

**VERHALTENSPHARMAKOLOGISCHE UND
METABOLISCHE UNTERSUCHUNGEN AKUTER
UND CHRONISCHER MODULATIONEN DES
ENDOCANNABINOIDSYSTEMS DER RATTE.**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Cathrin Rohleder

aus Wuppertal

Köln, 2012

Berichtersteller/in: Prof. Dr. Wolfgang Walkowiak
PD. Dr. Heike Endepols
Prof. Dr. med. F.-Markus Leweke

Tag der mündlichen Prüfung: 11.06.2012

Kurzzusammenfassung

Das Endocannabinoidsystem spielt eine große Rolle bei der Regulation verschiedener physiologischer Prozesse, indem es die synaptische Transmission moduliert. Es wird postuliert, dass das Endocannabinoidsystem homöostatisch auf eine Dysregulation von verschiedenen Neurotransmittersystemen reagiert und somit protektiv auf die Entwicklung schizophrener Psychosen wirken kann.

Auf der anderen Seite gilt Cannabiskonsum während der Pubertät als Risikofaktor für die Ausbildung einer psychotischen Symptomatik im jungen Erwachsenenalter. Dies ist im Wesentlichen auf den psychotomimetischen Hauptbestandteil von *Cannabis sativa*, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), zurückzuführen. Der zweite Hauptbestandteil der Pflanze, Cannabidiol, wird hingegen als mögliches Antipsychotikum diskutiert. Der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch nicht gut verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese, dass Cannabidiol das Endocannabinoidsystem moduliert und darüber seine antipsychotische Wirkung entfaltet, überprüft. Zudem wurde untersucht, ob die Modulation des Endocannabinoidsystems über die Inhibition von Endocannabinoidabbau oder -aufnahme (Hochregulation der Endocannabinoiden) Verhaltensänderungen induziert.

Die verhaltenspharmakologischen Untersuchungen ergaben, dass bei adulten Ratten unter weitestgehend stressfreien Haltungs- und Testbedingungen die Hochregulation der Endocannabinoidkonzentration keine Auswirkung auf das Verhalten hat. Zudem stellte sich heraus, dass die beim Menschen wirksame Cannabidiol-Menge nicht ausreicht, um auch bei der Ratte adäquate Spiegel im Gehirngewebe zu erreichen.

Die chronische pubertäre Behandlung mit dem synthetischen Cannabinoid WIN 55,212-2 gilt als etabliertes Tiermodell für Schizophrenie bei Ratten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich dieses Modell auch mit dem vom Menschen konsumierten Δ^9 -THC reproduzieren lässt, und in wie weit die Darreichungsform die Wirkung der Cannabinoide beeinflussen kann. Die pubertäre Applikation von Δ^9 -THC in einer öligen Darreichungsform resultierte nicht in langfristigen Verhaltensdefiziten. Außerdem wurde dessen Wirkung auf die Glukoseutilisation während einer Verhaltensaufgabe mittels Positronen-Emissions-Tomographie (Verhaltens-PET) untersucht.

Das Verhaltens-PET stellte sich im Hinblick auf Tiermodellstudien als eine geeignete Methode heraus, jedoch konnten in dieser Arbeit keine metabolischen Veränderungen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich, dass die Wirkung des Δ^9 -THC auf das Verhalten der Tiere durch die Darreichungsform beeinflusst wird, wobei eine schnelle Kinetik, die durch eine wässrige Formulierung erreicht wird, entscheidender zu sein scheint als die im Gehirngewebe erreichte Endkonzentration.

Diese Arbeit verdeutlicht die Komplexität des Endocannabinoidsystems sowie des psychiatrischen Tiermodells. Wie die heterogenen Ergebnissen in der Literatur zeigen, ist das Tiermodell durch unterschiedlichste Faktoren wie Haltungsbedingungen, Stress oder die Darreichungsform des Cannabinoids sehr beeinflussbar. Mit dem Verhaltens-PET steht eine neue Methode zur Verfügung, mit der zerebrale Regulationsmechanismen des Endocannabinoidsystems sichtbar gemacht werden können, die sich nicht zwangsläufig einheitlich phänotypisch äußern.

Abstract

The endocannabinoid system plays an important role in the regulation of several physiological processes by modulating synaptic transmission. It is postulated that the endocannabinoid system reacts homeostatically towards neurotransmitter imbalances and thus acts protectively on the development of schizophrenic psychosis.

On the other hand cannabis consumption during puberty is regarded as a risk factor for the development of a psychotic pathology in young adulthood. This has been attributed to the major psychotomimetic ingredient of *Cannabis sativa*, Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC). The second main compound of the plant, cannabidiol, is discussed as a potential antipsychotic substance. The exact mechanism of action is still sparsely understood. The present study examined the hypothesis that cannabidiol acts as an antipsychotic drug by modulating the endocannabinoid system. Furthermore, it was investigated if the modulation of the endocannabinoid system by inhibition of endocannabinoid uptake or degradation (upregulation of endocannabinoids) can induce behavioural alterations.

Behavioural pharmacological analysis revealed that under almost stressless housing and experimental conditions, the upregulation of endocannabinoid levels has no effect on the behaviour of adult rats. In addition it turned out, that although the cannabidiol dosage was effective in humans, it was insufficient to achieve appropriate levels in the brain tissue of rats.

Chronic pubertal treatment with the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 is considered as an established animal model for schizophrenia. In this project it was investigated if this model can be replicated by using Δ^9 -THC that is consumed by humans, and to which extent the pharmaceutical form influences the effect of cannabinoids. Pubertal administration of Δ^9 -THC in an oily pharmaceutical form induced no long-term behavioural deficits. In addition, the effects of Δ^9 -THC administration on glucose utilisation during a behavioural task were determined by positron emission tomography (behavioural PET). Behavioural PET turned out to be a suitable method with regard to animal models, although in this study no metabolic changes were observed. However, the effect of Δ^9 -THC on rats' behaviour was highly influenced by the pharmaceutical prepa-

ration. A fast kinetic achieved by a water-based solution is a more contributing factor than the final concentration that is reached in brain tissue.

The present project illustrates the complexity of the endocannabinoid system and psychiatric animal models. As displayed by the heterogeneous results in the literature, the Δ^9 -THC animal model for schizophrenia is extremely influenced by various factors as housing conditions, stress or the pharmaceutical form of the cannabinoid applied. To visualise cerebral regulation mechanisms of the endocannabinoid system that have not necessarily a uniform phenotypic effect, the behavioural PET provides a new promising method.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	13
1.1. CANNABIS	13
1.1.1. CHEMISCHE BESTANDTEILE DER <i>CANNABIS</i> -PFLANZE	14
1.2. ENDOCANNABINOIDSYSTEM	16
1.2.1. CANNABINOID-REZEPTOREN	17
1.2.2. ENDOCANNABINOIDE.....	19
1.2.2.1. Synthese und Inaktivierung von Endocannabinoiden.....	20
1.2.3. SIGNALTRANSDUKTIONSMCHANISMEN DES ENDOCANNABINOIDSYSTEMS.....	22
1.3. SCHIZOPHRENIE	26
1.3.1. SCHIZOPHRENIE UND DAS ENDOCANNABINOIDSYSTEM.....	27
1.3.2. SCHIZOPHRENIE UND CANNABIS	29
1.3.3. SCHIZOPHRENIE UND CANNABIDIOL.....	32
1.4. TIERMODELLE PSYCHIATRISCHER ERKRANKUNGEN.....	34
1.4.1. TIERMODELLE: VALIDITÄT, ENDOPHÄNOTYPEN UND BIOMARKER	34
1.4.2. MESSMETHODEN FÜR BIOMARKER UND ENDOPHÄNOTYPEN.....	36
1.4.3. TIERMODELLE FÜR SCHIZOPHRENIE.....	38
1.4.3.1. Chronische pubertäre Cannabinoidbehandlung.....	38
2. FRAGESTELLUNGEN	43
3. MATERIAL UND METHODEN.....	45
3.1. TIERE UND HALTUNG.....	45
3.2. SUBSTANZEN UND LÖSUNGSMITTEL	46
3.2.1. SUBSTANZEN	46
3.2.1.1. 2-[¹⁸ F] Fluor-2-Deoxyglukose.....	46
3.2.1.2. URB 597	47
3.2.1.3. Cannabidiol.....	48
3.2.1.4. Δ ⁹ -Tetrahydrocannabinol.....	48
3.2.1.5. R-(+)-WIN 55,212.....	49
3.2.2. LÖSUNGSMITTEL.....	50
3.3. ANÄSTHESIE	51
3.4. VERHALTENSVERSUCHE.....	52
3.4.1. OPEN FIELD	53
3.4.1.1. Auswertung Open Field.....	53
3.4.2. OBJEKTERKENNUNG.....	54
3.4.2.1. Auswertung Objekterkennung.....	56
3.4.3. SOZIALE INTERAKTION.....	57
3.4.3.1. Auswertung Sozialverhalten.....	57
3.4.4. ERHÖHTE PLUSARENA.....	58
3.4.4.1. Auswertung erhöhte Plusarena.....	59
3.4.5. PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	59
3.4.5.1. Auswertung der PPI der ASR	62
3.5. HÖRTEST	63
3.5.1. AUSWERTUNG DES HÖRTESTS	64
3.6. MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE.....	65
3.7. POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE.....	66
3.7.1. PPI-VERHALTENS-PET	67
3.7.1.1. Auswertung der PPI-Verhaltens-PET-Daten.....	68
3.8. BLUT-, ORGAN- UND GEHIRNENTNAHME.....	69
3.9. ANALYSE VON EICOSANOIDEN UND EXOGEN ZUGEFÜHRTEN CANNABINOIDEN	71

3.10. STATISTIK	72
3.11. STUDIEN	75
3.11.1. PPI-PET-STUDIE	75
3.11.2. CBD-URB-STUDIE	78
3.11.3. PUBERTÄRE Δ^9 -THC STUDIE	79
3.11.4. DOSISSTUDIE	81
3.11.5. LÖSUNGSMITTELSTUDIE	82
<u>4. ERGEBNISSE PPI-PET-STUDIE</u>	<u>87</u>
4.1 HÖRTEST	87
4.2 PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	87
4.3 VERHALTENS-PET	90
<u>5. DISKUSSION PPI-PET-STUDIE</u>	<u>97</u>
5.1. HÖRTEST UND PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	97
5.2. VERHALTENS-PET	98
<u>6. ERGEBNISSE CBD-URB-STUDIE</u>	<u>105</u>
6.1. VERHALTENSVERSUCHE	105
6.1.1. OPEN FIELD	105
6.1.2. OBJEKTERKENNUNG	109
6.1.3. SOZIALE INTERAKTION	111
6.1.4. ERHÖHTE PLUSARENA	113
6.1.5. PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	114
6.2. MESSUNGEN DER ENDOCANNABINOIDE UND VERWANDTER LIPIDE	116
<u>7. DISKUSSION CBD-URB-STUDIE</u>	<u>119</u>
7.1. VERHALTENSVERSUCHE	119
7.1.1. MOTORIK: OPEN FIELD UND ERHÖHTE PLUSARENA	119
7.1.2. RÄUMLICHE ORIENTIERUNG: OPEN FIELD	120
7.1.3. ÄNGSTLICHKEIT/NEUGIER: OPEN FIELD UND ERHÖHTE PLUSARENA	120
7.1.4. ARBEITSGEDÄCHTNIS: OBJEKTERKENNUNG	123
7.1.5. SOZIALVERHALTEN: SOZIALE INTERAKTION	125
7.1.6. SENSOMOTORISCHE HEMMUNG: PRÄPULSINHIBITION	126
7.2. KONZENTRATIONEN DER ENDOCANNABINOIDE UND VERWANDTER LIPIDE	128
7.3. FAZIT	129
<u>8. ERGEBNISSE PUBERTÄRE THC-STUDIE</u>	<u>131</u>
8.1. VERHALTENSVERSUCHE	131
8.1.1. OPEN FIELD	131
8.1.2. OBJEKTERKENNUNG	135
8.1.3. SOZIALE INTERAKTION	137
8.1.4. ERHÖHTE PLUSARENA	138
8.1.5. PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	139
8.2. VERHALTENS-PET	142
<u>9. DISKUSSION PUBERTÄRE THC-STUDIE</u>	<u>143</u>
9.1. VERHALTENSVERSUCHE	143
9.1.1. MOTORIK: OPEN FIELD UND ERHÖHTE PLUSARENA	143
9.1.2. RÄUMLICHE ORIENTIERUNG: OPEN FIELD	144
9.1.3. ÄNGSTLICHKEIT/NEUGIER: OPEN FIELD UND ERHÖHTE PLUSARENA	145
9.1.4. ARBEITSGEDÄCHTNIS: OBJEKTERKENNUNG	146
9.1.5. SOZIALVERHALTEN: SOZIALE INTERAKTION	148

9.1.6.	SENSOMOTORISCHE HEMMUNG: PRÄPULSINHIBITION	148
9.2.	VERHALTENS-PET	149
9.3.	FAZIT	150
10.	ERGEBNISSE DOSISSTUDIE.....	153
10.1.	OPEN FIELD	153
10.2.	OBJEKTERKENNUNG	156
10.3.	PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION.....	158
11.	DISKUSSION DOSISSTUDIE	161
11.1.	MOTORIK, ÄNGSTLICHKEIT, ORIENTIERUNGSFÄHIGKEIT: OPEN FIELD	161
11.2.	ARBEITSGEDÄCHTNIS: OBJEKTERKENNUNG	163
11.3.	SENSOMOTORISCHE HEMMUNG: PRÄPULSINHIBITION	165
11.4.	FAZIT	166
12.	ERGEBNISSE LÖSUNGSMITTELSTUDIE.....	169
12.1.	TEIL 1.....	169
12.1.1.	OPEN FIELD	170
12.1.2.	OBJEKTERKENNUNG.....	173
12.1.3.	PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	176
12.2.	TEIL 2.....	178
12.2.1.	OPEN FIELD	178
12.2.2.	OBJEKTERKENNUNG.....	181
12.2.3.	PRÄPULSINHIBITION DER AKUSTISCHEN SCHRECKREAKTION	183
12.3.	TEIL 3.....	185
12.3.1.	BIOVERFÜGBARKEIT DER CANNABINOIDE	186
12.3.2.	BEEINFLUSSUNG DER EICOSANOID-KONZENTRATIONEN DURCH UNTERSCHIEDLICHE DARREICHUNGSFORMEN VON URB 597 UND CBD.....	187
13.	DISKUSSION LÖSUNGSMITTELSTUDIE	189
13.1.	TEIL 1.....	189
13.1.1.	MOTORIK, ÄNGSTLICHKEIT: OPEN FIELD	189
13.1.2.	ARBEITSGEDÄCHTNIS: OBJEKTERKENNUNG.....	191
13.1.3.	SENSOMOTORISCHE HEMMUNG: PRÄPULSINHIBITION	192
13.2.	TEIL 2.....	193
13.2.1.	MOTORIK, ÄNGSTLICHKEIT: OPEN FIELD	193
13.2.2.	ARBEITSGEDÄCHTNIS: OBJEKTERKENNUNG.....	193
13.2.3.	SENSOMOTORISCHE HEMMUNG: PRÄPULSINHIBITION	194
13.3.	TEIL 3.....	194
13.3.1.	BIOVERFÜGBARKEIT DER CANNABINOIDE	194
13.3.2.	BEEINFLUSSUNG DER EICOSANOID-KONZENTRATIONEN DURCH UNTERSCHIEDLICHE DARREICHUNGSFORMEN VON URB 597 UND CBD.....	196
13.4.	FAZIT.....	196
14.	ABSCHLIEßENDE ALLGEMEINE DISKUSSION.....	199
15.	LITERATUR	203
16.	DANKSAGUNG	227
17.	ERKLÄRUNG	229

1. Einleitung

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht das Endocannabinoidsystem, ein Neurotransmittersystem, das unter anderem eine wichtige Rolle bei der Modulation der synaptischen Transmission einnimmt. Dieses System beeinflusst z. B. das Arbeitsgedächtnis, die Schmerzwahrnehmung, den Schlaf-Wach-Rhythmus, kardiovaskuläre Funktionen, das Immunsystem sowie das Essverhalten (Maccarrone et al., 2010). Mittlerweile werden Substanzen, die das Endocannabinoidsystem beeinflussen, als mögliche Medikamente bei der Schmerzbehandlung, der Behandlung von Schlaganfällen, von Bewegungsstörungen und von Psychosen, insbesondere von Schizophrenie diskutiert (Piomelli et al., 2000; Leweke et al., 2012). Letzteres ist für diese Arbeit von besonderem Interesse.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Aspekte dieses komplexen Systems untersucht. Zum einen wurde überprüft, unter welchen Bedingungen sich das Endocannabinoidsystem mit Hilfe von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, einer der beiden Hauptbestandteile der *Cannabis*-Pflanze, so modulieren lässt, dass bei Ratten Verhaltensveränderungen (Schizophrenie-ähnliche Symptome) auftreten. Zum anderen wurde untersucht, ob und wie der andere Hauptbestandteil der Pflanze, Cannabidiol, das Endocannabinoidsystem der Ratte modulieren kann.

Im Folgenden werden zunächst die genannten Phytocannabinoide näher beleuchtet. Anschließend wird das Endocannabinoidsystem erläutert, bevor beides im Zusammenhang mit Schizophrenie betrachtet wird. Abschließend werden Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen im Allgemeinen und speziell die chronische pubertäre Cannabinoidbehandlung als Tiermodell für Schizophrenie dargelegt.

1.1. Cannabis

Die Hanfpflanze *Cannabis sativa* L. wird schon seit Jahrtausenden in vielfältiger Weise verwendet: als Faserlieferant (Kleidung, Seile), als Lebensmittel (Hanfsamen), für medizinische Zwecke und als Rauschmittel. Bereits im ältesten bekannten Arzneibuch „Pên-ts’ao Ching“ (28. Jh. v. Chr.) sind Eintragungen über die medizinischen Eigenschaften der Pflanze und seine psychotropen Nebenwirkungen bei exzessivem Gebrauch zu finden (Murray et al., 2007). Mitte des 19. bis Mitte des 20. Jh. wurden Can-

nabisprodukte vielfältig als Arzneimittel verwendet, bis schließlich eine Vielfalt anderer Wirkstoffe mit besserer pharmazeutischer Stabilität entwickelt wurden (Mechoulam & Carlini, 1978; Fankhauser, 2004). Außerdem wurden auf Basis der von sechzig Nationen unterschriebenen „Single Convention of Narcotic Drugs“ (1961), rechtliche Einschränkungen bezüglich des Besitzes, der Verwendung, des Handels, Imports/Exports sowie der Produktion von *Cannabis* eingeführt (vgl. International Narcotics Control Board (INCB) der Vereinten Nationen).

Heutzutage gehört *Cannabis* zum einen zu den am meisten konsumierten Rauschmitteln weltweit. In Europa haben zwischen 1,5 % (Rumänien, 2007) und 32,5 % (Dänemark, 2010) der Erwachsenen (15-64 Jahre) die Substanz mindestens einmal ausprobiert (vgl. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)). Auf der anderen Seite sind in einigen Ländern Cannabisprodukte wieder als Medikamente zur Behandlung neuropathischer Schmerzen bei Multipler Sklerose (Sativex®), gegen Übelkeit und Erbrechen bei Krebspatienten (Cesamet®, Marinol®) und zur Behandlung von Anorexie bei AIDS-Patienten (Marinol®) zugelassen. Dennoch rückt die potentiell schädliche Wirkung von Δ^9 -Tetrahydrocannabinol auf die Entwicklung des Gehirns und die damit verbundene Steigerung des Risikos für Schizophrenie immer mehr in den Blickpunkt der Wissenschaft (vgl. 1.3.2). Des Weiteren zeichnet sich ab, dass die beiden Hauptbestandteile der *Cannabis*-Pflanze, Δ^9 -Tetrahydrocannabinol und Cannabidiol, aufgrund von unterschiedlichen Wirkmechanismen entgegengesetzte Effekte entfalten können, die man bei der Entwicklung neuer Medikamente berücksichtigen sollte. Dieser Aspekt spielt auch in der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle.

1.1.1. Chemische Bestandteile der *Cannabis*-Pflanze

Obwohl *Cannabis* Mitte des 19. Jh. Einzug in die westliche Medizin erhielt, wurde die wichtigste psychoaktive Substanz, das Cannabinoid Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), erst Mitte des 20. Jh. aus der Pflanze isoliert (Adams, 1940; Adams & Baker, 1940; Adams et al., 1940c). Die Bestimmung der korrekten Strukturformel von Δ^9 -THC gelang erst 1964 mittels NMR-Spektroskopie (Kernspinresonanzspektroskopie, Gaoni & Mechoulam, 1964).

Der zweite Hauptbestandteil der *Cannabis*-Pflanze ist das nicht psychoaktive Cannabinoid Cannabidiol (CBD). Die Isolierung gelang ebenfalls erstmals 1940 (Adams et al.,

1940a; Adams et al., 1940b; Adams et al., 1940d) und erneut wurde die Molekülstruktur im Labor von Mechoulam mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Mechoulam & Shvo, 1963) und später durch Röntgenstrukturanalysen bestätigt (Jones et al., 1977).

Neben diesen beiden Hauptbestandteilen wurden bis 2005 zudem 487 weitere Inhaltsstoffe nachgewiesen (Elsohly & Slade, 2005). Dazu zählen weitere Phytocannabinoide (C_{21} -Terpenphenole), sowie Substanzen, die 18 anderen Substanzklassen wie Terpene, Kohlenwasserstoffe, Zucker etc. zugeordnet werden können.

In Abhängigkeit vom Δ^9 -THC- und CBD-Anteil werden *Cannabis*-Pflanzen in drei verschiedene Phänotypen (Tabelle 1) unterteilt: (1) Drogen-, (2) intermediärer und (3) Faser-Hanf (de Meijer et al., 1992).

Phänotyp	Δ^9 -THC [%]	CBD [%]
Drogen-Hanf	> 0,3	< 0,5
Intermediärer Hanf	> 0,3	> 0,5
Faser Hanf	< 0,3	> 0,5

Tabelle 1: Einteilung der *Cannabis*-Pflanze in verschiedene Phänotypen in Abhängigkeit vom Δ^9 -THC- und CBD-Gehalt.

(Nach de Meijer et al., 1992).

Die höchste Cannabinoid-Konzentration ist im Harz enthalten. Dieser wird von Drüsenhaaren (Abbildung 1), vor allem auf der Oberfläche der Tragblätter (Braktee) der weiblichen Blüten, sekretiert (Hammond & Mahlberg, 1973).

Abbildung 1: Weibliche Cannabis-pflanze (modifiziert nach Marks et al., 2009).

(A) Blütenstand einer weiblichen Cannabis-pflanze 8 Wochen nach der Keimung. (B) Nahaufnahme der Blätter (Pfeil) nahe des Blütenstandes. (C) Harzdrüsen (Pfeil) auf den Tragblättern der weiblichen Blüten. (D) Elektronenmikroskopie der getielten Harzdrüsen. Gestielte Drüsenhaare entwickeln sich im Laufe der Tragblätterentwicklung aus knolligen sowie ungestielten, köpfchenförmigen Drüsen (Hammond & Mahlberg, 1973)



In der Pflanze werden CBD und Δ^9 -THC zunächst als Säuren (CBDS, THCS) gespeichert. Wenn das pflanzliche Produkt getrocknet, gelagert oder erhitzt wird, erfolgt eine teilweise oder vollständige Decarboxylierung zur neutralen Form: es entsteht Δ^9 -THC bzw.

CBD (de Meijer et al., 2003). Die Decarboxylierung erfolgt nicht-enzymatisch (Taura et al., 2007) und wird durch Licht und Temperatur beeinflusst (Yamauchi et al., 1967; Pertwee, 2006).

Zunächst ging man davon aus, dass CBD durch eine Ringschließung in Δ^9 -THC übergeht (Mechoulam, 1970; Shoyama et al., 1975). Mittlerweile wurde aber nachgewiesen, dass Cannabigerol-Säure die gemeinsame Vorstufe für beide Cannabinoide ist und entweder über die sog. die THCS-Synthase in THCS (Taura et al., 1995) oder über CBDS-Synthase in CBDS (Taura et al., 1996) umgewandelt wird. In Drogenhanf herrschen aktive THCS-Synthase-Enzyme vor, die sich in ihrer genetischen Sequenz von den inaktiven Varianten in Faserhanf unterscheiden (Kojoma et al., 2006).

1.2. Endocannabinoidsystem

Das Endocannabinoidsystem spielt bei diversen Prozessen sowohl im Zentralnervensystem (ZNS) als auch in peripheren Geweben eine wichtige Rolle (Abbildung 2).

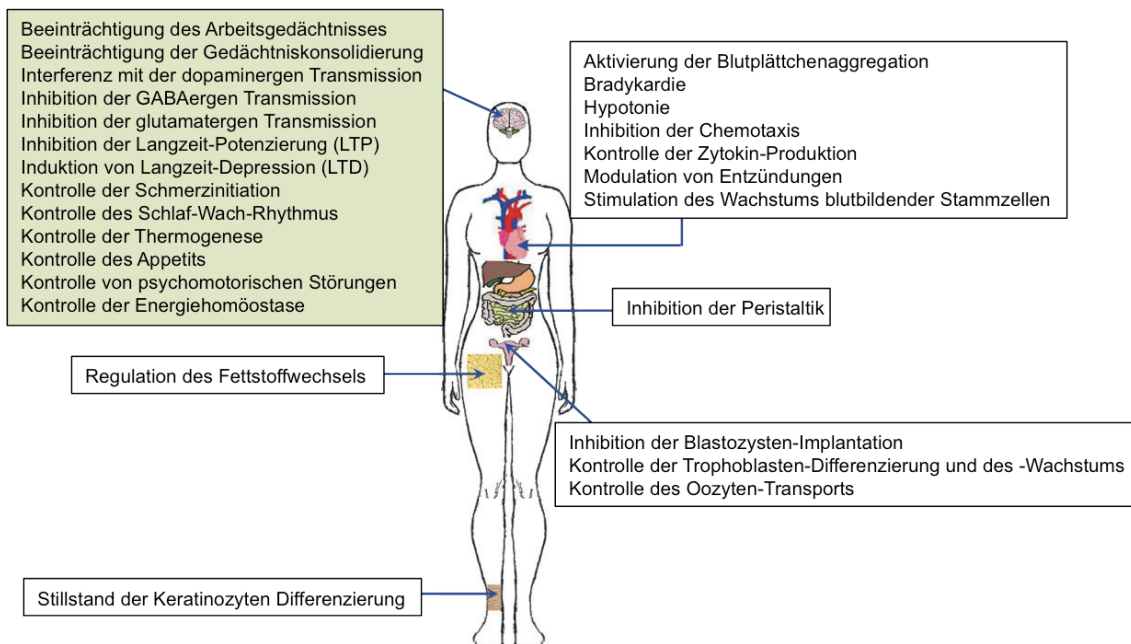


Abbildung 2: Funktion der Endocannabinoiden im Zentralnervensystem (grün hinterlegt) und in peripheren Geweben (modifiziert nach Maccarrone et al., 2010)

Im Gehirn modulieren Endocannabinoiden vor allem die synaptische Transmission über einen retrograden Regulationsmechanismus (vgl. 1.2.3) und beeinflussen auf diese Weise z. B. die Gedächtnisleistung, den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Psychomotorik, die

Schmerzinitiation sowie den Appetit (vgl. grün hinterlegter Kasten in Abbildung 2). Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase. Des Weiteren regulieren Endocannabinoide peripher kardiovaskuläre Funktionen, Reproduktionsprozesse, das Immunsystem sowie das Essverhalten (Maccarrone et al., 2010). Das Endocannabinoidsystem setzt sich aus Cannabinoidrezeptoren, Endocannabinoiden sowie synthetisierenden und degradierenden Enzymen zusammen, die im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.1. Cannabinoid-Rezeptoren

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von Δ^9 -THC ging man lange Zeit davon aus, dass Δ^9 -THC für seine Effekte keinen Rezeptor benötigte, sondern unspezifisch die Fluidität der Zellmembranen erhöhen könnte (Lawrence & Gill, 1975; Hillard et al., 1985). Diese Ansicht änderte sich, als synthetische Δ^9 -THC-Analoga entwickelt wurden, die eine größere Potenz und Stereoselektivität aufwiesen. Die Existenz einer deutlichen Stereoselektivität lässt sich nicht mit unspezifischen Membraninteraktionen in Einklang bringen (vgl. Review: Freund et al., 2003). Schließlich zeigte die Gruppe um Devane (1988) anhand von Rattengehirn-Membranpräparaten, dass Δ^9 -THC schnell und reversibel an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet. Wenig später wurde sowohl die Ratten- als auch die humane cDNA dieses ersten Cannabinoidrezeptors (CB₁-Rezeptor) kloniert und exprimiert (Matsuda et al., 1990; Gerard et al., 1991). Der humane CB₁-Rezeptor ähnelt dem der Ratte stark: 97,3 % der beiden fast gleich langen Aminosäuresequenzen (human: 472, Ratte: 473 Aminosäuren) stimmen überein. Erstaunlicherweise ist die erste Hälfte des relativ langen N-Terminus (116 Aminosäuren) bei Ratten und Menschen identisch (Gerard et al., 1991). Die hohe evolutive Konservierung im Bereich der Liganden-Bindungsstelle lässt vermuten, dass der Rezeptor im ZNS eine wichtige Rolle spielt.

Die Verteilung von CB₁-Rezeptoren wurde u.a. mittels Autoradiographie in Ratten (Herkenham et al., 1991; Jansen et al., 1992) und *post mortem* in humanen Gehirnen (Glass et al., 1997; Mato et al., 2003) untersucht. Wenn man evolutionär bedingte Unterschiede der Gehirne berücksichtigt, dann gleichen sich die Ergebnisse der humanen und Rodentia-Studien qualitativ (Mackie, 2005).

Die charakteristische Verteilung des CB₁-Rezeptors im ZNS ist durch eine Häufung im Kortex, Hippokampus, Amygdala, den Ausgangsstationen der Basalganglien (*Substantia nigra* und *Globus pallidus*) und im Zerebellum gekennzeichnet. Im Thalamus, der Pons und im Hirnstamm ist die CB₁-Expression hingegen nur sehr gering. Interessant ist vor allem die im Vergleich zu Opioid-Rezeptoren niedrige CB₁-Rezeptordichte im Atemzentrum. Dies erklärt vermutlich die geringe Sterblichkeit bei sehr hohen Cannabinoid-Dosierungen.

Auch *in situ* Hybridisierungsstudien (Mailleux & Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993) und immunhistochemische Untersuchungen (Tsou et al., 1998; Egertova & Elphick, 2000) bestätigten diese Verteilung bei Ratten. Man geht davon aus, dass CB₁-Rezeptoren vorwiegend präsynaptisch auf Axonen lokalisiert sind (Hajos et al., 2000; Katona et al., 2001; Freund et al., 2003), obwohl einige immunhistochemische Studien auch postsynaptische CB-Rezeptoren auf Somata und Dendriten finden konnten (Tsou et al., 1998; Salio et al., 2002). Für die präsynaptische Lokalisation sprechen neben anatomischen Hinweisen auch zahlreiche physiologische und pharmakologische Belege (vgl. 1.2.3), während diese bisher für die Existenz von postsynaptischen Rezeptoren fehlen. Daher könnten Schwächen in der immunhistochemischen Methodik zu den positiven Befunden bezüglich postsynaptischer CB₁-Rezeptoren geführt haben (Freund et al., 2003).

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass CB₁-Rezeptoren zwar vorwiegend im ZNS exprimiert werden, aber auch auf größeren Nerven des peripheren Nervensystems vorkommen (Hohmann & Herkenham, 1999). Des Weiteren liegen im enterischen Nervensystem hohe CB₁-Rezeptordichten vor (vgl. Review: Pinto et al., 2002).

Des Weiteren wurde ein zweiter Cannabinoidrezeptor (CB₂) identifiziert (Munro et al., 1993), der vor allem in der Peripherie auf Immunzellen lokalisiert ist, aber auch auf Mikrogliazellen nachgewiesen wurde (Nunez et al., 2004).

Zudem wird die Existenz weiterer Cannabinoidrezeptoren diskutiert (u.a. GPR55 und GPR19 sowie verschiedene Vanilloidrezeptoren wie z.B. TRPV1; vgl. Review: De Petrocellis & Di Marzo, 2010).

1.2.2. Endocannabinoide

Unter Endocannabinoiden versteht man per Definition endogen synthetisierte Moleküle, die einen oder beide der bisher bekannten Cannabinoidrezeptoren aktivieren (Di Marzo et al., 1998). Sie wirken im Gegensatz zu exogen zugeführten Cannabinoiden lokal, zeitlich begrenzt und in einem definierten Wirkspektrum.

Obwohl wie beschrieben 1988 der erste Cannabinoidrezeptor entdeckt wurde, dauerte es weitere vier Jahre bis der erste endogene Ligand aus Schweinegehirnen isoliert und cannabimimetische Aktivität nachgewiesen werden konnte: Anandamid (Devane et al., 1992). Der Name leitet sich einerseits aus dem Sanskritwort „ananda“ (Glückseligkeit) ab, spielt aber andererseits auch auf die chemische Struktur an. Bei Anandamid handelt es sich chemisch gesehen um ein Amid der Arachidonsäure, genauer gesagt um Arachidonoyl ethanolamid (AEA, Abbildung 3).

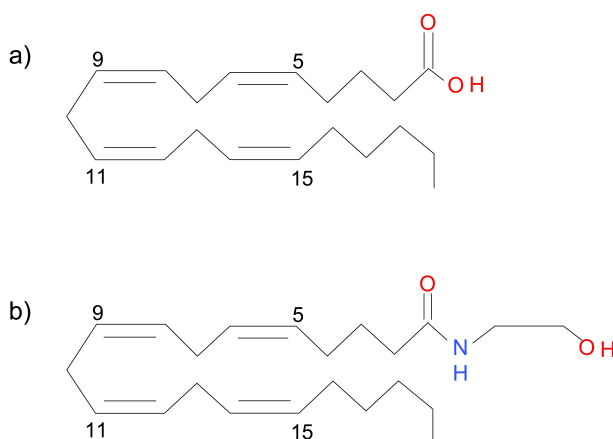


Abbildung 3: Strukturformel der Arachidonsäure (a) und des Endocannabinoids Anandamid (b).

Die Grundstruktur von Arachidonsäure (a) besteht aus 20 C-Atomen und vier Doppelbindungen (20:4). Das C1-Atom ist Bestandteil einer Carboxylgruppe. Bei Anandamid (b) handelt es sich um ein Arachidonsäure-Derivat. Es hat die gleiche Grundstruktur (20:4), aber am C1 ist die Hydroxyl-Gruppe der Carboxylgruppe durch Ethanolamin ersetzt. Die korrekte chemische Bezeichnung ist somit Arachidonoyl ethanolamid (AEA). Die Strukturformeln wurden mit dem Programm Symyx® Draw 3.2 (Symyx Technologies, Inc., Santa Clara, USA) erstellt.

Drei Jahre später gelang die Isolation eines weiteren Arachidonsäurederivats mit Bindungsaffinität zum CB₁-Rezeptor und cannabimimetischen Eigenschaften (Mechoulam et al., 1995) aus Darmgewebeproben von Hunden: 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG, Abbildung 4). Zeitgleich wurde aber auch die Bindungsfähigkeit von synthetisiertem 2-AG an CB₁-Rezeptoren in Rattengehirn-Präparaten bestätigt (Sugiura et al., 1995).

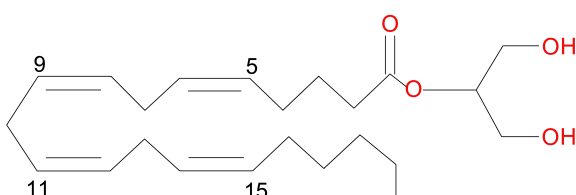


Abbildung 4: Strukturformel des Endocannabinoids 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol.

Auch 2-Arachidonoyl-*sn*-glycerol (2-AG) ist ein Arachidonsäure-Derivat. Über eine Esterbindung ist Glycerol am C1-Atom gebunden. Erstellt mit Symyx® Draw 3.2.

Moleküle wie Anandamid und 2-AG, die sich von der Arachidonsäure ableiten, werden zu den Eicosanoiden gezählt, einer Lipidklasse, deren Moleküle sich durch das Grundgerüst von 20 C-Atomen auszeichnen. Neben Anandamid (AEA) und 2-AG existieren noch zwei weitere Eicosanoide: Palmitoylethanolamid (PEA) und Oleoylethanolamid (OEA). Sie unterliegen den selben Synthese- und Abbauwegen wie Anandamid (vgl. 1.2.2.1, Schmid & Berdyshev, 2002). Beide teilen einige cannabimimetische Eigenschaften mit Anandamid und 2-AG, zeigen aber nur sehr geringe bis keine Affinität zu den beiden Cannabinoidrezeptoren (Lambert & Di Marzo, 1999; Appendino et al., 2009). Daher sind sie streng genommen nicht als Endocannabinoide zu bezeichnen.

Trotz der fehlenden Cannabinoidrezeptoraffinität nehmen sie möglicherweise über den so genannten „entourage effect“ Einfluss auf das Endocannabinoidsystem. Darunter versteht man die Hemmung des Anandamid-Abbaus, ausgelöst durch die Konkurrenz um das Hydrolyse-Enzym FAAH (vgl. 1.2.2.1) und die daraus resultierende Erhöhung des Anandamid-Spiegels im Gehirn (Lambert & Di Marzo, 1999; Jonsson et al., 2001; Lo Verme et al., 2005).

1.2.2.1. Synthese und Inaktivierung von Endocannabinoiden

Endocannabinoide werden bei Bedarf aus membranständigen Vorstufen (Phospholipiden) synthetisiert (Abbildung 6). Ausgangspunkt der Anandamid (AEA)-Synthese ist Phosphatidylethanolamin (PE), welches Ca^{2+} -abhängig in zwei enzymatischen Schritten in Anandamid umgewandelt wird (Di Marzo et al., 1994; Cadas et al., 1996; Schmid & Berdyshev, 2002; Freund et al., 2003; Piomelli, 2003). 2-AG wird hingegen aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) Ca^{2+} -abhängig in zwei enzymatischen Stufen synthetisiert (Stella et al., 1997; Maejima et al., 2005; Lafourcade et al., 2007).

Die Inaktivierung der Endocannabinoide scheint sowohl durch intrazelluläre Hydrolyse (Degradierung), als auch über aktiven Transport in die Zelle zu erfolgen (Piomelli, 2003). Anandamid wird durch die intrazelluläre, membrangebundene Fettsäureamidhydrolase (fatty acid amide hydrolase, FAAH) abgebaut (Cravatt et al., 1996; McKinney & Cravatt, 2005). Bei der enzymatischen Reaktion wird Anandamid in Arachidonsäure und Ethanolamin gespalten (Abbildung 6). FAAH degradiert neben Anandamid Amide wie OEA und PEA, aber auch Ester wie 2-AG können prinzipiell von FAAH hydrolysiert werden (Goparaju et al., 1998; Patricelli & Cravatt, 1999). Dieses ungewöhnlich breite

Substratspektrum führte zu der Annahme, dass auch *in vivo* FAAH beide Endocannabinoide inaktiviert. Mittlerweile wurde allerdings nachgewiesen, dass *in vivo* 2-AG nicht über FAAH abgebaut wird (Beltramo & Piomelli, 2000; Lichtman et al., 2002). Die Hydrolyse erfolgt vielmehr über die Monoacylglycerol-Lipase (MGL, Dinh et al., 2002), die 2-AG in Arachidonsäure und Glycerol spaltet (Abbildung 6).

In vielen Gehirnregionen (insbesondere im Kortex, Hippokampus und Zerebellum) von Nagern ist FAAH in Somata und Dendriten lokalisiert, die postsynaptisch zu Axonen liegen, die CB₁-Rezeptoren exprimieren (Egertova et al., 1998; Egertova et al., 2003). Allerdings trifft dies nicht für sämtliche Gehirnregionen zu. Es existieren auch Areale (*Substantia nigra pars reticulata*, *Globus Pallidus*) mit hoher CB₁-Dichte und geringer FAAH-Expression und Regionen (z. B. *Nucleus olivaris inferior*) mit hoher FAAH-Konzentration und niedriger CB₁-Expression (Egertova et al., 2003). Im Gegensatz zu FAAH ist die MGL vorwiegend präsynaptisch lokalisiert, wird aber ebenfalls vor allem in Regionen exprimiert, in denen die CB₁-Rezeptordichte hoch ist (Dinh et al., 2002).

Obwohl Anandamid und 2-AG aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften auch passiv über die Membran diffundieren können, scheint es zusätzlich einen aktiven Transportmechanismus zu geben (Abbildung 6). Anandamid wird schnell, temperaturabhängig sowie sättigungsfähig in Zellen aufgenommen (Di Marzo et al., 1994) und die Akkumulation von Anandamid und 2-AG kann pharmakologisch inhibiert werden (Beltramo et al., 1997; Beltramo & Piomelli, 2000). Da Anandamid und 2-AG gegenseitig ihren Transport verlangsamen, ging man davon aus, dass lediglich ein Transporter für beide Endocannabinoide existiert (Beltramo & Piomelli, 2000; Bisogno et al., 2001b). Dies scheint allerdings nicht der Fall zu sein, denn kürzlich konnte ein Anandamid-selektiver Transporter identifiziert werden. Es handelt sich um eine Spleißvariante von FAAH und wird deswegen als FAAH-like Anandamide Transporter (FLAT) bezeichnet (Abbildung 5). FLAT fehlt die Hydrolase-Aktivität, bindet Anandamid mit niedriger mikromolarer Affinität und fördert die Translokation in die Zelle. Zudem hemmt ein bereits bekannter Inhibitor die Translokation (Fu et al., 2011). Obwohl FAAH neben Anandamid (AEA) auch die verwandten Lipide OEA und PEA hydrolysiert, scheint FLAT die beiden anderen Eicosanoide nicht zu transportieren.

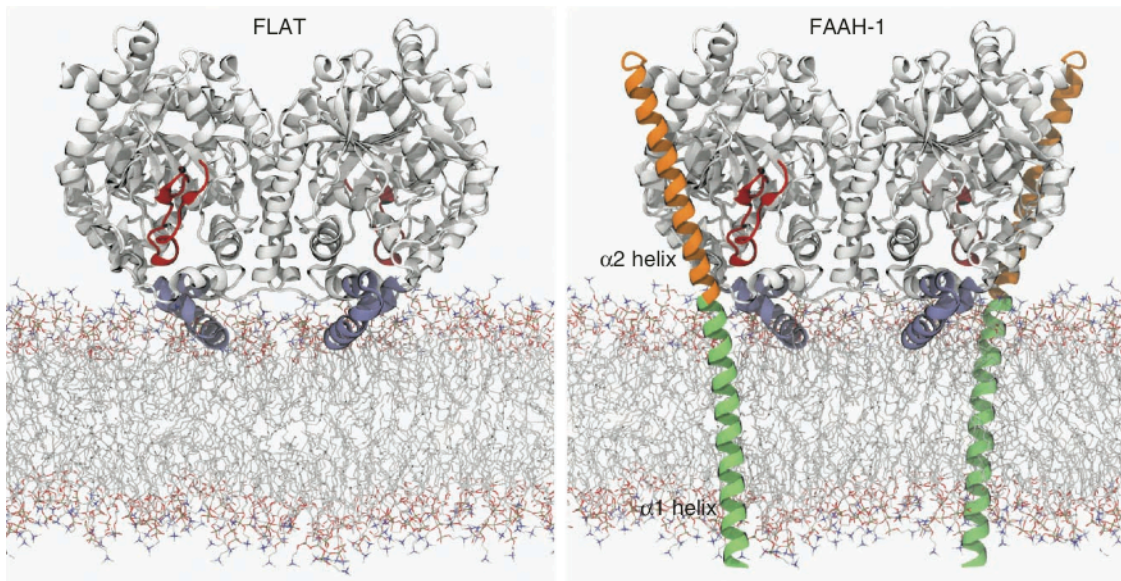


Abbildung 5: Modell des Transporters FLAT auf Basis der FAAH-Molekülstruktur (Fu et al., 2011).

Im Wesentlichen fehlt FLAT die α 1- (grün) sowie die α 2-Helix (orange), was zum Verlust der Hydrolase-Aktivität führt. Beide Moleküle weisen aber eine Membran-gebundene Domäne (blau) und eine Schleife auf, die vermutlich mit α 2 interagiert (rot) und die katalytische Tasche des Enzym vor Wassermoleküle abschirmt.

1.2.3. Signaltransduktionsmechanismen des Endocannabinoidsystems

Die beiden Endocannabinoide Anandamid und 2-AG zählen zu einer neuen Gruppe von Neurotransmittern: den Lipidneurotransmittern. Ihre große Bedeutung für das ZNS spiegelt zum einen die hohe evolutive Konservierung der CB₁-Rezeptoren wider (vgl. 1.2.1). Zum anderen ist die Anandamid-Konzentration in humanen Gehirnen vergleichbar mit Dopamin- und Serotonin-Konzentrationen (Felder et al., 1996).

Lipidneurotransmitter werden im Gegensatz zu den klassischen Neurotransmittern bei Bedarf aus membranständigen Vorstufen in postsynaptischen Zellen synthetisiert (vgl. 1.2.2.1). Nach ihrer Ausschüttung in den synaptischen Spalt entfalten sie ihre Wirkung vorwiegend an präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptoren. Somit wirken Endocannabinoide als retrograde Transmitter. Physiologisch wurde dies zuerst anhand der sog. depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) gezeigt (Katona et al., 1999; Hoffman & Lupica, 2000; Ohno-Shosaku et al., 2001; Yoshida et al., 2002). Unter DSI versteht man eine mehrere Sekunden anhaltende Reduktion der GABAergen IPSC (inhibitory post-synaptic currents)-Amplitude, nach kurzer neuronaler Aktivierung. Zumindest im Zerebellum und präfrontalen Kortex wird DSI über 2-AG vermittelt (Szabo et al., 2006; Yoshino et al., 2011). Neben DSI wurde auch der umgekehrte Effekt nach-

gewiesen: eine CB₁-vermittelte depolarization-induced suppression of excitation (DSE, Kreitzer & Regehr, 2001). Darunter versteht man die Reduktion der EPSC (excitatory post-synaptic currents)-Amplitude, durch Inhibition der Glutamatausschüttung. Zumindest im *Nucleus striae terminalis* wird dieser Effekt ebenfalls über 2-AG vermittelt (Abbildung 6; Puente et al., 2011). Das heißt, die durch neuronale Aktivität hervorgerufene postsynaptische Depolarisation führt zur Synthese und Freisetzung von 2-AG, welches wiederum an präsynaptische CB₁-Rezeptoren auf inhibitorischen GABAergen (DSI) bzw. exzitatorischen glutamatergen Neuronen (DSE) bindet. Durch die Rezeptoraktivierung wird die Transmitterausschüttung reduziert und somit die Aktivität der postsynaptischen Neurone moduliert (Abbildung 6).

DSE und DSI können in den gleichen Gehirnarealen mit ähnlichen Stimulationsprotokollen ausgelöst werden. Die genaue Regulation ist allerdings noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist, dass glutamaterge Neurone weniger sensitiv für Endocannabinoide sind und ein Wechsel von DSI zu DSE erfolgt, wenn eine bestimmte Endocannabinoid-Schwelle überschritten wird (Piomelli, 2003).

Endocannabinoide scheinen aber nicht ausschließlich retrograd zu wirken. Bei der sog. Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) spielen zumindest in einigen Gehirnarealen autokrine Endocannabinoideffekte eine Rolle. Während die Kurzzeit-Depression (z. B. DSI und DSE) nur wenige Sekunden anhält, wird die synaptische Aktivität bei der LTD für mehrere Stunden verändert. Im *Gyrus dentatus* und *Nucleus striae terminalis* wird dieser Effekt anscheinend über postsynaptisch synthetisiertes Anandamid vermittelt. Die Aktivierung postsynaptischer Vanilloid (TRPV1)-Rezeptoren durch Anandamid resultiert schließlich in einer anhaltenden Amplitudenreduktion der postsynaptischen Potentiale (Abbildung 6; Chavez et al., 2010; Puente et al., 2011). Im Striatum scheint die LTD hingegen über eine retrograde CB₁-Rezeptoraktivierung zu erfolgen. Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, welches Endocannabinoid verantwortlich ist. Während die Ergebnisse einer Studie darauf hindeuten, dass die Aktivierung über Anandamid erfolgt (Gerdeman et al., 2002), zeigte eine andere Studie, dass 2-AG entscheidend ist (Puente et al., 2011).

Die Signaltransduktionsmechanismen von Endocannabinoiden sind somit äußerst komplex: zum einen können sie über verschiedene Rezeptoren Einfluss nehmen und zum anderen sowohl über retrograde als auch autokrine Mechanismen ihre Wirkung

entfalten. Die Aktivierung von CB₁-Rezeptoren durch endo- und exogene Cannabinoide ist ebenfalls wesentlich vielfältiger und komplexer als bisher angenommen. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Bindung von CB₁-Rezeptoragonisten immer zur G_{i/o}-Protein-Aktivierung führt. Die Aktivierung dieser G-Protein-Subklasse bewirkt letztendlich eine Reduktion der Transmitterausschüttung (Abbildung 6 und vgl. Review: Howlett et al., 2002). Beobachtete Unterschiede in den Wirkungen von Endocannabinoiden und diversen exogen zugeführten Cannabinoiden wurden bisher auf die unterschiedliche Affinität und Wirkdauer am Rezeptor zurückgeführt. Mittlerweile geht man aber davon aus, dass der tatsächliche Signaltransduktionsmechanismus wesentlich komplexer ist: CB₁-Rezeptoren scheinen nicht nur an G_{i/o}- sondern auch an G_s-Proteine gekoppelt zu sein, und zusätzlich können verschiedene Subtypen G_{i/o}-/G_s-alpha-Untereinheiten aktiviert werden. Außerdem können Interaktionen mit modifizierenden Proteinen oder cholesterinreichen Domänen der Zellmembran (lipid raft) die Signalweiterleitung oder den Abbau bzw. die Synthese von Rezeptoren (receptor trafficking) beeinflussen. Des Weiteren scheint es verschiedenste Desensitivierungsmechanismen zu geben, die eine Limitierung der Signaldauer und –stärke hervorrufen (vgl. Review: Bosier et al., 2010). Somit können unterschiedliche Agonisten verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Dieses Phänomen wird als funktionelle Selektivität bezeichnet. Die Effektivität der Agonisten wird zudem zusätzlich durch die Verfügbarkeit und den Aktivitätszustand der Rezeptoren reguliert.

Abbildung 6 veranschaulicht in vereinfachter Form das Endocannabinoidsystem und zwei mögliche Signaltransduktionsmechanismen und fasst somit das Kapitel Endocannabinoidsystem (1.2) graphisch zusammen.

Dabei ist zu beachten, dass diese Abbildung nur einen kleinen Ausschnitt des komplexen Systems darstellt. Wie bereits beschrieben wirkt Anandamid nicht nur autokrin über Vanilloidrezeptoren sondern auch retrograd über CB₁-Rezeptoren. Die Wirkweise ist abhängig von der Art der Neurone, unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Gehirnareal und wird über vielfältige Mechanismen zusätzlich reguliert.

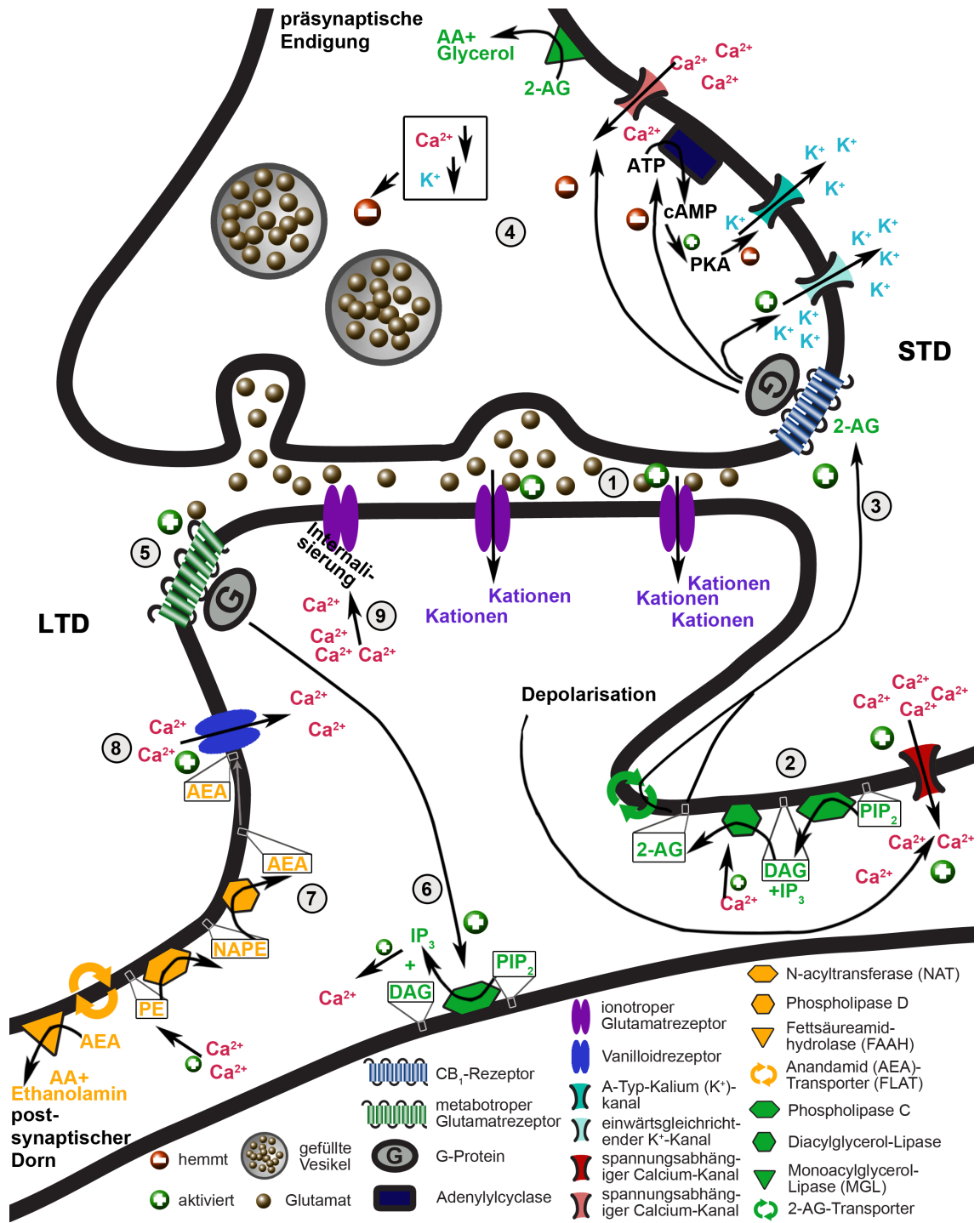


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Endocannabinoidsystems und zweier Signaltransduktionsmechanismen (Kurzzeit- (STD) und Langzeitdepression (LTD)), am Beispiel einer glutamatergen Synapse im Nucleus striae terminalis.

(1) Die Ausschüttung von Glutamat führt zu einer Aktivierung ionotroper Glutamatrezeptoren (AMPA) und resultiert in einer Depolarisation. (2) Eine Depolarisation der Postsynapse bedingt die Öffnung spannungabhängiger Ca²⁺-Kanäle, was die postsynaptische 2-AG-Synthese aus membranständigen Vorstufen begünstigt. Zunächst wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) über die Phospholipase C in Diacylglycerol (DAG) gespalten. Letzteres wird wiederum von der DAG-Lipase (DGL) in 2-AG umgewandelt. Wie 2-AG die Zelle verlässt ist noch nicht abschließend geklärt. Denkbar wäre mit Hilfe eines noch identifizierten Transporters, über unterstützende extrazelluläre Proteinen oder direkt nach Synthese in der Membran. Freigesetztes 2-AG aktiviert schließlich retrograd präsynaptische CB₁-Rezeptoren (3). Sind diese an G_{i/o}-Proteine gekoppelt, führt dies über folgende Mechanismen zur Reduktion der Transmitterausschüttung (4): a) Öffnung einwärtsgerichteter K⁺-Kanäle, b) Hemmung der präsynaptischen Endigung

Adenylylcyclase (Erniedrigung der cAMP-Konzentration) und somit Aufhebung der Inhibition von A-Typ-K⁺-Kanälen durch die Proteinkinase A (PKA) und c) Inhibition spannungsabhängiger Ca²⁺-Kanäle. Dies resultiert letztendlich in der Reduktion des exzitatorischen postsynaptischen Potentials. 2-AG wird schließlich präsynaptisch über die Monoacylglycerol-Lipase (MGL) abgebaut und in Arachidonsäure (AA) und Glycerol gespalten.

(5) Glutamat kann aber auch an metabotrope Glutamatrezeptoren binden, die wiederum über G-Proteine die Phospholipase C aktivieren (6). Bei der Spaltung von PIP₂ entsteht neben DAG Inositol triphosphat (IP₃), welches die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem endoplasmatischen Reticulum bewirkt und somit die Anandamid (AEA)-Synthese in der Lipidmembran fördert. Zunächst wird Phosphatidylethanolamin (PE), Ca²⁺-abhängig durch eine N-acyltransferase (NAT) in N-arachidonoyl-PE (NAPE) umgewandelt, bevor eine Phospholipase D daraus Anandamid synthetisiert. Anandamid kann autokrin postsynaptische ionotrope Vanilloidrezeptoren aktivieren (8). Dies führt zunächst zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels und resultiert schließlich in der Internalisierung von AMPA-Rezeptoren (9) und somit in einer Langzeitdepression (LTD). Da die Vanilloidrezeptor-Bindungsstelle innerhalb der Membran liegt, muss Anandamid (AEA) die Zelle nicht verlassen. Somit ist bei dieser Art der synaptischen Transmission, die Wiederaufnahme über den Transporter (FLAT) nicht notwendig. Die Anandamid-Hydrolyse zu Arachidonsäure (AA) und Ethanolamin erfolgt postsynaptisch über die Fettsäureamidhydrolase (FAAH).

1.3. Schizophrenie

Schizophrenie ist eine sehr heterogene, chronische psychische Erkrankung, mit einer Lebenszeitprävalenz von 0,4-1 % (Linscott & van Os; Cannon & Jones, 1996; Tsuang, 2000; Bhugra, 2005; Kellendonk et al., 2009; Heekeren, 2011). Die Erkrankung tritt in der Regel zwischen dem 15. und 35. Lebensjahr erstmals auf, wobei Männer häufig etwa 3-4 Jahre früher erkranken als Frauen (Häfner et al., 1993; Gaebel, 2002).

Schizophrenie ist durch drei Leitsymptome charakterisiert: positive, negative und kognitive Symptome (Kellendonk et al., 2009). Positivsymptome gehen häufig mit gesteigerter Angst einher. Die Intensität der verschiedenen Symptome variiert mit der Zeit (Häfner et al., 1993; Lieb, 2008). Während der akuten Phase der Erkrankung überwiegen im klinischen Bild die Positivsymptome wie Wahnvorstellungen, Halluzinationen (vor allem akustisch) und Ich-Störungen (z. B. Gedankeneingebung oder -entzug, Willensbeeinflussung). Die chronische und „stabile“ Phase der Krankheit ist vor allem durch Negativsymptome, wie Antriebslosigkeit, Affektverflachung, sozialer Rückzug sowie die Beeinträchtigung kognitiver Funktionen (vor allem Aufmerksamkeit, Arbeitsgedächtnis und exekutive Funktionen) charakterisiert. Zudem treten bereits einige Monate bis Jahre vor der Manifestation der akuten Erkrankung die ersten kognitiven Defizite und Negativsymptome auf (Prodromalphase).

Heutzutage stehen diverse Medikamente zur Behandlung der Erkrankung zur Verfügung. Die typischen Antipsychotika der 1. Generation wirken hauptsächlich antagonistisch am Dopamin-D₂-Rezeptor. Die atypischen Antipsychotika der 2. Generation blo-

ckieren hingegen die Dopaminrezeptoren weniger stark und wirken in der Regel zusätzlich an serotonergen, cholinergen, adrenergen und histaminergen Rezeptoren. Insbesondere die antagonistische Wirkung an Serotoninrezeptoren wird mit einer Reduktion der Negativsymptomatik in Zusammenhang gebracht, während die Blockade der anderen Rezeptortypen mit den Nebenwirkungen und weniger mit der Wirksamkeit in Verbindung steht (Frauenknecht et al., 2008). Extrapyramidale Nebenwirkungen, die dem Krankheitsbild von Parkinson ähneln, sind charakteristisch für typische Antipsychotika. Aufgrund der geringeren Dopaminrezeptor-Blockade führen die atypischen Antipsychotika nicht mehr zu starken motorischen Störungen. Sie sind aber mit Gewichtszunahme, Diabetes mellitus Typ II, Sedierung und sexuellen Dysfunktionen assoziiert (vgl. Review: Freedman, 2003).

Die Reduktion der Lebensqualität wird vor allem den Negativsymptomen und kognitiven Störungen zugeschrieben. Sie beeinflussen maßgeblich die Prognose des Krankheitsverlaufs und sind langfristig für das berufliche und soziale Schicksal der Betroffenen wesentlich folgenschwerer als die Positivsymptome (Häfner, 2005). Obwohl die Einführung der atypischen Antipsychotika mit deutlichen Behandlungsfortschritten einherging, können bisher hauptsächlich die Positivsymptome ausreichend behandelt werden. Außerdem wird ein Drittel der Patienten als behandlungsresistent angesehen. Somit besteht immer noch ein Bedarf an alternativen psychopharmakologischen Behandlungsansätzen.

1.3.1. Schizophrenie und das Endocannabinoidsystem

Die neurobiologischen Grundlagen der Schizophrenie sind erst in Ansätzen verstanden. Die vorherrschende Hypothese ist die Dopaminhypothese. Grundlage dieser Hypothese war die Feststellung, dass Antipsychotika den Catecholamin-Stoffwechsel beeinflussen und zu einer Rezeptorblockade führen könnten (Carlsson & Lindqvist, 1963). Als sich die Befunde bezüglich der Dopamin-Rezeptorblockade verdichteten, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Schizophrenie auf einer Hyperaktivität des Dopaminsystems beruht (van Rossum, 1966). Mittlerweile geht man allerdings davon aus, dass die Pathophysiologie der Erkrankung wesentlich komplexer ist. Zum einen wurde die Dopaminhypothese revidiert: die Hyperaktivität an D₂-Rezeptoren wird nun mit den Positivsymptomen in Zusammenhang gebracht, während die Negativsymptome auf eine

Hypoaktivität an D₁-Rezeptoren zurückgeführt werden (Davis et al., 1991). Zum anderen geht man davon aus, dass Dysfunktionen verschiedener Neurotransmittersysteme sowie ihre Interaktionen eine Rolle spielen. Dazu gehören das glutamaterge (Kim et al., 1980), GABAerge (Garbutt & van Kammen, 1983) und serotonerge System (Meltzer, 1989) sowie das Endocannabinoidsystem (Emrich et al., 1997).

Verschiedene Befunde sprechen für die Hypothese, dass das Endocannabinoidsystem adaptiv auf Neurotransmitter-Anomalien reagiert und protektiv bei der Entwicklung schizophrener Psychosen wirken kann (Leweke, 2012).

So wurden bereits bei Patienten, die sich in der Prodromalphase einer Psychose befanden, erhöhte Anandamidlevel im *Liquor cerebrospinalis* (CSF) gemessen. Zusätzlich hatten Patienten mit niedrigeren Anandamidspiegeln ein höheres Risiko, aus der prodromalen Phase in eine akute Psychose überzugehen (Koethe et al., 2009).

Patienten mit einer unbehandelten erstmanifesten paranoiden Psychose wiesen gegenüber gesunden Kontrollprobanden ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Anandamidspiegels im CSF auf (Leweke et al., 1999a; Giuffrida et al., 2004). Dabei war die Höhe des Anandamidlevels invers zur Psychopathologie dieser Patientengruppe korreliert. Das heißt je höher die Anandamidkonzentration war, desto schwächer waren die psychotischen Symptome ausgeprägt. Interessanterweise waren die Anandamidspiegel von Patienten, die mit typischen Antipsychotika (D₂-Rezeptor-Antagonisten) behandelt worden waren, nicht von denen der gesunden Kontrollprobanden zu unterscheiden. Patienten, die atypische Antipsychotika erhielten (zusätzlicher antagonisierender Effekt am 5HT_{2A}- Serotoninrezeptor), wiesen hingegen ebenfalls eine signifikante Erhöhung des Anandamidspiegels auf. Die Anandamidkonzentration erreichte jedoch nicht das Niveau der unbehandelten Gruppe. Da eine Behandlung mit typischen Antipsychotika zu einer Reduktion der Anandamidkonzentration auf Normalmaß führt, ist zu vermuten, dass das Endocannabinoidsystem regulierend auf das Dopaminsystem einwirkt. Diese Hypothese wird von Tierstudien unterstützt. Sowohl die neuronale Aktivität im dorsalen Striatum der Ratte als auch die lokale Administration eines D₂-Agonisten führten zur Ausschüttung von Anandamid (Giuffrida et al., 1999). Die Gabe eines D₂-Antagonisten verhinderte hingegen den Anstieg der Anandamidkonzentration. Außerdem wurde der Einfluss des D₂-Agonisten auf die motorische Aktivität von Ratten zum einen durch die Gabe eines CB₁-Antagonisten verstärkt (Giuffrida

et al., 1999) und zum anderen durch die Hemmung des Anandamidtransports verringert (Beltramo et al., 2000; Martin et al., 2008). Diese Befunde deuten darauf hin, dass das Endocannabinoidsystem als negatives Rückkopplungssystem der Dopaminausschüttung entgegenwirkt.

Auch die CB₁-Rezeptordichte scheint bei Schizophreniepatienten verändert zu sein, allerdings ist die Datenlage humaner *post mortem* Studien bislang nicht konsistent. Zwei Studien konnten autoradiographisch eine erhöhte CB₁-Rezeptor-Expression im dorsolateralen präfrontalen Kortex und anterioren zingulären Kortex (Dean et al., 2001; Zavitsanou et al., 2004) nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte immunhistochemisch im anterioren zingulären Kortex kein Unterschied in der CB₁-Rezeptordichte von Schizophreniepatienten und Normalprobanden festgestellt werden (Koethe et al., 2007). In einer weiteren Studie wurde bei Schizophreniepatienten im dorsolateralen präfrontalen Kortex eine signifikant geringere CB₁-mRNA- und Proteinmenge gemessen (Eggan et al., 2008). Ein Grund für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist sicherlich, dass die Untersuchungen nur *post mortem* durchgeführt werden können und somit nur der Endpunkt einer langen Krankheit mit unterschiedlicher Historie (z. B. Behandlungsart und -dauer sowie Lebensumstände) erfasst wird. Mithilfe von Positronen-Emissions-Tomographie (PET)-Studien wird es nun möglich, zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung einen Eindruck von der CB₁-Rezeptordichte zu bekommen. Die ersten PET-Studien zeigten eine Erhöhung der CB₁-Rezeptorbindung, die als erhöhte CB₁-Rezeptordichte interpretiert werden kann (Wong et al., 2010; Ceccarini et al., 2012).

1.3.2. Schizophrenie und Cannabis

Nicht nur die neurobiologischen Grundlagen der Schizophrenie sondern auch die Ätiologie der Erkrankung ist äußerst komplex. Wie Zwillingsstudien zeigen, liegt die Konkordanzrate eineiiger Zwillingen nur bei etwa 50 %, die zweieiiger Zwillinge bei etwa 20 %. Somit müssen neben genetischen Faktoren auch diverse Umweltfaktoren sowie Interaktionen beider Faktoren eine Rolle spielen (Tsuang, 2000; Caspi & Moffitt, 2006; Kellendonk et al., 2009). 1984 (Nuechterlein & Dawson) wurde erstmals ein Vulnerabilitäts-Stress-Modell postuliert, das bis heute Gültigkeit hat. Man geht davon aus, dass genetische Faktoren zu verschiedenen neuropathologischen Veränderungen führen,

die alleine nicht ausreichend sind, um eine Schizophrenie auszulösen (Vulnerabilität). Sind aber vulnerable Individuen bestimmten Umweltfaktoren (Stress) ausgesetzt, reichen die intrinsischen Kompensationsmechanismen nicht mehr aus, um den Ausbruch der Erkrankung zu unterdrücken.

Zahlreiche Umweltfaktoren werden als Risikofaktor diskutiert. Dazu gehört, ob man in der Stadt oder auf dem Land geboren wird und aufwächst, zu welcher Jahreszeit man geboren wird, pränatale Infektionen bzw. maternale Infektionen während der Schwangerschaft, maternaler Stress, paternales Alter, Geburtskomplikationen und Ernährung (vgl. Review: Brown, 2011).

Ein weiterer diskutierter Risikofaktor ist Cannabiskonsum. Einige Zeit wurde postuliert, dass langjähriger Cannabiskonsum eine sog. „Cannabis-Psychose“ auslöst, die eine eigene nosologische Entität darstellen sollte. Diese Ansicht wird mittlerweile verneint. Vielmehr geht man davon aus, dass Cannabiskonsum im Sinne des Vulnerabilitäts-Stress-Modells bei prädisponierten Personen als Stressfaktor wirkt, der die Entwicklung einer Schizophrenie begünstigt (Leweke et al., 2004). Mehrere epidemiologische Studien und Meta-Analysen zeigten, dass Cannabiskonsum vor allem in der Jugend mit einem signifikant erhöhten Risiko einhergeht, später an einer Psychose zu erkranken (Andreasson et al., 1987; Arseneault et al., 2002; van Os et al., 2002; Zammit et al., 2002; Fergusson et al., 2003; Henquet et al., 2005). Die verschiedenen Studien beziffern die Erhöhung des Risikos auf das 1,2 bis 4 fache. Zammit und Kollegen (2002) beobachteten zudem einen Zusammenhang zwischen Schizophrenierisiko und Ausmaß des Cannabiskonsums. Während das Risiko bei gelegentlichen Cannabisnutzern nur um das 1,2 fache stieg, führte häufiger Cannabiskonsum (> 50 Mal) zu einer 6,7 fachen Risikoerhöhung. Dieser Zusammenhang wurde auch in einer Meta-Analyse bestätigt (Moore et al., 2007).

Die Tatsache, dass das psychoaktive Δ^9 -THC sowohl bei gesunden Individuen als auch bei Schizophreniepatienten psychotische Symptome hervorruft, unterstützt die Hypothese, dass Cannabiskonsum und Schizophrenie miteinander assoziiert sind. So führt die Gabe von Δ^9 -THC bei gesunden Probanden vorübergehend zu positiven und negativen Symptomen, perzeptuellen Veränderungen, Euphorie und Angst sowie zu kognitiven Beeinträchtigungen wie bspw. Störungen des Arbeitsgedächtnis und der Aufmerksamkeit (Leweke et al., 1999b; Leweke et al., 2000; D'Souza et al., 2004; Koethe et al.,

2006; Bhattacharyya et al., 2009; Fusar-Poli et al., 2009). Bei Schizophreniepatienten verschlimmern sich hingegen vorübergehend positive und negative Symptome, perzeptuelle Veränderungen, kognitive Defizite und sogar extrapyramidale Nebenwirkungen von Antipsychotika (D'Souza et al., 2005).

Cannabiskonsum scheint bei schizophrenen Patienten auch einen Effekt auf das Endocannabinoidsystem zu haben. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Anandamidkonzentration im CSF bei Schizophreniepatienten mit geringem Cannabiskonsum, im Vergleich zu Patienten mit hohem Cannabiskonsum sowie gesunden Kontrollen 10-fach erhöht war (Leweke et al., 2007). Die Symptomatik war sowohl bei den Patienten mit niedrigen als auch mit hohem Cannabiskonsum negativ mit der Anandamidkonzentration korreliert. Somit scheint Cannabiskonsum der mutmaßlich protektiven Hochregulierung des Endocannabinoidsystem entgegenzuwirken.

Während Veränderungen der CB₁-Rezeptordichte bei Schizophreniepatienten noch kontrovers diskutiert werden (vgl. 1.3.1), scheint die Auswirkung von Cannabiskonsum bzw. Δ^9 -THC auf die CB₁-Rezeptordichte eindeutiger zu sein. Eine aktuelle PET-Studie (Hirvonen et al., 2011) konnte zeigen, dass bei Normalprobanden chronischer Cannabiskonsum zu einer reversiblen und regional selektiven Verringerung der CB₁-Rezeptorverfügbarkeit führt. Die Verringerung des PET-Signals wurde als Abnahme der Rezeptordichte interpretiert. Der Grad der Reduktion korrelierte mit der Anzahl der Jahre, in denen die Probanden Cannabis konsumierten. Nach etwa 4 Wochen Cannabis-Abstinenz erreichte die CB₁-Rezeptorverfügbarkeit wieder Normalmaß. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Tierstudien, in denen ebenfalls eine regional selektive Reduktion der CB₁-Rezeptordichte nach chronischer Δ^9 -THC-Behandlung beobachtet wurde (Rodriguez de Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1995; Romero et al., 1997; Romero et al., 1998; Breivogel et al., 1999). Die Erniedrigung der Rezeptordichte wird als Mechanismus der Toleranzentwicklung betrachtet. Somit verringert hoher Cannabiskonsum die Signaltransduktion des Endocannabinoidsystems auf der Ebene der Rezeptoren und schwächt auf diese Weise die regulative Wirkung des Systems. Bisher ist ungeklärt, ob der beobachtete Effekt von Cannabiskonsum auf die Anandamidspiegel von Schizophreniepatienten (siehe oben, Leweke et al., 2007) ein direkter ist, oder indirekt durch die Internalisierung der CB₁-Rezeptoren induziert wird.

1.3.3. Schizophrenie und Cannabidiol

Während Δ^9 -THC für die psychotropen Effekte von Cannabis verantwortlich ist und bei prädisponierten Personen die Entwicklung einer Schizophrenie begünstigt, wirkt der zweite Hauptbestandteil der Cannabispflanze, CBD, nicht psychoaktiv. Vielmehr wurden in diversen präklinischen und humanen Studien sedierende, anxiolytische, schlaf-induzierende, antiemetische, antikonvulsive sowie antioxidative, antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte nachgewiesen (vgl. Reviews: Mechoulam et al., 2002; Mechoulam et al., 2007). Außerdem wird CBD als vielversprechende Substanz für eine alternative Schizophreniebehandlung angesehen (vgl. Review: Zuardi et al., 2006a; Leweke et al., 2012).

Bei gesunden Probanden wirkt CBD den psychotropen Effekten von Δ^9 -THC entgegen. Es reduziert die durch Δ^9 -THC ausgelösten Positivsymptome, das gesteigerte Angstempfinden und perzeptuelle Veränderungen (Zuardi et al., 1982; Leweke et al., 2000; Bhattacharyya et al., 2010).

Die Wirkung von CBD als Antipsychotikum wurde erstmals 1995 im Rahmen eines Heilversuches getestet (Zuardi et al., 1995). Dabei wurde eine akut psychotische Patientin täglich mit CBD behandelt. Die beobachtete klinische Verbesserung konnte durch die anschließende Gabe eines damals gängigen Antipsychotikums nicht gesteigert werden. Einige Jahre später wurde CBD drei behandlungsresistenten Patienten verabreicht (Zuardi et al., 2006b). Bei einem der Patienten wurde ein leichter Rückgang der Positiv- und Negativsymptomatik beobachtet. Bei den anderen beiden Patienten hatte die Behandlung zwar keinen Effekt, aber es traten auch keine Nebenwirkungen auf. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde schließlich die erste doppelblinde randomisierte Studie mit Schizophreniepatienten durchgeführt (Leweke et al., 2012). Dabei wurde die Wirksamkeit von CBD mit einem gängigen Antipsychotikum (Amisulprid) verglichen. Beide Substanzen zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit, aber CBD zeichnete sich durch ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil aus. Verglichen mit Amisulprid traten signifikant weniger extrapyramidale Symptome auf. Außerdem zeigten die Probanden keine relevante Gewichtszunahme und keine Erhöhung des Prolaktinspiegels, wobei letzteres als Indikator für sexuelle Dysfunktion und Galaktorrhoe („krankhafter“ Milchfluss) gilt. Zudem wurden Leber- und Herzfunktionen nicht beeinflusst.

Der Wirkmechanismus von CBD ist noch wenig erforscht. Bisher ist nachgewiesen, dass dieses Cannabinoid nur mit äußerst geringer Affinität an die beiden Cannabinoidrezeptoren bindet (Bisogno et al., 2001a; Fride et al., 2005; McPartland et al., 2007). Dennoch wurde in Membranpräparaten von Maus- und Rattengehirnen eine CB₁-vermittelte antagonistische Wirkung beobachtet (Petitet et al., 1998; Thomas et al., 2007). Eine weitere Studie konnte hingegen weder einen agonistischen noch einen antagonistischen Effekt von CBD nachweisen (Breivogel et al., 2001).

Bisogno et al. (2001a) zeigten, dass CBD in Zellkulturen mit ähnlicher Effizienz und Wirksamkeit wie Capsaicin an den humanen Vanilloid-Rezeptor (TRPV1) bindet. Dieser Rezeptor kann auch von Anandamid aktiviert werden (vgl. 1.2.3). Des Weiteren scheint CBD in Zellkulturen und Membranpräparaten sowohl die Anandamid-Hydrolyse zu inhibieren (FAAH-Inhibition; Watanabe et al., 1996; Bisogno et al., 2001a; Leweke et al., 2012) als auch die Aufnahme von Anandamid in die Zelle (FLAT-Inhibition; Rakhshan et al., 2000; Bisogno et al., 2001a). Außerdem wurde postuliert, dass CBD indirekt die Endocannabinoid-Synthese steigern kann. In hippokampalen Zellkulturen von Ratten führte die CBD-Gabe zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Ryan et al., 2007). Dieser Anstieg war in Anwesenheit von Anandamid oder 2-AG deutlich geringer. Daher wurde angenommen, dass die Synthese von Anandamid und 2-AG zunächst durch den intrazellulären Ca²⁺-Anstieg erhöht wird und sich diese gesteigerten Endocannabinoidkonzentrationen schließlich negativ modulierend auf den CBD-Effekt auswirken.

