC, die zugleich mit Capsazepin inkubiert wurden, waren weniger PI-positve Neurone und IB<sub>4</sub>-positive Mikrogliazellen als in den allein mit NMDA behandelten OHSC nachzuweisen. Die Maßstäbe betragen 50µm.



**Abb. 3.11:** Die Wirkung von WIN in ungeschädigten und NMDA geschädigten OHSC auf die Mikrogliazellzahl und die Anzahl PI positiver Neurone. A, B: In geschädigten OHSC reduzierte WIN sowohl die Anzahl der Mikrogliazellen als auch die Anzahl PI positiver Neurone ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA). In ungeschädigten OHSC beeinflusste WIN weder die Mikrogliazellzahl noch die Anzahl PI positiver Neurone ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). C, D: Die CB Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 sowie der TRPV1 Rezeptor Antagonist Capsazepin beeinflussten die WIN verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC nicht ( $p > 0,05$  gegenüber NMDA+WIN), wogegen AM251 und Capsazepin die reduzierende Wirkung von WIN auf die Anzahl PI positiver Neurone signifikant antagonisierten ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA+WIN). AM630 zeigte keinen Einfluss auf die WIN verursachte Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS von geschädigten OHSC. E, F: Der TRPV1

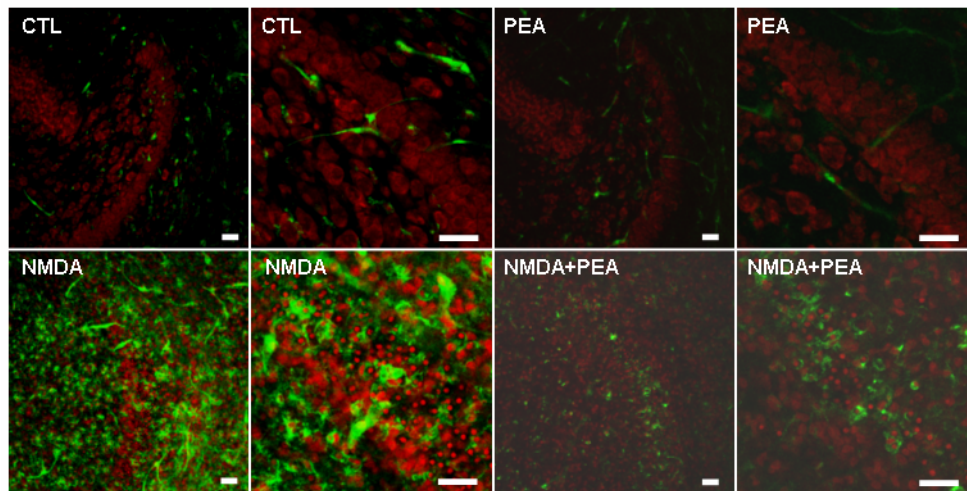
Rezeptor Antagonist Capsazepin wirkte in geschädigten OHSC im Vergleich zu allein mit NMDA geschädigten OHSC reduktiv auf die Mikrogliazellzahl und die Anzahl PI positiver Neurone ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA).  $** < 0,01$ ,  $* < 0,05$  gegenüber NMDA oder NMDA+WIN.

### **3.6 Funktionelle Bedeutung von Palmitylethanolamin (PEA) für die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone in NMDA geschädigten OHSC**

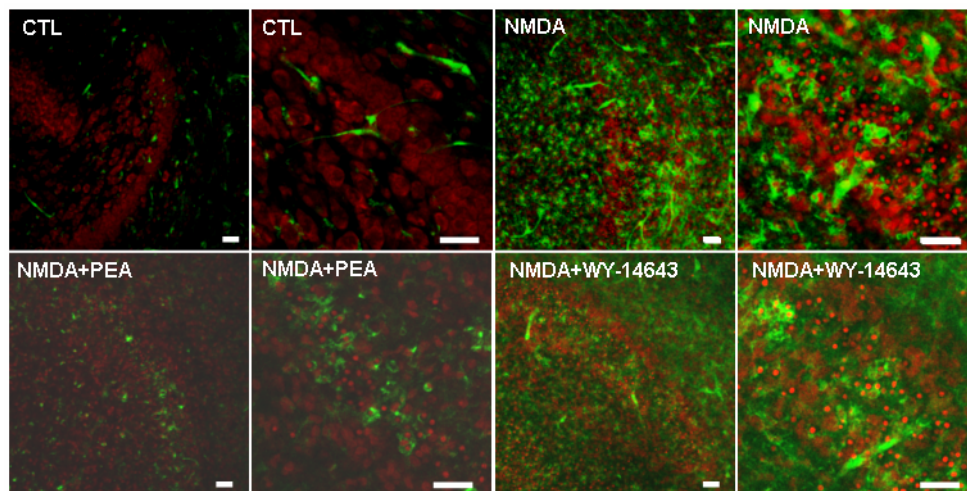
Die Zugabe von PEA ( $0,01\mu\text{M}$ ) auf ungeschädigte OHSC hatte keinen Einfluss auf die Mikrogliazellzahl: verglichen mit unbehandelten Kontrollen (CTL) waren in PEA behandelten OHSC sehr wenige, ramifizierte Mikrogliazellen vorzufinden (PEA:  $0,01\mu\text{M}$ , 22 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.12 und 3.13A). In geschädigten OHSC verursachte PEA eine signifikante Reduktion amöboider Mikrogliazellen (PEA:  $0,001\mu\text{M}$ , 91,1 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ;  $0,01\mu\text{M}$ , 55,7 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ;  $0,1\mu\text{M}$ , 75,2 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ;  $1\mu\text{M}$ , 68,9 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ; für alle Gruppen gegenüber NMDA, Abb. 3.12 und 3.13A).

In ungeschädigten OHSC übte PEA ( $0,01\mu\text{M}$ ) keinen Einfluss auf die Anzahl PI positiver Neurone aus: bei sehr guter Strukturhaltung waren wie in den unbehandelten Kontrollen fast keine PI positiven Neurone nachweisbar (PEA:  $0,01\mu\text{M}$ , 1,4 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.12 und 3.13B). In NMDA geschädigten OHSC verursachte PEA eine signifikante Reduktion der PI positiven Neurone in der KZS des GD (PEA:  $0,001\mu\text{M}$ , 115,3 Zellen/KZS,  $p > 0,05$ ;  $0,01\mu\text{M}$ , 51,09 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ;  $0,1\mu\text{M}$ , 86,3 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ;  $1\mu\text{M}$ , 92,8 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ; für alle Gruppen gegenüber NMDA, Abb. 3.12 und 3.13B).

Die Zugabe des PPAR-alpha Agonisten WY-14643 zu NMDA geschädigten OHSC übte bei einer WY-14643 Konzentration von  $0,01\mu\text{M}$  eine Reduktion der Mikrogliazellen in der KZS aus (WY-14643:  $0,01\mu\text{M}$ , 93,5 Zellen/KZS,  $p < 0,05$ ;  $0,1\mu\text{M}$ , 98 Zellen/KZS,  $p > 0,05$ ;  $1\mu\text{M}$ , 97,2 Zellen/KZS,  $p > 0,05$ , für alle Gruppen gegenüber NMDA, Abb.3.12 und 3.13C). In NMDA geschädigten OHSC führte die Zugabe unterschiedlicher WY-14643-Konzentrationen zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl PI positiver Neurone in der KZS des GD (WY-14643:  $0,01\mu\text{M}$ , 117,3 Zellen/KZS;  $0,1\mu\text{M}$ , 128,5 Zellen/KZS;  $1\mu\text{M}$ , 98,9 Zellen/KZS, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb.3.12 und 3.13D).

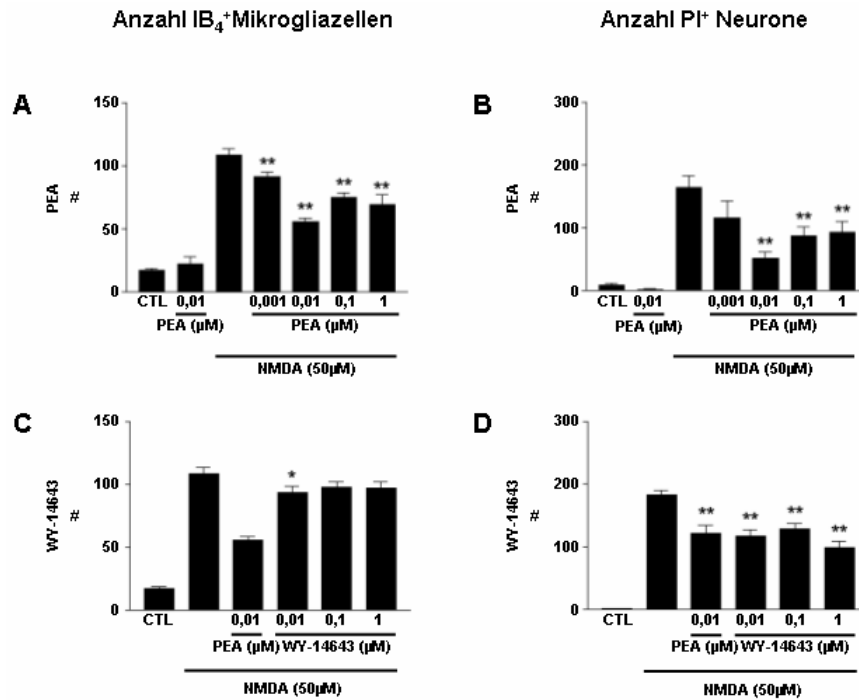


**Abb. 3.12a:** Einfluss von PEA auf Mikrogliazellen und Neurone in der OHSC. In unbehandelten OHSC, die mit PEA inkubiert wurden, waren fast keine IB<sub>4</sub>- und PI markierten Mikrogliazellen bzw. Neurone sichtbar. In geschädigten OHSC verursachte PEA eine Verminderung der Mikrogliazellzahl und der Anzahl PI positiver Neurone. So waren in der KZS des GD wenige amöboide Mikrogliazellen und PI positive Neurone nachweisbar. Die Maßstäbe repräsentieren 50µm.



**Abb. 3.12b:** Untersuchung der Wirkungsweise des PPAR-alpha Rezeptor Agonisten WY-14643 in geschädigten OHSC. Die Applikation von WY-14643 auf geschädigte OHSC verursachte im Vergleich zu geschädigten OHSC eine Verringerung der Anzahl amöboider Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in der KZS des GD. Die Maßstäbe stellen 50µm dar.





**Abb. 3.13:** Statistische Analyse der Wirkungen von PEA und WY-14643 auf Mikrogliazellzahl und PI positive Neurone in der OHSC. A, B: Wie die unbehandelten Kontrollen (CTL) zeigten OHSC, die mit PEA allein behandelt wurden, wenige IB<sub>4</sub> markierte Mikrogliazellen und PI positive Neurone ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). Der nach NMDA Applikation erfolgte starke Anstieg der Mikrogliazellzahl und der Anzahl degenerierender Neurone wurde durch Zugabe unterschiedlicher PEA Konzentrationen signifikant reduziert. Der stärkste Effekt wurde bei beiden untersuchten Parametern bei einer PEA-Konzentration von 0,01 μM erzielt. C, D: Im Vergleich zum reduzierenden Effekt des PEA war WY-14643 in ungefähr gleichem Maße in der Lage, die Anzahl PI positiver Neurone in geschädigten OHSC zu reduzieren. Dagegen reduzierte WY-14643 die Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC nur bei einer Konzentration von 0,01 μM.  $** < 0,01$ ,  $* < 0,05$  gegenüber NMDA.

### **3.7 Die Infiltration von Milzmakrophagen in geschädigte OHSC und ihr Einfluss auf die aktivierten Mikrogliazellen und degenerierenden Neurone**

Zunächst wurde der mögliche Einfluss der infiltrierten Makrophagen auf die Mikrogliazellzahl in der OHSC bestimmt. In nicht geschädigten Kontrollen (CTL) lagen nur sehr wenige, ramifizierte Mikrogliazellen im Bereich des GD vor (CTL, 2,2 Zellen/KZS, Abb.3.14a und 3.15A). Die Zugabe des Antikörpers, mit welchem zuvor die kultivierten Makrophagen inkubiert wurden, um sie mit diesem zu markieren, verursachte ebenso wenig eine Veränderung der Mikrogliazellzahl wie die Zugabe von 40.000 bzw.100.000 Makrophagen auf die ungeschädigten OHSC (CTL+AK, 10 Zellen/KZS; CTL+40.000 Makrophagen, 8 Zellen/KZS; CTL+100.000 Makrophagen, 13,8 Zellen/ KZS,  $p>0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.14a und 3.15A). In geschädigten OHSC kam es zu einem deutlichen Anstieg der Mikrogliazellzahl im GD, die Mikrogliazellen wiesen eine amöboide Morphologie auf. Weder die Zugabe des AK, mit welchem die Makrophagen markiert wurden, noch die Zugabe der Makrophagen verursachten eine Veränderung in der Anzahl und der Morphologie der Mikrogliazellen (NMDA+AK, 113,3 Zellen/KZS, NMDA+40.000 Makrophagen, 91 Zellen/KZS; NMDA+100.000 Makrophagen, 95,3 Zellen/ KZS,  $p>0,05$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14a und 3.15A).

In ungeschädigten OHSC lag eine sehr gute Strukturhaltung mit fast keinen PI positiven Neuronen vor (CTL, 1,2 Zellen/KZS). Weder die Zugabe des AK noch die Applikation der Makrophagen verursachte eine signifikante Veränderung der Strukturhaltung und der Anzahl PI positiver Neurone (CTL+AK, 0,8 Zellen/KZS; CTL+40.000 Makrophagen, 0,5 Zellen/KZS; CTL+100.000 Makrophagen, 2,7 Zellen/KZS,  $p>0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.14a und 3.15B). Nach NMDA Schädigung stieg die Anzahl der PI-positiven Neurone in der KZS des GD drastisch an. Gegenüber den geschädigten OHSC hatte weder die zusätzliche Applikation des AK noch die Zugabe der Makrophagen einen Einfluss auf die Anzahl PI positiver Neurone (NMDA+AK, 201 Zellen/KZS, NMDA+40.000 Makrophagen, 255 Zellen/KZS; NMDA+100.000 Makrophagen, 185,3 Zellen/ KZS,  $p>0,05$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14a und 3.15B).

Schließlich wurden die in die KZS des GD eingewanderten Makrophagen ausgezählt. In unbehandelten Kontrollen konnten nach Applikation von 40.000 Makrophagen im

Durchschnitt 0,7 Zellen/KZS und nach Applikation von 100.000 Makrophagen 6,8 Zellen/KZS ausgemacht werden (Abb. 3.14a und 3.15C). In geschädigten OHSC lagen nach Applikation von 40.000 Makrophagen 10,25 Zellen/KZS vor, nach Zugabe von 100.000 Makrophagen wurden im Schnitt 28,8 Zellen ausgemacht. So kam es zu einer signifikanten Zunahme der Makrophagenzahl in der KZS nach NMDA Schädigung (NMDA+100.000 Makrophagen, 28,8 Zellen,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14a und 3.15C).

Die Behandlung geschädigter OHSC mit 2-AG ( $0,001\mu\text{M}$ ) führte zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl (2-AG, 91,4 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14b und 3.15D). Die Zugabe von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen zu NMDA+2-AG behandelten OHSC führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl (40.000 Makrophagen+2-AG, 72 Zellen/KZS, 100.000 Makrophagen+2-AG, 71,7 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15D). Das Ausmaß des reduktiven Effekts von 2-AG veränderte sich durch die zugegebenen Makrophagen nicht. Auch zeigten die Mikrogliazellen innerhalb des GD durchweg eine amöboide Morphologie in geschädigten OHSC, die mit 2-AG allein oder in Kombination von 2-AG und Makrophagen behandelt wurden (3.14).

2-AG ( $0,001\mu\text{M}$ ) zeigte in geschädigten OHSC auch einen reduzierenden Effekt auf die Anzahl PI positiver Neurone in der KZS des GD (211,8 Zellen/KZS, Abb. 3.14 und 3.15E). Auch nach Applikation von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen konnte 2-AG in gleichem Umfang die Anzahl der PI positiven Neurone in geschädigten OHSC reduzieren (2-AG, 123,4 Zellen/KZS; 40.000 Makrophagen+2-AG, 144,8 Zellen/KZS, 100.000 Makrophagen+2-AG, 145 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15E).

AEA ( $0,01\mu\text{M}$ ) verursachte in geschädigten OHSC eine signifikante Reduktion der Mikrogliazellzahl (AEA, 101,3 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15F). Die Zugabe von Makrophagen konnte den reduzierenden Effekt des AEA auf die Mikrogliazellzahl noch weiter verstärken (40.000 Makrophagen+AEA, 92,3 Zellen/KZS, 100.000 Makrophagen+AEA, 62 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15F).

In geschädigten OHSC zeigte AEA allein keinen Effekt auf die Anzahl PI positiver Neurone. Die Zugabe von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen, die gleichzeitig mit AEA ( $0,01\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, verursachte jedoch nun einen signifikanten Abfall

der PI-positiven Neurone (AEA, 205,1 Zellen/KZS,  $p > 0,05$ ; 40.000 Makrophagen+AEA, 143,5 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ; 100.000 Makrophagen+AEA, 83 Zellen/KZS,  $p < 0,01$ ; für alle Gruppen gegenüber NMDA Abb.3.14 und 3.15G).

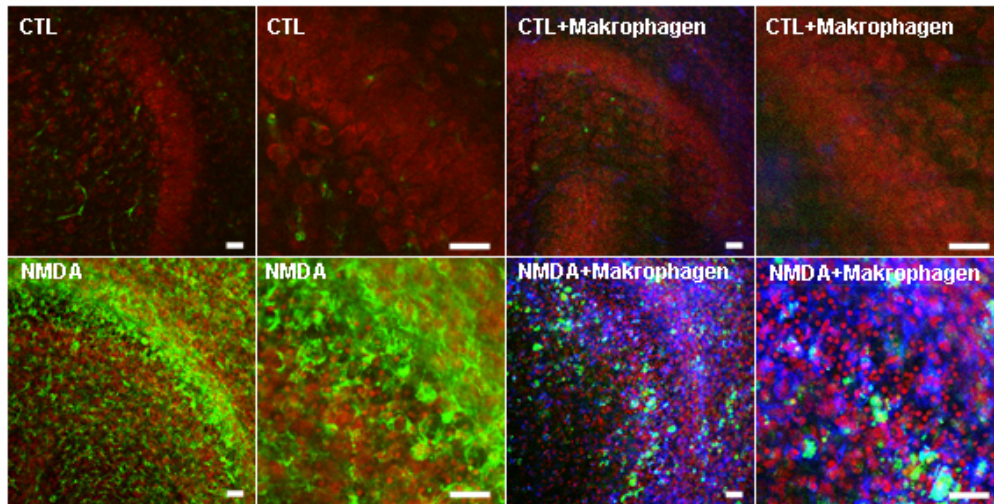
THC (3 $\mu$ M) reduzierte ebenfalls die Mikrogliazellzahl in geschädigten OHSC (THC, 52,9 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15H). Die Zugabe der Makrophagen+THC reduzierte in geschädigten OHSC die Mikrogliazellzahl in gleichem Umfang wie die Mikrogliazellzahl durch THC allein reduziert wurde (40.000 Makrophagen+THC, 43,6 Zellen/KZS, 100.000 Makrophagen+THC, 55,3 Zellen/KZS,  $p < 0,01$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15H).