Somit könnte die antipsychotische Wirkung des CBDs über die zusätzliche Hochregulierung des Endocannabinoidsystems zustande kommen. Dafür sprechen auch die Ergebnisse der bereits erwähnten klinischen CBD-Studie (Leweke et al., 2012). Die Gabe von CBD führte zu einer Erhöhung des Anandamidspiegels im Serum, die signifikant mit einer Verbesserung der psychotischen Symptome assoziiert war. Da zudem die Konzentrationen der verwandten Eicosanoide PEA und OEA anstiegen, kann postuliert werden, dass CBD auch in-vivo das gemeinsame Hydrolyseenzym FAAH inhibiert. Dennoch können zusätzliche Wirkmechanismen (z.B. über den Serotonin-5-HT_{1a}-Rezeptor; vgl. Review: Mechoulam et al., 2007) nicht ausgeschlossen werden.

1.4. Tiermodelle psychiatrischer Erkrankungen

Im Sinne der Neurowissenschaften versteht man unter Tiermodellen die Untersuchung von Gehirn-Verhaltensbeziehungen in lebenden Organismen unter kontrollierten Bedingungen, mit dem Ziel, einen Einblick in diese Beziehungen zu bekommen und Vorhersagen bei Menschen und anderen Spezies zu treffen (van der Staay, 2006). Tiermodelle haben einige Vorteile. Beispielsweise ist es häufig nicht möglich, bei Menschen die neurobiologischen Grundlagen einer Erkrankung umfassend zu untersuchen, da für einige Untersuchungen noch keine nicht-invasiven Methoden zur Verfügung stehen. Bei Menschen lassen sich zudem unterschiedliche Umwelteinflüsse nicht vermeiden, während in Tierstudien die Varianz verringert werden kann, indem alle Tiere unter den gleichen Bedingungen gehalten werden (z. B. Tag-Nacht-Rhythmus, Nahrung, Raumtemperatur etc.). Außerdem ist es möglich, longitudinale Untersuchungen vor und nach einer „Erkrankung“ durchzuführen. Die Nachteile der Tiermodelle liegen darin, dass Krankheiten nicht im vollen Umfang im Modell reproduzierbar und einige Symptome humanspezifisch sind. Letzteres gilt insbesondere für psychiatrische Tiermodelle.

1.4.1. Tiermodelle: Validität, Endophänotypen und Biomarker

Die Validität und somit die Qualität eines Tiermodells kann anhand von verschiedenen Kriterien eingeschätzt werden. Nach McKinney und Bunney (1969) sollte ein Tiermodell der modellierten Erkrankung bezüglich der Ätiologie, Biochemie, Symptomatik und der Behandlung gleichen. Ausgehend von dieser ersten Beschreibung wurden schließlich drei Validitätskriterien festgelegt (Willner, 1984; Willner, 1986), die bis heute Anwendung finden: (1) die Augenscheinvalidität (face validity), (2) die Vorhersagevalidität (predictive validity) und (3) die Konstruktvalidität (construct validity).

Die Augenscheinvalidität besagt, dass auf verschiedenen Ebenen eine phänotypische Ähnlichkeit zwischen Modell und modelliertem Zustand existiert. Unter Vorhersagevalidität versteht man, dass die Richtung eines Effektes vorhersagbar ist, wobei die genaue Definition in der Literatur zweideutig ist (Koch, 2006). Zum einen kann vorhergesagt werden, wie sich Manipulationen im Tiermodell in anderen Spezies oder unter anderen Bedingungen auswirken werden (z.B. Vorhersage über die klinische Potenz neuer Wirkstoffe). Zum anderen kann ein Verhaltensdefizit durch klinisch etablierte Wirkstoffe verbessert werden. Das heißt, diese Substanzen haben im Tiermodell die

gleiche Wirkung wie im zu modellierenden Zustand, so dass die Potenz bekannter Wirkstoffe vorsehbar ist. Die Konstruktvalidität beinhaltet die homologen Aspekte des Tiermodells und des modellierten Zustandes. Beides ähnelt sich nicht nur auf dem ersten Blick (Augenscheinvalidität), sondern die grundlegenden theoretischen Konstrukte bezüglich Ätiologie, Biochemie, Symptomatik und Behandlung sind gleich. Tiermodelle mit guter Konstruktvalidität machen z. B. explizite Annahmen über die zugrundeliegenden (pathologischen) Prozesse und über Wirkmechanismen von möglichen therapeutischen Komponenten. Das Problem ist, dass dies voraussetzt, dass der zu modellierende Zustand bereits gut untersucht ist, während Tiermodelle gerade eingesetzt werden um die Grundlagen einer Erkrankung zu verstehen.

Wie bereits erwähnt, ist es in der Regel nicht möglich, komplexe humane Erkrankungen vollständig in einem Tiermodell abzubilden. Es können lediglich einzelne Komponenten dargestellt und überprüft werden. Nach Gottesman und Gould (2003) muss dabei in Tiermodellen psychiatrischer Erkrankungen zwischen Endophänotypen und Biomarkern unterschieden werden (Abbildung 7).

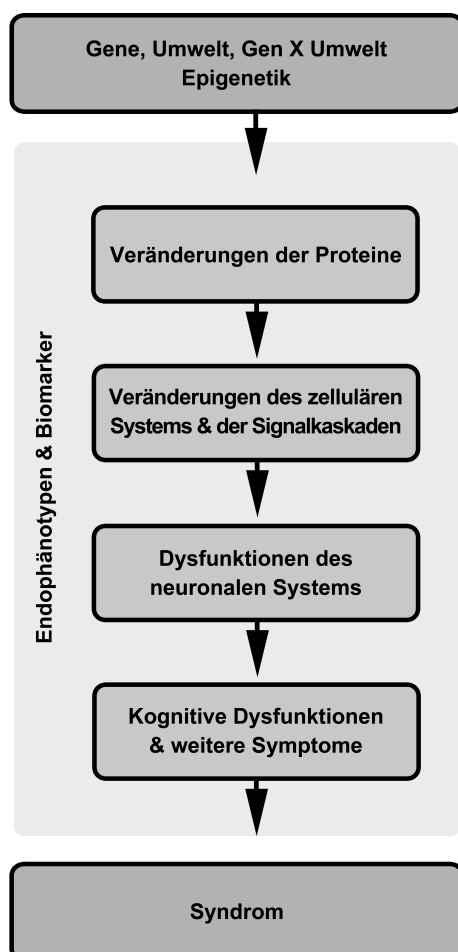


Abbildung 7: Prinzip der Endophänotypen und Biomarker.

Eine Erkrankung (Syndrom) lässt sich in kleinere, im Tiermodell testbare, Komponenten zerlegen: in Endophänotypen (auf einzelne Gene zurückführbar) und Biomarker (bedingt durch Umweltfaktoren, Epigenetik oder multifaktoriellen Ursprungs). Endophänotypen und Biomarker liegen auf verschiedenen Ebenen zwischen den Ursachen und den Ausprägungen einer Erkrankung (Syndrom). Somit können die messbaren Komponenten neuroanatomischer, biochemischer, neurophysiologischer oder kognitiver Natur sein. Auf diese Weise kann eine Vielzahl von Tiermodellen konzipiert werden, die jeweils unterschiedliche Aspekte der Ätiologie und Pathophysiologie einer Erkrankung beleuchten.

(Die Abbildung wurde modifiziert nach Cannon & Keller, 2006).

Während Biomarker multifaktoriellen Ursprungs sind oder sich auf Umwelt- oder epigenetische Faktoren zurückführen lassen, sind Endophänotypen per Definition genetisch bedingt. Nach dieser strengen Definition sind sicherlich viele in der Literatur als Endophänotypen bezeichnete Faktoren in Wirklichkeit Biomarker. Dennoch ist die Zerlegung einer komplexen humanen Erkrankung in kleinere Komponenten essentiell für die Entwicklung eines guten Tiermodells, das neue Erkenntnisse über den modellierten Zustand liefern soll. Da Endophänotypen und Biomarker auf unterschiedlichen Ebenen zwischen den Ursachen und der Ausprägung einer Erkrankung liegen, können in verschiedenen Tiermodellen auch diverse Aspekte einer Erkrankung untersucht werden.

1.4.2. Messmethoden für Biomarker und Endophänotypen

Entsprechend der Vielfalt von Biomarkern und Endophänotypen, existieren vielfältige Methoden um diese zu messen. Verhaltenstests ermöglichen die Analyse von kognitiven Dysfunktionen und anderen Symptomen. Dysfunktionen des neuronalen Systems können u.a. auf der Ebene des zerebralen Glukosemetabolismus mittels Positronen-Emissions-Tomographie oder auf der Ebene der Transmitter über Bestimmung der Transmitterspiegel-Veränderungen untersucht werden.

Für ein gutes Tiermodell ist die Verwendung valider Methoden essentiell. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass die verwendeten Methoden reproduzierbare Ergebnisse liefern. Insbesondere bei Verhaltenstests besteht die Herausforderung, die Tests so zu konzipieren, dass die Ergebnisse einwandfrei interpretierbar sind und eine mögliche Beeinflussung der Testergebnisse durch andere Faktoren (z. B. Motivation, Motorik) überprüft werden. Viele Tests machen sich die natürlichen Eigenschaften oder Reflexe der Versuchstiere zunutze. Dazu gehört bei Ratten u.a. das Meiden von freien Flächen und die damit verbundene thigmotaktische Fortbewegung, spontanes Explorationsverhalten unbekannter Objekte, das natürliche Sozialverhalten und die Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion. Im besten Falle gleichen sich die Tests bei Menschen und Ratten sowohl bezüglich ihrer neurobiologischen Grundlagen (Konstruktvalidität), als auch vordergründig (Augenscheinvalidität). Wenn sich Effekte von Manipulationen vorhersehen lassen, liegt zudem eine Vorhersagevalidität vor. Tabelle 2 stellt einige der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell-Paradigmen den bei Menschen gängigen Untersuchungen gegenüber.




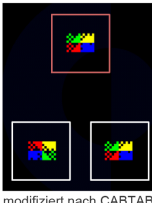
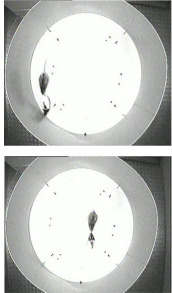
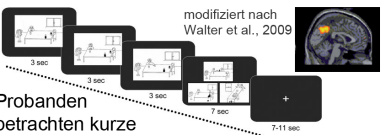
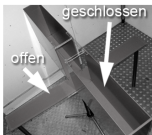
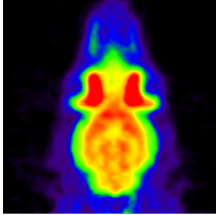
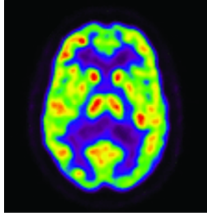
Zielfunktion	Paradigma im Tiermodell	Humanes Paradigma
sensomotorische Hemmung/ Aufmerksamkeit	 <p>Messung der Ganzkörperreaktion</p>	<p>Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion Unter PPI versteht man die natürliche Reduktion der Schreckreaktion, wenn vor dem Schreckreiz ein schwächerer Präpuls präsentiert wird, der selbst keine Schreckreaktion hervorruft. Reduzierte PPI gilt als Endophänotyp für Schizophrenie und wird als gestörte sensorische Filterung interpretiert, die zu einer Überladung mit sensorischen Reizen führt und die effiziente Verarbeitung von Informationen stört. Es handelt sich um eine nicht-erlernte, unwillkürliche Modulation der Reflexantwort, die sowohl bei Ratten als auch bei Menschen gemessen werden kann.</p>  <p>Katalog, San Diego Instruments</p> <p>elektromyographische Aufnahme des Lidschlags</p>
Arbeitsgedächtnis	<p>Objekterkennung Der Test ist eine Variante des humanen "delayed non-matching to sample task" und basiert auf dem spontanen Explorationsverhalten von Ratten: sie untersuchen unbekannte Gegenstände intensiver als bereits bekannte. Im 1. Durchgang werden in einer Arena zwei gleiche Objekte präsentiert, im 2. ein bekanntes und ein unbekanntes. Eine Präferenz für das neue Objekt im 2. Durchgang wird daher als Objektwiedererkennung bewertet (Ennaceur und Delacour, 1988).</p> 	<p>"Delayed (non) matching to sample task" Zunächst wird dem Proband ein Objekt gezeigt (rotes Quadrat). Das Objekt verschwindet dann wieder und nach einer festgelegten Zeitspanne werden zwei Objekte präsentiert (weiße Quadrate). Der Proband wird anschließend entweder aufgefordert das bekannte Objekt auszuwählen ("matching to sample") oder das unbekannte ("non-matching to sample").</p>  <p>modifiziert nach CABTAB</p>
Sozialverhalten	<p>Soziale Interaktion Zwei Ratten (Käfigpartner oder sich fremde Tiere) werden in eine Arena gesetzt und können mehrere Minuten miteinander interagieren. Ausgewertet werden anogenitale (z.B. obere Abbildung) und non-anogenitale Verhaltensweisen (untere Abbildung).</p> 	<p>Funktionelle Magnetresonanztomographie modifiziert nach Walter et al., 2009</p>  <p>Probanden betrachten kurze Bildergeschichten und müssen dann aus mehreren Möglichkeiten ein Bild auswählen, das ein logisches Ende ergibt. Kontrollbedingung: Geschichte ohne sozialen (= neutralen) Inhalt. Testbedingung: Geschichten mit sozialem Kontext. Verglichen werden die Aktivierungsmuster der Test- und Kontrollbedingung.</p>
Angst	<p>Erhöhte Plusarena Ratten halten sich bevorzugt auf den geschlossenen Armen auf (Pellow et al., 1985). Dieses Verhalten basiert vermutlich auf der natürlichen Aversion gegenüber offenen Gebieten (Lister, 1987). Diese Aversion scheint u.a. auf der Abwesenheit von thigmotaktischen Reizen zu beruhen (Rodgers und Dalvi, 1997). Bei verringerter Angst steigt die Zeit auf den offenen Armen, bei gesteigerter Angst nimmt sie hingegen ab.</p> 	<p>Fragebögen z.B. - Hamilton Anxiety Scale - Self-Rating-Anxiety Scale (SAS)</p>
zerebrale Glukose-utilisation	<p>Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit [¹⁸F]-Fluorodesoxyglukose(FDG) Mithilfe von PET können physiologische Vorgänge minimal-invasiv untersucht werden. Die Injektion radioaktiv markierter Glukose (FDG) ermöglicht eine Messung des Glukoseverbrauchs, der als indirektes Maß für die neuronale Aktivität verwendet werden kann (Schiffer et al., 2007).</p> 	 <p>modifiziert nach Newberg et al., 2011</p>

Tabelle 2: Gegenüberstellung der verwendeten Modellparadigmen und entsprechenden humanen Untersuchungen.

Da zum einen Δ^9 -THC, als ein Risikofaktor für Schizophrenie und zum anderen CBD, als mögliche antipsychotisch wirksame Substanz, im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, wurden insbesondere Verhaltensparadigmen verwendet, mit denen Negativsymptome (Defizite des Sozialverhaltens und der sensomotorischen Filterung), kognitive Defizite (Arbeitsgedächtnis) sowie Angst gemessen werden können. Zusätzlich wurde die zerebrale Glukoseutilisation und somit indirekt die neuronale Aktivität untersucht.

1.4.3. Tiermodelle für Schizophrenie

Entsprechend der komplexen Ätiologie und neurobiologischen Grundlagen der Schizophrenie werden in verschiedenen Tiermodellen schizophrenieähnliche Symptome (Endophänotypen/Biomarker) auf vielfältige Art und Weise induziert (Lipska & Weinberger, 2000; Marcotte et al., 2001; Powell & Miyakawa, 2006; Boksa, 2007). Die genetische Prädisposition wird in der Regel in Maus-Modellen untersucht. Dabei wird u.a. die Expression möglicher „Risikogene“ verringert, vollständig blockiert oder erhöht. Außerdem können Mutationen eingeführt werden, die die Funktion der resultierenden Proteine beeinflussen. Andere Modelle versuchen, verschiedene Neurotransmittersysteme aus dem Gleichgewicht zu bringen, um die Pathophysiologie von Schizophrenie zu untersuchen. Dies kann durch die Gabe von verschiedenen Substanzen wie NMDA-Antagonisten (z.B. Phencyclidin, MK-801 oder Ketamin) oder Dopaminrezeptor-Agonisten (Apomorphin) erfolgen.

Ein weiterer Ansatz stellt den Einfluss von Umweltfaktoren bei der Induktion schizophrenieähnlicher Symptome in den Vordergrund. Dabei wird beispielsweise untersucht, wie maternale Infektionen während der Schwangerschaft die Vulnerabilität für die Entwicklung einer Schizophrenie erhöhen. Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell stammt ebenfalls aus dieser Kategorie. In ihm wird der Einfluss von Cannabiskonsum während der Pubertät als Risikofaktor beleuchtet, der sich beim Menschen als besonders risikoreich im Hinblick auf die Ausbildung einer psychotischen Symptomatik im jungen Erwachsenenalter erwiesen hat (Arseneault et al., 2002).

1.4.3.1. Chronische pubertäre Cannabinoidbehandlung

Pubertät und Adoleszenz beschreiben den Übergang von der Kindheit zum Erwachsenenalter. Obwohl die beiden Begriffe in der Literatur in der Regel synonym verwendet werden, bezieht sich die Pubertät auf die Gonadenreifung, während die Adoleszenz die Reifung sozialer und kognitiver Verhaltensweisen beschreibt (Sisk & Foster, 2004; McCormick & Mathews, 2007). Die Geschlechtsreifung (Pubertät) vollzieht sich während der Adoleszenz. Während für Anfang und Ende der Adoleszenz keine speziellen Marker existieren, ist der Beginn der Pubertät bei männlichen Ratten durch die vollständige Separierung von Vorhaut und der Eichel des Penis definiert (McCormick & Mathews, 2007). Im Mittel ist dies 45-48 Tage nach der Geburt (postnatal day (pd) 45-

48) der Fall, wobei bei einigen Tieren bereits nach 40 und bei anderen erst nach 76 Tagen die Geschlechtsreife festgestellt wurde (vgl. Review: Lewis et al., 2002). Eine allgemein anerkannte Definition besagt, dass sich bei Ratten die Adoleszenz von pd 21 bis pd 59 erstreckt. Dabei wird die Adoleszenz in drei Phasen unterteilt: frühe Adoleszenz (pd 21-34), Mitte der Adoleszenz (pd 34-46) und späte Adoleszenz (pd 46-59; Tirelli et al., 2003). Eine weitere Klassifizierung nimmt an, dass die Adoleszenz von pd 28 bis pd 46 andauert. Bei dieser Definition existiert allerdings eine zeitliche Lücke bis zum Erwachsenenalter, welches die Ratten ca. 8 Wochen nach der Geburt erreichen (pd 60-63; McCormick & Mathews, 2007; McCutcheon & Marinelli, 2009). In der vorliegenden Arbeit findet die erste Definition Anwendung (siehe auch Abbildung 8), da diese (1) keine zeitliche Lücke beinhaltet, (2) die individuellen Schwankungen der Geschlechtsreife der Männchen berücksichtigt, (3) der Testosteronspiegel erst nach ca. 65 Tagen sein Maximum erreicht (Korenbroet et al., 1977) und (4) auch die endgültige CB₁-Rezeptordichte erst 60 Tage nach der Geburt erreicht wird (Belue et al., 1995).

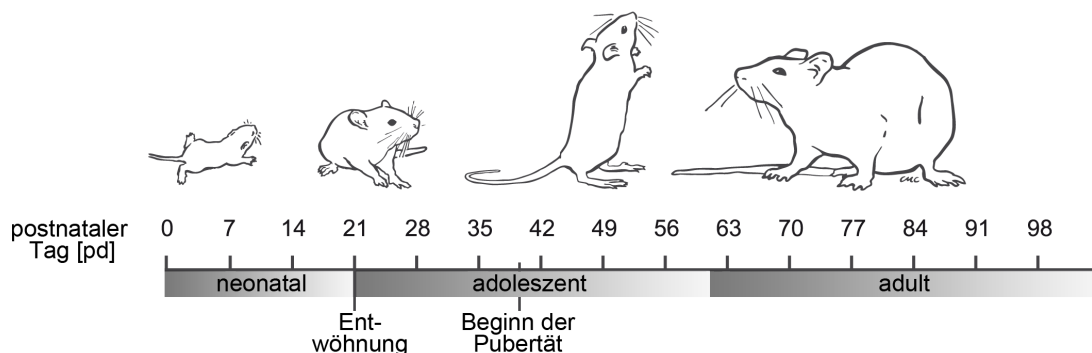


Abbildung 8: Entwicklungsstadien einer männlichen Ratte.

Ratten werden 21 Tage nach der Geburt von ihrer Mutter getrennt (Entwöhnung). Der Beginn der Adoleszenz ist definiert als erster Tag der Entwöhnung. Nach etwa 8 Wochen (ca. pd 60-63) werden die Tiere als adult betrachtet. (Die Abbildung wurde modifiziert nach McCutcheon & Marinelli, 2009)

Schneider und Koch (2003) etablierten die „chronische pubertäre Cannabinoidbehandlung“ als ein Tiermodell, in dem der Zusammenhang zwischen Cannabiskonsum und Schizophrenie genauer untersucht werden kann. Dabei wurde den Ratten von pd 40 bis 65 das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) verabreicht, welches ein deutlich besseres Löslichkeitsprofil als das natürliche Cannabinoid Δ^9 -THC aufweist (Schneider & Koch, 2003). Nach der oben erläuterten Definition erfolgte die Behand-

lung somit in der späten Adoleszenz bzw. zu Beginn der Pubertät. Dieses Tiermodell weist sowohl Augenschein- als auch Vorhersage- und Konstruktvalidität auf:

(1) Augenscheinvalidität: Die chronische pubertäre WIN-Behandlung führt bei Ratten zu verschiedenen, langanhaltenden Defiziten (u.a. reduzierte Präpulsinhibition sowie Defizite des Arbeitsgedächtnisses und des Sozialverhaltens), die auch bei Schizophreniepatienten beobachtet werden (Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2008; Leweke & Schneider, 2010). Die adoleszente Behandlung mit einem weiteren synthetischen Cannabinoid (pd 30-51) führt ebenfalls zu Defiziten, die den Negativsymptomen und kognitiven Beeinträchtigungen gleichen (O'Shea et al., 2006).

(2) Vorhersagevalidität: Die durch eine chronische pubertäre WIN-Behandlung induzierte Reduktion der Präpulsinhibition konnte durch die Gabe des klinisch wirksamen Antipsychotikums Haloperidol aufgehoben werden (Schneider & Koch, 2003). Des Weiteren konnten Defizite des Sozialverhaltens mit Hilfe des Antipsychotikums Quetiapin ausgeglichen werden (Leweke & Schneider, 2010).

(3) Konstruktvalidität: Wie bereits ausführlich erläutert (vgl. 1.3.2) kann davon ausgegangen werden, dass Cannabiskonsum und Schizophrenie assoziiert sind. Dabei scheint insbesondere Cannabiskonsum in der Pubertät das Risiko für die Entwicklung einer Schizophrenie deutlich zu erhöhen (Arseneault et al., 2004; Caspi et al., 2005; Moore et al., 2007). Aufgrund der starken Konservierung des CB₁-Rezeptors kann zudem davon ausgegangen werden, dass Cannabinoide sowohl in der Ratte als auch beim Menschen auf vergleichbare Weise ihre Wirkung entfalten.

Das bisherige Modell hat allerdings auch seine Schwächen. Etabliert wurde es wie erwähnt mit dem synthetischen Cannabinoid WIN. Die pharmakologischen Eigenschaften von WIN unterscheiden sich aber in einigen Punkten von Δ^9 -THC (vgl. Review: Howlett et al., 2002). Der wichtigste Unterschied ist sicherlich die unterschiedliche Affinität am CB₁-Rezeptor. Während es sich bei WIN um einen vollen Agonisten handelt, scheint Δ^9 -THC nur ein partieller Agonist zu sein. Somit ist es wahrscheinlich, dass sich die Wirkungen der beiden Cannabinoide zumindest teilweise unterscheiden und aufgrund der funktionellen Selektivität (vgl. 1.2.3) eventuell auch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. Da Menschen nicht WIN sondern Cannabis und somit Δ^9 -THC konsumieren, ist es unerlässlich, die Wirkung einer chronischen pubertären Δ^9 -THC-

Behandlung im Rattenmodell zu überprüfen und somit die Konstruktvalidität des Modells zu verbessern.

Zu Beginn dieser Arbeit fanden sich in der Literatur kaum Berichte über die Effekte einer chronischen adoleszenten Δ^9 -THC-Behandlung. Stiglick und Kalant (1983) beobachteten, dass eine Δ^9 -THC-Behandlung (pd 40-130, späte Adoleszenz bis ins Erwachsenenalter) nur tendenziell die generelle motorische Aktivität beeinflusste, das Vermeidungsverhalten verstärkte und die Lernfähigkeit verlangsamte. Die mit Δ^9 -THC behandelten Tiere schlossen nach 13 Tagen täglichen Testens wieder zu den Tieren, die nur das Lösungsmittel verabreicht bekamen, auf. Eine weitere Studie beobachtete keinen Effekt einer chronischen adoleszenten Behandlung (pd 30-51) auf das Lernverhalten von Ratten, aber einen stärkeren Effekt der akuten Gabe bei adoleszenten Tieren (Cha et al., 2006). Im Laufe dieser Arbeit wurden schließlich drei weitere Studien veröffentlicht, in denen die adulten Auswirkungen einer chronischen adoleszenten Δ^9 -THC-Behandlung untersucht wurden. Wiley und Burston (2010) beobachteten eine Leistungsverschlechterung in einer komplexen operanten Lernaufgabe nach Δ^9 -THC-Gabe in der frühen bis späten Phase der Adoleszenz (Δ^9 -THC-Behandlung: pd 21-50). Des Weiteren wurden Defizite im Sozialverhalten und im Arbeitsgedächtnis nach Δ^9 -THC-Administration in der Mitte der Adoleszenz festgestellt (THC-Behandlung: pd 32-40, bzw. 35-45; Quinn et al., 2008; Rubino et al., 2009).

Einige Studien untersuchten zudem die Effekte einer chronischen *adulten* Δ^9 -THC-Behandlung. Neben Veränderungen des Anandamid- und 2-AG-Spiegels (Di Marzo et al., 2000) wurde eine Verringerung der CB₁-Rezeptordichte (Rodriguez De Fonseca et al., 1994; Romero et al., 1998; Breivogel et al., 1999) sowie eine Verschlechterung des Arbeitsgedächtnisses (Nakamura et al., 1991) beobachtet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die akute Gabe von Δ^9 -THC oder Δ^9 -THC-reichen Extrakten in adulten Ratten sowohl motorische als auch Lern- und Gedächtnisdefizite hervorruft und den Glukosemetabolismus im Gehirn verändert (Margulies & Hammer, 1991; Lichtman et al., 1995; Brett et al., 2001; Fadda et al., 2004; Egerton et al., 2005).

2. Fragestellungen

Die beiden Phytocannabinoide Δ^9 -THC und CBD sowie ihre Effekte auf das Endocannabinoidsystem stellen die zentralen Aspekte der vorliegenden Arbeit dar.

Ziel der Arbeit war es, folgende Fragen zu klären:

Führt bei adulten Ratten die chronische Gabe von CBD zu Verhaltensänderungen?

Wirkt CBD auch im lebenden Organismus nach systemischer Gabe als Inhibitor des Anandamid-Hydrolyseenzym FAAH?

Ist die CBD-Wirkung mit der des bekannten FAAH-Inhibitors URB 597 vergleichbar?

Lässt sich das Modell der chronischen pubertären WIN 55,212-2 -Gabe auch mit dem vom Menschen konsumierten Δ^9 -THC reproduzieren? Können durch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung bei adulten Ratten Verhaltensdefizite und Veränderungen der zerebralen Glukoseutilisation induziert werden?

Des Weiteren wurden folgende Fragen adressiert:

In wie weit beeinflusst die Darreichungsform die Wirkung von Cannabinoiden? Wirkt Δ^9 -THC in einer öligen arzneimittelnahen Formulierung anders als in einer wässrigen Formulierung? Wodurch werden Unterschiede bedingt?

3. Material und Methoden

3.1. Tiere und Haltung

Sämtliche Studien wurden mit männlichen Ratten (*Rattus norvegicus*) durchgeführt. Zu Beginn der Arbeit wurden Tiere des Zuchtstammes Lister hooded (Harlan®, Rossdorf, Deutschland) verwendet, einem Auszuchtstamm, der auf einen Rattenstamm aus dem Lister-Institut zurückzuführen ist. Die später verwendeten Black hooded (PVG) Ratten (Janvier®, Le Genest St Isle, Frankreich), entstammen ursprünglich ebenfalls diesem Stamm, wurden aber als Inzuchtstamm weitergezüchtet. Der Rattenstamm wurden im Laufe dieser Doktorarbeit gewechselt, da sich nach der Etablierung eines Hörtests herausstellte, dass die Black hooded über ein besseres Hörvermögen verfügen. Alle chronischen Versuche wurden mit Lister hooded, alle akuten Studien mit Black hooded Ratten durchgeführt.

Die Tiere wurden in Typ 4-Makrolon-Käfigen bei einer Raumtemperatur von 22 ± 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 % in Gruppen gehalten. Die Gruppengröße betrug 2-3 adulte Tiere, jüngere Ratten (21 bis 65 Tage) wurden hingegen in 5 er Gruppen gehalten und erst anschließend in kleinere Gruppen aufgeteilt. Nach dem Tod eines Käfigpartners (z.B. aufgrund eines Tumors oder einer Narkoseunverträglichkeit) wurde die verbleibende Ratte nicht wieder neu vergesellschaftet, um einen Einfluss der Ausbildung neuer sozialer Strukturen auf die Testergebnisse mehrerer Tiere zu verhindern. Die Käfige waren alle mit einer horizontalen Röhre, einem kleinen Häuschen inklusive Nistmaterial und kleinen Hölzern zum Nagen ausgestattet. Diese moderate Bereicherung der Umwelt reduziert Stress, verbessert somit das Wohlergehen der Labortiere und unterstützt das natürliche Verhalten der Tiere im Versuch (Brillaud et al., 2005).

Die Tiere wurden in einem inversen 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus gehalten (Licht an: 20:30 – 8:30 Uhr). Da Ratten nachtaktiv sind und in der Lichtphase ca. 80 %, in der Dunkelphase hingegen nur 30 % der Zeit schlafen (Antle & Mistlberger, 2005), konnten auf diese Weise alle Versuche in der aktiven Phase der Tiere durchgeführt werden. Während der Dunkelphase war das Licht im Tierstall in der Regel ausgeschaltet. Wenn allerdings Licht benötigt wurde, z.B. zur Fütterung oder für Injektionen, wurde Rotlicht (> 660 nm, 2 Lux) eingeschaltet. Ratten besitzen drei verschiedene Fotorezeptoren. Die Stäbchen haben ein Absorptionsmaxima λ_{max} von 486 nm (Bridges, 1959), bei den Zap-

fen liegt λ_{\max} bei 358 nm (Yokoyama et al., 1998) sowie 510 nm (Neitz & Jacobs, 1986). Oberhalb von 600 nm sind selbst die blau-grünen Zapfen ($\lambda_{\max} = 510$ nm) kaum noch sensitiv (Jacobs et al., 2001), so dass Rotlicht den zirkadianen Rhythmus der Ratten nicht stört.

Zunächst wurden alle Tiere *ad libitum* gefüttert (Haltungsfutter, Harlan®), um die Futtermenge zu ermitteln, die die Tiere pro Tag zu sich nahmen. Im Anschluss wurde die Futtermenge auf 80 % der unter *ad libitum* Bedingungen verzehrten Menge begrenzt (restriktive Fütterung). Die Tiere, die für die letzten beiden Studien (Dosisstudie, Lösungsmittelstudie) verwendet wurden, wurden von Beginn an mit speziellem Diätfutter (Ssniff®) *ad libitum* gefüttert. Diese Art der Ernährung führt nur zu einer sehr langsamen Gewichtszunahme, vergleichbar mit der Gewichtsentwicklung bei restriktiver Fütterung.

Zu Beginn einer Studie wurden die Tiere nur 1-2 Mal die Woche gewogen, um die Gewichtsentwicklung zu verfolgen und bei starken Schwankungen gegebenenfalls eingreifen zu können. Sobald die Tiere Injektionen erhielten, wurden sie hingegen jeden Morgen gewogen, um das exakte Injektionsvolumen ermitteln zu können.

3.2. Substanzen und Lösungsmittel

Im Folgenden werden die in den verschiedenen Studien verwendeten Substanzen und Lösungsmittel erläutert. Die experimentelle Verwendung der verschiedenen Substanzen sowie die eingesetzten Konzentrationen werden unter dem Punkt Positronen-Emissions-Tomographie (vgl. 3.7) bzw. Studien (3.11) detailliert beschrieben.

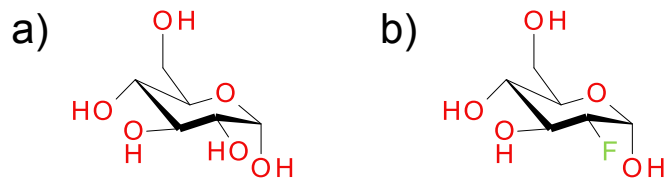
3.2.1. Substanzen

3.2.1.1. 2-[¹⁸F] Fluor-2-Deoxyglukose

Bei 2-[¹⁸F] Fluor-2-Deoxyglukose (¹⁸FDG) handelt es sich um ein Radiopharmakon, mit dem die zerebrale Glukoseutilisation untersucht werden kann. Die Halbwertszeit beträgt 109,8 min (Cherry, 2001). Die radioaktive Markierung des Zuckermoleküls Glukose wird durch den Austausch der Hydroxyl-Gruppe am C-2 Atom gegen ¹⁸F erreicht (Abbildung 9).

Abbildung 9: Gegenüberstellung der Strukturformeln von Glukose (a) und 2-¹⁸F Fluor-2-Deoxy-glukose (b).

Die Hydroxylgruppe am C-2 Atom der Glukose ist im 2-¹⁸F Fluor-2-Deoxyglukose-Molekül durch das Radionuklid ¹⁸F ersetzt. (Die Strukturformel wurde mit Symyx® Draw 3.2 erstellt.)



¹⁸FDG wird wie Glukose über die Bluthirnschranke transportiert und in die Zellen aufgenommen (Crane et al., 1983). In der Zelle wird ¹⁸FDG wie Glukose zunächst von der Hexokinase zu 2-¹⁸F Fluor-2-Deoxyglukose-6-Phosphat (¹⁸FDG-6-Phosphat) phosphoryliert (Bessell et al., 1972). ¹⁸FDG-6-Phosphat kann anschließend von der Glukose-6-Phosphat-Isomerase, dem nächsten Enzym der Glykolyse nicht weiter metabolisiert werden, so dass es in der Zelle akkumuliert.

Das in den PET-Studien verwendete ¹⁸FDG wurde von der Radiochemie des MPI für neurologische Forschung synthetisiert.

3.2.1.2. URB 597

Die Aktivität der Fettsäure-Amid-Hydrolase (FAAH, vgl. 1.2.2.1) lässt sich mithilfe verschiedenster Substanzen inhibieren (Freund et al., 2003). Zu den potentesten und selektivsten Inhibitoren gehört das Carbamat-Derivat URB 597 (URB, IUPAC-Bezeichnung: [3-(3-carbamoylphenyl) phenyl] N-cyclohexylcarbamate).

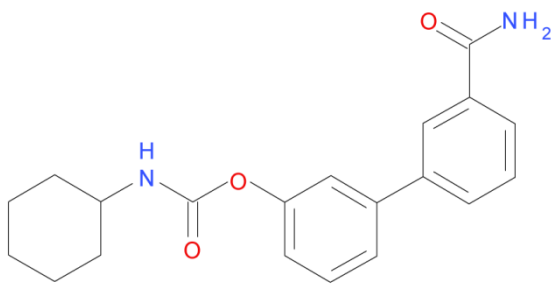


Abbildung 10: Strukturformel URB 597 (Symyx® Draw 3.2; in Anlehnung an Piomelli et al., 2006).

Die Summenformel des FAAH-Inhibitors URB 597 lautet: C₂₀H₂₂N₂O₃.

FAAH hydrolysiert das Endocannabinoid Anandamid (AEA) sowie die beiden Eicosanoide OEA und PEA in Ethanolamin und die entsprechende Fettsäure (Arachidonsäure, Ölsäure oder Palmitinsäure). Das andere Endocannabinoid, 2-AG, wird hingegen nicht von FAAH inaktiviert (vgl. 1.2.2.1). Die IC₅₀ (Konzentration die ausreicht um die FAAH-Aktivität zu 50 % zu inhibieren) liegt bei 4,6 ± 1,6 nM, die ID₅₀ (Dosis die benötigt wird um die FAAH-Aktivität um 50% zu reduzieren) beträgt nach systemischer Gabe (intra-peritoneal, i. p.) 0,15 mg/kg (Kathuria et al., 2003). Der maximale inhibitorische Effekt

von URB wird laut Literatur in wässrigem Lösungsmittel bereits 15 min nach i. p. Injektion erreicht und dauert bis zu 16 Stunden an (Fegley et al., 2005).

URB, wurde als Feststoff bezogen (Axxora Deutschland GmbH (Lörrach, Deutschland) und Enzo Life Science (Lörrach, Deutschland)). Die entsprechenden Lösungen wurden vor Beginn der Studien (vgl. 3.11.2 und 3.11.5) hergestellt.

3.2.1.3. Cannabidiol

Cannabidiol (CBD, IUPAC-Bezeichnung: 2-[(1R, 6R)-3-methyl-6-prop-1-en-2-ylcyclohex-2-en-1-yl]-5-pentylbenzene-1, 3-diol) ist einer der Hauptbestandteile in der Cannabispflanze (vgl. 1.1.1). CBD ist durch einen offenen Pyran-Ring gekennzeichnet und gehört somit chemisch gesehen nicht zu den klassischen (trizyklischen) Cannabinoiden (daher auch zum Teil als nicht-klassisches Cannabinoid bezeichnet). Im Gegensatz zum Cannabinoid Δ^9 -Tetrahydrocannabinol besitzt CBD nur eine geringe Affinität für die beiden Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂ (bei Ratten K_i CB₁: 2210,5 ± 558,08 nM (MW ± SE aus 6 Studien), K_i CB₂: 1000 nM (nur eine Studie, McPartland et al., 2007)). Dies ist vermutlich auf den geöffneten Pyran-Ring zurückzuführen (Howlett et al., 2002).

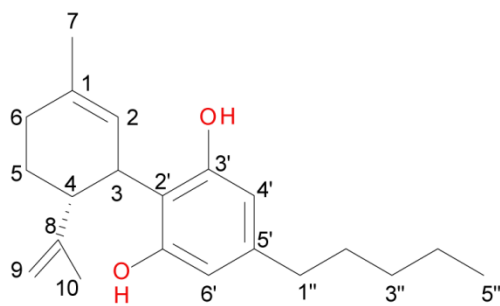


Abbildung 11: Strukturformel Cannabidiol (Symyx® Draw 3.2; modifiziert nach Jones et al., 1977).

Das Molekül Cannabidiol (CBD) weist folgende Summenformel auf: C₂₁H₃₀O₂.

Der bei den klassischen Cannabinoiden als B-Ring bezeichnete Pyranring liegt bei CBD in geöffneter Form vor. Das führt zu einer Reduktion der Bindungsfähigkeit an den CB₁ und CB₂-Rezeptor (Howlett et al., 2002).

Das CBD, das in der CBD-URB-Studie (vgl. 3.11.2) verwendet wurde, wurde bereits injektionsfertig bestellt (The Specials Laboratory (Northumberland, England)). Für die Lösungsmittelstudie (vgl. 3.11.5) wurde CBD als Feststoff (Pflanzenextrakt) gekauft (THC Pharm, Frankfurt am Main, Deutschland) und die benötigten Lösungen vor Beginn der Studie hergestellt.

3.2.1.4. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC, IUPAC-Bezeichnung: 6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydrobenzo[c]chromen-1-ol) ist ein ABC-trizyklisches Dibenzopyran-

Derivat und gehört somit zu den klassischen Cannabinoiden (Howlett et al., 2002). Δ^9 -THC ist ein partieller Agonist an beiden Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂, wobei die Affinität zu CB₁ etwas niedriger ist als zu CB₂ (bei Ratten K_i CB₁: 42,6 ± 5,01 nM (MW ± SE aus 18 Studien), K_i CB₂: 13,0 ± 7,70 nM (drei Studien; McPartland et al., 2007)).

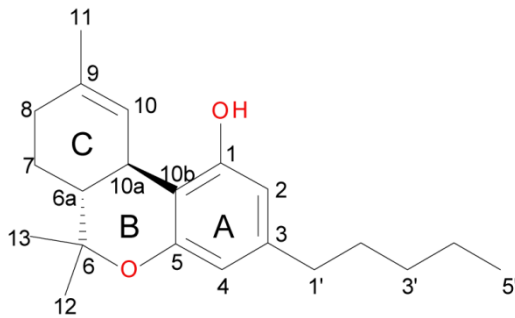


Abbildung 12: Strukturformel Δ^9 -Tetrahydrocannabinol.

Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) besitzt die gleiche Summenformel wie CBD: C₂₁H₃₀O₂. Im Gegensatz zu CBD liegt bei Δ^9 -THC aber der B-Ring in geschlossener Form vor. Somit handelt es sich bei Δ^9 -THC um ein klassisches Cannabinoid (Symyx® Draw 3.2; in Anlehnung an Howlett et al., 2002).

Alle benötigten Δ^9 -THC-Lösungen wurden von der Klinik-Apotheke (Universität zu Köln) hergestellt.

3.2.1.5. R-(+)-WIN 55,212

R-(+)-WIN 55,212-2 (WIN, IUPAC-Bezeichnung: (R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl) pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanon) ist ein synthetisch hergestellter voller CB₁- und CB₂-Rezeptor-Agonist. WIN gehört aber nicht zu den klassischen Cannabinoiden, sondern ist ein Aminoalkylindol.

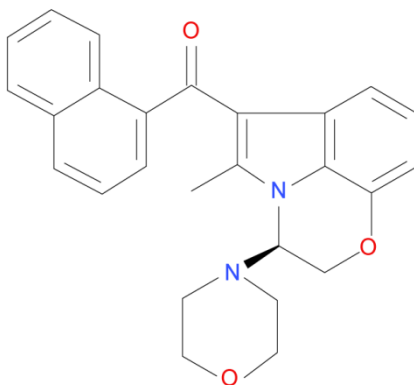


Abbildung 13 Strukturformel WIN 55,212-2

Bei WIN 55,212-2 (WIN) handelt es sich um ein Aminoalkylindol mit der Summenformel: C₂₇H₂₆N₂O₃. Obwohl die Struktur nicht an ein klassisches Cannabinoid erinnert, bindet es mit hoher Affinität an beide Cannabinoid-Rezeptoren (Symyx® Draw 3.2; in Anlehnung an Howlett et al., 2002).

Der mittlere K_i-Wert für CB₁ liegt bei 40,3 ± 46,92 nM und für CB₂ 5,0 ± 5,76 nM (jeweils MW ± STABW aus 5 Studien, anhand der Angaben in Howlett et al. (2002) berechnet. Allerdings fallen zwei der fünf CB₁-K_i-Werte mit 62,3 und 123 nM sehr hoch aus. Zudem wurde in einer aktuelleren Studie ein Wert von nur 7,3 nM gemessen (Mazzoni et al., 2010)).

WIN wurde von VWR International GmbH (Langenfeld, Deutschland) als Feststoff bezogen. Die benötigten Lösungen wurden vor Beginn der Lösungsmittelstudie (vgl. 3.11.5) hergestellt.

3.2.2. Lösungsmittel

Zu Beginn der Doktorarbeit wurde steriles Sesamöl (zunächst The Specials Laboratory (Northumberland, England, später Klinik-Apotheke der Universität zu Köln) als Lösungsmittel (Vehikel) festgelegt. Ein Grund war die verbesserte Vergleichbarkeit mit humanen Studien, da in einer ersten klinischen Studie (Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Universität zu Köln) Kapseln mit in Sesamöl gelöstem CBD verwendet wurden. Es wird eine Depot-Wirkung (langsamere kontinuierliche Freisetzung der Moleküle) erwartet, die als hilfreich eingestuft wurde. Zum anderen lassen sich die lipophilen Cannabinoide problemlos darin lösen.

Im Laufe der Arbeit wurden zusätzlich zwei verschiedene wässrige Lösungsmittel (Vehikel) verwendet (siehe Lösungsmittelstudie 3.11.5).

Vehikel 1 bestand aus 1 % Polysorbat 80 (Tween80, Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen, Deutschland)) in Saline (0,9 %ige Kochsalzlösung, B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)).

Vehikel 2 setzte sich aus Ethanol ($\geq 99,5$ %; Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)), Tween80 und Saline im Verhältnis von 1:1:18 zusammen.

Die Auswahl der beiden Lösungsmittel erfolgte zur besseren Vergleichbarkeit in Anlehnung an die Literatur. Einige Studien verwendeten Lösungsmittel mit 1 % Tween80 ohne Ethanol (Schneider & Koch, 2002; Bortolato et al., 2005; Egerton et al., 2005), während andere Lösungsmittel mit Ethanol, einem Lösungsvermittler wie Tween80/Cremophor/ Emulphor und Saline wählten (Lamarque et al., 2001; Sim-Selley & Martin, 2002; Rubino et al., 2007; Quinn et al., 2008).

Während alle Δ^9 -THC- sowie die CBD-Lösungen der CBD-URB-Studie bereits injektionsfertig bezogen wurden (vgl. 3.2.1.3 und 3.2.1.4), wurden alle anderen Lösungen selber hergestellt. Die Herstellung erfolgte immer nach einem ähnlichen Prinzip.

a) Ölige Lösungen: nach Zugabe des sterilen Sesamöls zu den entsprechenden Substanz-Mengen wurden die Lösungen wiederholt gevortext und ins temperierte Ultra-

schallbad gestellt, bis sich die Substanzen vollständig gelöst hatten. Das Aminoalkylin-dol WIN ließ sich nicht in Sesamöl lösen, so dass in der Lösungsmittelstudie unterschiedliche Wirkweisen des synthetischen Cannabinoids basierend auf unterschiedlichen Lösungsmitteln nicht überprüft werden konnten.

b) Wässrige Lösungen: Die Substanzen wurden entweder zunächst in 1 % Tween80 gelöst (Vehikel 1) oder in einem Teil Ethanol mit anschließender Zugabe der gleichen Menge Tween80 (Vehikel 2). Anschließend wurde bei beiden Ansätzen langsam unter Rühren die entsprechende Menge Saline hinzugegeben. Dann wurden auch diese Lösungen gevortext und ins temperierte Ultraschallbad gestellt. WIN löste sich in beiden wässrigen Lösungsmitteln vollständig, für Δ^9 -THC und CBD ließen sich mit beiden Lösungsmitteln Emulsionen herstellen, aber URB löste sich nur in Vehikel 2. Daher wurde im dritten Teil der Lösungsmittelstudie (vgl. 3.11.5) nur die Pharmakokinetik von CBD, Δ^9 -THC und URB in Sesamöl (Vehikel 3) und im wässrigen Vehikel 2 verglichen.

3.3. Anästhesie

Einige Versuche bzw. Versuchsteile mussten unter Narkose durchgeführt werden. Dazu zählen der Hörtest (vgl. 3.5), die Injektion des Radiopharmakons bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) sowie die PET- (vgl. 3.7) und MRT-Aufnahme (vgl. 3.6). Zudem war eine Narkose während der Präparation der *Arteria femoralis* (vgl. 3.8) erforderlich.

Die Anästhesie erfolgte jeweils nach dem gleichen Schema. Die Narkose wurde zunächst in einer Inhalationsnarkosebox mit einer hohen Isofluran-Konzentration eingeleitet (5 % Isofluran in 30 % O₂ und 70 % N₂O).

Im Falle der Radiopharmaka-Injektion wurde nun die Injektion durchgeführt, so dass das Tier etwa 1 min später wieder bei vollem Bewusstsein war.

Für die PET- und MRT-Messungen sowie die Hörtests und die Blutentnahme war hingegen eine längere Anästhesie erforderlich. Sobald das Tier ausreichend tief narkotisiert war (kein Lidschlussreflex mehr), wurde es auf einer speziellen Halterung fixiert und über eine Atemmaske weiterhin mit Narkosegasen versorgt. Dabei wurde die Isoflurankonzentration so reduziert, dass die Atemfrequenz etwa 55/min entsprach (1,5 – 2,5% Isofluran). Die Atemfrequenzmessung erfolgte bei den PET- und MRT-

Messungen über einen Atemsensor, der unter dem Thorax des Tieres platziert wurde. Bei den Hörtest-Messungen sowie der Blutentnahme konnte die Atemfrequenz nur visuell beobachtet werden. Während der längeren Narkosen wurde die Körpertemperatur der Tiere über eine rektale Temperatursonde gemessen und mithilfe eines automatisch regulierten Wärmebetts (PET- und MRT: Wasserbad; Hörtest und Blutentnahme: Heizkissen) konstant bei 37°C ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) gehalten. Des Weiteren wurde nach Einleitung der Narkose jeweils etwas Bepanthen (5 % Dexpanthenol, Bayer Vital®) auf die Augen aufgetragen, um ein Austrocknen der Augen während der Anästhesie zu verhindern.

3.4. Verhaltensversuche

Alle Versuche wurden ab 9:00 Uhr und somit während der Dunkelphase (aktive Phase, vgl. 3.1) durchgeführt.

Mit Ausnahme der Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion (PPI) fanden alle Verhaltensversuche in einer schallreduzierten, klimatisierten (22 °C) Kammer statt. Über eine Videokamera (Panasonic®) konnten die Versuche außerhalb der Kammer verfolgt und für die spätere Datenanalyse aufgezeichnet werden.

Für die digitalen Aufzeichnungen war eine minimale Beleuchtung mit Rotlicht (> 660 nm) mit einer Intensität von 3 Lux ausreichend. Ein in Zusammenarbeit mit der Firma medres® entwickeltes flexibles Beleuchtungssystem ermöglichte eine homogene Ausleuchtung aller verwendeten Arenen, durch die die Bildqualität maximiert und eventuelle Einflüsse des Lichtes auf das Verhalten der Tiere minimiert wurde.

Um für alle Tiere die gleichen Testbedingungen zu schaffen, wurden sämtliche Arenen sowie die PPI-Testapparatur zu Beginn des Versuchstages und nach jedem Durchgang mit Essigwasser gereinigt. Auf diese Weise wurden mögliche olfaktorische Marker entfernt.

Mit Ausnahme des Open Field-Versuches und der erhöhten Plusarena wurden alle im Folgenden beschriebenen Verhaltensversuche zu Beginn meiner Arbeit von mir im Institut etabliert.

3.4.1. Open Field

Der „Open Field“-Test wurde bereits erstmals 1934 beschrieben (Hall) und ist mittlerweile einer der weitverbreitetsten Verhaltensversuche (Prut & Belzung, 2003). Der Test erlaubt die Bestimmung der allgemeinen Lokomotion. Somit kann überprüft werden, ob die applizierten Substanzen eine sedierende oder stimulierende Wirkung haben, die die Ergebnisse anderer Verhaltenstests beeinflussen könnte. Da sich die Tiere bei ihren Erkundungsgängen im Open Field thigmotaktisch entlang der Wände fortbewegen und das Zentrum der Arena meiden, ermöglicht der Test prinzipiell auch eine Messung des Angstverhaltens. Eine Erhöhung der zentralen Lokomotion oder der Zeit, die die Tiere im zentralen Bereich der Arena verbringen, ohne Veränderung der gesamten Aktivität, lassen auf eine Anxiolyse schließen, während eine Abnahme dieser Variablen als eine Zunahme der Angst bewertet werden kann (Prut & Belzung, 2003). Des Weiteren wurde bei diesem Versuch ein „Homebase-Verhalten“ beschrieben (Eilam & Golani, 1989; Mertgens, 2008). Darunter versteht man das wiederholte, längere Aufsuchen eines oder mehrerer Orientierungspunkte innerhalb der Open Field (OF)-Arena, von denen aus neue Erkundungsgänge gestartet werden.

Für diesen Versuch wurde eine nach oben offene, runde PVC-Arena (\varnothing : 1,20 m, 0,58 m hohe Wand) verwendet. Die Tiere wurden immer an der gleichen Stelle (dem unteren Randbereich (Startpunkt), Abbildung 14) in die OF-Arena gesetzt und durften diese 10 min frei explorieren.

3.4.1.1. Auswertung Open Field

Zur Analyse wurde die Arena in eine äußere und innere Zone eingeteilt (Grenze: 0,21 m von der Wand entfernt, Abbildung 14 a). Die äußere Zone wurde dann zusätzlich in vier weitere, gleich große Zonen unterteilt: die untere, obere, linke und rechte Zone (Abbildung 14 b).

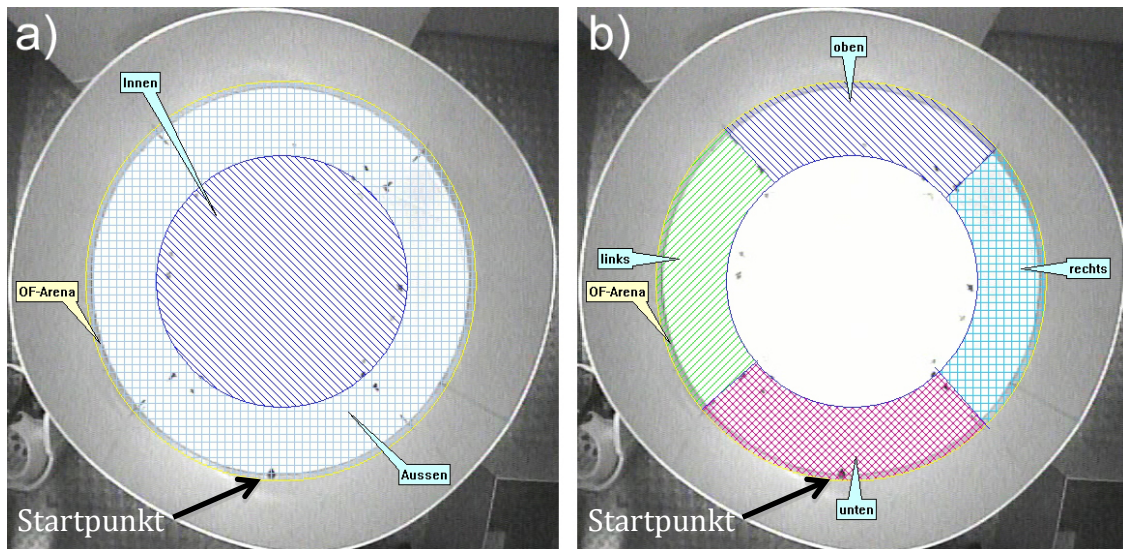


Abbildung 14: Zonen der „Open-Field“ (OF) –Arena.

Für die Datenauswertung wurde die OF-Arena einerseits in eine äußere (hellblau kariert) und eine innere Zone (blau quergestreift) unterteilt (a). Zudem wurde die äußere Zone weiter in eine obere (blau quergestreift), linke (grün quergestreift), rechte (hellblau kariert) und untere (rot kariert) Zone unterteilt (b). Die Tiere wurden zu Beginn jedes Versuches immer in die Mitte der unteren Zone (in Wandnähe) gesetzt (Startpunkt).

Die Auswertung der motorischen Aktivität erfolgte mithilfe des Programms Ethovision (Noldus®). Analysiert wurde die zurückgelegte Distanz (gesamte Arena, äußere und innere Zone) sowie die Zeit, die die Tiere prozentual in den verschiedenen äußeren Zonen verbrachten, die Fortbewegungsgeschwindigkeit und die Frequenz mit der sie die innere Zone betraten.

3.4.2. Objekterkennung

Das Arbeitsgedächtnis der Ratten kann anhand ihrer Fähigkeit, bekannte Objekte von unbekanntem Objekten zu unterscheiden, bewertet werden. Der Objekterkennungstest nutzt das spontane Explorationsverhalten der Tiere, die dazu neigen, unbekannte Objekte ausgiebiger zu untersuchen als bereits bekannte. Bei Präsentation eines unbekanntem und eines bekannten Objektes wird eine Präferenz für das neue Objekt als Objektwiedererkennung gewertet und folglich als intaktes Arbeitsgedächtnis interpretiert (Ennaceur & Delacour, 1988; Ennaceur et al., 1989; Ennaceur & Meliani, 1992; Ennaceur et al., 1997; Sutcliffe et al., 2007). Da der Objektwiedererkennungstest ebenfalls in der OF-Arena stattfand, wurde er stets im Anschluss an das Open field-Verhalten getestet, so dass sichergestellt wurde, dass die Tiere die Testumgebung kannten.

Der Versuchsaufbau wurde an die ursprüngliche Arbeit von Ennaceur und Delacour (1988) angelehnt und setzt sich aus zwei Durchgängen zusammen.

Im ersten Durchgang hatten die Tiere 3 min Zeit, um zwei identische Objekte (A1 und A2) zu explorieren. Daran schloss sich eine 15-minütige Pause an, die die Tiere in ihrem Heimkäfig verbrachten. In dieser Zeit wurde die Arena mit Essigwasser gesäubert. Im zweiten, ebenfalls 3-minütigen Durchgang, wurde den Ratten ein bereits bekanntes (A3) sowie ein neues Objekt (B) präsentiert. Um olfaktorische Einflüsse zu vermeiden, handelte es sich bei dem bekannten Objekt A3 um ein Duplikat der Objekte A1 und A2. In der Regel wurden zwei Objekttypen verwendet: eine Messingpyramide und ein Plexiglaszylinder mit drei „Armen“ (Abbildung 15).

Da die Etablierung dieses Versuches erst nach der CBD-URB-Studie abgeschlossen wurde, wurde in dieser Studie zusätzlich zu dem beschriebenen Objektpaar noch ein zweites randomisiert präsentiert: eine seitlich offene PVC-Röhre und ein lackierter Holzklötz mit seitlichen Vertiefungen (Abbildung 15).

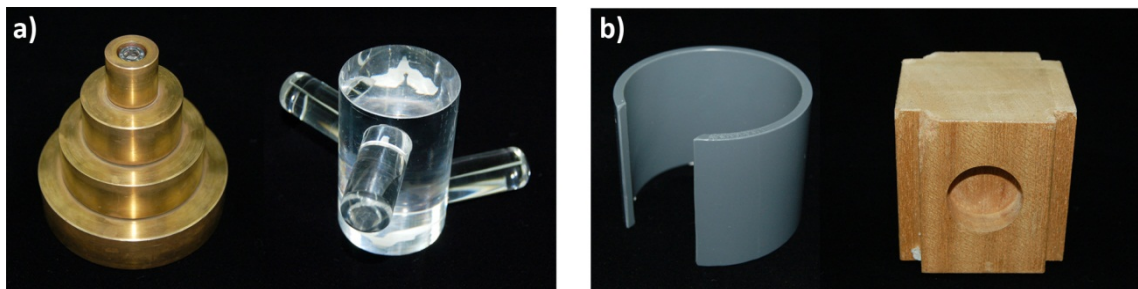


Abbildung 15: Objekte, die im Objekterkennungsversuch verwendet wurden.

Die in (a) abgebildeten Objekte (links: Messingpyramide, rechts: Plastikzylinder mit 3 „Armen“) wurden in allen Objekterkennungsversuchen präsentiert. In der chronischen CBD-URB-Studie wurden zusätzlich die beiden in (b) abgebildeten Objekte verwendet (links: seitlich offene PVC-Röhre, rechts: Holzklötz mit seitlichen Vertiefungen). Alle Objekte wurden in den jeweiligen Versuchen mit gleicher Häufigkeit als neues Objekt B präsentiert.

Die jeweiligen Objektpaare wurden immer in der linken und rechten Zone der OF-Arena an der Grenze zur inneren Zone platziert (Abbildung 16) und mit Patafix (Uhu®) am Boden fixiert, damit sie nicht verschoben oder umgeworfen werden konnten. Die Position des neuen Objektes (rechts oder links) sowie die Art (Messingpyramide oder Plexiglaszylinder bzw. Röhre oder Holzklötz) wurde jeweils ausbalanciert randomisiert.

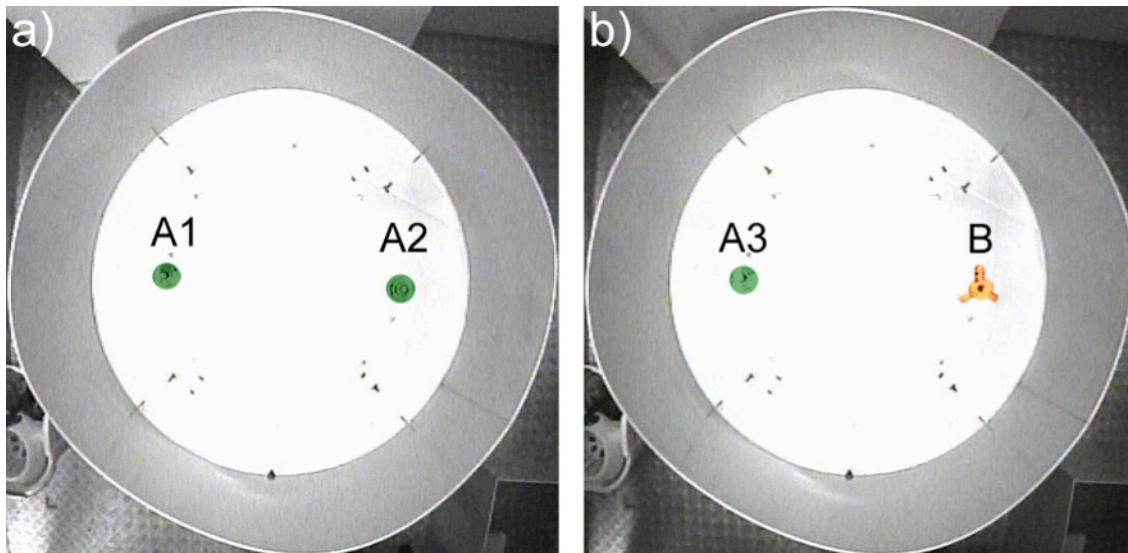


Abbildung 16: Beispielhafte Darstellung des Aufbaus der beiden Durchgänge des Objekterkennungstestes

Im ersten Durchgang (a) wurden zwei identische Objekte (A1, A2; in grün dargestellt) in der rechten und linken Hälfte der Arena (Abstand zur Wand jeweils: 0,21 m) platziert. Im zweiten Durchgang hingegen (b) wurde neben einem bekannten Objekt (A3; grün dargestellt) ein bisher unbekanntes Objekt B (orange dargestellt) präsentiert.

3.4.2.1. Auswertung Objekterkennung

Die Bestimmung der Explorationzeit der einzelnen Objekte erfolgte mit dem Programm Observer (Noldus®). Als Explorationsverhalten wurde Beschnüffeln, Nagen, Lecken und Berühren des Objektes mit Nase, Vibrissen und Pfoten gewertet. Auf einem Objekt sitzen oder stehen sowie lediglich dagegen lehnen, wurde hingegen nicht dazu gezählt. Um sicherzustellen, dass die Motivation der Tiere die Ergebnisse nicht beeinflusste, wurde die gesamte Explorationszeit im 1. Durchgang und 2. Durchgang verglichen. Des Weiteren wurde die Frequenz mit der die Tiere zwischen dem bekannten (A3) und unbekanntem (B) Objekt wechselten sowie die Latenzzeit bis zum ersten Betrachten eines der beiden Objekte analysiert.

Die Bewertung der Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses erfolgte anhand eines Diskriminierungsindex (d):

$$d = \frac{B-A3}{B+A3}$$

, also die Differenz der Explorationszeit des neuen und des bekannten Objektes (B-A3), dividiert durch die gesamte Explorationszeit im 2. Durchgang (B+A3). Werte über Null geben an, dass das neue Objekt ausgiebiger untersucht wurde als das alte und somit das Arbeitsgedächtnis intakt zu sein scheint. Allerdings mussten für die Berechnung des Diskriminierungsindex zwei Bedingungen erfüllt sein: 1) musste mindestens eines der Objekte im ersten

Durchgang untersucht (A1 oder A2) und 2) im zweiten Durchgang beide Objekte zumindest kurz betrachtet worden sein. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die Daten, die in der Berechnung berücksichtigt wurden, auch tatsächlich einen Rückschluss auf die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses erlaubten und nicht durch die zufällige erste Wahl der Tiere beeinflusst wurden.

3.4.3. Soziale Interaktion

Die OF-Arena wurde auch verwendet, um das Sozialverhalten fremder Ratten zu untersuchen. Der sog. „social interaction test“ wurde 1978 entwickelt (File & Hyde) und basiert darauf, dass Ratten in einer Umgebung, in denen keine der beiden ein Revier etabliert hat, selten aggressive aber verschiedene affiliative Verhaltensweisen zeigen. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung war den Tieren die Arena bereits bekannt, da sie bereits den Open Field- und Objekterkennungstest absolviert hatten. Somit sollte die Umgebung das Sozialverhalten nur geringfügig beeinflussen.

Um zu vermeiden, dass eine der getesteten Ratten eine deutlich dominantere Rolle einnehmen konnte, wurde zudem darauf geachtet, dass die getesteten Ratten etwa gleich alt und schwer waren. Außerdem wurden die beiden Ratten gleichzeitig, an gegenüberliegenden Seiten in die Arena gesetzt. Ein Durchgang dauerte 3 min. Um die Tiere in der anschließenden Auswertung mit dem Programm Observer (Noldus®) besser unterscheiden zu können, wurde der Rücken einer Ratte mit einem Stift (Edding®) geschwärzt.

3.4.3.1. Auswertung Sozialverhalten

Analysiert wurde non-anogenitales und anogenitales Sozialverhalten. Unter non-anogenitalem Verhalten wurde Nasenkontakt (Abbildung 17 a), gegenseitiges putzen und beschnüffeln am Kopf und Rumpf sowie Spielverhalten zusammengefasst. Als anogenitales Verhalten wurde das Schnüffeln am After des Interaktionspartners bewertet (Abbildung 17 b und c). Zusätzlich wurde das gesamte Sozialverhalten betrachtet. Dieses umfasste nicht nur die Summe des non- und anogenitalen Verhaltens, sondern auch die beiden Verhaltensweisen „folgen“ und „flüchten“. Darunter versteht man den Versuch, den Interaktionspartner zur anogenitalen oder non-anogenitalen Interaktion zu erreichen oder vor der Kontaktaufnahme zu flüchten.

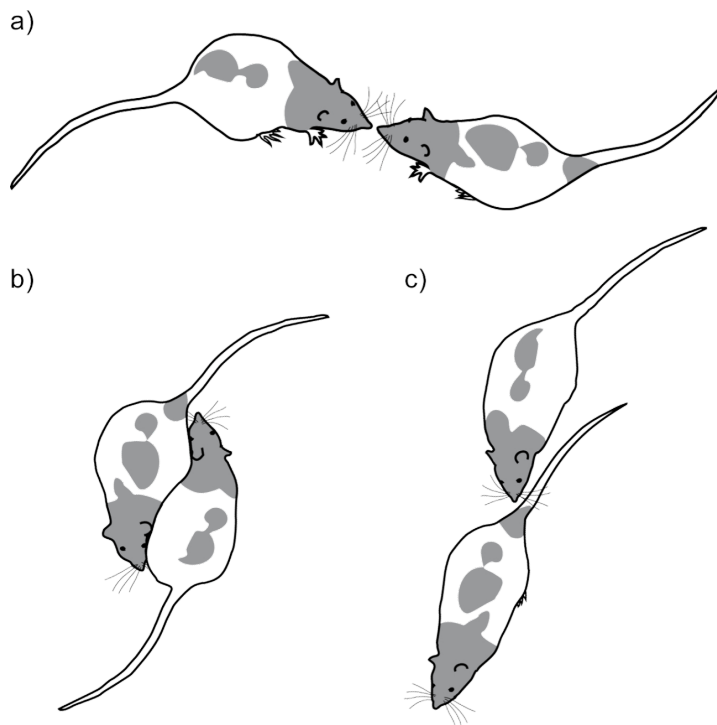


Abbildung 17: Schematische Darstellung verschiedener Verhaltensweisen bei sozialer Interaktion

Nasenkontakt ist ein Beispiel für non-anogenitales Sozialverhalten (a). Die Tiere berühren sich gegenseitig vorsichtig mit der Nase und schnüffeln. Anogenitales Verhalten kann sowohl gleichzeitig von beiden Interaktionspartnern (b), oder nur von einem der Tiere gezeigt werden (c).

3.4.4. Erhöhte Plusarena

Um die Neugier/Ängstlichkeit der Ratten zu ermitteln, wurde eine erhöhte Plusarena aus PVC verwendet, bei der vier Arme (0,50 x 0,12 m) plusförmig um eine erhöhte zentrale Plattform angeordnet (0,12 x 0,12 m, 0,50 m über dem Boden) waren (Abbildung 18 a). Zwei gegenüberliegende Arme hatten keine Umrandung (offene Arme), während die beiden anderen Arme an drei Seiten von Wänden (0,34 m, geschlossene Arme) umgeben waren. Zu Beginn des Versuches wurden die Tiere in das Zentrum gesetzt und konnten dann die Arena 10 min frei explorieren.

Diese Methode zur Analyse der Ängstlichkeit/Neugier wurde 1985 etabliert (Pellow et al., 1985). Es wurde gezeigt, dass sich Ratten bevorzugt auf den geschlossenen Armen aufhalten. Man geht davon aus, dass dieses Verhalten auf der natürlichen Aversion gegenüber offenen Gebieten basiert und diese u.a. auf die Abwesenheit von thigmotaktischen Reizen zurückzuführen ist (siehe auch Open Field; Rodgers & Dalvi, 1997). Der Test ermöglicht eine bidirektionale Analyse der Ängstlichkeit, wobei die Veränderung der Zeit auf den offenen Armen als Maß für eine veränderte Ängstlichkeit betrachtet wird (Pellow et al., 1985; Carobrez & Bertoglio, 2005).

3.4.4.1. Auswertung erhöhte Plusarena

Die Auswertung wurde mit Ethovision (Noldus®) durchgeführt. Die Arena wurde in drei verschiedene Zonen aufgeteilt: Zentrum, offene und geschlossene Arme (Abbildung 18 b).

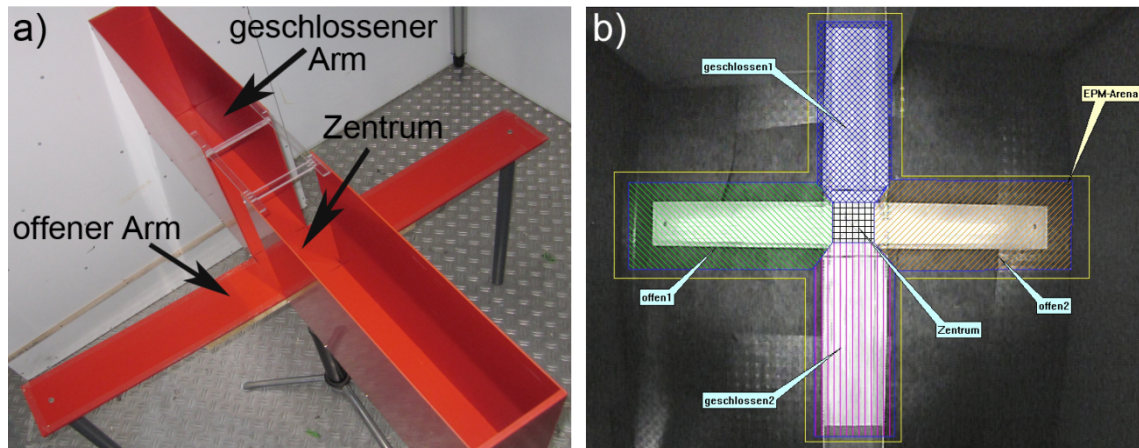


Abbildung 18: Erhöhte Plusarena

In (a) ist ein Foto der verwendeten Arena zu sehen. Jeweils zwei gegenüberliegende offene und geschlossene Arme sind über eine erhöhte zentrale Plattform (Zentrum) plusförmig mit einander verbunden.

Für die Auswertung wurde zunächst für jeden Arm sowie das Zentrum (schwarz kariert) eine Zone erstellt (b). Die Daten der beiden offenen (offen1 (grün gestreift) und 2 (orange gestreift)) sowie der beiden geschlossenen Zonen (geschlossen1 (blau kariert) und 2 (pink gestreift)) wurden schließlich zusammengefasst ausgewertet.

Analysiert wurde neben der prozentualen Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen die Frequenz des Armwechsels, die der Frequenz, mit der das Zentrum überquert wurde, entspricht.

3.4.5. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die Schreckreaktion ist eine schnelle protektive Verhaltensreaktion, welche durch unerwartete, starke sensorische Reize ausgelöst wird. Bei der Ratte äußert sich die Schreckreaktion als plötzliche Ganzkörperbewegung ("Startle"), die in etwa mit dem Moro-Reflex beim Menschen vergleichbar ist. Unter Präpulsinhibition (PPI) versteht man hingegen die Reduktion der Schreckreaktion, wenn etwa 20-800 ms vor dem Schreckreiz (Hoffman & Ison, 1980) ein schwächerer Präpuls dargeboten wird, der selbst keine Schreckreaktion hervorruft. Man geht davon aus, dass die PPI einen Schutzmechanismus widerspiegelt, der eine Störung der Verarbeitung des Präpulses durch den Schreckreiz verhindert (Graham, 1975; Koch, 1999). Daher kann die PPI als

Maß für die sensomotorische Hemmung (Fähigkeit eines schwachen Stimulus, die motorische Reflexantwort auf einen starken Stimulus zu modulieren) verwendet werden.

Die akustische Schreckreaktion (ASR) sowie die PPI der ASR, wurden in einer belüfteten, schallreduzierten Kammer, dem sogenannten SR-LAB (San Diego Instruments®, San Diego, USA) ermittelt. Während der Versuche wurden die Tiere in einen Plexiglaszylinder (\varnothing : 9 cm) gesetzt (Abbildung 19), der auf einer kleinen Plattform montiert war.



Abbildung 19: SR-LAB

Die Ratte befindet sich während der Testung in einem Plexiglaszylinder, der vorne und hinten mit einem Türchen verschlossen ist. Das Piezoelement (in der Abbildung nicht erkennbar) ist unter der weißen Plattform, auf der der Zylinder befestigt ist, angebracht.

Der unter der Plattform angebrachte bewegungsempfindliche Sensor (Piezoelement), detektierte die motorische Ganzkörperreaktion auf einen akustischen Reiz. Die dabei erzeugte elektrische Spannung wurde verstärkt, digitalisiert und auf einem Computer aufgezeichnet.

Die akustischen Stimuli (weißes Rauschen: 2,2- ca. 16,8 kHz, Abbildung 20) wurden über einen Lautsprecher präsentiert, der sich mittig über dem Plexiglaszylinder befand.

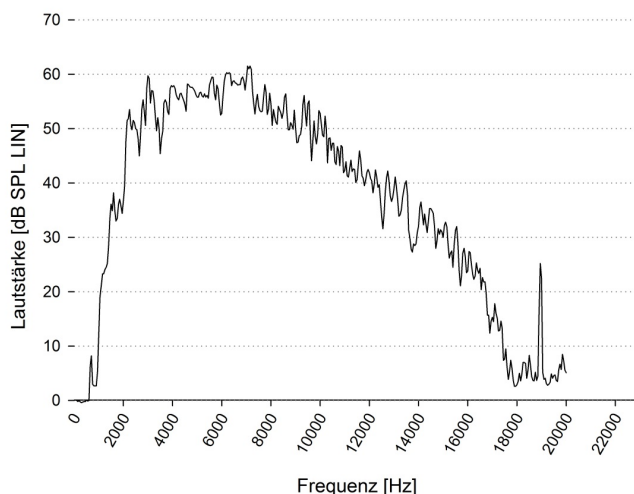


Abbildung 20: Frequenzspektrum des vom SR-LAB erzeugten weißen Rauschens

Das weiße Rauschen umfasste Frequenzen von 2,2- 10,3 kHz in etwa gleicher Lautstärke sowie in abgeschwächter Lautstärke Frequenzen bis 16,8 kHz. Des Weiteren wurde ein Peak bei 19 kHz gemessen, laut SDI® die Leistungsgrenze des Lautsprechers. Die Frequenzanalyse wurde mit Hilfe eines Schallpegelmessgerätes mit FFT (schnelle Fourier-Transformation)-Analysekarte (NL-32 mit NX-22FT, Rion® Co., LTD, Japan)

durchgeführt. Das Frequenzspektrum entspricht der Differenz der Messwerte eines Dauersignals (Lautstärke: 78 dB SPL LIN) und den Werten einer Leermessung, in der nur das Umgebungsrauschen gemessen wurde. Bei den beiden 60 s langen Messungen wurden folgende Einstellung verwendet: Kalkulationsmodus der FFT-Analyse: Mittelwert aller Datenübertragungsblöcke (LIN), Fensterfunktion bei FFT: Hanning-Fenster, unbewertete, lineare Frequenzgewichtung (FLAT), langsame Zeitbewertung (slow), Lautstärkebereich bis 80 bzw. 100 dB (Leer- bzw. Dauersignalmessung) sowie eine Frequenzspanne bis 20 kHz.

Im Laufe der Doktorarbeit wurde das PPI-Paradigma einmal verändert, um es besser an die Anforderungen der Verhaltens-PET-Messungen anzupassen. Der Ablauf der Testung sowie die Lautstärken wurden dabei beibehalten, aber die Habituationsphase wurde verkürzt (von 5 auf 1 min) und die Anzahl der Stimuli erhöht (von 20 auf 30 pro Stimulustyp). In der ersten Version (verwendet in der chronischen CBD-URB-Studie sowie der pubertären Δ^9 -THC-Studie) dauerte ein Durchgang 38, in der zweiten Version 45 min (verwendet in der PPI-PET-Studie und allen akuten Studien).

Während des gesamten Versuches betrug die Lautstärke des Hintergrundrauschens 65 dB SPL LIN. Alle Stimuli waren 25 ms lang. Das Interstimulusintervall wurde randomisiert und lag zwischen 1 s und 13 s. Nach einer kurzen Habituationsphase, bestehend aus 5 min bzw. 1 min Hintergrundrauschen (siehe oben) gefolgt von 25 Schreckreizen (110 dB SPL LIN), startete dann das eigentliche Testprogramm.

Das Programm umfasste 200 bzw. 300 Stimuli (siehe oben), die in einer pseudorandomisierten Reihenfolge präsentiert wurden. Die verwendeten Stimuli setzten sich wie folgt zusammen: (a) 20 bzw. 30 Kontrollstimuli (nur Hintergrundrauschen), (b) 20 bzw. 30 Schreckreize (110 dB SPL LIN), (c) 80 bzw. 120 Präpulsstimuli (20 bzw. 30 für jede Lautstärke: 68, 72, 78 oder 84 dB SPL LIN) und (d) 80 bzw. 120 Präpulse gefolgt von einem Schreckreiz (20 bzw. 30 Stimuli pro Präpuls Lautstärke). Das Intervall zwischen Präpuls und Schreckreiz betrug jeweils 100 ms.

Im Anschluss folgten erneut 20 Schreckreize.

Die Lautstärke sämtlicher verwendeter Stimuli wurde mittels Schallpegelmessers (zunächst Model 2700, Quest Technologies®, dann NL-32, Rion® Co., LTD, Japan) überprüft und justiert.

Das SR-LAB wurde zu Beginn jedes Testtages mit einer sog. Standardisierungs-Einheit (San Diego Instruments®, San Diego, USA) kalibriert. Dieses Gerät wurde auf dem Plexiglaszylinder befestigt und erzeugte kontinuierlich definierte mechanische Pulse. Die Verstärkung wurde so eingestellt, dass die durch die Standardisierungs-Einheit erzeugte elektrische Spannungsamplitude im Mittel 300 mV betrug. Die Einstellung war allerdings nicht hundertprozentig genau, so dass die Basis-Spannungsamplituden verschiedener Messtage um einige mV abwichen (Korrekturfaktor siehe unten).

3.4.5.1. Auswertung der PPI der ASR

Die Datenaufnahme erfolgte mit einer Abtastrate von 1000 Hz. Insgesamt wurden 200 ms nach Präsentation eines Stimulus aufgenommen. In Anlehnung an die Literatur (Geyer & Swerdlow, 1998) wurde für jeden Stimulus die mittlere Reaktionsamplitude berechnet. Dabei wurden die Daten von 5-100 ms nach Stimuluspräsentation (also insgesamt 95 ms) mithilfe der SR-LAB-Software gemittelt. Neben dieser mittleren Amplitude ermittelte das Programm die Basisamplitude in den ersten 5 ms nach Stimuluspräsentation. Da die Schreckreaktion im Mittel eine Latenz von etwa 13 ms aufweist (vgl. 4.2) bildet diese Basisamplitude den Aktivitätszustand der Ratte unmittelbar vor der Schreckreaktion ab. Dreht sich die Ratte gerade um, ist die gemessene Amplitude größer, als wenn sie einfach nur im Plexiglaszylinder sitzt. Um den Grundzustand der Ratte zu berücksichtigen, wurde die Basisamplitude zur Korrektur von der mittleren Amplitude subtrahiert.

Für jede der vier Präpuls lautstärken erfolgte die Berechnung der prozentualen PPI nach folgender Formel:

$$PPI = \frac{\text{Amplitude nach Schreckreiz} - \text{Amplitude nach Präpuls + Schreckreiz}}{\text{Amplitude nach Schreckreiz}} \times 100$$

Des Weiteren wurde die Amplitude der reinen Schreckreaktion gesondert betrachtet. Für diese Analyse wurden die Schreckreize während des eigentlichen Testprogrammes verwendet. Da es sich bei der Amplitude um einen absoluten Wert handelt (im Gegensatz zu den relativen PPI-Daten), wurde zwecks besserer Vergleichbarkeit eine Normalisierung durchgeführt, die die kalibrierungsbedingt leicht unterschiedlichen Basis-Spannungsamplituden berücksichtigte. Durch Multiplikation aller Schreckreizamplituden mit einem Korrekturfaktor wurden alle Werte an die mittlere Basis-Spannung einer Studie angepasst.

Für die PPI-PET-Studie wurde zusätzlich die tatsächliche Anzahl der Schreckreaktionen (bei reinen Schreckreizen mittlere Amplitude > 30 mV und bei Präpuls + Schreckreiz PPI < 15 %) und der PPI-Ereignisse (PPI > 15 %, da angemessene PPI-Level zwischen 20 und 80 % liegen; Geyer & Swerdlow, 1998) während des PPI-Paradigmas ermittelt. Daraus wurde das prozentuale Verhältnis von PPI-Ereignissen und Schreckreaktionen berechnet:

$$\frac{[\text{Anzahl}_{PPI} - \text{Anzahl}_{Schreck}]}{[\text{Anzahl}_{PPI} + \text{Anzahl}_{Schreck}]} \times 100$$

Negative Werte zeigen an, dass prozentual mehr Schreckreaktionen auftraten, während bei positiven Werten die PPI-Ereignisse überwogen.

3.5. Hörtest

Die Hörfähigkeit der Ratten ist für die PPI (vgl. 3.4.5) von entscheidender Bedeutung, da dieses Paradigma auf der Präsentation von akustischen Stimuli basiert. Allerdings wurde der Hörtest erst im Laufe der vorliegenden Arbeit etabliert, so dass er nicht in allen Studien eingesetzt werden konnte (vgl. 3.11).

Die Hörfähigkeit von Ratten lässt sich mittels früher akustisch evozierter Potentiale (FAEPs) ermitteln, die als Komponenten des EEGs an der Schädeloberfläche abgeleitet werden können. Die FAEPs der Ratte bestehen in der Regel aus vier Komponenten (Wellen), die aus der Aktivierung des VIII en Hirnnervs (auditorischer Nerv) und auditorischer Kerne des Hirnstamms sowie des Mesencephalon resultieren (Shaw, 1988).

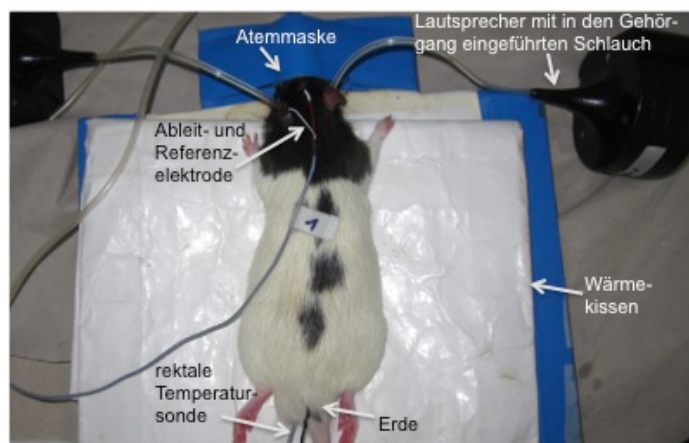
Die Messungen erfolgten am anästhesierten Tier (vgl. 3.3) in einer schallreduzierten Kammer, umgeben von einem Faraday-Käfig. Für die Differenzableitung der FAEPs wurden zum einen zwei Platin-Nadelelektroden subkutan auf dem Schädel der Ratte platziert. Dabei wurde die Ableitelektrode über das linke oder rechte Mastoid, die Referenzelektrode über dem Vertex gesteckt. Als Erde wurde eine weitere Nadelelektrode subkutan auf dem Rücken des Tieres oberhalb der Schwanzwurzel platziert. Die Präsentation der akustischen Stimuli erfolgte über „closed-field“-Lautsprecher (Model CF1, Tucker Davis Technology®, (TDT), Alachua, USA), auf die kleine Plastikschläuche aufgesteckt und in den äußeren Gehörgang der Ratten eingeführt wurden.

Abbildung 21: Versuchsaufbau des Hörtests

Die Messungen wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt, bei der die Narkosegase über eine Atemmaske zugeführt wurden.

Über dünne Plastikschläuche, die in den äußeren Gehörgang der Ratte eingeführt wurden und mit den Lautsprechern verbunden waren, wurden die akustischen Stimuli präsentiert.

Für die FAEP-Ableitung wurde eine Ableit- und eine Referenzelektrode auf dem Schädel sowie eine Elektrode als Erde oberhalb der Schwanzwurzel platziert.



Als akustische Stimuli wurden Klick-Signale (1-20 kHz, 500 ms) verwendet. Mit diesem breiten Frequenzband, in dem alle Frequenzen im Mittel mit der gleichen Amplitude präsentiert werden, können viele auditorische Neurone gleichzeitig stimuliert werden. Die Präsentation der Klicks erfolgte (kontrolliert über einen Trigger) mit einer Stimulationsrate von 4 Hz.

Zur Ermittlung der Hörschwelle wurde die Lautstärke der Stimuli ausgehend von 100 dB pSPL in jedem Durchgang um 10 dB pSPL verringert (geringste Lautstärke 10 dB pSPL), bis keine FAEPs mehr ausgelöst wurden. Während der Hörtestung wurde jeweils das kontralaterale Ohr mit kontinuierlichem weißen Rauschen (30 dB pSPL unterhalb der Klick-Lautstärke) vertäubt.

Alle Stimuli wurden unter Verwendung des Programms SigGen32 (TDT) generiert, über ein Glasfaserkabel vom Stimulus-Computer zum RX6-Prozessor (TDT) übermittelt und schließlich über einen Verstärker (SA1 Stereo Power Amp, TDT) an die „closed-field“-Lautsprecher (Model CF1, TDT) weitergeleitet.

Die Trigger wurden ebenfalls über SigGen32 (TDT) generiert und an den RX6-Prozessor (TDT) geleitet. Anschließend wurden sie über ein Patchpanel (PP24, TDT) und einem A/D-Wandler an die PCI-6143-Karte des Datenerfassungscomputers übermittelt.

Auch die EEG-Daten wurden über den A/D-Wandler und die PCI-6143-Karte auf den Datenerfassungscomputer übertragen. Vor der Digitalisierung wurden die Daten jedoch 1000fach verstärkt und Frequenzen über 3 kHz mittels analogen Tiefpassfilters entfernt. Die weitere Steuerung der EEG-Datenauswertung erfolgte dann über ein spezielles Dasy Lab Programm (National Instruments®, Austin, USA). Nach erneuter 1000facher Verstärkung und digitaler Hochpassfilterung (100 Hz) wurden die EEG-Potentiale über etwa 1000 Trigger (abhängig von der Qualität der Ableitung) pro getestete Lautstärke gemittelt.

3.5.1. Auswertung des Hörtests

Wie beschrieben wurde die Klicklautstärke in 10er Schritten reduziert, bis keine FAEPs mehr ausgelöst werden konnten. Der Mittelwert zwischen der Lautstärke, bei der kein evoziertes Potential mehr im EEG zu beobachten war, und der Lautstärke, bei der das letzte Potential detektiert werden konnte, wurde als Hörschwelle bezeichnet. Das heißt, wenn beispielsweise bei einer Klick-Lautstärke von 30 dB pSPL im EEG noch ein

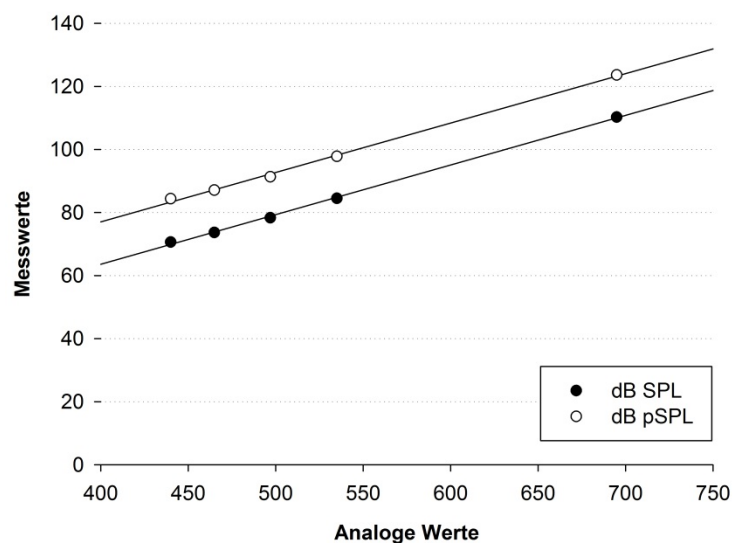
Potential erkennbar war, bei 20 dB pSPL hingegen nicht mehr, dann betrug die Hörschwelle 25 dB pSPL.

Die Lautstärke sehr kurzer Stimuli, wie sie im Hörtest verwendet wurden, muss in der Einheit dB pSPL gemessen werden. Dahingegen wurden bei der Lautstärkekalibrierung der Stimuli des PPI-Paradigmas längere Stimuli verwendet, deren Lautstärke wiederum in dB SPL gemessen werden muss (Burkard, 1984; Burkard, 2006). Daher lässt sich nicht ohne weiteres feststellen, ob auch die leisen Präpulse im PPI-Paradigma oberhalb der Hörschwelle liegen. Um die Präpuls lautstärke dennoch mit der Hörschwelle in Relation setzen zu können, wurden zwei Kalibriergeraden für die Präpuls lautstärken aufgenommen (pro Einheit eine, Abbildung 22). Anschließend wurde berechnet, ob sich die Steigung der beiden abhängigen Geraden signifikant unterscheidet oder nicht. Da dies nicht der Fall war (Steigung db pSPL = 0,152; Steigung db SPL = 0,152; $t=0,54$; $p=0,630$) wurde ein Korrekturfaktor berechnet (= 0,8509) und die Hörtestergebnisse in dB SPL LIN konvertiert.

**Abbildung 22:
Kalibriergeraden der Stimuli
des PPI-Paradigmas**

Über die SR-LAB Software konnten die im PPI-Paradigma verwendeten Stimuli als Dauergeräusche abgespielt werden. Die analogen Werte entsprechen den Einstellungen im SR-LAB-Programm. Die Lautstärke der langen Stimuli muss normalerweise in dB SPL gemessen werden (schwarz ausgefüllte Kreise). Diese Ergebnisse wurden daher auch der Ermittlung der Stimuluslautstärke zugrunde gelegt. Die Lautstärke kurzer Stimuli, wie sie beim Hörtest verwendet wurden, muss hingegen in dB pSPL angegeben werden.

Um die Hörschwellen in Relation zu den Stimuli-Lautstärken setzen zu können, wurde eine zweite Kalibriergerade aufgenommen, bei der die Lautstärke der langen Stimuli in dB pSPL gemessen wurde (unausgefüllte Kreise). Da sich die Steigung der beiden Kalibriergeraden nicht unterschied, wurde anhand dessen ein Korrekturfaktor berechnet und die Ergebnisse der Hörschwelle in dB SPL konvertiert.



3.6. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren, mit dem anatomische Strukturen dargestellt werden können. Mit Hilfe von MRT-Bildern kann zum

einen kontrolliert werden, ob das Gehirn eines Versuchstieres Anomalien aufweist und es somit aus der Studie ausgeschlossen werden muss. Zum anderen erleichtern die MRT-Bilder der Rattengehirne aufgrund der höheren räumlichen Auflösung die Auswertung der PET-Daten (vgl. 3.7.1.1).

MRT-Messungen wurden bei allen Versuchstieren durchgeführt, die auch im PET gemessen wurden. Die Aufnahmen wurden am 4,7-T BioSpec-Systems (Bruker BioSpin®) angefertigt. Dabei wurde eine Quadratur-Sender/Empfänger-„birdcage“-Spule (Rapid Biomedical®) mit einem Innendurchmesser von 38 mm eingesetzt. Bei allen Aufnahmen wurde eine T2-gewichtete RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement)-Sequenz verwendet, so dass sehr protonenreiche Bereiche wie die mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) gefüllten Ventrikel sehr hell erschienen.

Für die MRT-Messungen wurden die Tiere wie beschrieben anästhesiert (vgl. 3.3) auf einer speziellen Tierhalterung (medres®, Köln) fixiert und anschließend im MRT-System positioniert. Die Messungen dauerten in etwa 5 ½ min.

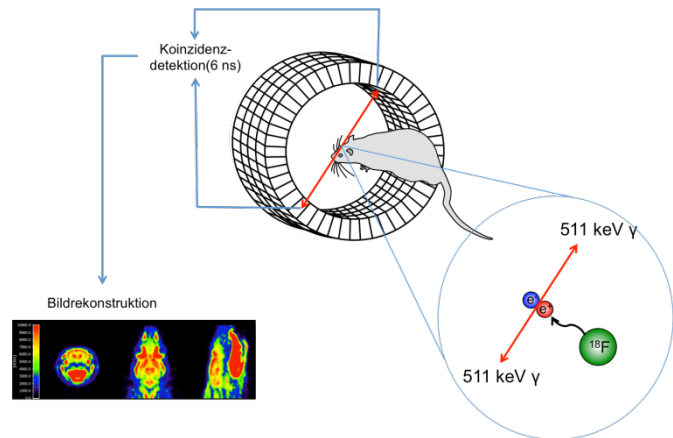
3.7. Positronen-Emissions-Tomographie

Eine mögliche Methode zur funktionellen Bildgebung ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET), bei der Radiopharmaka eingesetzt werden, um physiologische Prozesse zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurde die zerebrale Glukoseutilisation mit Hilfe des Radiopharmakons 2-[¹⁸F] fluor-2-deoxyglukose (¹⁸FDG, vgl. 3.2.1.1) untersucht. Beim radioaktiven Zerfall des [¹⁸F] werden Positronen freigesetzt (β^+ -Zerfall). Jedes Positron bewegt sich zunächst durch das Gewebe (0,25 mm bei von Fluor emittierten Positronen, Cherry, 2001) und verliert dabei durch Interaktionen mit umliegenden Atomen kinetische Energie. Wenn die Energie gering genug ist und das Positron mit einem Elektron zusammen stößt, kommt es zur sog. Annihilation. Dabei werden zwei hochenergetische Photonen (γ -Strahlen) in einem Winkel von 180° emittiert. Diese Photonen können von ringförmig angeordneten Detektorblöcken des PET-Scanners detektiert werden. Treffen zwei Photonen innerhalb von 6 ns auf zwei gegenüberliegende Detektoren, werden diese beiden Photonen als koinzident bewertet und einem Zerfallsereignis zugeordnet. Jede gemessene Koinzidenz wird von dem System als sog. „line of response“ gespeichert. Aus diesen Informationen werden dann

Bilder rekonstruiert, die die Verteilung der Positron-emittierenden Substanz wieder- spiegeln. Das PET-Prinzip ist in Abbildung 23 graphisch zusammengefasst dargestellt.

Abbildung 23: Schematische Darstellung des PET-Prinzips.

Das radioaktiv markierte Fluor (^{18}F) des ^{18}F FDG emittiert beim Zerfall ein Positron (e^+). Dieses bewegt sich durch das Gewebe und kollidiert schließlich mit einem Elektron (e^-). Der Zusammenstoß resultiert in der Annihilation, bei der zwei γ -Strahlen (Photonen) mit einer Energie von 511 keV entstehen, die in einem Winkel von 180° ausgesendet werden. Treffen diese in einem Zeitfenster von 6 ns auf gegenüberliegende Detektoren, werden sie einem Zerfallsereignis zugeschrieben und als Koinzidenz gespeichert. Aus einer Vielzahl an Koinzidenzen werden schließlich Bilder rekonstruiert, die die Verteilung des ^{18}F FDG darstellen. (Die Graphik wurde freundlicherweise von Heike Endepols zur Verfügung gestellt.)



In der vorliegenden Arbeit wurde die zerebrale Glukoseutilisation während eines Verhaltensversuchs analysiert. Als Verhaltensversuch wurde die akustische Schreckreaktion und Präpulsinhibition (PPI) ausgewählt (PPI-Verhaltens-PET).

Im Folgenden wird die generelle Vorgehensweise beim PPI-Verhaltens-PET beschrieben. Details der grundlegenden PPI-PET-Studie sowie Besonderheiten der pubertären Δ^9 -THC-Studie werden unter dem Punkt Studien genauer erläutert (vgl. 3.11.1, 3.11.3).

3.7.1. PPI-Verhaltens-PET

Um den Glukoseverbrauch im Gehirn eines wachen, sich verhaltenden Tieres untersuchen zu können, wurde zunächst das Radiopharmakon ^{18}F FDG i. p. verabreicht. Die Aktivität (Anzahl radioaktiver Zerfälle pro Zeiteinheit) betrug zwischen 2,01 und 2,22 mCi in 500-700 μl (Natriumphosphat-Puffer, je nach Bedarf bis zu einem Verhältnis von 1:10 mit 0,9 % iger Saline verdünnt). Die Injektion erfolgte unter einer kurzen Narkose (vgl. 3.3), von der sich die Tiere innerhalb weniger Minuten erholten.

Im Anschluss an die Injektion wurden die Tiere ins SR-LAB (vgl. 3.4.5) gesetzt und ein Testprogramm gestartet (genauer Ablauf vgl. 3.11.1 und 3.11.3). Nach der 45 minütigen Verhaltenstestung wurden die Tiere anästhesiert, auf einem speziellen Tierhalter (medres®, Köln) fixiert (vgl. 3.3) und im PET-Scanner (Focus 220, CTI-

Siemens®, Auflösung im Zentrum: 1,4 mm) platziert. Die PET-Messung wurde exakt eine Stunde nach FDG-Injektion gestartet und dauerte 30 min.

Der Ablauf des PPI-Verhaltens-PET ist in Abbildung 24 zusammenfassend dargestellt.

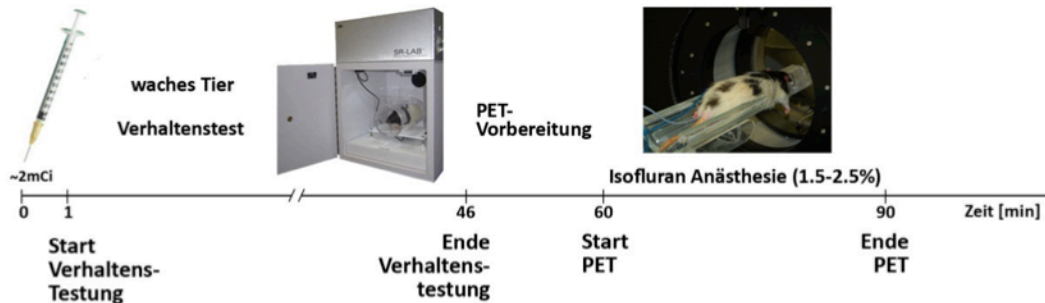


Abbildung 24: Zeitlicher Ablauf der Verhaltens-PET-Messung.

Nach i. p. Injektion von ^{18}F FDG (etwa 2 mCi, unter kurzer Isofluran-Narkose) folgte das Verhaltensparadigma. Dies konnte in Abhängigkeit von der Studie ein Kontrollprogramm (nur 65 dB SPL Hintergrundrauschen) oder eine Testbedingung (PPI-Paradigma) sein. Beide Programme waren 45 min lang. Im Anschluss wurde das Tier herausgenommen, narkotisiert und für die PET-Messung vorbereitet. Exakt 60 min nach ^{18}F FDG-Injektion startete die Messung für 30 min.

3.7.1.1. Auswertung der PPI-Verhaltens-PET-Daten

Die PET-Bilder wurden von der Arbeitsgruppe Medizinische Physik des MPIs nach der sog. OSEM3D/MAP-Methode (Qi et al., 1998) rekonstruiert (Voxelgröße: 0,38 x 0,38 x 0,82 mm). Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms VINCI (Vollmar et al., 2007).

Ein Rattengehirnatlas (Swanson, 1998) diente bei der Auswertung zunächst als Basis. Dann wurde ein Referenzgehirn (11,7 T-MRT-Bild einer adulten Black hooded-Ratte) so ausgerichtet, dass es so gut wie möglich auf den Rattenatlas passte. Anschließend wurden die 4,7 T-MRT-Bilder der Tiere ebenfalls koregistriert, d.h. identisch positioniert, und dienten als individuelle Vorlagen für die Koregistrierung der PET-Bilder.

Nach der Koregistrierung wurde die Intensität der PET-Bilder auf den *Bulbus olfactorius* normalisiert. Dieser wurde als Referenzgebiet gewählt, da angenommen werden konnte, dass seine Aktivität unter allen Bedingungen in etwa identisch war. Alle Tiere rochen während der Verhaltenstestung (Kontroll- und Testbedingung) das Gleiche: verdünnte Essigsäure, mit der der Plexiglaszylinder nach jedem Durchlauf gereinigt wurde. In Anlehnung an die Quotienten-Normalisierungstechnik (Arndt et al., 1996) wurde jedes PET-Bild durch die Aktivität der Bulbus-VOI (volume of interest) dividiert. Da die

Form/Größe der Black und Lister hooded-Gehirne etwas von der des Rattenatlas-Gehirns abwich, wurde die VOI entlang der anatomischen Grenzen des Bulbus des Referenzgehirns gezeichnet.

Bei der weiteren Datenauswertung müssen zwei verschiedene Auswertungsverfahren unterschieden werden: 1) die VOI-Analyse und 2) die Erstellung von sog. t-Wert-Karten (t-maps). Im Folgenden wird die allgemeine Vorgehensweise beschrieben, während Auswertungsdetails im Kapitel Studien für die entsprechenden Studien genauer erläutert werden (vgl. 3.11.1, 3.11.3).

Für die VOI-Analyse (1) wurden zunächst für das PPI-Paradigma relevante VOIs entlang der anatomischen Grenzen der entsprechenden Areale im Referenzgehirn gezeichnet. Anschließend wurde die Aktivität in diesen Arealen zwischen Test- und Kontrollbedingung verglichen. Alle VOIs, die eine Aktivitätsdifferenz von über 5 % aufwiesen, wurden in die statistische Analyse aufgenommen (vgl. 3.10). Der Vorteil der VOI-Analyse liegt darin, dass die Ergebnisse mit Verhaltensdaten korreliert werden können. Beim PPI-Paradigma bietet sich dafür das prozentuale Verhältnis von PPI-Ereignissen und Schreckreaktionen an (vgl. 3.4.5.1).

Bei der Erstellung von t-Wert-Karten (2) werden hingegen einzelne Voxel hinsichtlich ihrer Aktivität in Test- und Kontrollbedingung miteinander verglichen. Grundlage für die Berechnung von t-Wert-Karten ist eine optimale Koregistrierung der PET-Bilder. Auf diese Weise kann davon ausgegangen werden, dass sich Voxel mit der gleichen Position in allen PET-Bildern entsprechen. In Abhängigkeit vom Studien-Design wurden für den Vergleich entweder unabhängige oder abhängige t-Tests (vgl. 3.10) herangezogen. Die resultierenden t-Werte können farbcodiert auf dem Referenzgehirn dargestellt werden. Dabei wurde die Schwelle so festgelegt, dass nur die Voxel, deren t-Wert einem unkorrigierten p-Wert von kleiner 0,05 entspricht, sichtbar sind. In einer solchen t-Wert-Karte werden somit alle Voxel dargestellt, bei denen sich die Test- und Kontrollbedingung signifikant unterscheiden. Auf diese Weise werden auch Substrukturen einer VOI sichtbar, die für die Verhaltensaufgabe eine Rolle spielen.

3.8. Blut-, Organ- und Gehirnentnahme

Verhaltenstestungen und PET-Messungen ermöglichen es, die phänotypischen Effekte exogener Modulationen des Endocannabinoidsystems (durch systemische Injektionen

von Δ^9 -THC und CBD) zu untersuchen. Um die Auswirkungen von chronischen und akuten Behandlungen auf Anandamid (AEA) und 2-AG als Bestandteile des Endocannabinoidsystems sowie auf verwandte Lipide (PEA, OEA) analysieren zu können, wurde arterielles Blut sowie Organe und das Gehirn entnommen.

Ein optimaler und schneller Ablauf bei der Gewinnung der Blut- und Gewebeproben, erforderte drei Personen (je eine Person für Blutabnahme, Gehirn- und Organentnahme). Für die Blutabnahme wurde zunächst die Oberschenkelarterie (*Arteria femoralis*) am anästhesierten Tier frei präpariert (vgl. 3.3) und anschließend ein Katheter (\emptyset : 0,98 mm, Becton Dickinson, Heidelberg) in die *A. femoralis* eingeführt. Dann wurden bis zu 4,8 ml Blut mit Hilfe eines Serum-Röhrchens (S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Zur Gewinnung des Serums wurden die Serumröhrchen 30 min bei 4°C mit 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in Glasvials abgefüllt und bei -80°C gelagert.

Im Anschluss an die Blutabnahme wurden die Tiere dekapitiert. Nach Öffnung der Bauchhöhle (*Cavitas abdominalis*) wurde ein Leberlappen, eine Niere sowie die Milz entnommen, zeitgleich wurde für die Gehirnentnahme (von mir durchgeführt) das Schädeldach (*Calvaria*) mit Hilfe einer Knochenzange entfernt und noch vorhandene Reste der Hirnhaut (*Meninx encephali*, insbesondere Reste der *Dura mater*) mit einer Pinzette beseitigt. Nach dem Herauslösen des Gehirns aus dem Schädel wurde das Gehirn sagittal entlang der Längsfurche (*Fissura longitudinalis*) in die linke und rechte Hemisphäre geteilt. Eine Hemisphäre (ausbalanciert randomisiert mal die linke, mal die rechte) wurde in sechs kleinere Areale unterteilt (Abbildung 25): 1) Kleinhirn (*Zerebellum*), 2) Mittelhirn (*Mesencephalon*), 3) Hypothalamus, 4) Thalamus, 5) Hippokampus und 6) präfrontaler Kortex (PFC). Die andere Hemisphäre wurde intakt für zukünftige Analysen eingefroren.

Um ein möglichst schonendes und schnelles Tieffrieren der Gewebeproben zu gewährleisten, wurden die Proben in eine -40°C kalte 2-Methylbutan Lösung (Isopentan, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe) gegeben und direkt im Anschluss an die Experimente bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung (vgl. 3.9) gelagert.

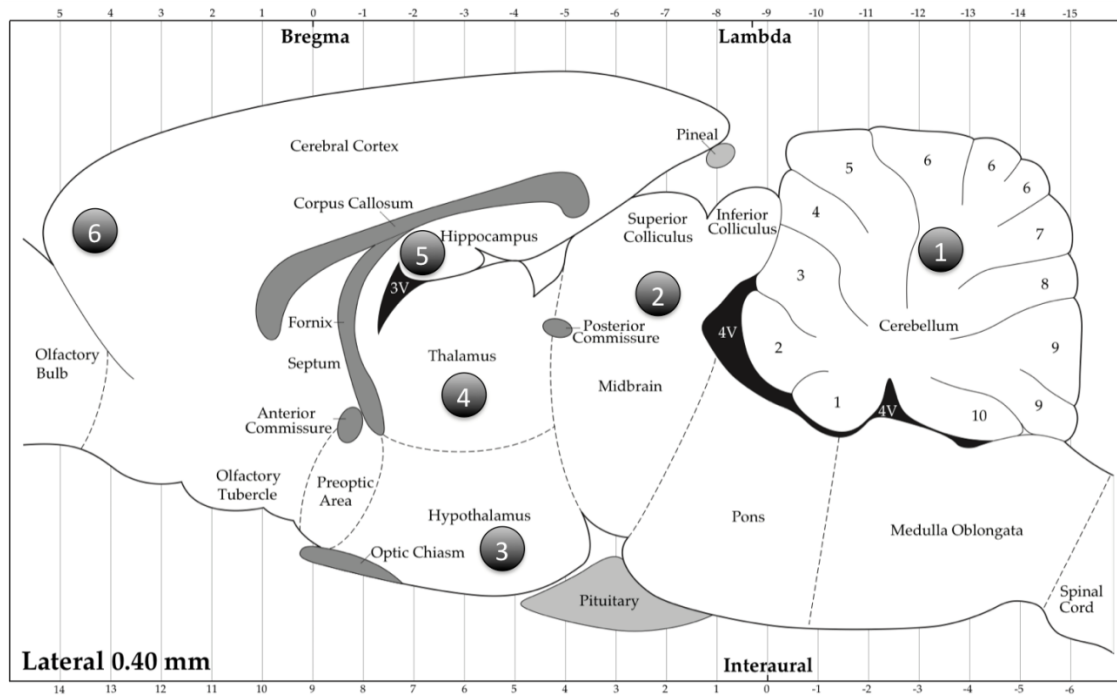


Abbildung 25: Schematische Darstellung der sagittalen Ansicht der rechten Hemisphäre eines Rattengehirns (Schnitt 0,4 mm rechts der Längsfurche).

Die für die weitere Analyse entnommenen Areale sind mit Zahlen markiert: 1) Kleinhirn, 2) Mittelhirn, 3) Hypothalamus, 4) Thalamus, 5) Hippokampus und 6) präfrontaler Kortex. (Modifiziert nach Paxinos & Watson, 2005)

3.9. Analyse von Eicosanoiden und exogen zugeführten Cannabinoiden

Obwohl die Analyse der Eicosanoide nicht von mir, sondern meiner Kollegin Frau Franziska Pahlisch durchgeführt wurde, soll die Vorgehensweise an dieser Stelle kurz erläutert werden.

Neben den Endocannabinoiden Anandamid (AEA) und 2-AG sowie den strukturell verwandten Lipiden OEA und PEA können auch exogen zugeführte Cannabinoide (Δ^9 -THC, CBD) in den Gewebeproben der verschiedenen Gehirnareale, den Organen und den Serumproben analysiert werden.

Die Extraktion der Analyte erfolgte wie von Fegley et al. (2005) beschrieben mit Methanol-Chloroform (Verhältnis 1:2) unter Zugabe deuterierter, interner Standards (Isotopenverdünnungs-Methodik). Anschließend wurde die organische Phase der Proben mittels Silicagel-Säulenchromatographie gereinigt und nach Aufkonzentrierung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie (HPLC/MS-MS) analysiert. Im Rahmen der HPLC (Agilent® 1200 HPLC System) wurden die Proben mit einer 4 μ m Synergi Hydro-RP C₁₈-Säule (150 x 2 mm; Pheno-

menex®) mit dazugehöriger Vorsäule aufgetrennt. Die Elution der Analyten erfolgte mit Hilfe eines Wasser-Methanol-Gradienten und einer Flussrate von 0,5 ml/min. Während der MS-MS (Applied Biosystems® API 5000) wurden die Analyten mittels positiver Elektrospray-Ionisation ionisiert und über zwei hintereinander geschaltete Quadrupole entsprechend ihres Masse- zu Ladungsverhältnisses aufgetrennt. Die Fragmente der Analyten wurden über das multiple reaction monitoring (MRM) detektiert und quantifiziert.

3.10. Statistik

Sämtliche statistische Analysen wurden mit PASW Statistics 18 und aktueller (SPSS Statistics 19 und 20; alles SPSS® Inc., IBM company, USA) durchgeführt.

Das Signifikanzniveau α wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Somit wurde bei p-Werten kleiner 0,05 die Nullhypothese abgelehnt und der Unterschied als signifikant betrachtet.

Aufgrund der sogenannten versuchsbezogenen Irrtumswahrscheinlichkeit hat unter biometrischen Gesichtspunkten nur der erste statistische Test, der mit den Daten einer Studie durchgeführt wird, eine wirkliche Aussagekraft im Sinne der Signifikanz. Wenn zur Untersuchung einer Fragestellung mehrere Tests durchgeführt werden, wird zwar in jedem einzelnen Test die individuelle Irrtumswahrscheinlichkeit kontrolliert, die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit ist jedoch größer (bei $\alpha = 0,05$: $1-(0,95)^n$ mit n = Anzahl der durchgeführten Tests). Sofern keine Korrektur der versuchsbezogenen Irrtumswahrscheinlichkeit erfolgt (Korrektur sämtlicher ermittelter p-Werte einer Studie), kann bei allen weiteren Tests nur die Aussage getroffen werden, dass die Unterschiede, die sich aus der deskriptiven Statistik ergeben vermutlich nicht zufällig zustande gekommen sind. In den meisten Tierstudien und so auch in der vorliegenden Arbeit, ist es nicht möglich die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit zu reduzieren (oder sinnvoll zu korrigieren), da man versucht, einen Überblick über einen Sachverhalt zu erhalten und somit viele verschiedene Parameter (Bsp.: OF, PPI etc.) untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde entsprechend nur die individuelle, aber nicht die versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit berücksichtigt. Unter welchen Gesichtspunkten die statistische Analyse in den verschiedenen Studien erfolgte, wird in den jeweiligen Ergebnisteilen kurz erläutert.

Prozentwerte wurden vor der statistischen Analyse Arkussinus (arcsin) transformiert.

Aufgrund der geringen Stichprobengröße (meist $n = 5$) lässt sich die Normalverteilung der Daten schlecht verlässlich ermitteln. Daher werden in anderen Arbeiten häufig vorsichtshalber nicht-parametrische Tests für die statistische Analyse verwendet. Allerdings sind diese Tests gerade bei kleinen Stichproben nicht ideal, während parametrische Tests durchaus sinnvolle Ergebnisse liefern können (Bland & Altman, 2009). Des Weiteren besteht das Problem, dass SPSS keine mehrfaktoriellen nicht-parametrischen Analysemethoden zur Verfügung stellt. Aufgrund dessen wurden die Daten nicht auf Normalverteilung überprüft und dennoch parametrische Analysemethoden angewendet, solange die anderen Bedingungen erfüllt wurden, die ein statistischer Test erforderte (z.B. Gleichheit der Varianzen).

Bei Varianzanalysen ohne Messwiederholung (ANOVA) und Varianzanalysen mit mindestens einem Faktor ohne und einem Faktor mit Messwiederholung (mixed-design ANOVA) wurde die Varianzhomogenität der Zwischensubjektfaktoren mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Bei Verletzung der Varianzhomogenität (Nullhypothese wird abgelehnt; $p < 0,05$) wurde zunächst versucht, durch Transformation der Daten (Reziprok der Quadratwurzel, Logarithmus, Wurzel oder Reziprok-Berechnung) Varianzhomogenität zu erreichen. Bei ineffektiver Transformation bzw. bei schon arcsin-transformierten Prozentzahlen, wurde statt einer einfaktoriellen ANOVA der Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrische Analysemethode) verwendet. Aus Mangel einer nicht-parametrischen Methode anstelle einer mixed-design ANOVA, wurden diese Analysen trotz Verletzung der Varianzhomogenität fortgeführt. Allerdings wurden die Ergebnisse entsprechend vorsichtig interpretiert.

Bei Varianzanalysen mit Messwiederholung (RM-ANOVA) wurde die Sphärizität (Varianzgleichheit der Differenzen von allen möglichen Messwertpaaren, die von einem Testsubjekt stammen) mit Hilfe des Mauchly-Tests untersucht. Wird die Sphärizität verletzt (Nullhypothese wird abgelehnt; $p < 0,05$), kann entweder eine Greenhouse-Geisser- oder eine Huyhn-Feldt-Korrektur vorgenommen werden. Bei beiden Korrekturen wird ein Korrekturfaktor (ϵ) berechnet, der für die Anpassung der Freiheitsgrade und der F-Werte verwendet wird, so dass die Abweichung von der Sphärizität ausgeglichen wird. Die Greenhouse-Geisser-Korrektur gilt als recht konservativ. Daher wurde die Greenhouse-Geisser-Korrektur, wie empfohlen (Field, 2009), nur bei Sphärizitäts-

Schätzungen von $\epsilon < 0,75$ verwendet während bei $\epsilon > 0,75$ auf die Huynh-Feldt-Korrektur zurückgegriffen wurde.

Um die Haupteffekte der ANOVA bei mehr als zwei Faktorstufen genauer analysieren zu können, wurden verschiedene weitere Analysen durchgeführt. Der Post hoc-Test Dunnett wurde verwendet um herauszufinden, welche Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel) zu einem signifikanten Zwischensubjekteffekt führte. Bei Faktoren mit Messwiederholung wurden einfache geplante Kontraste durchgeführt, wenn der Effekt bezüglich einer bestimmten Faktorstufe untersucht werden sollte (z.B. in Bezug auf ein bestimmte Zone im Open Field (Homebase) oder auf die Behandlungskontrolle (Saline)). Um eine signifikante Interaktion von zwei Faktoren auflösen zu können, wurden zum einen Interaktionsgraphen erzeugt und zum anderen wurde der Post hoc-Test Sidak berechnet. In den Interaktionsgraphen werden sogenannte geschätzte Randmittel und ihre Standardfehler gegen einen Faktor aufgetragen. Wenn eine 2 faktorielle ANOVA durchgeführt wurde, entsprechen die geschätzten Randmittel dem Mittelwert eines Faktors. Bei einer 3 faktoriellen Analyse werden hingegen die Mittelwerte von zwei Faktorstufen gemittelt. Das heißt, bei einer Analyse mit den Faktoren Testzeitpunkt, Behandlung und einer auf den Verhaltenstest bezogenen Variablen wie z.B. der Präpuls lautstärke, kann man bei der signifikanten Interaktion Präpuls lautstärke*Testzeitpunkt den Faktor Testzeitpunkt auf die X-Achse auftragen und die geschätzten Randmittel der verschiedenen Präpuls lautstärken auf die Y-Achse. Diese entsprechen dann der Präpulsinhibition für jede Lautstärke aber jeweils gemittelt über beide Behandlungen. Die Interaktionsgraphiken vereinfachen das Verständnis der Interaktion, während die zusätzlichen Post hoc-Tests anzeigen, ob die sichtbaren Unterschiede auch signifikant sind.

Für die VOI-Analyse und die Erstellung von t-Wert-Karten wurden t-Tests durchgeführt (abhängiger t-Test: Vergleich Kontroll- und Testbedingung bei Black hooded-Ratten; unabhängiger t-Test: Vergleich der Black und Lister hooded-Ratten und Vergleich unbehandelte und mit Δ^9 -THC behandelten Ratten).

Da für jede VOI, die eine Aktivitätsdifferenz zwischen Test- und Kontrollbedingung von über 5 % aufwies, ein t-Test durchgeführt werden musste, ergibt sich hier das Problem des multiplen Testens. Um dem entgegenzuwirken, wurden die resultierenden p-

Werte mit Hilfe eines statistischen Verfahrens (False Discovery Rate (FDR); Benjamini & Hochberg, 1995) korrigiert.

Das Problem des multiplen Testens ergibt sich auch bei der Erstellung von t-Wert-Karten. Allerdings stehen momentan noch keine adäquaten Korrekturmöglichkeiten zur Verfügung. Aufgrund der immens großen Anzahl an Tests (pro Voxel ein Test, somit werden ca. 19000 Tests durchgeführt) führen die Korrekturen alle dazu, dass kein einziger Voxel signifikante Aktivitätsunterschiede aufweist.

3.11. Studien

Insgesamt wurden während der Doktorarbeit fünf verschiedene Studien durchgeführt. Das genaue Design dieser Studien wird im Folgenden erläutert.

3.11.1. PPI-PET-Studie

Die PPI-PET-Studie wurde mit insgesamt zehn adulten, unbehandelten Ratten durchgeführt (5 Black und 5 Lister hooded-Ratten). Ziel dieser Studie war die Untersuchung neuronaler Grundlagen der Schreckreaktion und Präpulsinhibition (vgl. 3.4.5) in gesunden Tieren. Die Ergebnisse dieser Studie sind zudem Grundlage für die Auswertung der PET-Daten, die während der pubertären Δ^9 -THC-Studie (vgl. 3.11.3) gewonnen wurden. In der Studie wurde jedes Tier sowohl in einer Kontroll- als auch in einer Testbedingung getestet. Die Kontrollbedingung bestand nur aus kontinuierlichem Hintergrundrauschen. Dieses Hintergrundrauschen war identisch mit dem Rauschen, das im PPI-Paradigma verwendet wurde (vgl. 3.4.5; 65 dB SPL, 2.2 -16.7 kHz). Eine 18 FDG-Akkumulation war unter diesen Bedingungen in akustischen Arealen und solchen, die während der normalen physiologischen Prozesse eines wachen Tieres aktiv sind, zu erwarten.

Die Testbedingung umfasste das PPI-Paradigma (vgl. 3.4.5). Somit akkumulierte das 18 FDG in allen Arealen, die während der Schreckreaktion und der Präpulsinhibition aktiv waren, aber auch in Arealen, die für akustische Verarbeitung und andere physiologische Prozesse der wachen Tiere verantwortlich sind.

Bildet man einen Quotienten der Aktivitätsmuster der Test- und Kontrollbedingung, kürzen sich zwar die Aktivitäten heraus, die auf der akustischen Verarbeitung und an-

deren physiologischen Prozessen beruhen, aber es kann nicht zwischen Arealen unterschieden werden, die nur für die Vermittlung der Schreckreize relevant sind und solche, die die PPI vermitteln. Um dennoch die Areale, die bei der Schreckreaktion und der Präpulsinhibition aktiv sind, indirekt unterscheiden zu können, wurde die unterschiedliche Hörfähigkeit engverwandter Rattenstämme ausgenutzt. Vorangegangene Hörtest-Untersuchungen ergaben deutliche Hörschwellen-Unterschiede bei Lister und Black hooded-Ratten. Aufgrund dessen wurde angenommen, dass sich beide Stämme auch hinsichtlich der Anzahl der Schreckreaktionen und PPI-Ereignisse während des PPI-Paradigmas unterscheiden. Daraus sollten auch Aktivitätsunterschiede in den jeweiligen Arealen resultieren.

Der Ablauf der Verhaltens-PET-Messungen ist unter dem Punkt PPI-Verhaltens-PET (vgl. 3.7.1) beschrieben und in Abbildung 24 zusammengefasst. Alle Tiere wurden insgesamt zweimal an unterschiedlichen Tagen im PET gemessen: einmal wurde nach der ¹⁸F-DG-Injektion eine Kontrollmessung und einmal die Testbedingung gestartet (s.o.). Die Reihenfolge der Testungen wurde ausbalanciert randomisiert, so dass die eine Hälfte der Tiere zunächst in der Kontrollbedingung getestet wurde und die andere zuerst die PPI-Testung durchlief.

Des Weiteren wurden alle Tiere einem Hörtest (vgl. 3.5) unterzogen und es wurden MRT-Bilder angefertigt.

Da sich die Auswertung in dieser Studie von der Analyse der Daten der pubertären Δ^9 -THC-Studie in einigen Punkten unterschied, wurden unter dem Punkt 3.7.1.1 nur die generellen Grundlagen erläutert. Im Folgenden werden die Details für die PPI-PET-Studie zusammengefasst:

Für die Kontrollbedingung wurden a priori Areale des zentralen auditorischen Systems als VOIs festgelegt: obere Olive (*Nucleus olivaris superior*, SOC), dorsaler und ventraler *Lemniscus lateralis* (DLL, VLL), *Colliculus inferior* (IC), medialer Kniehöcker (*Corpus geniculatum mediale*, MG) und auditorischer Kortex (Au).

Die a priori festgelegten Areale für die Testbedingung waren angelehnt an Strukturen, die laut Literatur für die Vermittlung der Schreckreaktion und PPI relevant sind: *Nucleus reticularis pontis caudalis* (PnC) als Schlüsselstruktur in der Vermittlung der Schreckreaktion, *Colliculus superior* (SC), *Nucleus tegmentalis pedunculo-pontinus*

(PPTg) und *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg) sowie *Substantia nigra* (SN) als wichtige Strukturen der PPI-Vermittlung. Nach einer ersten Daten-Analyse wurde deutlich, dass angrenzende und Sub-Strukturen ebenfalls relevant sein könnten. Daher wurden folgende VOIs ergänzt: *Nucleus reticularis pontis oralis* (PnO), der rostral zum PnC liegt, der ventrocaudale PnC und *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg) als Substrukturen von PnC und PnO, sowie der *Nucleus cuneiformis* (CnF), der an den PPTg angrenzt. Zwar wird der IC ebenfalls als Teil der PPI-Vermittlung betrachtet, aber da sich die metabolische Aktivität der Struktur bereits in der Kontrollbedingung zwischen den beiden Rattenstämmen signifikant unterschied, wurde der IC in der Testbedingung nicht ausgewertet.

Zunächst wurde die Gehirnaktivität beider Stämme während der Kontrollbedingung sowie während der Testbedingung miteinander mittels VOI-Analyse (vgl. 3.7.1.1) verglichen.

Für den Vergleich der grundlegender Unterschiede während der Kontrollbedingung wurden die normalisierten PET-Bilder des Kontrolldurchlaufs für jeden Stamm (BH: Black hooded, LH: Lister hooded) zunächst gemittelt. Um die Unterschiede der Gehirnaktivität analysieren zu können, wurde daraus wie folgt die Differenz berechnet:

$$\frac{PET_Mittelwert_{BH} - PET_Mittelwert_{LH}}{(PET_Mittelwert_{BH} + PET_Mittelwert_{LH}) \div 2}$$

Auf die gleiche Weise wurden auch die Bilder der Testbedingung miteinander verrechnet.

Im Anschluss wurde überprüft, in welchen Arealen (VOIs) die Differenz über 5 % lag. Diese Areale wurden dann weiter statistisch ausgewertet (vgl. 3.10).

Die Aktivierungsdifferenzen während des PPI-Versuchs wurden zudem mit dem prozentualen Verhältnis von Schreckreaktionen und PPI-Ereignissen (vgl. 3.4.5.1) korreliert. Außerdem wurden t-Wert-Karten erstellt (vgl. 3.7.1.1), bei denen die beiden Rattenstämme in der Testbedingung verglichen wurden.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Kontroll- und Testbedingung der gut hörenden Black hooded-Ratten direkt miteinander verglichen:

$$\frac{PET_Mittelwert_{Test} - PET_Mittelwert_{Kontrolle}}{PET_Mittelwert_{Kontrolle}}$$

Auch hierfür wurde eine t-Wert-Karte erstellt, die die Aktivitätsunterschiede zwischen der Test- und Kontrollbedingung darstellt.

3.11.2. CBD-URB-Studie

Die CBD-URB-Studie wurde mit 20 adulten Lister hooded-Ratten begonnen.

Das Studien-Design ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt. Zunächst wurde das Verhalten aller Tiere im Open Field (vgl. 3.4.1), bei der Objekterkennung (vgl. 3.4.2), der sozialen Interaktion (vgl. 3.4.3), auf der erhöhten Plusarena (vgl. 3.4.4) sowie bei der Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion (vgl. 3.4.5.) untersucht (Zeitpunkt t₀; Tag 0-22). Während dieser Zeit musste eine Ratte aufgrund eines Tumors getötet werden, so dass alle folgenden Experimente nur noch mit 19 Tieren durchgeführt werden konnten.

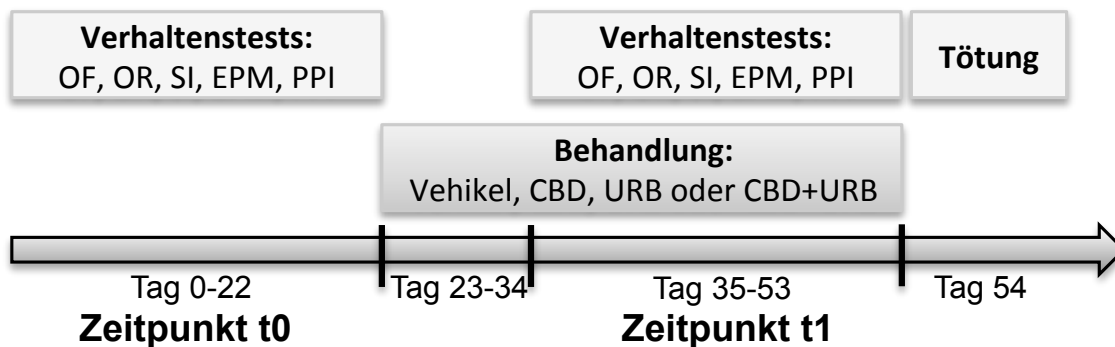


Abbildung 26: Schematische Darstellung des CBD-URB-Studien-Designs.

Alle Tiere (n = 19) wurden zunächst naiv (Zeitpunkt t₀) in verschiedenen Verhaltensversuchen getestet: Open Field (OF), Objekterkennung (OR), soziale Interaktion (SI), erhöhte Plusarena (EPM) und Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion (PPI). Anschließend wurde mit der Behandlung begonnen. Vier Tiere erhielten täglich eine Sesamöl (Vehikel)-Injektion, fünf Cannabidiol (CBD, 12 mg/kg), fünf URB (0,3 mg/kg) und 5 Tieren wurde eine Kombination aus CBD und URB appliziert. Nach zwölf Tagen startete erneut die Verhaltenstestung (Zeitpunkt t₁). Am Morgen nach der letzten Injektion wurde allen Tieren arterielles Blut sowie Gehirn und Organe entnommen (Tötung). Dieses Material wurde dann von Franziska Pahlisch mittels HPLC/MS-MS weiter analysiert.

Auf die initiale Verhaltenstestung folgte eine 12-tägige Behandlung (Tag 23-34) mit Vehikel (Sesamöl, n = 4), CBD (n = 5), URB (n=5,) oder einer Kombination von CBD und URB (n = 5). Die verschiedenen Substanzen wurden jeden Abend i. p. mit einem Injektionsvolumen von 1 ml/kg appliziert. CBD wurde in einer Konzentration von 12 mg/kg verwendet. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an eine erste klinische Studie gewählt (Leweke et al., 2012), in der Patienten pro Tag 800 mg verabreicht wurde. Bei einem Durchschnittsgewicht von 70 kg entspricht dies 11,43 mg/kg. URB wurde mit

0,3 mg/kg in einer Konzentration verwendet, die laut Literatur eine maximale FAAH-Inhibition erlaubt (vgl. 3.2.1.2).

Im Anschluss wurden die Tiere erneut den oben genannten Verhaltenstests unterzogen (Zeitpunkt t₁; Tag 35-53). Während dieser Zeit wurde die Behandlung fortgesetzt. Auf diese Weise wurden alle Substanzen auf einem konstanten Plasmaspiegel gehalten (steady state).

Am Morgen nach der letzten Injektion folgte schließlich die Blutabnahme sowie die Entnahme des Gehirns und der Organe (vgl. 3.8). Schließlich wurden die Konzentrationen der Endocannabinoide (2-AG, AEA) und verwandten Lipide (PEA, OEA) sowie die CBD-Konzentration mittels HPLC/MS-MS im Serum und den Gewebeproben gemessen (vgl. 3.9).

3.11.3. Pubertäre Δ^9 -THC Studie

Die pubertäre Δ^9 -THC-Studie wurde mit zehn Lister hooded-Ratten durchgeführt. Das Studien-Design ist in Abbildung 27 schematisch dargestellt.

Die Tiere wurden im Alter von 21 Tagen geliefert und konnten sich 2 Tage an die neue Umgebung gewöhnen, bevor mit den ersten Verhaltenstests begonnen wurde. Zwischen dem postnatalen Tag (pd) 23 bis 39 (Zeitpunkt t₀) wurden die Tiere im Open Field (vgl. 3.4.1), in der Objekterkennung (vgl. 3.4.2), der sozialen Interaktion (vgl. 3.4.3), auf der erhöhten Plusarena (vgl. 3.4.4) sowie der Präpulsinhibition (vgl. 3.4.5.) getestet.

Während der Pubertät der Tiere (pd 40 - 65) wurden fünf Ratten mit Δ^9 -THC in Sesamöl behandelt, wobei bei jeder i. p. Injektion 5 mg/kg Δ^9 -THC in einem Injektionsvolumen von 1 ml/kg appliziert wurden. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an die Literatur gewählt. Die anderen fünf Tiere (Kontrolltiere) erhielten hingegen 1 ml/kg reines Sesamöl (Vehikel). Die Injektionen erfolgten in unregelmäßigen und ausbalanciert randomisierten Abständen: an je 10 Tagen wurde nur einmal Δ^9 -THC injiziert, an 5 Tagen zweimal und an den weiteren 10 Tagen wurde keine Behandlung durchgeführt. Neben der Anzahl der Injektionen wurde auch die Uhrzeit der Injektionen variiert. Diese irreguläre Applikation von Δ^9 -THC wurde zum einen gewählt, um den unregelmäßigen Cannabiskonsum bei Menschen nachzuempfinden. Zum anderen sollte die Entwicklung einer Toleranz gegenüber Δ^9 -THC vermieden werden, da diese die Δ^9 -THC-

Wirkung beeinträchtigen würde (Breivogel et al., 1999; Bass & Martin, 2000; Lamarque et al., 2001; Whitlow et al., 2003). Im Anschluss an die pubertäre Behandlung folgte zunächst eine 12 tägige Pause, bis erneut alle Verhaltenstestungen wiederholt wurden. Zusätzlich wurde die PPI der akustischen Schreckreaktion mit einer μ PET-Messung kombiniert (PPI-Verhaltens-PET, vgl. 3.7) und MRT-Messungen durchgeführt (vgl. 3.6; Zeitpunkt t1: pd 78 - 92). Die Pause sollte gewährleisten, dass sich das Δ^9 -THC der letzten Injektion nicht mehr im Gehirngewebe der Ratte befand und somit nur chronische Veränderungen gemessen wurden.

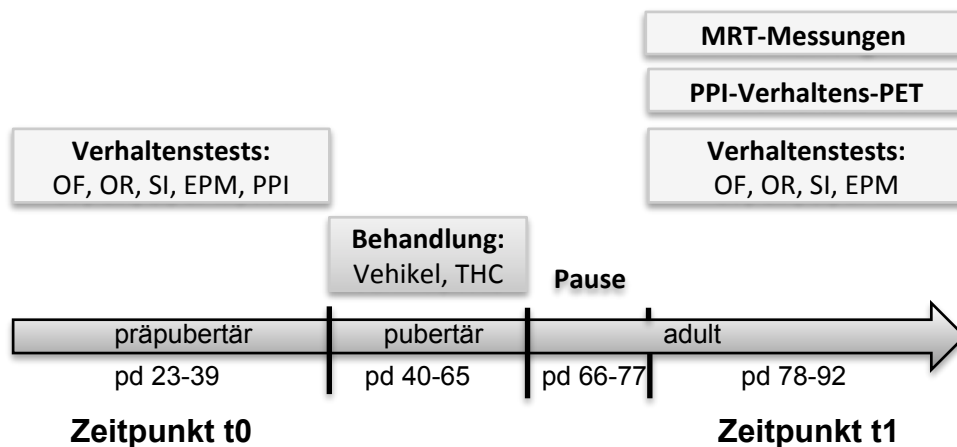


Abbildung 27: Schematische Darstellung des Designs der pubertären Δ^9 -THC-Studie.

Alle Tiere ($n = 10$) wurden vor der Pubertät in verschiedenen Verhaltensparadigmen (Open Field (OF), Objekterkennung (OR), soziale Interaktion (SI) erhöhte Plusarena (EPM), Präpulsinhibition (PPI)) untersucht. Während der Pubertät wurden fünf Ratten mit Vehikel (Sesamöl) und fünf Tiere mit Δ^9 -THC (5 mg/kg) behandelt. Zwölf Tage nach Beendigung der Behandlung wurden die adulten Tiere erneut den verschiedenen Verhaltenstest unterzogen. Zusätzlich wurde die PPI mit PET kombiniert und MRT-Messungen durchgeführt.

Da sich in dieser Studie der Ablauf des Verhaltens-PET und die Auswertung der resultierenden Daten von denen der PPI-PET-Studie unterscheidet, soll im Folgenden genauer darauf eingegangen werden.

Im Gegensatz zur PPI-PET-Studie, in der unbehandelte Tiere in einer Kontroll- und Testbedingung getestet wurden (vgl. 3.11.1), wurden die Tiere in dieser Studie nur in der Testbedingung untersucht. Da in der pubertären Δ^9 -THC-Studie zwei Gruppen (Tiere die in der Pubertät mit Δ^9 -THC behandelt wurden und Ratten, die nur Vehikel verabreicht bekamen) untersucht wurden, konnte der Glukosemetabolismus beider Gruppen während des PPI-Paradigmas verglichen und somit analysiert werden, ob die pubertäre Δ^9 -THC-Gabe in der adulten Ratte zu einer Veränderung der Glukoseutilisation während der Schreckreaktionen und PPI führt. Bei der Analyse wurden die Resultate

der PPI-PET-Studie zugrunde gelegt: es wurden nur die Areale betrachtet, die sich in der PPI-PET-Studie als relevant für die Vermittlung der Schreckreaktion und PPI herausgestellt hatten.

Zunächst wurden die Aktivitätsdifferenzen zwischen den beiden Gruppen wie folgt berechnet:

$$\frac{PET_Mittelwert_{THC} - PET_Mittelwert_{Vehikel}}{(PET_Mittelwert_{THC} + PET_Mittelwert_{Vehikel}) \div 2}$$

Im Anschluss wurde überprüft in welchen VOIs (vgl. 3.7.1.1) die Differenz über 5 % lag. Diese Areale wurden dann mittels VOI-Analyse ausgewertet.

Die Veränderungen des Aktivierungsmusters wurden schließlich mit den Daten der Lister hooded Ratten aus der PPI-PET-Studie verglichen. Auf diese Weise war es möglich, die Relevanz der Aktivitätsveränderungen trotz der fehlenden Kontrollbedingung für die PPI zu bewerten.

3.11.4. Dosisstudie

In der Dosisstudie wurden adulte Black hooded-Ratten getestet (vgl. 3.1). Es wurde mit 5 Tieren begonnen, eine Ratte starb jedoch während der Studie und wurde ausgeschlossen. Ein direkter Zusammenhang mit der Δ^9 -THC-Injektion kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, aber erscheint unwahrscheinlich, da zwei Tage zwischen Injektion und dem Eintreten des Todes lagen.

Zu Beginn der Studie wurde bei allen Tieren die Hörfähigkeit ermittelt (vgl. 3.5). Das weitere Studien-Design ist in Abbildung 28 zusammengefasst.

Das Open Field-Verhalten (vgl. 3.4.1), die Objekterkennung (vgl. 3.4.2) und die PPI (vgl. 3.4.5) der Tiere wurde zunächst naiv und anschließend in acht verschiedenen Testbedingungen untersucht. Diese Testbedingungen umfassten folgende i. p. Injektionen mit einem Injektionsvolumen von 1 ml/kg: a) Saline, b) Sesamöl, c) 1 mg/kg, d) 3 mg/kg, e) 5 mg/kg, f) 10 mg/kg, g) 25 mg/kg und h) 50 mg/kg Δ^9 -THC gelöst in Sesamöl.

Alle Tiere wurden in jeder Testbedingung getestet, wobei zwischen den verschiedenen Testtagen jeweils 5 injektionsfreie Tage lagen. Die Reihenfolge der verschiedenen Injektionen wurde für jedes Tier pseudorandomisiert. Die 5 tägige Pause zwischen den Versuchstagen sollte gewährleisten, dass sich kein Δ^9 -THC der vorherigen Injektion

mehr im Gehirngewebe befand. Laut Literatur wird bei Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels 15 min nach i. p. Injektion eine maximale Konzentration im Gehirn erreicht, die bis ca. 4 Stunden nach Injektion stabil bleibt (Tseng et al., 2004). Nach 24 Stunden ist die Δ^9 -THC-Konzentration im Gehirngewebe um das 3,1 bis 5,5 fache gesunken (Nahas et al., 1981; Nahas et al., 2002). Demnach beträgt die Halbwertszeit in etwa 12 Stunden. Die 5 tägige Pause entspricht somit der 10 fachen Halbwertszeit.

Am Versuchstag wurde 2 Stunden nach der Injektion mit dem Open Field-Versuch begonnen, gefolgt von dem Objekterkennungstest und der PPI. Die PPI-Testung endete 215 min nach der Injektion. Somit sollte während aller Versuche die gleiche Δ^9 -THC-Konzentration im Gehirn vorliegen (siehe oben).

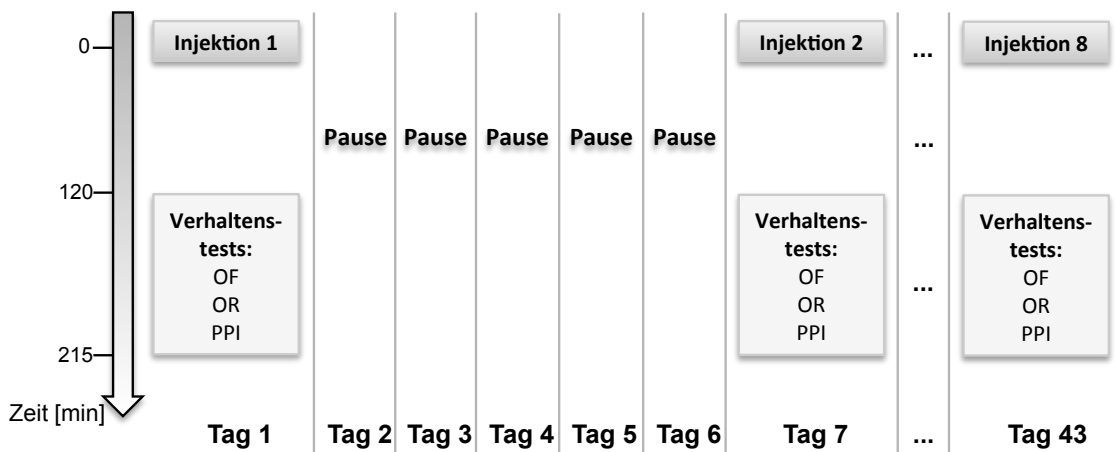


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Designs der Dosisstudie.

Über einen Zeitraum von 43 Tagen erhielten alle Tiere ($n = 4$) insgesamt acht verschiedene Injektionen (Saline, Sesamöl, 1, 3, 5, 10, 25 oder 50 mg/kg Δ^9 -THC in Sesamöl). Die Injektionsreihenfolge wurde für jedes Tier randomisiert. Zwischen den Versuchstagen wurde jeweils 5 Tage pausiert, um zu gewährleisten, dass keine relevanten Spuren der vorherigen Injektion im Gehirngewebe vorhanden waren.

Am Versuchstag wurde zwei Stunden nach i. p. Injektion mit den Verhaltenstests begonnen. Zunächst wurden die Tiere im Open Field (OF), dann im Objekterkennungstest (OR) getestet, gefolgt von der Testung der Präpulsinhibition (PPI). 215 min nach Injektion waren alle Tests abgeschlossen.

3.11.5. Lösungsmittelstudie

Im Anschluss an die Dosisstudie wurde eine Lösungsmittelstudie durchgeführt, die sich in drei Teile gliedern lässt. Im ersten Teil wurden die Verhaltenseffekte von 5 mg/kg Δ^9 -THC in wässriger Lösung mit den Effekten von 1,2 mg/kg WIN (ebenfalls in wässriger Lösung) verglichen. Die Dosierung wurde in Anlehnung an die Literatur (Schneider & Koch, 2002; Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2008) gewählt, um eine gute

Vergleichbarkeit mit den genannten Studien zu erreichen. Beide Substanzen wurden in zwei verschiedenen wässrigen Lösungsmitteln (einmal ohne Ethanol (Vehikel 1), einmal mit Ethanol (Vehikel 2); vgl. 3.2.2) gelöst. Für den direkten Wirkungsvergleich wurde zusätzlich Δ^9 -THC in Sesamöl (Vehikel 3) verwendet. Dieser Teil umfasste somit 9 Versuchsbedingungen: a) Saline, b) Vehikel 1, c) Vehikel 2, Vehikel 3 d) Δ^9 -THC in Vehikel 1, e) Δ^9 -THC in Vehikel 2, Δ^9 -THC in Vehikel 3 f) WIN in Vehikel 1 und g) WIN in Vehikel 2.

Der Ablauf der Studie war ansonsten identisch mit der Dosisstudie (vgl. 3.11.4 und Abbildung 28). Es wurden sechs adulte Black hooded-Ratten verwendet, wobei vier davon auch schon in der Dosisstudie getestet wurden. Die beiden neuen Tiere wurden ebenfalls zu Beginn der Studie auf ihre Hörfähigkeit getestet (vgl. 3.5).

Wie zuvor wurden die Tiere jeden sechsten Tag, zwei Stunden nach i. p. Injektion (Injektionsvolumen jeweils 1 ml/kg), im Open Field, dem Objekterkennungstest und der PPI getestet. Die Reihenfolge, mit der die verschiedenen Lösungen appliziert wurden, wurde erneut für jedes Tier randomisiert.

Der zweite Teil der Studie (Abbildung 29) wurde mit fünf adulten Black hooded-Ratten durchgeführt.

Dieser zweite Teil unterschied sich lediglich in drei Punkten vom ersten Teil:

- 1) Die Wirkung von 5 mg/kg Δ^9 -THC wurde nicht erst 2 h, sondern bereits 15 min nach Injektion untersucht.
- 2) Die Wirkung von WIN und Δ^9 -THC in Sesamöl wurde diesmal nicht mehr mitgetestet. Somit gab es nur 5 verschiedene Testbedingungen: a) Saline, b) Vehikel 1, c) Vehikel 2, d) Δ^9 -THC in Vehikel 1, e) Δ^9 -THC in Vehikel 2.
- 3) Die Tiere wurden nach Injektion entweder im Open Field und anschließendem Objekterkennungstest (Dauer: 40 min) oder im PPI-Paradigma getestet (Dauer: 45 min), um die maximale Testdauer zu reduzieren. Das heißt, jedes Tier wurde in jeder Versuchsbedingung zweimal getestet.

Auch bei diesem zweiten Teil wurde die zunächst die Hörfähigkeit der Ratten getestet.

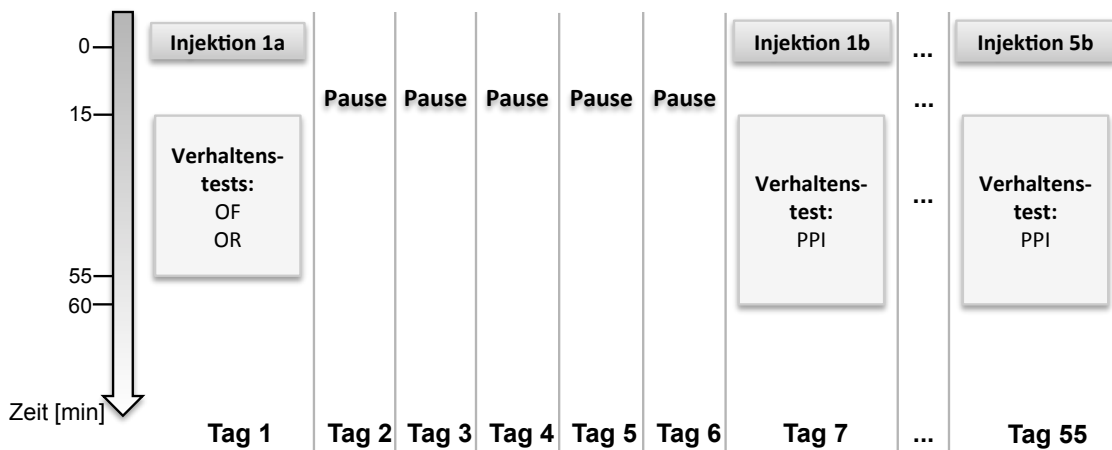


Abbildung 29: Schematische Darstellung des Designs des zweiten Teils der Lösungsmittelstudie.

In einen Zeitraum von 55 Tagen wurden fünf Ratten mit fünf verschiedenen Substanzen behandelt (Saline, Vehikel 1, Vehikel 2, Δ^9 -THC in Vehikel 1, Δ^9 -THC in Vehikel 2). Im Gegensatz zum ersten Teil der Studie wurde der Effekt auf verschiedene Verhaltensweisen bereits 15 min nach Injektion untersucht. Um zu gewährleisten, dass die Substanzmenge im Gehirngewebe in allen Versuche vergleichbar war, wurden die drei Verhaltensversuche auf 2 Versuchstage aufgeteilt. Das hatte zur Folge, dass jedes Tier jede Substanz zweimal appliziert bekam (in der Abbildung bezeichnet als Injektion a und b). Zwischen diesen beiden Injektionen lagen ebenfalls 5 Tage Pause.

D.h. am ersten Versuchstag wurden die Tiere 15 min nach Injektion a im Open Field (OF) und der Objekterkennung getestet (OR). Der Versuchstag war 55 min nach Injektion abgeschlossen. Sechs Tage später wurde die gleiche Substanz erneut injiziert (Injektion b). Nach 15 min wurde mit der Testung der Präpulsinhibition (PPI) begonnen, die 45 min dauerte und somit 60 min nach Injektion endete.

Am dritten Versuchstag (= fortlaufender Tag 13) wurde schließlich eine andere Substanz appliziert und wieder OF und OR durchgeführt u.s.w.

Die Reihenfolge, in der die Effekte der fünf verschiedenen Substanzen getestet wurden, wurde für jedes Tier randomisiert.

Der dritte Teil der Lösungsmittelstudie umfasste keine Verhaltensversuche mehr, sondern diente der Analyse der Pharmakokinetik. Das Studien-Design ist in Abbildung 30 schematisch zusammengefasst.

Je nach Versuchsgruppe wurde 15 min oder 2 Stunden nach Injektion mit der arteriellen Blutabnahme (vgl. 3.8) begonnen. Daran schloss sich die Gehirn- und Organentnahme an (vgl. 3.8). Die Konzentrationen der verschiedenen Lipide (Anandamid (AEA), PEA, OEA und 2-AG) sowie der exogen zugeführten Cannabinoide (Δ^9 -THC, CBD) wurden schließlich von Frau Pahlisch mittels HPLC/MS-MS (vgl. 3.9) bestimmt.

Insgesamt wurden für den dritten Teil der Lösungsmittelstudie 51 adulte Black hooded-Ratten verwendet, die auf 11 Versuchsgruppen wie folgt verteilt wurden:

1. Beginn der Blutabnahme 2 h nach Injektion: Saline (n = 5), b) Vehikel 2 (n = 2), c) Vehikel 3 (n = 4), d) Δ^9 -THC in Vehikel 2 (5 mg/kg; n = 5), e) CBD in Vehikel 2

(12 mg/kg; n = 5), f) URB in Vehikel 2 (0,3 mg/kg; n = 5), g) Δ^9 -THC in Vehikel 3 (5 mg/kg; n = 5), h) CBD in Vehikel 3 (12 mg/kg; n = 5), i) URB in Vehikel 3 (0,3 mg/kg; n = 5).

2. Beginn der Blutabnahme 15 min nach Injektion: j) Δ^9 -THC in Vehikel 2 (5 mg/kg; n = 5), k) Δ^9 -THC in Vehikel 3 (5 mg/kg; n = 5).

Die Ergebnisse der verschiedenen Vehikel wurden zusammengefasst analysiert, da es a) nicht möglich war, bei allen Gruppen eine ausreichend große Stichprobe zu erzielen und b) bei einer pharmakokinetischen Analyse die Vehikel-Gruppen als reine Negativkontrolle dienen.

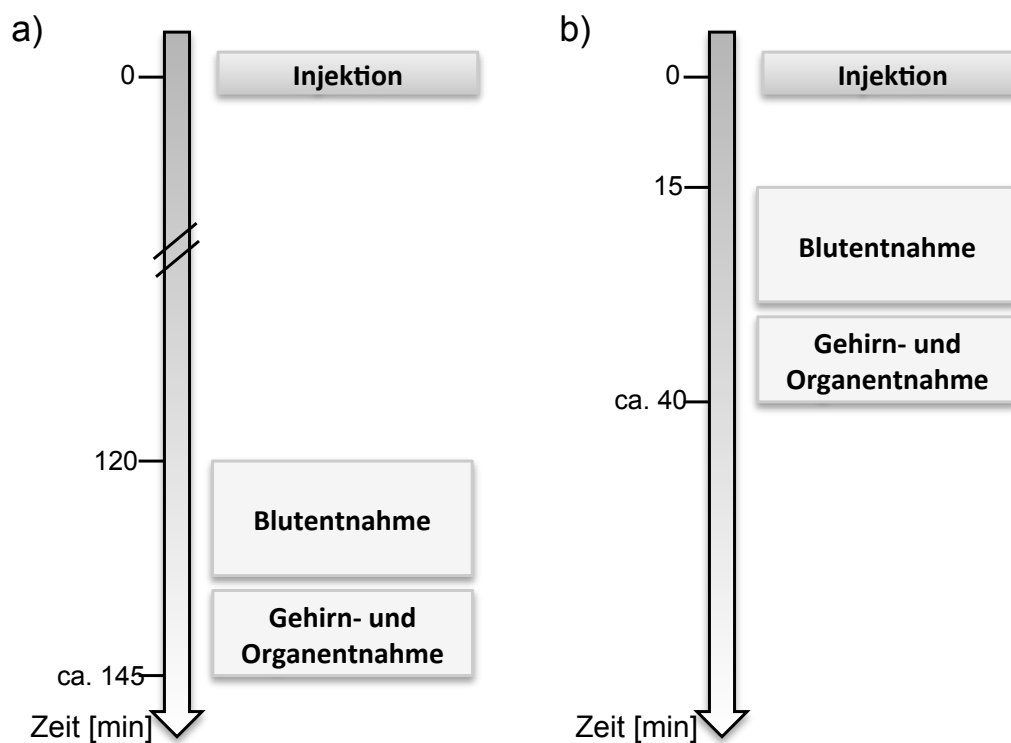


Abbildung 30: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs des dritten Teils der Lösungsmittelstudie.

(a) Bei 41 Tieren wurde zwei Stunden nach Injektion von Saline, Vehikel 2, Sesamöl (Vehikel 3), Δ^9 -THC in Vehikel 2, CBD in Vehikel 2, URB in Vehikel 2, Δ^9 -THC in Vehikel 3, CBD in Vehikel 3 oder URB in Vehikel 3 mit der arteriellen Blutentnahme begonnen. Direkt im Anschluss wurden die Tiere dekapitiert und es wurden parallel sowohl Gehirn als auch Organe entnommen.

(b) Bei 10 Tieren wurde bereits 15 min nach der Injektion von Δ^9 -THC in Vehikel 2 oder Δ^9 -THC in Vehikel 3 mit der Blutabnahme begonnen und sofort im Anschluss die Organe und Gehirne entnommen.

Anschließend wurden die verschiedenen Proben mittels HPLC/MS-MS analysiert.

4. Ergebnisse PPI-PET-Studie

4.1 Hörtest

Die Hörschwelle der Lister hooded-Ratten ($MW \pm STABW = 60,8 \pm 2,4$ dB SPL LIN) unterschied sich signifikant (unabhängiger t-Test; $t(8) = -25,40$; $p < 0,001$) von der Hörschwelle der Black hooded-Ratten ($MW \pm STABW = 18,1 \pm 2,9$ dB SPL LIN). Der Unterschied war mit etwa 40 dB beträchtlich, aber dennoch war die Hörfähigkeit der Lister hooded-Ratten groß genug, um das Hintergrundrauschen (65 dB SPL LIN) und alle im PPI-Paradigma verwendeten Präpulse (68, 72, 78 und 84 dB SPL LIN) wahrzunehmen.