Die Zugabe von THC (3 $\mu$ M) auf geschädigte OHSC hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl PI-positiver Neurone. Die Applikation von THC und 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen geschädigter OHSC verursachte eine leichte Reduktion der PI gefärbten Neurone, die sich jedoch nicht als signifikant erwies (THC, 230,2 Zellen/KZS; 40.000 Makrophagen+THC, 163,6 Zellen/KZS, 100.000 Makrophagen+THC, 169,7 Zellen/KZS,  $p > 0,05$  gegenüber NMDA, Abb. 3.14 und 3.15I).

**Abb. 3.14a:** Der Einfluss infiltrierter Makrophagen auf die Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen und PI positiver Neurone in der KZS des GD. In den unbehandelten Kontrollen (CTL) und den NMDA geschädigten OHSC (NMDA) sind die Mikrogliazellen grün, die PI positiven Neurone rot dargestellt. In den Kontrollen, die mit Makrophagen behandelt wurden, erscheinen die Makrophagen grün, die Mikrogliazellen blau und die PI positiven Neurone rot. Gleiches gilt für NMDA geschädigte OHSC, die mit grün markierten Makrophagen behandelt wurden. In unbehandelten Kontrollen liegen bei sehr guter Strukturhaltung fast keine PI positiven Neurone und kaum IB<sub>4</sub> markierte Mikrogliazellen (grün) vor. In Kontrollen, denen Makrophagen zugegeben wurden, ist eine sehr gute Strukturhaltung vorzufinden. Es befinden sich fast keine PI positiven Neurone und nur sehr wenige, ramifizierte Mikrogliazellen (blau) in der KZS. Von den grün markierten Makrophagen, die auf die unbehandelten OHSC zugegeben wurden, sind nur einige wenige im Bereich der KZS anzutreffen.

Nach NMDA Schädigung kommt es zu einer Akkumulation PI-positiver Neurone und aktivierter, amöboider Mikrogliazellen (grün) im Bereich der KZS des GD. Geschädigte OHSC, denen grün markierte Makrophagen zugegeben wurden,

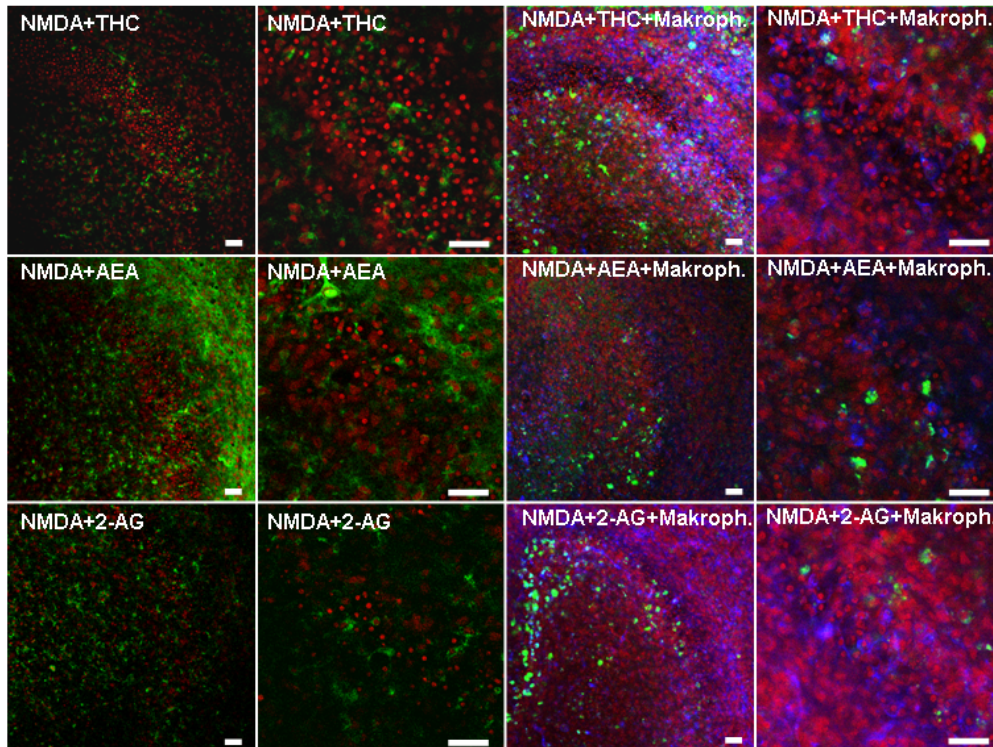
zeigten ebenfalls eine starke Anhäufung PI positiver Neurone und aktivierter, IB<sub>4</sub>-positiver Mikrogliazellen (blau) im Bereich der KZS. Zugleich kam es in der KZS zu einem vermehrten Auftreten der grün markierten Makrophagen. Die Maßstäbe betragen 50µm.



**Abb. 3.14b:** Einfluss infiltrierter Makrophagen auf Mikrogliazellen und Neurone in OHSC, die mit NMDA geschädigt und zugleich mit den Cannabinoiden THC, AEA oder 2-AG behandelt wurden. In den OHSC, die ohne Makrophagen behandelt wurden, sind die Mikrogliazellen grün und die degenerierenden Neurone rot dargestellt. Im Gegensatz hierzu sind in den OHSC, denen grün markierte Makrophagen zugegeben wurden, die Makrophagen entsprechend grün, die Mikrogliazellen blau und die degenerierenden Neurone rot dargestellt. Geschädigte OHSC, die mit THC, AEA oder 2-AG behandelt wurden, wiesen einige IB<sub>4</sub> markierte, amöboide Mikrogliazellen (grün) im Bereich des GD auf. Die geschädigten OHSC, die mit 2-AG behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu THC oder AEA behandelten OHSC weniger PI positive Neurone im Bereich der KZS des GD auf.

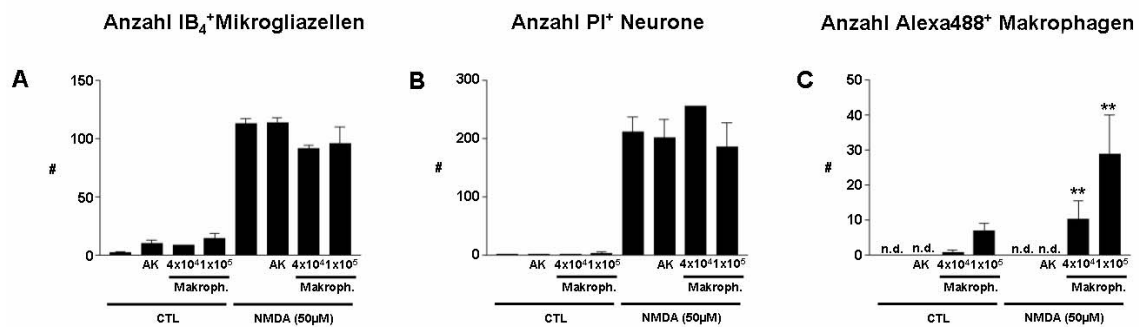
Vergleicht man geschädigte OHSC, die mit THC behandelt wurden, mit solchen, denen neben THC grün markierte Makrophagen zugegeben wurden, so findet man im Bereich der KZS zwar die ungefähr gleiche Anzahl an Mikrogliazellen vor, jedoch ist in mit Makrophagen behandelten OHSC die Anzahl PI-positiver Neurone in der KZS des GD geringer. Ein gleiches Phänomen konnte für das AEA beobachtet werden: in AEA+Makrophagen behandelten OHSC kam es im Vergleich zu allein mit

AEA behandelten OHSC zu einer Verringerung der PI positiven Neurone. In OHSC, die mit 2-AG behandelt wurden, kam es durch eine zusätzliche Behandlung mit den Makrophagen zu keiner Veränderung in der Anzahl der PI positiver Neurone oder IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen.



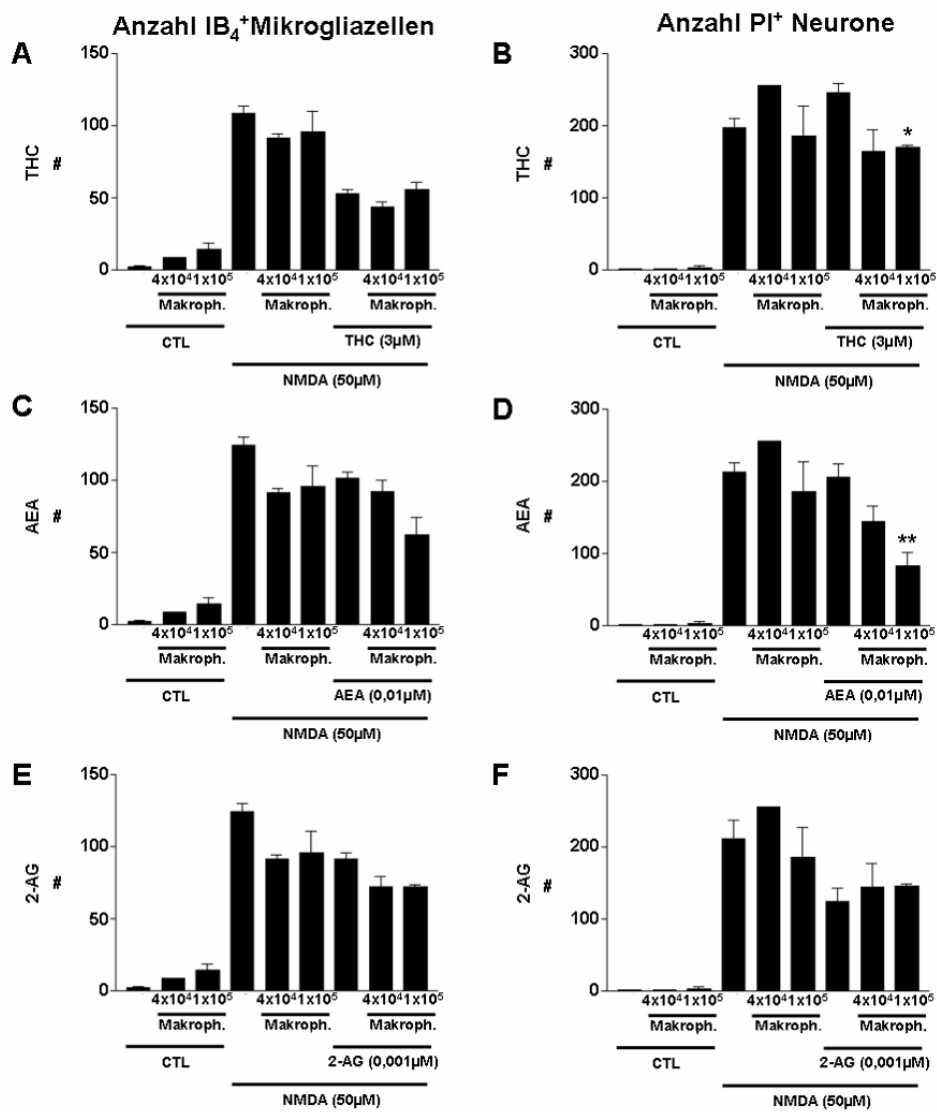
**Abb. 3.15:** Statistische Auswertung zum Einfluss infiltrierter Makrophagen auf Mikrogliazellzahl und Anzahl PI positiver Neurone in der OHSC. A: In unbehandelten Kontrollen hatte die Zugabe des AK, mit welchem die Makrophagen markiert wurden, und auch die Zugabe von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen keinen Einfluss auf die Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). In geschädigten OHSC hatte die Zugabe des AK, durch den die Makrophagen markiert wurden, und auch die Zugabe von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen keinen Einfluss auf die Anzahl IB<sub>4</sub> positiver Mikrogliazellen ( $p > 0,05$  gegenüber NMDA). B: In ungeschädigten OHSC, denen der AK, welcher zur Markierung der Makrophagen diente, oder 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen zugegeben wurden, keinen Einfluss auf die Anzahl PI positiver Neurone ( $p > 0,05$  gegenüber CTL). In geschädigten OHSC hatte die Zugabe

des AK, durch den die Makrophagen markiert wurden, und auch die Zugabe von 40.000 bzw. 100.000 Makrophagen keinen Einfluss auf die Anzahl PI positiver Neurone ( $p>0,05$  gegenüber NMDA). C: Der Vergleich der Anzahl von infiltrierten Makrophagen in der KZS des GD von ungeschädigten und geschädigten OHSC zeigt, dass jeweils bei Zugabe der gleichen Menge von Makrophagen die Anzahl von Makrophagen in geschädigten OHSC gegenüber ungeschädigten Kontrollen (CTL) signifikant erhöht war.  $**<0,01$  gegenüber CTL+40.000 Makrophagen bzw. CTL+100.000 Makrophagen.



**Abb. 3.16:** Einfluss infiltrierter Makrophagen auf Mikrogliazellen und Neurone in OHSC, die mit NMDA+ THC, NMDA+AEA oder NMDA+2-AG behandelt wurden. A, C, E: Geschädigte OHSC, die mit THC, AEA oder 2-AG behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu OHSC, die nur mit NMDA geschädigt wurden, weniger IB<sub>4</sub> markierte Mikrogliazellen auf ( $p<0,01$  gegenüber NMDA). Die Zugabe von 40.000 oder 100.000 Makrophagen zu den NMDA+THC, NMDA+AEA oder NMDA+2-AG behandelten OHSC führte im Vergleich zu den Gruppen, die entsprechend ohne Makrophagen behandelt wurden, zu keiner Veränderung in der Zahl IB<sub>4</sub> markierter Mikrogliazellen ( $p>0,05$  gegenüber NMDA+THC, NMDA+AEA oder NMDA+2-AG). B, D, F: Geschädigte OHSC, die mit THC oder AEA behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu OHSC, die nur mit NMDA geschädigt wurden, keinen Unterschied in der Anzahl PI positiver Neurone auf ( $p>0,05$  gegenüber NMDA). Geschädigte OHSC, die mit 2-AG behandelt wurden, wiesen im Vergleich zu OHSC, die nur mit NMDA geschädigt

wurden, weniger PI positive Neurone auf ( $p < 0,01$  gegenüber NMDA). Die Wirkung von 2-AG auf die Anzahl positiver Neurone in geschädigten OHSC veränderte sich auch nach Zugabe von 40.000 oder 100.000 Makrophagen nicht ( $p > 0,05$  gegenüber NMDA+2-AG). Beim Vergleich geschädigter OHSC, die mit THC oder AEA behandelt wurden, mit OHSC, denen neben THC oder AEA zusätzlich Makrophagen appliziert wurden, nahm die Anzahl PI positiver Neurone nach Zugabe der Makrophagen in den NMDA+THC sowie NMDA+AEA behandelten Gruppen signifikant ab.  $** < 0,01$ ,  $* < 0,05$  gegenüber NMDA+THC bzw. NMDA+AEA.





### 3.8 Regulation der TNF-alpha Freisetzung aus Mikrogliazellen und Astrozyten durch Cannabinoide

#### Freisetzung von TNF-alpha aus Mikrogliazellen

Nach zweistündiger Stimulation kultivierter Mikrogliazellen mit 10ng/ml des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS) kam es im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (CTL, 18,8%) zu einer starken Freisetzung von TNF-alpha (11,07ng / ml x 100.000 Zellen). Dieser Wert wurde als 100% festgesetzt. Die gleichzeitige Applikation von LPS mit den Cannabinoiden 2-AG, abn Cannabidiol oder WIN verursachte in allen drei Fällen eine signifikante Reduktion der TNF-alpha Freisetzung (2-AG, 80,5%; abn Cannabidiol, 42,8%; WIN, nicht detektierbar (n. d.), für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber LPS, Abb. 3.16). Die parallele Applikation von LPS und AEA verursachte hingegen einen signifikanten Anstieg der TNF-alpha Freisetzung (AEA, 142,7%,  $p < 0,01$  gegenüber LPS, Abb. 3.16).

Nach 48stündiger Behandlung der Mikrogliazellen mit LPS stieg der TNF-alpha Gehalt im Kulturüberstand stark an (12,05ng / ml x 100.000 Zellen). Dieser Wert wurde als 100% festgesetzt. Gegenüber unbehandelten Mikrogliazellen (CTL, 0,83%) kam es nach 48stündiger Behandlung kultivierter Mikrogliazellen mit 2-AG (0,001 $\mu$ M) zu keiner signifikanten Veränderung der TNF-alpha Freisetzung (2-AG, n. d.,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.17A). Die parallele Behandlung von Mikrogliazellen mit LPS+2-AG (0,001 $\mu$ M) verursachte eine signifikante Reduktion der TNF-alpha Freisetzung (2-AG, 34,3%,  $p < 0,01$  gegenüber LPS, Abb.3.17A). Die Zugabe des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 sowie der abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol hatte keinen Einfluss auf die 2-AG induzierte Reduktion der TNF-alpha Sekretion von LPS behandelten Mikrogliazellen (10 $\mu$ M AM251+2-AG+LPS, 40,3%; 10 $\mu$ M AM630+2-AG+LPS, 25%; 30 $\mu$ M O-1918+2-AG+LPS, 35,1%; 10 $\mu$ M Cannabidiol+2-AG+LPS, 28,1%, für alle Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber 2-AG+LPS, Ab.3.17A).

Im Vergleich zu den unbehandelten Mikrogliazellen (CTL, 0,83%) hatte die Behandlung kultivierter Mikrogliazellen mit AEA (0,01 $\mu$ M) keinen Einfluss auf die TNF-alpha Freisetzung (AEA, n. d.,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.17B). Nach 48stündiger Stimulation mit LPS kam es zu einem enormen Anstieg der TNF-alpha Freisetzung in das Kulturmedium, dieser Wert wurde als 100% festgelegt (s. o.). Im

Vergleich hierzu verursachte die parallele Behandlung kultivierter Mikrogliazellen mit LPS+AEA (0,01 $\mu$ M) eine signifikante Reduktion der TNF-alpha Freisetzung (AEA, 74,7%,  $p < 0,01$  gegenüber LPS, Abb. 3.17B). Gegenüber dieser AEA verursachten Reduktion übten die CB Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 keinen signifikanten Einfluss aus (10 $\mu$ M AM251+AEA+LPS, 81,7%; 10 $\mu$ M AM630+AEA+LPS, 69,7%, für beide Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber AEA+LPS, Abb. 3.17B). Die AEA verursachte Reduktion der LPS induzierten TNF-alpha Freisetzung konnte jedoch durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol signifikant aufgehoben werden (30 $\mu$ M O-1918+AEA+LPS, 105,7%; 10 $\mu$ M Cannabidiol+AEA+LPS, 104%, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber AEA+LPS, Abb. 3.17B).

Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen (CTL, 0,83%) hatte die Behandlung kultivierter Mikrogliazellen mit abn Cannabidiol (10 $\mu$ M) keinen Einfluss auf die Freisetzung von TNF-alpha in das Kulturmedium (abn Cannabidiol, n. d.,  $p > 0,05$  gegenüber CTL). Gegenüber LPS stimulierten Zellen, deren TNF-alpha Werte als 100% festgesetzt wurden (s. o.), verursachte die Behandlung kultivierter Mikrogliazellen mit LPS+abn Cannabidiol eine signifikante Reduktion der TNF-alpha Konzentration im Kulturüberstand (abn Cannabidiol, 80,6%,  $p < 0,05$  gegenüber LPS, Abb. 3.17C). Die CB1 und 2 Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 hatten keinen Einfluss auf den reduzierenden Effekt des abn Cannabidiols (10 $\mu$ M AM251+abn Cannabidiol+LPS, 66,7%; 10 $\mu$ M AM630+abn Cannabidiol+LPS, 64,3%, für beide Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber AEA+LPS, Abb. 3.17C). Die Behandlung mit den abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol führte dagegen zu einer weiteren Reduktion der TNF-alpha Freisetzung (30 $\mu$ M O-1918+abn Cannabidiol+LPS, 14,9%; 10 $\mu$ M Cannabidiol+abn Cannabidiol+LPS, 44,6%, für alle Gruppen  $p < 0,01$  gegenüber abn Cannabidiol+LPS, Abb. 3.17C).