4.2 Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die mittlere Amplitude der Schreckreaktion betrug bei Lister hooded-Ratten $99,2 \pm 16,9$ mV und bei Black hooded $168,3 \pm 45,4$ mV ($MW \pm STABW$). Diese Differenz war signifikant (unabhängiger t-Test; $t(8) = 3,2$; $p = 0,01$).

In Abbildung 31 ist zur Veranschaulichung die normale Schreckreaktion der reduzierten Schreckreaktion, vermindert durch einen 100 ms zuvor präsentierten Präpuls, gegenübergestellt.

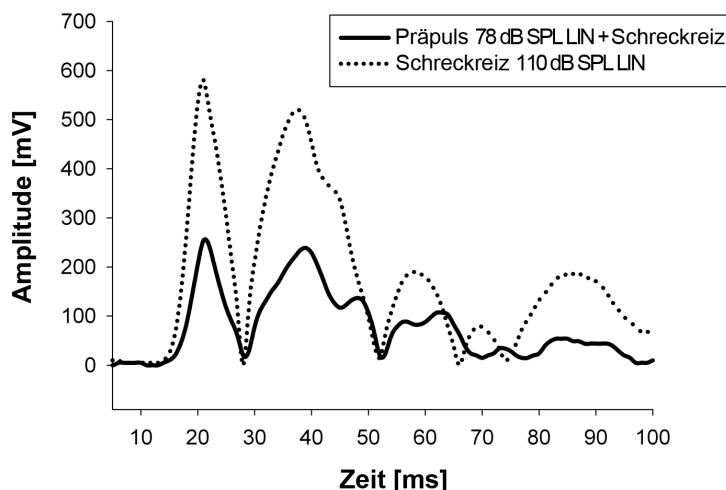


Abbildung 31: Beispielhafte Darstellung der Schreckreaktion (gepunktete Linie) sowie einer reduzierten Schreckreaktion (durchgezogene Linie) vermindert durch die Präsentation eines Präpulses.

Die Ergebnisse der PPI-Analyse sind in Abbildung 32 dargestellt. Eine 2 faktorielle mixed-design ANOVA (Faktoren: Präpuls lautstärke, Rattenstamm) zeigte, dass die PPI signifikant von der Präpuls lautstärke abhing ($F(3, 24) = 255,0$; $p < 0,001$). Der Post hoc-

Test Sidak ergab, dass die PPI umso höher war, je lauter der vor dem Schreckreiz präsentierte Präpuls (68 vs. 72 dB: $p = 0,026$; ansonsten $p < 0,001$).

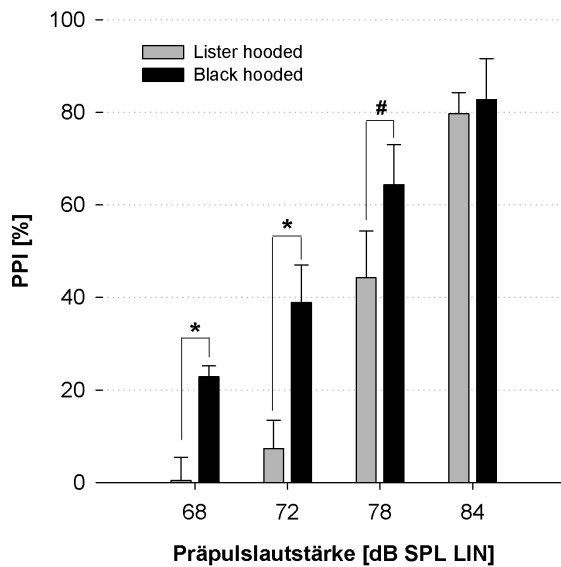


Abbildung 32: Gegenüberstellung der PPI beider Rattenstämme (Black und Lister hooded) in Abhängigkeit von der Präpuls lautstärke.

Es wurden vier verschiedene Präpuls lautstärken getestet: 68, 72, 78 und 84 dB SPL LIN. Generell lässt sich sagen: je lauter der Präpuls desto stärker die PPI ($p < 0,001$, die Signifikanz des Haupteffektes ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet).

Des Weiteren ergab sich ein Haupteffekt des Rattenstamms. Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass bei Durchgängen in denen ein 68, 72 oder 78 dB SPL LIN Präpuls von einem Schreckreiz gefolgt wurde, die PPI der Lister hooded-Ratten signifikant geringer war, als die der Black hooded (*: $p = 0,001$). Bei der Präpuls lautstärke hingegen 84 dB SPL LIN war die PPI beider Rattenstämme identisch.

Des Weiteren lag ein signifikanter Haupteffekt des Rattenstamms ($F(1, 8) = 24,2$; $p = 0,001$) sowie eine signifikante Interaktion der Faktoren Präpuls lautstärke und Rattenstamm ($F(3, 24) = 5,4$; $p = 0,006$) vor. Der Haupteffekt des Rattenstamms besagt zunächst nur, dass die PPI generell bei Black hooded stärker ausgeprägt war als bei Lister hooded-Ratten. Die Auflösung der Interaktion (Interaktionsgraphik (Abbildung 33) sowie der Post hoc-Test Sidak) ergab jedoch, dass dies nur bei den drei leiseren Präpulsen der Fall war (68 dB und 72 dB: $p < 0,001$; 78 dB: $p = 0,011$), während sich die PPI nach einem Präpuls von 84 dB zwischen den Stämmen nicht unterschied ($p = 0,429$). Außerdem war bei Lister hooded-Ratten die PPI, die aus der Präsentation des 68 dB-Präpulses resultierte, vergleichbar mit der PPI nach einem 72 dB-Präpuls ($p = 0,611$). Ansonsten gilt auch hier: je lauter der Präpuls desto größer die PPI.

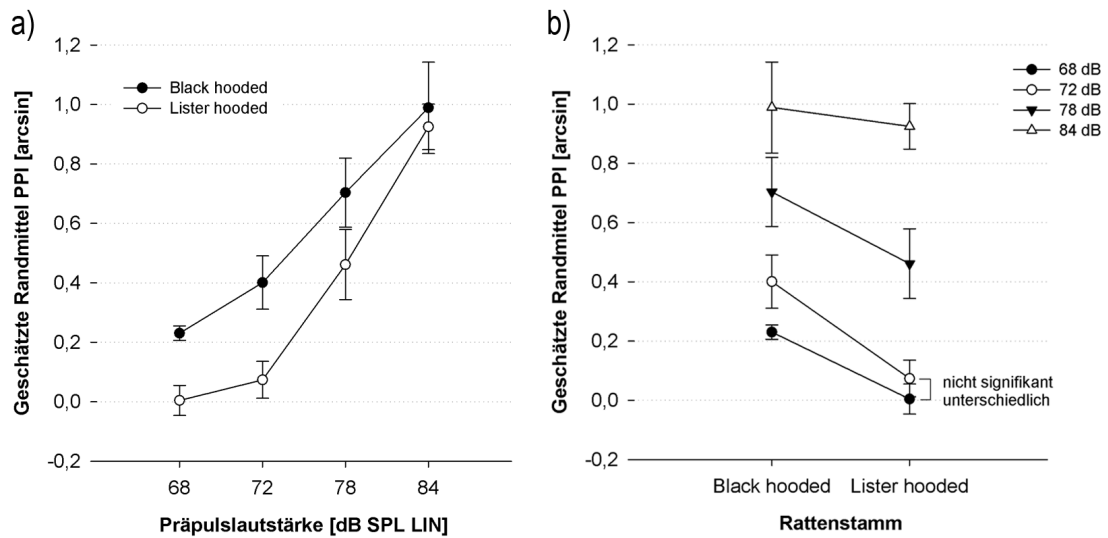


Abbildung 33: Interaktionsgraphiken Präpuls lautstärke * Rattenstamm.

Aufgrund der zweifaktoriellen Analyse entsprechen die aufgetragenen geschätzten Randmittel dem Mittelwert der PPI für die verschiedenen Präpuls lautstärken in Abhängigkeit vom Rattenstamm (a) bzw. für die Rattenstämme in Abhängigkeit von der Präpuls lautstärke (b).

Aus Abbildung a) geht deutlich hervor, dass sich die PPI der beiden Rattenstämme nur bei den leiseren Präpuls (68, 72 und 78 dB SPL LIN) signifikant unterschied, während die Reaktion auf einen Schreckreiz vor dem ein 84 dB-Präpuls präsentiert wurde, vergleichbar war. Generell war die PPI zudem abhängig von der Präpuls lautstärke: je lauter der Präpuls, desto größer war die gemessene PPI (b). Allerdings gab es bei den Lister hooded-Ratten eine Ausnahme. Die PPI-Werte in Durchgängen mit 68 und mit 72 dB-Werte waren nicht signifikant unterschiedlich.

Obwohl das PPI-Paradigma bei allen Tiere identisch ablief, war die Anzahl an tatsächlichen Schreckreaktionen und Präpulsinhibitionen signifikant vom Rattenstamm abhängig (Abbildung 34). Black hooded-Ratten erschrecken während des Versuches seltener als Lister hooded-Ratten (t-test für unabhängige Stichproben, $t(8) = -3,0$; $p = 0,018$), während eine PPI häufiger gemessen werden konnte (keine Varianzgleichheit gegeben, daher Korrektur der Freiheitsgrade; $t(6,23) = 5,3$; $p = 0,002$).

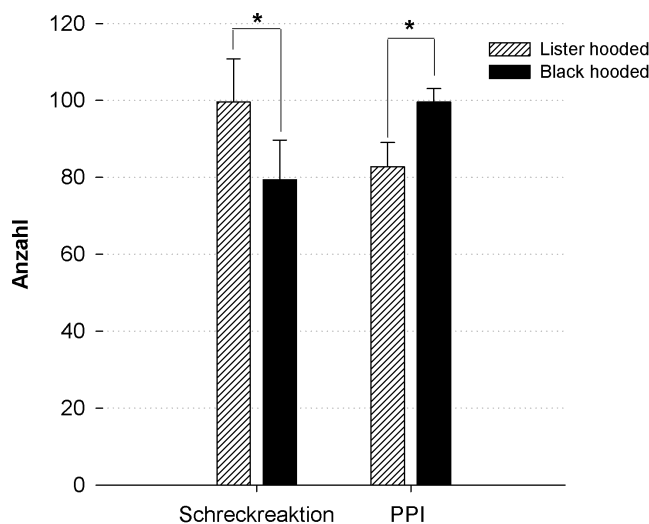


Abbildung 34: Anzahl der Schreckreaktionen und PPI-Ereignisse.

Lister hooded-Ratten erschrecken signifikant häufiger als Black hooded-Ratten (Amplitude nach alleiniger Präsentation eines Schreckreizes >30 mV bzw. nach kombinierter Präsentation von Präpuls und Schreckreiz $PPI < 15\%$, $p = 0,018$), während eine PPI ($PPI > 15\%$) seltener auftrat ($p = 0,002$).

Daraus resultierte ein negatives prozentuale Verhältnis von Schreckreaktionen und PPI bei Lister hooded (MW \pm STABW = -9,01 \pm 8,92 %) sowie ein positives für Black hooded Ratten (MW \pm STABW = 11,53 \pm 7,79%).

4.3 Verhaltens-PET

Während der Kontrollbedingung (nur Hintergrundrauschen) unterschied sich die metabolische Aktivität zwischen den Rattenstämmen um mehr als 5 % in verschiedenen Arealen des zentralen auditorischen Systems (*Colliculus inferior* (IC), *Corpus geniculatum mediale* (MG), ventraler und dorsaler *Lemniscus lateralis* (VLL/DLL) und *Nucleus olivaris superior* (SOC)) sowie im *Colliculus superior* (SC) und der *Substantia nigra* (SN). Die Signifikanz wurde zunächst mittels t-Tests für unabhängige Stichproben (bei normalverteilten Daten) bzw. Kolmogorov-Smirnov-Test (K-S-Test; bei den nicht normalverteilten Daten (rechten SC)) ermittelt. Nach Korrektur der p-Werte (False Discovery Rate (FDR)) war nur noch die metabolische Aktivität des linken IC der besser hörenden Ratten (Black hooded) signifikant höher ($p = 0,013$) im Vergleich zu den schlechter hörenden Ratten (Lister hooded), während die Aktivität im rechten IC nur tendenziell erhöht war ($p = 0,053$). Aufgrund dessen kann nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede im IC auch während der Testbedingung auf die unterschiedliche Hörfähigkeit und nicht auf Unterschiede in der PPI-Vermittlung zurückzuführen sind. Folglich wurde die IC-Aktivität in der Testbedingung nicht ausgewertet. Die genaue Statistik ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Areal	Veränderung [%]	t-Wert	unkorrigierter p-Wert	korrigierter p-Wert
MG (links)	+16,5	3,0	0,017	0,063
SOC (rechts)	+15,8	1,8	0,111	0,122
VLL (links)	-13,6	-2,8	0,022	0,061
IC (links)	+12,4	4,8	0,001	0,013
IC (rechts)	+10,4	3,4	0,010	0,053
SN (rechts)	+9,9	2,0	0,081	0,111
DLL (links)	-8,3	-2,3	0,051	0,094
SC (links)	+7,1	2,4	0,041	0,090
SN (links)	+7,1	1,7	0,125	0,125
MG (rechts)	+5,8	2,0	0,080	0,126
SC (rechts)	+5,3	1,3	0,082	0,100

Tabelle 3: Statistik der Areale, deren metabolische Aktivität sich während der Kontrollbedingung zwischen beiden Rattenstämmen mehr als 5 % unterschied.

Für alle Areale ist die metabolische Aktivitätsdifferenz, der t-Wert (t-Test für unabhängige Stichproben bzw. *: Z-Wert des K-S-Tests) sowie der resultierende p-Wert (unkorrigiert und korrigiert) angegeben. Abk.: IC: *Colliculus inferior*, MG: *Corpus geniculatum mediale*, VLL/DLL: ventraler/ dorsaler *Lemniscus lateralis*, SOC: *Nucleus olivaris superior*, SC:

Colliculus superior, SN: *Substantia nigra*.

Graphisch sind die metabolischen Unterschiede zwischen den beiden Rattenstämmen in der Kontrollbedingung in Abbildung 35 a dargestellt.

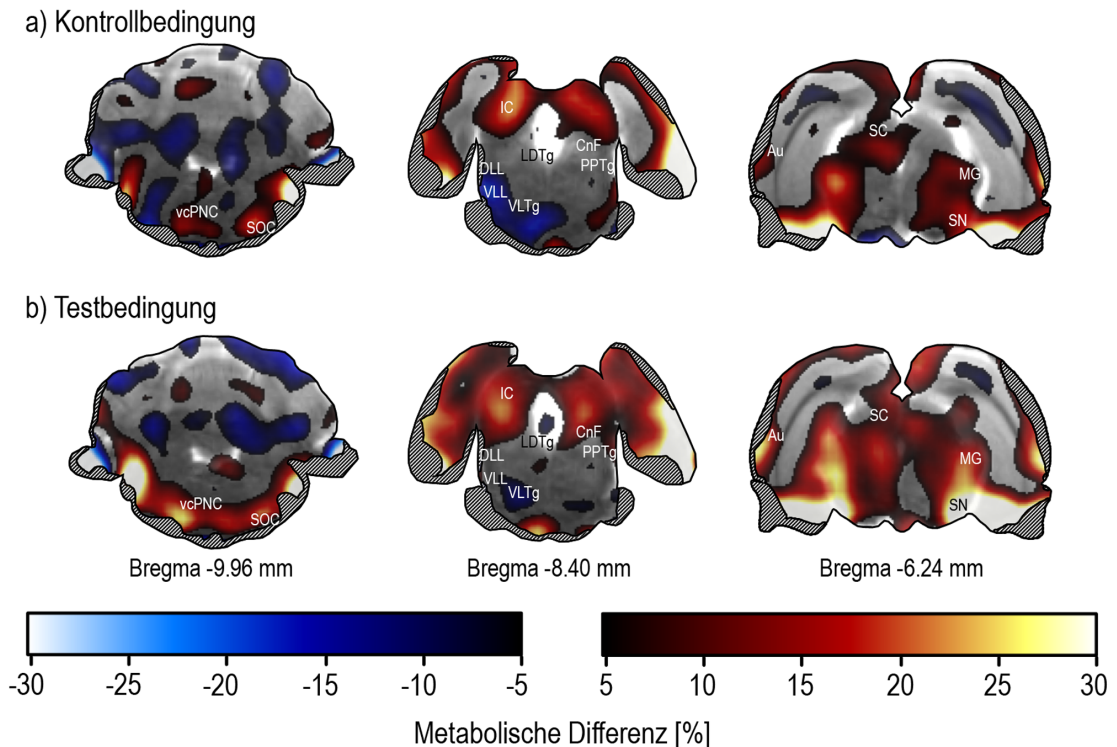


Abbildung 35: Mittelwert der metabolischen Aktivitätsdifferenzen von Black und Lister hooded-Ratten während der Kontroll- (a) und der Testbedingung (b).

Die Differenzen in der Gehirnaktivität beider Rattenstämme (Berechnung vgl. 3.11.1) sind farblich kodiert dargestellt. Negative Werte (blau) zeigen an, dass die metabolische Aktivität bei Lister hooded größer war als bei Black hooded-Ratten. Areale, die bei Black hooded Ratten eine höhere Aktivität aufwiesen, sind rot (positive Werte) dargestellt. Je heller die Farbkodierung, desto größer der Unterschied. Die gestreiften Bereiche wurden nicht analysiert, da in diesen Arealen Einstrahlungen von außerhalb des Gehirns (Kaumuskel, Drüsen) nicht ausgeschlossen werden konnten. Während der Kontrollbedingung (Hintergrundrauschen) unterschied sich die metabolische Aktivität der beiden Rattenstämme in Arealen des zentralen auditorischen Systems. Black hooded-Ratten (niedrige Hörschwelle) wiesen im Vergleich zu Lister hooded-Ratten (hohe Hörschwelle) eine signifikant höhere Aktivität im *Colliculus inferior* (IC) auf. Aber auch in anderen auditorischen Arealen wie dem *Nucleus olivaris superior* (SOC), dem dorsalen und ventralen *Lemniscus lateralis* (DLL, VLL) sowie dem *Corpus geniculatum mediale* (MG) wurden tendentielle Unterschiede beobachtet. Die Aktivitätsdifferenz des auditorischen Kortex (Au) lag unter 5 %, wobei berücksichtigt werden muss, dass aufgrund von Einstrahlungen nur ein Teil dieses Areals ausgewertet werden konnte.

Während der Testbedingung war die Aktivität des *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg) in Lister hooded-Ratten signifikant erhöht. Black hooded-Ratten wiesen hingegen im *Colliculus superior* (SC), *Nucleus cuneiformis* (CnF) und der *Substantia nigra* (SN) eine signifikant höhere metabolische Aktivität auf. Der linke ventrocaudale *Nucleus reticularis pontis caudalis* (vcPnC) und der rechte *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg) waren tendenziell in Black hooded-Ratten stärker aktiv. Es wurde kein Unterschied in der Aktivierung des *Nucleus tegmentalis pedunculo-pontinus* (PPTg) beobachtet.

Während der Testbedingung durchliefen die Tiere das PPI-Paradigma. Die unterschiedliche Reaktion auf die Präsentation von Schreckreizen und einer Kombination von Präpuls und Schreckreizen spiegelte sich nicht nur im Verhalten wider (vgl. 4.2), sondern äußerte sich auch in metabolischen Aktivitätsdifferenzen. Während bei Black hooded-Ratten die Aktivität im linken *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg) verglichen mit Lister hooded-Ratten erniedrigt war (-9,3 %), war die metabolische Aktivität in den folgenden Arealen um mehr als 5 % erhöht: im linken ventrocaudalen *Nucleus reticularis pontis caudalis* (vcPnC), im *Colliculus superior* (SC), im rechten *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg), im *Nucleus cuneiformis* (CnF) und der *Substantia nigra* (SN). Nach p-Wert Korrektur (FDR) waren die metabolischen Unterschiede zwischen den Rattenstämmen noch in folgenden Arealen signifikant: VLTg, SC, CnF und SN. Die genauen statistischen Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Areal	Veränderung [%]	t-Wert	unkorrigierter p-Wert	korrigierter p-Wert
SN (rechts)	+18,9	4,0	0,004	0,009
SN (links)	+17,5	3,7	0,006	0,009
CnF (links)	+12,5	5,0	0,001	0,005
CnF (rechts)	+9,6	3,7	0,006	0,008
SC (links)	+9,4	3,7	0,006	0,008
VLTg (links)	-9,3	-4,2	0,003	0,009
vcPnC (links)	+9,1	1,8	0,119	0,134
SC (rechts)	+8,9	5,4	0,001	0,006
LDTg (rechts)	+5,1	1,0*	0,329	0,329

Tabelle 4: Statistik für die Areale, bei denen sich die metabolische Aktivität während der Testbedingung zwischen den beiden Rattenstämmen um mehr als 5 % unterschied.

Für alle Areale ist die metabolische Aktivitätsdifferenz, der t-Wert (t-Test für unabhängige Stichproben bzw. *: Z-Wert, des K-S-Tests) sowie der resultierende p-Wert (unkorrigiert) und der korrigierte p-Wert nach

FDR angegeben. Abk.: VLTg: *Nucleus ventrolateralis tegmentalis*, vcPnC: ventrocaudaler *Nucleus reticularis pontis caudalis*, SC: *Colliculus superior*, LDTg: *Nucleus tegmentalis posterolateralis*, CnF: *Nucleus cuneiformis*, SN *Substantia nigra*.

Allerdings unterschied sich die Aktivität zwischen den beiden Rattenstämmen nicht in anderen Arealen, die für die Vermittlung der Schreckreaktion und der PPI als relevant angesehen werden: dem rechten vcPnC, rechten VLTg, linken LDTg, dem *Nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (PPTg), dem gesamten *Nucleus reticularis pontis caudalis* (PnC) sowie dem *Nucleus reticularis pontis oralis* (PnO).

Graphisch sind die Aktivitätsdifferenzen in Abbildung 35 b dargestellt. Des Weiteren können die Unterschiede zwischen Black und Lister hooded Ratten während des PPI-Paradigmas in der t-Wert-Karte (Abbildung 36) genauer betrachtet werden.

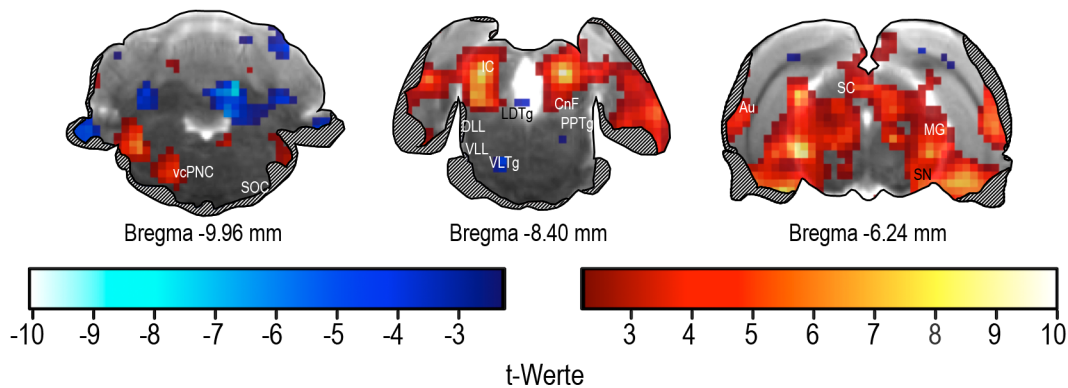


Abbildung 36: t-Wert-Karte des voxel-weisen Vergleichs der Gehirnaktivität beider Rattenstämme während der Testbedingung.

Angegeben sind alle Voxel, deren t-Werte (Berechnung vgl. 3.11.1) einem p-Wert von kleiner 0,05 entsprechen ($t > \pm 2,3$). Positive t-Werte sind rot dargestellt und geben an, dass die metabolische Aktivität in Black hooded-Ratten signifikant größer war. Voxel die in Lister hooded Ratten eine signifikant höhere Aktivität aufwiesen, besitzen einen negativen t-Wert und sind blau dargestellt. Je heller die Farbe, desto größer der t-Wert und desto kleiner der zugehörige p-Wert (z.B. $t \geq 3,36$, $p \leq 0,01$). Die gestreiften Bereiche wurden nicht analysiert, da in diesen Arealen Einstrahlungen von außerhalb des Gehirns (Kaumuskeln, Drüsen) nicht ausgeschlossen werden konnten. Die t-Wert-Karte spezifiziert die Ergebnisse der VOI-Analyse, da nur exakt die Voxel dargestellt sind, die während der PPI in den beiden Rattenstämmen signifikant unterschiedlich aktiviert waren.

Abk.: vcPnC: ventrocaudaler *Nucleus reticularis pontis caudalis*, SOC: *Nucleus olivaris superior*, IC: *Colliculus inferior*, MG: *Corpus geniculatum mediale*, VLL/DLL: ventraler/ dorsaler *Lemniscus lateralis*, VLTg: *Nucleus ventrolateralis tegmentalis*, , LDTg: *Nucleus tegmentalis posterolateralis*, PPTg: *Nucleus tegmentalis pedunculo pontinus*, CnF: *Nucleus cuneiformis*, SC: *Colliculus superior*, SN: *Substantia nigra*.

Für die gut hörenden Black hooded-Ratten wurde zudem die Testbedingung direkt mit der Kontrollbedingung verglichen. Während der Testbedingung war die Aktivität in den folgenden Arealen um mehr als 5 % erhöht: im rechten *Nucleus reticularis pontis caudalis* (PnC) und vcPnC, im *Nucleus cuneiformis* (CnF) und der *Substantia nigra* (SN). Nach statistischer Analyse der Differenzen mittels t-Tests für eine Stichprobe (Vergleich gegen Testwert $\mu = 1$) und anschließender FDR war nur noch die Aktivität im linken CnF während der Testbedingung signifikant erhöht (Statistik vgl. Tabelle 5).

Dagegen war die metabolische Aktivität im linken PnC und vcPnC, sowie im *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg), *Colliculus inferior* (IC), *Colliculus superior* (SC), *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg) sowie *Nucleus tegmentalis pedunculo pontinus* (PPTg) in Kontroll- und der Testbedingung vergleichbar.

Areal	Veränderung [%]	t-Wert	unkorrigierter p-Wert	korrigierter p-Wert
vcPnC (rechts)	+10,4	1,9	0,127	0,127
SN (links)	+8,4	2,3	0,083	0,146
CnF (rechts)	+8,0	3,0	0,038	0,077
CnF (links)	+7,6	13,1	0,000	0,001
PnC (rechts)	+7,5	3,1	0,035	0,104
SN (rechts)	+5,5	2,0	0,122	0,124

Tabelle 5:
Statistik der Areale von Black hooded-Ratten, deren metabolische Aktivität sich zwischen Kontroll- und Testbedingung um mehr als 5 % unterschied.

Für alle Areale ist die metabolische Aktivitätsdifferenz, der t-Wert (t-Test für unabhängige Stichproben) sowie der resultierende p-Wert (unkorrigiert) und der korrigierte p-Wert nach FDR

angegeben. Abk.: (vc)PnC: (ventrocaudaler) *Nucleus reticularis pontis caudalis*, CnF: *Nucleus cuneiformis*, SN *Substantia nigra*.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 sowohl als Mittelwert der prozentualen Veränderung der metabolischen Aktivität (a) als auch als t-Wert-Karte (b) graphisch dargestellt.

Zusätzlich wurden die Verhaltensergebnisse mit den signifikanten metabolischen Veränderungen korreliert. Die Pearson-Korrelation ergab, dass die Aktivität im linken *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* signifikant negativ mit dem prozentualen Anteil an Schreckreaktionen und PPI-Ereignissen korreliert war ($r = -0,76$; $p = 0,010$). Das heißt, die Aktivität dieses Kerns war um so höher, je mehr Schreckreaktionen ein Tier durchlebte (und desto kleiner das Verhältnis von PPI zu Schreckreaktionen ausfiel, vgl. 3.5.4.1). Auf der anderen Seite war die metabolische Aktivität des *Nucleus cuneiformis* (links: $r = 0,85$; $p = 0,002$; rechts $r = 0,82$; $p = 0,004$) und der rechten *Substantia nigra* ($r = 0,70$; $p = 0,025$) positiv mit diesem Quotienten korreliert. Das heißt je häufiger eine Präpulsinhibition stattfand, desto höher war die Aktivität in diesen Kerngebieten.

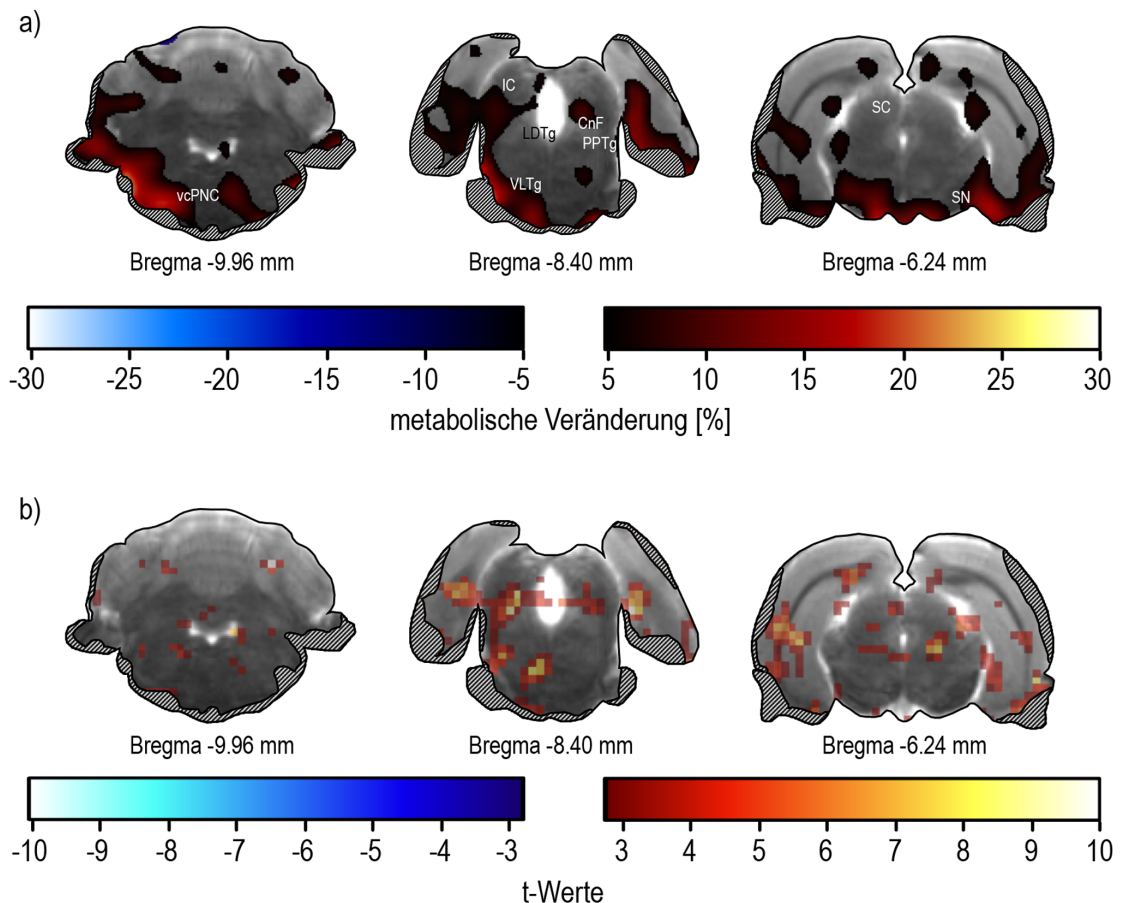


Abbildung 37: Vergleich der metabolischen Aktivität während der Kontroll- und der Testbedingung in Black hooded Ratten.

a) Mittelwert der prozentualen Veränderung der metabolischen Aktivität. Die Unterschiede in der Gehirnaktivität während der Kontroll- und Testbedingung (Berechnung vgl. 3.11.1) sind farbkodiert dargestellt. Negative Werte (blau) zeigen an, dass die metabolische Aktivität während der Kontrollbedingung höher war. Areale, die während der Testbedingung stärker aktiv waren, sind rot (positive Werte) dargestellt. Je heller die Farbkodierung, desto größer der Unterschied. Die gestreiften Bereiche wurden nicht analysiert da in diesen Arealen Einstrahlungen von außerhalb des Gehirns (Kaumuskeln, Drüsen) nicht ausgeschlossen werden konnten.

Während der Testbedingung war vor allem die Aktivität im linken *Nucleus cuneiformis* (CnF) signifikant erhöht. Des Weiteren wurde eine gesteigerte Aktivität im rechten *Nucleus reticularis pontis caudalis* (vcPnC) und in der rechten und linken *Substantia nigra* (SN) beobachtet. Allerdings waren diese Aktivitätsunterschiede von über 5 % nur vor der FDR-Korrektur für den rechten CnF und vcPnC signifikant, aber nicht für die SN. Die Aktivität des *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg), *Nucleus tegmentalis pedunculo-pontinus* (PPTg), *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg), *Colliculus inferior* (IC) und des *Colliculus superior* (SC) unterschied sich hingegen nicht zwischen beiden Bedingungen.

5. Diskussion PPI-PET-Studie

Die Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Areale zu identifizieren, die bei gesunden, unbehandelten Ratten in die Vermittlung der Schreckreaktion und der Präpulsinhibition involviert sind. Die Ergebnisse der Studie dienen zudem als Grundlage für die Analyse der PET-Ergebnisse in der pubertären Δ^9 -THC-Studie.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse des Hörtests und die PPI-Verhaltensdaten diskutiert. Die neurobiologischen Grundlagen der Schreckreaktion und PPI wurden bislang nur mittels invasiver Methoden (z. B. Läsionen, Substanzgabe, elektrische Stimulation) und genetischer Ansätze untersucht (Swerdlow et al., 2000; Swerdlow et al., 2001; Geyer et al., 2002; Schwabe et al., 2007). Studien, die wie die vorliegende die bisher postulierten zugrundeliegenden neuronalen Prozesse an unbehandelten Tieren überprüfen, fehlen allerdings noch immer. Daher wird im Anschluss genauer diskutiert, in wie weit die PET-Ergebnisse die bisherigen Erkenntnisse bestätigen und wie sie diese ergänzen.

5.1. Hörtest und Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die in der Studie verwendeten Black und Lister hooded-Ratten hatten ein unterschiedliches Hörvermögen. Die Hörschwelle der Black hooded-Ratten entsprach der Literatur (Backoff & Caspary, 1994; Brandt-Lassen et al., 2000; Popelar et al., 2006), während die der Lister hooded-Ratten um etwa 40 dB erhöht war. Die Lautstärke des Hintergrundrauschens und sämtlicher Stimuli lag aber oberhalb der Hörschwelle der Lister hooded-Ratten. Dennoch spiegelten sich die unterschiedlichen Hörfähigkeiten sowohl in der Schreckreizamplitude, dem Ausmaß der PPI, als auch in der Anzahl der Schreckreaktionen und PPI-Ereignisse wider. Die Lister hooded-Ratten erschreckten sich häufiger und die mittlere Schreckreizamplitude war verglichen mit Black hooded-Ratten niedriger. Dies lag daran, dass sie zum einen den Schreckreiz nicht so laut wahrnahmen und zum anderen die leiseren Präpulse keine stabile PPI auslösten. Wie auch in der Literatur beschrieben, hing das Ausmaß der PPI bei beiden Stämmen signifikant von der Präpuls lautstärke ab: je lauter der Präpuls, desto größer war die PPI (Hoffman & Wible, 1970; Ison, 1978; Reijmers & Peeters, 1994). In der vorliegenden Studie führte nur der lauteste Präpuls bei beiden Stämmen zu einer vergleichbaren PPI. Ansonsten

war die PPI bei den gut hörenden Black hooded-Ratten stärker ausgeprägt. Das Ausmaß der PPI scheint folglich davon abhängig zu sein, wie stark sich der Präpuls vom Hintergrundrauschen abhebt. Auch eine humane Studie belegt, dass das Signal-Rausch-Verhältnis weitaus wichtiger ist als die reine Präpuls lautstärke (Franklin et al., 2007). Unter den in der Studie vorhandenen Bedingungen kann mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von 1,3 bei beiden Rattenstämmen eine maximale PPI zu erzeugt werden. Allerdings muss bei Lister hooded-Ratten das Verhältnis mindestens 1,11 betragen, um eine stabile PPI auszulösen, während bei gut hörenden Black hooded-Ratten bereits ein Verhältnis von 1,04 ausreicht. Unterschiedliche PPI-Werte in der Literatur sind daher vermutlich eher auf die verschiedenen Hörfähigkeiten der getesteten Tiere zurückführen als auf andere genetische Unterschiede zwischen den Rattenstämmen.

5.2. Verhaltens-PET

Die unterschiedlichen Hörfähigkeiten der beiden Stämme spiegelten sich nicht nur im Verhalten sondern auch in der Glukoseutilisation im zentralen auditorischen System wider. Während der Kontrollbedingung (Hintergrundrauschen) war die metabolische Aktivität vor allem im *Colliculus inferior* (IC) bei den gut hörenden Black hooded-Ratten gegenüber den Lister hooded-Ratten erhöht.

Daraus lässt sich ableiten, dass die metabolische Aktivität der beteiligten Areale auch durch Unterschiede in der Anzahl der Schreckreaktionen und dem Ausmaß der PPI entsprechend beeinflusst wird. Daher wurden die Areale, in denen die metabolische Aktivität mit der Anzahl der Schreckreaktionen korrelierte, als mit der Vermittlung der Schreckreaktion assoziiert klassifiziert. Umgekehrt wurden Areale mit einer Korrelation zwischen der metabolischen Aktivität und der Anzahl der PPI-Ereignisse mit der Vermittlung der PPI in Verbindung gebracht.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen aus invasiven Studien geht man momentan davon aus, dass der *Nucleus reticularis pontis caudalis* (PnC) die Schlüsselstruktur bei der Vermittlung der Schreckreaktion darstellt. Dieser Kern erhält Eingang von den *Nuclei cochlearis* und projiziert auf spinale Motoneurone (Yeomans & Frankland, 1996; Koch, 1999). In der vorliegenden Studie war die Aktivität des gesamten PnC bei beiden Stämmen nahezu identisch (Differenz < 5 %), aber Subregionen des Kerns unterschied-

den sich deutlicher. Es gibt Hinweise darauf, dass vor allem die sog. Riesenneurone des ventrocaudalen PnC (vcPnC) für die Vermittlung der akustischen Schreckreaktion relevant sind (Koch et al., 1992; Lingenhohl & Friauf, 1994; Yeomans & Frankland, 1996; Schmid et al., 2010). Tendenziell war der linke vcPnC bei Black hooded-Ratten stärker aktiviert als bei Lister hooded-Ratten. Dies steht zunächst im Gegensatz zu der Theorie, dass die PPI auf einer Herunterregulierung des vcPnC basiert, da bei Tieren, die mehr und stärkere PPI-Ereignisse erleben, dann die metabolische Aktivität geringer sein sollte. Die ^{18}F FDG-Aufnahme spiegelt aber die synaptische Eingangsaktivität wider und erlaubt keine Aussage über die Anzahl der weitergeleiteten Aktionspotentiale (Raichle & Mintun, 2006). Somit ist die erhöhte metabolische vcPnC-Aktivität vermutlich durch zusätzliche inhibitorische Eingänge (z. B. *Substantia nigra* oder *Nucleus cuneiformis*, s. u.) bedingt.

Des Weiteren war bei Lister hooded-Ratten die metabolische Aktivität im *Nucleus ventrolateralis tegmentalis* (VLTg, entspricht der posterioren Hälfte des *Nucleus reticularis pontis oralis* (PnO)) während der Testbedingung erhöht. Da die Aktivität des Kernes zusätzlich mit der Anzahl der Schreckreaktionen korreliert war, scheint diese Struktur mit der Vermittlung der Schreckreaktion, aber nicht mit der Vermittlung der PPI assoziiert zu sein. Auch in der Literatur wurde bereits vermutet, dass dieser Kern eine Rolle bei sensomotorischen Verhaltensweisen spielt, da er wie der PnC Eingänge von den *Nuclei cochleares* (Kandler & Herbert, 1991) erhält und sowohl auf den vcPnC (Yeomans & Frankland, 1996), als auch auf den *Nucleus motorius nervo facialis* (Herbert et al., 1997) projiziert. Somit könnte der VLTg entweder nur die Gesichtskomponenten der Schreckreaktion (Anspannung der Gesichtsmuskeln etc.) vermitteln oder auch über die Aktivierung des vcPnC die Gesamtkörperreaktion beeinflussen. Da kleine elektrolytische Läsionen des VLTg keinen Einfluss auf die Schreckreaktionsamplitude hatten, die wie in dieser Studie als Gesamtkörperreaktion über ein Piezoelement gemessen wurde (Lee et al., 1996), ist anzunehmen, dass die Aktivierung des VLTgs hauptsächlich die Gesichtskomponenten kontrolliert.

Bisher wurde postuliert, dass sich das PPI-Netzwerk aus dem *Colliculus inferior* (IC) und *superior* (SC), dem *Nucleus tegmentalis pedunculopontinus* (PPTg) und *Nucleus tegmentalis posterolateralis* (LDTg) sowie der *Substantia nigra* (SN) zusammensetzt.

Dabei scheint der IC Informationen zwischen dem auditorischen System und dem PPI-Netzwerk zu vermitteln (Fendt et al., 2001). Große IC-Läsionen führten zu einer Erhöhung der Schreckreaktionsamplitude und eine PPI konnte nur noch visuell, aber nicht mehr akustisch ausgelöst werden (Leitner & Cohen, 1985). Kleinere Läsionen schwächten hingegen nur das Ausmaß der PPI ab und hatten keinen Effekt auf die Amplitude der Schreckreaktion (Li et al., 1998). Da sich die Aktivierung des IC bereits in der Kontrollbedingung zwischen den beiden Stämmen unterscheidet, ist nicht auszuschließen, dass dies die Ergebnisse der Testbedingung beeinflusst. Daher wurde die IC-Aktivität beider Stämme während der Testbedingung nicht verglichen. Beim Vergleich der IC-Aktivität zwischen der Kontroll- und der Testbedingung bei Black hooded-Ratten ergab sich aber kein Aktivitätsunterschied. Dies könnte dadurch begründet sein, dass der IC als wichtige Struktur des zentralen auditorischen Systems in beiden Bedingungen aktiv war und die Vermittlung der PPI nur zu einer vergleichsweise kleinen, im PET nicht detektierbaren metabolischen Änderung führte. Einige Studien gehen davon aus, dass der IC die Signale des auditorischen Systems zunächst an den SC weiterleitet (Koch & Schnitzler, 1997; Fendt et al., 2001; Yeomans et al., 2006), der somit das zweite relevante Areal in der Vermittlung der akustischen PPI darstellen würde. Der SC ist mit der sensomotorischen Integration während Abwehrreaktionen (Dean et al., 1989) assoziiert und könnte somit auch die PPI vermitteln. In der vorliegenden Studie wurde in der Testbedingung eine signifikant höhere SC-Aktivität bei Black hooded-Ratten beobachtet, die im Vergleich zu Lister hooded-Ratten sowohl mehr als auch stärkere PPI-Ereignisse erlebten. Allerdings korrelierte die ¹⁸FDG-Aufnahme nicht mit der Anzahl der PPI-Ereignisse. Dies ist verwunderlich, da SC-Läsionen das Ausmaß der PPI reduzierten, ohne dabei die Schreckreaktionsamplitude zu verändern (Fendt et al., 1994). Des Weiteren führte die Inhibition der GABA-Aktivität innerhalb des SC zu einer Verstärkung der PPI ohne die Amplitude der Schreckreaktion zu beeinflussen (Fendt, 1999). Die fehlende Korrelation in der vorliegenden Studie deutet daraufhin, dass im intakten Organismus die Rolle des SC möglicherweise nicht so bedeutsam ist. Dies wird auch dadurch unterstützt, dass der PPTg, der Eingänge vom SC erhält (Redgrave et al., 1987), entgegen bisheriger Annahmen nicht in die Vermittlung der PPI involviert zu sein scheint (Koch, 1999; Fendt et al., 2001). Läsionen des PPTg (Swerdlow & Geyer, 1993; Kodosi & Swerdlow, 1997), Infusionen eines GABA-Agonisten (Diederich & Koch,

2005) und neurotoxische Läsionen der cholinergen PPTg Neurone (Koch et al., 1993) führten zu einer Reduktion der PPI. In der vorliegenden Studie war die metabolische Aktivität des PPTg während der Testbedingung bei beiden Stämmen identisch. Auch die Aktivität des LDTg unterschied sich nicht, obwohl eine andere Studie zeigte, dass Läsionen mit Ibotensäure die PPI reduzierten (Jones & Shannon, 2004).

Die genauere Betrachtung der PET-Daten ergab allerdings, dass der CnF, eine Struktur unmittelbar dorsal zum PPTg und lateral zum LDTg, bei Black hooded-Ratten signifikant stärker aktiviert war als bei Lister hooded-Ratten. Das Ausmaß der Aktivierung korrelierte dabei positiv mit der Anzahl der PPI-Ereignisse. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Saitoh und Kollegen (1987) überein. Sie zeigten, dass eine elektrische CnF-Stimulation die Schreckreaktion inhibiert und die Stärke dieser Inhibition negativ mit der Entfernung der Stimulationselektrode vom CnF korreliert war. Elektrolytische Läsionen des lateralen tegmentalens Areal (CnF eingeschlossen) reduzierten ebenfalls die PPI (Leitner et al., 1981) und erhöhten die Schreckreaktionsamplitude (Swerdlow & Geyer, 1993). Daher ist es denkbar, dass nicht der PPTg, sondern der angrenzende CnF, bei unbehandelten Tieren eine wichtige Rolle bei der PPI-Vermittlung spielt. Die Tatsache, dass die Schreckreaktion eine protektive Verhaltensreaktion z. B. als Schutz vor Verwundung durch einen Feind darstellt, und der CnF durch Stimuli aktiviert wird, die mit Abwehrverhalten verbunden sind (Dielenberg et al., 2001; McGregor et al., 2004; Walker & Winn, 2007), unterstützt ebenfalls die Theorie, dass der CnF bei der Regulation der Schreckreaktion beteiligt ist.

Neben dem CnF war auch die Aktivität der SN signifikant mit der Anzahl der PPI-Ereignisse korreliert. Dies steht im Einklang mit der Literatur, da Läsionen der SN mit Ibotensäure die PPI, vermutlich durch die Eliminierung der GABAergen Projektionen auf den PnC, erniedrigten (Koch et al., 2000). Neben dieser direkten Inhibition des PnC könnte eine Aktivierung theoretisch auch indirekt über den SC erfolgen, auf den die SN ebenfalls projiziert (Bentivoglio et al., 1979).

Die Verhaltens-PET-Daten unterstützen somit die Rolle des vcPnC als Integrationsstruktur zwischen Netzwerkstrukturen, die die Schreckreaktion und PPI vermitteln. Auch die Bedeutung des VLTg für die Schreckreaktion wird durch die Daten bestätigt. Außerdem sprechen die Ergebnisse für die Hypothese, dass die SN bei der PPI-Vermittlung involviert ist. Im Gegensatz dazu konnten in dieser Studie keine Belege gefunden werden,

dass SC, PPTg und LDTg im intakten Organismus eine entscheidende Rolle bezüglich der PPI spielen. Die metabolischen Aktivitätsmuster deuten vielmehr darauf hin, dass der CnF, eine zum PPTg und LDTg angrenzende Struktur, eine Schlüsselfunktion bei der PPI-Vermittlung einnimmt.

Generell ist es nicht verwunderlich, dass Läsionsstudien und bildgebende Untersuchungen von unbehandelten, gesunden Tieren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen, da in Läsionsstudien mögliche funktionelle Kompensationen und sekundäre Schädigungen nicht gut kontrollierbar sind. Das PPI-Verhaltens-PET ist somit eine geeignete Ergänzung zu den bisherigen Läsionsstudien. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um die hier gezeigten Ergebnisse zu untermauern und um das PPI Netzwerk weiter zu entschlüsseln. Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Optimierung der Kontrollbedingung. Mit dem bisherigen Versuchsablauf ist es nur über einen korrelativen Ansatz möglich, Areale, die an der Vermittlung der Schreckreaktion beteiligt sind von denen abzugrenzen, die für die PPI-Vermittlung relevant sind. Für eine Folgestudie ist geplant, eine weitere Kontrollbedingung einzuschließen, in der die Tiere nur Schreckreizen ausgesetzt werden. Dabei muss zum einen gewährleistet werden, dass genug Schreckreize präsentiert werden, damit sich diese neue Bedingung ausreichend von der bisherigen Kontrollbedingung (Hintergrundrauschen) unterscheidet. Zum anderen muss der Stress, dem die Tiere durch die ständige Präsentation von Schreckreizen ausgesetzt sind, berücksichtigt und möglichst gering gehalten werden. Optimal wäre es daher, wenn für jedes Tier die Anzahl der Schreckreize in der neuen Kontrollbedingung an die Anzahl der tatsächlichen Schreckreaktionen in der zuvor durchlaufenen Testbedingung angepasst würde. Vergleicht man dann die Ergebnisse der Testbedingung mit dieser neuen Kontrollbedingung, resultiert daraus das Aktivierungsmuster der Areale, die an der PPI-Vermittlung beteiligt sind.

Zusätzlich zu dem neuronalen Netzwerk, das der PPI-Vermittlung zugrunde liegt, scheint es ein weiteres Netzwerk zu geben, das die PPI moduliert. Nach Erkenntnissen aus invasiven Studien sind dabei folgende Strukturen involviert: *Nucleus accumbens*, ventrales Pallidum, das septohippokampale System, basolaterale Amygdala, medio-dorsaler Thalamus und der mediale präfrontale Kortex.

Man geht davon aus, dass das Modulationssystem die sensomotorische Hemmung reduziert, in dem es über den *Nucleus accumbens* und das ventrale Pallidum auf das PPI-Vermittlungssystem einwirkt (Koch & Fendt, 2003).

In der vorliegenden Studie wurde dieses System noch nicht genauer betrachtet, da die Anzahl der ausgewerteten Areale vorher eingegrenzt wurde, um eine sinnvolle statistische Analyse zu gewährleisten. Je mehr Areale betrachtet werden, desto größer wird der Faktor für die p-Wert-Korrektur und desto unwahrscheinlicher wird es, signifikante Unterschiede zu erfassen. Da dies die erste Studie ist, die die neuronalen Grundlagen der PPI der akustischen Schreckreaktion am unbehandelten Tier untersuchte, wurde zunächst die Auswertung a priori auf die Vermittlung der Schreckreaktion und PPI begrenzt (vgl. 3.11.1). In einer folgenden Studie, soll (unter Verwendung der neuen Kontrollbedingung) auch das PPI-Modulationsnetzwerk untersucht werden, um einen Eindruck davon zu erhalten, welche der postulierten Areale tatsächlich relevant sind.

6. Ergebnisse CBD-URB-Studie

6.1. Verhaltensversuche

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der verschiedenen Verhaltensversuche erläutert. Die Daten wurden im Hinblick auf den Effekt der verschiedenen Behandlungen (Vehikel, Cannabidiol (CBD), URB 597 (URB) und CBD+URB) sowie des Testzeitpunktes (t0, t1) analysiert (2 faktorielle mixed design ANOVA, Faktoren: Testzeitpunkt, Behandlung). Bei einigen Versuchen wurde zusätzlich der Effekt bestimmter Variablen des Verhaltensversuchs untersucht, wie verschiedene Zonen, Durchgänge etc. Diese Analyse erfolgte mittels 3 faktorieller mixed design ANOVA (Faktoren: Testzeitpunkt, Behandlung und die zusätzliche Variable).

Der Testzeitpunkt t0 entspricht dem Verhalten vor Behandlung. Die zweite Verhaltensmessung erfolgte während der Behandlung (t1), wobei die Tiere der CBD-, URB- und CBD+URB-Gruppe einen konstanten Plasmaspiegel der entsprechenden Substanzen aufwiesen (vgl. 3.11.2). Ein Haupteffekt des Testzeitpunktes zeigt an, dass sich (gemittelt über alle Behandlungen) die Ratten beim zweiten Test anders verhalten als beim ersten. Dies kann zwar auf einen Behandlungseffekt zurückzuführen sein, kann aber auch z.B. einen generellen Gewöhnungs-, Alterungseffekt, etc. widerspiegeln. Ein Haupteffekt der Behandlung bedeutet, dass sich die Behandlungsgruppen (gemittelt über die Testzeitpunkte) unterscheiden. Auch dies kann durch die Behandlung verursacht sein, kann aber auch auf a priori-Unterschiede der Gruppen zurückzuführen sein. Die Faktorinteraktion zeigt einen Behandlungseffekt dagegen eindeutig: Der Einfluss des Faktors Testzeitpunkt ist abhängig von der Behandlung und umgekehrt. Welche Behandlung einen Effekt auf das Verhalten gezeigt hat, kann nur über post hoc-Tests geklärt werden.

6.1.1. Open Field

Weder der Testzeitpunkt ($F(1,15) = 3,1$; $p = 0,098$) noch die Behandlung ($F(3,15) = 3,0$; $p = 0,062$) hatten einen Einfluss auf die generelle Lokomotion. Innerhalb von 10 min in der Open Field-Arena legten die Tiere im Mittel 3985 ± 1176 cm zurück. Zudem wurden die zurückgelegten Distanzen in der inneren und in der äußeren Zone verglichen. Da der Levene-Test signifikant war, mussten die Daten zunächst transformiert werden

(1/Wurzel X). Alle Tiere bewegten sich in der inneren Zone signifikant weniger als in der äußeren Zone ($F(1,15) = 142,0$; $p < 0,001$) und zwar unabhängig vom Testzeitpunkt ($F(1,15) = 2,2$; $p = 0,158$) und der Behandlung ($F(3,15) = 1,1$; $p = 0,397$). Da sich somit die Ergebnisse vor und während Behandlung nicht unterschieden, sind in Abbildung 38 nur die Ergebnisse zum Zeitpunkt t1 graphisch dargestellt.

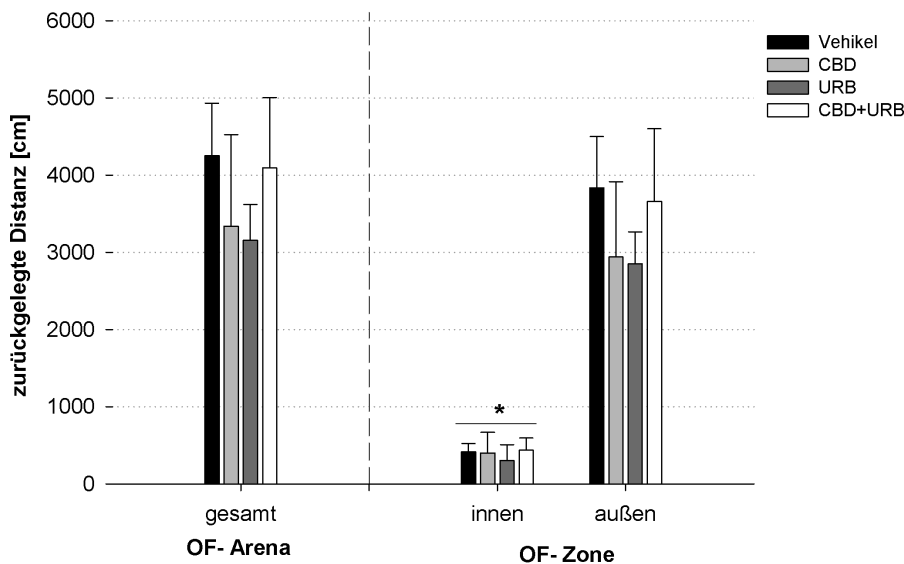


Abbildung 38: Zurückgelegte Distanz im Open Field (OF) Paradigma zum Testzeitpunkt t1.

Links: Zurückgelegte Distanz in der gesamten OF-Arena. Keine der applizierten Substanzen (Vehikel, CBD, URB oder CBD+URB) hatte einen Effekt auf die allgemeine Lokomotion. Die Tiere legten somit unabhängig von der Behandlung in etwa die gleiche Distanz zurück.

Rechts: Zurückgelegte Distanz in der inneren und äußeren Zone der OF-Arena. Alle Tiere bewegten sich unabhängig von der Behandlung in der inneren Zone signifikant weniger als in der äußeren Zone ($p < 0,001$).

Zusätzlich zur zurückgelegten Distanz wurde die Laufgeschwindigkeit der Ratten in der inneren und äußeren Zone verglichen. Weder der Testzeitpunkt ($F(1,15) = 0,1$; $p = 0,790$) noch die Behandlung ($F(3,15) = 0,6$; $p = 0,645$) hatte einen Effekt auf die Geschwindigkeit. Somit wirkte keine der applizierten Substanzen (Vehikel, CBD, URB oder CBD+URB) sedierend oder stimulierend.

Allerdings gab es einen Haupteffekt der Zone (Abbildung 39): die Ratten liefen in der inneren Zone signifikant schneller als in der äußeren Zone ($F(1,15) = 70,0$; $p < 0,001$). Da dies unabhängig vom Testzeitpunkt war, sind in Abbildung 39 nur die Laufgeschwindigkeitsunterschiede in den beiden Zonen zum Zeitpunkt t1 graphisch dargestellt.

stellt. Die Differenz betrug über alle Tiere und beide Zeitpunkte gemittelt $13,5 \pm 7,5$ cm/s.

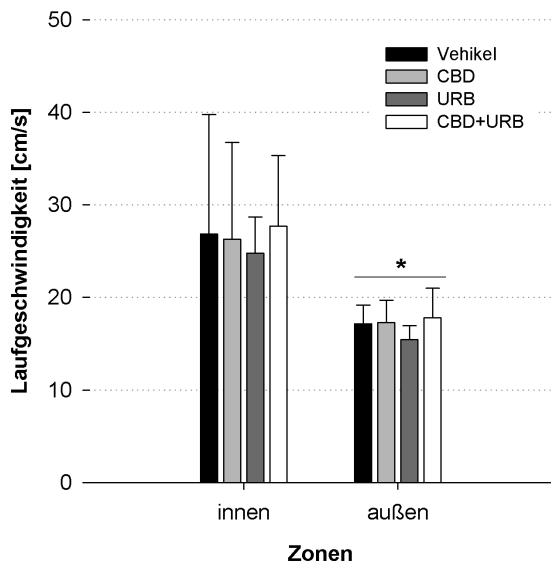


Abbildung 39: Laufgeschwindigkeit in der inneren und äußeren Zone während der Behandlung (t1).

Die Behandlung mit Vehikel, CBD, URB oder CBD+URB scheint keinen Effekt auf die Motorik zu haben. Unabhängig von der Art der Behandlung bewegten sich die Ratten in der äußeren Zone signifikant langsamer und erhöhten ihre Geschwindigkeit, wenn sie sich in der inneren Zone aufhielten ($p < 0,001$).

Des Weiteren wurde die prozentuale Aufenthaltsdauer in den vier äußeren Zonen (unten, oben, links und rechts; Abbildung 40) untersucht. Da der Mauchly-Test für die Faktoren Zone sowie Zone*Messzeitpunkt signifikant war (Zone: $X^2(5) = 26,4$; $p < 0,001$; Zone*Messzeitpunkt: $X^2(5) = 12,7$; $p = 0,027$), wurden die Freiheitsgrade korrigiert (Greenhouse-Geisser Schätzung; Zone: $\epsilon = 0,525$; Zone*Messzeitpunkt: $\epsilon = 0,688$). Die statistische Analyse ergab einen Haupteffekt der Zone ($F(1,574, 23,607) = 47,0$; $p < 0,001$). Geplante einfache Kontraste bestätigten, dass alle Tiere zu beiden Testzeitpunkten unabhängig von der Behandlung ein sog. Homebase-Verhalten zeigten (Abbildung 40 a/b). Das heißt, sie hielten sich in einer äußeren Zone, der unteren Zone, signifikant länger auf als in den anderen drei Zonen (bei allen Kontrasten $p < 0,001$). Es gab keinen Haupteffekt des Testzeitpunktes ($F(1,15) = 3,9$; $p = 0,068$), aber eine signifikante Interaktion von Testzeitpunkt und Zone ($F(2,063, 30,939) = 5,687$; $p = 0,007$; Abbildung 40 c). Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass nur die Aufenthaltsdauer in der rechten Zone zu beiden Testzeitpunkten unverändert blieb ($p = 0,797$). Die Aufenthaltsdauer in der unteren Zone nahm während der Behandlung (t1) signifikant zu ($p = 0,008$) während sie in der linken ($p = 0,013$) und oberen Zone ($p = 0,017$) sank (Abbildung 40 c). Die Art der Behandlung hatte hingegen keinen Effekt auf die Aufenthaltsdauer ($F(3,15) = 0,6$; $p = 0,648$). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass der Levene-Test für einige Variablen (t0 links: $p = 0,029$; t1 unten: $p = 0,026$; t1 rechts:

p = 0,035) signifikant war. Zusammengefasst heißt das, dass alle Tiere unabhängig von der Behandlung ein Homebase-Verhalten zeigten, welches sich bei allen zum Zeitpunkt t1 verstärkte.

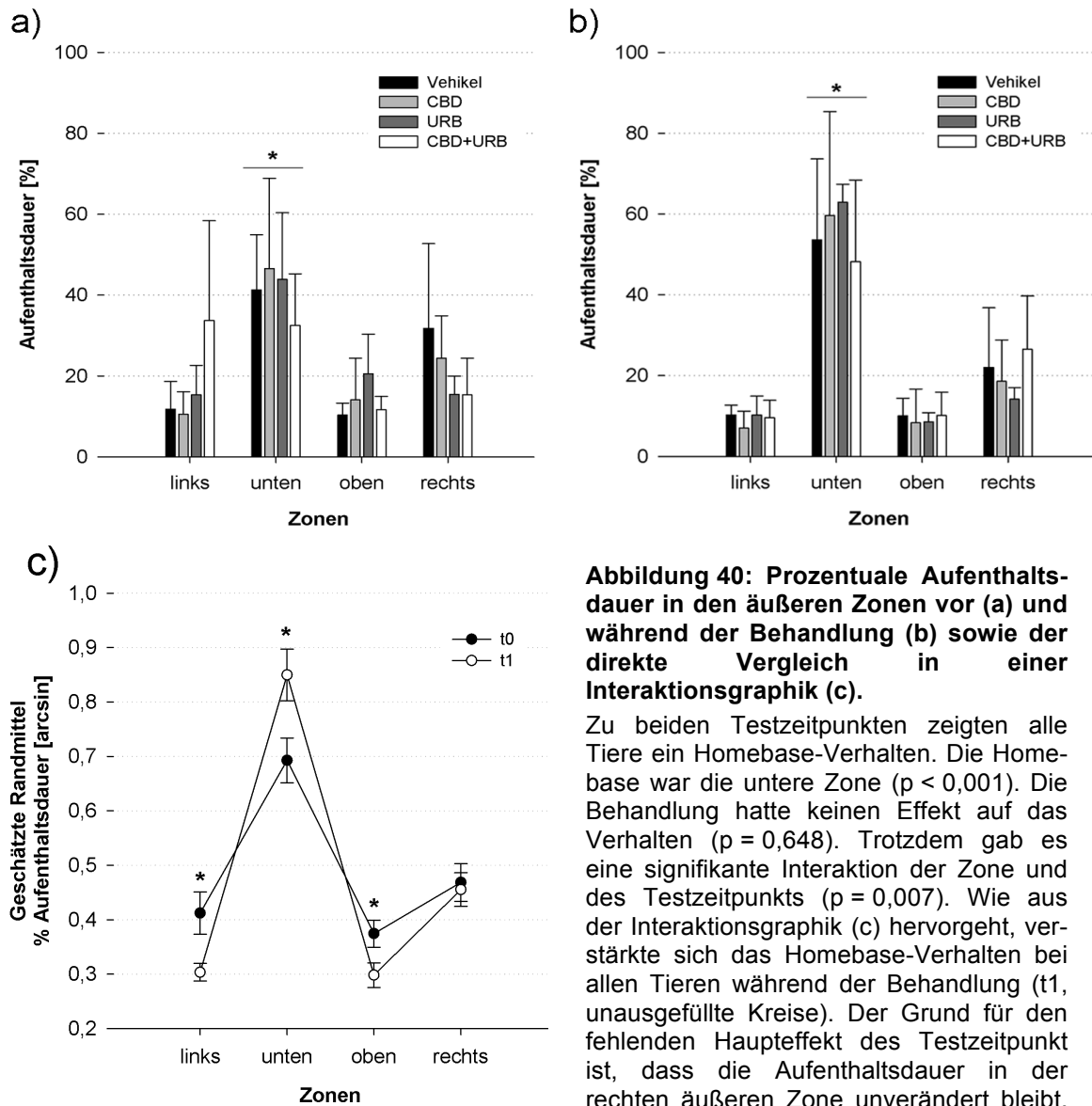


Abbildung 40: Prozentuale Aufenthaltsdauer in den äußeren Zonen vor (a) und während der Behandlung (b) sowie der direkte Vergleich in einer Interaktionsgraphik (c).

Zu beiden Testzeitpunkten zeigten alle Tiere ein Homebase-Verhalten. Die Homebase war die untere Zone ($p < 0,001$). Die Behandlung hatte keinen Effekt auf das Verhalten ($p = 0,648$). Trotzdem gab es eine signifikante Interaktion der Zone und des Testzeitpunkts ($p = 0,007$). Wie aus der Interaktionsgraphik (c) hervorgeht, verstärkte sich das Homebase-Verhalten bei allen Tieren während der Behandlung (t1, unausgefüllte Kreise). Der Grund für den fehlenden Haupteffekt des Testzeitpunkt ist, dass die Aufenthaltsdauer in der rechten äußeren Zone unverändert bleibt.

Im Gegensatz dazu nimmt sie aber im Vergleich zu t0 (schwarz ausgefüllte Kreise) in der linken und oberen Zone ab und in der unteren Zone zu. (Die geschätzten Randmittel entsprechen der Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen zu beiden Testzeitpunkten, gemittelt über die Behandlungen).

Die Behandlung (Vehikel, CBD, URB oder CBD+URB) hatte auch keinen Einfluss auf die Frequenz, mit der die innere Zone der OF-Arena betreten wurde ($F(3,15) = 1,4$; $p = 0,271$). Somit wurde die Ängstlichkeit der Tiere durch keine der Substanzen moduliert. Allerdings hatte der Testzeitpunkt einen signifikanten Effekt auf die Frequenz ($F(1,15) = 7,3$; $p = 0,016$). Da keine signifikante Interaktion von Testzeitpunkt und Be-

handlung vorlag ($F(3,15) = 0,6$; $p = 0,614$), gilt, dass die Frequenz mit der die innere Zone betreten wurde, bei allen Behandlungsgruppen zum Zeitpunkt t1 signifikant geringer war als vor Behandlung (t0; Abbildung 41).

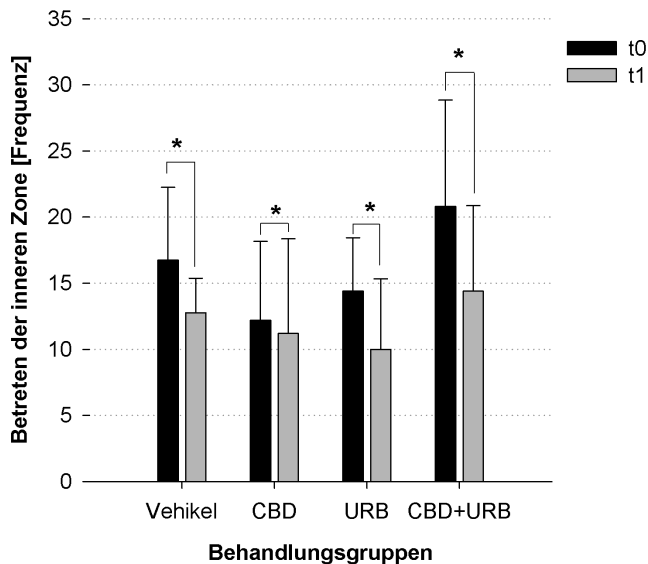


Abbildung 41: Frequenz mit der die innere Zone vor (t0) und während der Behandlung (t1) betreten wurde.

Während der Behandlung betraten alle Tiere die innere Zone der OF-Arena seltener als vor Behandlung ($p = 0,016$). Diese Abnahme war allerdings unabhängig von der applizierten Substanz. Es gab weder einen signifikanten Behandlungseffekt, noch eine signifikante Interaktion von Behandlung und Testzeitpunkt.

6.1.2. Objekterkennung

Weder der Testzeitpunkt ($F(1,15) = 2,7$; $p = 0,118$) noch die Behandlung ($F(3,15) = 0,2$; $p = 0,894$) hatten einen signifikanten Einfluss auf die Explorationsdauer. Während des insgesamt sechsminütigen Versuches (jeweils 3 min pro Durchgang) explorierten alle Tiere die Objekte jeweils im Mittel 111 ± 32 s. Somit verbrachten sie etwa $\frac{1}{3}$ der Zeit mit der aktiven Exploration beider Objekte.

Bei dem Vergleich der Explorationszeit im ersten und zweiten Durchgang ergab sich allerdings eine signifikante Interaktion von Behandlung und Durchgang ($F(3,15) = 3,3$; $p = 0,049$). Der Post hoc-Test Sidak zeigte, dass sich nur die Tiere der CBD+URB-Gruppe sowohl vor als auch nach Behandlung im 2. Durchgang signifikant weniger ausgiebig mit den beiden Objekten beschäftigen ($p = 0,017$; Abbildung 42). Allerdings war der Levene-Test signifikant und keine Transformation zur Verbesserung der Varianzhomogenität erfolgreich, so dass dieses Ergebnis mit Vorbehalt zu betrachten ist.

Da sich die Tiere der CBD-URB-Gruppe sowohl vor als auch während der Behandlung gleich verhielten, lässt sich dennoch sagen, dass keine der verwendeten Substanzen einen Effekt auf das Explorationsverhalten der Tiere hatte.

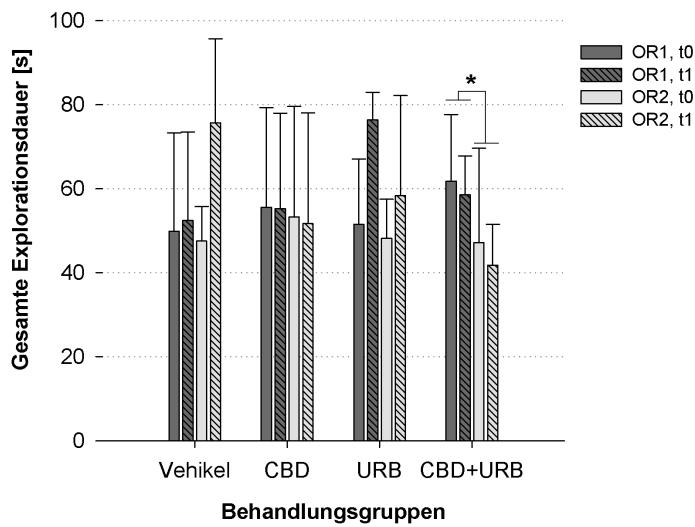


Abbildung 42: Vergleich der gesamten Explorationsdauer beider Versuchsdurchgänge (OR1, OR2) in Abhängigkeit vom Testzeitpunkt (t0, t1) und der Behandlungsgruppe.

Die Explorationsdauer im ersten Durchgang (OR1, zwei gleiche Objekte) ist in dunkelgrau, die im zweiten Durchgang (OR2, ein bekanntes und ein neues Objekt) in hellgrau dargestellt. Alle Tiere verhielten sich vor (t0, keine Streifen) und während der Behandlung (t1, gestreifte Balken) gleich. Allerdings betrachten die Tiere der CBD+URB-Gruppe unabhängig von der Behandlung die Objekte im zweiten Durchgang weniger lange ($p = 0,017$).

Das Verhalten im zweiten Durchgang (OR2) erlaubt einen Rückschluss auf die Arbeitsgedächtnisleistung der Ratten. Die genauere Analyse ergab, dass weder der Testzeitpunkt ($F(1,15) = 0,2$; $p = 0,682$) noch die Behandlung ($F(3,15) = 0,6$; $p = 0,652$) einen Effekt auf die Frequenz hatte, mit der die Tiere zwischen dem bekannten und unbekanntem Objekt wechselten (Abbildung 43 a).

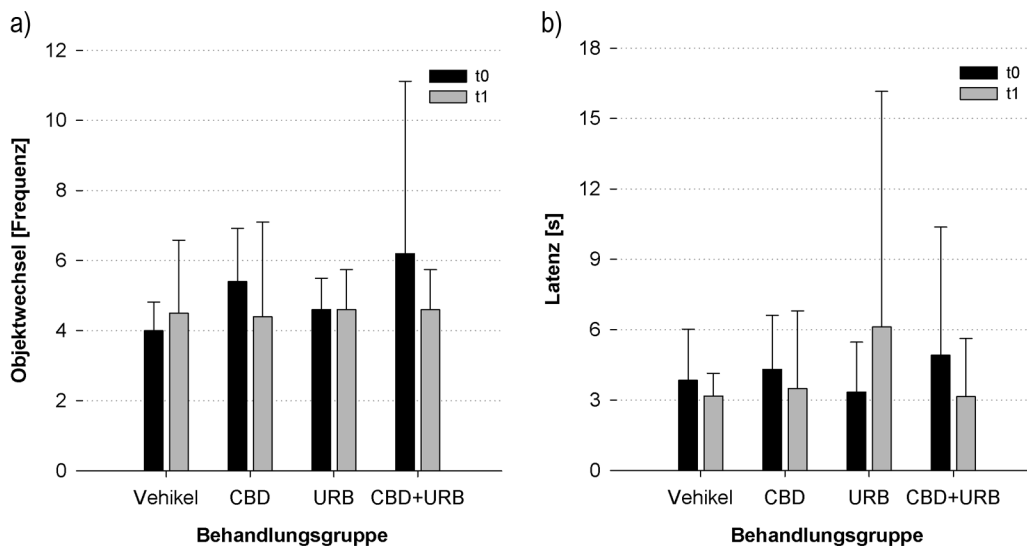


Abbildung 43: Frequenz mit der die Tiere zwischen dem bekannten und unbekanntem Objekt wechselten (a) sowie die Latenzzeit bis zum ersten Betrachten des ersten Objektes (b).

Weder der Testzeitpunkt (vor (t0), während der Behandlung (t1)) noch die Art der Behandlung hatten im zweiten Durchgang einen Effekt auf die Objektwechselfrequenz. Im Mittel liefen die Tiere zwischen beiden Objekten 5 ± 2 mal hin und her. Auch die Latenzzeit wurde nicht beeinflusst (mittlere Latenzzeit: $4,1 \pm 4,3$ s).

Die Latenzzeit bis zum ersten Betrachten eines der beiden Objekte wurde ebenfalls nicht beeinflusst (Abbildung 43 b; Testzeitpunkt: $F(1,15) < 0,1$; $p = 0,940$), Behandlung: ($F(3,15) = 0,1$; $p = 0,950$)).

Somit wurde die Gedächtnisleistung nicht durch die Aktivität/Lokomotion beeinflusst.

Da alle Tiere im ersten Durchgang mindestens ein Objekt betrachteten und im zweiten mindestens einmal zwischen den Objekten wechselten, wurde keines von der Analyse des Diskriminierungsindex ausgeschlossen (Berechnung vgl. 3.4.2.1). Im Mittel wiesen alle Ratten einen positiven Diskriminierungsindex auf (Abbildung 44), d.h. sie betrachteten das unbekannte Objekt länger als das bekannte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Arbeitsgedächtnis bei allen Tieren intakt war und keine der verwendeten Substanzen die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses beeinflusste ($F(3,15) = 0,8$; $p = 0,491$). Auch der Testzeitpunkt hatte keinen Effekt ($F(1,15) = 0,1$; $p = 0,824$).

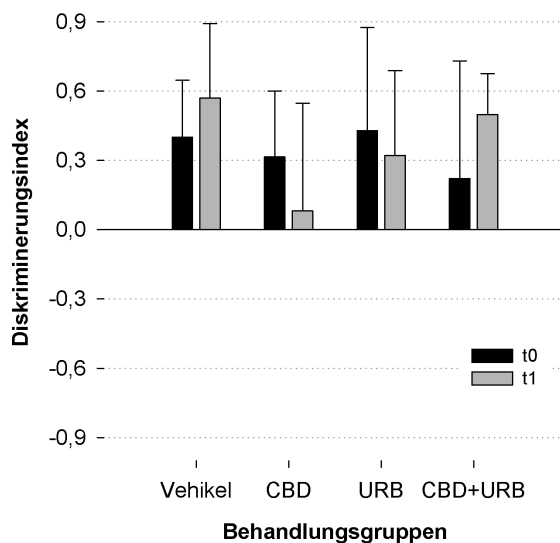


Abbildung 44: Diskriminierungsindex

Positive Werte geben an, dass das neue Objekt ausgiebiger betrachtet wurde als das bekannte. Dies ist im Mittel bei allen Tieren der Fall, so dass von einem intakten Arbeitsgedächtnis ausgegangen werden kann. Weder der Testzeitpunkt (t0: vor, t1: während der Behandlung) noch die Art der Behandlung hatte einen Effekt auf die Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses.

6.1.3. Soziale Interaktion

Weder der Testzeitpunkt ($F(1,15) = 2,3$; $p = 0,155$) noch eine der applizierten Lösungen ($F(3,15) = 0,1$; $p = 0,946$) beeinflusste die soziale Interaktion mit einer fremden Ratte (Abbildung 45). Somit führte keine Substanz zu sozialem Rückzug oder zu einem gesteigerten Sozialverhalten. Die Analyse des gesamten Sozialverhaltens ergab, dass alle Ratten im Mittel etwa $\frac{1}{3}$ der Zeit in der Arena mit sozialer Interaktion verbrachten.

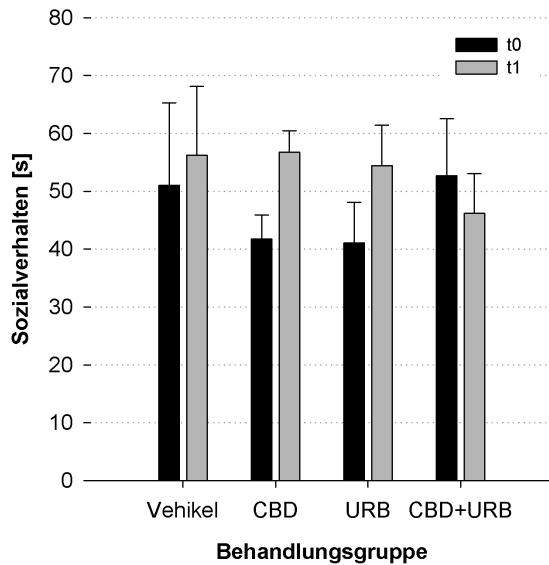


Abbildung 45: Generelles Sozialverhalten gegenüber einer fremden Ratte.

Das gesamte Sozialverhalten, bestehend aus non-anogenitalem und anogenitalem Verhalten sowie dem „Folgen“ und „Flüchten“, blieb vor (t0) und während der Behandlung (t1) unverändert. Keine der verwendeten Substanzen hatte einen Effekt.

Die genaue Analyse von non-anogenitalen und anogenitalen Interaktionen ergab, dass sich der Anteil der beiden Verhaltensweisen am gesamten Sozialverhalten generell nicht signifikant unterschied ($F(1,15) = 0,1$; $p = 0,790$). Beide Verhaltensweisen machten jeweils etwa 40 % aus (Abbildung 46). Zwar gab es keinen signifikanten Haupteffekt der Behandlung ($F(3,15) = 2,1$; $p = 0,141$), aber signifikante Interaktionen, die auf einen Einfluss von URB auf das Sozialverhalten hindeuten (s.u.).

Neben einem Haupteffekt des Testzeitpunktes ($F(1,15) = 10,9$; $p = 0,005$) ergaben sich signifikante Interaktionen des Testzeitpunktes mit der Verhaltensweise ($F(1,15) = 11,7$; $p = 0,005$), der Behandlung ($F(3,15) = 4,2$; $p = 0,025$) sowie der Verhaltensweise und der Behandlung ($F(3,15) = 4,2$; $p = 0,025$).

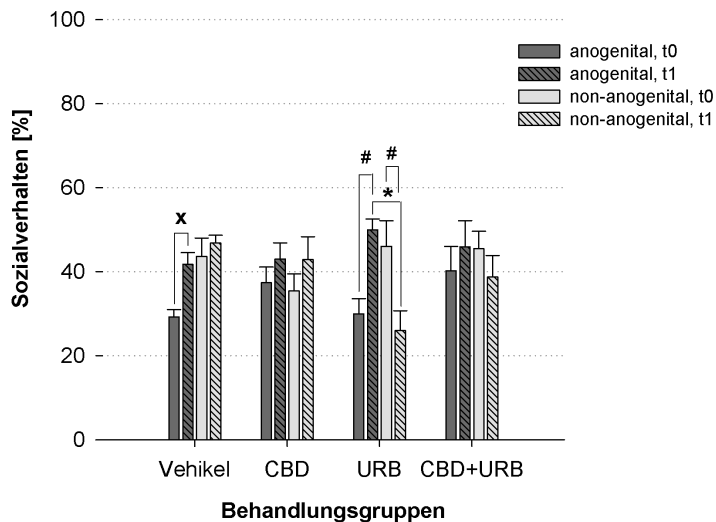
Die Interaktionsanalyse zeigte, dass in der Vehikelgruppe zum Testzeitpunkt t1 (während der Behandlung) der Anteil des anogenitalen Verhaltens signifikant zunahm ($p = 0,031$; Abbildung 46). Allerdings hatte diese Veränderung keinen Einfluss auf das Verhältnis beider Verhaltensweisen am gesamten Sozialverhalten. Zu beiden Zeitpunkten erkundeten die Tiere der Vehikelgruppe die fremde Ratte in der Arena gleichermaßen ano- und non-anogenital.

Die Gabe von URB führte hingegen zu einer Verschiebung des Verhältnisses von anogenitalem und non-anogenitalem Verhalten. Während sich die beiden Verhaltensweisen vor Behandlung nicht signifikant unterschieden, führte die chronische URB-Gabe zu einer Zunahme des anogenitalen und einer Abnahme des non-anogenitalen Verhal-

tens ($p = 0,001$). Daher unterschieden sich beide Verhaltensweisen während URB-Injektion signifikant ($p = 0,013$).

CBD oder eine kombinierte Gabe von CBD und URB beeinflusste die soziale Interaktion zwischen fremden Ratten hingegen nicht.

Abbildung 46: Anteil des anogenitalen und non-anogenitalen Verhaltens am gesamten Sozialverhalten in Abhängigkeit vom Testzeitpunkt und der Behandlung.



Das anogenitale Verhalten ist dunkelgrau dargestellt, non-anogenitales Verhalten hingegen hellgrau. Vor Behandlung (t0, Balken ohne Streifen) unterschieden sich die beiden Verhaltensweisen in der Vehikel- und der URB-Gruppe nur tendenziell. Während der Behandlung (t1, gestreifte Balken) entwickelte sich ein signifikanter Unterschied in der URB-Gruppe: die Ratten zeigten länger anogenitales als non-anogenitales Verhalten (*: $p = 0,013$). Außerdem führte die URB-Behandlung zu einer Zunahme des anogenitalen und einer Abnahme des non-anogenitalen

Verhaltens (#: $p = 0,001$). Des Weiteren ergab die statistische Analyse, dass in der Vehikelgruppe der Anteil an anogenitalem Verhalten während der Behandlung zunahm (x: $p = 0,031$), wobei dies keinen Einfluss auf das Verhältnis beider Verhaltensweisen an der gesamten sozialen Interaktion hatte.

6.1.4. Erhöhte Plusarena

Die relative Zeit, die die Ratten auf den Armen der erhöhten Plusarena verbrachten, unterschied sich bereits zu Beginn der Versuche. Dies spiegelt auch der signifikante Haupteffekt der Behandlung wider ($F(3,15) = 4,1$; $p = 0,025$), der sich nicht nur auf den Zeitpunkt während der Behandlung (t1), sondern auch auf a priori-Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezieht. Der anschließende Post hoc-Test Dunnett ergab, dass sich die Ratten der Vehikelgruppe signifikant kürzer auf den offenen Armen aufhielten als die Ratten der CBD- ($p = 0,014$), der URB- ($p = 0,045$) und der CBD+URB-Gruppe ($p = 0,033$; Abbildung 47). Der Testzeitpunkt hatte hingegen keinen Einfluss auf das Verhalten der Tiere ($F(1,15) = 1,2$; $p = 0,294$) und eine Interaktion zwischen Behandlung und Testzeitpunkt lag ebenfalls nicht vor ($F(3,15) = 1,0$; $p = 0,431$). Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt der Behandlungsgruppe sowohl vor als auch während der Injektionen signifikant war.

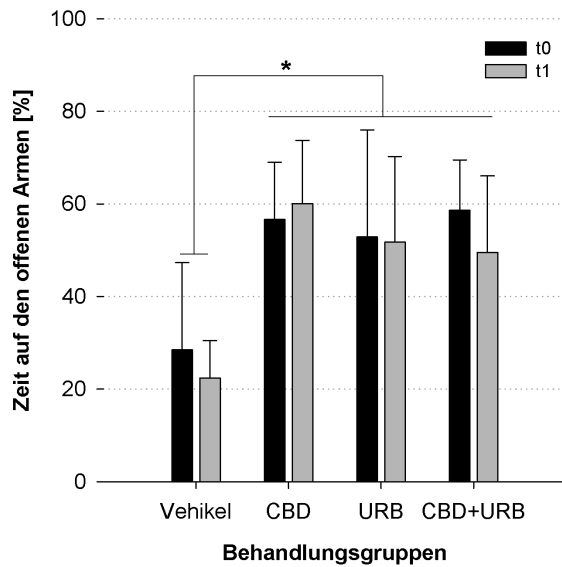


Abbildung 47: Relative Zeit auf den offenen Armen der erhöhten Plusarena in Abhängigkeit von der Behandlung.

Die Tiere der Vehikelgruppe verbrachten sowohl vor (t0) als auch während der Behandlung (t1) signifikant weniger Zeit auf den offenen Armen als die Ratten der anderen Gruppen.

Die lokomotorische Aktivität auf der Plusarena war hingegen bei allen Tieren unabhängig vom Testzeitpunkt ($F(1,15) = 1,2$; $p = 0,291$) und der Behandlung ($F(3,15) = 2,1$; $p = 0,144$) identisch: die Ratten wechselten die Arme der Arena mit der gleichen Frequenz (Abbildung 48).

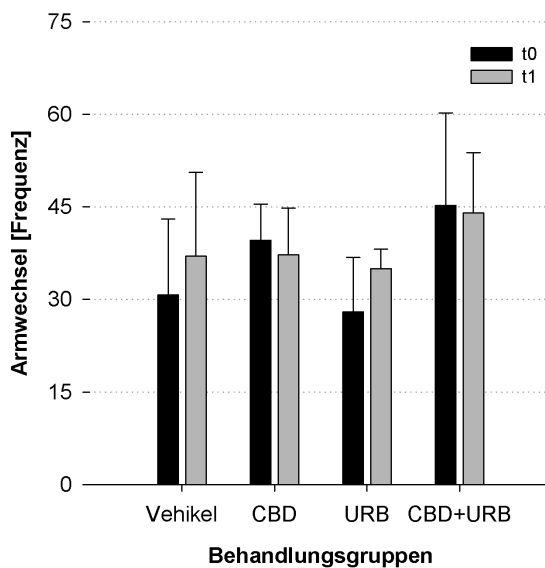


Abbildung 48: Locomotorische Aktivität auf der erhöhten Plusarena in Abhängigkeit der Behandlung.

Die Armwechselfrequenz, ein Maß für die lokomotorische Aktivität, war vor (t0), während der Behandlung (t1) identisch. Keine der verwendeten Substanzen beeinflusste die Frequenz, mit der die Tiere die Arme der erhöhten Plusarena wechselten.

6.1.5. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Da bei der statistischen Analyse der Schreckreaktionsamplitude die Voraussetzung der Varianzhomogenität nicht gegeben war (Levene-Test signifikant), wurde zunächst eine Quadratwurzel-Transformation der Daten durchgeführt. Die Amplitude der Schreckreaktion (Abbildung 49) war während der Behandlung (t1) signifikant niedriger als vor

Behandlung (t_0 , $F(1,15) = 37,9$; $p < 0,001$). Dieser Effekt war allerdings unabhängig von der Art der Behandlung ($F(3,15) = 1,3$; $p = 0,318$).

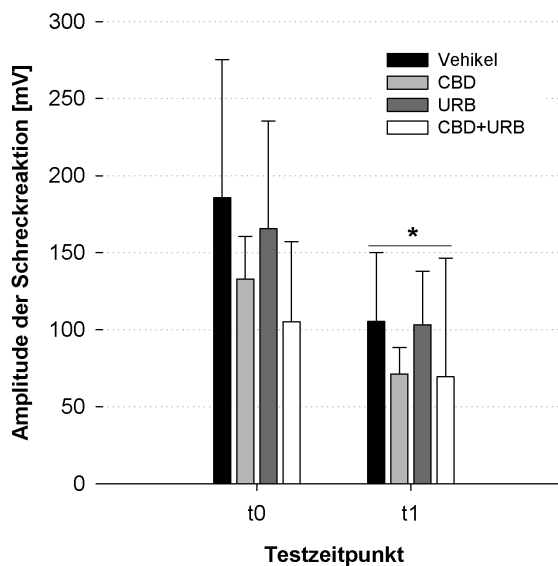


Abbildung 49: Amplitude der Schreckreaktion vor (t_0) und während der (t_1) Behandlung.

Unabhängig von der Art der Behandlung sank die Amplitude der Schreckreaktion bei allen Gruppen.

Bei der Analyse der Präpulsinhibition (PPI) mussten die Freiheitsgrade für den Faktor Präpuls lautstärke ($\chi^2(5) = 13,1$; $p = 0,023$) korrigiert werden (Greenhouse-Geisser Schätzung; $\epsilon = 0,714$), da der Mauchly-Test eine Verletzung der Sphärizitäts-Voraussetzung anzeigte. Die PPI war signifikant von der Präpuls lautstärke abhängig (Abbildung 50; $F(2,143, 32,140) = 320,7$; $p < 0,001$).

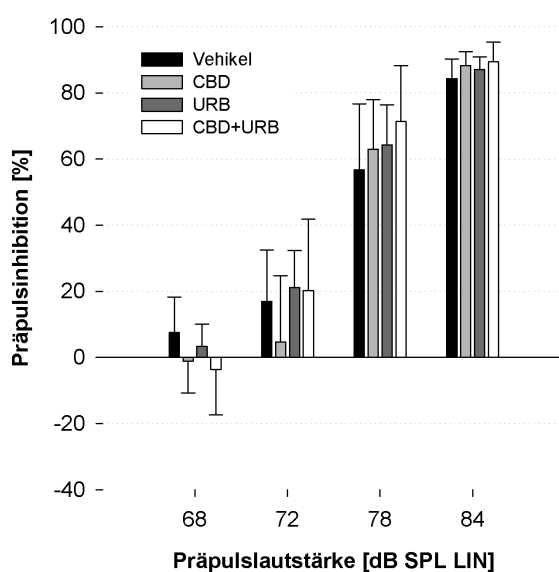


Abbildung 50: Präpulsinhibition (PPI) während der Behandlung, in Abhängigkeit von der Präpuls lautstärke.

Die Höhe der PPI war von der Präpuls lautstärke abhängig. Je lauter der Präpuls, desto höher die PPI, wobei sämtliche Lautstärkevergleiche signifikant waren (aus Gründen der Übersicht nicht in der Graphik dargestellt). Die Behandlung hatte hingegen keinen Effekt auf die PPI. Die sensorische Hemmung wurde somit weder von CBD noch von URB oder einer kombinierten Gabe beeinflusst.

Der Post hoc-Test-Sidak bestätigte, dass die mittlere PPI umso größer ausfiel, je lauter der präsentierte Präpuls war (68 vs. 72 dB SPL LIN: $p = 0,009$; für alle anderen Vergleiche).

che $p < 0,001$). Der leiseste Präpuls (68 dB SPL LIN) rief keine stabile PPI von über 15 % hervor, und auch ein Präpuls von 72 dB SPL LIN führte zu sehr variablen Reaktionen. Die PPI wurde nicht vom Testzeitpunkt beeinflusst ($F(1,15) = 1,4$; $p = 0,253$). Daher ist in Abbildung 50 nur das Ergebnis zum Zeitpunkt t1 dargestellt. Des Weiteren beeinflusste weder CBD noch URB oder eine Kombination beider Substanzen die sensorische Hemmung ($F(3,15) = 1,1$; $p = 0,398$).

6.2. Messungen der Endocannabinoide und verwandter Lipide

Nach Abschluss der Verhaltenstestung wurden die Tiere schließlich getötet, um die Konzentrationen der verschiedenen Eicosanoide (Anandamid (AEA), PEA, OEA und 2-AG) in den verschiedenen Gehirnarealen sowie in der Leber mittels HPLC/MS-MS zu bestimmen. Die statistische Analyse der Behandlungseffekte auf die Eicosanoid-Level in den verschiedenen Gehirnarealen (3 faktorielle mixed design ANOVA (Faktoren: Gehirnareal, Eicosanoide, Behandlung; Greenhouse-Geisser-Korrektur, log-Transformation zur Herstellung von Varianzgleichheit) bestätigte zunächst, dass sich die Konzentrationen der verschiedenen Lipide per se unterschieden ($F(1,627, 24,405) = 2995,6$; $p < 0,001$). Zusätzlich schwankten die Eicosanoid-Level in Abhängigkeit vom Gehirnareal ($F(3,116, 47,490) = 34,5$; $p < 0,001$), so dass auch eine signifikante Interaktion Gehirnareal*Endocannabinoid zu beobachten war ($F(5,708, 171,866) = 30,3$; $p < 0,001$). Der Effekt der Behandlung war allerdings unabhängig vom Gehirnareal ($F(9,498, 47,490) = 0,9$; $p = 0,525$). Aufgrund dessen und in Anbetracht der Tatsache, dass der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit nicht auf den Eicosanoid-Messungen lag, wurden alle Daten zusammengefasst und die Behandlungseffekte auf die Eicosanoid-Konzentration im Gehirngewebe insgesamt analysiert (detailliertere Datenanalyse siehe Doktorarbeit von Frau Pahlisch).

Zur Analyse der Eicosanoid-Level im gesamten Gehirngewebe wurde eine 2 faktorielle mixed design ANOVA (Faktoren: Eicosanoide, Behandlung) durchgeführt. Da der Mauchly-Test signifikant war (Eicosanoide: $X^2(5) = 60,3$; $p < 0,001$) und damit die Voraussetzung der Sphärizität nicht gegeben war, wurden die Freiheitsgrade angepasst (Greenhouse-Geisser-Korrektur; $\epsilon = 0,372$). Des Weiteren mussten die Daten transformiert ($1/\sqrt{x}$) werden, da für die OEA- und PEA-Daten zunächst keine Varianzgleichheit gegeben war (Levene-Test OEA: $F(3,15) = 4,3$; $p = 0,022$; PEA: $F(3,15) = 4,0$;

$p = 0,027$). Wie bereits erwähnt, sind die Konzentrationen der verschiedenen Eicosano-
id-Konzentrationen im Gehirn generell nicht zu vergleichen, was sich in einem signifi-
kanten Haupteffekt der Eicosanoide ($F(1,116, 16,735) = 1863,4$; $p < 0,001$) widerspie-
gelt. Da die Konzentrationsunterschiede sehr groß sind, werden in Abbildung 51 die
Ergebnisse für jedes Lipid in einzelnen Graphen dargestellt.

Die Behandlung hatte einen signifikanten Effekt auf die Lipidkonzentrationen
($F(3,15) = 33,789$; $p < 0,001$), wobei der Behandlungseffekt vom Eicosanoid abhing
(signifikante Interaktion Eicosanoid*Behandlung: $F(3,347, 16,735) = 18,1$; $p < 0,001$).
Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass weder CBD noch URB oder eine kombinierte Gabe
einen Effekt auf die 2-AG-Konzentration hatte (Vehikel vs. CBD: $p = 0,987$; Vehikel vs.
URB und CBD+URB jeweils $p = 1,000$). Somit wurde die Degradierung von 2-AG nicht
inhibiert.

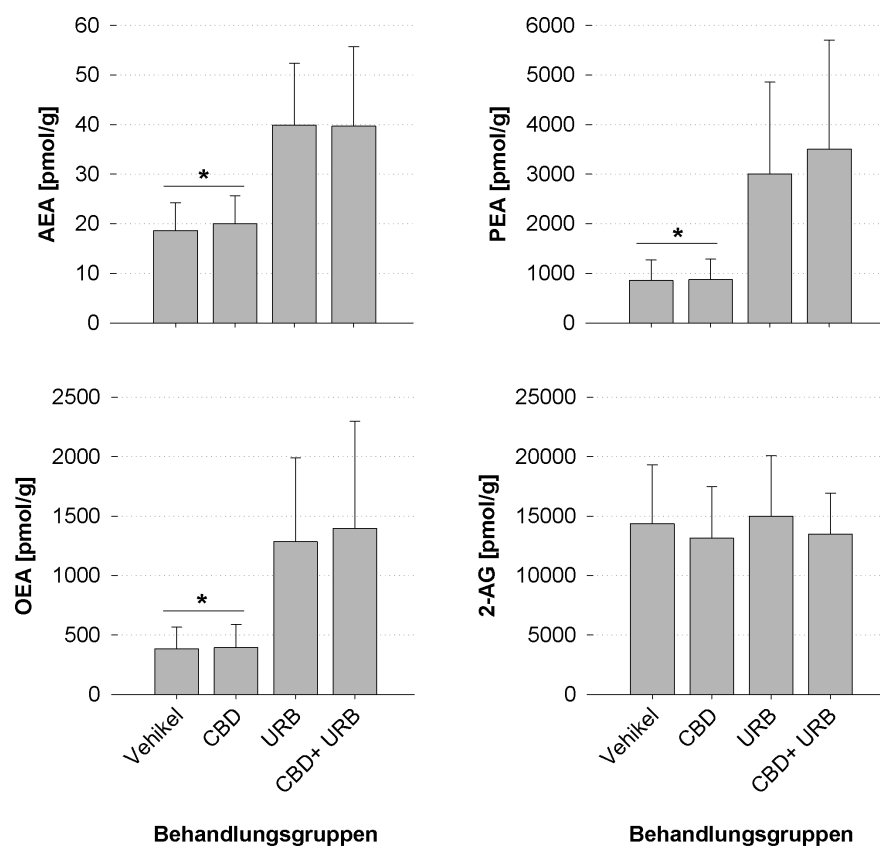


Abbildung 51: Einfluss der Behandlung auf die Eicosanoid-Konzentration im Gehirngewebe.

Keine der verwendeten Substanzen hatte einen Einfluss auf die 2-AG Konzentration. Die AEA-, PEA- und OEA-Level im Gehirngewebe erhöhten sich hingegen gleichermaßen nach URB- und CBD+URB-Gabe ($p < 0,001$). Die Wirkung von CBD ließ sich nicht von der Vehikelwirkung unterscheiden.

Die Wirkung von CBD auf die Anandamid- (AEA), OEA- und PEA-Level war nicht von der Vehikel-Wirkung zu unterscheiden (AEA: $p = 0,973$; OEA: $p = 1,000$; PEA: $p = 0,999$). Allerdings erhöhte URB im Vergleich zum Vehikel signifikant die AEA-, PEA- und OEA-Konzentrationen (jeweils $p < 0,001$). Somit wurde die Hydrolyse dieser drei Lipide durch FAAH blockiert. Die Gabe von CBD+URB erhöhte die Konzentration der drei Lipide (Vehikel vs. CBD+URB: jeweils $p < 0,001$) im gleichen Ausmaß wie die alleinige URB-Administration (URB vs. CBD+URB: AEA: $p = 1,000$; OEA: $p = 0,999$; PEA: $p = 0,981$). Die kombinierte Gabe von CBD und URB hatte somit keinen synergistischen Effekt.

Vollständigkeitshalber sei an dieser Stelle erwähnt, dass ähnliche Effekte in der Leber zu beobachten waren. Allerdings führte die URB- sowie CBD+URB-Gabe verglichen mit der Vehikel-Behandlung nur tendenziell zu einer Erhöhung der AEA-, PEA- und OEA-Konzentrationen. Eine 2 faktorielle mixed design ANOVA ergab keinen signifikanten Haupteffekt der Behandlung ($F(3,15) = 1,3$; $p = 0,326$) und keine signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Eicosanoid ($F(3,001, 15,003) = 18,1$; $p = 0,312$).

7. Diskussion CBD-URB-Studie

Die CBD-URB-Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt, die Effekte und die Wirkweise einer chronischen CBD-Gabe bei gesunden adulten Ratten näher zu beleuchten. Die Hypothese war, dass CBD den enzymatischen Abbau von Anandamid (AEA) und den verwandten Lipiden PEA und OEA inhibiert. Daher wurde die Wirkung von CBD mit der von URB, einem potenten Inhibitor des Enzyms FAAH, welches AEA, OEA und PEA hydrolysiert (vgl. 1.2.2.1), verglichen. Es wurde überprüft, ob die chronische Gabe von CBD, URB oder einer Kombination Einfluss auf die Motorik, die räumliche Orientierung, die Neugier/Ängstlichkeit, das Arbeitsgedächtnis, das Sozialverhalten oder die sensorische Hemmung hat. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Verhaltensversuche zunächst getrennt betrachtet und schließlich im Kontext der Lipidveränderungen im Gehirngewebe erläutert.

7.1. Verhaltensversuche

7.1.1. Motorik: Open Field und erhöhte Plusarena

Weder CBD noch URB oder eine kombinierte Gabe beider Substanzen wirkte sedierend oder stimulierend. Im Open Field-Test legten alle Tiere im Mittel die gleiche Distanz zurück und auch die Geschwindigkeit, mit der sich die Ratten bewegten, blieb von den verschiedenen Behandlungsansätzen unbeeinflusst. Ein weiteres Maß für die lokomotorische Aktivität ist die Frequenz, mit der die Tiere die Arme der erhöhten Plusarena wechseln. Aber auch die Armwechselfrequenz unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Das heißt, die Ergebnisse der anderen Verhaltensversuche wurden nicht durch eine veränderte Motorik beeinflusst.

Dies steht im Einklang mit der Literatur. In keiner der Studien führte die akute Gabe von URB oder CBD zu einer Veränderung der Motorik (Finn et al., 2004; Scherma et al., 2008; Trezza & Vanderschuren, 2008; Malone et al., 2009). Während der Effekt einer chronischen Gabe von URB bisher noch nicht untersucht wurde, analysierte eine kürzlich veröffentlichte Studie die Wirkung einer subchronischen CBD-Gabe (10 mg/kg). Weder nach drei noch nach neun täglichen CBD-Injektionen (i. p.) veränderte sich die zurückgelegte Distanz oder die Bewegungsgeschwindigkeit (ElBatsh et al., 2011).

7.1.2. Räumliche Orientierung: Open Field

Die Analyse des Open Field-Verhaltens ergab zudem, dass alle Tiere ein klassisches Homebase-Verhalten zeigten. Darunter versteht man das wiederholte, längere Aufsuchen eines oder mehrerer Orientierungspunkte innerhalb der Arena, von denen aus neue Erkundungsgänge gestartet werden. In dieser Studie hielten sich die Ratten insbesondere in dem Bereich, in dem sie in die Arena gesetzt wurden, am längsten auf. Dieses Verhalten verstärkte sich zum Zeitpunkt t1 unabhängig von der Behandlung. Das Homebase-Verhalten von Ratten in der Open Field-Arena wurde bisher hauptsächlich in der Lichtphase beobachtet (Eilam & Golani, 1989; Golani et al., 1993; Tchernichovski et al., 1998; Draï et al., 2000). Wurden Nager hingegen in der Dunkelphase unter Infrarotlicht getestet, zeigten sie dieses Verhalten nicht wie in der vorliegenden Studie innerhalb von 10 min, sondern erst wesentlich später (Zadicario et al., 2005; Avni et al., 2006). Auch in anderen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde das Homebase-Verhalten unter Rotlicht nachgewiesen (Mertgens, 2008; Lee, 2010). Da Rotlichtbeleuchtung einen Einfluss auf die zirkadiane Rhythmik der Tiere haben kann (Sun et al., 1993; Poeggeler et al., 1995; Fukuhara et al., 2005), könnte es sein, dass Ratten unter Rotlicht dennoch etwas Licht wahrnehmen können, obwohl ihre Fotorezeptoren eigentlich nicht sensitiv für diese langen Wellenlängen sind (vgl. 3.1; Bridges, 1959; Neitz & Jacobs, 1986; Yokoyama et al., 1998; Jacobs et al., 2001). Wäre dies der Fall, könnten sich die Tiere anhand visueller Landmarken orientieren, die die Ausbildung einer Homebase begünstigen. Andererseits wird diskutiert, dass Ratten nicht nur Hinweise aus der Umwelt (sowohl visuell als auch olfaktorisch) für ihre räumliche Orientierung nutzen, sondern auch ihre eigenen Bewegungen im Sinne einer Koppelnavigation (vgl. Review: Wallace et al., 2008).

Aber unabhängig davon, wie die Orientierung genau erfolgt, lässt sich zumindest festhalten, dass weder eine chronische CBD-, URB- oder die kombinierte Gabe einen Effekt auf die räumliche Orientierung der Ratten hatte.

7.1.3. Ängstlichkeit/Neugier: Open Field und erhöhte Plusarena

Das Open Field wird nicht nur zur Überprüfung der lokomotorischen Aktivität herangezogen, sondern auch, um die Ängstlichkeit der Tiere zu testen (Prut & Belzung, 2003). Generell halten sich Ratten hauptsächlich im äußeren Bereich der Arena auf. Sie be-

wegen sich dabei thigmotaktisch und berühren mit ihren Vibrissen die Wand. Immer wieder werden Erkundungszüge gestartet, bei denen die Ratten auch die innere Zone überqueren. Dabei nimmt die Geschwindigkeit in der Regel zu. Dies wurde auch bei allen getesteten Tieren beobachtet. Unter der Voraussetzung, dass sich die allgemeine Lokomotion nicht verändert (wie im Falle dieser Studie), kann eine Zunahme der Frequenz, mit der die innere Zone betreten wird, als Abnahme der Ängstlichkeit interpretiert werden. Die Frequenz wurde durch keine der Behandlungen beeinflusst, so dass weder eine anxiolytische noch eine anxiogene Wirkung auftrat. Dies bestätigten auch die Ergebnisse der erhöhten Plusarena.

Die erhöhte Plusarena gilt als ein Standardtest zur Untersuchung der Ängstlichkeit von Ratten (Pellow et al., 1985). Dabei wird die Veränderung der Zeit auf den offenen Armen als Maß für eine Veränderung der Ängstlichkeit/Neugier herangezogen. Wenn die Zeit, die die Tiere auf den offenen Armen verbringen, sinkt, wird von einer Zunahme der Angst ausgegangen und umgekehrt (Carobrez & Bertoglio, 2005).

Zwar verhielten sich die Tiere der Vehikelgruppe von Anfang an ängstlicher als alle anderen, aber es konnte kein Behandlungseffekt beobachtet werden. Dass in keinem der beiden Tests eine verringerte Ängstlichkeit durch die Behandlung mit CBD, URB oder CBD+URB beobachtet werden konnte, widerspricht zunächst den Erwartungen. Verschiedene Studien zeigten, dass bei Nagern sowohl CBD als auch URB in verschiedenen Paradigmen anxiolytisch wirken (Guimaraes et al., 1990; Onaivi et al., 1990; Kathuria et al., 2003; Moreira et al., 2006; Patel & Hillard, 2006; Resstel et al., 2006; Scherma et al., 2008; Long et al., 2009). Bezüglich URB hat sich mittlerweile herausgestellt, dass die anxiolytische Wirkung einer akuten Gabe vor allem unter besonders stressigen Bedingungen zum Tragen kommt (Haller et al., 2009; persönliche Mitteilung Daniele Piomelli, 2011). Werden beispielsweise die offenen Arme der erhöhten Plusarena hell beleuchtet, die geschlossenen hingegen nicht (Patel & Hillard, 2006), oder wechselt die Lichtintensität plötzlich während des Versuches (Haller et al., 2009), dann wirkt URB anxiolytisch. Auch die durch Phencyclidin-Gabe (NMDA-Rezeptor-Antagonist), Alkoholentzug oder durch sehr starke Beleuchtung gesteigerte Ängstlichkeit kann durch URB reduziert werden (Cippitelli et al., 2008; Scherma et al., 2008; Haller et al., 2009; Seillier & Giuffrida, 2011). Unter stressarmen Bedingungen (z. B. gleichmäßiges, nicht zu starkes Licht, vorherige Habituation an den Raum, Handling der Tiere) scheint URB

hingegen keinen Effekt zu haben (Naidu et al., 2007; Haller et al., 2009; Seillier & Giuffrida, 2011). Dies deutet darauf hin, dass URB insbesondere induzierte Angst reduziert, aber per se keinen Einfluss auf die Ängstlichkeit eines Tieres hat. Da URB durch die FAAH-Inhibition zu einer Erhöhung der Konzentration von Anandamid und verwandten Lipiden führt, deuten diese Befunde darauf hin, dass das Endocannabinoidsystem lediglich protektiv wirkt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Testung der Tiere in einer stressarmen Umgebung: die Tiere waren mit Menschen und dem Raum vertraut und wurden in ihrer Aktivitätsphase bei gedimmtem Rotlicht getestet. Somit ist der fehlende Effekt von URB auf die Ängstlichkeit der Ratten nicht verwunderlich, auch wenn der oben beschriebene Einfluss unterschiedlicher Versuchsbedingungen nur für eine akute URB-Behandlung untersucht wurde.

Auch für CBD ist die Datenlage nicht eindeutig und abhängig von der injizierten Dosis und der Behandlungsdauer. In Versuchen mit der erhöhten Plusarena wurde bei Ratten eine anxiolytische Wirkung nach akuter Injektion von 2,5, 5 und 10 mg/kg CBD beobachtet, während 20 mg/kg hingegen keinen Effekt hatte (Guimaraes et al., 1990). Die anxiolytische Wirkung moderater CBD-Konzentrationen wurde auch bei Mäusen bestätigt (1 und 10 mg/kg, aber nicht 100 mg/kg; Onaivi et al., 1990), konnte aber in einer weiteren Studie nicht beobachtet werden (1 und 50 mg/kg; Long et al., 2009). Zudem senkte eine Vorbehandlung mit CBD die durch THC-Gabe induzierte gesteigerte Ängstlichkeit auf der erhöhten Plusarena (Onaivi et al., 1990). Wurden Ratten auf aversive Stimuli konditioniert bzw. während des Trinkens immer wieder Elektroschocks ausgesetzt, wirkte eine vorherige CBD-Gabe ebenfalls anxiolytisch (Moreira et al., 2006; Resstel et al., 2006). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CBD, ähnlich wie URB, vor allem unter stressigen Bedingungen seine anxiolytische Wirkung entfaltet, auch wenn dies im Gegensatz zu URB noch nicht systematisch untersucht wurde. Sollten beide Substanzen tatsächlich über einen ähnlichen Mechanismus wirken, nämlich die Erhöhung der Konzentrationen von Anandamid (AEA) und verwandter Lipide, wäre es auch nicht erstaunlich, wenn sich ihre akuten Effekte ähneln.

Bisher untersuchten zwei Studien die Wirkung chronischer CBD-Behandlungen auf die Ängstlichkeit. Beide kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während bei Ratten nach 11-tägiger Behandlung (10 mg/kg) eine Verstärkung der konditionierten Angst

beobachtet wurde (ElBatsh et al., 2011), wurde bei Mäusen in Abhängigkeit vom Testparadigma und der Dosierung entweder kein Effekt oder eine anxiolytische Wirkung beobachtet (Long et al., 2009). Wie auch in der vorliegenden Studie hatte CBD (1, 5, 10 oder 50 mg/kg) keinen Effekt auf die Zeit auf den offenen Armen der erhöhten Plusarena. Eine Dosierung von 50 mg/kg erhöhte allerdings die Zeit in der inneren Zone des Open Fields und in einem weiteren Paradigma wirkte lediglich 1 mg/kg CBD anxiolytisch. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Testbedingungen offensichtlich eine ganz entscheidende Rolle für die Wirkung von CBD spielen. Daher wäre eine systematische Untersuchung des Zusammenhangs von Umweltfaktoren, Dosierungen und Dosierungsdauer erforderlich, um eine fundierte Aussage über die Wirkung von CBD auf die Ängstlichkeit treffen zu können.

7.1.4. Arbeitsgedächtnis: Objekterkennung

Das Arbeitsgedächtnis der Ratten wurde mit Hilfe des Objekterkennungs-Tests untersucht. Dieser Test macht sich das natürliche Explorationsverhalten der Ratten zunutze, die unbekannte Objekte intensiver untersuchen als bekannte. Während der erste Durchgang dazu dient, die Tiere mit einer Objektart bekannt zu machen, wird im zweiten Durchgang untersucht, welches Objekt (bekannt/unbekannt) intensiver untersucht wird. Durch die zeitliche Verzögerung zwischen den beiden Durchgängen und der Tatsache, dass man misst, ob die Tiere das neue Objekt erkennen, bezeichnet man diesen Verhaltensversuch auch als „delayed non-matching to sample task“.

Vergleicht man die gesamte Explorationszeit beider Durchgänge, erhält man einen Eindruck von der Aktivität der Tiere. Keine der Behandlungen veränderte das Explorationsverhalten der Tiere. Sowohl vor als auch während der Behandlung explorierten die Tiere der Vehikel-, CBD- und URB-Gruppe die Objekte in beiden Durchgängen mit gleicher Intensität, was auf eine unveränderte Aktivität schließen lässt. Die Ratten der CBD+URB-Gruppe hingegen untersuchten zu beiden Testzeitpunkten die Objekte im zweiten Durchgang nicht ganz so ausgiebig. Dies deutet auf generell reduziertes Explorationsverhalten der Tiere dieser Gruppe hin, das aber unabhängig von der Behandlung war. Die Aktivität der Tiere lässt sich zudem anhand der Frequenz, mit der sie zwischen den dargebotenen Objekten hin und her laufen sowie der Latenz, bis sie das erste Objekt betrachten, bewerten. Alle Tiere, auch die der CBD-URB-Gruppe, verhiel-

ten sich bezüglich Wechselfrequenz und Latenz zu beiden Zeitpunkten wie alle anderen Ratten. Somit wurden die Ergebnisse bei keiner Gruppe durch eine veränderte Aktivität während des Testes beeinträchtigt.

Keine Behandlung hatte eine Auswirkung auf die Arbeitsgedächtnisleistung: alle Tiere betrachteten im zweiten Durchgang das unbekannte Objekt intensiver als das bekannte (positiver Diskriminierungsindex).

Bezüglich CBD steht dies im Einklang mit der Literatur. Allerdings wurde bisher nur in einer einzigen Studie die akute Wirkung eines CBD-reichen Extraktes (85 % CBD, 7,8 % Δ^9 -THC) auf das Arbeitsgedächtnis der Ratten in einem sog. „delayed matching to position“-Test untersucht (Fadda et al., 2004). Dabei wurden Dosierungen von bis zu 50 mg/kg getestet, von denen keine die Gedächtnisleistung verschlechterte.

Im Falle von URB stehen die Ergebnisse der vorliegenden Studie teilweise im Gegensatz zur Literatur. Die akute Gabe von 0,3 mg/kg verschlechterte die Gedächtnisleistung in einem anderen Arbeitsgedächtnistest mit zeitlicher Verzögerung (spontane Alternierung, Seillier et al., 2010). Auf der anderen Seite führte die akute URB-Gabe in einem „delayed non-matching to sample task“, der in einer operanten Konditionierungsbox durchgeführt wurde, zu keiner Reduktion der Gedächtnisleistung, wenn wie in der vorliegenden Studie eine Dosierung von 0,3 mg/kg appliziert wurde. Die zehnfache Dosierung erhöhte hingegen, in Abhängigkeit von der Länge der zeitlichen Verzögerung, die Fehlerrate (Goonawardena et al., 2011). Im Gegensatz zu URB (FAAH-Inhibition), führte die Gabe eines Inhibitors des Anandamid-Transporters (FLAT) bei keiner der Dosierungen zu einem Behandlungseffekt (Goonawardena et al., 2011). Falls die verwendeten Konzentrationen der FAAH- und FLAT-Inhibitoren den Anandamidspiegel nicht im gleichen Ausmaß erhöhten und die Effektivität der eingesetzten FLAT-Inhibitor-Dosis vergleichbar mit der von 0,3 mg/kg URB aber nicht mit der von 3 mg/kg war, dann wäre auch keine Wirkung auf das Arbeitsgedächtnis zu erwarten. Auf der anderen Seite könnten auch die unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Inhibitoren eine Rolle gespielt haben. Da URB den Abbau von Anandamid und verwandten Lipiden hemmt und somit zu einem generellen Anstieg der Anandamidkonzentration führt, resultiert die Inhibition des Transporters in einem erhöhten Anandamidspiegel im synaptischen Spalt. Außerdem erhöht URB auch die PEA- und OEA-Spiegel. Somit könnte die Wirkung von URB auch über diese beiden Lipide und nicht

über Anandamid vermittelt werden. Dagegen spricht, dass die akute systemische Gabe von Anandamid ebenfalls das Arbeitsgedächtnis verschlechtern kann (Mallet & Beninger, 1998). Obwohl keine Informationen vorliegen, ob die zerebrale Anandamidkonzentration nach systemischer Anandamid-Gabe vergleichbar mit der Konzentration nach FAAH- oder FLAT-Inhibitor-Administration ist, deutet vieles daraufhin, dass die Wirkung auf das Arbeitsgedächtnis eine Frage der Konzentration ist. Es ist möglich, dass ein deutlicher Eingriff in das Endocannabinoidsystem auch einen negativen Effekt haben kann, während eine geringfügigere Veränderung keinen Einfluss auf das Gedächtnis hat.

7.1.5. Sozialverhalten: Soziale Interaktion

Der Test der sozialen Interaktion erlaubt zum einen eine Betrachtung des Sozialverhaltens insgesamt, aber auch eine Analyse einzelner Verhaltensweisen. Weder die CBD- noch die URB- oder eine kombinierte Gabe beeinflusste das Ausmaß des Sozialverhaltens während des Versuches. Das heißt alle Tiere beschäftigten sich in der Open Field-Arena gleich lange mit der ihnen unbekanntem Ratte. Allerdings scheint die chronische URB-Gabe das Verhältnis einzelner Verhaltensweisen zu verändern. Vor Behandlung war der Anteil an anogenitalem und non-anogenitalem Verhalten bei allen Ratten sehr ähnlich. Die URB-Gabe führte allerdings dazu, dass die Tiere die fremde Ratte länger anogenital erkundeten, während die non-anogenitalen Verhaltensweisen abnahmen. Der resultierende relative Unterschied beider Verhaltensweisen war signifikant. Interessanterweise hatte die kombinierte Gabe von CBD+URB keinen Effekt.

In der Literatur findet man nur eine Studie, die die Wirkung von URB auf das Sozialverhalten untersucht. Seillier et al. (2010) beobachteten eine Reduktion des gesamten Sozialverhaltens nach akuter Gabe. Allerdings analysierten sie nicht die einzelnen Verhaltensweisen. In einer anderen Studie wurden die striatalen Anandamid-Spiegel während der sozialen Interaktion mit einer bekannten bzw. einer unbekanntem Ratte in einem neutralen Käfig untersucht (Marco et al., 2011). Die unbekanntem Ratten beschnüffelten (keine Unterscheidung von non- und anogenital) sich intensiver als die bekannten Ratten und bei der Interaktion mit einer unbekanntem Ratte nahm die Anandamid-Konzentration signifikant zu. Es ist denkbar, dass der durch die URB-Gabe hervorgerufene erhöhte Anandamid-Spiegel soziale Verhaltensweisen fördert, die Ratten

gegenüber fremden Ratten zeigen. Dies könnte die Zunahme des anogenitalen Verhaltens gegenüber dem non-anogenitalen Verhalten in der vorliegenden Studie erklären.

Mehrere Studien untersuchten die Wirkung einer akuten CBD-Gabe auf das Sozialverhalten. Wie in der vorliegenden Studie konnte keine einen Effekt nachweisen (van Ree et al., 1984; Long et al., 2009; Malone et al., 2009; Gururajan et al., 2011).

7.1.6. Sensomotorische Hemmung: Präpulsinhibition

Die Schreckreaktion ist eine protektive Verhaltensreaktion, die sich bei Ratten in einer Ganzkörperreaktion äußert, in der die Augen geschlossen, Gesichts-, Hals- und Skelettmuskeln kontrahiert, gerade ablaufende Verhaltensweisen gestoppt werden und sich die Herzschlagrate beschleunigt (Koch, 1999). Die Präsentation eines leiseren Präpulses reduziert die Schreckreaktion (Präpulsinhibition, vgl. 3.4.5) und kontrolliert somit die durch den Schreckreiz ausgelöste Reflexantwort (sensomotorische Hemmung).

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse ganz allgemein, so wird deutlich, dass, wie bereits in der PPI-PET-Studie (4.2, 5.1) gezeigt, das Ausmaß der sensomotorischen Hemmung von der Präpulsstärke abhing. Je lauter der Präpuls, desto stärker war die PPI. Obwohl zum Zeitpunkt der Durchführung der CBD-URB-Studie noch kein Hörtest zur Verfügung stand, lassen die PPI-Ergebnisse vermuten, dass die Hörschwelle der Lister hooded-Ratten in beiden Studien vergleichbar war. Auch in dieser Studie war ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1,11 notwendig, um eine stabile PPI hervorzurufen und die Schreckreaktionsamplitude lag in einem ähnlichen Bereich (insbesondere zum Zeitpunkt t1).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal untersucht, ob URB die sensomotorische Hemmung beeinflussen kann und die Modulation der motorischen Reflexantwort durch einen schwachen Präpuls verstärkt oder abschwächt. Nach der chronischen URB-Gabe konnte weder ein Effekt auf die Amplitude der Schreckreaktion, noch auf die Präpulsinhibition (PPI) nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie, die den Effekt der FLAT-Inhibition auf die PPI bei Ratten untersuchte (Bortolato et al., 2006). Die akute Gabe des FLAT-Inhibitors (2,5, 5 und 10 mg/kg) beeinflusste ebenfalls weder die PPI noch die Amplitude der Schreckreaktion. Zwar sind die Wirkmechanismen der FAAH- und FLAT-Inhibition unterschiedlich (s.o.), aber beide Behandlungen aktivieren das Endocannabinoidsystem, so dass ähnliche Wirkungen

denkbar sind. Bei Mäusen allerdings erhöhte die akute Gabe des FLAT-Inhibitors die Amplitude der Schreckreaktion in Abhängigkeit von der Dosierung (2,5 mg/kg, aber nicht 5 mg/kg) und reduzierte die PPI (5 mg/kg, aber nicht 2,5 mg/kg) bei einer von zwei Präpuls lautstärken (70 nicht 80 dB). Bei der subchronischen Behandlung (7 Tage) mit 5 mg/kg wurden hingegen umgekehrte Effekte beobachtet: die Amplitude der Schreckreaktion blieb unbeeinflusst, während die PPI bei beiden Präpuls lautstärken abnahm (Fernandez-Espejo & Galan-Rodriguez, 2004). Gründe für diese Verschiebung in den Ergebnissen werden von den Autoren nicht diskutiert.

Es ist nicht auszuschließen, dass Unterschiede in den Versuchsprotokollen, dem Handling der Tiere oder der Hörfähigkeit die Ergebnisse der Mäusestudie beeinflussen und zur Diskrepanz zu den beiden Rattenstudien führen (vorliegende Studie; Bortolato et al., 2006). Für ein nur mäßiges Hörvermögen der Mäuse spricht, dass die PPI bei beiden Präpuls lautstärken nur bei etwa 40 % lag, obwohl ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1,16 und 1,33 vorlag. Selbst bei den schlechter hörenden Lister hooded-Ratten reichte ein Signal-Rausch-Verhältnis von 1,11 für eine PPI von etwa 50 % und während ein Wert von 1,29 zu einer PPI von 80 % führte (vgl. 4.2, 5.1 und 6.1.5).

Wie URB beeinflusste in der vorliegenden Studie auch die chronische Gabe von CBD die sensomotorische Hemmung nicht. Die Literatur ist in diesem Punkt nicht konsistent. Bei Mäusen führte die subchronische (7 Tage) und chronische Gabe (18 Tage) verschiedener CBD-Konzentrationen (1, 5, 10 und 50 mg/kg) weder zu einer Veränderung der Schreckreaktionsamplitude noch zu einer Veränderung der PPI (Long et al., 2009). Allerdings wird in der Veröffentlichung von einer signifikanten Erhöhung der PPI nach chronischer Gabe von 1 mg/kg CBD berichtet. Dieses Ergebnis wurde aus geplanten Kontrasten abgeleitet, die streng genommen nicht betrachtet werden durften, da anscheinend nur für die akute, nicht aber für die chronische Behandlung ein signifikanter Haupteffekt vorlag. In der gleichen Studie hatte die akute Gabe von 10 mg/kg keinen Effekt auf die PPI, während die akute Gabe von 1, 5 und 50 mg/kg die PPI erhöhte. Die Amplitude der Schreckreaktion blieb bei allen Dosierungen unbeeinflusst. Interessanterweise stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu den Resultaten einer vorangegangenen Studie (Long et al., 2006). In dieser ersten Studie führte die akute CBD-Gabe (1 und 15 mg/kg, aber nicht 5 mg/kg) zu einer Erhöhung der Schreckreaktionsamplitu-

de, während die PPI unverändert blieb. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse wird von den Autoren nicht näher erläutert.

Bei Ratten wurden nach akuter CBD-Gabe wieder andere Ergebnisse beobachtet (Gururajan et al., 2011). CBD verringerte dosisabhängig die Schreckreaktionsamplitude (3 und 10 mg/kg, aber nicht 30 mg/kg) und die PPI (nur 10 mg/kg). Die Gründe für diese äußerst inkonsistenten Daten sind bisher unklar. Vermutlich führen wie auch schon bei der Testung der Ängstlichkeit (vgl. 7.1.3) kleine Unterschiede im Versuchsprotokoll, im Testzeitpunkt, der Gewöhnung der Tiere an den Experimentator, den Raum oder den Versuch, zu unterschiedlichen Ergebnissen. Somit wäre es wünschenswert, wenn diese Zusammenhänge in Zukunft systematisch untersucht würden, um eine bessere Standardisierung und Interpretierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

7.2. Konzentrationen der Endocannabinoide und verwandter Lipide

Die Eicosanoid-Messungen ergaben, dass die systemische (i. p.) URB-Gabe zu einer signifikanten Steigerung der Anandamid (AEA)-, PEA- und OEA-Level im Gehirngewebe führte. Im Gegensatz dazu blieb die 2-AG-Konzentration unverändert. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen. 2-AG wird nicht von FAAH sondern der Monoacylglycerol-Lipase (MGL) degradiert (vgl. 1.2.2.1) und *in vitro* Untersuchungen zeigten, dass URB als selektiver FAAH-Inhibitor wirkt und die MGL-Aktivität nur in hohen Konzentrationen reduzieren kann. Während 4.6 ± 1.6 nM URB ausreichen, um die FAAH-Aktivität zu 50 % zu inhibieren (IC_{50}), liegt die IC_{50} von URB in Bezug auf MGL bei über 30 μ M (Kathuria et al., 2003). Somit kann die verwendete Dosis von 0,3 mg/kg, die der doppelten ID_{50} entspricht (Kathuria et al., 2003), keinen Effekt auf die MGL-Aktivität haben.

In sämtlichen bekannten URB-Studien wurde die Substanz in einem wässrigen Lösungsmittel gelöst appliziert. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen mit Sesamöl eine Formulierung gewählt, die der eines Arzneimittels näher kommt. Die Ergebnisse zeigen, dass Sesamöl bei chronischer Gabe keinen generellen Einfluss auf die Wirksamkeit der Substanz zu haben scheint.

Die Hypothese, dass CBD ebenso wie URB die Anandamid-Hydrolyse inhibiert, konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Nach chronischer CBD-Gabe unterschieden sich die Anandamid (AEA)-, PEA und OEA-Spiegel im Gehirngewebe nicht von denen

der Vehikel-Tiere. Der Grund scheint in der zu geringen Dosierung zu liegen. Während in Neuroblastomzellen von Mäusen die IC_{50} 27,5 μ M betrug (Bisogno et al., 2001a), ergaben Untersuchungen von Rattengehirnpräparationen, dass CBD mit einer IC_{50} von 10 μ M die Anandamid-Hydrolyse blockiert (Leweke et al., 2012). In der vorliegenden Studie wurde allerdings nur etwa ein Fünftel der erforderlichen CBD-Konzentration im Gehirngewebe nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist zunächst verwunderlich, da die verwendete Dosierung äquivalent zu der in der humanen Studie verwendeten Konzentration war, in der die antipsychotische Wirksamkeit von CBD bei Schizophreniepatienten gezeigt werden konnte (Leweke et al., 2012). Auch das Lösungsmittel (Sesamöl) wurde in Anlehnung an diese Studie ausgewählt. Um den Stress für die Tiere zu minimieren wurde CBD allerdings nicht oral sondern intraperitoneal appliziert.

Neben der Administrationsroute könnte eine unterschiedliche Metabolisierung des CBDs in der Leber bei Ratte und Mensch eine schlechtere Bioverfügbarkeit bedingen.

7.3. Fazit

Die Erhöhung der Konzentration von Anandamid und verwandten Lipiden durch eine chronische URB-Gabe wirkte sich in der vorliegenden Studie (1) weder sedierend noch stimulierend auf die Motorik aus, hatte (2) keinen Effekt auf die Orientierungsfähigkeit, führte (3) unter stressarmen Bedingungen zu keiner erhöhten Ängstlichkeit und beeinflusste (4) weder das Arbeitsgedächtnis noch (5) die sensomotorische Hemmung. Allerdings scheint (6) eine erhöhte Anandamid-Konzentration die sozialen Verhaltensweisen gegenüber fremden Ratten zu verstärken.

Die anfängliche Frage, ob bei adulten Ratten die chronische Gabe von CBD zu Verhaltensänderungen führt, muss zunächst verneint werden. CBD wirkte sich ebenso wenig wie URB auf die Motorik, die Orientierungsfähigkeit, die Ängstlichkeit, das Arbeitsgedächtnis und die sensomotorische Hemmung aus. Außerdem hatte es keinen Effekt auf das Sozialverhalten. Allerdings führte die chronische CBD-Gabe im Gegensatz zu URB zu keiner Veränderung des Anandamid- sowie PEA- und OEA-Spiegels. Wie bereits erwähnt war dies vermutlich durch eine zu geringe Dosierung bedingt (vgl. 7.2). Somit kann die Frage, ob CBD auch im lebenden Organismus nach systemischer Gabe als Inhibitor des Anandamid-Hydrolyseenzym FAAH wirkt, vorläufig nicht beantwortet werden. Allerdings bleibt nun die Frage, ob CBD in der vorliegenden Studie keine Ver-

haltensänderungen hervorrufen konnte, weil die Dosierung zu gering gewählt war, oder ob der Wirkmechanismus gar nicht in erster Linie über die FAAH-Inhibition erfolgt. Neben der Blockade der Anandamid-Hydrolyse wurde auch eine Inhibition des Anandamid-Transporters FLAT postuliert. Letzteres würde nur zu einem Anstieg der Anandamid-Konzentration im synaptischen Spalt führen und somit eine Wirkverlängerung ermöglichen. Da dabei die Gesamtmenge an Anandamid unverändert bleiben würde, könnte man auch keine Erhöhung des Anandamid-Spiegels messen. Die für die FLAT-Inhibition notwendige IC_{50} (Rakhshan et al., 2000; Bisogno et al., 2001a) liegt aber in einem ähnlichen Bereich wie die der FAAH-Inhibition. Somit wäre auch für diesen Mechanismus die CBD-Konzentration zu gering.

Andererseits wurden in anderen Studien auch Verhaltensveränderungen mit noch geringeren Dosierungen hervorgerufen als die 12 mg/kg, die in der vorliegenden Arbeit appliziert wurden. Dosierungen von 1, 2,5, 3, 5 und 10 mg/kg wirkten beispielsweise unter bestimmten Bedingungen anxiolytisch (Guimaraes et al., 1990; Onaivi et al., 1990) oder sogar anxiogen (ElBatsh et al., 2011), hatten Auswirkungen auf die Amplitude der Schreckreaktion oder die PPI (Gururajan et al., 2011). Allerdings finden sich ebenso Berichte in denen bei den Dosierungen keine Wirkung beobachtet wird (Long et al., 2006; Long et al., 2009).

Somit ergeben sich aus den Ergebnissen der CBD-URB Studie folgende Fragen: Wirkt CBD über einen ganz anderen Mechanismus, für den die geringen Konzentrationen ausreichen? Ist die Wirkung von CBD eventuell durch die verwendete Spezies (Maus oder Ratte, unterschiedliche Stämme) und somit durch genetische Faktoren bedingt? Könnte die Bioverfügbarkeit durch die Verwendung einer anderen Formulierung in den genannten Studien besser gewesen sein, so dass höhere CBD-Konzentrationen das Gehirn erreichten? Während die beiden ersten Fragen unbeantwortet bleiben müssen, wurde die Frage der verbesserten Bioverfügbarkeit durch eine andere Darreichungsform im dritten Teil der Lösungsmittelstudie untersucht.

8. Ergebnisse pubertäre THC-Studie

8.1. Verhaltensversuche

In der pubertären THC-Studie durchliefen die Tiere jeweils zweimal verschiedene Verhaltensparadigmen. Die erste Testung erfolgte präpubertär (t0), die zweite im Erwachsenenalter (t1) nach pubertärer Vehikel- oder Δ^9 -THC-Behandlung. Die Daten wurden hinsichtlich des Behandlungseffektes und des Testzeitpunktes mittels 2 faktorieller (Faktoren: Testzeitpunkt, Behandlung) bzw. 3 faktorieller mixed design ANOVA (Faktoren: Testzeitpunkt, Behandlung, zusätzliche Variable des Verhaltensversuchs wie Zone, Durchgang etc.) ausgewertet. Ein Haupteffekt des Testzeitpunktes gibt an, dass sich die Ratten (zunächst unabhängig von der Behandlung) präpubertär (t0) anders verhielten als im Erwachsenenalter (t1). Diese Veränderung kann entwicklungsbedingt sein und einen Alterungseffekt widerspiegeln oder durch die Behandlung ausgelöst worden sein. Ein Haupteffekt der Behandlung zeigt Gruppenunterschiede (Vehikel, THC) an, die zum einen bereits a priori bestanden haben können oder durch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung hervorgerufen wurden. Liegt eine Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Testzeitpunkt vor, lässt sich mittels Interaktionsanalyse genau klären, ob Unterschiede auf die Behandlung zurückzuführen sind.

8.1.1. Open Field

Die Analyse der zurückgelegten Distanz in der Open Field-Arena ergab mehrere signifikante Haupteffekte und Interaktionen. Zum einen legten alle Ratten zu beiden Testzeitpunkten in der inneren Zone signifikant kürzere Distanzen zurück als in der äußeren Zone ($F(1,7) = 307,5$; $p < 0,001$; Abbildung 52). Zum anderen wurde das Laufverhalten durch den Testzeitpunkt ($F(1,7) = 5,7$; $p = 0,048$) und die Behandlung ($F(1,7) = 22,8$; $p = 0,002$) beeinflusst und für beide Faktoren wurde eine Interaktion mit dem Faktor Zone beobachtet (Zone*Behandlung: $F(1,7) = 13,7$; $p = 0,008$; Zone*Zeitpunkt: $F(1,7) = 10,0$; $p = 0,016$). Die Interaktionsgraphiken (Abbildung 53) und der Post hoc-Test Sidak bestätigten was sich bereits in Abbildung 52 erahnen lässt: die Laufaktivität der präpubertären und adulten Ratten war in der inneren Zone vergleichbar ($p = 0,575$), in der äußeren Zone legten die präpubertären Tiere allerdings eine signifikant kürzere Strecke zurück ($p = 0,017$). Dieser Unterschied zwischen den Altersgrup-

pen bezieht sich aber nur auf die Ratten der THC-Gruppe, die vor Behandlung in der äußeren Zone signifikant weniger weit liefen als die Tiere der Vehikelgruppe ($p = 0,003$). Im Erwachsenenalter legten alle Tiere unabhängig von der Behandlung vergleichbare Distanzen zurück.

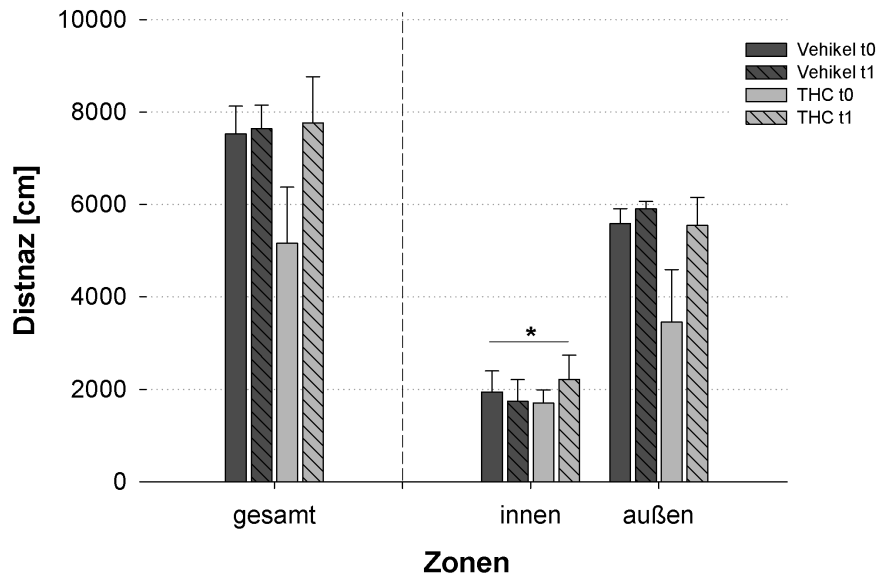


Abbildung 52: Zurückgelegte Distanz in der gesamten Open Field-Arena (links) sowie in der inneren und äußeren Zone (rechts).

Alle Tiere legten zu beiden Testzeitpunkten (t0: präpubertär, t1: adult) in der inneren Zone signifikant geringere Distanzen zurück, als in der äußeren ($p < 0,001$). Allerdings bewegten sich die Tiere der THC-Gruppe vor Behandlung insbesondere in der äußeren Zone weniger als die präpubertären Ratten der Vehikelgruppe (vgl. Interaktionsgraphik, Abbildung 53).

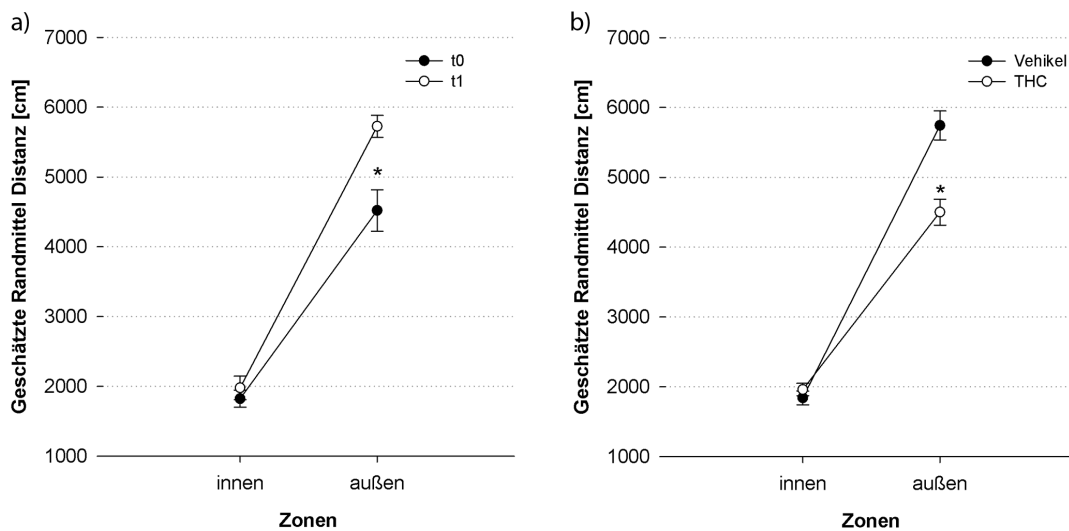


Abbildung 53: Interaktionsgraphiken der zurückgelegten Distanz: (a) Zone*Testzeitpunkt und (b) Zone*Behandlung.

Die geschätzten Randmittel (gemittelt über Faktor Behandlung) verdeutlichen, dass die Ratten adult (t1) nur in der äußeren Zone weiter liefen als präpubertär (t0; $p = 0,017$). Die zurückgelegte Distanz in der inneren Zone blieb unverändert (a). Dieser Unterschied wurde durch Gruppenunterschiede ausgelöst (b, geschätzte Randmittel gemittelt über Faktor Testzeitpunkt). Die THC-Tiere liefen in der äußeren Zone signifikant weniger als die Ratten der Vehikelgruppe ($p = 0,003$).

Dieser präpubertäre Gruppenunterschied spiegelte sich nicht in der Laufgeschwindigkeit wider. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere in den beiden Zonen der Open Field-Arena bewegten, nahm allerdings mit dem Alter zu ($F(1,7) = 18,1$; $p = 0,004$; Abbildung 54). Des Weiteren liefen alle Tiere in der inneren Zone schneller als in der äußeren ($F(1,7) = 75,8$; $p < 0,001$). Die Behandlung beeinflusste die Laufgeschwindigkeit nicht ($F(1,7) = 4,4$; $p = 0,074$). Zusammen mit den Ergebnissen bezüglich der zurückgelegten Distanz lässt sich somit sagen, dass die pubertäre Δ^9 -THC-Gabe weder eine sedierende noch eine stimulierende Wirkung auf die Motorik der Ratten hatte.

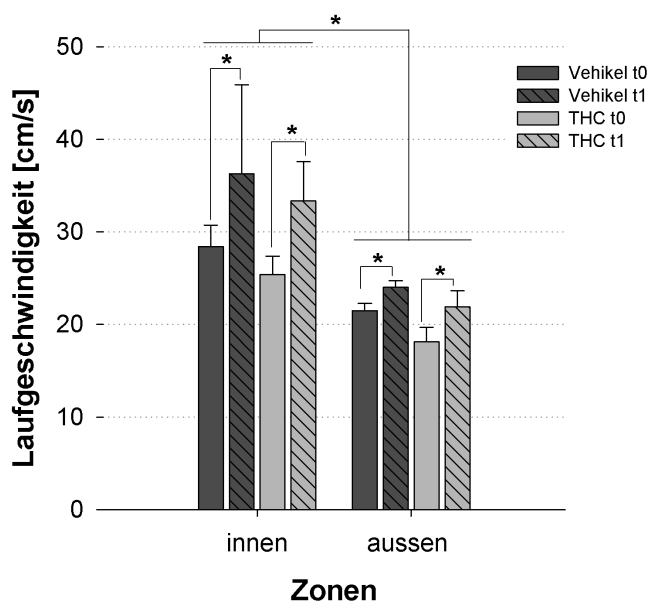


Abbildung 54: Laufgeschwindigkeit in den beiden Zonen der Open Field-Arena.

Unabhängig vom Alter (t0: präpubertär, t1: adult) und der pubertären Behandlung war die Laufgeschwindigkeit der Ratten in der inneren Zone höher als in der äußeren ($p < 0,001$). Des Weiteren liefen die adulten Ratten insgesamt schneller ($p = 0,004$).

Für die Analyse des Homebase-Verhaltens der Tiere wurde die Aufenthaltsdauer in den vier äußeren Zonen betrachtet (Abbildung 55). Da die Bedingung der Sphärizität verletzt wurde, wurden die Freiheitsgrade zunächst korrigiert (Zone: $X^2(5) = 11,6$; $p = 0,043$; Greenhouse-Geisser Schätzung $\epsilon = 0,518$; Zone*Testzeitpunkt: $X^2(5) = 22,2$; $p = 0,001$; Greenhouse-Geisser Schätzung; $\epsilon = 0,382$). Zu beiden Zeitpunkten bildeten die Ratten beider Behandlungsgruppen eine Homebase aus. Die geplanten einfachen Kontraste, die aufgrund des signifikanten Haupteffekts der Zone ($F(1,553, 10,872) = 74,4$; $p < 0,001$) durchgeführt wurden, ergaben, dass sich die Aufenthaltsdauer in der rechten, linken und oberen Zone signifikant von der unteren Zone unterschied (jeweils $p < 0,001$). Dies zeigt an, dass die Homebase in der unteren Zone lag. Allerdings lag auch eine signifikante Interaktion der Faktoren Zone und Testzeitpunkt vor ($F(1,146, 8,025) = 5,8$; $p = 0,040$).

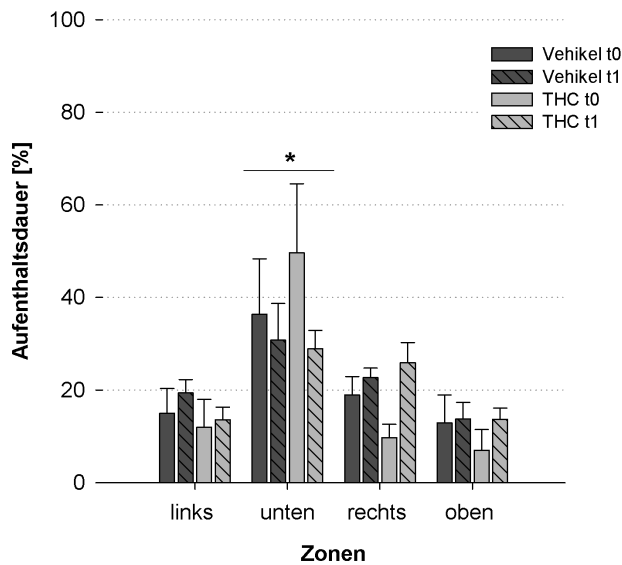


Abbildung 55: Prozentuale Aufenthaltsdauer in den äußeren Zonen der Open Field-Arena.

Die Ratten bildeten sowohl im präpubertären (t0) als auch im Erwachsenenalter (t1) eine Homebase aus ($p < 0,001$). Diese lag in der unteren Zone ($p < 0,001$). Bei den adulten Ratten verschob sich die Homebase teilweise nach rechts (siehe Interaktionsgraphik).

Die Interaktionsanalyse (Abbildung 56, Post hoc-Test Sidak) zeigte, dass die präpubertären Ratten ihre Homebase tatsächlich nur in der unteren der Zone einrichteten (unten vs. links: $p = 0,013$; vs. rechts: $p = 0,008$; vs. oben: $p = 0,006$), während sich die Ratten im Erwachsenenalter sowohl in der unteren und rechten Zone länger aufhielten als in den anderen beiden (links vs. unten: $p = 0,011$; links vs. rechts: $p = 0,022$; oben vs. rechts: $p = 0,008$; oben vs. unten: $p = 0,003$). Die Zunahme der Aufenthaltsdauer in der rechten Zone zum Testzeitpunkt t1 war signifikant ($p < 0,001$).

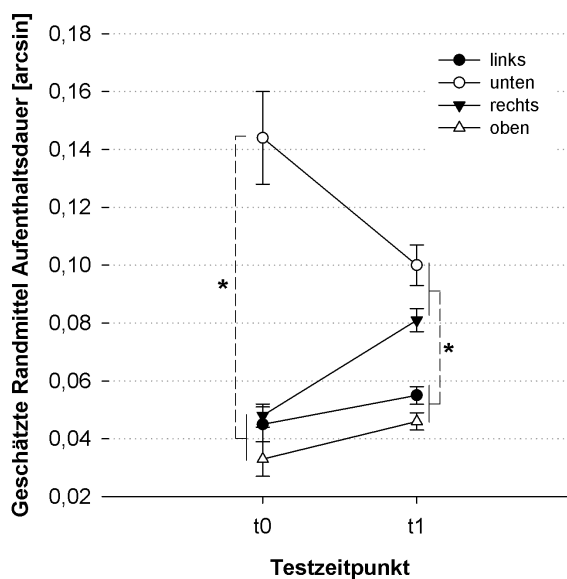


Abbildung 56: Interaktionsgraphik für die Aufenthaltsdauer: Zone*Zeitpunkt.

Die geschätzten Randmittel (gemittelt über die Behandlung) machen deutlich, dass sich die präpubertären Ratten (t0) vorwiegend in der unteren Zone aufhielten (*: $p \leq 0,013$). Nach Behandlung (t1) sank die Aufenthaltsdauer in der unteren Zone etwas, während die in der rechten Zone signifikant zunahm (Signifikanz nicht eingezeichnet: $p < 0,001$). Dies lässt auf ein Homebaseverhalten schließen, das sich über die zwei Zonen erstreckte (*: $p \leq 0,022$).

Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung wirkte sich nicht auf das Homebaseverhalten der Ratten aus ($F(1, 7) = 3,4$; $p = 0,108$).

Weder die Behandlung ($F(1,7) = 0,1$; $p = 0,812$) noch das Alter ($F(1,7) = 0,5$; $p = 0,513$) der Tiere bewirkte eine Veränderung der Ängstlichkeit: die Frequenz, mit der die Tiere die innere Zone betraten, blieb unverändert (Abbildung 57).

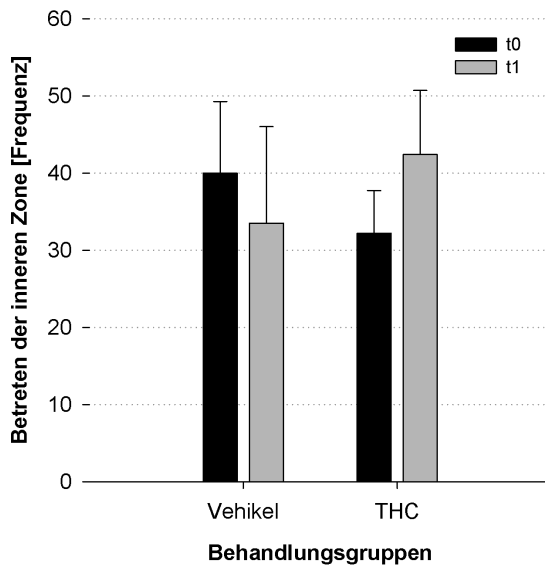


Abbildung 57: Frequenz, mit der die innere Zone der Open Field-Arena betreten wurde.

Die Ängstlichkeit wurde nicht durch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung moduliert. Auch das Alter der Tiere wirkte sich nicht aus.

Durchschnittlich betraten die Ratten die innere Zone der Open Field-Arena 37 ± 9 Mal und somit häufiger als die Tiere der CBD-URB-Studie (vgl. 6.1.1).

8.1.2. Objekterkennung

Das Explorationsverhalten der Ratten war in beiden Durchgängen ($F(1,7) = 1,5$; $p = 0,259$) und zu beiden Testzeitpunkten ($F(1,7) = 4,5$; $p = 0,071$) vergleichbar. Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung hatte ebenfalls keinen Einfluss ($F(1,7) = 1,3$; $p = 0,290$) auf die Tiere. Insgesamt verbrachten sie etwa $\frac{1}{3}$ der Testzeit mit der aktiven Exploration der Objekte (Abbildung 58) und beschäftigten sich somit ähnlich lange mit den Objekten wie die Ratten der CBD-URB-Studie (vgl. 6.1.2).

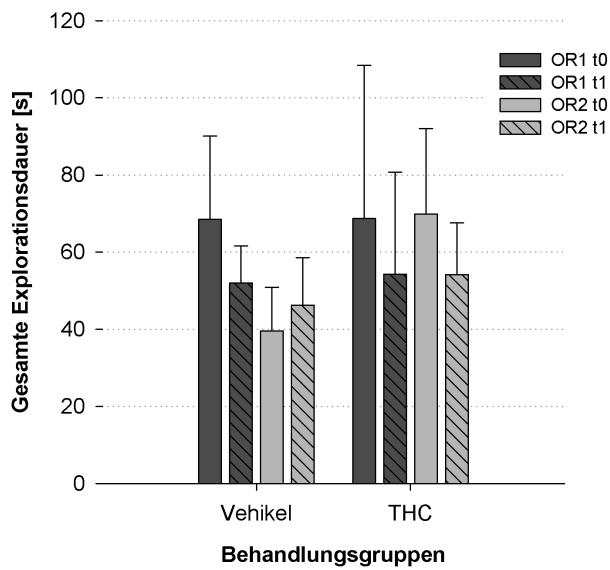


Abbildung 58: Gesamte Explorationszeit während des ersten (OR1) und zweiten Durchgangs (OR2) des Objekterkennungstests.

Weder die Behandlung noch der Testzeitpunkt (t0: präpubertär, t1: adult) wirken sich auf das Explorationsverhalten der Ratten aus.

Die Zeit, bis die Tiere im zweiten Durchgang das erste Objekt betrachteten, sowie die Objektwechselfrequenz wurden ebenfalls nicht durch die Behandlung (Latenz: $F(1,7) = 0,6$; $p = 0,467$; Objektwechsel: $F(1,7) < 0,1$; $p = 0,964$) oder das Alter der Ratten (Latenz: $F(1,7) = 1,7$; $p = 0,231$; Objektwechsel: $F(1,7) < 0,1$; $p = 1,000$) beeinflusst.

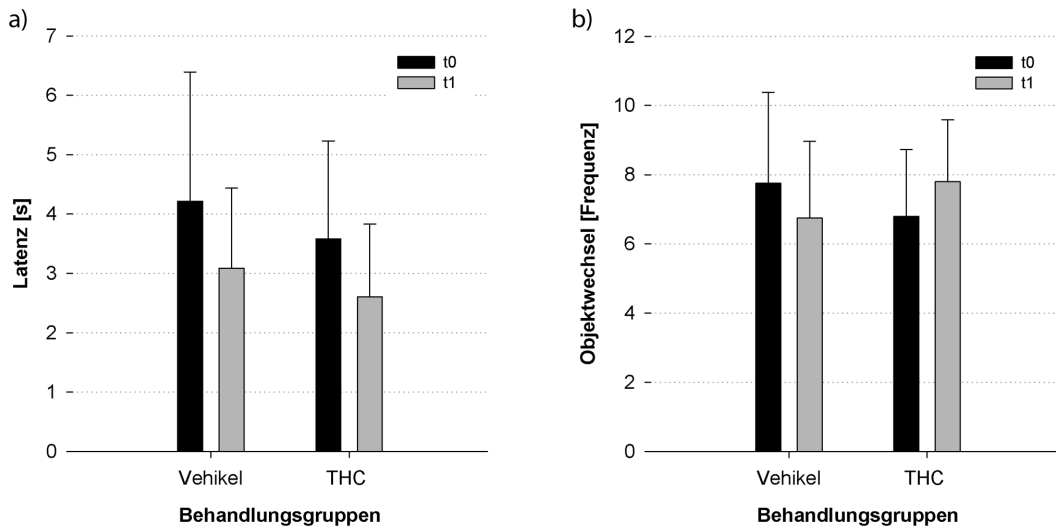


Abbildung 59: Latenzzeit, bis das erste Objekt im zweiten Durchgang betrachtet wurde (a) sowie die Frequenz, mit der die Ratten zwischen den Objekten wechselten (b).

Zu beiden Testzeitpunkten (t0: präpubertär, t1: adult) war die Latenzzeit und die Objektwechselfrequenz bei beiden Behandlungsgruppen vergleichbar.

Daher wurde die Arbeitsgedächtnisleistung nicht durch die Aktivität/Lokomotion der Tiere beeinflusst. Sowohl vor als auch nach der pubertären Δ^9 -THC-Behandlung ergaben sich für beide Gruppen positive Diskriminierungsindizes, so dass bei allen Ratten

zu beiden Testzeitpunkten von einem intakten Arbeitsgedächtnis ausgegangen werden kann (Abbildung 60). Weder der Testzeitpunkt ($F(1,7) = 0,2$; $p = 0,657$) noch die Behandlung ($F(1,7) = 0,2$; $p = 0,635$) verursachte eine Veränderung der Leistungsfähigkeit des Arbeitsgedächtnisses.