Das synthetische Cannabinoid WIN (10 $\mu$ M) beeinflusste die TNF-alpha Freisetzung in unbehandelten Kontrollen nicht (WIN, n. d.,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.17D). Nach Behandlung LPS stimulierter Zellen mit WIN kam es zu einer fast vollständigen Einstellung der TNF-alpha Freisetzung (WIN, 0,52%,  $p < 0,01$  gegenüber WIN+LPS, Abb. 3.17D), wobei die TNF-alpha Werte der allein mit LPS behandelten Gruppen als 100% festgesetzt wurden (s. o.). Die CB Rezeptor Antagonisten AM251, AM630 und O-1918 konnten alle signifikant die WIN verursachte Reduktion der TNF-alpha

Freisetzung aufheben. Der abn Cannabidiol Rezeptor Antagonist Cannabidiol hingegen beeinflusste die WIN induzierte Reduktion des TNF-alpha Spiegels nicht (10µM AM251+WIN+LPS, 19,8%,  $p < 0,01$  gegenüber WIN+LPS; 10µM AM630+WIN+LPS, 36,7%,  $p < 0,01$  gegenüber WIN+LPS, 30µM O-1918+WIN+LPS 33,7,  $p < 0,01$  gegenüber WIN+LPS, 10µM Cannabidiol+WIN+LPS, 1,2%,  $p > 0,05$  gegenüber WIN+LPS, Abb. 3.17D).

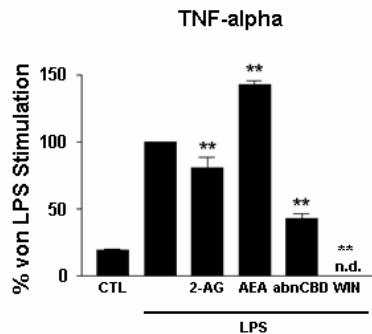
### **Freisetzung von TNF-alpha aus Astrozyten**

In kultivierten Astrozyten kam es nach 48stündiger LPS Behandlung zu einer starken Freisetzung von TNF-alpha in den Kulturüberstand (10,03ng / ml x 100.000 Zellen). Diese Werte wurden als 100% festgesetzt. 2-AG (0,001µM) hatte keinen Einfluss auf die TNF-alpha Freisetzung in unbehandelten Kulturen (CTL). Nach paralleler LPS und 2-AG (0,001µM) Behandlung kam es zu einem drastischen Abfall der TNF-alpha Konzentration im Kulturüberstand (2-AG, 4,1%,  $p < 0,01$  gegenüber 2-AG+LPS, Abb. 3.18A). Der reduzierende Effekt von 2-AG konnte durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 und durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol signifikant aufgehoben werden (10µM AM630+2-AG+LPS, 60,7%,  $p < 0,01$  gegenüber 2-AG+LPS; 30µM O-1918+2-AG+LPS 112,7%,  $p < 0,01$  gegenüber 2-AG+LPS; 10µM Cannabidiol+2-AG+LPS, 54%,  $p < 0,01$  gegenüber 2-AG+LPS, Abb. 3.18A). Gegenüber der LPS stimulierten Gruppe waren die AM630+2-AG+LPS bzw. Cannabidiol+2-AG+LPS behandelten Gruppen immer noch signifikant erniedrigt (10µM AM630+2-AG+LPS, 60,7%,  $p < 0,01$  gegenüber LPS; 10µM Cannabidiol+2-AG+LPS, 54%,  $p < 0,01$  gegenüber LPS, Abb. 3.18A).

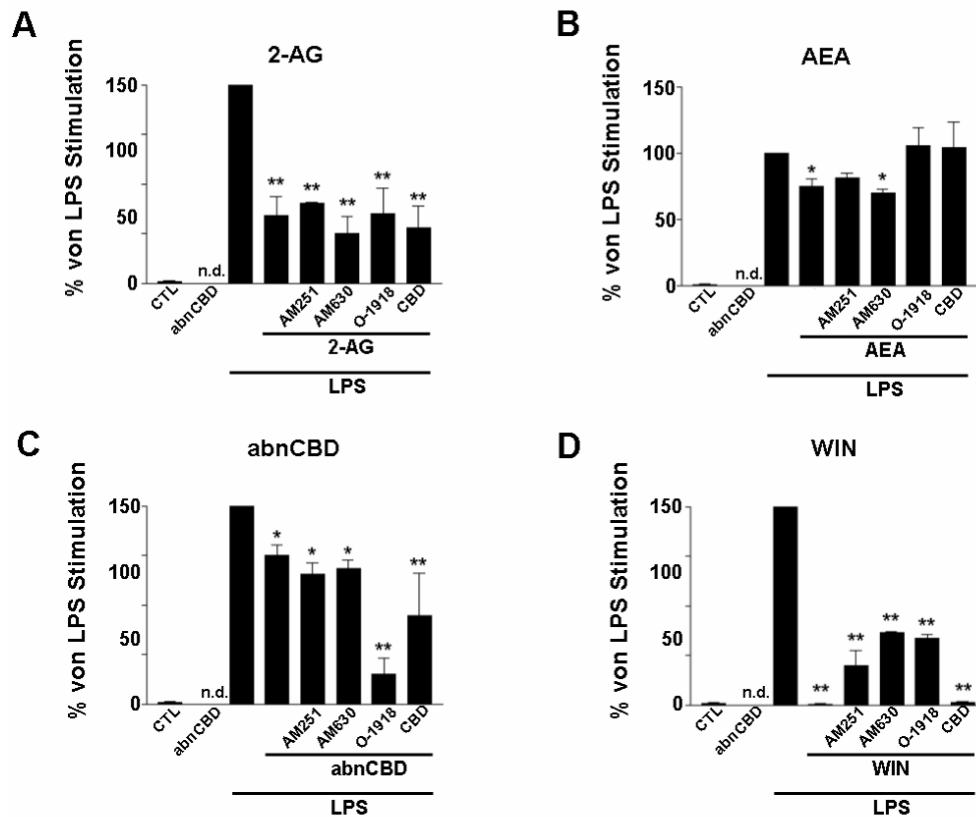
In Kontrollen hatte die Behandlung der kultivierten Astrozyten mit AEA (0,01µM) keinen Einfluss auf den TNF-alpha Gehalt (AEA, n. d.,  $p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.18B). In LPS stimulierten Gruppen reduzierte AEA (0,01µM) signifikant die Freisetzung von TNF-alpha (AEA, 88%,  $p < 0,01$  gegenüber AEA+LPS, Abb. 3.18B). Alle drei verwendeten CB Rezeptor Antagonisten übten keinen Einfluss auf den reduzierenden Effekt von AEA (0,01µM) aus (10µM AM630+AEA+LPS, 90,2; 30µM O-1918+AEA+LPS, 96,3; 10µM Cannabidiol+AEA+LPS, 77,3; für alle Gruppen  $p > 0,05$  gegenüber AEA+LPS, Abb. 3.18B).

Die Behandlung kultivierter Astrozyten mit abn Cannabidiol (10µM) beeinflusste in unbehandelten Kulturen die TNF-alpha Freisetzung nicht (abn Cannabidiol, n. d.,

$p > 0,05$  gegenüber CTL, Abb. 3.18C). In LPS behandelten Gruppen führte abn Cannabidiol ( $10\mu\text{M}$ ) zu einer signifikanten Reduktion von TNF-alpha (abn Cannabidiol, 92%,  $p < 0,01$  gegenüber abn Cannabidiol+LPS, Abb. 3.18C). Die Behandlung mit dem abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten Cannabidiol konnte diesen reduzierenden Effekt von abn Cannabidiol ( $10\mu\text{M}$ ) aufheben, wogegen die beiden Antagnisten AM630 (CB2 Rezeptor) und O-1918 (abn Cannabidiol Rezeptor) die abn Cannabiol verursachte Reduktion des TNF-alpha weiter verstärkten ( $10\mu\text{M}$  AM630+abn Cannabidiol+LPS, 32,3%,  $p < 0,01$  gegenüber abn Cannabidiol+LPS;  $30\mu\text{M}$  O-1918+abn Cannabidiol+LPS 43%,  $p < 0,01$  gegenüber abn Cannabidiol+LPS;  $10\mu\text{M}$  Cannabidiol+abn Cannabidiol+LPS, 118%,  $p < 0,01$  gegenüber abn Cannabidiol+LPS, Abb. 3.18C).



**Abb. 3.16:** Die Sekretion von TNF-alpha aus Mikrogliazellen nach 2stündiger Stimulation mit LPS. Der TNF-alpha Gehalt von LPS stimulierten Präparationen wurde als 100% festgesetzt. Die Cannabinoide 2-AG, abn Cannabidiol (abnCBD) und WIN verursachten eine signifikante Reduktion der LPS induzierten TNF-alpha Freisetzung, wobei WIN den stärksten reduzierenden Effekt erzielte. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von AEA zu einer verstärkten Freisetzung von TNF-alpha nach LPS Stimulation.  $**p < 0,01$  gegenüber LPS.

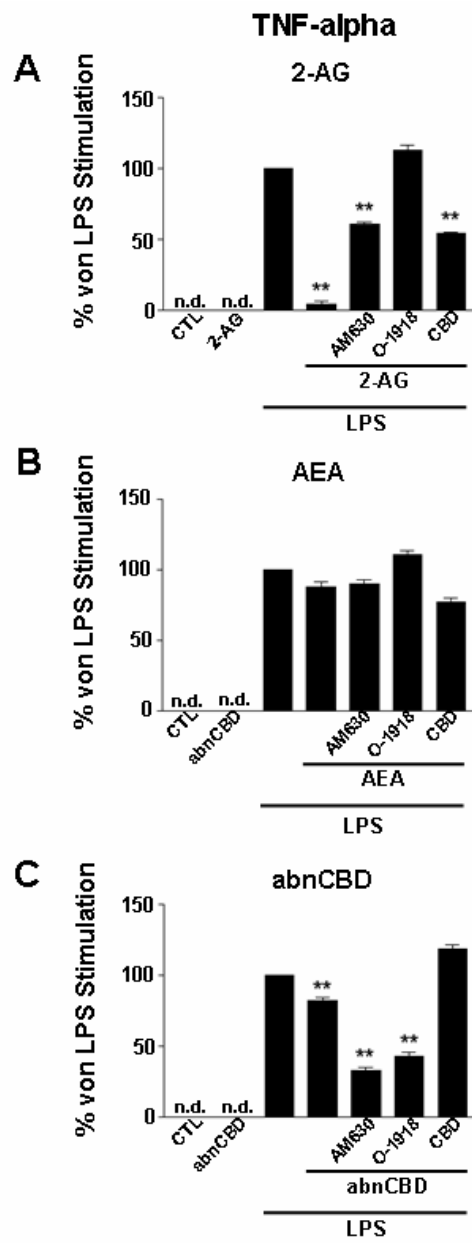


**Abb. 3.17:** TNF-alpha Freisetzung aus kultivierten Mikrogliazellen nach 48stündiger LPS Behandlung. Alle verwendeten Cannabinoide, die zusammen mit LPS für 48 Stunden appliziert wurden, konnten die LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha signifikant reduzieren. Die TNF-alpha Menge in Präparationen, die mit LPS allein behandelt wurden, wurde als 100% festgesetzt. A: Die Zugabe von 2-AG zu unbehandelten Kontrollen beeinflusste die TNF-alpha Sekretion nicht. Die LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha konnte durch 2-AG signifikant reduziert werden. Die gleichzeitige Zugabe des CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 oder der beiden abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol (CBD) konnte die 2-AG verursachte Reduktion der TNF-alpha Freisetzung nicht beeinflussen. B: Die Applikation von AEA zu unbehandelten Kontrollen hatte keinen Einfluss auf die TNF-alpha Freisetzung. Die durch LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha konnte durch AEA signifikant vermindert werden. Die beiden CB1 und 2 Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 beeinflussten den reduzierenden Effekt von AEA nicht, wohingegen die beiden abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und CBD die AEA verursachte Reduktion aufhoben.

C: Die Zugabe von abn Cannabidiol (abnCBD) zu unbehandelten Kontrollen übte keinen Einfluss auf die Freisetzung von TNF-alpha aus. Die durch LPS verursachte Sekretion von TNF-alpha wurde durch abn Cannabidiol signifikant reduziert. AM251, AM630 und Cannabidiol übten keinen Einfluss auf den reduzierenden Effekt des abn Cannabidiols aus, wogegen O-1918 den reduzierenden Effekt von abnCBD noch weiter verstärkte. D: Die Zugabe von WIN konnte in unbehandelten Präparationen keinen Einfluss auf die Freisetzung von TNF-alpha nehmen. Hingegen sorgte WIN nach LPS Stimulation für eine signifikante Reduktion der TNF-alpha Freisetzung. Diese Reduktion wurde durch AM251, AM630 und O-1918 signifikant vermindert, jedoch nicht komplett aufgehoben. CBD zeigte gegenüber der WIN verursachten Reduktion keine Wirkung. \*\*p<0,01, \*p<0,05 gegenüber LPS.

---

**Abb. 3.18:** TNF-alpha Freisetzung aus kultivierten Astrozyten nach 48stündiger LPS Behandlung. In allen Untersuchungen wurde der TNF-alpha Gehalt aus LPS stimulierten Präparationen als 100% festgesetzt. A: Die Applikation von 2-AG zu unbehandelten Kontrollen beeinflusste die TNF-alpha Sekretion nicht. Die LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha wurde durch 2-AG signifikant reduziert. Die gleichzeitige Zugabe des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 und des abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten Cannabidiol (CBD) konnte die 2-AG verursachte Reduktion der TNF-alpha Freisetzung signifikant herabsetzen, die Zugabe des abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 hob die 2-AG verursachte Verringerung der TNF-alpha Konzentration komplett auf. B: In unbehandelten Kontrollen hatte AEA keinen Einfluss auf den TNF-alpha Spiegel. Der LPS verursachte Anstieg in der TNF-alpha Sekretion konnte durch AEA allein und durch AEA in Kombination mit AM630, O-1918 oder CBD nicht beeinflusst werden. C: Die Zugabe von abn Cannabidiol (abnCBD) zu unbehandelten Kontrollen hatte auf die Freisetzung von TNF-alpha aus Astrozyten keinen Einfluss. Die durch LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha wurde durch abn Cannabidiol signifikant reduziert. AM630 und O-1918 verstärkten diese Reduktion noch weiter, wogegen CBD den reduzierenden Effekt des abnCBD komplett aufhob. \*\*p<0,01 gegenüber LPS.



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die neuroprotektiven Eigenschaften von Cannabinoiden untersucht. Es sollte überprüft werden, ob und inwieweit die verwendeten Cannabinoide den Prozess der exzitotoxischen neuronalen Schädigung in organotypischen hippocampalen Schnittkulturen (OHSC) beeinträchtigen. Die OHSC gelten als ein fest etabliertes Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Schädigungsprozesse (Adamchik et al. 2000; Adembri et al. 2004; Hailer et al. 2001). Gegenüber primären Neuronenkulturen sind die OHSC im Vorteil, da sie funktionell intakte zelluläre Netzwerke besitzen, in welche Neurone und Gliazellen eingeschlossen sind. Ein weiterer Vorteil dieses Modellsystems liegt darin, dass immunkompetente Zellen aus der Blutbahn, wie z. B. Monozyten, die bekanntermaßen nach einer zerebralen Verletzung über die offene Bluthirnschranke in das geschädigte Nervengewebe einwandern und dort zum Phänomen der Sekundärschädigung beitragen, im Modellsystem der OHSC fehlen. So kann mit Hilfe der OHSC die funktionelle Bedeutung der Mikrogliazellen, als der einzigen residenten immunkompetenten Zellform des ZNS, für die neuronalen Schädigungsprozesse untersucht werden.

Im Fokus der vorliegenden Untersuchungen standen zunächst das Phytocannabinoid (-)-Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) und die Endocannabinoide (EC) N-Arachidonylethanolamin (AEA) und 2-Arachidonylglycerin (2-AG) und deren Wirkungen auf die Mikrogliazellen und das Absterben von Neuronen in der Körnerzellschicht (KZS) des Gyrus dentatus (GD) im Hippokampus.

### 4.1 Vergleichende Analyse der Cannabinoide THC, AEA und 2-AG im Schädigungsmodellsystem OHSC

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass THC, AEA und 2-AG in unterschiedlichen Hirnregionen sowohl in vivo als auch in neuronaler Einzelzellkultur neuroprotektiv wirken (Hampson et al. 1998; Sinor et al. 2000; van der Stelt et al. 2001a; Mechoulam 2004). Im gesunden Gehirn werden in der Regel nur sehr geringe Mengen an EC nachgewiesen. In unbehandelten Schnittkulturen des Hippokampus, die in diesem Fall modellhaft für gesundes neuronales Gewebe stehen, wurden beispielsweise  $1.5 \pm 0.7$  pmol AEA und  $8.6 \pm 3.5$  pmol 2-AG pro hippocampale Schnittkultur gemessen. Eine pathologische Überstimulation von Schnittkulturen mit



Glutamat bewirkte im Falle des AEA nur einen moderaten oder gar keinen Anstieg des AEA Spiegels, wohingegen die gleiche glutamaterge Stimulation zu einem vierfachen Anstieg der 2-AG Konzentration führte (Stella et al. 1997; Stella und Piomelli 2001; Walter et al. 2003). Aufgrund dieser „on demand“ Hochregulation wurde den EC, insbesondere dem 2-AG, eine neuroprotektive Rolle zugeschrieben. Im Rahmen der hier erfolgten vergleichenden Untersuchungen zwischen THC, AEA und 2-AG zeigte nur das 2-AG, welches im ZNS das mengenmäßig häufigste Cannabinoid darstellt (Mechoulam et al. 1995; Sugiura et al. 1995), nach einer pathologischen NMDA Behandlung neuroprotektive Effekte auf Körnerzellen im GD des Hippokampus. Solche neuroprotektiven Eigenschaften von 2-AG wurden auch in dem in vivo Modellsystem der sog. „closed head injury“ beobachtet (Panikashvili et al. 2001): 2-AG führte dort insgesamt zu einer besseren klinischen Erholung. Es reduzierte das Hirnödem, das Infarktolumen und den neuronalen Zellverlust im CA3 Feld des Hippokampus. Die zahlreich beschriebenen neuroprotektiven Effekte von 2-AG in diversen in vivo Modellen könnten theoretisch sowohl über residente als auch über in das verletzte Hirngewebe einwandernde immunkompetente Zellen der Blutbahn vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit dagegen erschien es sinnvoll anzunehmen, dass aufgrund der Abwesenheit von immunkompetenten Blutzellen in der OHSC 2-AG seine neuroprotektiven Eigenschaften entweder direkt auf Neurone, wie in der neuronalen Einzelzellkultur der Fall (Hampson et al. 1998), oder indirekt durch Interaktion mit den residenten Mikrogliazellen und/oder Astrozyten ausübte. Über den Effekt von 2-AG auf die residenten Mikrogliazellen in der OHSC wird weiter unten berichtet.