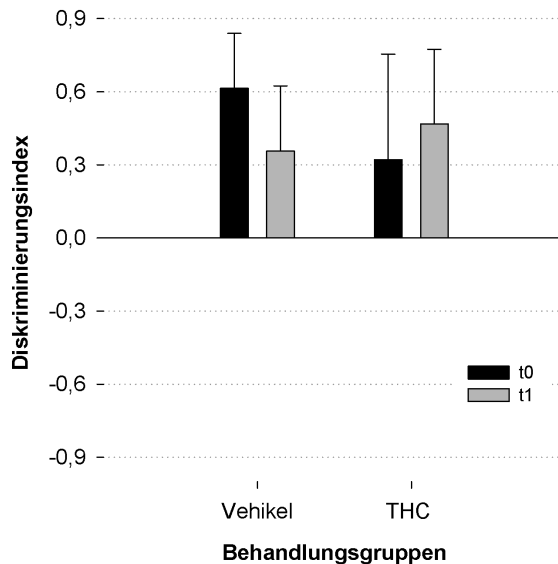


Abbildung 60: Diskriminierungsindex.

Alle Tiere betrachteten im zweiten Durchgang das neue Objekt intensiver als das bekannte (positiver Diskriminierungsindex). Somit hatte die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung.

8.1.3. Soziale Interaktion

Die Zeit, die die Tiere während des Versuches mit sozialer Interaktion verbrachten, war bei beiden Behandlungsgruppen vor und nach Behandlung vergleichbar (Abbildung 61; Testzeitpunkt: $F(1,7) < 0,1$; $p = 0,926$; Behandlung: $F(1,7) = 0,4$; $p = 0,540$).

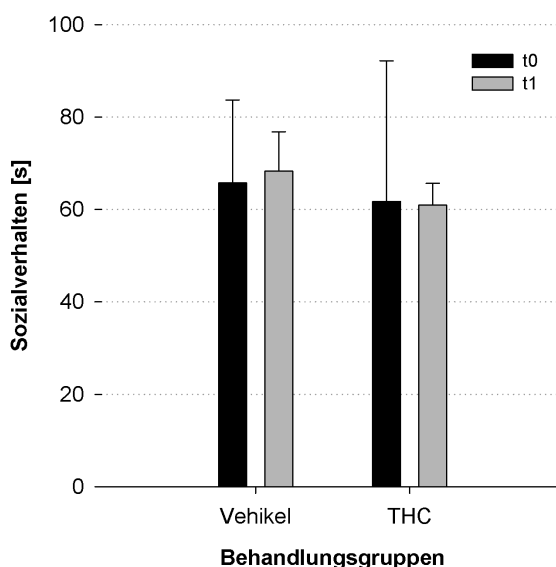


Abbildung 61: Sozialverhalten gegenüber einer fremden Ratte.

Sowohl im präpubertären (t0) als auch im adulten Alter (t1) beschäftigten sich die Ratten etwa gleich lange mit dem Interaktionspartner. Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung hatte somit keinen Einfluss auf die soziale Interaktion.

Durchschnittlich interagierten alle Tiere etwa $\frac{1}{3}$ der Zeit mit der fremden Ratte (vgl. 6.1.3), wobei sich die Qualität des Sozialverhaltens mit zunehmenden Alter veränderte (Abbildung 62).

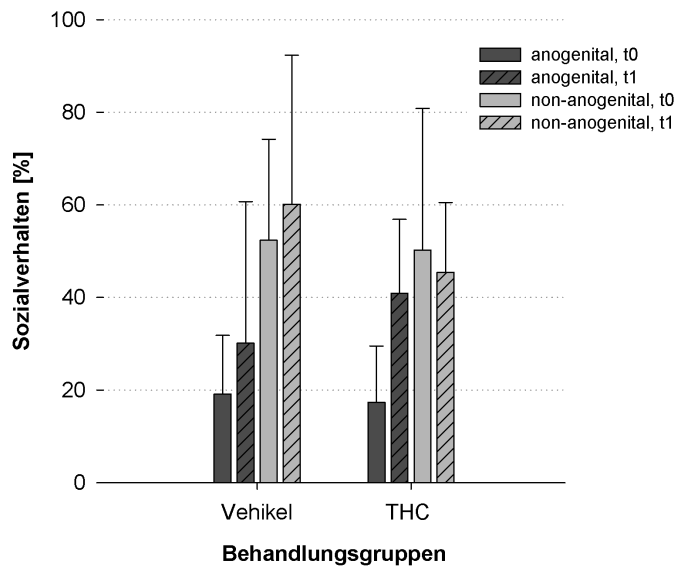


Abbildung 62: Prozentualer Anteil des anogenitalen und non-anogenitalen Verhaltens.

Tendenziell war das non-anogenitale Verhalten im präpubertären Alter (t0) stärker ausgeprägt als im adulten (t1). Die pubertäre Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Art des Sozialverhaltens.

Die präpubertären Ratten schienen hauptsächlich non-anogenital zu interagieren. Die Videoanalyse zeigte, dass in diesem Alter das Spielverhalten ausgeprägter war als bei den adulten Tieren. Im Erwachsenenalter nahm hingegen das anogenitale Verhalten zu, so dass es zeitlich mit dem non-anogenitalen Verhalten vergleichbar war. Diese Veränderungen der Verhaltensweisen mit zunehmenden Alter waren allerdings nicht signifikant (Testzeitpunkt: (F (1,7) = 5,3; p = 0,055); Verhaltensweise (non-anogenital, anogenital; F (1,7) = 5,4; p = 0,053). Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung beeinflusste das Verhältnis des anogenitalen und non-anogenitalen Verhaltens nicht (F (1,7) = 0,4; p = 0,541).

8.1.4. Erhöhte Plusarena

Die statistische Analyse der Zeit, die die Ratten auf den offenen Armen verbrachten, ergab einen signifikanten Haupteffekt des Testzeitpunkts (F (1,7) = 35,0; p = 0,001). Wie Abbildung 63 zeigt, hielten sich alle Tiere vor der pubertären Behandlung signifikant kürzer auf den offenen Armen auf, als zum Testzeitpunkt t1. Diese Veränderung war altersbedingt und unabhängig von der Δ^9 -THC-Behandlung (F (1,7) = 1,2; p = 0,309).

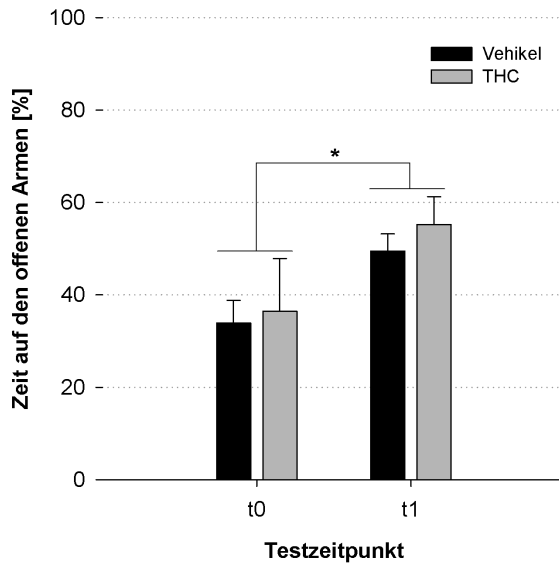


Abbildung 63: Relative Zeit auf den offenen Armen der erhöhten Plusarena.

Im präpubertären Alter (t0) verbrachten alle Ratten signifikant weniger Zeit auf den offenen Armen als im Erwachsenenalter (t1; $p = 0,001$). Das Verhalten der adulten Tiere wurde durch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung nicht beeinflusst.

Dass dieser Unterschied auf einer verminderten Ängstlichkeit im Erwachsenenalter beruhte, zeigt auch die zu beiden Testzeitpunkten vergleichbare Armwechselfrequenz ($F(1,7) = 0,3$; $p = 0,578$; Abbildung 64), die ebenfalls nicht durch die pubertäre Behandlung beeinflusst wurde ($F(1,7) = 1,4$; $p = 0,271$). Das Verhalten auf den offenen Armen der Arena wurde also nicht durch eine veränderte Lokomotion bedingt.

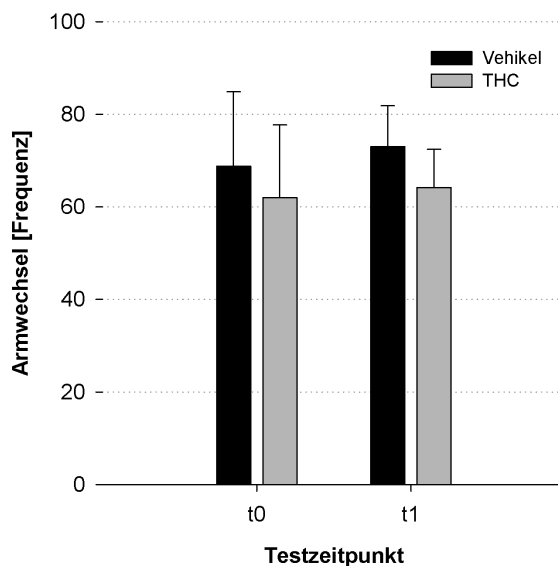


Abbildung 64: Lokomotorische Aktivität auf der erhöhten Plusarena.

Die Armwechselfrequenz veränderte sich weder in Abhängigkeit vom Alter der Tiere (t0: präpubertär, t1: adult) noch durch die pubertäre Behandlung mit Δ^9 -THC.

8.1.5. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die Amplitude der Schreckreaktion (Abbildung 65) unterschied sich deutlich zwischen den Testzeitpunkten ($F(1,7) = 30,4$; $p = 0,001$), während die Δ^9 -THC-Behandlung kei-

nen Einfluss hatte ($F(1,7) < 0,1$; $p = 0,943$). Im präpubertären Alter war die Amplitude mit 36 ± 7 mV deutlich niedriger als im Erwachsenenalter (100 ± 34 mV). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die jungen Ratten deutlich weniger wogen (präpubertär: 129 ± 10 g; adult: 311 ± 18 g). Während bei der Messung der Ganzkörperreaktion über das Piezoelement kleinere Gewichtsunterschiede keine große Rolle spielen (Korrelation nach Pearson Amplitude/Gewicht präpubertär: $r = 0,60$; $p = 0,090$; adult: $r = 0,63$; $p = 0,070$), machen sich große Gewichtsunterschiede deutlich bemerkbar.

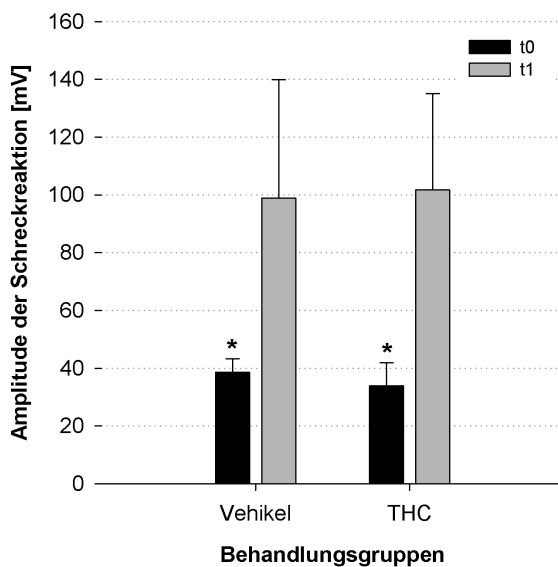


Abbildung 65: Amplitude der Schreckreaktion in Abhängigkeit vom Testzeitpunkt (t0: präpubertär, t1: adult) und der Behandlung.

Die Schreckreaktionsamplitude nahm mit dem Alter signifikant zu ($p = 0,001$), wobei dies mit einer deutlichen Gewichtszunahme einherging. Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung hatte hingegen keinen Einfluss.

Bei der Analyse der Präpulsinhibition (PPI) zeigte sich eine Verletzung der Sphärizitäts-Bedingung, so dass die Freiheitsgrade des Faktors Präpuls lautstärke angepasst wurden (Mauchly-Tests: $X^2(5) = 15,3$; $p = 0,010$; Greenhouse-Geisser Schätzung: $\epsilon = 0,436$).

Es gab keinen signifikanten Haupteffekt der Behandlung ($F(1,7) = 0,6$; $p = 0,454$), aber der Präpuls lautstärke ($F(1,309, 9,166) = 110,0$; $p < 0,001$) und des Testzeitpunkts ($F(1,7) = 56,3$; $p < 0,001$). Zudem lag eine signifikante Interaktion beider Faktoren vor ($F(3,21) = 12,6$; $p < 0,001$).

Wie aus Abbildung 66 und der Interaktionsgraphik Abbildung 67 a hervorgeht, war die PPI bei den adulten Ratten stärker ausgeprägt als im präpubertären Alter (Post hoc-Test Sidak: 68 dB: $p = 0,032$; 72 dB: $p = 0,006$; 78 dB: $p = 0,001$; 84 dB: $p < 0,001$). Zudem war das Ausmaß der PPI von der Präpuls lautstärke abhängig. Generell galt je lauter der Präpuls, desto größer die PPI. Während dies bei den adulten Ratten für alle Präpuls lautstärken galt (Post hoc-Test Sidak: 68 vs. 72 dB: $p = 0,019$; 84 vs. 68 und vs. 72 dB: $p < 0,001$; ansonsten $p = 0,001$), unterschied sich zum Testzeitpunkt t0 die

PPI nach Präsentation eines Präpulses von 68 dB SPL LIN nicht von der nach 72 und aufgrund der hohen Standardabweichung auch nicht von der PPI nach 78 dB SPL LIN Präpulsen (Post hoc-Test Sidak: 68 vs. 72 dB: $p = 0,657$; 68 vs. 78 dB: $p = 0,051$; 68 vs. 84 dB: $p = 0,001$; 72 vs. 78 dB: $p = 0,048$; alle anderen $p < 0,001$; Abbildung 67 b).

Somit verstärkte sich die Abhängigkeit der PPI von der Präpuls lautstärke mit zunehmendem Alter. Dies hing sicherlich auch mit der insgesamt stärkeren PPI der adulten Tiere zusammen.

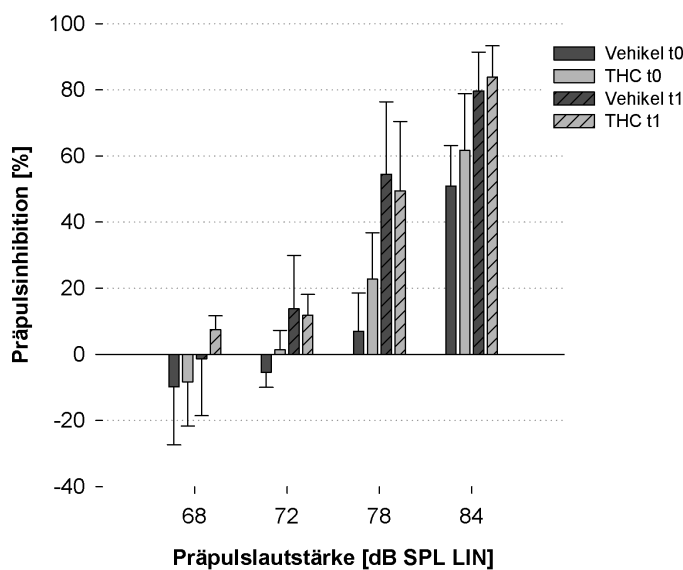


Abbildung 66: Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion in Abhängigkeit vom Testzeitpunkt und der Behandlung.

Generell nahm die PPI zu beiden Testzeitpunkten mit zunehmender Präpuls lautstärke zu. Des Weiteren war die PPI bei den adulten Ratten insgesamt stärker ausgeprägt. Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung hatte hingegen keinen Einfluss.

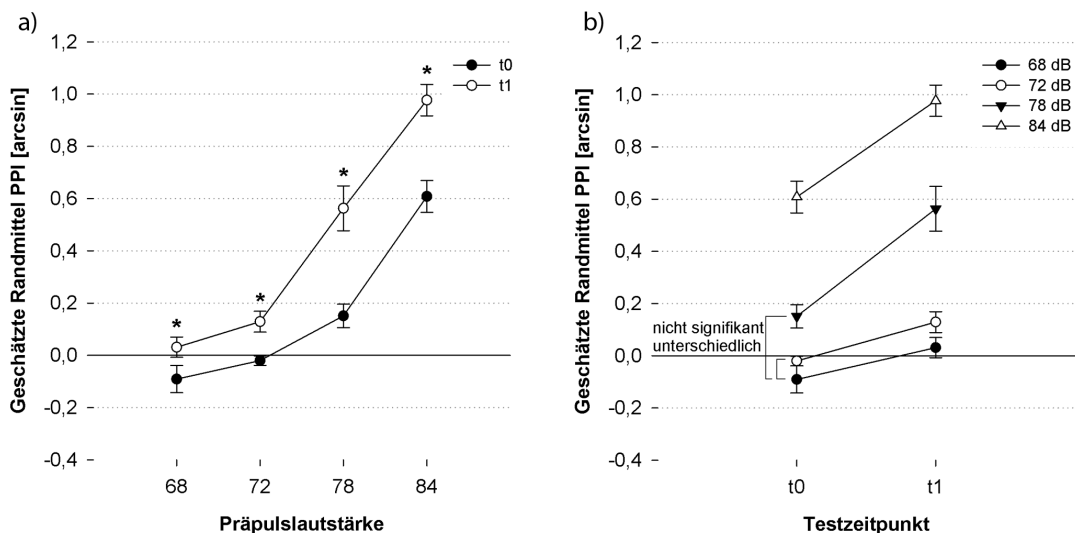


Abbildung 67: Interaktiongraphen: Präpuls lautstärke*Testzeitpunkt.

Die geschätzten Randmittel (gemittelt über die Behandlung) zeigen deutlich, dass (a) die adulten Tiere (t1) bei jeder Präpuls lautstärke eine signifikant stärkere PPI aufwiesen als im präpubertären Alter (t0). Außerdem nahm (b) zum Testzeitpunkt t1 die PPI mit zunehmender Präpuls lautstärke zu, während bei den präpubertären Ratten (t0) die PPI nach 68 dB SPL LIN Präpuls verglichbar mit der PPI nach 72 und 78 dB SPL LIN Präpuls war.

8.2. Verhaltens-PET

Zum Testzeitpunkt t1 wurde die PPI-Untersuchung mit einer PET-Messung kombiniert, um eventuelle metabolische Veränderungen, ausgelöst durch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung, untersuchen zu können.

Der Vergleich der beiden Behandlungsgruppen ergab zunächst in mehreren Gehirnarealen einen Unterschied in der Glukoseutilisation (Berechnung vgl. 3.11.3) mit Aktivitätsdifferenzen über 5 %. Die Veränderungen innerhalb der Areale, die sich in der PPI-PET-Studie für die PPI sowie die Schreckreaktion als relevant herausgestellt hatten, sind in Tabelle 6 angegeben.

Die statistische Analyse (unabhängige t-Tests mit anschließender FDR) ergab jedoch, dass diese Aktivitätsdifferenzen nicht signifikant waren (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der Glukoseutilisation nach pubertärer Vehikel- oder Δ^9 -THC-Behandlung während der Präpulsinhibition im Erwachsenenalter.

In keinem für die PPI und die Schreckreaktion relevanten Areal war die Aktivitätsdifferenz nach Korrektur signifikant. Somit hatte die pubertäre Behandlung keinen relevanten Einfluss auf die Glukoseutilisation.

Abk.: vcPnC: *ventrocaudaler Nucleus reticularis pontis caudalis*, VLTg: *Nucleus ventrolateralis tegmentalis*, CnF: *Nucleus cuneiformis*, SN: *Substantia nigra*.

Gehirnareal	Differenz [%]	t-Wert	p-Wert unkorrigiert	p-Wert korrigiert
vcPnC_li	-16,0	-1,9	0,119	0,179
vcPnC_re	-16,4	-1,0	0,361	0,433
VLTg_li	-6,4	-2,1	0,074	0,222
VLTg_re	-10,6	-2,9	0,024	0,144
CnF_li	1,0	—	—	—
CnF_re	-2,8	—	—	—
SN_li	13,6	-1,8	0,112	0,223
SN_re	-6,4	-0,6	0,559	0,559

Dass überhaupt Aktivitätsdifferenzen von über 5 % auftraten, schien an zwei Tieren in der THC-Gruppe zu liegen, bei denen die Intensitätsnormalisierung mit dem *Bulbus olfactorius* als Referenzareal nicht optimal aussah. Mit Ausnahme der linken *Substantia nigra* waren alle Unterschiede negativ, d.h. die Glukoseutilisation war während des PPI-PET-Versuches bei den THC-Tieren etwas geringer als bei den Kontrollen.

9. Diskussion pubertäre THC-Studie

Bei Menschen gilt Cannabiskonsum in der Pubertät als Stressfaktor, der bei prädisponierten Personen die Entwicklung einer Schizophrenie begünstigt (vgl. 1.3.2). Davon ausgehend wurde ein Tiermodell etabliert, mit dem gezeigt werden konnte, dass bei Ratten eine chronische pubertäre Behandlung mit dem synthetischen Cannabinoid WIN 55,212-2 im adulten Tier Schizophrenie-ähnliche Symptome auslöst, die mit Hilfe von Antipsychotika behandelt werden können (Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2008; Leweke & Schneider, 2010). Die pubertäre THC-Studie wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das Modell der chronischen pubertären WIN 55,212-2-Gabe auch mit dem vom Menschen konsumierten Δ^9 -THC reproduzieren lässt. Dabei wurde nicht nur analysiert, ob die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung bei adulten Ratten Defizite bezüglich der Motorik, der räumlichen Orientierung, der Neugier/Ängstlichkeit, des Arbeitsgedächtnisses, des Sozialverhaltens oder der sensomotorische Hemmung hervorruft, sondern auch ob Veränderungen der zerebralen Glukoseutilisation induziert werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit den Resultaten anderer chronischer adoleszenter Cannabinoidbehandlungen diskutiert. Dabei muss berücksichtigt werden, dass sich die Ergebnisse nicht immer direkt vergleichen lassen, da unterschiedliche Cannabinoide eingesetzt wurden und die Behandlung teilweise innerhalb verschiedener Zeiträume der Adoleszenz durchgeführt wurden.

9.1. Verhaltensversuche

9.1.1. Motorik: Open Field und erhöhte Plusarena

Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung wirkte weder sedierend noch stimulierend auf das Verhalten der Tiere. Im Open Field legten die Ratten beider Behandlungsgruppen vergleichbare Distanzen mit ähnlicher Geschwindigkeit zurück. Auch die Armwechselfrequenz auf der erhöhten Plusarena war identisch, so dass auch hier von einer unveränderten Lokomotion ausgegangen werden kann. Allerdings ließ sich ein Alterungseffekt beobachten. Die präpubertären Tiere liefen insgesamt etwas langsamer als später im jungen Erwachsenenalter.

In nur einer weiteren Studie wurde ebenfalls die Wirkung einer chronischen pubertären Δ^9 -THC-Behandlung (postnatal day (pd) 41-60) auf die Lokomotion untersucht, wobei die Testung bereits am letzten Tag der Behandlung erfolgte, so dass ein möglicher Effekt auch akut bedingt sein könnte (Harte & Dow-Edwards, 2010). Unter dieser Bedingung konnte aber ebenfalls kein Effekt auf die zurückgelegte Distanz nachgewiesen werden. Es wurde aber festgestellt, dass eine chronische präpubertäre Δ^9 -THC-Gabe (pd 22-40) zu einer Reduktion der zurückgelegten Strecke führt. Während eine weitere präpubertäre Studie (Δ^9 -THC-Behandlung: pd 30-38) beobachtete, dass sich die adulten Tiere seltener aufrichteten (Wiley et al., 2007), konnten Rubino et al. (2008) keinen Einfluss auf die Lokomotion feststellen (Behandlung pd 35-45).

Wurden die Ratten chronisch von Beginn der Pubertät (pd 40) bis ins Erwachsenenalter (pd 130) hinein mit Δ^9 -THC behandelt, ließ sich nur eine tendenzielle Aktivitätsminderung im Open Field messen (Stiglick & Kalant, 1983).

Des Weiteren führte weder die präpubertäre (pd 15-40) noch die pubertäre WIN 55,212-2-Behandlung (pd 40-65) zu einer Veränderung der zurückgelegten Distanz im Open Field (Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2005). Dem gegenüber steht allerdings eine Studie der gleichen Arbeitsgruppe, in der die pubertäre WIN 55,212-2-Gabe zu einer Hyperaktivität im Open Field führte (Wegener & Koch, 2009). Die Autoren führen diese unterschiedlichen Resultate auf eine leicht veränderte Testprozedur zurück.

9.1.2. Räumliche Orientierung: Open Field

Unabhängig von der pubertären Behandlung wurde bei allen Tieren ein Homebase-Verhalten (vgl. 7.1.2) beobachtet. Während die präpubertären Tiere nur in der unteren Zone eine Homebase etablierten, starteten die Tiere nach Behandlung ihre Erkundungsgänge entweder von der unteren oder der rechten Zone bzw. teilweise von der Grenzregion beider Zonen. Dieses klassische Verhalten zeigt, dass die räumliche Orientierung schon bei den jungen Tieren voll ausgeprägt war und auch nicht durch die Δ^9 -THC-Behandlung beeinflusst wurde.

In der Literatur finden sich keine Berichte über die Auswirkung von Cannabinoiden auf das Homebase-Verhalten von Ratten. Auch in anderen Paradigmen scheint der Behandlungseinfluss auf die Koppelnavigation nicht untersucht worden zu sein.

Ebenso fehlen Untersuchungen bezüglich des Homebase-Verhaltens von jungen Ratten.

9.1.3. Ängstlichkeit/Neugier: Open Field und erhöhte Plusarena

Die Frequenz, mit der die innere Zone der Open Field-Arena betreten wird, gilt als inverses Maß für die Ängstlichkeit, sofern die motorische Aktivität der Tiere, wie in dieser Studie, unverändert ist (vgl. 7.1.3). Da weder der Testzeitpunkt noch die Behandlung die Frequenz beeinflusste, ist zunächst davon auszugehen, dass sich die Ängstlichkeit nicht mit dem Alter veränderte und auch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung keine Auswirkungen auf die Ängstlichkeit der Tiere hatte. Betrachtet man aber zusätzlich die Ergebnisse der erhöhten Plusarena, so zeigt sich, dass dies zwar für die pubertäre Behandlung gilt, aber nicht für den Einfluss des Alters. Die adulten Tiere hielten sich auf den offenen Armen der Plusarena signifikant länger auf als noch im präpubertären Alter. Somit nahm die Ängstlichkeit mit zunehmendem Alter ab. Dieses Ergebnis scheint auch nicht auf die geringere Lokomotion der jüngeren Tiere zurückzuführen sein, die im Open Field-Test beobachtet wurde, da die Armwechselfrequenz (ebenfalls ein Maß für die Lokomotion) zu beiden Testzeitpunkten identisch war (vgl. 9.1.1). Folglich ist anzunehmen, dass man mit dem Open Field und der erhöhten Plusarena unterschiedliche Ängstlichkeitsformen misst. Da beide Tests auf der Vermeidung von bedrohlichen Situationen beruhen, ging man zunächst davon aus, dass beide auch das gleiche emotionale Konstrukt messen. Diverse Analysen zeigten aber, dass Ergebnisse der beiden Tests nicht miteinander korrelieren und somit unterschiedliche Aspekte der Angst/Emotionalität widerspiegeln. Dies erklärt auch, warum bei verschiedenen pharmakologischen Untersuchungen die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Art des Tests variieren (vgl. Review: Ramos, 2008).

Die Wirkung einer chronischen pubertären Δ^9 -THC-Behandlung auf die Ängstlichkeit der Tiere im Erwachsenenalter wurde bisher in anderen Studien nicht untersucht. Die langfristige orale Δ^9 -THC-Gabe von Beginn der Pubertät bis ins Erwachsenenalter (pd 40-130) führte allerdings zu keiner Veränderung der Zeit, die die Tiere in der inneren Zone des Open Fields verbrachten (Stiglick & Kalant, 1983). Auch durch eine präpubertäre Δ^9 -THC-Behandlung (pd 35-45) wurde weder die Zeit in der inneren Zone noch das Verhalten auf der erhöhten Plusarena beeinflusst. Es wurde lediglich eine

tendenzielle Abnahme der Frequenz, mit der die innere Zone betreten wurde, beobachtet (Rubino et al., 2008).

Nach Behandlung mit dem synthetischen Cannabinoid WIN 55,212-2 wurden gegensätzliche Effekte beobachtet. Während die pubertäre Gabe (pd 40-65) zu einer Reduktion der allgemeinen Ängstlichkeit führte (Zunahme der Zeit auf den offenen Armen der erhöhten Plusarena sowie in der inneren Zone des Open Fields, Wegener & Koch, 2009), erhöhte die präpubertäre WIN-Behandlung (pd 15-40) die Ängstlichkeit (Reduktion der Zeit in der inneren Zone im Open Field, Schneider et al., 2005).

Die chronische präpubertäre CP 55,940-Behandlung (pd 30-41), wirkte wiederum in verschiedenen Tests, die das Verhalten gegenüber bedrohlichen Situationen untersuchten, weder anxiolytisch noch anxiogen. Die einzige Ausnahme war, dass die Tiere nach der Cannabinoid-Gabe signifikant weniger Zeit in einem schützenden Häuschen in der Open Field-Arena verbrachten, was als leicht anxiolytische Wirkung interpretiert werden kann (O'Shea et al., 2006).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Studien könnten auf dem Behandlungszeitpunkt beruhen und in der zuletzt beschriebenen Studie auf den speziellen Test zurückzuführen sein. Abschließend lässt sich anhand der bisherigen chronischen Studien die Frage, ob Cannabinoide die Ängstlichkeit in die eine oder andere Richtung beeinflussen, nicht beantworten.

9.1.4. Arbeitsgedächtnis: Objekterkennung

Während des Objekterkennungstests zeigten alle Tiere zu beiden Testzeitpunkten ein vergleichbares Explorationsverhalten. Sie beschäftigten sich in beiden Durchgängen gleich lange mit den Objekten, begannen mit der Exploration mit etwa gleicher Latenzzeit und wechselten in der Betrachtung der Objekte gleich häufig. Dies steht im Einklang mit der Literatur (Quinn et al., 2008) und bedeutet zum einen, dass der Lokomotionsunterschied, der im Open Field-Test zwischen den beiden Testzeitpunkten beobachtet wurde, keinen Einfluss auf die Resultate des Objekterkennungstest hatte. Zum anderen konnte die Arbeitsgedächtnisleistung über die Berechnung des Diskriminierungsindex ohne Einschränkungen bewertet werden (vgl. 3.4.2.1). Alle Tiere beschäftigten sich im zweiten Durchgang länger mit dem neuen Objekt als mit dem bereits

bekannt. Folglich beeinflusste weder das Alter noch die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung das Arbeitsgedächtnis der Ratten.

Auch bezüglich des Arbeitsgedächtnisses ist ein direkter Vergleich der vorliegenden Studie mit der Literatur problematisch, da in keiner Studie eine pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung durchgeführt wurde, sondern entweder Δ^9 -THC in einem anderen Zeitraum verabreicht wurde oder die pubertäre Behandlung mit einem synthetischen Cannabinoid erfolgte. Außerdem waren die Intervalle zwischen den beiden Durchgängen des Objekterkennungsversuches nicht immer vergleichbar oder das Arbeitsgedächtnis wurde mit einem anderen Paradigma getestet.

Zamberletti et al. (2012) testeten, wie in der vorliegenden Arbeit, das Arbeitsgedächtnis mithilfe des Objekterkennungstests, starteten den zweiten Durchgang allerdings bereits nach 3 min. Sie konnten eine signifikante Reduktion des Diskriminierungsindex nach adoleszenter Δ^9 -THC-Behandlung (pd 35-45) nachweisen, aber nur bei weiblichen und nicht bei männlichen Ratten. Betrug das Intervall zwischen den Durchgängen jedoch eine Stunde, wurde nach einer Δ^9 -THC-Behandlung (pd 32-40) eine signifikante Reduktion der Zeit, mit der männliche Ratten das neue Objekt betrachteten, festgestellt (Quinn et al., 2008). Auch in einem verwandten Arbeitsgedächtnistest („delayed non-matching to position“-Test, vgl. 7.1.4) führte die chronische adoleszente Behandlung mit dem natürlichen Cannabinoid (pd 21-50) zu einer Verschlechterung der Gedächtnisleistung (Wiley & Burston, 2010). In einem anderen Paradigma („Morris Water Maze“) wurde hingegen kein Einfluss von Δ^9 -THC auf das Arbeitsgedächtnis nachgewiesen (Behandlung: pd 30-51; Cha et al., 2006).

Ähnlich inkonsistente Ergebnisse liegen auch bezüglich der Behandlung mit synthetischen Cannabinoiden vor. Während die präpubertäre WIN 55,212-2-Gabe (pd 15-40) im Objekterkennungstest das Arbeitsgedächtnis der erwachsenen Tiere nicht beeinträchtigte (Intervall 30 min und 2 h; Schneider et al., 2005), beschäftigten sich Ratten nach CP 55,940-Injektionen (pd 30-41) signifikant weniger mit dem neuen Objekt (Intervall 2 h; O'Shea et al., 2006). Die chronische pubertäre WIN 55,212-2-Behandlung (pd 40-65) verschlechterte ebenfalls die Arbeitsgedächtnisleistung gemessen mit dem Objekterkennungstest (Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2008; Abush & Akirav, 2012), in einem „delayed non-matching to position“-Test sowie im Morris Water Maze (Abush & Akirav, 2012).

9.1.5. Sozialverhalten: Soziale Interaktion

Während der Anteil des Sozialverhaltens mit zunehmendem Alter konstant blieb, veränderte sich tendenziell die Art der sozialen Interaktion. Die präpubertären Tiere erkundeten den fremden Interaktionspartner hauptsächlich non-anogenital, während im jungen Erwachsenenalter non-anogenitales und anogenitales Verhalten etwa gleich häufig zu beobachten war. Letzteres wurde auch in der Literatur beschrieben (Moura et al., 2010) und ist vergleichbar mit den Beobachtungen in der CBD-URB-Studie (vgl. 6.1.3, 7.1.5). Der etwas höhere Anteil des non-anogenitalen Verhaltens adoleszenter Ratten war auf das ausgeprägtere Spielverhalten der jungen Tiere zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit der Literatur, da das soziale Spielverhalten bei Ratten hauptsächlich vor der sexuellen Reifung (also vor der Pubertät) beobachtet wird, während andere Formen des Sozialverhaltens über die gesamte Lebensspanne gezeigt werden (Vanderschuren et al., 1997).

Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung veränderte das Sozialverhalten hingegen nicht. Dies entspricht Teilen der Literatur, aber auch hier fehlt eine Studie, mit der die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit optimal verglichen werden können. Zamberletti et al. (2012) beobachteten ebenfalls keinen Einfluss einer adoleszenten Δ^9 -THC-Gabe (pd 35-45) auf das Sozialverhalten der adulten Ratten. Dieser Befund war unabhängig vom Geschlecht der Tiere. Dem gegenüber steht eine Studie, in der ein Rückgang der sozialen Interaktion (sozialer Rückzug) nach präpubertärer Δ^9 -THC-Behandlung beobachtet wurde (pd 32-40; Quinn et al., 2008).

Bei Verwendung von synthetischen Cannabinoiden ist die Ergebnislage hingegen eindeutiger. Die pubertäre WIN 55,212-2-Behandlung (pd 40-65) reduzierte das Sozialverhalten (Schneider et al., 2008; Leweke & Schneider, 2010) der erwachsenen Ratten. Dieses Verhaltensdefizit konnte zudem durch die akute Gabe eines Antipsychotikums vermindert werden (Leweke & Schneider, 2010). Eine signifikante Reduktion der sozialen Interaktion wurde auch durch die präpubertäre Behandlung mit CP 55,940 hervorgerufen (O'Shea et al., 2006).

9.1.6. Sensomotorische Hemmung: Präpulsinhibition

Die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung führte zu keiner Veränderung der Schreckreaktionsamplitude oder der sensomotorischen Hemmung. Die Amplitude der Schreckreaktion

sowie das Ausmaß der PPI waren allerdings altersabhängig: beides erhöhte sich mit zunehmenden Alter. Dies wurde auch in der Literatur beschrieben (Swerdlow et al., 2000; van den Buuse, 2003; Le Pen et al., 2006), aber da der Fokus der Studien nicht auf der Untersuchung der Alterseffekte lag, wurde der Grund für diese Unterschiede nicht diskutiert. Die große Differenz der Schreckreaktionsamplitude ist sicherlich durch das Gewicht der Tiere bedingt (vgl. 8.1.5). Möglicherweise beeinflusste dies auch die PPI. Dagegen spricht zunächst, dass die PPI einen relativen Wert darstellt, der die individuelle Schreckreaktionsamplitude berücksichtigt. Das Piezoelement misst für ein deutlich leichteres Tier zwar eine geringere Schreckreaktionsamplitude, aber diese Differenz ist für alle Bedingungen gleich (Schreckreiz alleine bzw. Präpuls+Schreckreiz). Somit sollten sich große Gewichtsunterschiede nur in der reinen Schreckreaktionsamplitude widerspiegeln, aber nicht in der PPI, die für jedes Tier zunächst separat berechnet und dann gemittelt wird. Es ist natürlich möglich, dass die Sensitivität des Piezoelementes für die sehr leichten präpubertären Ratten nicht ausreichend ist und deswegen kleine Veränderungen in der Schreckreaktion nicht adäquat gemessen werden können. Die andere Möglichkeit ist, dass die Altersunterschiede in der PPI entwicklungsbedingt sind. Dies soll in einer zukünftigen Studie mittels PPI-PET-Messungen (vgl. 3.7.1) untersucht werden.

Bisher wurde in keiner anderen Studie der Einfluss einer chronischen adoleszenten Δ^9 -THC-Behandlung auf die sensomotorische Hemmung untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen allerdings im Gegensatz zu Resultaten der bisherigen WIN 55,212-2-Studien. Sowohl die pubertäre (pd 40-65; Schneider & Koch, 2003; Wegener & Koch, 2009) als auch die präpubertäre WIN 55,212-2-Applikation (pd 15-40; Schneider et al., 2005) verringerte die PPI, ohne die Schreckreaktionsamplitude zu beeinflussen. Diese Reduktion konnte durch die akute Gabe eines Antipsychotikums aufgehoben werden (Schneider & Koch, 2003; Schneider et al., 2005).

9.2. Verhaltens-PET

Zwar wurden keine Verhaltensdefizite bezüglich der sensomotorischen Hemmung beobachtet, aber denkbar wäre, dass Δ^9 -THC durchaus den zerebralen Glukosemetabolismus im Gehirn beeinflusst und Kompensationsmechanismen dazu führen, dass im Verhalten keine Unterschiede festgestellt werden. Dem war aber nicht so, die Gluko-

seutilisation der beiden Behandlungsgruppen während der PPI war vergleichbar. Higuera-Matas et al. (2011) konnten auch nach einer präpubertären CP 55,940-Behandlung (pd 28-38) keine Veränderung der Glukoseutilisation bei männlichen adulten Ratten feststellen. Bei weiblichen Ratten führte die präpubertäre Cannabinoid-Gabe allerdings zu einer verstärkten Einlagerung des ^{18}F FDG im Septum (Einlagerung erfolgte im wachen Tier aber nicht während eines Verhaltensversuchs). Es wurde vermutet, dass diese regional- und geschlechtsspezifische Erhöhung im Zusammenhang mit den bei Weibchen nach adoleszenter Cannabinoidbehandlung stärker ausgeprägten Depressions-ähnlichen Symptomen (Anhedonie und biochemische Marker) steht. Dabei verweisen die Autoren allerdings nur auf die Literatur, da in der PET-Studie keine zusätzlichen Verhaltensuntersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt wurden.

Weitere Untersuchungen der Auswirkungen einer adoleszenten Cannabinoid-Gabe auf die zerebrale Glukoseutilisation scheinen nicht durchgeführt worden zu sein. Allerdings reduzierte die chronische adulte Δ^9 -THC-Behandlung in verschiedenen Gehirnarealen die metabolische Aktivität (Whitlow et al., 2003). Zwar war in der vorliegenden Arbeit keine der Veränderungen signifikant, aber es wurde ebenfalls eine tendenzielle Reduktion beobachtet. Auch akute Studien zeigen, dass Δ^9 -THC den zerebralen Metabolismus mit steigender Dosis zunehmend reduziert (Margulies & Hammer, 1991; Brett et al., 2001; Freedland et al., 2002; Whitlow et al., 2002), wobei bei geringeren Dosierungen teilweise auch Erhöhungen der Glukoseutilisation beobachtet wurden (Margulies & Hammer, 1991; Brett et al., 2001).

9.3. Fazit

In der vorliegenden Studie war es nicht möglich, mit einer chronischen pubertären Δ^9 -THC-Behandlung langfristige Verhaltensdefizite und/oder Veränderungen der zerebralen Glukoseutilisation hervorzurufen. Somit muss die Frage, ob sich das Modell der chronischen pubertären WIN 55,212-2-Gabe auch mit dem vom Menschen konsumierten Δ^9 -THC reproduziert werden kann, verneint werden.

Wie ausführlich diskutiert, ist die Datenlage bezüglich der Auswirkungen einer adoleszenten Cannabinoidbehandlung äußerst widersprüchlich. Lässt man den genauen Behandlungszeitraum zunächst außen vor, so zeigt sich, dass unabhängig von der Art des

verwendeten Cannabinoids mindestens eine Studie ein Verhaltensdefizit bezüglich der Lokomotion, der Ängstlichkeit, des Arbeitsgedächtnisses und des Sozialverhaltens nachweisen konnte und mindestens eine Studie keine Wirkung beobachtete. Die Ausnahme bildet die Präpulsinhibition, die nach chronischer adoleszenter WIN 55,212-2-Behandlung immer reduziert war. Die Frage ist nun, warum diese Studien zu solch widersprüchlichen Ergebnissen kommen.

Ein zentraler Punkt ist dabei sicherlich der Zeitpunkt, zu dem die Behandlung durchgeführt wird. Sowohl die präpubertäre als auch die pubertäre Cannabinoidbehandlung können in langfristigen Verhaltensdefiziten resultieren, folglich sind die Ratten in beiden Entwicklungsphasen vulnerabel. Dies ändert sich im Erwachsenenalter. Einige Studien zeigen, dass eine chronische adulte Cannabinoidbehandlung keinen anhaltenden Einfluss auf die Lokomotion, das Arbeitsgedächtnis und die sensomotorische Hemmung hat (Stiglick & Kalant, 1985; Nakamura et al., 1991; Schneider & Koch, 2003), sondern sich in erster Linie nur akute Effekte beobachten lassen (Nakamura et al., 1991). Dies steht sicherlich im Zusammenhang mit der Entwicklung des Endocannabinoidsystems. Die endgültige CB₁-Rezeptordichte wird bei Ratten erst 60 Tage nach der Geburt erreicht (Belue et al., 1995). Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob die Rezeptordichte kontinuierlich ansteigt (Belue et al., 1995) oder zunächst eine maximale CB₁-Rezeptordichte erreicht wird (bei männlichen Ratten um pd 40), die dann wieder auf das Niveau der adulten Tieren absinkt (Rodriguez de Fonseca et al., 1993). Aber ungeachtet der genauen Vorgänge greift eine adoleszente Cannabinoidbehandlung in die Entwicklung des Endocannabinoidsystems ein und kann auf diese Weise die Entwicklung des Gehirns beeinflussen. Da die meisten Jugendlichen sicherlich erst während der Pubertät anfangen Cannabis zu konsumieren, verbessert die pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung im Rattenmodell die Konstruktvalidität (vgl. 1.4.1) und sollte somit auch in zukünftigen Untersuchungen beibehalten werden.

Ein großer Unterschied zwischen der vorliegenden Studie und den oben genannten Arbeiten ist, dass dies die einzige Untersuchung ist, in der die Tiere in ihrer aktiven Phase (Dunkelphase, vgl. 3.1) getestet wurden. Da das Endocannabinoidsystem zirkadian reguliert ist, könnte dies einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Während in der Lichtphase die Rezeptordichte im Gegensatz zur Dunkelphase hochreguliert ist (Martinez-Vargas et al., 2003; Rueda-Orozco et al., 2008), ist die Endocannabinoidkon-

zentration niedriger (Valenti et al., 2004; Murillo-Rodriguez et al., 2006). Injiziert man nun Δ^9 -THC in der Dunkelphase, konkurriert es mit mehr Endocannabinoiden um insgesamt weniger Rezeptoren. Im Rahmen einer Masterarbeit wurde daher untersucht, ob sich mit identischem Studiendesign Verhaltensdefizite beobachten lassen, wenn die chronische pubertäre Behandlung sowie die Verhaltenstestung wie in Literatur in der Lichtphase erfolgt (Lee, 2010). Aber auch unter diesen Bedingungen konnten im Erwachsenenalter keine Verhaltensdefizite hervorgerufen werden.

Ein weiterer Grund könnte der verwendete Rattenstamm sein. Zum Beispiel wurde von Unterschieden in der pharmakologischen Beeinflussung der PPI in Abhängigkeit vom Rattenstamm berichtet (Swerdlow et al., 2000; van den Buuse, 2003). Dies deutet darauf hin, dass genetische Unterschiede zu einer veränderten Vulnerabilität führen. Dagegen spricht, dass in den hier zitierten Studien zahlreiche verschiedene Rattenstämme verwendet wurden und die Ergebnisse der Verhaltensanalysen auch innerhalb eines Rattenstammes inkonsistent waren.

Zudem unterscheidet sich die vorliegende Arbeit von den anderen Studien im für die Δ^9 -THC Applikation verwendeten Lösungsmittel. Mit einer Ausnahme wurden in sämtlichen Studien wässrige Lösungsmittel verschiedenster Zusammensetzung verwendet. Nur Stiglick und Kalant (1983) verabreichten Δ^9 -THC in Olivenöl gelöst, allerdings oral. Die Verwendung eines öligen Lösungsmittels verbessert die Konstruktvalidität des Modells, da Menschen Δ^9 -THC entweder pulmonal aufnehmen oder es in etwas Fetthaltigem gelöst zu sich nehmen. Zwar ist mit einer verlangsamten Kinetik zu rechnen, aber die Bluthirnschranke sollte problemlos passiert werden. Δ^9 -THC ähnelt strukturell dem CBD und CBD konnte nach i. p. Applikation in Sesamöl im Gehirngewebe der Ratten nachgewiesen werden (vgl. 6.2). Dies bestätigte auch eine exemplarische Untersuchung der Δ^9 -THC-Konzentration im Gehirngewebe 2 h nach i. p. Injektion.

Die adoleszenten Δ^9 -THC-Studien, die sich in der Literatur finden, verwendeten zudem unterschiedliche Dosierungen (zwischen 5 und 20 mg/kg, teilweise schrittweise Erhöhung während der Behandlungszeit: 2,5 bis 10 mg/kg). Somit liegt die in der Arbeit verwendete Dosierung am unteren Ende des Bereiches, den man in der Literatur findet. Daher wurde im Anschluss an diese Studie die Dosierung überprüft, um zu klären, ob bei Verwendung eines öligen Lösungsmittels höhere Konzentrationen eingesetzt werden müssen (vgl. 10).

10. Ergebnisse Dosisstudie

In der Dosisstudie wurden die akuten Wirkungen verschiedener Δ^9 -THC-Dosierungen auf verschiedene Verhaltensweisen analysiert. Da jedes Tier alle Behandlungen erhielt, wurden in der statistischen Analyse verschiedene ANOVA mit Messwiederholungen gerechnet. Bei nur einer untersuchten Variablen (z.B. gesamte Distanz) handelte es sich dabei um eine 1 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktor: Behandlung). Wurde zusätzlich der Effekt bestimmter Variablen des Verhaltensversuchs untersucht (Zonen, Durchgänge etc.), wurde eine 2 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktoren: Behandlung und die zusätzliche Variable) verwendet.

10.1. Open Field

Keine der eingesetzten Δ^9 -THC Dosierungen hatte eine sedierende oder stimulierende Wirkung auf die Motorik ($F(7,21) = 1,2$; $p = 0,358$). Für alle Dosierungen zusammengefasst legten die Tiere im Mittel innerhalb von 10 min in der Open Field-Arena eine Distanz von 3014 ± 655 cm zurück (Abbildung 68).

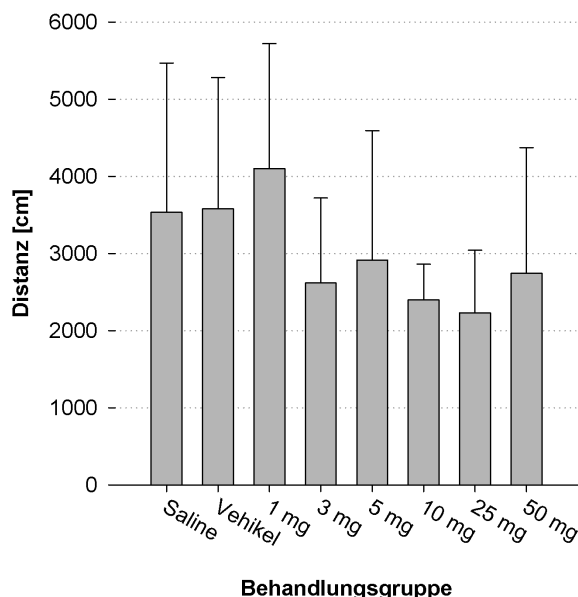


Abbildung 68: Zurückgelegte Distanz im Open Field nach akuter Behandlung mit Saline, Sesamöl (Vehikel) und verschiedenen Δ^9 -THC-Konzentrationen, gelöst in Sesamöl.

Die Injektion von Δ^9 -THC hatte in keiner Konzentration einen deutlichen Einfluss auf die Motorik der Ratten. Allerdings führten Injektionen von 3 bis 50 mg/kg Δ^9 -THC tendenziell zu einer Abnahme der insgesamt zurückgelegten Distanz.

Unabhängig von der Behandlung ($F(7,21) = 1,2$; $p = 0,358$) bewegten sich alle Tiere zudem mehr in der äußeren Zone und legten dort mit 2628 ± 495 cm weitaus längere Strecken zurück, als in der inneren Zone (386 ± 187 cm; $F(1,3) = 92,8$; $p = 0,002$). Somit

blieb das typische Bewegungsmuster im Open Field von der Δ^9 -THC-Gabe unbeeinflusst (Daten graphisch nicht dargestellt).

Dieses typische Bewegungsmuster spiegelte sich allerdings nicht so deutlich in der Laufgeschwindigkeit (Abbildung 69) wider, da alle Ratten in der inneren Zone nur tendenziell schneller liefen ($F(1,3) = 8,7$; $p = 0,060$). Der Geschwindigkeitsunterschied wurde zudem tendenziell mit steigender Dosierung kleiner, aber ein signifikanter Behandlungseffekt ($F(7,21) = 1,0$; $p = 0,464$) oder eine signifikante Interaktion ($F(7,21) = 0,6$; $p = 0,740$) konnte nicht festgestellt werden.

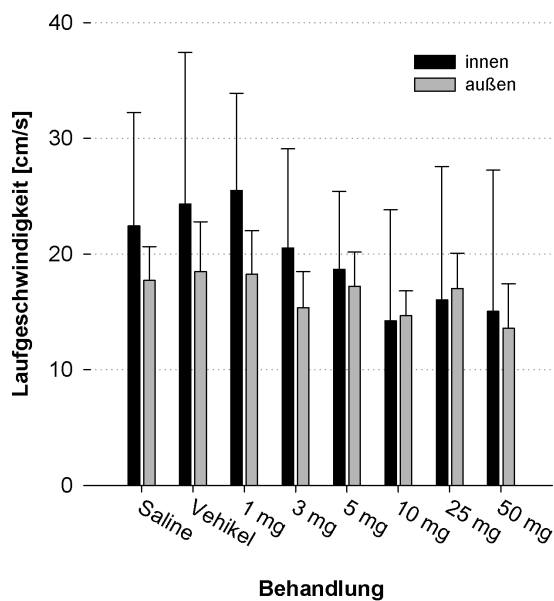


Abbildung 69: Laufgeschwindigkeit im Open Field 2 h nach Injektion von Saline, Sesamöl (Vehikel) oder verschiedenen Δ^9 -THC-Konzentrationen.

Es gab keinen signifikanten Effekt der Behandlung und der Zone. Alle Tiere liefen in der inneren Zone (schwarz) nur tendenziell schneller als in der äußeren (grau).

Die Analyse der Aufenthaltsdauer für die einzelnen äußeren Zonen ergab einen signifikanten Haupteffekt der Zone ($F(3,9) = 8,6$; $p = 0,005$). Die einfachen Kontraste zeigten, dass sich die Aufenthaltsdauer in der unteren Zone signifikant von der Aufenthaltsdauer in der linken ($F(1,3) = 17,2$; $p = 0,026$) und der oberen Zone ($F(1,3) = 12,4$; $p = 0,039$) aber nicht von der in der rechten Zone unterschied ($F(1,3) = 0,7$; $p = 0,460$). Da keine signifikante Interaktion (Zone*Behandlung: $F(7,21) = 1,3$; $p = 0,313$) vorlag, muss angenommen werden, dass alle Tiere zwei Homebases etablierten. Während der Videoanalyse ließ sich allerdings beobachten, dass viele Tiere von einer Homebase auf der Grenze zwischen der unteren und rechten Zone starteten. Außerdem deutet die graphische Darstellung (Abbildung 70) darauf hin, dass bei einigen Gruppen die Homebase nur in der unteren Zone zu finden war. Die verschiedenen Δ^9 -THC-Behandlungen wirkten sich nicht auf die Ausbildung der Homebase aus ($F(7,21) = 1,3$; $p = 0,313$).

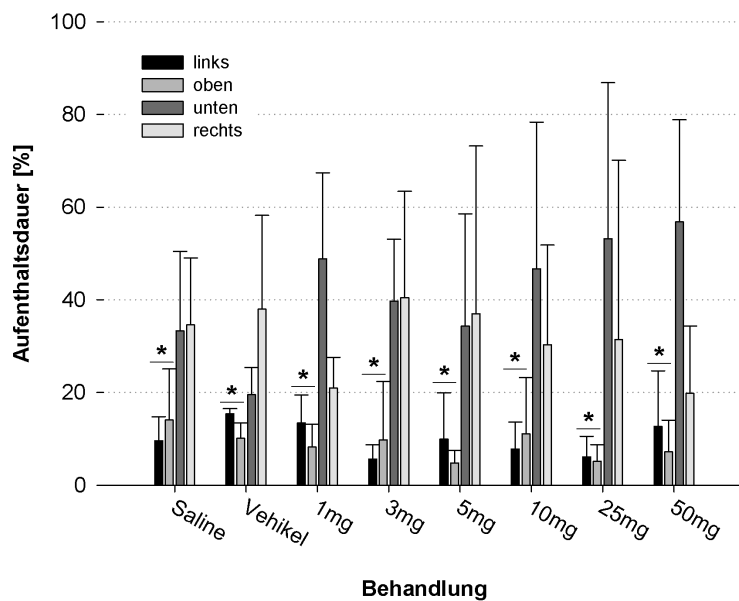


Abbildung 70: Prozentuale Aufenthaltsdauer in den äußeren Zonen der Open Field-Arena.

Die Δ^9 -THC-Behandlung hatte keinen Einfluss auf das Homebase-Verhalten der Tiere ($p = 0,313$). Die meiste Zeit verbrachten die Tiere in der unteren und rechten Zone.

Keine der Δ^9 -THC-Dosierungen modulierte die Ängstlichkeit der Tiere. Die Frequenz, mit der die innere Zone der Arena betreten wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($F(7,21) = 1,1$; $p = 0,418$). Mit steigender Dosierung nahm die Frequenz nur leicht ab (Abbildung 71).

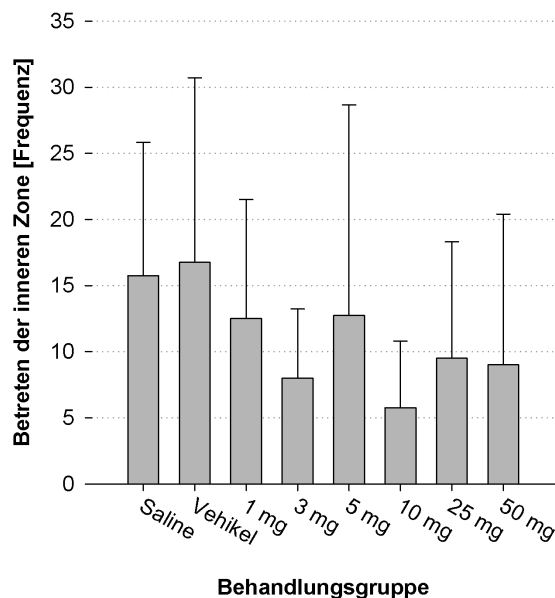


Abbildung 71: Frequenz, mit der die innere Zone der Arena betreten wurde.

Zwar verringerte sich die Frequenz mit zunehmender Dosierung tendenziell, ein signifikanter Behandlungseffekt konnte aber nicht nachgewiesen werden ($p = 0,418$).

10.2. Objekterkennung

Die akute Gabe verschiedener Δ^9 -THC-Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf das generelle Explorationsverhalten der Tiere ($F(7,21) = 1,1$; $p = 0,382$). Alle Tiere betrachteten die Objekte im ersten und zweiten Durchgang des Versuches etwa gleich lang ($F(1,3) = 0,7$; $p = 0,453$), so dass von einer unveränderten Motivation im zweiten Durchgang ausgegangen werden kann (Abbildung 72). Insgesamt betrug die Explorationszeit während der beiden 3 minütigen Durchgänge 57 ± 10 s.

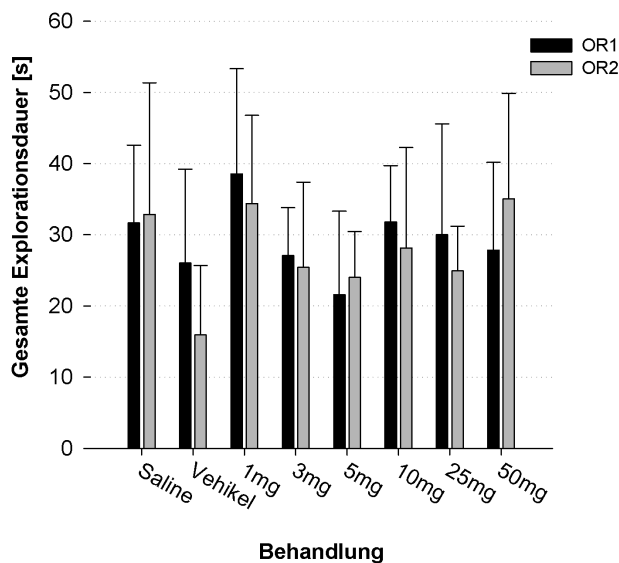


Abbildung 72: Vergleich der gesamten Explorationsdauer im ersten (OR1, schwarz) und zweiten Durchgang (OR2, grau) in Abhängigkeit von der Behandlungsgruppe.

Die Betrachtungsdauer war in beiden Durchgängen nahezu identisch ($p = 0,453$) und wurde durch keine der verwendeten Δ^9 -THC-Dosierungen beeinflusst.

In keiner Dosierung hatte Δ^9 -THC Auswirkungen auf die Frequenz (Abbildung 73 a), mit der die Tiere im zweiten Durchgang in der Betrachtung zwischen dem unbekanntem und bekanntem Objekt wechselten ($F(7,21) = 0,6$; $p = 0,776$).

Ebenso war die Latenzzeit (Abbildung 73 b), also die Zeit, bis die Tiere im zweiten Durchgang das erste Mal ein Objekt betrachteten, für alle Gruppen vergleichbar ($F(7,21) = 0,8$; $p = 0,574$).

Somit war die Aktivität aller Tiere vergleichbar.

Da alle Tiere im ersten Durchgang mindestens ein Objekt betrachteten und auch im zweiten Durchgang mindestens einmal zwischen dem bekannten und unbekanntem Objekt hin und her wechselten, wurden alle Tiere in die Berechnung des Diskriminierungsindex eingeschlossen.

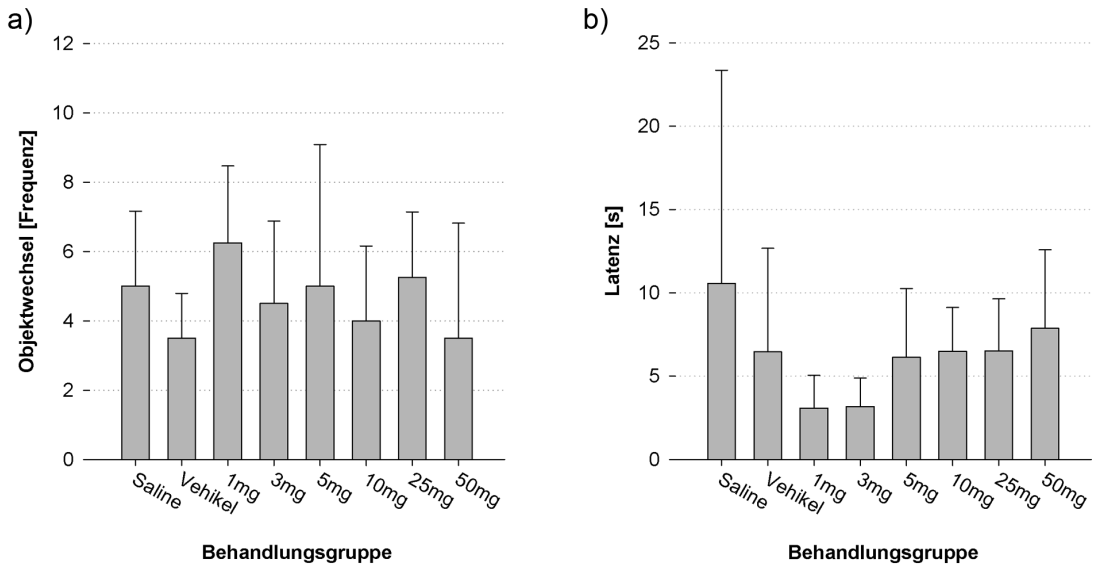


Abbildung 73: Frequenz, mit der die Tiere in der Betrachtung zwischen den beiden Objekten im zweiten Durchgang wechselten (a) sowie die Zeit, bis das erste Objekt betrachtet wurde (b).

Die Aktivität der Tiere blieb durch die Δ^9 -THC-Gabe unbeeinflusst. Alle Tiere wechselten im Mittel 5 ± 1 mal zwischen dem neuen und dem bekannten Objekt hin und her (a). Auch die Latenzzeit (b) war bei allen Tieren vergleichbar (im Mittel: $5,7 \pm 1,8$ s).

Obwohl die Gabe von 25 mg/kg Δ^9 -THC in einem negativen Diskriminierungsindex resultierte (d.h. das bekannte Objekte wurde ausgiebiger exploriert als das unbekannte), konnte statistisch nicht nachgewiesen werden, dass die Behandlung das Arbeitsgedächtnis beeinflusste ($F(7,21) = 0,4$; $p = 0,868$; Abbildung 74).

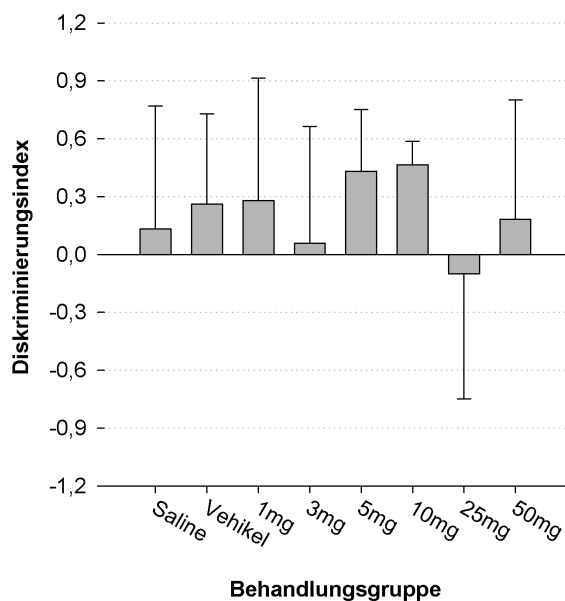


Abbildung 74: Diskriminierungsindex.

Positive Diskriminierungsindizes zeigen an, dass das neue, unbekannte Objekt ausgiebiger betrachtet wurde als das bereits bekannte. Nach Gabe von 25 mg/kg Δ^9 -THC explorierten die Tiere zwar im Mittel das bekannte Objekt länger als das unbekannte (negativer Index), die statistische Analyse ergab allerdings, dass die Behandlung keinen Effekt auf das Arbeitsgedächtnis der Tiere hatte ($p = 0,868$).

10.3. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die Amplitude der akustischen Schreckreaktion (Abbildung 75) veränderte sich nach Δ^9 -THC-Gabe nicht ($F(7,21) = 1,4$; $p = 0,245$).

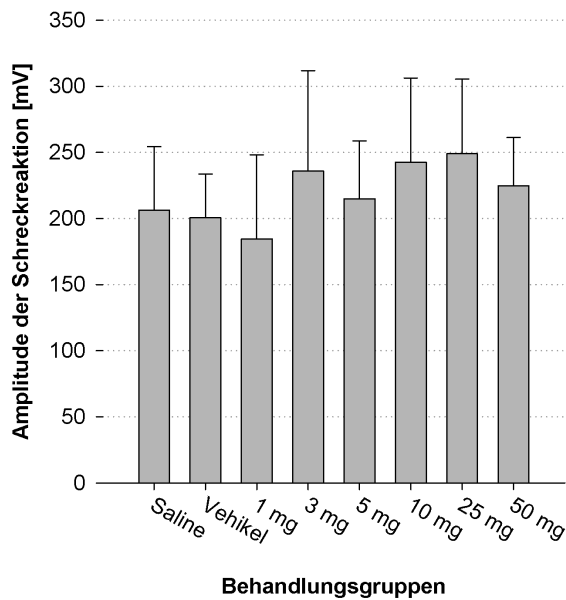


Abbildung 75: Amplitude der Schreckreaktion.

Keine der verwendeten Δ^9 -THC-Dosierungen resultierte in einer Veränderung der Schreckreaktionsamplitude.

Die Ergebnisse der Präpulsinhibition (PPI) sind in Abbildung 76 (a-d) zusammengefasst. Aus Gründen der Übersicht wurde für jede der vier Präpuls lautstärken eine separate Graphik erstellt. Bei allen Tieren war die PPI signifikant vom Präpuls abhängig ($F(3,9) = 380,2$; $p < 0,001$). Der Post hoc-Test Sidak zeigte, dass die PPI umso höher war, je lauter der Präpuls (68 vs. 72 dB SPL LIN: $p = 0,039$; 72 vs. 78 dB SPL LIN: $p = 0,008$; 72 vs. 84 dB SPL LIN: $p = 0,003$; 68 vs. 78 und 78 vs. 84 dB SPL LIN: $p = 0,001$ und 68 vs. 84 dB SPL LIN: $p < 0,001$).

Die Behandlung der Tiere mit verschiedenen Δ^9 -THC-Dosierungen führte bei keiner Präpuls lautstärke zu einer Veränderung der PPI und hatte somit keinen Einfluss auf die sensomotorische Hemmung (Behandlung: $F(7,21) = 0,4$; $p = 0,892$; Behandlung*Präpuls: $F(21,63) = 1,2$; $p = 0,278$).

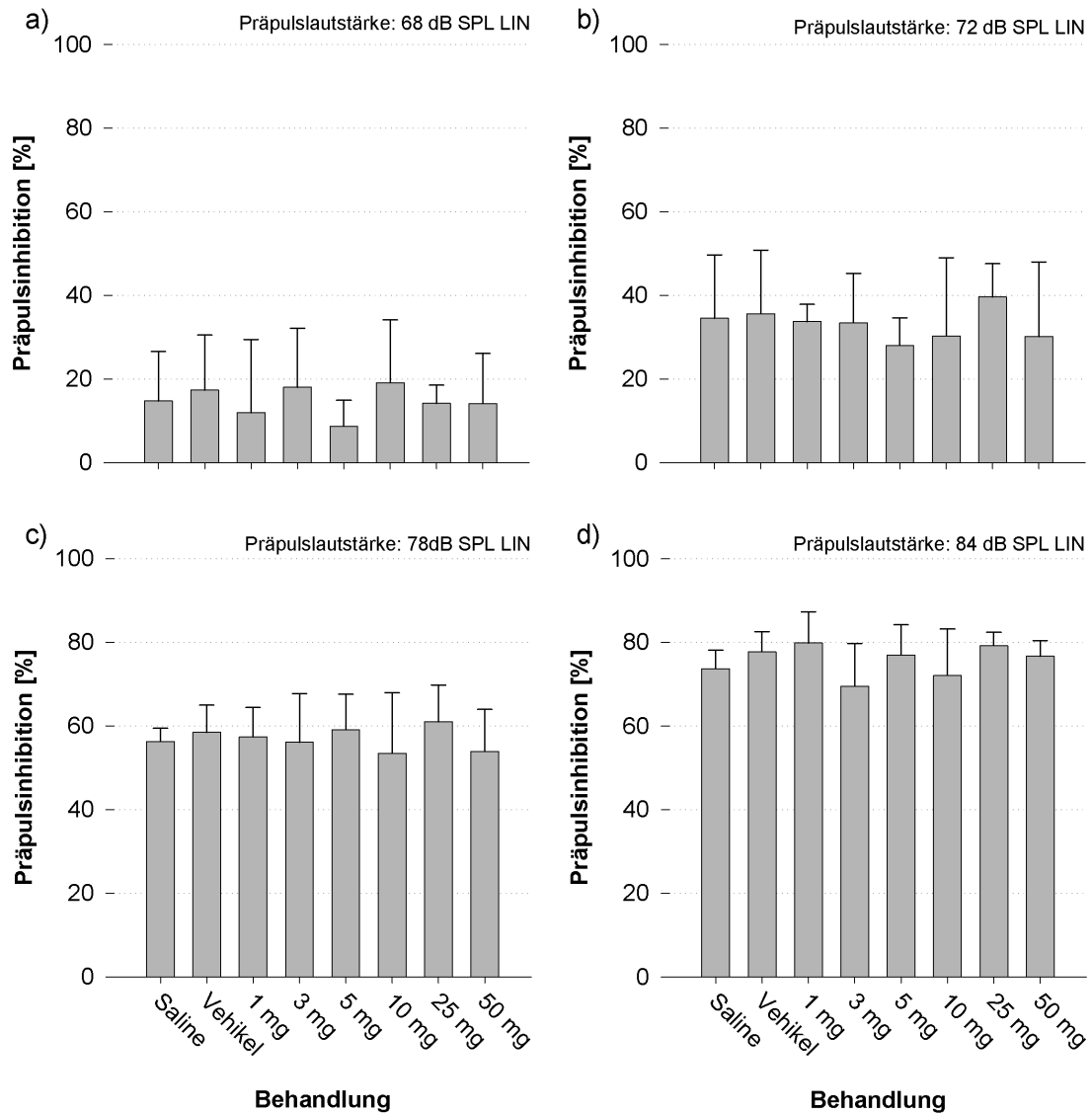


Abbildung 76: Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion in Abhängigkeit von den vier Präpulsintensitäten 68 (a), 72 (b), 78 (c) und 84 dB SPL LIN (d).

Die Injektion von Δ^9 -THC beeinflusste in keiner Dosierung die PPI ($p = 0,892$). Das Ausmaß der sensomotorischen Hemmung war lediglich von der Präpulsintensität abhängig ($p < 0,001$). Je lauter der Präpuls, desto stärker war die PPI.

11. Diskussion Dosisstudie

Wie bereits diskutiert, war es nicht möglich, durch eine chronische pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung bei adulten Ratten Verhaltensdefizite hervorzurufen. Die möglichen Gründe für dieses Versagen sind vielfältig (vgl. 9). Nachdem der Einfluss circadianer Rhythmen zumindest nicht das vorherrschende Problem zu sein schien (vgl. 9; Lee, 2010), wurde in der Dosisstudie überprüft, ob bei Verwendung einer öligen Formulierung höhere Konzentration eingesetzt werden müssen, um Verhaltensdefizite zu erzeugen. Da eine chronische pubertäre Behandlung sehr zeitaufwendig ist und den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde, wurde diese Frage in einem akuten Studiendesign untersucht. Dabei wurde analysiert, wie sich sechs verschiedene Δ^9 -THC-Dosierungen (1, 3, 5, 10, 25 und 50 mg/kg) bei adulten Ratten auf die Motorik, die Ängstlichkeit, die Orientierungsfähigkeit, das Arbeitsgedächtnis und die sensomotorische Hemmung auswirkten.

11.1. Motorik, Ängstlichkeit, Orientierungsfähigkeit: Open Field

Δ^9 -THC hatte in keiner Dosierung eine nachweislich sedierende oder stimulierende Wirkung. Die statistische Analyse ergab, dass alle Tiere während des Open-Field-Versuchs in etwa die gleiche Distanz zurücklegten und sich mit gleicher Geschwindigkeit fortbewegten. Somit schien die Motorik der Tiere unverändert zu sein. Allerdings entstand der Eindruck, dass sich die Ratten nach Gabe von 3 bis 50 mg/kg Δ^9 -THC etwas weniger (die zurückgelegte Distanz sank) und langsamer bewegten (Abnahme der Geschwindigkeit in der äußeren Zone), was auf eine leichte Sedierung hindeutet.

Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in der Frequenz, mit der die Tiere die innere Zone der Arena betraten, wider. Es konnte kein signifikanter Behandlungseffekt nachgewiesen werden, aber die Frequenz, mit der die Tiere die innere Zone betraten schien ab einer Dosierung von 3 mg/kg tendenziell abzunehmen. Bei einer unveränderten Motorik würde dies auf eine leicht anxiogene Wirkung hinweisen. In dieser Studie ist die tendenzielle Frequenzabnahme jedoch eher auf die, bezüglich der Distanz und Geschwindigkeit beobachtete, leichte Reduktion der motorischen Aktivität zurückzuführen.

Laut Literatur ist die akute Wirkung von Δ^9 -THC auf die Motorik adulter Ratten dosisabhängig. Je höher die eingesetzte Konzentration, desto stärker war die beobachtete Sedierung (Fernandes et al., 1974; Tseng & Craft, 2001; Wiley et al., 2007). Allerdings sind die Berichte bezüglich der erforderlichen Dosis inkonsistent. Es wurde berichtet, dass sich bereits 1, 3 und 5 mg/kg Δ^9 -THC signifikant sedierend auswirken (Fernandes et al., 1974; Järbe & Hiltunen, 1987; Tseng & Craft, 2001), während in anderen Studien Dosierungen von 1, 3, 5, 10 und 30 mg/kg ineffektiv waren (Sanudo-Pena et al., 2000; Wiley et al., 2007) und erst 100, 176 und 300 mg/kg eine signifikante Reduktion des Bewegungsvermögens auslösten (Wiley et al., 2007).

Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Testverfahren und der variablen Testdauer liegen. Gestartet wurden die Messungen der Lokomotion zwischen 1 und 30 min nach i. p. Injektion, die Testdauer lag zwischen 5 min und 6 h und die lokomotorische Aktivität wurde im Käfig, im Open Field oder in einer speziellen Open Field-Arena mit Lichtschranken (Aktivitätsbox) gemessen. Dies kann aber nicht alleine die Diskrepanzen begründen, da auch eine sehr ähnliche Herangehensweise (Testung 30 min nach Injektion, 5 bzw. 10 min in der Aktivitätsbox) zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führte (Tseng & Craft, 2001; Wiley et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich am besten mit den Ergebnissen von Wiley und Kollegen (2007) vergleichen, die eine ED_{50} von 69 mg/kg Δ^9 -THC ermittelten. Die verwendete Höchstdosis von 50 mg/kg lag noch etwas darunter, so dass eine signifikante Sedierung nicht zu erwarten wäre. Dem gegenüber stehen aber die anderen genannten Studien, die auch bei geringerer Dosierung signifikante Effekte beobachteten. Die Dosisstudie unterscheidet sich allerdings in zwei Punkten deutlich von den zitierten Untersuchungen: 1) wurde der Einfluss von Δ^9 -THC auf die Motorik in der aktiven (Dunkel-) Phase der Ratten untersucht und 2) wurde kein wässriges Lösungsmittel sondern Sesamöl verwendet.

In der Literatur konnte nur eine Untersuchung ausfindig gemacht werden, die der vorliegenden Studie in der Durchführung weitestgehend ähnelte: Navarro et al. (1993) analysierten die Lokomotion der Ratten in der Dunkelphase 1 h nach oraler Gabe von 5 mg/kg Δ^9 -THC in Sesamöl im 10 minütigen Open Field-Test. Unter diesen Bedingungen reduzierte Δ^9 -THC die lokomotorische Aktivität im Gegensatz zu der vorliegenden Studie signifikant. Möglicherweise spielt die Applikationsroute eine entscheidende

Rolle und die orale Gabe resultiert, verglichen mit der intraperitonealen Injektion, in einer besseren Bioverfügbarkeit des Δ^9 -THCs.

Neben der lokomotorischen Aktivität wurde in der vorliegenden Studie das Homebaseverhalten analysiert, das als Maß für räumliche Orientierungsfähigkeit gilt (vgl. 7.1.2). In keiner Dosierung hatte Δ^9 -THC einen Einfluss auf die Ausbildung einer Homebase. Im Gegensatz zur CBD-URB-Studie entstand hier zunächst der Eindruck, dass einige Tiere nicht nur eine Homebase in der unteren Zone ausbildeten, sondern auch noch eine zweite, in der rechten Zone. Die Videoanalyse zeigte aber, dass die meisten Tiere in Wirklichkeit nur eine Ausgangsstation für ihre Erkundungszüge hatten, die genau auf der Grenze zwischen den beiden genannten Zonen lag. Der akute Einfluss von Δ^9 -THC auf die Orientierungsfähigkeit der Ratten wurde in anderen Studien bisher nicht untersucht. Das mag u. a. daran liegen, dass zum einen die Motorik der Tiere eher in einer Aktivitätsbox als im Open Field getestet wurde und zum anderen der häufig beobachtete sedierende Effekt die Analyse des Orientierungsverhaltens beeinflussen würde.

11.2. Arbeitsgedächtnis: Objekterkennung

Das Arbeitsgedächtnis wurde, wie schon in den vorangegangenen Studien, mit Hilfe des Objekterkennungstests untersucht. Die Explorationsdauer war in beiden Durchgängen vergleichbar, so dass über den gesamten Versuch hinweg die Aktivität der Tiere unverändert blieb. Dies zeigte sich auch anhand der Latenzzeit bis zur Betrachtung des ersten Objekts sowie der Objektwechselfrequenz: beide Parameter wurden durch keine der Δ^9 -THC-Dosierungen beeinflusst.