Im Gegensatz zu 2-AG zeigte das zweite verwendete EC, AEA, keine neuroprotektiven Eigenschaften für Neurone des GD in der OHSC. Dieser Befund steht im Gegensatz zu verschiedenen in vivo Modellsystemen (van der Stelt et al. 2001b; Veldhuis et al. 2003): AEA und seine Metabolite führten in den genannten Arbeiten zu einer verzögerten Entstehung zytotoxischer Ödeme nach einer intrakraniellen Injektion des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Inhibitors Ouabain. Auch in der Einzelzellkultur schützte AEA Neurone vor dem Zelltod (Sinor et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit zeigte auch das THC keine neuroprotektiven Eigenschaften in NMDA geschädigten OHSC, obwohl THC, wie in der Literatur beschrieben, Neurone in vivo und in der Einzelzellkultur vor Exzitotoxizität zu schützen vermag (Hampson et al. 1998; van der Stelt et al. 2001a).

Es bleibt somit zusammengefasst festzuhalten, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich 2-AG in der Lage war, Körnerzellen des GD von NMDA geschädigten OHSC vor dem Absterben zu bewahren, wohingegen AEA und THC den Prozess der exzitotoxischen neuronalen Schädigung nicht signifikant verhindern konnten. Diese Befunde sollte man zum Einen vor dem Hintergrund betrachten, dass nach pathologischer Überstimulation vor allem der Gehalt von 2-AG in vivo stark ansteigt, wohingegen AEA nur mäßig bis gar nicht hochreguliert wird. Ein anderer Erklärungsansatz für die nicht vorhandene Neuroprotektion von AEA und THC im Modellsystem der OHSC wäre ein Vergleich des vorliegenden Modells mit der neuronalen Einzelzellkultur und den verschiedenen in vivo Modellsystemen. So spräche eine neuroprotektive Eigenschaft von AEA und THC in neuronalen Einzelzellkulturen für einen direkten Effekt dieser Cannabinoide auf die Neurone (Hampson et al. 1998; Sinor et al. 2000). Im Vergleich zu den OHSC ist die neuronale Einzelzellkultur jedoch wenig komplex und funktionell intakte zelluläre Netzwerke zwischen Neuronen und Gliazellen bestehen dort nicht. Diese Netzwerke, welche in den OHSC vorhanden sind, könnten den möglicherweise direkten neuroprotektiven Effekt von AEA und THC aufheben, indem die Cannabinoide auch auf Gliazellen wie Astrozyten und Mikrogliazellen wirken und dadurch einer Neuroprotektion von AEA und THC auf Neurone in der OHSC entgegengewirkt wird. Für die neuroprotektiven Eigenschaften von AEA und THC in den beschriebenen in vivo Modellsystemen könnten die in der OHSC nicht vorhandenen immunkompetenten Blutzellen verantwortlich sein. Gerade vor diesem Hintergrund erschien es interessant zu untersuchen, inwieweit 2-AG, AEA und THC möglicherweise auch unterschiedliche Effekte auf die residenten Mikrogliazellen in der OHSC ausüben.

Mikrogliazellen sind bei neuropathologischen Prozessen von besonderem Interesse, da sie an Prozessen der Sekundärschädigung beteiligt sind (Marty et al. 1991; Blight 1992). Gegenwärtig wird über ihre dortige Rolle kontrovers diskutiert, da noch nicht endgültig geklärt werden konnte, ob sich Mikrogliazellen positiv oder negativ auf das Überleben von Neuronen auswirken. So gibt es Arbeiten, die zeigen, dass Mikrogliazellen neuronales Überleben ermöglichen (Nagata et al. 1993; Kohl et al. 2003). Dagegen stehen Untersuchungen, die belegen, dass Mikrogliazellen durch ihre Freisetzung von zytotoxischen Substanzen Neurone abtöten (Colton und Gilbert 1987; Giulian et al. 1994). Dadurch ist der Verdacht begründet, dass Mikrogliazellen

zu den Prozessen der Sekundärschädigung beitragen, die nach ischämischer oder traumatischer Läsion des ZNS auftritt (Schwab und Bartholdi 1996; Kim und Ko 1998). In diesem Zusammenhang zeigt eine Studie, dass Mikrogliazellen nach exzitotoxischer ZNS-Läsion zum Ort der Schädigung wandern und dort große Mengen an Sauerstoffradikalen produzieren, welche dann zur Sekundärschädigung führen (Ullrich et al. 2001a, b). In dieser Untersuchung wurde dargelegt, dass die Unterbrechung der Migration von Mikrogliazellen zum Ort der initialen Schädigung zur Aufhebung des neuronalen Sekundärschadens führte. Da Mikrogliazellen potentielle Zielzellen für Cannabinoide darstellen und ihre Beteiligung an neuronalen Schädigungsprozessen belegt ist, wurde die Wirkung von THC, AEA und 2-AG auch auf das Verhalten der Mikrogliazellen in der OHSC untersucht. In unseren Untersuchungen verursachte THC eine konzentrationsabhängige Reduktion der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen. Es ist bekannt, dass Cannabinoide ihre Wirkungen auf Mikrogliazellen über die dort exprimierten Cannabinoid (CB)<sub>2</sub> Rezeptoren oder über den bisher ausschließlich pharmakologisch nachgewiesenen abnormalen (abn) Cannabidiol Rezeptor ausüben (Jarai et al. 1999; Carlisle et al. 2002; Facchinetti et al. 2003; Walter et al. 2003). Im vorliegenden Befund konnte die THC verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl durch den spezifischen CB<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten AM630 signifikant aufgehoben wurde. Mit 10µM AM630 wurde dabei die effektivste und die am häufigsten angewandte Dosierung gebraucht (Mukherjee et al. 2004; Shoemaker et al. 2005). Dieser Befund ließ schlussfolgern, dass die THC induzierte Reduktion der Mikrogliazellzahl über den CB<sub>2</sub> Rezeptor vermittelt wird.

In Bezug auf die Anzahl degenerierender Neurone führte die Applikation von AM630 auf THC und NMDA behandelte OHSC zu einer Reduktion der Anzahl degenerierender Neurone, obwohl THC allein die Anzahl degenerierender Neurone in NMDA geschädigten OHSC nicht beeinflusste. Diese Befunde lieferten einen ersten Hinweis darauf, dass eine Reduktion der Mikrogliazellzahl nicht gleichzeitig mit einem besseren Überleben von Neuronen einhergeht.

AEA reduzierte ebenfalls signifikant die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen. Diese Reduktion konnte jedoch nicht mit Hilfe des selektiven CB<sub>2</sub> Rezeptor Antagonisten AM630 verhindert werden, was gegen eine Beteiligung des CB<sub>2</sub> Rezeptors bei der AEA induzierten Reduktion aktivierter Mikrogliazellen spricht. Dieser Befund steht im Einklang mit einer Arbeit die zeigt, dass die durch AEA verursachte Linderung von neuropathischen Schmerzen nicht durch AM630 aufgehoben werden kann (Guindon

und Beaulieu 2006). So scheint AEA seine Wirkungen über andere CB Rezeptoren zu vermitteln.

Interessanterweise reduzierte AM630 in der vorliegenden Arbeit bei gleichzeitiger Applikation mit AEA und NMDA die Anzahl degenerierender Neurone in den entsprechenden OHSC, obwohl AEA allein keinen Effekt auf den NMDA induzierten Untergang von Neuronen ausübte. Dieses Phänomen wurde auch für das Phytocannabinoid THC im Zusammenhang mit einer CB2 Rezeptor Blockade durch AM630 festgestellt. So scheinen THC und AEA ein vergleichbares pharmakologisches Spektrum zu besitzen. Ein Erklärungsansatz für dieses Phänomen könnten zwei Arbeiten liefern, die sich mit dem Migrationverhalten von Mikrogliazellen im Zusammenspiel mit Cannabinoiden beschäftigen. So steigert die Stimulation von CB Rezeptoren mit 2-AG die Migration von kultivierten Mikrogliazellen (Walter et al. 2003). Eine andere Arbeit belegt, dass die ortsspezifische Migration der Mikrogliazellen in Anwesenheit der CB1- und CB2 Rezeptor Antagonisten AM251 und AM630 massiv gestört ist (Eljaschewitsch et al. 2006). Daher könnte eine Blockade des CB2 Rezeptors durch AM630 die Fähigkeit der Mikrogliazellen zur Migration, in unserem Fall möglicherweise durch AEA induziert, in der OHSC herabsetzen und dadurch zur Neuroprotektion von Körnerzellen im GD des Hippokampus von geschädigten OHSC führen.

Im Gegensatz zu THC und AEA reduzierte 2-AG sowohl die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen als auch die Zahl der degenerierten Neurone in geschädigten OHSC. 2-AG ist bekanntermaßen ein potenter Agonist für den CB2 Rezeptor, welcher in hoher Dichte auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen lokalisiert ist (Carlisle et al. 2002). Interessanterweise verstärkte die Applikation des CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 die Reduktion der Mikrogliazellen noch weiter. Diese Tatsache spricht dafür, dass die 2-AG verursachte Reduktion der Mikrogliazellen nicht ausschließlich über den CB2 Rezeptor vermittelt wird. Neben dem CB2 Rezeptor besitzen Mikrogliazellen mit dem *abn* Cannabidiol Rezeptor einen weiteren Rezeptor, für den 2-AG als ein potenter Agonist ausgemacht wurde (Walter et al. 2003). Um die Beteiligung des *abn* Cannabidiol Rezeptors zu überprüfen, wurden spezifische Agonisten bzw. Antagonisten für den *abn* Cannabidiol Rezeptor verwendet. Auf die Ergebnisse dieser Versuche wird an anderer Stelle weiter unten in der Diskussion eingegangen.

Die selektive Blockade des CB2 Rezeptors durch AM630 beeinflusste jedoch nicht die 2-AG vermittelte Neuroprotektion, so dass dieser Effekt nicht mit einer Aktivierung des CB2 Rezeptors einhergehen kann. Dieser Befund steht im Einklang mit zahlreichen Arbeiten, die belegen, dass 2-AG neuroprotektive Eigenschaften unabhängig von CB2 Rezeptoren ausüben kann (Marsicano et al. 2003; van der Stelt und Di Marzo 2005; Panikashvili et al. 2006).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vergleichenden Analyse der Cannabinoide THC, AEA und 2-AG alle drei Cannabinoide in der Lage waren, die Anzahl der Mikrogliazellen signifikant zu reduzieren, jedoch ausschließlich 2-AG die Neurone in der KZS vor exzitotoxischer Schädigung bewahren konnte. Diese Befunde implizieren, dass eine Reduktion von Mikrogliazellen kein neuroprotektives Ereignis per se darstellt und somit keine generelle Korrelation zwischen neuronaler Degeneration und der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen existiert. Zudem zeigen die verwendeten Cannabinoide ein unterschiedliches pharmakologisches Spektrum.

#### **4.2 Der Einfluss von Makrophagen auf die neuroprotektiven Eigenschaften von THC, AEA und 2-AG in der OHSC**

Es ist bekannt, dass immunkompetente Zellen aus der Blutbahn eng mit neuronalen Schädigungsprozessen verzahnt sind. So wandern diese über die offene Bluthirnschranke in das neuronale Gewebe ein und migrieren dort zum Ort des neuronalen Schadens. Eine Studie hierzu zeigt beispielsweise, dass Monozyten aus der Blutbahn, welche nach enthorinaler Kortexläsion in das verletzte neuronale Gewebe infiltrieren, in Zonen akuter, anterograder axonaler Degeneration eine morphologische Transformation hin zu Mikrogliazellen, den residenten immunkompetenten Zellen des ZNS, vollziehen (Bechmann et al. 2005). In einer anderen Arbeit wird gezeigt, dass die Migration von Leukozyten innerhalb des denervierten Hippokampus als Reaktion auf eine axonale Schädigung in Folge einer Läsion des Enthorinodentatus, durch vor Ort von Gliazellen produzierten Chemokine dirigiert wird (Babcock et al. 2003).

Im vorliegenden Modellsystem der OHSC sind Blut stämmige immunkompetente Zellen abwesend. Während in der OHSC 2-AG neuroprotektiv wirkte, bewahrten AEA und THC die Neurone nicht vor dem Untergang nach einer exzitotoxischen Läsion. Da in zahlreichen in vivo Modellen jedoch gezeigt wurde, dass AEA und THC

durchaus neuroprotektive Eigenschaften besitzen, könnte dies mit den in vivo vorhandenen Blut stämmigen Makrophagen in Zusammenhang stehen. Daher führten wir Experimente durch, in denen wir aus der Milz isolierte Makrophagen in die OHSC einwandern ließen. Es zeigte sich dabei, dass nach Infiltration von Makrophagen in die OHSC sowohl AEA als auch THC nun in der Lage waren, die Anzahl degenerierender Neurone in der KZS des Hippokampus signifikant zu reduzieren. Dieses Phänomen der Makrophagen abhängigen Neuroprotektion von AEA und THC auf der einen und der Makrophagen unabhängigen Neuroprotektion von 2-AG auf der anderen Seite könnte durch zahlreiche in der Literatur beschriebene konträre Wirkungen von AEA und THC gegenüber 2-AG erklärbar werden.

2-AG übt im Vergleich zu AEA und THC gegensätzliche Effekte auf T-Zellen aus. Funktionell relevante Parameter, die von den Cannabinoiden beeinflusst werden, sind vor allem die generelle Entzündungsantwort, die Migration der immunkompetenten Zellen und die Freisetzung von Zytokinen. Generell stimuliert 2-AG immunologische Reaktionen wohingegen AEA und THC diese reduzieren (Sugiura et al. 2004). Ferner wird berichtet, dass THC selektiv T-Zell abhängige humorale Immunantworten mittels direkter Inhibition akzessorischer T-Zellfunktionen hemmt (Schatz et al. 1997; Kaminski 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass 2-AG die Migration von humanen, peripheren Blutmonozyten sowie humanen, peripheren Blutkillerzellen induziert, während AEA und THC dies nicht tun (Kishimoto et al. 2003; Kishimoto et al. 2005). Mit Hilfe einer Chemotaxiskammer konnte gezeigt werden, dass 2-AG eine starke chemotaktische Aktivität auf unreife und reife dendritische Zellen ausübte (Maestroni 2004). Dieser Effekt wurde vollständig durch den CB2 Rezeptor Antagonisten SR 144528 inhibiert. 2-AG, AEA und THC unterscheiden sich des Weiteren in der funktionellen Modulation von immunkompetenten Zellen, so z. B. in der Inhibition der Zytokinproduktion durch Makrophagen (Berdyshev et al. 1997; Gallily et al. 2000). Für THC und AEA konnte gezeigt werden, dass sie die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Stickstoffmonoxid (NO) und Interleukin (IL)-6 Produktion konzentrationsabhängig reduzierten, wohingegen 2-AG zwar die IL-6 Produktion inhibierte, dafür aber die induzierbare NO Synthase (iNOS)-abhängige NO-Produktion moderat steigerte (Chang et al. 2001). Allerdings besaß 2-AG überhaupt keinen Effekt auf die NO Produktion selbst (Gallily et al. 2000). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass 2-AG die beschleunigte Produktion von IL-8 in HL-60 Zellen (humanen promyelozytische Leukämie Zellen)

induziert, wohingegen dies für AEA nicht gezeigt werden konnte (Kishimoto et al. 2004).

Obwohl natürlich die Effekte von 2-AG, AEA und THC hinsichtlich eines neuroprotektiven Verhaltens auf der einen Seite und hinsichtlich der Effekte auf immunkompetente Blutzellen auf der anderen Seite nicht direkt miteinander vergleichbar sind, so implizieren sie doch, dass 2-AG seine Effekte über Mechanismen vermittelt, welche sich deutlich von denen unterscheiden, über die AEA und THC wirken. Man könnte daraus ableiten, dass 2-AG Neuroprotektion ohne die Beteiligung von immunkompetenten Blutzellen vermittelt, wohingegen AEA und THC einen Mechanismus der Neuroprotektion anwenden, welcher von der Verfügbarkeit immunkompetenter Blutzellen abhängt. Die in Einzelzellkulturen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich einer Neuroprotektion von AEA und THC könnten als zu artifiziell angesehen werden, da die wichtige Interaktionen zwischen Neuronen und Gliazellen wie Astrozyten und Mikrogliazellen, welche sowohl in den diskutierten in vivo Modellen als auch in der vorliegenden OHSC funktionell in Takt arbeiten, in diesen Systemen vollkommen fehlen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die verwendeten Cannabinoide hinsichtlich ihrer neuroprotektiven Kapazität in der OHSC differieren. Dieser Befund impliziert, dass 2-AG, AEA und THC unterschiedliche Mechanismen zur Ausübung der Neuroprotektion verwenden und verschiedene Zelltypen im ZNS selbst und/oder zusätzliche, über die offene Bluthirnschranke einwandernde, Blut stämmige immunkompetente Zellen nach einer zerebralen Schädigung Angriffspunkte für Cannabinoide darstellen.

#### **4.3 Pharmakologische Untersuchungen zur abnormaler (abn) Cannabidiol Rezeptor vermittelten Neuroprotektion in der OHSC**

Im Jahre 1977 stellten Adams und Kollegen auf der Suche nach psychoaktiven Cannabis assoziierten Substanzen fest, dass es nach Applikation von abn Cannabidiol, einem synthetischen Analogon des Phytocannabinoids Cannabidiol, in Versuchstieren zu einem rapiden Abfall des Blutdrucks, begleitet von leichten Bradykardien, kam (Adams et al. 1977). Die Arbeitsgruppe um Kunos konnte dann schließlich im Jahre 1999 mit Hilfe von CB1 und 2 Rezeptor defizienten Mäusen einen Rezeptor für das abn Cannabidiol pharmakologisch identifizieren, der funktionell den  $G_{i/o}$  Protein gekoppelten Rezeptoren angehört (Jarai et al. 1999).

Dieser identifizierte Rezeptor wird durch den synthetischen Agonisten *abn* Cannabidiol aktiviert und durch das Phytocannabinoid Cannabidiol sowie das synthetische O-1918 antagonisiert (Jarai et al. 1999; Offertaler et al. 2003). *Abn* Cannabidiol bindet nicht an CB1 Rezeptoren, was eindeutig an Membranfraktionen, die aus dem Kleinhirn von Ratten gewonnen wurden, nachgewiesen wurde (Offertaler et al. 2003). Am humanen CB2 Rezeptor, welcher in CHO (chinese hamster ovary) Zellen überexprimiert wurde, konnten keine Effekte von *abn* Cannabidiol bis zu einer Konzentrationen von 100µM nachgewiesen werden (Showalter et al. 1996).

Nachdem gezeigt wurde, dass *abn* Cannabidiol bei Hunden eine Erniedrigung des Blutdrucks verursachte (Adams et al. 1977), fand man heraus, dass der *abn* Cannabidiol Rezeptor auf Endothelzellen von Blutgefäßen vorzukommen scheint. Dort führte seine Aktivierung zu einem Anstieg des intrazellulären cGMP Gehalts, was schließlich in der Öffnung von Kalium-Kanälen im Bereich der glatten vaskulären Muskulatur mündet und dort für Relaxation und Vasodilation sorgt (Begg et al. 2003). Pharmakologische Evidenzen legen nahe, dass aktivierte Mikrogliazellen neben dem CB2 Rezeptor ebenfalls den *abn* Cannabidiol Rezeptor besitzen (Walter et al. 2003). So wurde in dieser Studie mit primären mikroglialen Einzelzellkulturen aus neugeborenen Mäusen gezeigt, dass *abn* Cannabidiol die Migration der Mikrogliazellen förderte und dieser Effekt durch die Antagonisten Cannabidiol und O-1918 gehemmt wurde. Es gibt Hinweise darauf, dass der *abn* Cannabidiol Rezeptor die Migration der Mikrogliazellen über einen Anstieg des intrazellulären Botenstoffes cGMP leitet (Begg et al. 2003; Duan et al. 2003). Ob auch Astrozyten den *abn* Cannabidiol Rezeptor besitzen, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden (Walter und Stella 2003).