Zudem wurde keine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses festgestellt. Zwar wurde nach Injektion von 25 mg/kg Δ^9 -THC ein negativer Diskriminierungsindex beobachtet, aber statistisch konnte kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse können nur mit der Studie von Ciccocioppo et al. verglichen werden, da nur hier die akute Wirkung von Δ^9 -THC ebenfalls im Objekterkennungstest untersucht wurde (Ciccocioppo et al., 2002). In dieser Studie blieb die Aktivität aller Tiere ebenfalls konstant, unabhängig von der Behandlung während des gesamten Versuches. Allerdings führte im Gegensatz zu 2 und 5 mg/kg die Gabe von 10 mg/kg Δ^9 -THC zu einer Reduktion der gesamten Explorationsdauer in beiden Durchgängen. Das Arbeitsgedächtnis wurde durch die beiden niedrigeren Δ^9 -THC-Dosierungen nicht beein-

trächtigt, während die Injektion von 10 mg/kg in einem negativen Diskriminierungsindex resultierte. Aufgrund dieser Ergebnisse wäre dementsprechend zu erwarten gewesen, dass nicht nur die Gabe von 25 mg/kg, sondern auch die Behandlung mit 10 und 50 mg/kg Δ^9 -THC zu negativen Indizes führen würden. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse liegt vermutlich nicht in der Durchführung der Verhaltensversuche, da sogar das Intervall zwischen den beiden Durchgängen identisch war. Auch testeten Ciccocioppo et al. die Ratten ebenfalls in der aktiven Dunkelphase. Allerdings durchbrachen sie den circadianen Rhythmus der Tiere während der Versuche, da sie die Testarena schwach mit weißem Licht beleuchteten. Somit konnte die Objekterkennung nicht nur anhand von taktilen und olfaktorischen, sondern auch über visuelle Hinweise erfolgen. Da aber vermutlich diese zusätzliche Dimension die Objekterkennung vereinfacht, ist nicht anzunehmen, dass die deutlichere Wirkung von 10 mg/kg Δ^9 -THC auf diesen Verfahrensunterschied zurückzuführen ist. Ein viel wichtigerer Unterschied könnte hingegen das in der Studie verwendete wässrige Lösungsmittel sein.

Sogenannte „delayed (non-) matching to sample/position“-Tests, zu denen auch der Objekterkennungstest zählt (vgl. 7.1.4), können in einer operanten Konditionierungsbox, in einer mit Wasser gefüllten Arena oder auf einer achtarmigen radialen Arena durchgeführt werden. Unter diesen verschiedenen Testbedingungen verschlechterten auch geringere Dosierungen von Δ^9 -THC und THC-reichen Extrakten (1,25, 2, 3, 4, 5 und 5,6 mg/kg) das Arbeitsgedächtnis (Nakamura et al., 1991; Lichtman et al., 1995; Mallet & Beninger, 1998; Fadda et al., 2004).

Ein weiterer Arbeitsgedächtnistest (Morris Water Maze) lieferte hingegen vergleichbare Ergebnisse zu der Studie von Ciccocioppo et al. (2002). Die Gabe von 2,5 und 5 mg/kg Δ^9 -THC blieb ineffektiv, während 10 mg/kg die Gedächtnisleistung beeinträchtigte (Cha et al., 2006)

Die beschriebenen vielfältigen Ergebnisse der verschiedenen Verhaltensversuche lassen darauf schließen, dass Δ^9 -THC nur bestimmte Aspekte des Gedächtnisses beeinflusst. Diese Hypothese wird von einer Studie unterstützt, die zeigte, dass zwei verschiedene Gedächtnistests, die beide in einer t-förmigen Arena durchgeführt wurden, unterschiedliche Ergebnisse nach Gabe von 5 mg/kg Δ^9 -THC lieferten (Jentsch et al., 1997). Die Autoren schlussfolgerten, dass Δ^9 -THC zwar das räumliche Arbeitsgedächtnis (die Ratte muss immer den Arm aufsuchen, in dem sie zuvor noch nicht war) beein-

trächtig, während dass sogenannte Referenzgedächtnis (das Tier muss, wie zuvor gelernt, immer einen Arm mit bestimmter Farbe aufsuchen, unabhängig vom vorherigen Durchgang) unbeeinflusst bleibt. Da die CB₁-Rezeptordichte nicht in allen Gehirnarealen identisch ist und die Wirkung der Cannabinoide zusätzlich durch die Art der Neurone, der vorliegenden G-Proteine und der Subtypen ihrer alpha-Untereinheiten (vgl. 1.2.3) reguliert werden kann, ist es denkbar, dass Gedächtnisfunktionen, die unterschiedliche neuronale Substrate erfordern, auch unterschiedlich stark durch Modulationen des Endocannabinoidsystems beeinflusst werden.

11.3. Sensomotorische Hemmung: Präpulsinhibition

Die akute Wirkung von Δ^9 -THC auf die Schreckreaktion und Präpulsinhibition (PPI) wurde bei adulten Ratten bisher lediglich in der vorliegenden Arbeit sowie einer weiteren Studie untersucht (Malone & Taylor, 2006). Die Ergebnisse beider Studien sind prinzipiell vergleichbar. In der Dosisstudie erschreckten sich alle Tiere unabhängig von der Δ^9 -THC-Behandlung nach Präsentation eines akustischen Schreckreizes gleich stark. Auch die sensomotorische Hemmung durch die vorherige Präsentation eines Präpulses wurde nicht von Δ^9 -THC, sondern lediglich durch die Präpuls lautstärke beeinflusst. Auch Malone und Taylor (2006) berichten, dass die Schreckreizamplitude durch die Injektion von 0,3, 1 und 3 mg/kg Δ^9 -THC lediglich tendenziell, aber nicht signifikant abnahm und die PPI durch die Behandlung unbeeinflusst blieb, aber mit zunehmender Präpuls lautstärke anstieg. Dies galt allerdings nur, wenn die Tiere, wie in dieser Arbeit, in Gruppen gehalten wurden. Wurden sie hingegen sozial isoliert aufgezogen, war die PPI bei den beiden leiseren Präpulsen signifikant kleiner. Zudem führte bei diesen Tieren die Gabe von 3 mg/kg Δ^9 -THC zu einer signifikanten Reduktion der Amplitude der Schreckreaktion sowie der PPI nach Präsentation der beiden lautesten Präpulse. Dies deutet daraufhin, dass Δ^9 -THC eine gestörte sensomotorische Hemmung zwar verstärken, per se aber keine hervorrufen kann.

Untersuchungen mit in Gruppen gehaltenen Mäusen bestätigten diese Ergebnisse hingegen nicht (Nagai et al., 2006; Long et al., 2009). Außerdem widersprechen sich die Ergebnisse sowohl bezüglich der Amplitude der Schreckreaktion als auch bezüglich der PPI. Während Nagai et al. (2006) zeigten, dass die Gabe von 10 mg/kg Δ^9 -THC sowohl die Schreckreaktionsamplitude als auch die PPI verringerte, resultierte die gleiche

Δ^9 -THC-Konzentraion bei Long et al. (2009) in einer Erhöhung der Amplitude und der PPI. Diese Diskrepanz wurde von den Autoren auf die unterschiedlichen Mäusestämme zurückgeführt. Möglich wäre aber auch ein unterschiedliches Handling der Tiere. Wenn eine soziale Isolierung die PPI verändern kann, könnten auch andere Stressfaktoren während der Haltung und der Versuchsdurchführung die Testergebnisse beeinflussen.

11.4. Fazit

Keine der sechs verschiedenen Δ^9 -THC-Dosierungen (1, 3, 5, 10, 25 und 50 mg/kg) beeinflusste das Verhalten adulter Ratten. Es konnte weder eine akute Wirkung auf (1) die Lokomotion, (2) die Ängstlichkeit, (3) die Orientierungsfähigkeit, (4) das Arbeitsgedächtnis und (5) die sensomotorische Hemmung beobachtet werden.

Da mit zunehmender Dosierung die Aktivität der Ratten tendenziell abnahm, kann vermutet werden, dass nach Gabe von noch höheren Konzentrationen zumindest die Motorik der Ratten beeinträchtigt worden wäre.

Auch wenn in der Literatur Uneinigkeit über die erforderliche Dosierung besteht, existieren zahlreiche Berichte über die akute Wirkung von Δ^9 -THC auf die Motorik und die Gedächtnisleistung. Eine Gemeinsamkeit dieser Studien ist die Verwendung eines wässrigen Lösungsmittels. Daher stellt sich die Frage, ob die Darreichungsform die Wirkung von Cannabinoiden beeinflussen kann.

Führt die Verwendung der öligen Formulierung dazu, dass die Wirksamkeit des Δ^9 -THCs begrenzt wird? Dagegen spricht auf den ersten Blick, die Studie von Navarro et al. (1993), in der gezeigt wurde, dass die Gabe von 5 mg/kg Δ^9 -THC in Sesamöl eine sedierende Wirkung hatte. Allerdings wurde die Δ^9 -THC-Lösung nicht i. p. appliziert, sondern oral verabreicht. Somit könnte in diesem Fall die Applikationsroute den entscheidenden Unterschied bezüglich der Bioverfügbarkeit ausgemacht haben. Die orale Applikation wäre zwar besser vergleichbar mit einer medikamentösen Darreichungsform von Cannabinoiden (z. B. von CBD als Antipsychotikum), bedeutet für die Tiere aber auch mehr Stress. Um sicher gehen zu können, dass die Ratten tatsächlich die vorgesehene Substanzmenge aufnehmen, muss die Gabe über eine Schlundsonde erfolgen, eine Vorgehensweise, die man auch unter dem Begriff enterale Applikation zusammenfasst. Da bei dieser Applikationstechnik zudem verschiedene Risiken (z. B. Perforation des Pharynx und des Magens) bestehen, wurde davon abgesehen. Statt-

dessen wurde in der nächsten Studie folgende Frage untersucht: Lassen sich nach i. p. Injektion einer wässrigen Δ^9 -THC-Formulierung die Wirkungen beobachten, die in der Literatur beschrieben werden?

12. Ergebnisse Lösungsmittelstudie

Im Anschluss an die Dosisstudie wurde eine dreiteilige Lösungsmittelstudie durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind. Während in den ersten beiden Teilen das Verhalten der Tiere analysiert wurde, diente der dritte Teil ausschließlich der Analyse der Pharmakokinetik.

12.1. Teil 1

Im ersten Teil der Lösungsmittelstudie wurde 5 mg/kg Δ^9 -THC in drei verschiedenen Lösungsmitteln (zwei wässrige, ein öliges) appliziert und ihre akute Wirkung nach 2 h verglichen. Zusätzlich zu dem Vergleich der drei verschiedenen Δ^9 -THC-Formulierungen wurden die Effekte des Δ^9 -THCs denen des synthetischen Cannabinoids WIN 55,212-2 (WIN) gegenübergestellt. WIN wurde nur in zwei verschiedenen wässrigen Lösungsmitteln verwendet, da es nicht möglich war, die Substanz wie Δ^9 -THC in Sesamöl zu lösen. In Tabelle 7 sind alle eingesetzten Substanzen und Lösungsmittel, sowie ihre im Folgenden verwendeten Kurzbezeichnungen zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der in der Studie verwendeten Lösungsmitteln und Substanzen sowie ihre Kurzbezeichnungen.

Kurzbezeichnung	Lösungsmittel	Substanz
Saline	0,9 %ige Kochsalzlösung	—
Vehikel 1	1 % Tween80 in Saline	—
WIN 1	1 % Tween80 in Saline	1,2 mg/kg WIN 55,212-2
THC 1	1 % Tween80 in Saline	5 mg/kg Δ^9 -THC
Vehikel 2	Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	—
WIN 2	Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	1,2 mg/kg WIN 55,212-2
THC 2	Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	5 mg/kg Δ^9 -THC
Vehikel 3	Sesamöl	—
THC 3	Sesamöl	5 mg/kg Δ^9 -THC

Da jedes Tier alle Behandlungen erhielt, erfolgte die statistische Analyse mit Hilfe von ANOVA mit Messwiederholungen. Bei nur einer untersuchten Variablen (z.B. gesamte Distanz) wurde eine 1 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktor: Behandlung) durchgeführt, bei zusätzlichen Variablen eines Verhaltensversuchs (Zonen, Durchgänge

etc.), eine 2 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktoren: Behandlung und die zusätzliche Variable).

12.1.1. Open Field

Die allgemeine Lokomotion der Tiere war in Abhängigkeit von der Behandlung signifikant vermindert ($F(8,40) = 6,474$; $p < 0,001$; Abbildung 77). Gegenüber Saline hatte die Gabe von Δ^9 -THC in Sesamöl (THC 3), wie schon in der Dosisstudie (vgl. 10.1 und 11.1), keinen Einfluss auf die in der Open Field-Arena zurückgelegte Distanz ($p = 0,371$), während WIN 1 ($p = 0,043$) und THC 1 ($p = 0,033$) diese signifikant reduzierte. Wurden die beiden Cannabinoide im zweiten wässrigen Lösungsmittel gelöst appliziert, verringerte sich zwar die zurückgelegte Strecke, aber diese Reduktion war nicht signifikant (WIN2: $p = 0,090$; THC 2 $p = 0,091$).

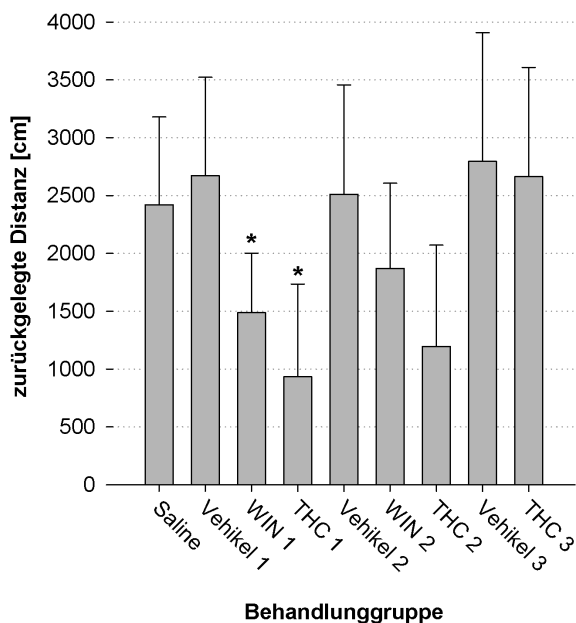


Abbildung 77: Gesamte im Open Field zurückgelegte Distanz in Abhängigkeit von der Behandlung.

Die Behandlung hatte einen signifikanten Haupteffekt auf die Strecke, die die Tiere in der Arena zurücklegten ($p < 0,001$). Zwar wurde eine Reduktion der Distanz nach Gabe aller Cannabinoide in wässrigen Lösungsmitteln beobachtet, aber signifikant war dieser Rückgang nur für WIN 1 ($p = 0,043$) und THC 1 ($p = 0,033$). Δ^9 -THC in Sesamöl (THC 3) war unwirksam.

Der statistische Vergleich der Distanz und der Laufgeschwindigkeit in der äußeren und inneren Zone der Open Field-Arena in Bezug auf die Behandlung ist an dieser Stelle nicht sinnvoll, da nach Gabe von Δ^9 -THC in einer wässrigen Lösung (THC 1 und THC 2) jeweils nur ein Tier die innere Zone der Arena betrat. Nach Injektion des synthetischen Cannabinoids WIN 55,212-2 (WIN 1 und WIN 2) erkundeten während des 10 minütigen Versuchs hingegen 5 von 6 Tieren die innere Zone. Der Einfluss der Behandlung auf die Motorik der Ratten wird bei Betrachtung charakteristischer Laufmuster besonders deutlich (Abbildung 78). Zwar reduzierte die THC 2- und WIN 2-Injektion nur tendenzi-

ell die zurückgelegte Distanz, aber das Bewegungsmuster veränderte sich deutlich. Die Ratten bewegten sich streng thigmotaktisch entlang der Wand des Open Fields, während Tiere nach Saline, Vehikel und THC 3-Gabe ein recht chaotisches Bewegungsmuster in der äußeren Zone der Arena aufwiesen.

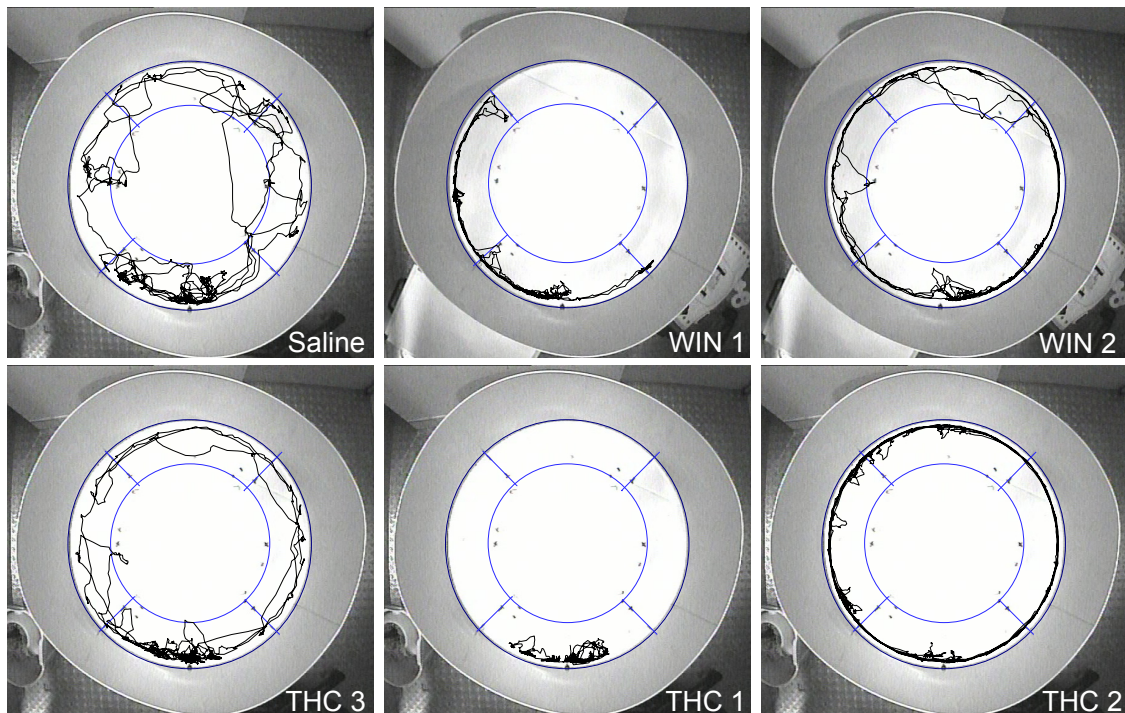


Abbildung 78: Charakteristische Laufmuster im Open Field nach Gabe der verschiedenen Substanzen.

Für jede Behandlung ist das Laufmuster einer Ratte exemplarisch dargestellt. Da sich die Laufmuster der Tiere nach Vehikel-Gabe nicht von denen nach Saline-Gabe unterschieden, wurde auf eine Abbildung verzichtet.

Aus den Graphiken geht deutlich hervor, dass die Gabe von THC 1 und WIN 1 die Lokomotion der Ratten insgesamt verringerte, während Injektion von THC 2 und WIN 2 insbesondere das Bewegungsmuster veränderte. Die Tiere bewegten sich dann streng thigmotaktisch, während sie sich nach Behandlung mit Saline und THC 3 zwar vor allem in der äußeren Arena aufhielten, aber eher ein chaotisches Bewegungsverhalten zeigten.

In den vorangegangenen Studien (CBD-URB-Studie, pubertäre THC-Studie sowie Dosisstudie) wurde die Frequenz, mit der die innere Zone betreten wurde, auch als Maß für die Ängstlichkeit der Tiere herangezogen. Dies setzt aber eine unveränderte Lokomotion voraus, die in dieser Studie nicht gegeben war, so dass sie hier nur als Maß für die Aktivität der Tiere betrachtet werden kann. Die Frequenz (Abbildung 79) verringerte sich signifikant in Abhängigkeit von der Behandlung ($F(8,40) = 4,143$; $p = 0,001$). Obwohl nach THC 1 und THC 2-Gabe, wie erwähnt, nur jeweils ein Tier die innere Zone betrat (für die anderen Tiere betrug die Frequenz somit Null), war der Rückgang nur

für THC 1 signifikant (geplante Kontraste: THC 1 $p = 0,029$; THC 2 $p = 0,075$). Wurde Δ^9 -THC in Sesamöl (THC 3) gelöst verabreicht, veränderte sich das Verhalten der Tiere nicht. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Tiere nach WIN 1-Injektion tendenziell seltener die innere Zone des Open Fields betraten ($p = 0,313$).

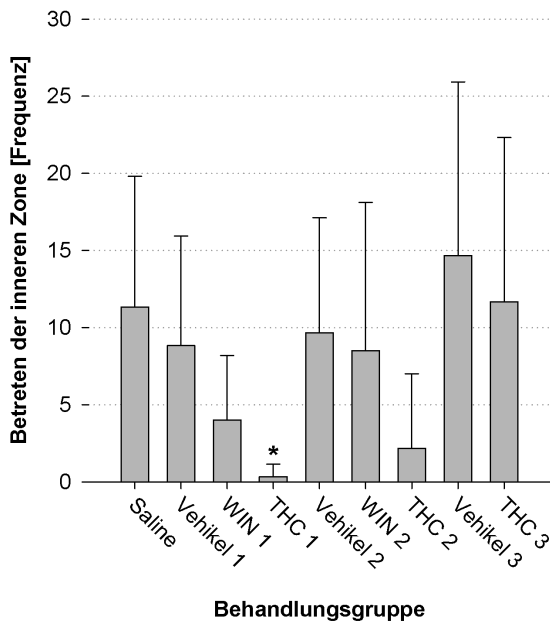


Abbildung 79: Frequenz, mit der die Tiere die innere Zone der Arena betraten.

Verglichen mit Tieren, die Saline verabreicht bekommen hatten, erkundeten die Tiere nach THC 1-Gabe die innere Zone des Open Fields signifikant seltener ($p = 0,029$). Obwohl sowohl nach THC 1- als auch nach THC 2-Applikation jeweils nur ein Tier überhaupt die innere Zone betrat, war der Frequenzrückgang nach THC 2-Injektion nicht signifikant, da sich ein Tier wie nach Saline-Gabe verhielt. Nach WIN 1- und WIN 2-Injektion erkundete jeweils ein Tier beider Gruppen die innere Zone nicht. Nur die WIN 1-Applikation schien tendenziell die Aktivität der Tiere zu erniedrigen.

Die statistische Analyse der Laufgeschwindigkeit der Ratten in der äußeren Zone der Open Field-Arena (Abbildung 80), ergab einen signifikanten Haupteffekt der Behandlung ($F(8,40) = 3,644$; $p = 0,003$).

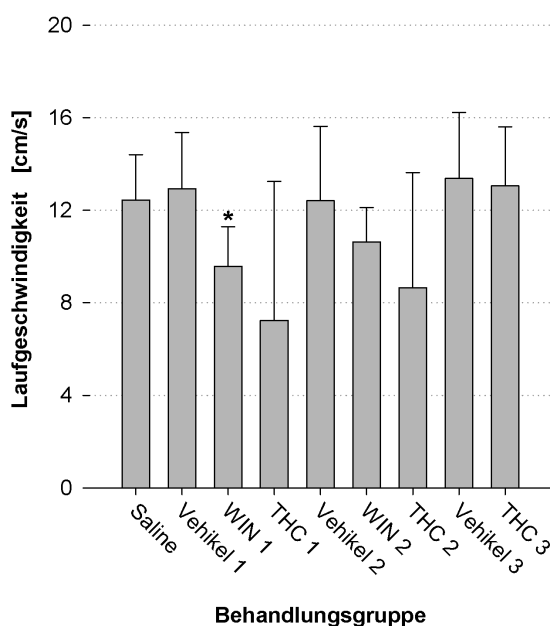


Abbildung 80: Laufgeschwindigkeit in der äußeren Zone des Open Fields.

2 h nach Injektion der Cannabinoide in wässrigem Lösungsmittel (WIN 1, THC 1, WIN 2, THC 2), nahm die Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere in der äußeren Zone der Arena bewegten, leicht ab. Diese Abnahme war nach WIN 1-Applikation signifikant ($p = 0,022$).

Nach den geplanten Kontrasten war dieser Unterschied für WIN 1 signifikant ($p = 0,022$). Die Injektion der anderen Cannabinoide in wässrigen Lösungen reduzierte die Bewegungsgeschwindigkeit nur leicht (THC 1: $p = 0,070$; THC 2: $p = 0,151$; WIN 2: $p = 0,076$). Die Gabe von Δ^9 -THC in Sesamöl (THC 3) hatte hingegen keinen Einfluss ($p = 0,582$).

Betrachtet man die Ergebnisse der Distanz, Frequenz und Laufgeschwindigkeit zusammen, so zeigt sich, dass Δ^9 -THC die lokomotorische Aktivität der Tiere nur verringerte, wenn es in einem wässrigen Lösungsmittel appliziert wurde, während es als ölige Formulierung keinen Effekt hatte. Des Weiteren scheint die Wirkung bei Verwendung des Vehikel 1 etwas stärker zu sein. Auch das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 reduzierte die Lokomotion, wenn es in Vehikel 1 gelöst war.

12.1.2. Objekterkennung

Die Auswertung der Explorationsdauer (Abbildung 81) ergab, dass im ersten Durchgang (OR1) nach Injektion von THC 1 und THC 2 drei Ratten kein einziges Objekt betrachteten. Von den Tieren, die in OR1 kein Objekt explorierten, beschäftigten sich, mit Ausnahme einer Ratte (THC 1-Gruppe), auch während des zweiten Durchgangs (OR2) kein Tier mit einem der Objekte. Dennoch konnte kein signifikanter Haupteffekt der Behandlung auf die Explorationsdauer nachgewiesen werden ($F(8,40) = 1,523$; $p = 0,180$). Zudem war die Explorationszeit in beiden Durchgängen vergleichbar ($F(1,5) = 1,843$; $p = 0,233$).

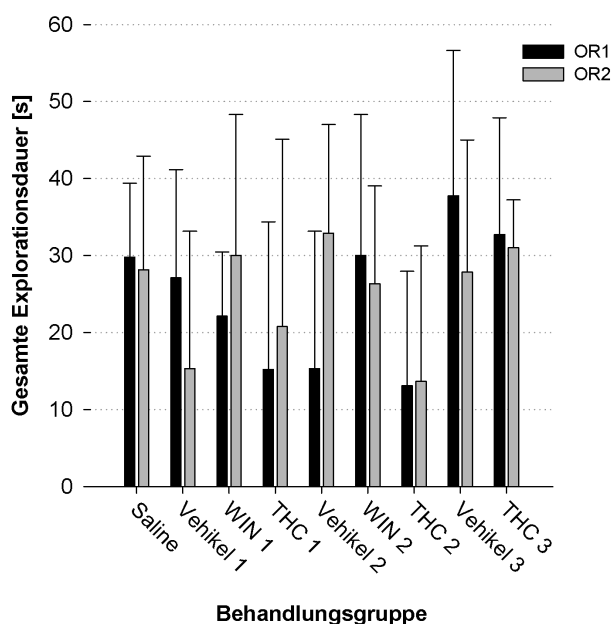


Abbildung 81: Vergleich der gesamten Explorationsdauer im ersten Durchgang (OR1, schwarz) und zweiten Durchgang (OR2, grau).

Obwohl einige Tiere in einem oder beiden Durchgängen kein Objekt explorierten, konnte kein Haupteffekt der Behandlung nachgewiesen werden ($p = 0,180$). Des Weiteren war die Betrachtungsdauer in beiden Durchgängen nahezu identisch ($p = 0,233$).

Für die Analyse der Latenzzeit (Abbildung 82 a) wurde den Tieren, die im zweiten Durchgang kein Objekt explorierten, eine Latenzzeit von 180 s zugewiesen, da eine ANOVA mit Messwiederholung mit fehlenden Werten nicht durchgeführt werden kann. Es wurde ein signifikanter Haupteffekt der Behandlung ($F(8,40) = 4,622$; $p < 0,001$) nachgewiesen. Allerdings gaben die im Anschluss ermittelten einfachen geplanten Kontraste keinen weiteren Aufschluss. Der Anstieg in der Latenzzeit nach THC 1- und THC 2-Behandlung war nicht signifikant.

Die Behandlung hatte auch einen signifikanten Effekt auf die Objektwechselfrequenz (Abbildung 82 b).

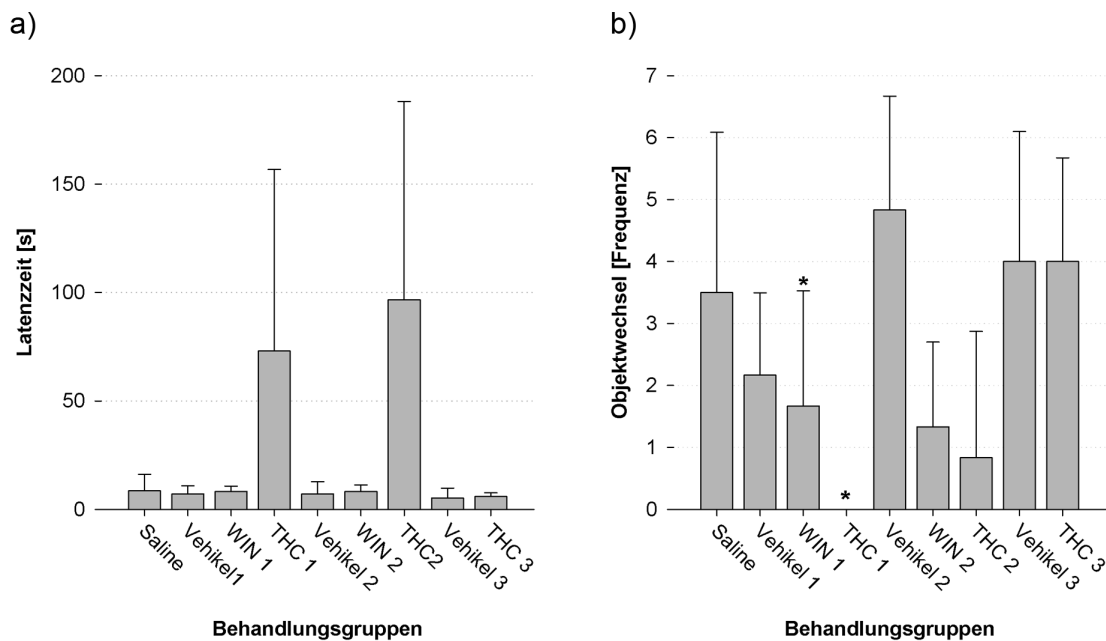


Abbildung 82: Zeit, bis das erste Objekt im zweiten Durchgang betrachtet wurde (a) sowie die Frequenz, mit der die Tiere während der Exploration zwischen den beiden Objekten wechselten (b).

Die Latenzzeit der Tiere, die Δ^9 -THC in einer wässrigen Formulierung verabreicht bekamen, stieg stark an, da einige Ratten kein Objekt betrachteten (Latenzzeit 180 s). Trotz eines Haupteffekts der Behandlung ($p < 0,001$), gaben die geplanten Kontraste keinen weiteren Aufschluss. Die Objektwechselfrequenz wurde hingegen durch die WIN 1- und THC 1-Behandlung signifikant reduziert (WIN 1: $p = 0,028$; THC 1 $p = 0,021$). Des Weiteren nahm die Frequenz nach WIN 2- und THC 2-Injektion tendenziell ab (WIN 2: $p = 0,071$; THC 2: $p = 0,116$).

Sowohl die Tiere, die gar kein Objekt betrachteten, als auch die, die bei dem Objekt blieben, dass sie zuerst erreicht hatten, wurden bezüglich der Frequenz, mit der sie bei der Exploration zwischen den Objekten wechselten, mit null bewertet. Die Objektwechselfrequenz war sowohl nach THC 1- ($p = 0,021$) als auch nach WIN 1-Behandlung

($p = 0,028$) signifikant verringert. Obwohl die Reduktion der Frequenz nach WIN 2- und THC 2-Injektion auf dem ersten Blick größer erschien als nach den WIN 1-Gabe, war dieser Effekt nicht signifikant (WIN 2: $p = 0,071$; THC 2 $p = 0,116$). Die Applikation von Δ^9 -THC in Sesamöl beeinflusste weder die Latenz noch die Objektwechselfrequenz.

Der Diskriminierungsindex ist in Abbildung 83 dargestellt, wurde aber aufgrund der teilweise sehr geringen Gruppengröße statistisch nicht analysiert.

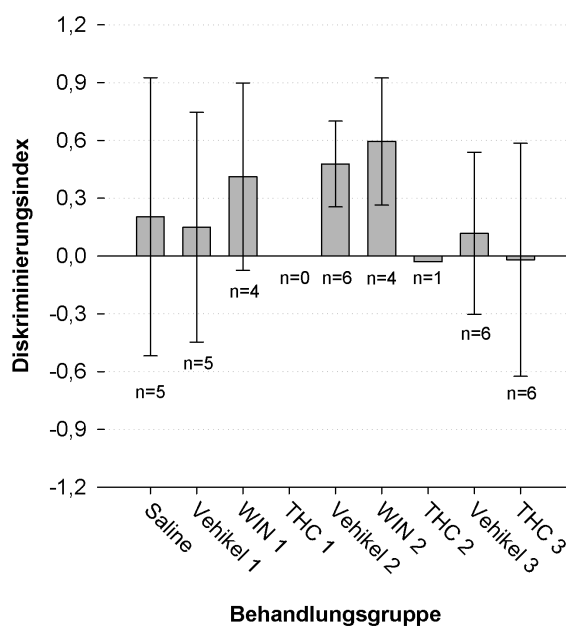


Abbildung 83: Diskriminierungsindex.

Einige Tiere mussten von der Berechnung des Diskriminierungsindex ausgeschlossen werden. Die verbleibende Tierzahl pro Gruppe (n) ist unter den jeweiligen Balken angegeben. Nach Gabe von THC 1 und THC 2 betrachteten die meisten Tiere im ersten Durchgang kein Objekt und/oder im zweiten Durchgang nur eines oder keines. Nach Saline- und Vehikel-Injektionen wiesen die Tiere einen positiven Index und somit ein intaktes Arbeitsgedächtnis auf. Für die Tiere, die Δ^9 -THC in Sesamöl verabreicht bekamen, kann aufgrund der hohen Standardabweichung keine verlässliche Aussage über die Gedächtnisleistung gemacht werden. Das synthetische Cannabinoid WIN 55,212-2 scheint das Arbeitsgedächtnis nicht zu beeinflussen. Da die Motorik der Tiere allerdings vermindert war, muss dies unter Vorbehalt betrachtet werden.

Alle Tiere, die im ersten Durchgang kein Objekt betrachteten und/oder im zweiten Durchgang ebenfalls keins oder nur eines, wurden von der Berechnung ausgeschlossen. Dies betraf im Wesentlichen Tiere nach THC 1- und THC 2-Behandlung. Die Motorik der Tiere war so stark beeinträchtigt, dass mit Ausnahme einer Ratte kein Tier im Objekterkennungstest aktiv war. Die Gedächtnisleistung der Ratten, die mit einer wässrigen Δ^9 -THC-Formulierung behandelt wurden, lässt sich somit nicht beurteilen. In einer öligen Darreichungsform beeinflusste Δ^9 -THC die Lokomotion nicht, so dass die Gedächtnisleistung analysiert werden konnte. Der Diskriminierungsindex deutet mit einem Wert von etwa null auf eine reduzierte Leistung hin. Aufgrund der hohen Standardabweichung lässt sich aber in dieser Studie keine verlässliche Aussage über das Arbeitsgedächtnis dieser Tiere treffen. Zwar war der Diskriminierungsindex nach beiden WIN 55,212-2-Behandlungen (WIN 1, WIN 2) positiv, was ein intaktes Arbeitsgedächtnis anzeigt, aber da auch die Lokomotion und Objektwechselfrequenz nach Gabe

von WIN reduziert war, muss dieses Ergebnis unter Vorbehalt betrachtet werden. Nach Vehikel-Behandlung wiesen die Tiere im Mittel einen positiven Diskriminierungsindex auf und ihre Motorik war unverändert, so dass von einem intakten Arbeitsgedächtnis ausgegangen werden kann.

12.1.3. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Die Amplitude der akustischen Schreckreaktion (Abbildung 84) konnte durch keine Behandlung moduliert werden ($F(8,40) = 1,982$; $p = 0,074$).

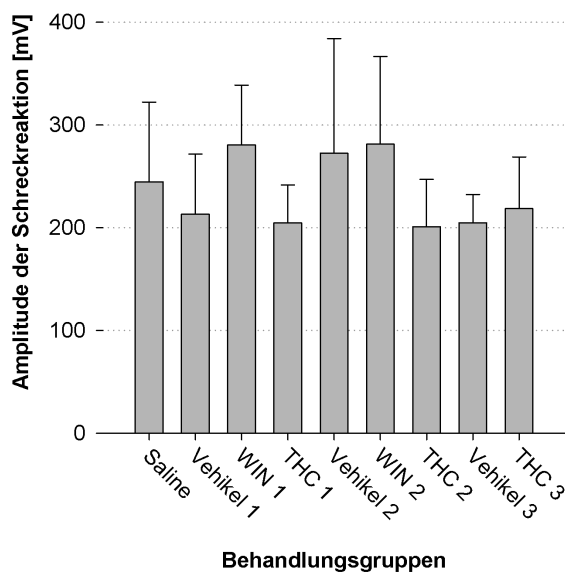


Abbildung 84: Amplitude der Schreckreaktion.

Keine Behandlung beeinflusste die Amplitude der Schreckreaktion ($p = 0,074$).

Abbildung 85 fasst die Ergebnisse der Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion zusammen. Bei der statistischen Analyse des Effektes der Präpuls lautstärke auf die PPI mussten zunächst die Freiheitsgrade aufgrund der fehlenden Varianzgleichheit angepasst werden (Mauchly: $X^2(5) = 17,046$; $p < 0,006$; Greenhouse-Geisser Schätzung; $\epsilon = 0,425$). Bei allen Tieren wurde die Stärke der sensomotorischen Hemmung von der Lautstärke des Präpulses bestimmt ($F(1,276, 6,382) = 342,787$; $p < 0,001$). Der Post hoc-Test Sidak ergab, dass die PPI umso größer war, je lauter der verwendete Präpuls (68 vs. 72: $p = 0,001$, alle anderen $p < 0,001$).

Zudem wurde ein signifikanter Haupteffekt der Behandlung beobachtet ($F(8, 40) = 2,323$; $p = 0,038$). Die Kontrastanalyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der PPI nach Saline- und nach THC 2-Injektion ($p = 0,034$). Da keine Interaktion Behandlung*Präpuls lautstärke vorlag ($F(24, 120) = 0,897$; $p = 0,605$), gilt dieser Ef-

fekt für alle Präpuls lautstärken zusammengefasst. Aus Abbildung 85 geht hervor, dass nach Δ^9 -THC-Gabe im Vehikel 2 die PPI immer etwas niedriger war als nach Saline-Gabe. Auch die Applikation von WIN 2 schien die PPI verglichen mit der PPI nach Saline-Behandlung zu erniedrigen, aber diese Reduktion war nicht signifikant ($p = 0,175$).

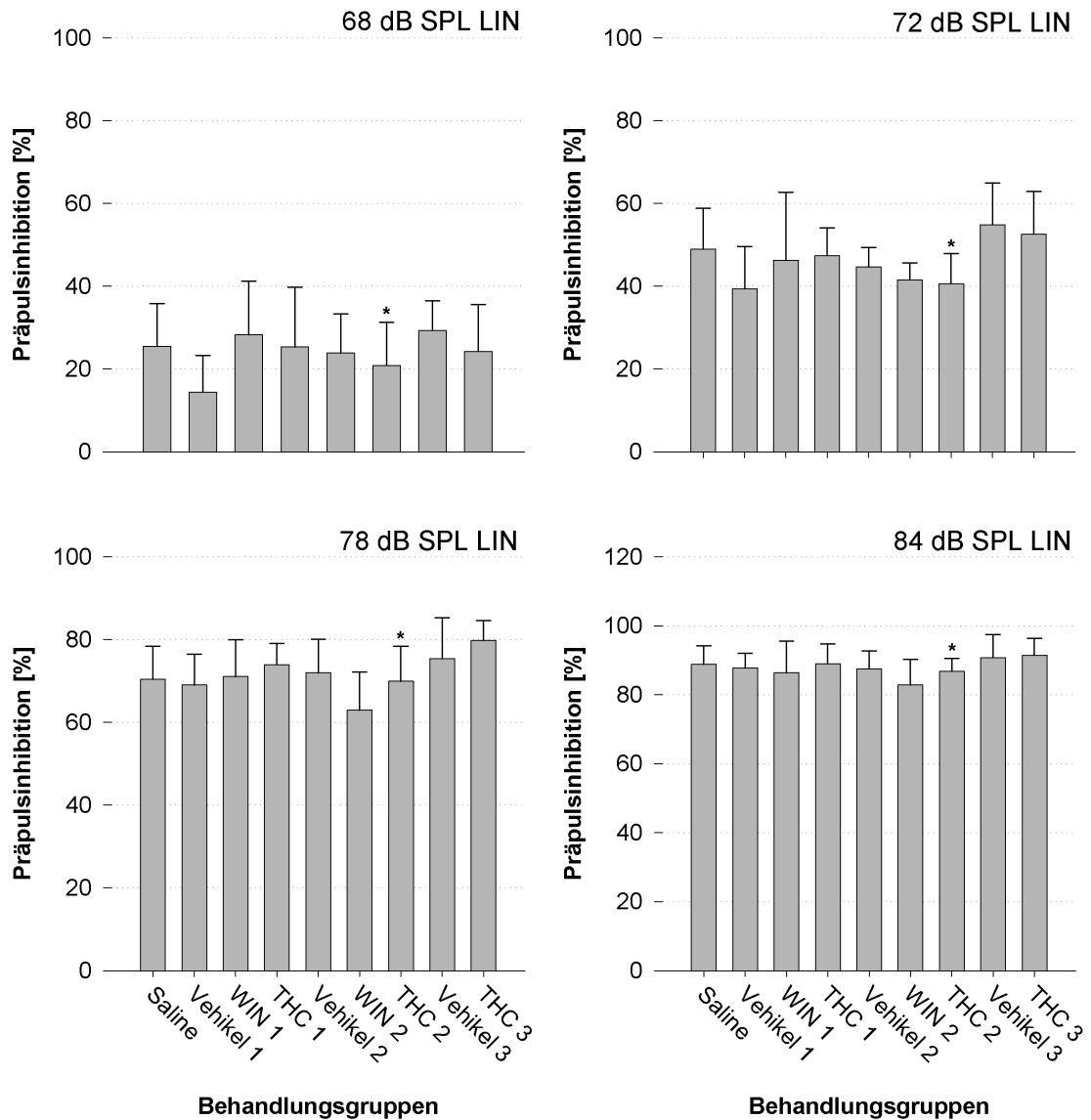


Abbildung 85: Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion in Abhängigkeit von der Präpuls lautstärke (68, 72, 78 und 84 dB SPL LIN).

Die Behandlung hatte einen signifikanten Effekt auf die PPI ($p = 0,038$), wobei dieser unabhängig von der Präpuls lautstärke war (Behandlung*Präpuls: $p = 0,605$). Die Kontrastanalyse ergab, dass THC 2 die PPI signifikant veränderte ($p = 0,034$). Die graphische Darstellung zeigt, dass die PPI nach THC 2-Gabe bei jeder Präpuls lautstärke etwas geringer war als nach Saline-Injektion. Die PPI-Reduktion nach WIN 2-Applikation war hingegen nicht signifikant ($p = 0,175$). Das Ausmaß der sensomotorischen Hemmung war zudem immer von der Präpuls lautstärke abhängig ($p < 0,001$). Je lauter der Präpuls, desto stärker war die PPI.

Die Gabe von Cannabinoiden in wässrigen Lösungsmitteln hatte somit keinen starken Effekt auf die sensomotorische Hemmung, aber Δ^9 -THC konnte zumindest in einer Formulierung die PPI leicht, aber dennoch signifikant reduzieren.

Wie auch schon in der Dosisstudie hatte Δ^9 -THC in der öligen Darreichungsform keinen Einfluss auf die PPI.

12.2. Teil 2

Im ersten Teil der Lösungsmittelstudie wurde die Cannabinoidwirkung 2 h nach Injektion getestet. Diese Zeit wurde in Anlehnung an die Dosisstudie gewählt, in der Δ^9 -THC ausschließlich in Sesamöl gelöst verabreicht wurde. Bei Verwendung von wässrigen Lösungsmitteln ist allerdings eine schnellere Kinetik zu erwarten, so dass die Wirkung auch früher eintreten kann. Um zudem eine bessere Vergleichbarkeit mit der Literatur zu erreichen, wurde in diesem zweiten Teil der Lösungsmittelstudie die akute Wirkung von 5 mg/kg Δ^9 -THC in den beiden wässrigen Vehikeln nach 15 min untersucht. In Tabelle 8 sind alle eingesetzten Lösungen sowie ihre im Folgenden verwendeten Kurzbezeichnungen zusammengefasst.

Kurzbezeichnung	Lösungsmittel	Substanz
Saline	0,9 %ige Kochsalzlösung	—
Vehikel 1	1 % Tween80 in Saline	—
Vehikel 2	Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	—
THC 1	1 % Tween80 in Saline	5 mg/kg Δ^9 -THC
THC 2	Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	5 mg/kg Δ^9 -THC

Tabelle 8:
Zusammenfassung der in der Studie verwendeten Lösungen sowie ihre Kurzbezeichnungen.

Auch in dieser Studie durchlief jedes Tier alle Behandlungen, so dass für die statistischen Analysen ANOVAs mit Messwiederholungen verwendet wurden (1 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktor: Behandlung) oder 2 faktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Faktoren: Behandlung und zusätzliche Variable des Verhaltensversuchs)).

12.2.1. Open Field

Während im ersten Teil der Lösungsmittelstudie eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Distanz nach THC 1-Gabe beobachtet wurde, bewegten sich die Tiere

15 min nach Injektion nur tendenziell weniger (Abbildung 86). Die leichte Verringerung der zurückgelegten Distanz wurde auch nach THC 2-Behandlung beobachtet (Haupteffekt der Behandlung: $F(4, 16) = 1,930$; $p = 0,154$).

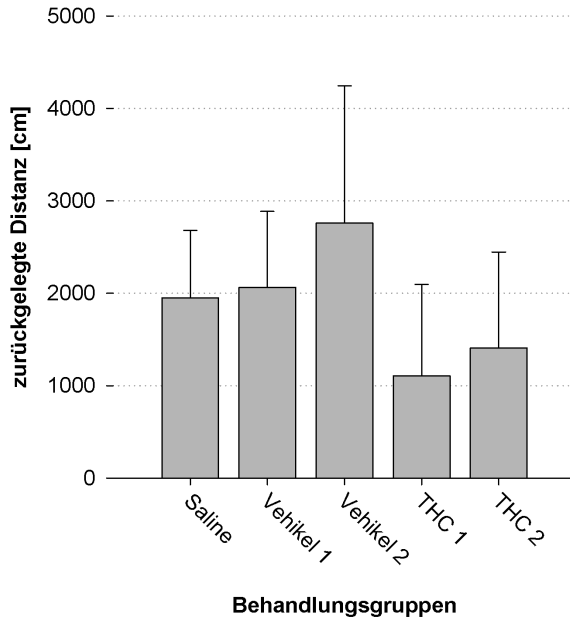


Abbildung 86: Zurückgelegte Distanz im Open Field nach Injektion von Saline, Vehikel oder wässriger Δ^9 -THC-Lösung.

Δ^9 -THC hatte 15 min nach Injektion noch keinen deutlichen Einfluss auf die Motorik der Ratten. Nur eine tendenzielle Abnahme der insgesamt zurückgelegten Distanz war zu beobachten.

Nach Vehikel 2-Gabe, waren die Tiere tendenziell etwas aktiver. Sie legten innerhalb der 10 min im Open Field eine etwas längere Strecke zurück und betraten häufiger die innere Zone der Arena (Abbildung 87).

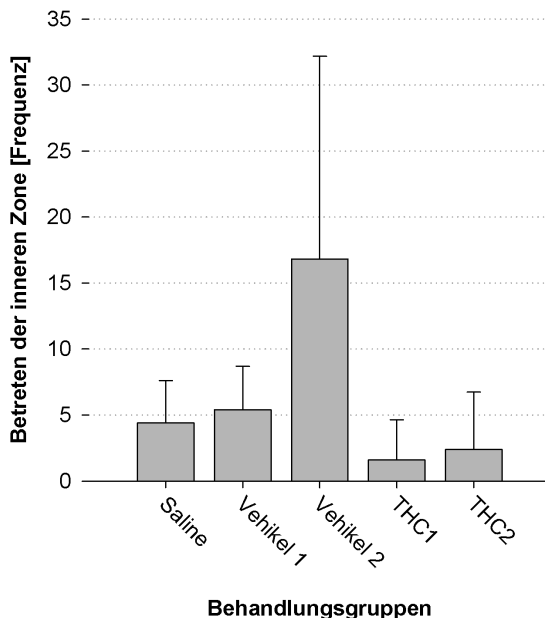


Abbildung 87: Frequenz, mit der die innere Zone des Open Fields betreten wurde.

Nach Vehikel 2-Injektion erkundeten die Ratten die innere Zone etwas häufiger, während die Δ^9 -THC-Gabe zu einer Abnahme der Frequenz führte. Keine dieser Veränderungen war jedoch signifikant.

Im Gegensatz dazu nahm die Frequenz, mit der die Tiere die innere Zone nach THC 1- und THC 2-Applikation betraten, ab. Es wurde auch ein Haupteffekt der Behandlung bezüglich der Frequenz nachgewiesen ($F(4, 16) = 3,716$; $p = 0,025$), aber keiner der ein-

fachen geplanten Kontraste war signifikant. Die leichten Veränderungen in der Frequenz, mit der die innere Zone betreten wurde, scheinen nicht mit einer Ab- oder Zunahme der Ängstlichkeit einherzugehen, sondern eher mit einer leichten Aktivitätsänderung, die sich auch in der zurückgelegten Distanz (Abbildung 86) sowie der Laufgeschwindigkeit (Abbildung 88) widerspiegelt.

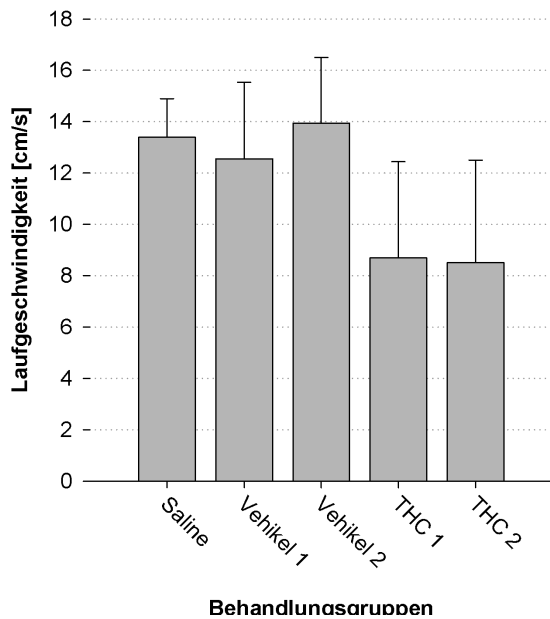


Abbildung 88: Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere in der äußeren Zone bewegten.

Die Δ^9 -THC-Behandlung führte zu einer tendenziellen Reduktion der Laufgeschwindigkeit.

Nach Δ^9 -THC-Injektion bewegten sich die Ratten nicht nur tendenziell weniger, sie liefen auch in der äußeren Zone etwas langsamer (signifikanter Haupteffekt der Zone: $F(4, 16) = 3,202$; $p = 0,041$, aber keiner der geplanten Kontraste war signifikant).

Die charakteristischen Laufmuster der Ratten verdeutlichen die oben gezeigten Ergebnisse (Abbildung 89).

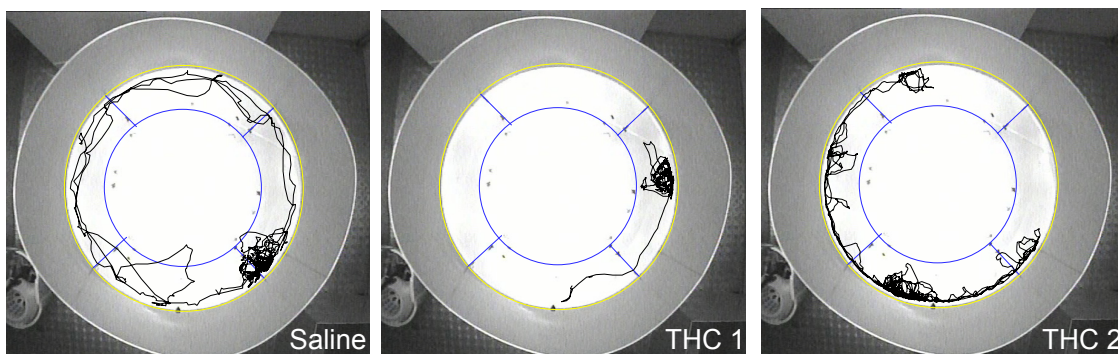


Abbildung 89: Exemplarische Bewegungsmuster der Ratten nach der Injektion von Saline, THC 1 und THC 2.

Nach Vehikel 1- und 2-Gabe ergaben sich Laufmuster, die mit denen nach Saline-Injektion vergleichbar sind. Während die Lokomotion nach THC 1-Applikation teilweise vollständig zum Erliegen kam, bewegen sich die Tiere nach THC 2-Gabe weniger, etwas langsamer und vor allem deutlich ausgeprägter entlang der Arenawand als nach Saline-Injektion.

12.2.2. Objekterkennung

Der Objekterkennungsversuch startete etwa 30 min nach Injektion der verschiedenen Lösungen. Im Gegensatz zum ersten Teil der Lösungsmittelstudie (vgl. 12.1.2) betrachteten alle Ratten in beiden Durchgängen mindestens ein Objekt. Keine der Behandlungen wirkte sich auf die gesamte Explorationsdauer aus ($F(4, 16) = 1,090$; $p = 0,395$) und in beiden Durchgängen wurden die Objekte etwa gleich lang exploriert ($F(1, 4) = 0,162$; $p = 0,708$; Abbildung 90)

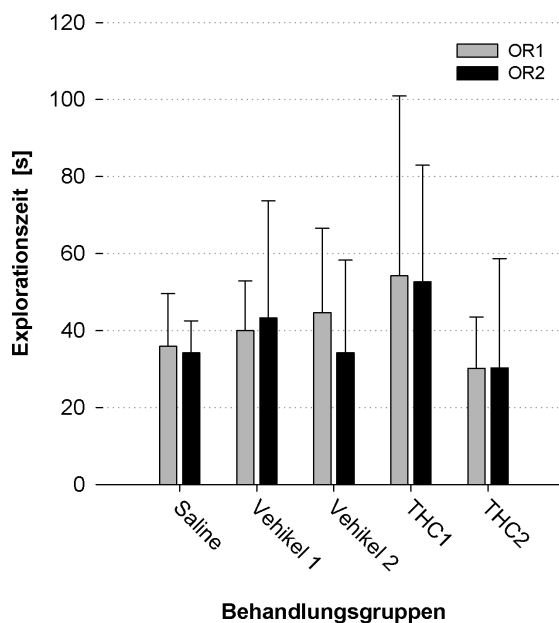


Abbildung 90: Vergleich der gesamten Explorationsdauer im ersten (OR1, grau) und zweiten Durchgang (OR2, schwarz).

Die Betrachtungsdauer war in beiden Durchgängen vergleichbar und wurde nicht durch Δ^9 -THC beeinflusst.

Da alle Tiere im zweiten Durchgang mindestens ein Objekt betrachteten, konnte für jede Ratte eine Latenzzeit gemessen werden (Abbildung 91 a). Aufgrund fehlender Varianzhomogenität der Daten wurden die Freiheitsgrade zunächst angepasst (Mauchly: $X^2(9) = 22,311$; $p < 0,022$; Greenhouse-Geisser Schätzung; $\epsilon = 0,454$). Es zeigte sich ein signifikanter Haupteffekt der Behandlung ($F(1,816, 7,265) = 7,401$; $p = 0,019$), wobei laut Kontrasten nur die THC 1-Gabe die Latenzzeit signifikant erhöhte ($p = 0,04$), während THC 2 nur tendenziell die Latenz steigerte ($p = 0,057$). Unabhängig vom Lösungsmittel führte die Δ^9 -THC-Behandlung dazu, dass jeweils vier Tiere im zweiten Durchgang des Versuches bei dem Objekt blieben, das sie zuerst erreichten. Dies resultierte in einer signifikanten Reduktion der Objektwechselfrequenz durch Δ^9 -THC ($F(4, 16) = 9,227$; $p < 0,001$; THC1: $p = 0,007$; THC2: $p = 0,003$; Abbildung 91 b).

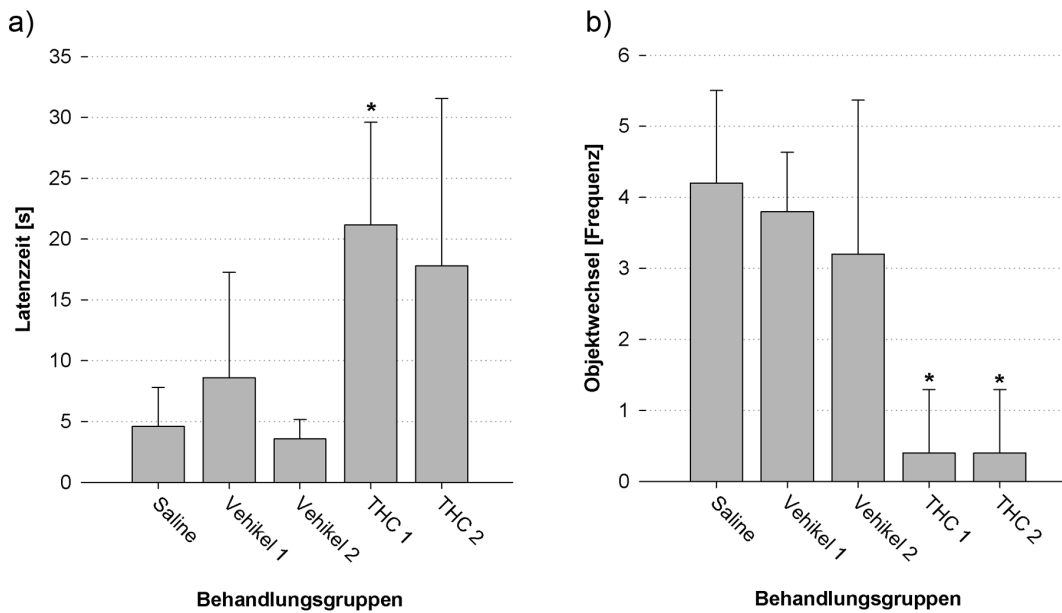
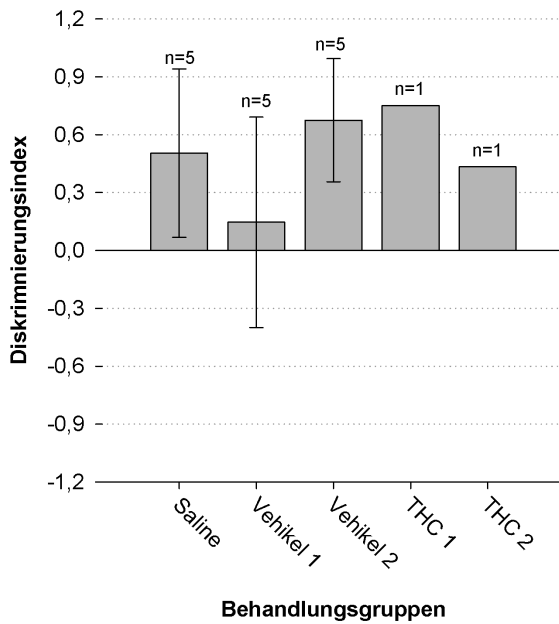


Abbildung 91: Zeit, bis das erste Objekt betrachtet wurde (a) sowie die Frequenz, mit der die Tiere während der Exploration zwischen den beiden Objekten im zweiten Durchgang wechselten (b).

Für alle Tiere konnte in dieser Studie eine Latenzzeit gemessen werden. Die Δ^9 -THC-Behandlung verlängerte die Zeit, bis ein Tier das erste Mal ein Objekt betrachtete. Dieser Unterschied war für THC 1 signifikant ($p = 0,04$). Beide Cannabinoidbehandlungen reduzierten zudem signifikant die Objektwechselfrequenz (THC 1: $p = 0,007$; THC 2: $p = 0,003$).

Die tendenzielle Aktivitätsänderung, die sich bereits im Open Field-Test zeigte, machte sich somit auch im Objekterkennungstest bemerkbar. Zwar betrachteten alle Tiere mindestens ein Objekt, aber die Latenz nahm zu und die Objektwechselfrequenz nahm ab. Außerdem resultierte die Δ^9 -THC-Behandlung darin, dass fast alle Tiere, wenn sie ein Objekt erreichten, auch dort verharrten. Das erschwerte die Berechnung des Diskriminierungsindex. Somit kann auch im zweiten Teil der Lösungsmittelstudie die Gedächtnisleistung der Tiere nicht sinnvoll bewertet werden (Abbildung 92). Die beiden Tiere, die nach Δ^9 -THC-Injektion im zweiten Durchgang beide Objekte betrachteten, explorierten das unbekannte Objekt länger als das bekannte und zeigten somit keine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses.

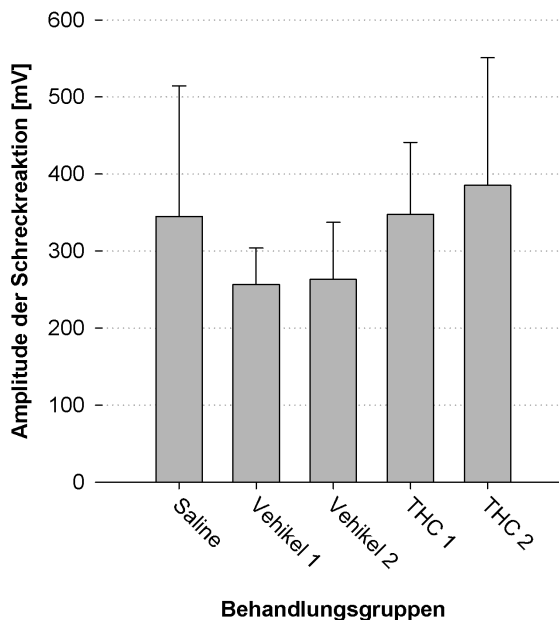
Auch die Saline- und Vehikel-Injektionen hatten keinen Einfluss auf die Gedächtnisleistung der Ratten. Im Mittel wurden positive Indizes beobachtet.

**Abbildung 92: Diskriminierungsindex**

Der Diskriminierungsindex konnte für alle Tiere nach Saline- und Vehikel-Gabe, aber nur für jeweils ein Tier nach Δ^9 -THC-Gabe berechnet werden (siehe auch Angaben der Tierzahl (n) über den Balken). Insgesamt zeigte sich im Mittel für jede Behandlung ein positiver Index, so dass von einem intakten Arbeitsgedächtnis ausgegangen werden kann.

12.2.3. Präpulsinhibition der akustischen Schreckreaktion

Auch nach kurzer Wirkdauer wurde die Amplitude der akustischen Schreckreaktion nicht durch Δ^9 -THC verändert. Die Vehikel-Gabe hatte ebenfalls keinen Einfluss ($F(4, 16) = 1,351$; $p = 0,294$).

**Abbildung 93: Amplitude der akustischen Schreckreaktion.**

Keine der Behandlungen resultierte in einer Veränderung der Schreckreaktion.

Die PPI war erneut signifikant von der Präpuls lautstärke abhängig ($F(3, 12) = 392,524$; $p < 0,001$). Der Post hoc-Test Sidak bestätigte, dass die PPI umso stärker war, je lauter

der präsentierte Präpuls (68 vs. 72 und 78 vs. 84: $p = 0,002$; 72 vs. 78 und vs. 84 $p = 0,001$; 68 vs. 78 und vs. 84 $p < 0,001$).

Während etwa 3 h nach Behandlung mit THC 2 eine leichte, aber signifikante Reduktion der Präpulsinhibition (PPI) beobachtet wurde (vgl. 12.2.3), hatte Δ^9 -THC in dieser Studie keine Wirkung auf die sensomotorische Hemmung ($F(4, 16) = 2,113$; $p = 0,127$; Abbildung 94).

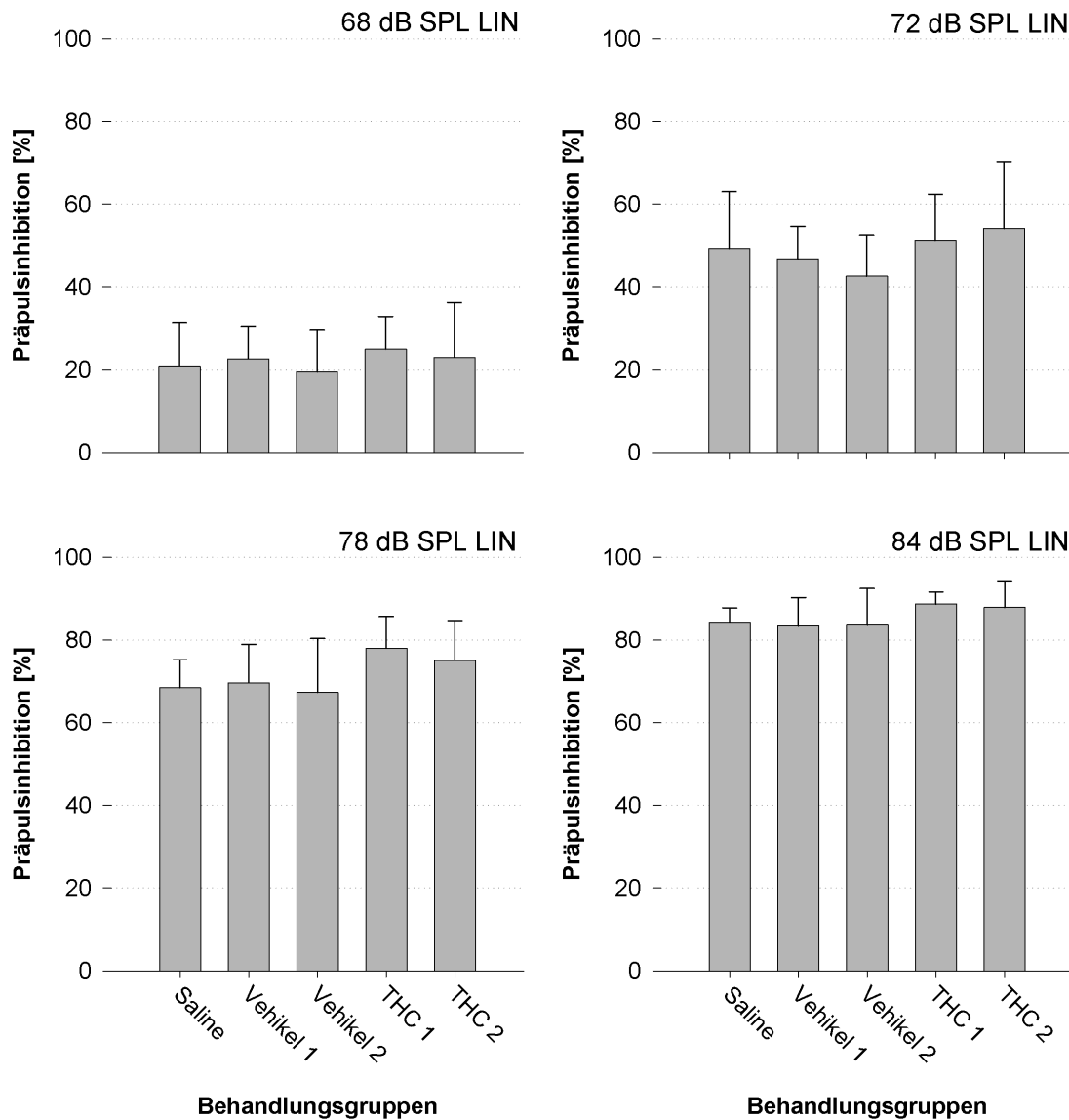


Abbildung 94: Präpulsinhibition (PPI) der akustischen Schreckreaktion in Abhängigkeit von den vier Prapulslautstarken 68, 72, 78 und 84 dB SPL LIN.

Die Injektion von Δ^9 -THC beeinflusste in keiner der beiden Darreichungsformen die PPI ($p = 0,127$). Das Ausmaß der sensomotorischen Hemmung war allerdings von der Prapulslautstärke abhängig ($p < 0,001$). Je lauter der Präpuls, desto stärker war die PPI.

12.3. Teil 3

Im dritten Teil der Lösungsmittelstudie wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Bioverfügbarkeit von Δ^9 -THC untersucht. Im Fokus stand zum einen die unterschiedliche Kinetik sowie die nach 15 min und 2 h im Gehirngewebe erreichte Endkonzentration. Zudem wurde untersucht, ob die Darreichungsform auch die Wirkung von CBD und URB 597 (URB) auf Anandamid (AEA), PEA und OEA beeinflussen kann.

Alle getesteten Lösungen sowie ihre im Folgenden verwendeten Kurzbezeichnungen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der in Teil 3 der Lösungsmittelstudie verwendeten Lösungen sowie ihre Kurzbezeichnungen.

Kurzbezeichnung	Lösungsmittel	Substanz
Vehikel	Zusammenfassung von Saline, Vehikel 2 und Sesamöl	—
THC 2	Vehikel 2: Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	5 mg/kg Δ^9 -THC
THC 3	Sesamöl	5 mg/kg Δ^9 -THC
CBD 2	Vehikel 2: Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	12 mg/kg CBD
CBD 3	Sesamöl	12 mg/kg CBD
URB 2	Vehikel 2: Ethanol, Tween80, Saline (1:1:18)	0,3 mg/kg URB 597
URB 3	Sesamöl	0,3 mg/kg URB 597

In der vorliegenden Arbeit wurden die mittels HPLC/MS-MS ermittelten Konzentrationen von Δ^9 -THC, CBD, der Endocannabinoide Anandamid (AEA) und 2-AG sowie verwandter Lipide (PEA und OEA) für das Gesamthirn zusammengefasst betrachtet. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Gehirnareale ist in der Arbeit von Frau Pahlisch zu finden.

Die statistische Analyse erfolgte bei der Untersuchung der Bioverfügbarkeit der Cannabinoide mittels 2 faktorieller ANOVA (Faktoren: Wirkdauer und Lösungsmittel bzw. Behandlung und Lösungsmittel) und bei der Analyse der Effekte der Darreichungsform auf die Wirkung von CBD und URB über eine 2 faktorielle mixed design ANOVA (Faktoren: Medikation und Lipide).

12.3.1. Bioverfügbarkeit der Cannabinoide

Die Analyse der Δ^9 -THC-Konzentrationen im Gehirngewebe ergab, dass nach i. p. Applikation trotz vollständiger Injektion der Substanz diese das Gehirn teilweise nicht erreichte. Tiere, in deren Gehirn kein Δ^9 -THC nachgewiesen werden konnte, wurden von der Mittelwertbildung ausgeschlossen. Somit ergaben sich folgenden Tierzahlen:

15 min Wirkdauer: THC 2: n=3; THC 3 n=4;

2 h Wirkdauer: THC 2: n=2 THC 3 n=5;

Die statistische Analyse muss unter Vorbehalt betrachtet werden, da zusätzlich zum kleinen n auch durch Transformationen keine Varianzhomogenität erreicht wurde (Levene-Test: $F(3,10) = 5,9$; $p = 0,014$). Es ergab sich kein signifikanter Haupteffekt des Lösungsmittels ($F(1,10) = 0,6$; $p = 0,463$), aber die Wirkdauer hatte einen signifikanten Einfluss ($F(1,10) = 19,2$; $p = 0,001$). Eine signifikante Interaktion wurde ebenfalls beobachtet (Lösungsmittel*Wirkdauer: $F(1,10) = 10,5$; $p = 0,009$). Der Post hoc-Test Sidak zeigte, dass 2 h nach Injektion von Δ^9 -THC in Sesamöl (THC 3) der Cannabinoid-Gehalt signifikant höher war als nach einer Wirkdauer von nur 15 min ($p < 0,001$). Wurde Δ^9 -THC hingegen im wässrigen Vehikel (THC 2) appliziert, waren die Konzentrationen im Gehirngewebe nach 15 min und 2 h vergleichbar. Des Weiteren war der Δ^9 -THC-Spiegel 15 min nach Injektion der wässrigen Lösung höher als nach Injektion der öligen ($p = 0,014$). Nach 2 h hatte sich der Δ^9 -THC-Gehalt im Gewebe allerdings wieder ausgeglichen (Abbildung 95).

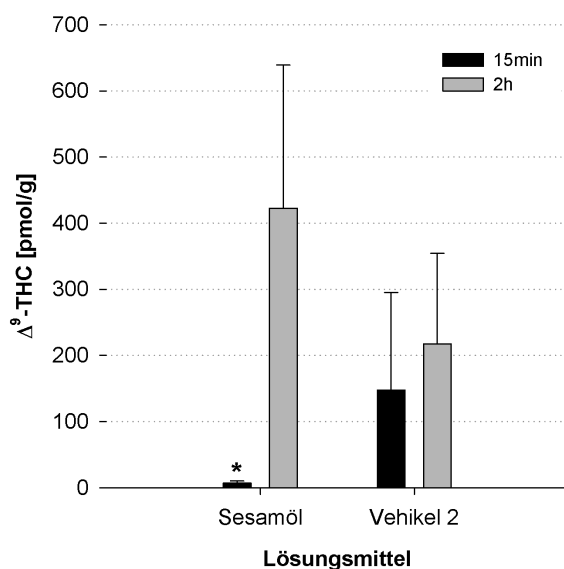


Abbildung 95: Δ^9 -THC-Konzentration im Gehirngewebe in Abhängigkeit von der Wirkdauer und dem Lösungsmittel.

Injiziert man Δ^9 -THC im wässrigen Vehikel, so wird bereits nach 15 min eine signifikant höhere Konzentration im Gehirngewebe erreicht, verglichen mit der Verwendung von Sesamöl ($p = 0,014$; Signifikanz aus Übersichtsgründen nicht eingezeichnet). Der Δ^9 -THC-Spiegel war zudem nach 15 min vergleichbar mit der Konzentration nach 2 h. Sesamöl führte hingegen zu einer verlangsamten Kinetik: nach 2 h war die Δ^9 -THC-Konzentration im Gehirngewebe signifikant höher als nach 15 min (*: $p < 0,001$). Statistisch konnte kein Unterschied im Δ^9 -THC-Gehalt nach 2 h in Abhängigkeit vom Lösungsmittel festgestellt werden.

Das heißt, Δ^9 -THC wurde bei Verwendung des wässrigen Vehikels schneller ins Gehirn transportiert (schnellere Kinetik), aber die Endkonzentration, die im Gehirngewebe nach 2 h erreicht wurde, war unabhängig vom Lösungsmittel.

Die Ergebnisse der Bioverfügbarkeit von CBD sind mit denen für Δ^9 -THC vergleichbar. Prozentual wurden nach 2 h identische Cannabinoid-Konzentrationen gemessen (Δ^9 -THC vs. CBD: $F(1,10) = 0,9$; $p = 0,376$). Auch hier ließ sich nach 2 h kein Unterschied in Abhängigkeit von den beiden Lösungsmitteln beobachten ($F(1,10) = 0,5$; $p = 0,529$). Somit kann CBD mit der gleichen Effizienz die Bluthirnschranke passieren wie Δ^9 -THC.

12.3.2. Beeinflussung der Eicosanoid-Konzentrationen durch unterschiedliche Darreichungsformen von URB 597 und CBD

Die Darreichungsform beeinflusste nicht die Wirkung von CBD und URB 597 auf die Eicosanoid-Konzentrationen (Abbildung 96). Nach Korrektur der Freiheitsgrade aufgrund fehlender Varianzhomogenität (Mauchly: $X^2(5) = 76,1$; $p < 0,001$; Greenhouse-Geisser Schätzung; $\epsilon = 0,428$), ergab die Analyse des signifikanten Behandlungseffekts $F(4,26) = 9,4$; $p < 0,001$) und der signifikanten Interaktion (Behandlung*Lipide: $F(5,141, 33,415) = 5,3$; $p = 0,001$), dass CBD die Konzentration von Anandamid sowie PEA und OEA nicht veränderte (kein Unterschied gegenüber Vehikel, jeweils $p = 1,000$), während URB 597 FAAH unabhängig vom Lösungsmittel inhibierte. Der Post hoc-Test Sidak war allerdings nur bezüglich des Anstiegs der PEA- und OEA-Spiegel nach URB-Gabe, signifikant (p-Werte vgl. Tabelle 10), während die AEA-Konzentration nur tendenziell erhöht war. Die Konzentration des Endocannabinoids 2-AG wurde durch keine Behandlung verändert.

Lipid	Behandlung	p-Wert	Behandlung	p-Wert
PEA	URB 2 vs Vehikel	0,019	URB 3 vs Vehikel	0,001
	URB 2 vs CBD 2	0,016	URB 3 vs CBD 2	0,002
	URB 2 vs CBD 3	0,039	URB 3 vs CBD 3	0,002
OEA	URB 2 vs Vehikel	0,007	URB 3 vs Vehikel	0,003
	URB 2 vs CBD 2	0,018	URB 3 vs CBD 2	0,003
	URB 2 vs CBD 3	0,014	URB 3 vs CBD 3	0,008

Tabelle 10: Post hoc-Test Sidak (p-Werte) der signifikanten Interaktion Behandlung*Lipide.

Aus Gründen der Übersicht sind nur die signifikanten p-Werte angegeben.