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften des *abn* Cannabidiol Rezeptors und des wahrscheinlichen Vorkommens auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen wurde die funktionelle Relevanz dieses Rezeptors für die exzitotoxische Schädigung in OHSC untersucht. Die Applikation von *abn* Cannabidiol auf geschädigte OHSC führte zu einer signifikanten Reduktion der Mikrogliazellzahl. Diese Reduktion wurde durch den Einsatz der Antagonisten Cannabidiol und O-1918 aufgehoben. Ebenso wirkte *abn* Cannabidiol neuroprotektiv in geschädigten OHSC: die Anzahl degenerierter Neurone sank signifikant ab. Dieser neuroprotektive Effekt des *abn* Cannabidiols wurde ebenfalls durch den Einsatz von Cannabidiol und O-1918 aufgehoben. Die



vorliegenden Befunde sprechen für eine Beteiligung des  $\text{abn}$  Cannabidiol Rezeptors an neuroprotektiven Vorgängen. In der Literatur sind zu dieser Eigenschaft des  $\text{abn}$  Cannabidiols noch keine Hinweise vorzufinden. Die dargelegten Ergebnisse implizieren, dass es sich bei den Effekten des  $\text{abn}$  Cannabidiols entweder um einen direkten Angriff auf möglicherweise neuronal vorkommende  $\text{abn}$  Cannabidiol Rezeptoren handelt oder aber dass  $\text{abn}$  Cannabidiol durch einen Angriff auf mikrogläre Rezeptoren indirekt für die Reduktion des Neuronentodes verantwortlich ist. Weiterhin konnten auch die 2-AG verursachte Reduktion der Mikrogliazellzahl und die Protektion von Körnerzellen des GD in geschädigten OHSC durch die beiden  $\text{abn}$  Cannabidiol Rezeptor Antagonisten Cannabidiol und O-1918 aufgehoben werden. Dieser Befund unterstützt die Vermutung, dass der  $\text{abn}$  Cannabidiol Rezeptor für Cannabinoid vermittelte Neuroprotektion relevant zu sein scheint.

#### **4.4 Pharmakologische Untersuchungen zur WIN Rezeptor vermittelten Neuroprotektion in der OHSC**

Das Aminoalkylindol WIN 55,212-2 (mesylat) ist ein synthetisches Cannabinoid und fungiert als ein potenter Agonist am CB1- und 2 Rezeptor (Kuster et al. 1993; Showalter et al. 1996). AEA und WIN zeigten in CB1 Rezeptor defizienten Mäusen aktivierende Eigenschaften an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, insbesondere im Bereich des Hippokampus, was für eine CB1 Rezeptor unabhängige Wirkung von AEA und WIN sprach (Di Marzo et al. 2000b; Breivogel et al. 2001). Auf peripheren Trigemulusneuronen bindet WIN zudem an den TRPV (transient receptor potential vanilloid)<sup>1</sup> Rezeptor, einen nichtselektiven Kationenkanal mit signifikanter Permeabilität vor allem für Kalzium, und inhibiert dort eine Calcineurin vermittelte Antihyperalgesie (Patwardhan et al. 2006). In primären Kulturen von Trigemulusneuronen der Ratte wurde zudem gezeigt, dass WIN zur Dephosphorylierung des TRPV1 Rezeptors und damit zur Desensibilisierung dieses Rezeptortyps führt (Jeske et al. 2006). Diese posttranslationale Modifikation läuft über die Aktivierung der Proteinphosphatase Calcineurin. Die Phosphorylierung von TRPV1 Rezeptoren spielt eine Schlüsselrolle in der Induktion der thermalen Hyperalgesie in Modellen inflammatorischen Schmerzes. TRPV1 Rezeptoren stellen dabei molekulare Integratoren schmerzhafter Stimuli dar, wie z. B. exogen zugeführter schmerzhafter Hitze oder endogen im Zuge inflammatorischer Prozesse

über Vanilloide vermittelter Effekte. Die Substanzgruppe der Vanilloide gaben dem TRPV1 Rezeptor ursprünglich den früher bekannten Namen Vanilloid1 Rezeptor.

Die Mitglieder der TRPV Rezeptorfamilie sind im ZNS weit verbreitet und kommen auch in peripheren Geweben vor (Mezey et al. 2000). Im Jahre 1997 wurde der TRPV1 Rezeptor kloniert (Caterina et al. 1997). Im Gehirn von Mäusen wurde eine massive neuronale Kolo-kalisation von TRPV1- und CB1 Rezeptoren nachgewiesen (Cristino et al. 2006). Mittlerweile ist bekannt, dass neben der neuronalen Lokalisation der TRPV1 Rezeptor auch auf Mikrogliazellen vorzufinden ist (Kim et al. 2006). Eine Aktivierung des TRPV1 Rezeptors durch den Agonisten Capsaizin führte über den Kalziumsignalweg und einer Zerstörung der Mitochondrien zum Untergang von Mikrogliazellen. Mit Hilfe des spezifischen TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin wurde die Schädigung der Mikrogliazellen abgeschwächt (Kim et al. 2006).

WIN stößt über die oben beschriebenen Rezeptoren eine Vielzahl von unterschiedlichsten Effekten in den Zielzellen an. So induzierte WIN anxiogene Effekte, welche von einer motorischen Inhibition begleitet und durch AM281, einen spezifischen CB1 Rezeptor Antagonisten, blockiert wurden (Rutkowska et al. 2006). Außerdem wirkte WIN antiemetisch. Der Effekt wurde in diesem Fall durch SR 141716A, einen spezifischen CB1 Rezeptor Antagonisten, aufgehoben, wohingegen der CB2 Rezeptor Antagonist SR144528 keine Wirkung zeigte (Darmani 2001). WIN zeigte zudem antikonvulsive Wirkungen, ohne jedoch gleichzeitig eine Atemdepression zu provozieren. Als Modellsystem diente in diesem Falle ein Hirnstamm-Rückenmark-Präparationsmodell (Koda et al. 2005).

Hinsichtlich eines neuroprotektiven Verhaltens von WIN ergibt sich anhand der Literatur ein recht einheitliches Bild, wobei der Wirkmechanismus allerdings noch umstritten ist. So verhinderte WIN die durch Quinolinsäure induzierten exzitotoxischen Effekte im Striatum der Ratte, ein Effekt, der durch den CB1 Rezeptor Antagonist AM251 aufgehoben wurde (Pintor et al. 2006). In hippokampalen Schnittkulturen inhibierten neben WIN diverse weitere Cannabinoide die Glutamat-Freigabe und waren so in der Lage, Glutamat induzierte neuronale Schädigungsprozesse zu reduzieren (Shen et al. 1996). Dabei wirkten die unterschiedlichen Cannabinoide sowohl über den CB1- als auch unabhängig vom CB1 Rezeptor. Im letzteren Falle lag eine Pertussistoxin abhängige Wirkung vor, was auf G-Protein vermittelte Effekte schließen lässt. Im Modellsystem des synaptisch

vermittelten Neuronentodes, bei dem es durch Reduktion der extrazellulären Magnesium-Konzentration über einen gewählten Zeitraum zu provozierten, sich wiederholenden Mustern von intrazellulären Kalziumspikes kam, die schließlich zum Absterben der verwendeten hippocampalen Neurone führten, konnte WIN dieses Absterben der Neurone verhindern, indem durch Zugabe von WIN die Kalziumspikes blockiert wurden (Shen und Thayer 1998). Dieser Effekt von WIN wurde durch den spezifischen CB1 Rezeptor Antagonisten SR141716A inhibiert. Ähnliche Ergebnisse für WIN zeigten, dass dies den Verlust hippocampaler Neurone nach transients globaler zerebraler Ischämie verminderte und das Infarktvolumen nach permanenter fokaler zerebraler Ischämie reduzierte (Nagayama et al. 1999). Es zeigte sich, dass diese Effekte durch den spezifischen CB1 Rezeptor Antagonist AM251 aufgehoben werden konnten. In der gleichen Studie schützte WIN ebenso kultivierte Neurone aus dem Neokortex nach Hypoxie und Glukoseentzug. Dieser Effekt war jedoch nicht durch den CB1- oder 2 Rezeptor vermittelbar, was für einen weiteren Cannabinoid Rezeptor spricht, über den WIN protektive Effekte auslösen kann. In Schnittkulturen des Frontallappens, welche über einen längeren Zeitraum ohne Glukose kultiviert wurden, wirkte WIN über den CB1- und 2 Rezeptor neuroprotektiv. Die Aktivierung des CB1 und 2 Rezeptors beeinflusste die glutamaterge Exzitotoxizität, die TNF-alpha Freisetzung sowie die Expression der induzierbaren NO Synthase (Fernandez-Lopez et al. 2006). WIN induzierte ferner über sensorische Trigemini neurone eine Antihyperalgesie. WIN wirkte dabei jedoch weder durch CB1,- CB2- noch TRPV1 Rezeptoren (Price et al. 2004). Vor dem Hintergrund der zahlreich beschriebenen neuroprotektiven Effekte liegt der Schluss nahe, dass WIN neben CB1- und 2 Rezeptoren noch einen weiteren, bisher unbekanntes G-Protein-gekoppeltes Cannabinoid (WIN) Rezeptor ansteuert. Der tatsächliche Wirkmechanismus dieses WIN Rezeptors ist jedoch noch nicht endgültig definiert worden.

Im Rahmen unserer Experimente wurde gezeigt, dass WIN in NMDA geschädigten OHSC neuroprotektiv wirkte und dieser Effekt durch AM251, einem spezifischen CB1 Rezeptor Antagonisten, blockiert werden konnte. Daher könnte in der OHSC die WIN induzierte Neuroprotektion über den CB1 Rezeptor vermittelt werden und so der exzitotoxischen neuronalen Schädigung von Körnerzellen im GD entgegenwirken. Allerdings wurde der neuroprotektive Effekt von WIN auch durch den TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin aufgehoben, was für eine Beteiligung des TRPV1 Rezeptors an der WIN vermittelten Neuroprotektion spricht. Da WIN auch als

ein potenter Agonist am CB2 Rezeptor beschrieben wurde (Felder et al. 1995), kam in der vorliegenden Arbeit auch der CB2 Rezeptor Antagonist AM630 zum Einsatz. Dieser konnte allerdings die Neuroprotektion von WIN nicht beeinflussen. Auf die WIN vermittelte Reduktion der Mikrogliazellzahl übten alle drei eingesetzten Antagonisten keinen Einfluss aus, so dass dieser Effekt von WIN unabhängig vom CB1,- CB2- und TRPV1 Rezeptor vermittelt zu werden scheint.

#### **4.5 Das Endocannabinoid PEA vermittelt seine neuroprotektiven Effekte in der OHSC möglicherweise über den PPAR-alpha Rezeptor**

Das endogene Fettsäureamin Palmitylethanolamin (PEA), generiert aus Ethanolamin und Palmitinsäure, wurde schon vor mehr als 50 Jahren identifiziert (Long und Martin 1956). Im Jahre 1964 wurde PEA erstmalig in Gewebe von Säugetieren nachgewiesen (Bachur et al. 1965). Bereits 1968 wurde für PEA gezeigt, dass es allergische Reaktionen und Entzündungen in Tieren reduziert (Benvenuti et al. 1968; Perlik et al. 1971). Außerdem wurden Grippe-Symptome beim Menschen nach PEA Gabe abgeschwächt (Kahlich et al. 1979). In der Folgezeit nahm das Interesse an PEA kontinuierlich ab, bis man schließlich herausfand, dass AEA, ein strukturelles Analogon von PEA, endogener Ligand an CB Rezeptoren ist. Seither wurde für PEA gezeigt, dass es in der Peripherie Inflammationsprozesse und die Degranulation von Mastzellen inhibiert sowie neuroprotektive und antinozizeptive Effekte in Nagetieren aufweist (Berdyshev et al. 1998; Aloe et al. 1993; Mazzari et al. 1996; Calignano et al. 1998; Jaggar et al. 1998; Lambert et al. 2001). PEA wirkt auf die NO Produktion und auf die Expression proinflammatorischer Proteine wie die induzierbare NO Synthase oder die Cyklooxygenase 2, indem es in deren transkriptionale Steuerung eingreift (Ross et al. 2000). Andere Studien haben außerdem gezeigt, dass PEA Inflammationsprozesse auch im Rahmen weniger Stunden und transkriptionsunabhängig reduzieren kann (Conti et al. 2002; LoVerme et al. 2005). PEA besitzt neben immunoregulatorischen Eigenschaften auch die Fähigkeit, neurogene und neuropathische Schmerzen zu beeinflussen (Di Marzo et al. 2000a). PEA soll hier in einem komplexen System die basale Reizschwelle von Entzündung und Schmerz kontrollieren (Calignano et al. 2001; Malan et al. 2002; Hohmann 2002). Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass PEA während der frühen Phase von Entzündungsprozessen und der Schmerzentstehung synthetisiert wird. Während Gewebsverletzungen steigt die Menge von PEA lokal schnell an,

indem Leukozyten, Mastzellen und Epidermiszellen vermehrt PEA freisetzen (Di Marzo et al. 1996; Bisogno et al. 1997; Calignano et al. 1998; Berdyshev 2000; Hohmann 2002). Eine gesteigerte PEA Synthese konnte auch im zerebralen Kortex der Ratte nach fokaler Ischämie festgestellt werden (Franklin et al. 2003). PEA wirkt weiterhin inhibitorisch auf die Nahrungsaufnahme, reduziert die gastrointestinale Motilität, drosselt die Proliferation von Krebszellen und schützt das vaskuläre Endothel in ischämischen Herzen (Di Marzo et al. 2001; Rodriguez de Fonseca et al. 2001; Capasso et al. 2001; DePetrocellis et al. 2002; Bouchard et al. 2003). Prinzipiell gilt es somit als gesichert, dass über den Anstieg des PEA Gehalts die lokalen anti-inflammatorischen und analgetischen Wirkungen von PEA erklärbar werden (Darmani et al. 2005).

Ähnlich stark steigt der PEA Gehalt nach fokaler zerebraler Ischämie auch im verletzten Hirngewebe an und führt synergistisch mit AEA zu einer Motilitätssteigerung der Mikrogliazellen (Franklin et al. 2003). Bezogen auf die Mikrogliazellen wurde weiterhin nachgewiesen, dass PEA allein appliziert im Dosierungsbereich von 1nM bis 3 $\mu$ M die basale Zellmigration der BV2 Zellen (einer tumorigenen Mikrogliazelllinie) nicht beeinflusste, wohingegen AEA die Migration der BV2 Zellen induzieren konnte (Walter et al. 2003). Wiederum zeigte sich, dass AEA und PEA gemeinsam die BV2 Zellmigration potenzierten, wohingegen PEA keinen Einfluss auf die 2-AG induzierte BV2 Zellmigration ausübte (Calignano et al. 1998; Franklin et al. 2003).

Anfangs wurde vermutet, dass PEA seine antinozizeptiven Effekte durch Angriff an peripheren CB2 Rezeptoren ausübt (Calignano et al. 1998). Diese Vermutung wurde durch die Erkenntnis unterstützt, dass der analgetische Effekt von PEA durch den CB2 Rezeptor Antagonisten SR144528 aufgehoben wird (Lambert und Di Marzo 1999). Mittlerweile gilt es jedoch als gesichert, dass PEA nicht an CB2 Rezeptoren bindet. Die Tatsache, dass SR144528 viele pharmakologische Effekte von PEA revertiert, bleibt jedoch bestehen. So wurde beispielsweise der analgetische Effekt von PEA durch SR144528 blockiert (Calignano et al. 1998; Rice et al. 2002; Farquhar-Smith und Rice 2003; Helyes et al. 2003). Die anti-inflammatorischen Effekte von PEA sind jedoch nur in akuten Inflammationsmodellen SR144528 sensitiv (Conti et al. 2002; Costa et al. 2002; LoVerme et al. 2005).

PEA wird zusammen mit AEA aus einem gemeinsamen Lipidvorläufer hergestellt. Man vermutete daher, dass beide Substanzen ein ähnliches Rezeptorprofil besäßen.

Es zeigte sich jedoch, dass PEA im Gegensatz zu AEA sowohl am CB2- als auch am CB1 Rezeptor inaktiv ist (Felder et al. 1995; Howlett et al. 2002; Lambert et al. 2002). Daher wird nun propagiert, dass PEA indirekt die AEA vermittelten Effekte verstärken kann, welche AEA über den CB1- und den TRPV1 Rezeptor ausübt (Lambert et al. 1999; DePetrocellis et al. 2001; Di Marzo et al. 2002; Lambert et al. 2002). Dieses Phänomen, welches weiter oben schon für die Steuerung der Migration von Mikrogliazellen beschrieben wurde, wird als „Entourage-Effekt“ bezeichnet und stellt den ersten von 3 propagierten Wirkmechanismen für PEA dar.

Für den zweiten möglichen Wirkmechanismus von PEA wird postuliert, dass die alpha Isoform des „peroxisome proliferator activated receptor“ (PPAR) das molekulare Ziel von PEA darstellt, über welches die anti-inflammatorischen Eigenschaften von PEA vermittelt werden (LoVerme et al. 2005). PPARs sind Liganden aktivierte Transkriptionsfaktor Rezeptoren, welche zur Rezeptorfamilie nukleärer Rezeptoren gehören. Retinsäure X Rezeptoren interagieren mit PPAR Rezeptoren und bilden Heterodimere, welche die Expression von sog. PPAR „responsive genes“ (PRG) regulieren. Es existieren drei Isoformen von PPAR (alpha, beta/delta und gamma). PPARs wurden sowohl im Gehirn als auch im Rückenmark in zerebralen Blutgefäßen bzw. Blutgefäßen des Rückenmarks nachgewiesen (Cullingford et al. 1998; Moreno et al. 2004). Auch Neurone, insbesondere Körnerzellen des GD, sowie Astrozyten haben einen hohen Gehalt an PPARs (Moreno et al. 2004). PPAR-alpha Rezeptoren werden auch von einer Vielzahl von Zellen des Immunsystems exprimiert (Daynes und Jones 2002). Die Aktivierung von PPAR-alpha durch natürliche und synthetische Liganden reguliert ferner den Lipid- sowie Lipoproteinstoffwechsel und spielt auch eine Rolle bei Entzündungsprozessen (Berger et al. 2005). PPAR-alpha kann generell als ein Modulator der inflammatorischen Antwort angesehen werden, da gezeigt wurde, dass Inflammationsprozesse in PPAR-alpha defizienten Mäusen deutlich verlängert sind (Devchand et al. 1996). Kürzlich wurde in diesem Zusammenhang aufgedeckt, dass PPAR-alpha seine anti-inflammatorischen Eigenschaften durch Unterdrückung typischer inflammatorischer Signaltransduktionswege ausübt, wie z. B. den C/EBP-beta,- STAT1,- NFAT,- AP-1 und NFkB kontrollierten Signalweg (Delerive et al. 1999; Blanquart et al. 2003). PPAR-alpha verhinderte z. B. die Aktivierung von NFkB, wodurch die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Gene wie TNF-alpha, IL-1beta und ICAM-1 nicht induziert werden konnte (Bregman et al. 1997a, b; Diener

und Bregmann 1998a, b). Des Weiteren ist PPAR-alpha an der zellulären Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (Rusyn et al. 2000). PPAR-alpha Agonisten reduzieren hier das Ausmaß an oxidativem Stress, indem sie die Aktivität zahlreicher antioxidativer Enzyme steigern, so z. B. die der Kupfer/Zink Superoxiddismutase und der Gluthathionperoxidase (Deplanque et al. 2003). Auch für synthetische PPAR Agonisten konnten fundierte anti-inflammatorische Effekte gezeigt werden (Chinetti et al. 2000; LoVerme et al. 2005; Sheu et al. 2002). Eine direkte Bindung von PEA an PPAR-alpha und die damit verbundene Aktivierung des Transkriptionsfaktors mit einer halbmaximal effektiven Konzentration ( $EC_{50}$ ) von  $3\mu\text{M}$  wurde nachgewiesen (LoVerme et al. 2005). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass PEA weder an PPAR-beta noch an PPAR-gamma bindet.

Neben den beiden aufgeführten Möglichkeiten, dass PEA entweder über einen noch nicht identifizierten, SR144528 (CB2 Rezeptor Antagonist) sensitiven CB Rezeptor wirkt oder seine Effekte über PPAR-alpha Rezeptoren vermittelt, steht noch ein dritter möglicher Wirkmechanismus von PEA zur Diskussion. So könnte PEA als ein möglicher Agonist am G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) 55 fungieren (Mackie und Stella 2006). Dieser auf Immunzellen lokalisierte GPCR55 Rezeptor könnte die anti-entzündlichen Eigenschaften des PEA vermitteln und so die zahlreichen Funktionen des PEA in Immunzellen ausüben.

Um die funktionelle Relevanz des PEA für neuroprotektive Phänomene und die Migration von Mikrogliazellen zu diskutieren, muss erneut auf den zweiten Wirkmechanismus zurückgegriffen werden, bei dem die Effekte von PEA über PPAR Rezeptoren vermittelt werden. PPAR Rezeptoren wurden in neuronalem Gewebe nachgewiesen. Die Expression von PPARalpha im Rückenmark ist in der grauen Substanz homogen verteilt, wohingegen in der weißen Substanz PPAR-alpha exklusiv in Astrozyten vorzufinden ist (Benani et al. 2003). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der PPAR-alpha Agonist 4-Chlor-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthiosäure (Wy-14643) in primären Astrozytenkulturen, die mit LPS stimuliert wurden, konzentrationsabhängig die Produktion von NO reduzierte (Xu et al. 2006). Des Weiteren wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-1beta und IL-6 gehemmt. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte ähnliche Ergebnisse für Mikrogliazellen nachweisen. In primären Kulturen von Mikrogliazellen inhibierte Wy-14643 die Produktion von NO, IL-1beta und TNF-alpha (Xu et al. 2005).

Der PPAR-alpha Agonist Wy-14643 war in der Lage, das ZNS in einem Schlaganfallmodell bei der Maus zu schützen, und zwar dann, wenn es 3 bzw. 7 Tage vor Induktion der zerebralen Ischämie verabreicht wurde (Inoue et al. 2003). In einem Ischämie/Reperfusion (I/R) Schädigungsmodell des Rattenhippokampus zeigte eine andere Arbeitsgruppe die Induktion einer akuten Neuroprotektion, wenn Wy-14643 direkt vor der zerebralen Ischämie oder während der Reperusionsperiode appliziert wurde (Collino et al. 2006a, b). Dort wurde zudem gezeigt, dass die Konzentration des S100B Proteins, einem Marker für zerebrale Schädigungen, im Hippokampus von Ratten, die vorher einer I/R ausgesetzt waren, stark erhöht war. Durch Applikation des PPAR-alpha Rezeptor Agonist Wy-14643 konnte die Konzentration von S100B signifikant reduziert werden. Da zahlreiche Mechanismen, welche an der zerebralen Ischämie beteiligt sind, ebenfalls eine Rolle in der traumatischen Schädigung von Nervengewebe spielen, wurde die Rolle von PPAR-alpha in Modellen von traumatischer Rückenmarksschädigung und traumatischer ZNS Schädigung überprüft. Dabei wurde ein neuroprotektiver Effekt mit teilweise ähnlichen Mechanismen wie in der zerebralen Ischämie, beispielsweise die Reduktion der Biosynthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha, beobachtet (Genovese et al. 2005; Besson et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PEA in der Lage war, die Anzahl degenerierender Neurone in der KZS des GD nach exzitotoxischer Schädigung signifikant zu reduzieren. Weiterhin reduzierte PEA auch die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen. Um eine mögliche Beteiligung des PPAR-alpha Rezeptors zu untersuchen, verwendeten wir den PPAR-alpha Rezeptor Agonisten Wy-14643. Dabei zeigte sich, dass Wy-14643 sowohl die Mikrogliazellzahl als auch die Anzahl degenerierender Neurone in der KZS des GD nach exzitotoxischer Schädigung signifikant reduzierte. So könnte PEA im vorliegenden Schädigungsmodell seine neuroprotektiven Eigenschaften über den PPAR-alpha Rezeptor vermitteln.

#### **4.6 Cannabinoide beeinflussen die TNF-alpha Sekretion aus Mikrogliazellen und Astrozyten**

Zytokine steuern die Proliferation und Differenzierung von Zellen und fungieren zudem als Mediatoren innerhalb immunologischer Prozesse. Tumornekrosefaktoren (TNF) wie TNF-alpha bilden dabei eine Hauptgruppe von Zytokinen. In der Peripherie wird TNF-alpha hauptsächlich von Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen



gebildet. Dort ist es an Prozessen der Immunabwehr und Inflammation beteiligt. Im ZNS sind vorwiegend zwei Zelltypen zur Bildung von TNF-alpha befähigt: die residenten immunkompetenten Mikrogliazellen und die Astrozyten (Puffenbarger et al. 2000; Facchinetti et al. 2003; Sheng et al. 2005). Im gesunden Gehirn moduliert TNF-alpha beispielsweise im Hypothalamus die Freisetzung des „Corticotropin-Releasing“-Hormons (CRH; Bianchi et al. 1991). Bei pathologischen Prozessen hingegen kommt es zur übermäßigen Aktivierung von Mikrogliazellen, die daraufhin vermehrt Interleukine (IL-1beta und IL-6) und TNF-alpha freisetzen. Diese übermäßige Produktion von TNF-alpha kann sich dann zunehmend schädlich auf das umgebende neuronale Gewebe auswirken. Im Verlauf solch neurodegenerativer Prozesse produzieren neben den Mikrogliazellen auch Astrozyten vermehrt TNF-alpha (Puffenbarger et al. 2000). TNF-alpha sorgt als ein Mediator inflammatorischer Prozesse innerhalb des ZNS u. a. für die Induktion der iNOS, wodurch es zur vermehrten Produktion des schädlichen NO kommt (Heneka et al. 1998). Ferner unterdrückt TNF-alpha solche neuronale Signalkaskaden, die einer Schädigung entgegenwirken könnten (Venters et al. 2000).

Da Cannabinoide für ihre neuroprotektiven Eigenschaften bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob bestimmte Cannabinoide die Freisetzung von TNF-alpha aus Mikrogliazellen und Astrozyten hemmen können. Von einigen Cannabinoiden ist bekannt, dass sie sich negativ auf die Sekretion von TNF-alpha auswirken. So wurde gezeigt, dass die beiden EC 2-AG und AEA sowie die synthetischen Cannabinoide WIN, CP55940 und HU-210, letzteres ein THC Analogon, die LPS induzierte Sekretion von TNF in primären Kulturen von Mikrogliazellen innerhalb einer 2stündigen Stimulationsdauer signifikant und konzentrationsabhängig reduzieren (Facchinetti et al. 2003). Der reduzierende Effekt von WIN wird dabei nicht über die Aktivierung von CB1- oder 2 Rezeptoren vermittelt. Auch andere Studien zeigten, dass die Cannabinoid induzierte Reduktion von TNF-alpha nicht über CB1 und 2 Rezeptoren vermittelt wird (Puffenbarger et al. 2000). In Astrozyten konnte WIN ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion von TNF-alpha erzielen (Sheng et al. 2005). In diesem Fall wurde TNF-alpha durch eine 48stündige Stimulation mit IL-1beta induziert.

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die EC 2-AG und AEA sowie das synthetische Cannabinoid WIN reduzierende Effekte auf den TNF-alpha Gehalt im Kulturüberstand von Mikrogliazellen, allerdings wurde hier für 48 Stunden mit LPS

stimuliert. Der Effekt von 2-AG wurde nicht über CB1,- CB2- oder den abn Cannabidiol Rezeptor vermittelt. Der Effekt von AEA konnte durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol aufgehoben werden, was dafür spricht, dass AEA den TNF-alpha Gehalt möglicherweise über den abn Cannabidiol Rezeptor reduziert. So ist bekannt, dass Agonisten des abn Cannabidiol Rezeptors die Migration von Mikrogliazellen steuern (Walter et al. 2003). Ein weiteres Indiz dafür, dass der abn Cannabidiol Rezeptor an der Regulierung der TNF-alpha Freisetzung beteiligt sein könnte, ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit abn Cannabidiol selbst die Sekretion von TNF-alpha aus Mikrogliazellen reduzierte. Dieser Effekt konnte jedoch nicht durch abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten gehemmt werden, so dass unsere vorgelegten Ergebnisse in keine bisher beschriebene und einheitliche Pharmakologie für CB Rezeptoren zu passen scheinen.

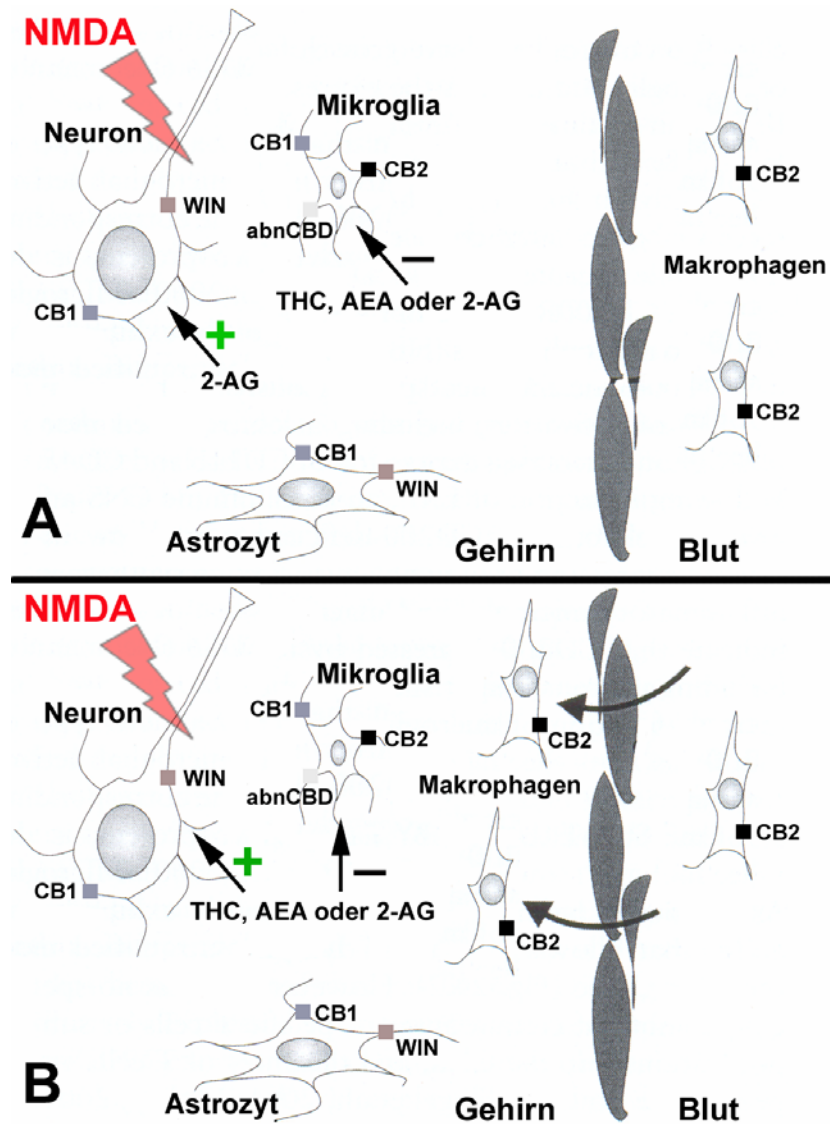
Die durch WIN verursachte Reduktion von TNF-alpha in Mikrogliazellkulturen konnte durch den CB1 Rezeptor Antagonisten AM251, den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 und den abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 geringfügig aufgehoben werden. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu einer bereits oben zitierten Arbeit, in der dem reduzierenden Effekt von WIN weder der CB1 noch der CB2 Rezeptor zugeordnet werden konnte (Puffenbarger et al. 2000).

In den Astrozytenkulturen konnte AEA den TNF-alpha Anstieg als Folge der 48stündigen LPS Stimulation nicht signifikant beeinflussen. Dagegen verursachte 2-AG eine Reduktion der LPS stimulierten TNF-alpha Freisetzung. Der Effekt von 2-AG konnte durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 sowie die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol signifikant aufgehoben werden. Der CB 2 Rezeptor wurde auf der Zelloberfläche von humanen Astrozyten nachgewiesen (Sheng et al. 2005). Eine pharmakologische Charakterisierung des abn Cannabidiol Rezeptors auf Astrozyten liegt nach aktueller Literatur dagegen noch nicht vor. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Pharmakologie spricht somit zum Teil für die Existenz eines astrozytären abn Cannabidiol Rezeptors, über welchen 2-AG die LPS stimulierte TNF-alpha Freisetzung hemmen kann. Einen weiteren Hinweis für das Vorkommen eines solchen astrozytären abn Cannabidiol Rezeptors liefert die Tatsache, dass das synthetische abn Cannabidiol, ein selektiver Agonist für den abn Cannabidiol Rezeptor, ebenfalls in der Lage war, die LPS induzierte Sekretion von TNF-alpha aus Astrozyten zu reduzieren. Allerdings konnte der reduzierende Effekt

von abn Cannabidiol nur durch einen der beiden verwendeten abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten gehemmt werden. Daher ist momentan nicht schlüssig erklärbar, ob der abn Cannabidiol Rezeptor tatsächlich aktiv auf Astrozyten vorkommt und funktionell relevant für die TNF-alpha Produktion ist. Es bedarf in dieser Hinsicht sicherlich noch weiterer experimenteller Erhebungen, in die auch weitere Agonisten/Antagonisten für Cannabinoid Rezeptoren einbezogen werden müssen.

**Abb. 4.1:** Darstellung der Arbeitshypothesen. Nach exzitotoxischer Schädigung der OHSC durch NMDA kommt es zu einem drastischen Untergang von Neuronen und zu einer massiven Aktivierung von Mikrogliazellen. A: Bei Abwesenheit Blut stämmiger Makrophagen bewirken die Cannabinoide THC, AEA und 2-AG eine deutliche Reduktion der Mikrogliazellzahl, jedoch ist nur 2-AG in der Lage, gleichzeitig auch die Anzahl degenerierender Neurone zu vermindern. B: In Anwesenheit Blut stämmiger Makrophagen reduzieren THC, AEA und 2-AG sowohl die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen als auch die Anzahl degenerierender Neurone. Theoretisch könnten THC, AEA und 2-AG ihre neuroprotektiven Eigenschaften direkt über die auf Neuronen nachgewiesenen CB1- oder WIN Rezeptoren vermitteln. THC, AEA und 2-AG könnten sich ebenfalls indirekt über CB1-, CB2-, abnCBD- oder WIN Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche von Astrozyten, Makrophagen oder Mikrogliazellen befinden, neuroprotektiv auswirken. Aus den Befunden der vorliegenden Arbeit und der in der Literatur beschriebenen Verteilungsmuster von CB Rezeptoren lassen sich daher folgende Arbeitshypothesen ableiten: 1. Eine durch die Cannabinoide THC, AEA oder 2-AG verursachte Reduktion der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen führt nicht per se zu einer Neuroprotektion. 2. Durch Anwesenheit von Blut stämmigen Makrophagen weisen THC und AEA neuroprotektive

Eigenschaften auf, die sie in deren Abwesenheit nicht zeigen (verändert nach Neumann 2004).



## 5 Zusammenfassung

Neben den Phytocannabinoiden und synthetischen Cannabinoiden existieren bei Säugetieren und Menschen endogene Cannabinoide (EC). Diese lipophilen Signalstoffe sind vorwiegend im ZNS und Immunsystem aktiv. Heute werden den EC vermehrt neuroprotektive Eigenschaften zugewiesen. Mit den Cannabinoid (CB)1- und 2 Rezeptoren wurden bisher zwei dem endogenen Cannabinoidsystem (ECS) zugehörige Rezeptoren kloniert. Pharmakologische Untersuchungen an CB1- und 2 Rezeptor defizienten Mäusen weisen jedoch auf noch weitere bisher nicht klonierte Rezeptoren hin. Zu den bekanntesten im ZNS selbst synthetisierten und gezielt freigesetzten Liganden für die CB Rezeptoren zählen Arachidonylethanolamin (AEA), 2-Arachidonylglycerin (2-AG) und Palmitylethanolamin (PEA). Deren Mengen steigen z. B. nach einer traumatischen Schädigung deutlich an. Die postulierte Neuroprotektion der EC erfolgt wahrscheinlich über eine Reduktion der glutamatergen Neurotransmission. Darüber hinaus kommt es auch in Mikrogliazellen und Astrozyten zur Cannabinoid induzierten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, wodurch Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen wie TNF-alpha vermindert werden.

Im vorliegenden Projekt sollten die den Phytocannabinoiden (THC) und den EC zugewiesenen neuroprotektiven Eigenschaften am Modellsystem der organotypischen hippokampalen Schnittkultur (OHSC) nach einer exzitotoxischen Läsion vergleichend untersucht werden. Dazu wurden OHSC von 8 Tage alten Ratten hergestellt und durch Applikation von *N*-Methyl-*D*-Aspartat (NMDA) exzitotoxisch geschädigt. Exzitotoxische Läsionen zeichnen sich durch einen massiven Neuronenverlust sowie durch die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten aus. Die Anzahl der zerstörten Körnerzellen im Gyrus dentatus (GD) des Hippokampus wurde als Maß für die Bestimmung des neuronalen Schadens angesehen. Weiterhin wurde die Anzahl der aktivierten Mikrogliazellen im Bereich der Körnerzellschicht quantitativ bestimmt. Dann sollte geprüft werden, ob die eingesetzten Cannabinoide die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen reduzieren und ob sich eine Reduktion der Mikrogliazellen positiv auf das Überleben der Neurone auswirkt. Ungeschädigte und NMDA geschädigte OHSC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von THC, AEA, 2-AG oder PEA behandelt. Durch Zugabe von Propidiumiodid (PI) wurden die degenerierten Neurone markiert (PI<sup>+</sup> Neurone). Mit Hilfe von FITC-konjugiertem *Griffonia simplicifolia* Isolektin B<sub>4</sub> (IB<sub>4</sub><sup>+</sup>) wurden die Mikrogliazellen dargestellt und die OHSC abschließend mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop analysiert. Es folgten weitere Versuche, bei denen verschiedene synthetische Agonisten/Antagonisten von CB Rezeptoren verwendet wurden, um die möglicherweise an neuroprotektiven Prozessen beteiligten CB Rezeptoren zu identifizieren. Um die mögliche Beteiligung des CB1- und 2 Rezeptors zu beleuchten, kamen die Antagonisten AM251 und AM630 zum Einsatz. Die Beteiligung von bisher nur pharmakologisch identifizierten CB Rezeptoren, wie dem WIN- oder dem abnormalen (abn) Cannabidiol Rezeptor, wurde mit Hilfe des Agonisten WIN und des Antagonisten Capsazepin für den WIN Rezeptor, oder, im Falle des abn Cannabidiol Rezeptors, mit Hilfe der Agonisten abn Cannabidiol und 2-AG sowie der Antagonisten O-1918 und Cannabidiol untersucht. In ungeschädigten OHSC waren in der KZS des GD nahezu keine PI<sup>+</sup> Neurone und nur sehr wenige IB<sub>4</sub><sup>+</sup>, ramifizierte Mikrogliazellen nachweisbar. Nach NMDA Schädigung stieg die Zahl der PI<sup>+</sup> Neurone und der IB<sub>4</sub><sup>+</sup>, amöboiden Mikrogliazellen massiv an. Die aktivierten Mikrogliazellen akkumulierten vorwiegend an Stellen

höchster neuronaler Schädigung. Im Vergleich zu ausschließlich mit NMDA behandelten OHSC verursachte das Phytocannabinoid THC eine konzentrationsabhängige numerische Reduktion der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen. Die Anzahl der PI<sup>+</sup> Neurone wurde hingegen nicht beeinflusst. Alle verwendeten Endocannabinoide (AEA, 2-AG, PEA) reduzierten die Anzahl der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen. Darüber hinaus war die Zahl der PI<sup>+</sup> Neurone nach Gabe von 2-AG und PEA im Sinne eines neuroprotektiven Effektes deutlich vermindert, wohingegen AEA keine neuroprotektiven Eigenschaften besaß. Die synthetischen CB Rezeptor Agonisten WIN und abn Cannabidiol reduzierten die Anzahl der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen und PI<sup>+</sup> Neurone ebenfalls deutlich. Der Einsatz der oben beschriebenen Antagonisten ergab, dass die THC induzierte Reduktion der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen durch den CB2 Rezeptor Antagonisten AM630 aufgehoben wurde, was auf eine Beteiligung des CB2 Rezeptors hindeutet. Die 2-AG induzierte Reduktion der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen wurde durch die abn Cannabidiol Rezeptor Antagonisten O-1918 und Cannabidiol gehemmt. Der 2-AG vermittelte neuroprotektive Effekt wurde ebenfalls durch O-1918 und Cannabidiol aufgehoben. Beide Antagonisten hoben auch die abn Cannabidiol induzierte Reduktion der IB<sub>4</sub><sup>+</sup> Mikrogliazellen und die abn Cannabidiol induzierte Neuroprotektion auf. Die am Modellsystem der OHSC durchgeführten Versuche zeigen deutlich, dass die verwendeten Cannabinoide nach einer exzitotoxischen Schädigung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Anzahl aktivierter Mikrogliazellen und die Zahl degenerierender Neurone ausüben. Sie belegen ferner, dass eine Reduktion der Anzahl aktivierter Mikrogliazellen sich nicht per se neuroprotektiv auszuwirken scheint. Daher ist festzustellen, dass ein Zusammenspiel verschiedenartiger CB Rezeptortypen auf der einen und unterschiedlicher Zelltypen auf der anderen Seite beim Mechanismus der Neuroprotektion stattfindet.

In unseren Untersuchungen erwiesen sich THC und AEA als nicht neuroprotektiv, obwohl für beide Substanzen in der Literatur solche Effekte unter in vivo Bedingungen beschrieben wurden. Die Diskrepanz zwischen 2-AG und PEA auf der einen Seite und AEA und THC auf der anderen Seite in unserem Modellsystem ließe sich eventuell dadurch erklären, dass in der OHSC keine immunkompetenten Blutzellen vorhanden sind, die möglicherweise ein wichtiges Element im Zusammenspiel verschiedener Zelltypen bei der Neuroprotektion unter in vivo Bedingungen darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, haben wir OHSC mit isolierten Milzmakrophagen inkubiert, um so aus der Blutbahn einwandernde immunkompetente Zellen zu simulieren. Die Ergebnisse dieser Experimente belegen, dass Milzmakrophagen tatsächlich zum Ort höchster neuronaler Schädigung in der OHSC migrieren und bei Anwesenheit dieser Milzmakrophagen sowohl AEA als auch THC neuroprotektiv sind.

Schließlich wurde mit primären Kulturen von Mikrogliazellen und Astrozyten untersucht, ob Cannabinoide die Lipopolysaccharid (LPS) induzierte Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen beeinflussen. Diesbezüglich wurde die Konzentrationen des Zytokins TNF-alpha im Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass die eingesetzten Cannabinoide die Freisetzung von TNF-alpha äußerst differenziert regulieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Arbeit interessante und neue Befunde zur neuroprotektiven Wirkung von Cannabinoiden erhoben wurden. Diese Daten werden sicherlich eine breite Ausgangsbasis für zukünftige Untersuchungen bieten, in denen die weitere Analyse des komplexen Zusammenspiels zwischen verschiedenen CB Rezeptoren und unterschiedlichen Zelltypen des ZNS bei der Cannabinoid vermittelten Neuroprotektion erfolgen wird.

## 6 Literatur

Adamchik Y, Frantseva MV, Weisspapier M, Carlen PL, Perez Velazquez JL (2000) Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc.* 5:153-158.

Adams MD, Earnhardt JT, Martin BR, Harris LS, Dewey WL, Razdan RK (1977) A cannabinoid with cardiovascular activity but no overt behavioral effects. *Experientia.* 33:1204-1205.

Adembri C, Bechi A, Meli E, Gramigni E, Venturi L, Moroni F, De Gaudio AR, Pellegrini-Giampietro DE (2004) Erythropoietin attenuates post-traumatic injury in organotypic hippocampal slices. *J Neurotrauma.* 21:1103-1112.

Ameri A, Wilhelm A, Simmet T (1999) Effects of the endogenous cannabinoid, anandamide, on neuronal activity in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol.* 126:1831-1839.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87:171.

Aloe L, Leon A, Levi-Montalcini R (1993) A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behaviour. *Agents Actions.* 39:C145-147.

Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T (2003) Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci.* 23:7922-7930.

Bachur NR, Masek K, Melmon KL, Udenfriend S (1965) Fatty Acid Amides Of Ethanolamine In Mammalian Tissues. *J Biol Chem.* 240:1019-1024.

Bartholdi D, Schwab ME (1997) Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* 9:1422-1438.

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J (2005) Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J.* 19:647-649.

Begg M, Mo FM, Offertaler L, Batkai S, Pacher P, Razdan RK, Lovinger DM, Kunos G (2003) G protein-coupled endothelial receptor for atypical cannabinoid ligands modulates a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> current. *J Biol Chem.* 278:46188-46194.

Benani A, Kremarik-Bouillaud P, Bianchi A, Netter P, Minn A, Dauca M (2003) Evidence for the presence of both peroxisome proliferator-activated receptors alpha and beta in the rat spinal cord. *J Chem Neuroanat.* 25:29-38.

Benvenuti F, Lattanzi F, De Gori A, Tarli P (1968) Activity of some derivatives of palmitoylethanolamide on carragenine-induced edema in the rat paw. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 44:809-813.

- Berdyshev EV, Boichot E, Germain N, Allain N, Anger JP, Lagente V (1997) Influence of fatty acid ethanolamides and delta9-tetrahydrocannabinol on cytokine and arachidonate release by mononuclear cells. *Eur J Pharmacol.* 330:231-240.
- Berdyshev E, Boichot E, Corbel M, Germain N, Lagente V (1998) Effects of cannabinoid receptor ligands on LPS-induced pulmonary inflammation in mice. *Life Sci.* 63:PL125-129.
- Berdyshev EV (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids.* 108:169-190.
- Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci.* 26:244-251.
- Besson VC, Chen XR, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C (2005) Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, exerts neuroprotective effects in traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 388:7-12.
- Bianchi M, Sacerdote P, Locatelli L, Mantegazza P, Panerai AE (1991) Corticotropin releasing hormone, interleukin-1 alpha, and tumor necrosis factor-alpha share characteristics of stress mediators. *Brain Res.* 546:139-142.
- Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem.* 272:3315-3323.
- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 85:267-273.
- Blight AR (1985) Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma.* 2:299-315.
- Blight AR (1992) Macrophages and inflammatory damage in spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 9:S83-91.
- Bouaboula M, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Stimulation of cannabinoid receptor CB1 induces krox-24 expression in human astrocytoma cells. *J Biol Chem.* 270:13973-13980.
- Bouchard JF, Lepicier P, Lamontagne D (2003) Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci.* 72:1859-1870.
- Bregman BS, Diener PS, McAtee M, Dai HN, James C (1997a) Intervention strategies to enhance anatomical plasticity and recovery of function after spinal cord injury. *Adv Neurol.* 72:257-275.



Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL (1997b) Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Exp Neurol.* 148:475-494.

Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol.* 60:155-163.

Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D (1996) Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci.* 16:3934-3942.

Calignano A, La Rana G, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature.* 394:277-281.

Calignano A, La Rana G, Piomelli D (2001) Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 419:191-198.

Capasso R, Izzo AA, Fezza F, Pinto A, Capasso F, Mascolo N, Di Marzo V (2001) Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol.* 134:945-950.

Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol.* 2:69-82.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389:816-824.

Chabot S, Williams G, Yong VW (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferon-beta-1b. *J Clin Invest.* 100:604-612.

Chang YH, Lee ST, Lin WW (2001) Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. *J Cell Biochem.* 81:715-723.

Childers SR (2006) Activation of G-proteins in brain by endogenous and exogenous cannabinoids. *AAPS J.* 8:E112-117.

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 49:497-505.

Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1:623-634.

Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Benetti E, Gallicchio M, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R (2006a) Oxidative stress and inflammatory response

evoked by transient cerebral ischemia/reperfusion: effects of the PPAR-alpha agonist WY14643. *Free Radic Biol Med.* 41:579-589

Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiemermann C, Fantozzi R (2006b) Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 530:70-80.

Colton CA, Gilbert DL (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* 223:284-288.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol.* 135:181-187.

Costa B, Conti S, Giagnoni G, Colleoni M (2002) Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems. *Br J Pharmacol.* 137:413-420.

Costa B, Colleoni M, Conti S, Parolaro D, Franke C, Trovato AE, Giagnoni G (2004) Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 369:294-299.

Cristino L, de Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience.* (139):1405-1415.

Cullingford TE, Bhakoo K, Peuchen S, Dolphin CT, Patel R, Clark JB (1998) Distribution of mRNAs encoding the peroxisome proliferator-activated receptor alpha, beta, and gamma and the retinoid X receptor alpha, beta, and gamma in rat central nervous system. *J Neurochem.* 70:1366-1375.

Darmani NA (2001) The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A reverses the antiemetic and motor depressant actions of WIN 55, 212-2. *Eur J Pharmacol.* 430:49-58.

Darmani NA, Izzo AA, Degenhardt B, Valenti M, Scaglione G, Capasso R, Sorrentini I, Di Marzo V (2005) Involvement of the cannabimimetic compound, N-palmitoylethanolamine, in inflammatory and neuropathic conditions: Review of the available pre-clinical data, and first human studies. *Neuropharmacology.* 48:1154-1163.

Daynes RA, Jones DC (2002) Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2:748-759.

Deliverie P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene res-

- ponse by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem.* 274:32048-32054.
- Del Rio-Hortega, P (1932): Microglia. In: Penfield, EW (Hrsg.): *Cytology and cellular pathology of the nervous system.* Hoeber, New York, 482-534.
- De Petrocellis L, Davis JB, Di Marzo V (2001) Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors. *FEBS Lett.* 506:253-156.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Bifulco M, Melck D, Di Marzo V (2002) Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems. *Fundam Clin Pharmacol.* 16:297-302.
- Deplanque D, Gele P, Petrault O, Six I, Furman C, Bouly M, Nion S, Dupuis B, Leys D, Fruchart JC, Cecchelli R, Staels B, Duriez P, Bordet R (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activation as a mechanism of preventive neuroprotection induced by chronic fenofibrate treatment. *J Neurosci.* 23:6264-6271.
- 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.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli (1996) The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature.* 384:39-43.
- Devlin MG, Christopoulos A (2002) Modulation of cannabinoid agonist binding by 5-HT in the rat cerebellum. *J Neurochem.* 80:1095-1102.
- Diana MA, Marty A (2004) Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE). *Br J Pharmacol.* 142:9-19.
- Di Carlo G, Izzo AA (2003) Cannabinoids for gastrointestinal diseases: potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs.* 12:39-49.
- Diener PS, Bregman BS (1998a) Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *J Neurosci.* 18:763-778.
- Diener PS, Bregman BS (1998b) Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci.* 18:779-793.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A (1996) Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J.* 316:977-984.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L (2000a) Endocannabinoids: new targets for drug development. *Curr Pharm Des.* 6:1361-1380.

Di Marzo V, Breivogel CS, Tao Q, Bridgen DT, Razdan RK, Zimmer AM, Zimmer A, Martin BR (2000b) Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J Neurochem.* 75:2434-2444.

Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L (2001) Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J.* 358:249-255.

Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A (2002) Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol.* 12:372-379.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. (2004) The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov.* 3:771-784.

Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J Neurosci.* 23:1320-1328.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron.* 49:67-79.

Facchinetti F, Del Giudice E, Furegato S, Passarotto M, Leon A (2003) Cannabinoids ablate release of TNFalpha in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia.* 41:161-168.

Farquhar-Smith WP, Rice AS (2003) A novel neuroimmune mechanism in cannabinoid-mediated attenuation of nerve growth factor-induced hyperalgesia. *Anesthesiology.* 99:1391-1401.

Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL (1995) Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 48:443-450.

Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2006) Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatr Res.* 60:169-173.

Forster E, Zhao S, Frotscher M (2006) Laminating the hippocampus. *Nat Rev Neurosci.* 7:259-267.

Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci.* 23:7767-7775.

- Franklin A, Stella N (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol.* 474:195-198.
- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus.* 6:347-470.
- Gahwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20:471-477.
- Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R (1988) Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.* 336:385-388.
- Gallily R, Breuer A, Mechoulam R (2000) 2-Arachidonylglycerol, an endogenous cannabinoid, inhibits tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages, and in mice. *Eur J Pharmacol.* 406:R5-7.
- Genovese T, Mazzon E, Di Paola R, Cannavo G, Muia C, Bramanti P, Cuzzocrea S (2005) Role of endogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha in the secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Exp Neurol.* 194:267-278.
- Gerdeman GL, Partridge JG, Lupica CR, Lovinger DM (2003) It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 26:184-192.
- Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW (1988) Axotomy of the rat facial nerve leads to increased CR3 complement receptor expression by activated microglial cells. *J Neurosci Res.* 21:18-24.
- Giulian D, Ingeman JE (1988) Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci.* 8:4707-4717.
- Giulian D, Vaca K, Johnson B (1988) Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. *J Neurosci Res.* 21:487-500.
- Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C (1994) Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem Int.* 25:227-233.
- Guindon J, Beaulieu P (2006) Antihyperalgesic effects of local injections of anandamide, ibuprofen, rofecoxib and their combinations in a model of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 50:814-823.
- Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R (1996) Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia.* 18:319-331.

- Hailer NP, Wirjatijasa F, Roser N, Hischebeth GT, Korf HW, Dehghani F (2001) Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 14:315-326.
- Hajos N, Katona I, Naiem SS, MacKie K, Ledent C, Mody I, Freund TF (2000) Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci.* 12:3239-3249.
- Hajos N, Ledent C, Freund TF (2001) Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. *Neuroscience* 106:1-4.
- Hajos N, Freund TF (2002) Distinct cannabinoid sensitive receptors regulate hippocampal excitation and inhibition. *Chem Phys Lipids.* 121:73-82.
- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D (1998) Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8268-73
- Hampson RE, Deadwyler SA (2000) Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci.* 20:8932-8942.
- Helyes Z, Nemeth J, Than M, Bolcskei K, Pinter E, Szolcsanyi J (2003) Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 73:2345-2353.
- Heneka MT, Loschmann PA, Gleichmann M, Weller M, Schulz JB, Wullner U, Klockgether T (1998) Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor-alpha/lipopolysaccharide. *J Neurochem.* 71:88-94.
- Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998) Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *Eur J Neurosci.* 10:3284-3290.
- Hermann A, Kaczocha M, Deutsch DG (2006) 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) membrane transport: history and outlook. *AAPS J.* 8:E409-412.
- Herring AC, Kaminski NE (1999) Cannabinol-mediated inhibition of nuclear factor-kappaB, cAMP response element-binding protein, and interleukin-2 secretion by activated thymocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 291:1156-1163
- Hilairat S, Bouaboula M, Carriere D, Le Fur G, Casellas P (2003) Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J Biol Chem.* 278:23731-23737.
- Hohmann AG (2002) Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioral, neurophysiological and neuroanatomical perspectives. *Chem Phys Lipids.* 121:173-190.

Holopainen IE (2005) Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochem Res.* 30:1521-1528.

Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:619-631.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161-202.

Howlett AC (2005) Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol.* 168:53-79.

Hüll M, Bahr M (1994) Regulation of immediate-early gene expression in rat retinal ganglion cells after axotomy and during regeneration through a peripheral nerve graft. *J Neurobiol.* 25:92-105.

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 75:816-821.

Huestis MA, Gorelick DA, Heishman SJ, Preston KL, Nelson RA, Moolchan ET, Frank RA (2001) Blockade of effects of smoked marijuana by the CB1-selective cannabinoid receptor antagonist SR141716. *Arch Gen Psychiatry.* 58:322-328.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Morita M, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Yumakai Y, Uchiyama K, Yoshikawa T (2003) Effect of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *Eur J Pharmacol.* 481:261-269.

Iversen L, Chapman V (2002) Cannabinoids: a real prospect for pain relief? *Curr Opin Pharmacol.* 2:50-55.

Jaggari SI, Hasnie FS, Sellaturay S, Rice AS (1998) The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain. *Pain.* 76:189-199.

Jan TR, Rao GK, Kaminski NE (2002) Cannabinol enhancement of interleukin-2 (IL-2) expression by T cells is associated with an increase in IL-2 distal nuclear factor of activated T cell activity. *Mol Pharmacol.* 61:446-454.

Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:14136-14141.

Jeske NA, Patwardhan AM, Gamper N, Price TJ, Akopian AN, Hargreaves KM (2006) Cannabinoid WIN 55,212-2 regulates TRPV1 phosphorylation in sensory neurons. *J Biol Chem.* 281:32879-32890.

Kahlich R, Klima J, Cihla F, Frankova V, Masek K, Rosicky M, Matousek F, Bruthans J (1979) Studies on prophylactic efficacy of N-2-hydroxyethyl palmitamide (Impulsin) in acute respiratory infections. Serologically controlled field trials. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 23:11-24.

Kaminski NE (1998) Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol.* 83:124-132.

Kearn CS, Blake-Palmer K, Daniel E, Mackie K, Glass M (2005) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors enhances heterodimer formation: a mechanism for receptor cross-talk? *Mol Pharmacol.* 67:1697-1704.

Kiessling M, Stumm G, Xie Y, Herdegen T, Aguzzi A, Bravo R, Gass P (1993) Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13:914-924.

Kim WK, Ko KH (1998) Potentiation of N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity by immunostimulated murine microglia. *J Neurosci Res.* 54:17-26.

Kim SH, Won SJ, Mao XO, Jin K, Greenberg DA (2006) Molecular mechanisms of cannabinoid protection from neuronal excitotoxicity. *Mol Pharmacol.* 69:691-696.

Kishimoto S, Gokoh M, Oka S, Muramatsu M, Kajiwara T, Waku K, Sugiura T (2003) 2-arachidonoylglycerol induces the migration of HL-60 cells differentiated into macrophage-like cells and human peripheral blood monocytes through the cannabinoid CB2 receptor-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 278:24469-24475.

Kishimoto S, Kobayashi Y, Oka S, Gokoh M, Waku K, Sugiura T (2004) 2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand, induces accelerated production of chemokines in HL-60 cells. *J Biochem (Tokyo).* 135:517-524.

Kishimoto S, Muramatsu M, Gokoh M, Oka S, Waku K, Sugiura T (2005) Endogenous cannabinoid receptor ligand induces the migration of human natural killer cells. *J Biochem (Tokyo).* 137:217-223.

Klegeris A, Bissonnette CJ, McGeer PL (2003) Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. *Br J Pharmacol.* 139:775-786.

Klein TW (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol.* 5:400-411.

Kloss CU, Kreutzberg GW, Raivich G (1997) Proliferation of ramified microglia on an astrocyte monolayer: characterization of stimulatory and inhibitory cytokines. *J Neurosci Res.* 49:248-254.

Kohl A, Dehghani F, Korf HW, Hailer NP (2003) The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol.* 181:1-11.



- Koda S, Takeda S, Onimaru H, Akada S, Sakamoto A (2005) Cannabinoid suppressed bicuculline-induced convulsion without respiratory depression in the brainstem-spinal cord preparation from newborn rats. *Biomed Res.* 26:241-247.
- Kreutz S, Korf HW, Schubert-Zsilavecz M (2006) Selective cannabinoid receptor antagonists. *Pharm Unserer Zeit.* 35:512-520.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 19:312-318.
- Kunkler PE, Kraig RP (1997) Reactive astrocytosis from excitotoxic injury in hippocampal organ culture parallels that seen in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17:26-43.
- Kuster JE, Stevenson JI, Ward SJ, D'Ambra TE, Haycock DA (1993) Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: selective displacement by natural and synthetic cannabinoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 264:1352-1363.
- Lambert DM, Di Marzo V (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas: are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem.* 6:757-773.
- Lambert DM, DiPaolo FG, Sonveaux P, Kanyonyo M, Govaerts SJ, Hermans E, Bueb J, Delzenne NM, Tschirhart EJ (1999) Analogues and homologues of N-palmitoylethanolamide, a putative endogenous CB(2) cannabinoid, as potential ligands for the cannabinoid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1440:266-274.
- Lambert DM, Vandevoorde S, Diependaele G, Govaerts SJ, Robert AR (2001) Anticonvulsant activity of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid, in mice. *Epilepsia.* 42:321-327.
- Lambert DM, Vandevoorde S, Jonsson KO, Fowler CJ (2002) The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents? *Curr Med Chem.* 9:663-674.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 48:405-415.
- Lee J, Chan SL, Mattson MP (2002) Adverse effect of a presenilin-1 mutation in microglia results in enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine responses to immune challenge in the brain. *Neuromolecular Med.* 2:29-45.
- Lee SC, Collins M, Vanguri P, Shin ML (1992) Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes and microglia. *J Immunol.* 148:3391-3397.
- Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *J Neurosci Res.* 69:94-103.
- Long DA, Martin AJ (1956) Factor in arachis oil depressing sensitivity to tuberculin in B.C.G.-infected guineapigs. *Lancet.* 270:464-466.

- Lothman EW, Bertram EH 3rd, Stringer JL (1991) Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog Neurobiol.* 37:1-82.
- LoVerme J, La Rana G, Russo R, Calignano A, Piomelli D (2005) The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci.* 77:1685-1698.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol.* 58:193-201.
- Ludwin SK (1997) The pathobiology of the oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56:111-124.
- Mackie K, Stella N (2006) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8:E298-306.
- Maestroni GJ (2004) The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein. *FASEB J.* 18:1914-1916.
- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 146:3-15.
- Malan TP Jr, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F (2002) Inhibition of pain responses by activation of CB(2) cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids.* 121:191-200.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreakos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritic therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:9561-9566.
- Malipiero UV, Frei K, Fontana A (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J Immunol.* 144:3816-3821.
- Mailleux P, Verslype M, Preud'homme X, Vanderhaeghen JJ (1994) Activation of multiple transcription factor genes by tetrahydrocannabinol in rat forebrain. *Neuroreport.* 5:1265-1268.
- Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 302:84-88.
- Marty S, Dusart I, Peschanski M (1991) Glial changes following an excitotoxic lesion in the CNS--I. Microglia/macrophages. *Neuroscience.* 45:529-539.
- Massi P, Vaccani A, Parolaro D (2006) Cannabinoids, immune system and cytokine network. *Curr Pharm Des.* 12:3135-3146.

- 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.
- Mazzari S, Canella R, Petrelli L, Marcolongo G, Leon A (1996) N-(2-hydroxyethyl)hexadecanamide is orally active in reducing edema formation and inflammatory hyperalgesia by down-modulating mast cell activation. *Eur J Pharmacol.* 300:227-236.
- 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, Spatz M, Shohami E (2002) Endocannabinoids and neuroprotection. *Sci STKE.* 2002:RE5.
- Mechoulam R, Lichtman AH (2003) Neuroscience. Stout guards of the central nervous system. *Science.* 302:65-67
- Mechoulam R (2004) The promise of advances in the field of endocannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett.* 25:11-12.
- Meng ID, Manning BH, Martin WJ, Fields HL (1998) An analgesia circuit activated by cannabinoids. *Nature.* 395:381-383.
- Misner DL, Sullivan JM (1999) Mechanism of cannabinoid effects on long-term potentiation and depression in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* 19:6795-6805.
- Mezey E, Toth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3655-3660.
- Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience.* 123:131-145.
- Mukherjee S, Adams M, Whiteaker K, Daza A, Kage K, Cassar S, Meyer M, Yao BB (2004) Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors. *Eur J Pharmacol.* 505:1-9.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365:61-65.
- Nagata K, Takei N, Nakajima K, Saito H, Kohsaka S (1993) Microglial conditioned medium promotes survival and development of cultured mesencephalic neurons from embryonic rat brain. *J Neurosci Res.* 34:357-363.

- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci.* 19:2987-2995.
- Neumann H (2004) Antigen processing, presentation, and T cell interaction. In: Kettenmann H, Ransom BR (eds.) *Neuroglia* 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press.
- Offertaler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol.* 63:699-705.
- Olney JW, Sharpe LG (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science.* 166:386-388.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature.* 413:527-531.
- Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E (2006) The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis.* 22:257-264
- Patwardhan AM, Jeske NA, Price TJ, Gamper N, Akopian AN, Hargreaves KM (2006) The cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and evokes peripheral antihyperalgesia via calcineurin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:11393-11398.
- Pazmany T, Mechtler L, Tomasi TB, Kosa JP, Turoczi A, Urbanyi Z (1999) Differential regulation of major histocompatibility complex class II expression and nitric oxide release by beta-amyloid in rat astrocyte and microglia. *Brain Res.* 835:213-223.
- Perez-Reyes M, Timmons MC, Davis KH, Wall EM (1973) A comparison of the pharmacological activity in man of intravenously administered delta9-tetrahydrocannabinol, cannabinal, and cannabidiol. *Experientia* 29:1368-1390.
- Perlik F, Raskova H, Elis J (1971) Anti-inflammatory properties of N(2-hydroxyethyl) palmitamide. *Acta Physiol Acad Sci Hung.* 39:395-400.
- Pertwee RG (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther.* 95:165-174.
- Piomelli D (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4:873-884.
- Pintor A, Tebano MT, Martire A, Grieco R, Galluzzo M, Scattoni ML, Pezzola A, Coccorello R, Felici F, Cuomo V, Piomelli D, Calamandrei G, Popoli P (2006) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology.* 51:1004-1012

- Potucek YD, Crain JM, Watters JJ (2006) Purinergic receptors modulate MAP kinases and transcription factors that control microglial inflammatory gene expression. *Neurochem Int.* 49:204-214.
- Price TJ, Patwardhan A, Akopian AN, Hargreaves KM, Flores CM (2004) Cannabinoid receptor-independent actions of the aminoalkylindole WIN 55,212-2 on trigeminal sensory neurons. *Br J Pharmacol.* 142:257-266.
- Puffenbarger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia.* 29:58-69.
- Randall MD, Harris D, Kendall DA, Ralevic V (2002) Cardiovascular effects of cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 95:191-202.
- Rice AS, Farquhar-Smith WP, Nagy I (2002) Endocannabinoids and pain: spinal and peripheral analgesia in inflammation and neuropathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66:243-256.
- Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Gomez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodriguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D (2001) An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 414:209-212.
- Ross RA, Brockie HC, Pertwee RG (2000) Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamide. *Eur J Pharmacol.* 401:121-130.
- Rusyn I, Rose ML, Bojes HK, Thurman RG (2000) Novel role of oxidants in the molecular mechanism of action of peroxisome proliferators. *Antioxid Redox Signal.* 2:607-621.
- Rutkowska M, Jamontt J, Gliniak H (2006) Effects of cannabinoids on the anxiety-like response in mice. *Pharmacol Rep.* 58:200-206.
- Salio C, Doly S, Fischer J, Franzoni MF, Conrath M (2002) Neuronal and astrocytic localization of the cannabinoid receptor-1 in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 329:13-6.
- Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T (1990) Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res.* 509:119-124.
- Sawada M, Imamura K, Nagatsu T (2006) Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 70:373-381.
- Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142:278-287.
- Schipke CG, Boucsein C, Ohlemeyer C, Kirchhoff F, Kettenmann H. (2002) Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J.* 16:255-257.

Schwab ME, Bartholdi D (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* 76:319-370.

Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci.* 16:4322-4334.

Shen M, Thayer SA (1998) The cannabinoid agonist Win55,212-2 inhibits calcium channels by receptor-mediated and direct pathways in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res.* 783:77-84.

Sheng WS, Hu S, Min X, Cabral GA, Lokensgard JR, Peterson PK (2005) Synthetic cannabinoid WIN55,212-2 inhibits generation of inflammatory mediators by IL-1beta-stimulated human astrocytes. *Glia.* 49:211-219.

Sheu MY, Fowler AJ, Kao J, Schmuth M, Schoonjans K, Auwerx J, Fluhr JW, Man MQ, Elias PM, Feingold KR (2002) Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol.* 118:94-101.

Shivachar AC, Martin BR, Ellis EF (1996) Anandamide- and delta9-tetrahydrocannabinol-evoked arachidonic acid mobilization and blockade by SR141716A [N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboximide hydrochloride]. *Biochem Pharmacol.* 51:669-676.

Shoemaker JL, Ruckle MB, Mayeux PR, Prather PL (2005) Agonist-directed trafficking of response by endocannabinoids acting at CB2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 315:828-838.

Showalter VM, Compton DR, Martin BR, Abood ME (1996) Evaluation of binding in a transfected cell line expressing a peripheral cannabinoid receptor (CB2): identification of cannabinoid receptor subtype selective ligands. *J Pharmacol Exp Ther.* 278:989-999.

Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA (2000) Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 278:157-160.

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

Stella N, Piomelli D (2001) Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 425:189-196.

Stella N (2004) Cannabinoid signaling in glial cells. *Glia.* 48:267-277.

Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods.* 37:173-182.

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW (1988) Functional plasticity of microglia: a review. *Glia.* 1:301-307.

- Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT (1998) Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol.* 152:74-87.
- Streit WJ (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology.* 22:619-624.
- 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.
- Sugiura T, Oka S, Gokoh M, Kishimoto S, Waku K (2004) New perspectives in the studies on endocannabinoid and cannabis: 2-arachidonoylglycerol as a possible novel mediator of inflammation. *J Pharmacol Sci.* 96:367-375.
- Tator CH, Fehlings MG (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* 75:15-26.
- They C, Stanley ER, Mallat M (1992) Interleukin 1 and tumor necrosis factor-alpha stimulate the production of colony-stimulating factor 1 by murine astrocytes. *J Neurochem.* 59:1183-1186.
- Ullrich O, Diestel A, Bechmann I, Homberg M, Grune T, Hass R, Nitsch R (2001a) Turnover of oxidatively damaged nuclear proteins in BV-2 microglial cells is linked to their activation state by poly-ADP-ribose polymerase. *FASEB J.* 15:1460-1462.
- Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R (2001b) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol.* 3:1035-1042.
- Van der Stelt M, Veldhuis WB, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K (2001a) Neuroprotection by Delta9-tetrahydrocannabinol, the main active compound in marijuana, against ouabain-induced in vivo excitotoxicity. *J Neurosci.* 21:6475-6479.
- Van der Stelt M, Veldhuis WB, van Haften GW, Fezza F, Bisogno T, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Di Marzo V, Nicolay K (2001b) Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci.* 21:8765-8771.
- Van der Stelt M, Di Marzo V (2003) The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders. *Eur J Pharmacol.* 480:133-150.
- Van der Stelt M, Di Marzo V (2005) Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med.* 7(1-2):37-50.
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, van Zadelhoff G, Maccarrone M, Fezza F, Veldink GA, Vliegenthart JF, Bar PR, Nicolay K, Di Marzo V (2003) Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J Neurosci.* 23:4127-4133.

Venters HD, Dantzer R, Kelley KW (2000) Tumor necrosis factor-alpha induces neuronal death by silencing survival signals generated by the type I insulin-like growth factor receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 917:210-220.

Verderio C, Matteoli M (2001) ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J Immunol.* 166:6383-6391.

Vincent AM, Mohammad Y, Ahmad I, Greenberg R, Maiese K (1997) Metabotropic glutamate receptors prevent nitric oxide-induced programmed cell death. *J Neurosci Res.* 50:549-564.

Vincent VA, Lowik CW, Verheijen JH, de Bart AC, Tilders FJ, Van Dam AM (1998) Role of astrocyte-derived tissue-type plasminogen activator in the regulation of endotoxin-stimulated nitric oxide production by microglial cells. *Glia.* 22:130-137.

Walter L, Franklin A, Witting A, Moller T, Stella N (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J Biol Chem.* 277:20869-20876.

Walter L, Stella N (2003) Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia.* 44:85-90.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci.* 23:1398-1405.

Walter L, Stella N (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol.* 141:775-785.

Wilson MA, Molliver ME (1994) Microglial response to degeneration of serotonergic axon terminals. *Glia.* 11:18-34.

Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron.* 31:453-462.

Wilson RI, Nicoll RA (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.* 296:678-682.

Wilms H, Hartmann D, Sievers J (1997) Ramification of microglia, monocytes and macrophages in vitro: influences of various epithelial and mesenchymal cells and their conditioned media. *Cell Tissue Res.* 287:447-458.

Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N (2004) P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3214-3219.

Wotjak CT (2005) Role of endogenous cannabinoids in cognition and emotionality. *Mini Rev Med Chem.* 5:659-670.

Xu W, Filppula SA, Mercier R, Yaddanapudi S, Pavlopoulos S, Cai J, Pierce WM, Makriyannis A (2005) Purification and mass spectroscopic analysis of human CB1



cannabinoid receptor functionally expressed using the baculovirus system. *J Pept Res.* 66:138-150.

Xu X, Liu Y, Huang S, Liu G, Xie C, Zhou J, Fan W, Li Q, Wang Q, Zhong D, Miao X (2006) Overexpression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 correlates with improved prognosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 171:31-38.

Yea SS, Yang KH, Kaminski NE (2002) Role of nuclear factor of activated T-cells and activator protein-1 in the inhibition of interleukin-2 gene transcription by cannabinol in EL4 T-cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 292:597-605.

Young AB (1993) Role of excitotoxins in heredito-degenerative neurologic diseases. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 71:175-189.

## 7 Danksagung

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst-Werner Korf, Dr. Senckenbergische Anatomie, Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes bedanken. Weiterhin möchte ich ihm für seine fachliche Unterstützung und insbesondere für die Anregungen und Ratschläge bei der Verfassung von Manuskripten und der Vorbereitung von Kongressbeiträgen danken.

Herrn Professor Dr. Theodor Dingermann, Pharmazeutische Biologie, Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, danke ich für die bereitwillige Betreuung meiner Doktorarbeit als Zweitkorrektor und Fachbereichsvertreter.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Faramarz Dehghani. Er hat mich zu jeder Zeit auf allen Ebenen umfassend unterstützt und dafür gesorgt, dass ich immer gerne an die Zeit in der Dr. Senckenbergischen Anatomie zurückdenken werde.

Die allerbeste Unterstützung, die man sich nur vorstellen kann, verdanke ich jedoch Herrn Dr. Marco Koch, welcher mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Er war jederzeit zu wissenschaftlichen Auseinandersetzungen bereit und bot mir jedwede Hilfestellung an. Ich habe unendlich viel von ihm gelernt. Ein einfaches Dankeschön wäre viel zu wenig.

Dem „weltbesten“ MTA, Herrn Chalid Gadghan, danke ich für seinen unermüdlichen Einsatz im Labor und die damit verbundene exzellente praktische Unterstützung. „Lieber Chalid, es hat enormen Spaß gemacht, mit Dir im Labor zusammen zu arbeiten!“

Bei Frau Dr. Ariane Conrad möchte ich mich für Ihre unerschütterliche Freundschaft und das nicht enden wollende Verständnis bedanken.

„Lieber Faramarz, Marco, Chalid und Ariane: tausend Dank für die viele Freude und die gute Zeit, die wir zusammen in der Dr. Senckenbergischen Anatomie verbringen durften.“

Herrn Professor Herbert Zimmermann und Frau Dr. Gabi Lahner möchte ich für Ihren Einsatz im Rahmen des Graduiertenkollegs „Neuronale Plastizität: Moleküle, Strukturen und Funktionen“ danken. Das Graduiertenkolleg ermöglichte es mir, weit über den Tellerrand meiner eigenen Arbeit hinauszuschauen und interessante neurobiologische Aspekte und wertvolle Erfahrungen bei unterschiedlichsten Seminaren, Workshops und Exkursionen zu sammeln.

Frau Käthe (Kitty) Neumann danke ich ganz herzlich für das immer offene Ohr und ihre liebevolle Fürsorge. „Liebe Kitty, unsere „Cappuccino Pausen“ taten immer so gut und werden mir sehr fehlen!“

Frau Dr. Angelika Kohl möchte ich ganz herzlich für die effektive Einarbeitung in die Methoden und die generelle „Starthilfe“ danken.

Mein Dank gilt auch Frau Iris Habazettl für die technische Unterstützung im Labor.

Ganz herzlich danke sagen möchte ich weiterhin allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen der Dr. Senckenbergischen Anatomie, die mich mit Rat und Tat während meiner Promotionszeit begleitet und unterstützt haben: Herrn Prof. Dr. Jörg Stehle, Herrn HSD Dr. Dr. Abdelhaq Rami, Frau Dr. Suzana Gispert-Sanchez, Frau Dipl. Biol. Antje Jilg, Frau Dipl. Biochem. Kathrin Ackermann, Frau Dr. Magdalena Karolczak, Frau Dr. Gertrud Klauer, Herrn Prof. Dr. Frank Nürnberger, Frau Dr. Martina Pfeffer, Herrn PD Dr. Christof Schomerus, Frau Dr. Charlotte von Gall und Herrn Dr. Qiang Zhang.

Ganz speziell möchte ich schließlich Herrn PD Dr. Udo Rüb, Dr. Senckenbergische Anatomie, Institut für Anatomie I, für die vielen lustigen und ehrlichen Augenblicke danken!!!