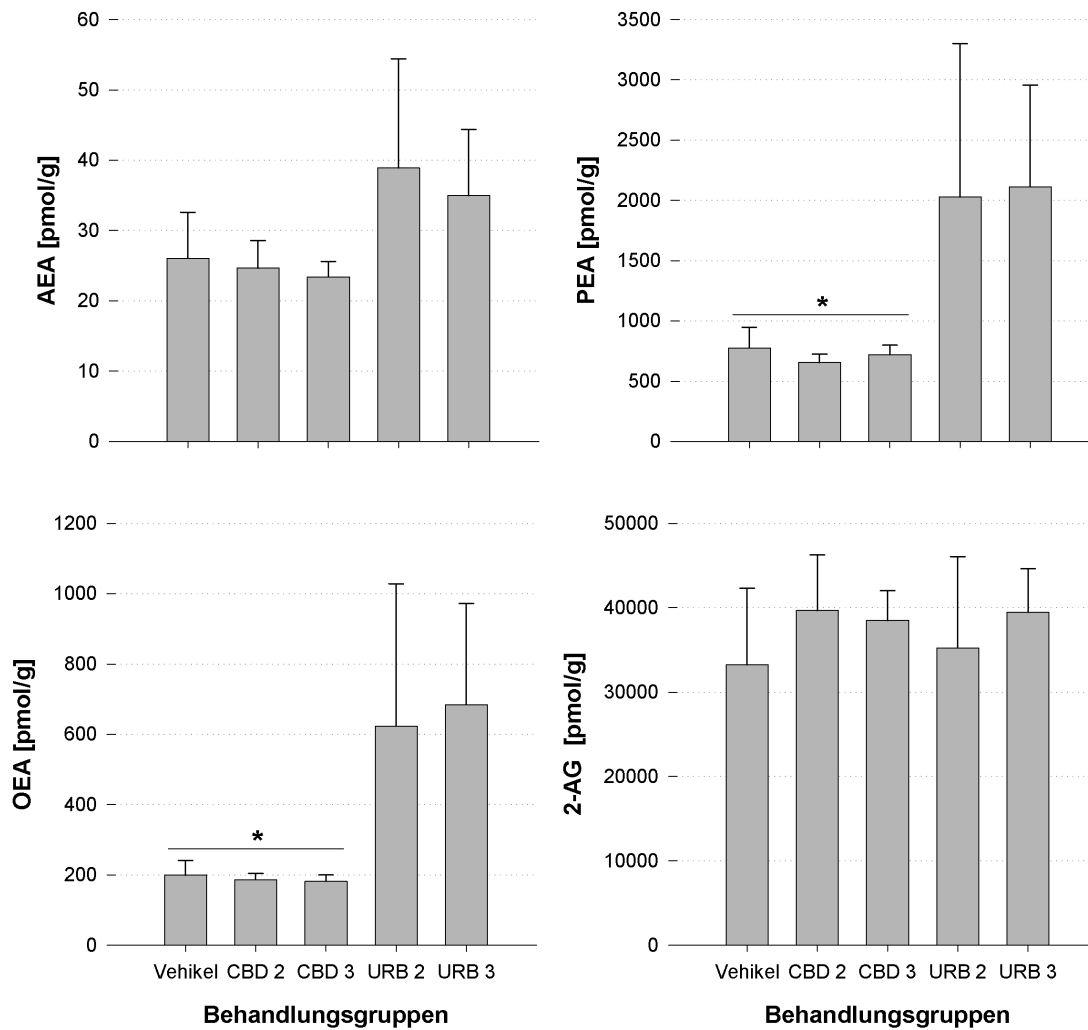


Abbildung 96: Einfluss der Behandlung und der Darreichungsform auf die Eicosanoid-Konzentration im Gehirngewebe.

Keine der verwendeten Substanzen hatte einen Einfluss auf die 2-AG Konzentration. Die Anandamid (AEA)-, PEA- und OEA-Level im Gehirngewebe erhöhten sich hingegen nach Injektion von URB in wässriger Lösung (URB 2) und URB gelöst in Sesamöl (URB 3). Dieser Anstieg war nur bezüglich PEA und OEA signifikant. Die Wirkung von CBD ließ sich nicht von der Vehikelwirkung unterscheiden.

13. Diskussion Lösungsmittelstudie

Nachdem die Resultate der Dosisstudie darauf hindeuteten, dass nicht die Dosis an sich das Problem darstellt, sondern die Bioverfügbarkeit des Δ^9 -THC, wurde eine dreiteilige Lösungsmittelstudie konzipiert. In dieser Studie wurde überprüft ob, die Darreichungsform die Wirkung von Cannabinoiden beeinflusst und ob Δ^9 -THC in einer öligen, arzneimittel-nahen Formulierung anders wirkt als in einer wässrigen Formulierung. Im ersten Teil wurde daher die akute Wirkung von Δ^9 -THC in Sesamöl sowie in zwei wässrigen Lösungsmitteln verglichen. Zudem erfolgte der direkte Vergleich mit der Wirkung des am häufigsten verwendeten synthetischen Cannabinoid WIN 55,212-2, das auch zur Etablierung der pubertären Cannabinoidbehandlung als Schizophrenie-Modell eingesetzt wurde. Im zweiten Teil wurde dann der Einfluss der Wirkdauer beleuchtet, während der dritte Teil der pharmakokinetischen Analyse diente, um herauszufinden worauf die unterschiedlichen Wirkungen beruhen und ob auch die Wirkungen von CBD und URB 597 durch das Lösungsmittel beeinflusst werden.

13.1. Teil 1

13.1.1. Motorik, Ängstlichkeit: Open Field

Während die ölige Δ^9 -THC-Formulierung erneut keinen Einfluss auf die Lokomotion hatte, wirkte Δ^9 -THC nach Applikation im wässrigen Lösungsmittel sedierend, wobei der Effekt bei Verwendung von Vehikel 1 (1% Tween in Saline) ausgeprägter war. Ein ähnlicher Effekt wurde nach Gabe von WIN 1 beobachtet. Die Tiere bewegten sich 2 h nach Injektion im Open Field weniger, liefen langsamer und betraten die innere Zone seltener. Letzteres kann aufgrund der veränderten Lokomotion nicht auf eine gesteigerte Ängstlichkeit zurückgeführt werden. Die einzige Veränderung, die nach Gabe von WIN 55,212-2 in Vehikel 2 (Ethanol-haltig) auffiel, betraf das Laufmuster. Die Lokomotion blieb im Wesentlichen unbeeinflusst (Distanz, Geschwindigkeit, Frequenz), aber die Tiere bewegten sich stärker thigmotaktisch verglichen mit den Kontrollen (Saline, Vehikel 1, 2 und 3) sowie nach THC 3-Gabe.

Somit hat die Darreichungsform von Δ^9 -THC hinsichtlich der Motorik einen deutlichen Effekt auf dessen Wirkung. Wie bereits im Rahmen der Dosisstudie (vgl. 11) diskutiert, finden sich in der Literatur einige Berichte über die sedierende Wirkung nach akuter

Gabe von bis zu 5 mg/kg Δ^9 -THC in einem wässrigen Lösungsmittel (Fernandes et al., 1974; Järbe & Hiltunen, 1987; Tseng & Craft, 2001). Dennoch wurde in einigen Studien keine Veränderung der Lokomotion beobachtet, obwohl ein wässriges Lösungsmittel verwendet wurde (Sanudo-Pena et al., 2000; Wiley et al., 2007). In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass die Wirkung von THC 2 etwas schwächer war als die von THC 1. Das könnte an der kleinen Stichprobe liegen oder aber die Zusammensetzung des wässrigen Lösungsmittels ist ebenfalls entscheidend. Dies lässt sich anhand der Daten in der Literatur allerdings nicht bestätigen. Tseng & Craft (2001) und Wiley et al. (2007) verwendeten beide das gleiche Lösungsmittel (wie Vehikel 2, doch statt Tween80, Emulphor®) und ein sehr ähnliches Versuchsprotokoll (vgl. 11.1) und kommen trotzdem zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Dennoch ist der Einfluss der Lösungsmittelzusammensetzung nicht ganz von der Hand zu weisen, da WIN 55,212-2 in Vehikel 1 wie Δ^9 -THC sedierend wirkte, bei Gabe in Vehikel 2 aber nur das thigmotaktische Bewegungsverhalten verstärkte. Die stark sedierende Wirkung von 1,2 mg/kg WIN 55,212-2 in Vehikel 1 wurde ebenfalls bei Mäusen beschrieben (Brzozka et al., 2011). Bei Ratten reduzierte die gleiche Konzentration im gleichen Vehikel die Lokomotion allerdings nicht (Drews et al., 2005; Wegener et al., 2008), wobei in einer weiteren Studie der sedierende Effekt nach Gabe von 3 mg/kg WIN 55,212-2 eintrat, während 1mg/kg wirkungslos blieb (Järbe et al., 2006). Obwohl alle genannten Studien das gleiche Lösungsmittel verwendeten, sind die Daten inkonsistent. Somit scheint die Lösungsmittelzusammensetzung nicht der alleinige Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse zu sein. Ein weiterer Grund könnte die Zeit zwischen Injektion und Testung sein. Während Wegener et al. (2008) die Motorik bereits 10 min nach Applikation testeten, wurden die Versuche in den anderen Studien nach 25-30 min durchgeführt (Järbe et al., 2006; Brzozka et al., 2011). Vielleicht entfaltet sich die sedierende Wirkung von WIN 55,212 erst nach einer längeren Wirkdauer.

Leider ließ sich WIN 55,212-2 nicht in Sesamöl lösen, so dass nicht überprüft werden konnte, ob sich die Wahl der Darreichungsform auch auf die Wirkung des synthetischen Cannabinoids auswirkt.

13.1.2. Arbeitsgedächtnis: Objekterkennung

Die sedierende Wirkung des Δ^9 -THC in den wässrigen Darreichungsformen wirkte sich im Objekterkennungstest zwar nur tendenziell auf die gesamte Explorationsdauer aus, führte aber dazu, dass die Tiere im zweiten Durchgang gar nicht oder erst nach langer Latenz ein Objekt betrachteten und nur selten bis gar nicht zwischen den Objekten wechselten. Der Diskriminierungsindex konnte nur für ein Tier berechnet werden, so dass keine Aussage über die Wirkung von Δ^9 -THC auf das Arbeitsgedächtnis getroffen werden kann. Dies wurde in der Literatur bisher kaum diskutiert. Die genannten Studien, die einen sedierenden Effekt feststellten, untersuchten neben der Lokomotion auch die antinozizeptive Wirkung, Katalepsie, Hypothermie und die Nahrungsaufnahme (Fernandes et al., 1974; Wiley et al., 2007) und führten somit keine Gedächtnistests durch. Studien, in denen das Arbeitsgedächtnis der Ratten untersucht wurde, berichten hingegen nicht von sedierenden Effekten (Ciccocioppo et al., 2002; Baek et al., 2009), auch wenn nicht immer Veränderungen der Motorik zusätzlich untersucht wurden (Nakamura et al., 1991; Mallet & Beninger, 1998; Fadda et al., 2004).

Eine Ausnahme stellt die Arbeit von Lichtman et al. (1995) dar, in der angegeben wurde, dass 92 % der Ratten nach Injektion von 5,6 mg/kg Δ^9 -THC nicht die Kriterien erfüllten, die für den Arbeitsgedächtnistest (achtarmige radiale Arena) erforderlich waren. Bei den Tieren, die die Kriterien erreichten, wurde allerdings eine erhöhte Fehlerrate beobachtet. Für die eine Ratte, die in der vorliegenden Arbeit nach Δ^9 -THC-Injektion alle Kriterien erfüllte, ergab sich allerdings ein positiver Diskriminierungsindex, so dass von einer intakten Arbeitsgedächtnisleistung ausgegangen werden muss.

Die Injektion von WIN 1 und WIN 2 resultierte in keiner Veränderung der Gedächtnisleistung im Objekterkennungstest. Allerdings mussten jeweils zwei Tiere nach den beiden WIN-Behandlungen von der Berechnung ausgeschlossen werden. Somit erfüllten nach WIN 1 und WIN 2-Behandlung jeweils 30 % der Ratten nicht die Versuchskriterien. Dies passt zu den Ergebnissen von Lichtman et al. (1995), in deren Studie 27 % der Tiere nach Applikation von 1 mg/kg WIN 55,212-2 die Kriterien nicht mehr erfüllten. Zudem war die Dosierung für eine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses nicht ausreichend. Auch in einem „delayed non-matching to position“-Versuch reduzierte 1 mg/kg WIN 55,212-2 die Gedächtnisleistung nicht (Han et al., 2000). Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine Reduktion der Gedächtnisleistung im Ob-

jekterkennungstest beobachtet (1 bzw. 1,2 mg/kg; Schneider & Koch, 2002; Baek et al., 2009). In beiden Untersuchungen war die Zeit zwischen den beiden Durchgängen mit 30 min doppelt solange wie in der vorliegenden Arbeit. Daher ist es möglich, dass Gedächtnisdefizite erst bei einer größeren zeitlichen Verzögerung zum tragen kommen.

13.1.3. Sensomotorische Hemmung: Präpulsinhibition

Trotz der lokomotorischen Defizite hatte keine Behandlung einen Einfluss auf die Amplitude der Schreckreaktion. Allerdings reduzierte THC 2 signifikant die Präpulsinhibition, wobei dieser Effekt nur gering war. Somit ist die Testung weiterer Tiere nötig um abschätzen zu können, wie stabil dieser Effekt ist. Ob THC 1 aufgrund des Lösungsmittels keine Wirkung zeigte, bleibt derzeit fraglich. Malone und Taylor (2006) konnten wie bereits diskutiert (vgl. 11.3) keine Reduktion der PPI feststellen, wenn die Ratten wie in der vorliegenden Arbeit in Gruppen gehalten werden.

Die Datenlage bezüglich der WIN 55,212-2-Wirkung auf die sensomotorische Hemmung bei Ratten ist hingegen umfangreicher. Wie in der vorliegenden Studie fanden Bortolato et al. (2005) keine reduzierte PPI nach WIN 55,212-2-Injektion (gelöst in Vehikel 1). Allerdings beobachteten sie eine signifikante Reduktion der Schreckreaktionsamplitude, die in dieser Arbeit nicht auftrat. Dem gegenüber stehen Studien, die eine verringerte PPI beobachteten (Vehikel 1; Schneider & Koch, 2002; Wegener et al., 2008; Brosda et al., 2011). Die Autoren argumentieren, dass die gegensätzlichen Ergebnisse auf die unterschiedlichen Rattenstämme (Sprague-Dawley bzw. Wistar) zurückzuführen sind und somit genetische Unterschiede die Ergebnisse beeinflussen. Dagegen spricht, dass die Injektion des synthetischen Cannabinoids CP 55,940 sowohl bei Sprague-Dawley als auch bei Wistar-Ratten zu einer signifikanten Reduktion der Schreckreaktionsamplitude führte (Mansbach et al., 1996; Martin et al., 2003), wobei nur bei den Wistar-Ratten bei einer von drei Präpuls lautstärken eine verringerte PPI beobachtet wurde (Martin et al., 2003).

Da die Studien, die eine Reduktion der PPI nach WIN 55,212-2-Applikation beobachten, alle aus der gleichen Arbeitsgruppe stammen, ist es aber auch denkbar, dass die Haltung und das Handling der Tiere eine Rolle spielt. Darauf weist die genannte Δ^9 -THC-Studie (Malone & Taylor, 2006) sowie eine Studie mit Mäusen hin, in der sich zeigte,

dass WIN 55,212-2 bei gestressten Mäusen die PPI erhöhte, während die PPI bei Kontrollmäusen unverändert blieb (Brzozka et al., 2011).

13.2. Teil 2

Im ersten Teil der Lösungsmittelstudie wurden die Ratten in Anlehnung an die Dosisstudie 2 h nach Injektion in den verschiedenen Versuchen getestet. In allen zitierten Studien wurden die Experimente allerdings früher (10-60 min nach Injektion) durchgeführt. Laut Literatur wird 15 min nach i. p. Injektion von Δ^9 -THC in einem wässrigen Lösungsmittel (vergleichbar mit Vehikel 2: statt Tween80, Cremophor®) bei männlichen Ratten im Gehirn der maximale Spiegel erreicht, der bis zu 4 h stabil bleibt (Tseng et al., 2004). Daher wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien die Δ^9 -THC-Wirkung auch nach 15 min getestet.

13.2.1. Motorik, Ängstlichkeit: Open Field

15 min nach Injektion war die sedierende Δ^9 -THC Wirkung wie sie nach 2 h beobachtet wurde, noch nicht voll ausgeprägt. Allerdings liefen die Ratten tendenziell weniger und langsamer als nach Vehikel- oder Saline-Injektion, bewegten sich verstärkt thigmotaktisch und betraten tendenziell seltener die innere Zone der Open Field-Arena. Letzteres ist auf die veränderte Lokomotion zurückzuführen.

Somit könnten unterschiedliche Ergebnisse in der Literatur auf unterschiedliche Wirkzeiten zurückzuführen sein. Dies kann aber zumindest bei den bereits genannten, gut vergleichbaren Studien von Tseng & Craft (2001) und Wiley (2007) ausgeschlossen werden, da beide Male die Untersuchung der Lokomotion 30 min nach Injektion gestartet wurde.

13.2.2. Arbeitsgedächtnis: Objekterkennung

Die tendenziell verringerte Lokomotion nach Δ^9 -THC-Gabe wirkte sich nicht auf die gesamte Explorationsdauer im Objekterkennungstest aus, führte aber zu einer signifikanten Erhöhung der Latenzzeit und Reduktion der Objektwechselfrequenz. Zudem konnte nur für jeweils eine Ratte der Diskriminierungsindex ermittelt werden, da alle anderen im zweiten Durchgang nur das Objekt aktiv explorierten, das sie zuerst erreichten. Das heißt auch wenn die Lokomotion nach 15 min noch nicht vollständig ge-

stört ist, lassen sich mit den Tieren keine kognitiven Tests durchführen, deren Ergebnisse durch die Motorik beeinflusst werden.

13.2.3. Sensomotorische Hemmung: Präpulsinhibition

Die Amplitude der Schreckreaktion wurde auch nach 15 min nicht durch die Δ^9 -THC-Gabe beeinflusst. Zudem blieb nach der kürzeren Wirkdauer auch die Reduktion der PPI durch THC 2 aus. Somit scheint die Zeit zwischen Injektion und Testung einen Einfluss auf die sensomotorische Hemmung zu haben. Der fehlende Δ^9 -THC-Effekt in der Studie von Malone & Taylor (2006) kann damit allerdings nicht eindeutig in Zusammenhang gebracht werden, da die Testung 45 min nach Injektion erfolgte und somit zwischen den beiden Testzeitpunkten lag, die in der Arbeit untersucht wurden.

Auch die unterschiedlichen Ergebnisse der WIN 55,212-2-Studien (alle verwendeten Vehikel 1) können mit der Wirkdauer nicht erklärt werden, da Bortolato et al. (2005) die Ratten 30 min nach Injektion untersuchten und keine Veränderung der PPI fanden, während in den anderen Studien eine Reduktion der PPI bereits nach 10 min auftrat (Schneider & Koch, 2002; Wegener et al., 2008; Brosda et al., 2011).

13.3. Teil 3

Der Einfluss der Darreichungsform auf die Δ^9 -THC-Wirkung deutet darauf hin, dass die Kinetik eine wichtige Rolle spielt. Es bleibt die Frage, wodurch die unterschiedliche Wirksamkeit genau bedingt wird und ob nicht nur die Wirksamkeit von Δ^9 -THC sondern auch die von CBD und URB 597 durch die Art des Lösungsmittels beeinflusst wird.

13.3.1. Bioverfügbarkeit der Cannabinoide

Die injizierten Substanzen schienen nicht immer das Gehirn zu erreichen, obwohl stets die gesamte Injektionslösung appliziert wurde. Wenn man davon ausgeht, dass die Detektionsmethode reproduzierbar funktionierte, bedeutet dies, dass die intraperitoneale Injektion keine stabilen Ergebnisse liefert. Tatsächlich wurde eine Fehlerquote von 10-20 % in der Literatur beschrieben (Gaines Das & North, 2007), was auch die recht hohen Standardabweichungen in den Verhaltensversuchen erklärt. Im ersten Teil der Lösungsmittelstudie wird dies besonders deutlich, da sich nach THC 2-Injektion ein Tier wie nach Saline-Gabe verhielt und somit laut statistischer Analyse keine signifikan-

ten Verhaltensveränderungen vorlagen, obwohl die anderen Tiere nach Behandlung deutlich motorisch beeinträchtigt waren.

Betrachtet man die Tiere, bei denen Δ^9 -THC oder CBD im Gehirn nachgewiesen werden konnte, so zeigt sich, dass nach 2 h die Substanzmengen im Gehirngewebe vergleichbar sind, unabhängig davon, welche Formulierung verwendet wurde. Somit sind die Diskrepanzen in der Δ^9 -THC-Wirkung auf das Verhalten nicht damit zu erklären, dass die Verwendung des Sesamöls zu einer geringeren Endkonzentration im Gehirn führte und somit weniger Rezeptoren aktiviert werden.

Die beiden Darreichungsformen unterschieden sich allerdings in ihrer Kinetik. Bei Verwendung eines wässrigen Vehikels wurde bereits nach 15 min die maximale Konzentration erreicht. Dies entspricht der Literatur (Tseng et al., 2004).

Somit scheint für die sedierende Wirkung des Δ^9 -THC eine schnelle Kinetik erforderlich zu sein. Dass die Kinetik für die Wirkung einer Substanz entscheidend ist, zeigten auch Untersuchungen, die sich mit der Wirkung von Drogen auf das Belohnungssystem beschäftigten. Eine schnelle Änderung der Dopaminausschüttung bedingt durch einen sehr steilen Anstieg der Substanzspiegel im Blut hat einen stärker subjektiv belohnenden Effekt als eine langsame Änderung (Grace, 2000; Volkow & Swanson, 2003). Eine mögliche Erklärung ist, dass bei einer kontinuierlichen Steigerung der Cannabinoidkonzentration im Gehirngewebe ein Toleranzeffekt eintritt, der aus Desensitivierungsmechanismen, wie zum Beispiel der Internalisierung von CB_1 -Rezeptoren, resultiert (vgl. 1.3.2).

Obwohl sich der Δ^9 -THC-Spiegel nach 15 min nicht von dem nach 2 h unterschied, war die sedierende Wirkung zum späteren Zeitpunkt deutlich ausgeprägter. Somit führt die längere Wirkdauer am Rezeptor auch zu einer stärkeren Verhaltensänderung.

Zudem zeigte die Analyse, dass die Bioverfügbarkeit beider Cannabinoide (Δ^9 -THC, CBD) vergleichbar ist. Beide Moleküle scheinen also gleichermaßen metabolisiert zu werden, bevor sie das Gehirn erreichen. Dies zeigt sich auch im Vergleich humaner Plasmaprofile: die CBD und Δ^9 -THC-Spiegel sinken direkt nach Injektion sehr schnell und nehmen dann langsamer ab (Chiang & Rapaka, 1987).

13.3.2. Beeinflussung der Eicosanoid-Konzentrationen durch unterschiedliche Darreichungsformen von URB 597 und CBD

Die Wirkung von URB 597 wird nicht durch die Darreichungsform beeinflusst. Die Erhöhung der Eicosanoid-Konzentrationen war bei beiden Lösungsmitteln identisch. Somit wird die Inhibition des Hydrolyse-Enzyms FAAH nicht durch die Kinetik reguliert. Die kontinuierlich steigende Eicosanoid-Konzentration scheint also nicht über einen Rückkopplungs-Mechanismus zu einer erhöhten Synthese des FAAH-Enzyms zu führen. Auch die Wirkung von CBD kann in der eingesetzten Konzentration durch ein wässriges Lösungsmittel nicht verbessert werden. In einer zukünftigen Studie sollte allerdings überprüft werden, ob dies auch bei einer höheren Konzentration nicht der Fall ist, da wie bereits diskutiert die eingesetzte CBD-Dosis zu gering war (vgl. 7.2), so dass der im Gehirngewebe nachgewiesene CBD-Spiegel unterhalb der für eine FAAH-Inhibition erforderlichen Konzentration lag. Da die Wirkung von URB 597 auf die Eicosanoid-Konzentrationen nicht durch die Darreichungsform beeinflusst wird, sollte dies allerdings auch nicht bei einer höheren CBD-Dosierung auftreten.

An dieser Stelle muss allerdings die Frage, ob sich eine schnellere Erhöhung der Eicosanoid-Konzentration auf das Verhalten der Ratten niederschlägt, unbeantwortet bleiben. Theoretisch wäre es möglich, dass der langsamere Anstieg von Anandamid bei Verwendung von Sesamöl ebenfalls zu einer CB₁-Rezeptorinternalisierung führt und somit Verhaltenseffekte abgemildert werden. Wie bereits ausführlich diskutiert wurden in der Literatur ausschließlich wässrige Lösungsmittel verwendet und es konnte keine Wirkung auf die Motorik festgestellt werden. Die anxiolytische Wirkung von URB 597 scheint durch die Testsituation und das Handling der Tiere beeinflusst zu werden. Allerdings wurden im Gegensatz zur vorliegenden Studie teilweise Gedächtnisdefizite nach Anandamid und URB 597-Gabe beobachtet, die eventuell durch einen schnellen Anstieg der Anandamidkonzentration ausgelöst werden könnten.

13.4. Fazit

Die Lösungsmittelstudie zeigte, dass die Darreichungsform die Wirkung von Δ^9 -THC auf das Verhalten der Ratten deutlich beeinflusst. Während bei der Verwendung einer öligen arzneimittelnahen Formulierung keine signifikanten Verhaltensänderungen beobachtet wurden, resultierte die Δ^9 -THC-Gabe in einem wässrigen Lösungsmittel vor

allem in einer starken Sedierung. Diese machte die Analyse des Arbeitsgedächtnisses unmöglich. Trotz der sedierenden Wirkung wurde die akustische Schreckreaktion sowie die sensomotorische Hemmung nicht deutlich beeinflusst, auch wenn Δ^9 -THC in einem der wässrigen Lösungsmittel eine leichte aber signifikante PPI-Reduktion hervorrief. Obwohl nach 15 min bereits im Gehirn die maximale Δ^9 -THC-Konzentration erreicht wurde, waren die Verhaltenseffekte noch nicht so deutlich ausgeprägt, was darauf schließen lässt, dass die Dauer der Rezeptoraktivierung durchaus die Verhaltensdefizite moduliert. Da die Endkonzentration im Gehirngewebe unabhängig von der Darreichungsform war, kann davon ausgegangen werden, dass die schnellere Kinetik bei der wässrigen Darreichung die unterschiedlichen Resultate bedingt. Grundlage hierfür könnte sein, dass keine Desensitivierungsmechanismen aktiviert werden. Es ist somit möglich, dass pubertäre Δ^9 -THC-Behandlung zu langfristigen Verhaltensdefiziten führt, wenn den Tieren eine wässrige Formulierung appliziert wird. Dies sollte in einer zukünftigen Studie überprüft werden.

Die Wirkung von CBD und URB 597 auf die Eicosanoidkonzentrationen kann hingegen nicht durch eine veränderte Pharmakokinetik beeinflusst werden.

14. Abschließende allgemeine Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Verhaltens-PET eine geeignete Methode ist, um neuronale Vorgänge während eines Verhaltensversuchs darzustellen. Die Kombination der Präpulsinhibitions (PPI)-Testung mit einer PET-Untersuchung demonstrierte zudem, dass Verhaltens-PET eine gute Ergänzung zu bisherigen Läsionsstudien ist. Außerdem konnte die Beteiligung einiger aufgrund dieser invasiven Methoden postulierten Gehirnareale an der Vermittlung der akustischen Schreckreaktion und der PPI bestätigt werden. Zudem zeigte sich, dass der *Nucleus cuneiformis* eine zentrale Rolle spielt, eine Struktur die bislang wenig beachtet wurde und an die Areale angrenzt, die bisher mit der PPI-Vermittlung in Verbindung gebracht wurden. Die Durchführung der PPI-PET-Messung wird in einer Folgestudie weiter optimiert, um die hier gezeigten Ergebnisse zu untermauern. Zudem sind weitere Studien geplant, um den Einblick in die Modulationsmechanismen der PPI zu vertiefen.

Die PPI-PET-Studie verdeutlichte weiterhin, wie wichtig es ist, bei der Durchführung akustischer Verhaltensversuche vor Beginn der Studie Hörtests durchzuführen. Die Hörschwellen der Ratten können sich in Abhängigkeit vom Rattenstamm und eventuell auch vom Züchter beträchtlich unterscheiden und wirken sich deutlich auf die Stärke der PPI aus. Dies erklärt sicherlich auch einige der diskrepanten Ergebnisse zum Ausmaß der PPI, die in der Literatur zu finden sind.

Außerdem liefern die grundlegenden Verhaltens-PET-Untersuchungen die Basis für die Untersuchung metabolischer Veränderungen nach Modulation des Endocannabinoidsystems der Ratte. Kennt man die neuronalen Strukturen, die bei unbehandelten Tieren bei der Vermittlung der akustischen Schreckreaktion und der PPI sowie der Modulation der PPI involviert sind, so ist es möglich zu überprüfen, ob eine Behandlung zu relevanten Veränderungen der Glukoseutilisation des wachen, sich verhaltenden Tieres führt. Dies liefert neue Einblicke in die Wirkweise des Endocannabinoidsystems. Zum Zeitpunkt der CBD-URB-Studie war diese Methodik noch nicht ausgereift. In einer zukünftigen Studie sollte die Wirkung von CBD auf den zerebralen Glukosemetabolismus überprüft werden, da es Hinweise gibt, dass Cannabidiol die Glukoseutilisation steigern kann (Brett et al., 2006). Allerdings muss die dann eingesetzte CBD-Dosis deutlich erhöht werden. Obwohl die in der CBD-URB-Studie verwendete Dosierung an

die bei Menschen verwendete Dosis angepasst war, wurde im Gehirngewebe der Ratten nicht die Konzentration erreicht, die *in vitro* nötig war, um eine Inhibition des Hydrolyse-Enzyms FAAH zu erreichen.

Die metabolischen Untersuchungen (PPI-PET) nach pubertärer Δ^9 -THC-Behandlung ergaben keinen weiteren Aufschluss über die Wirkung des Cannabinoids auf den zerebralen Glukosemetabolismus, da die Behandlung, wie sich auch in den Verhaltenstestungen zeigte, insgesamt wirkungslos blieb. Die Ergebnisse der Dosis- und Lösungsmittelstudie deuten darauf hin, dass nicht die gewählte Dosierung problematisch war, sondern die langsame Anflutung von Δ^9 -THC bei Verwendung der öligen Darreichungsform. Es ist denkbar, dass die langsamere Kinetik die CB₁-Rezeptorinternalisierung begünstigt und somit zu einer Toleranzentwicklung beiträgt.

Wie die inkonsistenten Daten in der Literatur zeigen, ist aber das Lösungsmittel nicht der einzige Faktor, der die akute und chronische Wirkung von Cannabinoiden beeinflusst. Weitere entscheidende Einflussfaktoren scheinen die Haltung, das Handling der Tiere und damit einhergehend auch stressauslösende, experimentelle Bedingungen zu sein. Dies wurde allerdings bisher nicht systematisch untersucht. Malone & Taylor (2006) zeigten, dass die akute Gabe von Δ^9 -THC nur bei sozial isoliert gehaltenen Tieren die PPI reduzierte, und Brzozka et al. (2011) berichteten, dass die Wirkung von WIN 55,212-2 bei Mäusen, die sozialem Stress ausgesetzt wurden, ausgeprägter ist. Dem gegenüber stehen allerdings einige Studien, die auch bei in Gruppen gehaltenen Tieren, die keinem speziellen Stressmodell ausgesetzt wurden, akute und chronische Cannabinoideffekte beobachteten (vgl. 9, 11 und 13).

Wie aus einer systematischen Untersuchung der anxiolytischen URB 597-Wirkung hervorging, beeinflussen die Faktoren Handling und Stress auch die Auswirkungen eines hochregulierten Endocannabinoidsystems. Ein erhöhter Anandamid-Spiegel kann zwar induzierte Angst reduzieren, wirkt aber per se nicht anxiolytisch (Haller et al., 2009). Dies weist, wie schon die Untersuchungen der Anandamid-Spiegel bei Patienten in der Prodromalphase (Koethe et al., 2009) und Patienten mit einer erstmanifesten paranoiden Psychose (Leweke et al., 1999a; Giuffrida et al., 2004), darauf hin, dass das Endocannabinoidsystem ein regulierendes, protektiv wirkendes System ist.

Eine weiterer Faktor könnte der Rattenstamm und somit eine genetische Komponente sein. Bisher wurde dies aber noch nicht systematisch untersucht. Zwar zeigten verglei-

chende Studien, dass in Abhängigkeit vom Rattenstamm die PPI unterschiedlich stark pharmakologisch manipuliert werden kann (van den Buuse, 2003; Swerdlow et al., 2004a; Swerdlow et al., 2004b; Swerdlow et al., 2007) und die Ängstlichkeit durch Gabe eines synthetischen Cannabinoids unterschiedlich moduliert wird (Arnold et al., 2010), aber die genetischen Unterschiede, die dazu führen, wurden noch nicht betrachtet. Daher wäre es interessant zu untersuchen, wie sich die verschiedenen Rattenstämme bezüglich der mit dem Endocannabinoidsystem assoziierten Gene unterscheiden, die z.B. für die CB₁-Rezeptoren, die Synthesenzyme, FAAH, FLAT, etc. kodieren.

Trotzdem muss auch bezüglich des Rattenstammes festgehalten werden, dass akute und chronische Cannabinoideffekte bei verschiedenen Rattenstämmen (u.a. Lister hooded-, Wistar-, Lewis-, Sprague-Dawley-Ratten) beobachtet wurden, so dass man zunächst nicht davon ausgehen kann, dass ein bestimmter Rattenstamm völlig insensitive gegenüber einer Cannabinoidbehandlung ist.

Die vielen verschiedenen, teilweise widersprüchlichen Daten in der Literatur zeigen, wie wichtig standardisierte Bedingungen sind, um ein gutes, reproduzierbares Tiermodell zu etablieren. Dazu gehören nicht nur sämtliche Haltungs-, sondern auch die experimentellen Bedingungen. Gerade im Bereich der besonders anspruchsvollen Tiermodelle für psychiatrische Erkrankungen, wie hier die Schizophrenie, ist noch viel Arbeit nötig. Auch wenn es bisher noch nicht gelungen ist, ein verlässliches Modell der chronischen adoleszenten Cannabinoidbehandlung zu etablieren, liefern die Untersuchungen dennoch zahlreiche Hinweise, die das Verständnis der Wirkweise und der Rolle des Endocannabinoidsystems verbessern.

15. Literatur

- Abush, H., Akirav, I., 2012. Short- and long-term cognitive effects of chronic cannabinoids administration in late-adolescence rats. *PLoS ONE*. 7, e31731.
- Adams, R., 1940. *Marihuana Science*. 92, 115-119.
- Adams, R., Baker, B.R., 1940. Structure of Cannabidiol. VII. A method of synthesis of a tetrahydrocannabinol which possesses marihuana activity. *Journal of the American Chemical Society*. 62, 2405-2408.
- Adams, R., Hunt, M., Clark, J.H., 1940a. Structure of Cannabidiol, a Product Isolated from the Marihuana Extract of Minnesota Wild Hemp. I. *Journal of the American Chemical Society*. 62, 196-200.
- Adams, R., Loewe, S., Pease, D.C., Cain, C.K., Wearn, R.B., Baker, R.B., Wolff, H., 1940b. Structure of Cannabidiol. VIII. Position of the double bonds in cannabidiol. Marihuana activity of tetrahydrocannabinols. *Journal of the American Chemical Society*. 62, 2566-2567.
- Adams, R., Pease, D.C., Cain, C.K., Clark, J.H., 1940c. Structure of Cannabidiol. VI. Isomerization of Cannabidiol to Tetrahydrocannabinol, a Physiologically Active Product. Conversion of Cannabidiol to Cannabinol. *Journal of the American Chemical Society*. 62, 2402-2405.
- Adams, R., Wolff, H., Cain, C.K., Clark, J.H., 1940d. Structure of Cannabidiol. V. Position of the Alicyclic Double Bonds. *Journal of the American Chemical Society*. 62, 2215-2219.
- Andreasson, S., Allebeck, P., Engstrom, A., Rydberg, U., 1987. Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of Swedish conscripts. *Lancet*. 2, 1483-6.
- Antle, M.C., Mistlberger, R.E., 2005. Circadian Rhythms. In *The Behavior of the Laboratory Rat. A Handbook with Tests.*, Vol., I.Q. Whishaw, B. Kolb, ed. eds. Oxford University Press, pp. 183-194.
- Appendino, G., Ligresti, A., Minassi, A., Cascio, M.G., Allara, M., Tagliabatella-Scafati, O., Pertwee, R.G., De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2009. Conformationally constrained fatty acid ethanolamides as cannabinoid and vanilloid receptor probes. *J Med Chem*. 52, 3001-9.
- Arndt, S., Cizadlo, T., O'Leary, D., Gold, S., Andreasen, N.C., 1996. Normalizing counts and cerebral blood flow intensity in functional imaging studies of the human brain. *Neuroimage*. 3, 175-184.
- Arnold, J.C., Dielenberg, R.A., McGregor, I.S., 2010. Cannabinoids increase conditioned ultrasonic vocalisations and cat odour avoidance in rats: strain differences in drug-induced anxiety. *Life Sci*. 87, 572-8.
- Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A., Moffitt, T.E., 2002. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *Bmj*. 325, 1212-3.
- Arseneault, L., Cannon, M., Witton, J., Murray, R.M., 2004. Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry*. 184, 110-117.
- Avni, R., Zadicario, P., Eilam, D., 2006. Exploration in a dark open field: a shift from directional to positional progression and a proposed model of acquiring spatial information. *Behav Brain Res*. 171, 313-23.

- Backoff, P.M., Caspary, D.M., 1994. Age-related changes in auditory brainstem responses in Fischer 344 rats: effects of rate and intensity. *Hear Res.* 73, 163-72.
- Baek, J., Zheng, Y., Darlington, C.L., Smith, P.F., 2009. The CB1 receptor agonist, WIN 55,212-2, dose-dependently disrupts object recognition memory in adult rats. *Neurosci Lett.* 464, 71-3.
- Bass, C.E., Martin, B.R., 2000. Time course for the induction and maintenance of tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Drug Alcohol Depend.* 60, 113-9.
- Beltramo, M., Stella, N., Calignano, A., Lin, S.Y., Makriyannis, A., Piomelli, D., 1997. Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science.* 277, 1094-7.
- Beltramo, M., de Fonseca, F.R., Navarro, M., Calignano, A., Gorriti, M.A., Grammatikopoulos, G., Sadile, A.G., Giuffrida, A., Piomelli, D., 2000. Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci.* 20, 3401-7.
- Beltramo, M., Piomelli, D., 2000. Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol. *NeuroReport.* 11, 1231-5.
- Belue, R.C., Howlett, A.C., Westlake, T.M., Hutchings, D.E., 1995. The ontogeny of cannabinoid receptors in the brain of postnatal and aging rats. *Neurotoxicol Teratol.* 17, 25-30.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* 57, 289-300.
- Bentivoglio, M., van der Kooy, D., Kuypers, H.G., 1979. The organization of the efferent projections of the substantia nigra in the rat. A retrograde fluorescent double labeling study. *Brain Res.* 174, 1-17.
- Bessell, E.M., Foster, A.B., Westwood, J.H., 1972. The use of deoxyfluoro-D-glucopyranoses and related compounds in a study of yeast hexokinase specificity. *Biochem J.* 128, 199-204.
- Bhattacharyya, S., Fusar-Poli, P., Borgwardt, S., Martin-Santos, R., Nosarti, C., O'Carroll, C., Allen, P., Seal, M.L., Fletcher, P.C., Crippa, J.A., Giampietro, V., Mechelli, A., Atakan, Z., McGuire, P., 2009. Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis. *Arch Gen Psychiatry.* 66, 442-51.
- Bhattacharyya, S., Morrison, P.D., Fusar-Poli, P., Martin-Santos, R., Borgwardt, S., Winton-Brown, T., Nosarti, C., CM, O.C., Seal, M., Allen, P., Mehta, M.A., Stone, J.M., Tunstall, N., Giampietro, V., Kapur, S., Murray, R.M., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Atakan, Z., McGuire, P.K., 2010. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology.* 35, 764-74.
- Bhugra, D., 2005. The global prevalence of schizophrenia. *PLoS Med.* 2, e151; quiz e175.
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V., 2001a. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and

- on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 134, 845-52.
- Bisogno, T., Maccarrone, M., De Petrocellis, L., Jarrhian, A., Finazzi-Agro, A., Hillard, C., Di Marzo, V., 2001b. The uptake by cells of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous agonist of cannabinoid receptors. *Eur J Biochem.* 268, 1982-9.
- Bland, J.M., Altman, D.G., 2009. Analysis of continuous data from small samples. *Bmj.* 338, a3166.
- Boksa, P., 2007. Of rats and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 32, 8-10.
- Bortolato, M., Aru, G.N., Frau, R., Orru, M., Luckey, G.C., Boi, G., Gessa, G.L., 2005. The CB receptor agonist WIN 55,212-2 fails to elicit disruption of prepulse inhibition of the startle in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl).* 177, 264-71.
- Bortolato, M., Campolongo, P., Mangieri, R.A., Scattoni, M.L., Frau, R., Trezza, V., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Gessa, G.L., Cuomo, V., Piomelli, D., 2006. Anxiolytic-like properties of the anandamide transport inhibitor AM404. *Neuropsychopharmacology.* 31, 2652-9.
- Bosier, B., Muccioli, G.G., Hermans, E., Lambert, D.M., 2010. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol.* 80, 1-12.
- Brandt-Lassen, R., Lund, S.P., Jepsen, G.B., 2000. Rats exposed to Toluene and Noise may develop Loss of Auditory Sensitivity due to Synergistic Interaction. *Noise Health.* 3, 33-44.
- Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E., Vogt, L.J., Sim-Selley, L.J., 1999. Chronic delta9-tetrahydrocannabinol treatment produces a time-dependent loss of cannabinoid receptors and cannabinoid receptor-activated G proteins in rat brain. *J Neurochem.* 73, 2447-59.
- Breivogel, C.S., Griffin, G., Di Marzo, V., Martin, B.R., 2001. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol.* 60, 155-63.
- Brett, R., MacKenzie, F., Pratt, J., 2001. Δ 9-tetrahydrocannabinol-induced alterations in limbic system glucose use in the rat. *Neuroreport.* 12, 3573-3577.
- Brett, R.R., Allison, C., Pratt, J.A., 2006. Mapping cannabidiol-induced alterations in regional brain activity in the rat by [14 C] 2-deoxyglucose imaging and immediate early gene expression. In *SFN Vol.*, ed. ^eds., Atlanta.
- Bridges, C.D., 1959. Visual pigments of some common laboratory mammals. *Nature.* 184(Suppl 22), 1727-8.
- Brillaud, E., Morillion, D., de Seze, R., 2005. Modest environmental enrichment: effect on a radial maze validation and well being of rats. *Brain Res.* 1054, 174-82.
- Brosda, J., Hayn, L., Klein, C., Koch, M., Meyer, C., Schallhorn, R., Wegener, N., 2011. Pharmacological and parametrical investigation of prepulse inhibition of startle and prepulse elicited reactions in Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 99, 22-8.
- Brown, A.S., 2011. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol.* 93, 23-58.
- Brzozka, M.M., Fischer, A., Falkai, P., Havemann-Reinecke, U., 2011. Acute treatment with cannabinoid receptor agonist WIN55212.2 improves prepulse inhibition in psychosocially stressed mice. *Behavioural Brain Research.* 218, 280-7.
- Burkard, R., 1984. Sound pressure level measurement and spectral analysis of brief acoustic transients. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 57, 83-91.

- Burkard, R., 2006. Calibration of acoustic transients. *Brain Res.* 1091, 27-31.
- 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, 3934-42.
- Cannon, M., Jones, P., 1996. Schizophrenia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 60, 604-13.
- Cannon, T.D., Keller, M.C., 2006. Endophenotypes in the genetic analyses of mental disorders. *Annu Rev Clin Psychol.* 2, 267-90.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., 1963. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on formation of 3Methoxytyramine and Normetanephrine in mouse brain. . *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 20, 140-4.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Behav Physiol.* 29, 1193-1205.
- Caspi, A., Moffitt, T.E., Cannon, M., McClay, J., Murray, R., Harrington, H., Taylor, A., Arseneault, L., Williams, B., Braithwaite, A., Poulton, R., Craig, I.W., 2005. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry.* 57, 1117-27.
- Caspi, A., Moffitt, T.E., 2006. Gene-environment interactions in psychiatry: joining forces with neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 7, 583-90.
- Ceccarini, J., De Hert, M., Van Winkel, R., Peuskens, J., Bormanns, G., Kranaster, L., Koethe, D., Leweke, F.M., Van Laere, K., 2012. In vivo PET imaging of Cerebral Type 1 Cannabinoid Receptor in Patients with Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* In press.
- Cha, Y.M., White, A.M., Kuhn, C.M., Wilson, W.A., Swartzwelder, H.S., 2006. Differential effects of delta9-THC on learning in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 83, 448-55.
- Chavez, A.E., Chiu, C.Q., Castillo, P.E., 2010. TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 13, 1511-8.
- Cherry, S., 2001. Fundamentals of positron emission tomography and applications in preclinical drug development. *The Journal of Clinical Pharmacology.* 41, 482-491.
- Chiang, C.N., Rapaka, R.S., 1987. Pharmacokinetics and disposition of cannabinoids. *NIDA Res Monogr.* 79, 173-88.
- Ciccocioppo, R., Antonelli, L., Biondini, M., Perfumi, M., Pompei, P., Massi, M., 2002. Memory impairment following combined exposure to delta(9)-tetrahydrocannabinol and ethanol in rats. *Eur J Pharmacol.* 449, 245-52.
- Cippitelli, A., Cannella, N., Braconi, S., Duranti, A., Tontini, A., Bilbao, A., Defonseca, F.R., Piomelli, D., Ciccocioppo, R., 2008. Increase of brain endocannabinoid anandamide levels by FAAH inhibition and alcohol abuse behaviours in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 198, 449-60.
- Crane, P.D., Pardridge, W.M., Braun, L.D., Oldendorf, W.H., 1983. Kinetics of transport and phosphorylation of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rat brain. *J Neurochem.* 40, 160-7.

- Cravatt, B.F., Giang, D.K., Mayfield, S.P., Boger, D.L., Lerner, R.A., Gilula, N.B., 1996. Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*. 384, 83-7.
- D'Souza, D.C., Perry, E., MacDougall, L., Ammerman, Y., Cooper, T., Wu, Y.T., Braley, G., Gueorguieva, R., Krystal, J.H., 2004. The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis. *Neuropsychopharmacology*. 29, 1558-72.
- D'Souza, D.C., Abi-Saab, W.M., Madonick, S., Forselius-Bielen, K., Doersch, A., Braley, G., Gueorguieva, R., Cooper, T.B., Krystal, J.H., 2005. Delta-9-tetrahydrocannabinol effects in schizophrenia: implications for cognition, psychosis, and addiction. *Biol Psychiatry*. 57, 594-608.
- Davis, K.L., Kahn, R.S., Ko, G., Davidson, M., 1991. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am J Psychiatry*. 148, 1474-86.
- de Meijer, E.P., Bagatta, M., Carboni, A., Crucitti, P., Moliterni, V.M., Ranalli, P., Mandolino, G., 2003. The inheritance of chemical phenotype in *Cannabis sativa* L. *Genetics*. 163, 335-46.
- de Meijer, E.P.M., van der Kamp, H.J., van Eeuwijk, F.A., 1992. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. *Euphytica*. 62, 187-200.
- De Petrocellis, L., Di Marzo, V., 2010. Non-CB1, non-CB2 receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *J Neuroimmune Pharmacol*. 5, 103-21.
- Dean, B., Sundram, S., Bradbury, R., Scarr, E., Copolov, D., 2001. Studies on [³H]CP-55940 Binding in the Human Central Nervous System: Regional Specific Changes in Density of Cannabinoid-1 Receptors Associated With Schizophrenia and Cannabis Use. *Neuroscience* 103, 9-15.
- Dean, P., Redgrave, P., Westby, G.W., 1989. Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends Neurosci*. 12, 137-47.
- Devane, W.A., Dysarz, F.A., Johnson, M.R., Melvin, L.S., Howlett, A.C., 1988. Determination and Characterization of a Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Mol Pharmacol*. 34, 605-613.
- Devane, W.A., Hanus, L., Breuer, A., Pertwee, R.G., Stevenson, L.A., 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, 1946-9.
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J.C., Piomelli, D., 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372, 686-91.
- Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L., 1998. Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 21, 521-8.
- Di Marzo, V., Berrendero, F., Bisogno, T., Gonzalez, S., Cavaliere, P., Romero, J., Cebeira, M., Ramos, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., 2000. Enhancement of anandamide formation in the limbic forebrain and reduction of endocannabinoid contents in the striatum of delta9-tetrahydrocannabinol-tolerant rats. *J Neurochem*. 74, 1627-35.

- Diederich, K., Koch, M., 2005. Role of the pedunculo-pontine tegmental nucleus in sensorimotor gating and reward-related behavior in rats. *Psychopharmacology*. 179, 402-408.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 2001. "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience*. 104, 1085-97.
- Dinh, T.P., Carpenter, D., Leslie, F.M., Freund, T.F., Katona, I., Sensi, S.L., Kathuria, S., Piomelli, D., 2002. Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 10819-24.
- Drai, D., Benjamini, Y., Golani, I., 2000. Statistical discrimination of natural modes of motion in rat exploratory behavior. *J Neurosci Methods*. 96, 119-31.
- Drews, E., Schneider, M., Koch, M., 2005. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 80, 145-50.
- Egerton, A., Brett, R.R., Pratt, J.A., 2005. Acute Δ 9-Tetrahydrocannabinol-Induced Deficits in Reversal Learning: Neural Correlates of Affective Inflexibility. *Neuropsychopharmacology*. 30, 1895-1905.
- Egertova, M., Giang, D.K., Cravatt, B.F., Elphick, M.R., 1998. A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci*. 265, 2081-5.
- Egertova, M., Elphick, M.R., 2000. Localisation of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J Comp Neurol*. 422, 159-71.
- Egertova, M., Cravatt, B.F., Elphick, M.R., 2003. Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Neuroscience*. 119, 481-96.
- Eggen, S.M., Hashimoto, T., Lewis, D.A., 2008. Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 65, 772-84.
- Eilam, D., Golani, I., 1989. Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behav Brain Res*. 34, 199-211.
- ElBatsh, M.M., Assareh, N., Marsden, C.A., Kendall, D.A., 2011. Anxiogenic-like effects of chronic cannabidiol administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Elsohly, M.A., Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci*. 78, 539-48.
- Emrich, H.M., Leweke, F.M., Schneider, U., 1997. Towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia: cognitive impairments due to dysregulation of the endogenous cannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav*. 56, 803-7.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31, 47-59.
- Ennaceur, A., Cavoy, A., Costa, J.-C., Delacour, J., 1989. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: effects of piracetam und pramiracetam. *Behav Brain Res*. 33, 197-207.
- Ennaceur, A., Meliani, K., 1992. A new one trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav Brain Res*. 51, 83-92.

- Ennaceur, A., Neave, N., Aggleton, J.P., 1997. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res.* 113, 509-519.
- Fadda, P., Robinson, L., Fratta, W., Pertwee, R.G., Riedel, G., 2004. Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats. *Neuropharmacology.* 47, 1170-9.
- Fankhauser, M., 2004. Cannabis in der westlichen Medizin. In *Cannabis und Cannabinoide*. Vol. 2, F. Grotenhermen, ed. eds. Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, pp. 57-71.
- Fegley, D., Gaetani, S., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., Piomelli, D., 2005. Characterization of the fatty acid amide hydrolase inhibitor cyclohexyl carbamic acid 3'-carbamoyl-biphenyl-3-yl ester (URB597): effects on anandamide and oleoylethanolamide deactivation. *J Pharmacol Exp Ther.* 313, 352-8.
- Felder, C.C., Nielsen, A., Briley, E.M., Palkovits, M., Priller, J., Axelrod, J., Nguyen, D.N., Richardson, J.M., Riggan, R.M., Koppel, G.A., Paul, S.M., Becker, G.W., 1996. Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett.* 393, 231-5.
- Fendt, M., Koch, M., Schnitzler, H.U., 1994. Sensorimotor gating deficit after lesions of the superior colliculus. *NeuroReport.* 5, 1725-8.
- Fendt, M., 1999. Enhancement of prepulse inhibition after blockade of GABA activity within the superior colliculus. *Brain Res.* 833, 81-5.
- Fendt, M., Li, L., Yeomans, J.S., 2001. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl).* 156, 216-24.
- Fergusson, D.M., Horwood, L.J., Swain-Campbell, N.R., 2003. Cannabis dependence and psychotic symptoms in young people. *Psychol Med.* 33, 15-21.
- Fernandes, M., Schabarek, A., Coper, H., Hill, R., 1974. Modification of delta9-THC-actions by cannabinal and cannabidiol in the rat. *Psychopharmacologia.* 38, 329-38.
- Fernandez-Espejo, E., Galan-Rodriguez, B., 2004. Sensorimotor gating in mice is disrupted after AM404, an anandamide reuptake and degradation inhibitor. *Psychopharmacology (Berl).* 175, 220-4.
- Field, A., 2009. *Discovering statistics using SPSS*. Vol. 3, SAGE Publications Ltd.
- File, S.E., Hyde, J.R., 1978. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol.* 62, 19-24.
- Finn, D.P., Beckett, S.R., Roe, C.H., Madjd, A., Fone, K.C., Kendall, D.A., Marsden, C.A., Chapman, V., 2004. Effects of coadministration of cannabinoids and morphine on nociceptive behaviour, brain monoamines and HPA axis activity in a rat model of persistent pain. *Eur J Neurosci.* 19, 678-86.
- Franklin, J.C., Moretti, N.A., Blumenthal, T.D., 2007. Impact of stimulus signal-to-noise ratio on prepulse inhibition of acoustic startle. *Psychophysiology.* 44, 339-42.
- Frauenknecht, S., Lieb, K., Brunnhuber, S., 2008. *Therapie psychischer Erkrankungen*. In *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie*. Vol. 6, K. Lieb, S. Frauenknecht, S. Brunnhuber, ed. eds. Elsevier Urban & Fischer, München.
- Freedland, C.S., Whitlow, C.T., Miller, M.D., Porrino, L.J., 2002. Dose-dependent effects of Delta9-tetrahydrocannabinol on rates of local cerebral glucose utilization in rat. *Synapse.* 45, 134-42.

- Freedman, R., 2003. Schizophrenia. *N Engl J Med.* 349, 1738-49.
- Freund, T.F., Katona, I., Piomelli, D., 2003. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev.* 83, 1017-66.
- Fride, E., Ponde, D., Breuer, A., Hanus, L., 2005. Peripheral, but not central effects of cannabidiol derivatives: mediation by CB(1) and unidentified receptors. *Neuropharmacology.* 48, 1117-29.
- Fu, J., Bottegoni, G., Sasso, O., Bertorelli, R., Rocchia, W., Masetti, M., Guijarro, A., Lodola, A., Armirotti, A., Garau, G., Bandiera, T., Reggiani, A., Mor, M., Cavalli, A., Piomelli, D., 2011. A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons. *Nat Neurosci.* 15, 64-9.
- Fukuhara, C., Aguzzi, J., Bullock, N., Tosini, G., 2005. Effect of long-term exposure to constant dim light on the circadian system of rats. *Neurosignals.* 14, 117-25.
- Fusar-Poli, P., Crippa, J.A., Bhattacharyya, S., Borgwardt, S.J., Allen, P., Martin-Santos, R., Seal, M., Surguladze, S.A., O'Carroll, C., Atakan, Z., Zuardi, A.W., McGuire, P.K., 2009. Distinct Effects of {Delta}9-Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Neural Activation During Emotional Processing. *Arch Gen Psychiatry.* 66, 95-105.
- Gaebel, W., 2002. Schizophrenie, schizotyp und wahnhaftige Störungen (F2). In *Diagnostik und Therapie psychischer Störungen.* Vol., ed.^eds. Gaebel, Wolfgang
- Müller-Spahn, Franz, Stuttgart, pp. 244-356.
- Gaines Das, R., North, D., 2007. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. *Lab Anim.* 41, 312-20.
- Gaoni, Y., Mechoulam, R., 1964. Isolation Structure + Partial Synthesis of Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society.* 86, 1646-&.
- Garbutt, J.C., van Kammen, D.P., 1983. The interaction between GABA and dopamine: implications for schizophrenia. *Schizophr Bull.* 9, 336-53.
- Gerard, C.M., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M., 1991. Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J.* 279 (Pt 1), 129-34.
- Gerdeman, G.L., Ronesi, J., Lovinger, D.M., 2002. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nat Neurosci.* 5, 446-51.
- Geyer, M.A., Swerdlow, N.R., 1998. Measurement of startle response, prepulse inhibition, and habituation. In *Current Protocols in Neuroscience.* Vol. Supplement 3, ed.^eds.
- Geyer, M.A., Mcllwain, K.L., Paylor, R., 2002. Mouse genetic models for prepulse inhibition: an early review. *Mol Psychiatry.* 7, 1039-53.
- Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D., 1999. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci.* 2, 358-63.
- Giuffrida, A., Leweke, F.M., Gerth, C.W., Schreiber, D., Koethe, D., Faulhaber, J., Klosterkötter, J., Piomelli, D., 2004. Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms. *Neuropsychopharmacology.* 29, 2108-14.

- Glass, M., Dragunow, M., Faull, R.L., 1997. Cannabinoid receptors in the human brain: a detailed anatomical and quantitative autoradiographic study in the fetal, neonatal and adult human brain. *Neuroscience*. 77, 299-318.
- Golani, I., Benjamini, Y., Eilam, D., 1993. Stopping behavior: constraints on exploration in rats (*Rattus norvegicus*). *Behav Brain Res*. 53, 21-33.
- Goonawardena, A.V., Sesay, J., Sexton, C.A., Riedel, G., Hampson, R.E., 2011. Pharmacological elevation of anandamide impairs short-term memory by altering the neurophysiology in the hippocampus. *Neuropharmacology*. 61, 1016-25.
- Goparaju, S.K., Ueda, N., Yamaguchi, H., Yamamoto, S., 1998. Anandamide amidohydrolase reacting with 2-arachidonoylglycerol, another cannabinoid receptor ligand. *FEBS Lett*. 422, 69-73.
- Gottesman, II, Gould, T.D., 2003. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 160, 636-45.
- Grace, A.A., 2000. The tonic/phasic model of dopamine system regulation and its implications for understanding alcohol and psychostimulant craving. *Addiction*. 95 Suppl 2, S119-28.
- Graham, F.K., 1975. Presidential Address, 1974. The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology*. 12, 238-48.
- Guimaraes, F.S., Chiaretti, T.M., Graeff, F.G., Zuardi, A.W., 1990. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology*. 100, 558-559.
- Gururajan, A., Taylor, D.A., Malone, D.T., 2011. Effect of cannabidiol in a MK-801-rodent model of aspects of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*. 222, 299-308.
- Häfner, H., Maurer, K., Löffler, W., Riecher-Rössler, A., 1993. The influence of age and sex on the onset and early course of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 162, 80-6.
- Hajos, N., Katona, I., Naiem, S.S., Mackie, K., Ledent, C., Mody, I., Freund, T.F., 2000. Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur J Neurosci*. 12, 3239-49.
- Hall, C.S., 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*. 18, 385-403.
- Haller, J., Barna, I., Barsvari, B., Gyimesi Pelczér, K., Yasar, S., Panlilio, L.V., Goldberg, S., 2009. Interactions between environmental aversiveness and the anxiolytic effects of enhanced cannabinoid signaling by FAAH inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 204, 607-16.
- Hammond, C.T., Mahlberg, P.G., 1973. Morphology of Glandular Hairs of *Cannabis sativa* from Scanning Electron Microscopy. *American Journal of Botany*. 60, 524-528.
- Han, C.J., Pierre-Louis, J., Scheff, A., Robinson, J.K., 2000. A performance-dependent adjustment of the retention interval in a delayed non-matching-to-position paradigm differentiates effects of amnesic drugs in rats. *Eur J Pharmacol*. 403, 87-93.
- Harte, L.C., Dow-Edwards, D., 2010. Sexually dimorphic alterations in locomotion and reversal learning after adolescent tetrahydrocannabinol exposure in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 32, 515-24.
- Heekeren, K., 2011. [Does cannabis use lead to schizophrenia?]. *Praxis (Bern 1994)*. 100, 1361-7.

- Henquet, C., Murray, R., Linszen, D., van Os, J., 2005. The environment and schizophrenia: the role of cannabis use. *Schizophr Bull.* 31, 608-12.
- Herbert, H., Klepper, A., Ostwald, J., 1997. Afferent and efferent connections of the ventrolateral tegmental area in the rat. *Anat Embryol (Berl).* 196, 235-59.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C., 1991. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci.* 11, 563-83.
- Higuera-Matas, A., Soto-Montenegro, M.L., Montoya, G.L., Garcia-Vazquez, V., Pascau, J., Miguens, M., Del Olmo, N., Vaquero, J.J., Garcia-Lecumberri, C., Desco, M., Ambrosio, E., 2011. Chronic cannabinoid administration to periadolescent rats modulates the metabolic response to acute cocaine in the adult brain. *Mol Imaging Biol.* 13, 411-5.
- Hillard, C.J., Harris, R.A., Bloom, A.S., 1985. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 232, 579-88.
- Hirvonen, J., Goodwin, R.S., Li, C.T., Terry, G.E., Zoghbi, S.S., Morse, C., Pike, V.W., Volkow, N.D., Huestis, M.A., Innis, R.B., 2011. Reversible and regionally selective downregulation of brain cannabinoid CB(1) receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry.*
- Hoffman, A.F., Lupica, C.R., 2000. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. *J Neurosci.* 20, 2470-9.
- Hoffman, H.S., Wible, B.L., 1970. Role of Weak Signals in Acoustic Startle. *The Journal of the Acoustical Society of America.* 47, 489-497.
- Hoffman, H.S., Ison, J.R., 1980. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev.* 87, 175-89.
- Hohmann, A.G., Herkenham, M., 1999. Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves. *Neuroscience.* 92, 1171-5.
- Howlett, A.C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W.A., Felder, C.C., Herkenham, M., Mackie, K., Martin, B.R., Mechoulam, R., Pertwee, R.G., 2002. International Union of Pharmacology.XVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev.* 54, 161-202.
- Ison, J.R., 1978. Reflex inhibition and reflex elicitation by acoustic stimuli differing in abruptness of onset and peak intensity. *Animal Learning and Behavior.* 6, 106-110.
- Jacobs, G.H., Fenwick, J.A., Williams, G.A., 2001. Cone-based vision of rats for ultraviolet and visible lights. *J Exp Biol.* 204, 2439-46.
- Jansen, E.M., Haycock, D.A., Ward, S.J., Seybold, V.S., 1992. Distribution of cannabinoid receptors in rat brain determined with aminoalkylindoles. *Brain Res.* 575, 93-102.
- Järbe, T.U., Hiltunen, A.J., 1987. Cannabimimetic activity of cannabiol in rats and pigeons. *Neuropharmacology.* 26, 219-28.
- Järbe, T.U., Ross, T., DiPatrizio, N.V., Pandarinathan, L., Makriyannis, A., 2006. Effects of the CB1R agonist WIN-55,212-2 and the CB1R antagonists SR-141716 and AM-1387: open-field examination in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 85, 243-52.
- Jentsch, J.D., Andrusiak, E., Tran, A., Bowers, M.B., Jr., Roth, R.H., 1997. Delta 9-tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization

- and impairs spatial working memory in the rat: blockade of dopaminergic effects with HA966. *Neuropsychopharmacology*. 16, 426-32.
- Jones, C.K., Shannon, H.E., 2004. Lesions of the laterodorsal tegmental nucleus disrupt prepulse inhibition of the acoustic startle reflex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 78, 229-237.
- Jones, P.G., Falvello, L., Kennard, O., Sheldrick, G.M., Mechoulam, R., 1977. Cannabidiol. *Acta Crystallographica Section B*. 33, 3211-3214.
- Jonsson, K.O., Vandevoorde, S., Lambert, D.M., Tiger, G., Fowler, C.J., 2001. Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide. *Br J Pharmacol*. 133, 1263-75.
- Kandler, K., Herbert, H., 1991. Auditory projections from the cochlear nucleus to pontine and mesencephalic reticular nuclei in the rat. *Brain Res*. 562, 230-42.
- Kathuria, S., Gaetani, S., Fegley, D., Valino, F., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Tarzia, G., La Rana, G., Calignano, A., Giustino, A., Tattoli, M., Palmery, M., Cuomo, V., Piomelli, D., 2003. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med*. 9, 76-81.
- Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E.S., Mackie, K., Freund, T.F., 1999. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci*. 19, 4544-58.
- Katona, I., Rancz, E.A., Acsady, L., Ledent, C., Mackie, K., Hajos, N., Freund, T.F., 2001. Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci*. 21, 9506-18.
- Kellendonk, C., Simpson, E.H., Kandel, E.R., 2009. Modeling cognitive endophenotypes of schizophrenia in mice. *Trends Neurosci*. 32, 347-58.
- Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 20, 379-82.
- Koch, M., Lingenhohl, K., Pilz, P.K., 1992. Loss of the acoustic startle response following neurotoxic lesions of the caudal pontine reticular formation: possible role of giant neurons. *Neuroscience*. 49, 617-25.
- Koch, M., Kungel, M., Herbert, H., 1993. Cholinergic neurons in the pedunclopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res*. 97, 71-82.
- Koch, M., Schnitzler, H.U., 1997. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behavioural Brain Research*. 89, 35-49.
- Koch, M., 1999. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol*. 59, 107-28.
- Koch, M., Fendt, M., Kretschmer, B.D., 2000. Role of the substantia nigra pars reticulata in sensorimotor gating, measured by prepulse inhibition of startle in rats. *Behavioural Brain Research*. 117, 153-162.
- Koch, M., Fendt, M., 2003. Startle response Modulation as a behavioral tool in neuropharmacology. *Current Neuropharmacology*. 1, 175-185.
- Koch, M., 2006. Animal models of schizophrenia. In *Animal models of neuropsychiatric diseases*. Vol. 1, M. Koch, ed. eds. Imperial College Press, pp. 337-402.
- Kodsi, M.H., Swerdlow, N.R., 1997. Regulation of prepulse inhibition by ventral pallidal projections. *Brain Res Bull*. 43, 219-28.
- Koethe, D., Gerth, C.W., Neatby, M.A., Haensel, A., Thies, M., Schneider, U., Emrich, H.M., Klosterkötter, J., Schultze-Lutter, F., Leweke, F.M., 2006. Disturbances of

- visual information processing in early states of psychosis and experimental delta-9-tetrahydrocannabinol altered states of consciousness. *Schizophrenia Research* 88, 142-150.
- Koethe, D., Llenos, I.C., Dulay, J.R., Hoyer, C., Torrey, E.F., Leweke, F.M., Weis, S., 2007. Expression of CB(1) cannabinoid receptor in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression. *J Neural Transm.*
- Koethe, D., Giuffrida, A., Schreiber, D., Hellmich, M., Schultze-Lutter, F., Ruhrmann, S., Klosterkotter, J., Piomelli, D., Leweke, F.M., 2009. Anandamide elevation in cerebrospinal fluid in initial prodromal states of psychosis. *Br J Psychiatry.* 194, 371-2.
- Kojoma, M., Seki, H., Yoshida, S., Muranaka, T., 2006. DNA polymorphisms in the tetrahydrocannabinolic acid (THCA) synthase gene in "drug-type" and "fiber-type" *Cannabis sativa L.* *Forensic Sci Int.* 159, 132-140.
- Korenbrod, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.I., 1977. Preputial separation as an external sign of pubertal development in male rat *Biology of Reproduction.* 17, 298-303.
- Kreitzer, A.C., Regehr, W.G., 2001. Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron.* 29, 717-27.
- Lafourcade, M., Elezgarai, I., Mato, S., Bakiri, Y., Grandes, P., Manzoni, O.J., 2007. Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS ONE.* 2, e709.
- Lamarque, S., Taghzouti, K., Simon, H., 2001. Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol enhances the locomotor response to amphetamine and heroin. Implications for vulnerability to drug addiction. *Neuropharmacology.* 41, 118-29.
- Lambert, D.M., Di Marzo, V., 1999. The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem.* 6, 757-73.
- Lawrence, D.K., Gill, E.W., 1975. The effects of delta1-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids on spin-labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia. *Mol Pharmacol.* 11, 595-602.
- Le Pen, G., Gourevitch, R., Hazane, F., Hoareau, C., Jay, T.M., Krebs, M.O., 2006. Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. *Neuroscience.* 143, 395-405.
- Lee, S.-J., 2010. Establishment of an animal model for schizophrenia in Lister hooded rats. Masterarbeit; MPI für neurologische Forschung sowie Zoologie der Universität zu Köln. pp. 113.
- Lee, Y., Lopez, D.E., Meloni, E.G., Davis, M., 1996. A primary acoustic startle pathway: obligatory role of cochlear root neurons and the nucleus reticularis pontis caudalis. *J Neurosci.* 16, 3775-89.
- Leitner, D.S., Powers, A.S., Stitt, C.L., Hoffman, H.S., 1981. Midbrain reticular formation involvement in the inhibition of acoustic startle. *Physiol Behav.* 26, 259-68.
- Leitner, D.S., Cohen, M.E., 1985. Role of the inferior colliculus in the inhibition of acoustic startle in the rat. *Physiol Behav.* 34, 65-70.
- Leweke, F.M., Giuffrida, A., Wurster, U., Emrich, H.M., Piomelli, D., 1999a. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport.* 10, 1665-9.

- Leweke, F.M., Schneider, U., Thies, M., Münte, T.F., Emrich, H.M., 1999b. Effects of synthetic Δ^9 -tetrahydrocannabinol on binocular depth inversion of natural and artificial objects in man. *Psychopharmacology*. 142, 230-235.
- Leweke, F.M., Schneider, U., Radwan, M., Schmidt, E., Emrich, H.M., 2000. Different Effects of Nabilone and Cannabidiol on Binocular Depth Inversion in Man. *Pharmacol Biochem Behav*. 66, 175-181.
- Leweke, F.M., Gerth, C.W., Klosterkötter, J., 2004. Cannabis-Associated Psychosis: Current Status of Research. *CNS Drugs*. 18, 895-910.
- Leweke, F.M., Giuffrida, A., Koethe, D., Schreiber, D., Nolden, B.M., Kranaster, L., Neatby, M.A., Schneider, M., Gerth, C.W., Hellmich, M., Klosterkötter, J., Piomelli, D., 2007. Anandamide levels in cerebrospinal fluid of first-episode schizophrenic patients: Impact of cannabis use. *Schizophr Res*. 94, 29-36.
- Leweke, F.M., Schneider, M., 2010. Chronic pubertal cannabinoid treatment as a behavioural model for aspects of schizophrenia: effects of the atypical antipsychotic quetiapine. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1-9.
- Leweke, F.M., 2012. Anandamide dysfunction in prodromal and established psychosis. *Current Pharmaceutical Design*. In press.
- Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkötter, J., Hellmich, M., Koethe, D., 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2, e94.
- Lewis, E.M., Barnett, J.F., Freshwater, L., Hoberman, A.M., Christian, M.S., 2002. Sexual maturation data for CRL Sprague-Dawley rats: Criteria and confounding factors. *Drug & Chemical Toxicology*. 25, 437.
- Li, L., Korngut, L.M., Frost, B.J., Beninger, R.J., 1998. Prepulse inhibition following lesions of the inferior colliculus: prepulse intensity functions. *Physiol Behav*. 65, 133-9.
- Lichtman, A.H., Dimen, K.R., Martin, B.R., 1995. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 119, 282-90.
- Lichtman, A.H., Hawkins, E.G., Griffin, G., Cravatt, B.F., 2002. Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 302, 73-9.
- Lieb, K., 2008. Schizophrenien und andere psychotische Störungen. In *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie*. Vol. 6, K. Lieb, S. Frauenknecht, S. Brunnhuber, eds. Elsevier Urban & Fischer, München, pp. 177-204.
- Lingenhohl, K., Friauf, E., 1994. Giant neurons in the rat reticular formation: a sensorimotor interface in the elementary acoustic startle circuit? *J Neurosci*. 14, 1176-94.
- Linscott, R.J., van Os, J., Systematic reviews of categorical versus continuum models in psychosis: evidence for discontinuous subpopulations underlying a psychometric continuum. Implications for DSM-V, DSM-VI, and DSM-VII. *Annu Rev Clin Psychol*. 6, 391-419.
- Lipska, B.K., Weinberger, D.R., 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 23, 223-39.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92, 180-185.
- Lo Verme, J., La Rana, G., Russo, R., Calignano, A., Piomelli, D., 2005. The search for the palmitoylethanolamide receptor. *Life Sci*. 77, 1685-98.

- Long, L.E., Malone, D.T., Taylor, D.A., 2006. Cannabidiol reverses MK-801-induced disruption of prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology*. 31, 795-803.
- Long, L.E., Chesworth, R., Huang, X.F., McGregor, I.S., Arnold, J.C., Karl, T., 2009. A behavioural comparison of acute and chronic Delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol in C57BL/6JArc mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 1-16.
- Maccarrone, M., Gasperi, V., Catani, M.V., Diep, T.A., Dainese, E., Hansen, H.S., Avigliano, L., 2010. The endocannabinoid system and its relevance for nutrition. *Annual review of nutrition*. 30, 423-40.
- Mackie, K., 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. 299-325.
- Maejima, T., Oka, S., Hashimoto-dani, Y., Ohno-Shosaku, T., Aiba, A., Wu, D., Waku, K., Sugiura, T., Kano, M., 2005. Synaptically driven endocannabinoid release requires Ca²⁺-assisted metabotropic glutamate receptor subtype 1 to phospholipase Cbeta4 signaling cascade in the cerebellum. *J Neurosci*. 25, 6826-35.
- Mailleux, P., Vanderhaeghen, J.J., 1992. Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*. 48, 655-68.
- Mallet, P.E., Beninger, R.J., 1998. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A attenuates the memory impairment produced by delta9-tetrahydrocannabinol or anandamide. *Psychopharmacology (Berl)*. 140, 11-9.
- Malone, D.T., Taylor, D.A., 2006. The effect of Delta9-tetrahydrocannabinol on sensorimotor gating in socially isolated rats. *Behav Brain Res*. 166, 101-9.
- Malone, D.T., Jongejan, D., Taylor, D.A., 2009. Cannabidiol reverses the reduction in social interaction produced by low dose Delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 93, 91-6.
- Mansbach, R.S., Rovetti, C.C., Winston, E.N., Lowe, J.A., 3rd, 1996. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716A on the behavior of pigeons and rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 124, 315-22.
- Marco, E.M., Rapino, C., Caprioli, A., Borsini, F., Maccarrone, M., Laviola, G., 2011. Social encounter with a novel partner in adolescent rats: activation of the central endocannabinoid system. *Behavioural Brain Research*. 220, 140-5.
- Marcotte, E.R., Pearson, D.M., Srivastava, L.K., 2001. Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci*. 26, 395-410.
- Margulies, J.E., Hammer, R.P., Jr., 1991. Delta 9-tetrahydrocannabinol alters cerebral metabolism in a biphasic, dose-dependent manner in rat brain. *Eur J Pharmacol*. 202, 373-8.
- Marks, M.D., Tian, L., Wenger, J.P., Omburo, S.N., Soto-Fuentes, W., He, J., Gang, D.R., Weiblen, G.D., Dixon, R.A., 2009. Identification of candidate genes affecting Delta-9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *Journal of Experimental Botany*. 60, 3715-3726.
- Martin, A.B., Fernandez-Espejo, E., Ferrer, B., Gorriti, M.A., Bilbao, A., Navarro, M., Rodriguez de Fonseca, F., Moratalla, R., 2008. Expression and function of CB1 receptor in the rat striatum: localization and effects on D1 and D2 dopamine receptor-mediated motor behaviors. *Neuropsychopharmacology*. 33, 1667-79.

- Martin, R.S., Secchi, R.L., Sung, E., Lemaire, M., Bonhaus, D.W., Hedley, L.R., Lowe, D.A., 2003. Effects of cannabinoid receptor ligands on psychosis-relevant behavior models in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 165, 128-35.
- Martinez-Vargas, M., Murillo-Rodriguez, E., Gonzalez-Rivera, R., Landa, A., Mendez-Diaz, M., Prospero-Garcia, O., Navarro, L., 2003. Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience*. 117, 197-201.
- Mato, S., Del Olmo, E., Pazos, A., 2003. Ontogenetic development of cannabinoid receptor expression and signal transduction functionality in the human brain. *Eur J Neurosci*. 17, 1747-54.
- Matsuda, L.A., Lolait, S.J., Brownstein, M.J., Young, A.C., Bonner, T.I., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346, 561-4.
- Matsuda, L.A., Bonner, T.I., Lolait, S.J., 1993. Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*. 327, 535-50.
- Mazzoni, O., Diurno, M.V., di Bosco, A.M., Novellino, E., Grieco, P., Esposito, G., Bertamino, A., Calignano, A., Russo, R., 2010. Synthesis and pharmacological evaluation of analogs of indole-based cannabimimetic agents. *Chem Biol Drug Des*. 75, 106-14.
- McCormick, C.M., Mathews, I.Z., 2007. HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 86, 220-233.
- McCutcheon, J.E., Marinelli, M., 2009. Age matters. *European Journal of Neuroscience*. 29, 997-1014.
- McGregor, I.S., Hargreaves, G.A., Apfelbach, R., Hunt, G.E., 2004. Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *J Neurosci*. 24, 4134-44.
- McKinney, M.K., Cravatt, B.F., 2005. Structure and function of fatty acid amide hydrolase. *Annu Rev Biochem*. 74, 411-32.
- McKinney, W.T., Jr., Bunney, W.E., Jr., 1969. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry*. 21, 240-8.
- McPartland, J.M., Glass, M., Pertwee, R.G., 2007. Meta-analysis of cannabinoid ligand binding affinity and receptor distribution: interspecies differences. *Br J Pharmacol*. 152, 583-93.
- Mechoulam, R., Shvo, Y., 1963. Hashish—I : The structure of Cannabidiol. *Tetrahedron*. 19, 2073-2078.
- Mechoulam, R., 1970. Marihuana chemistry. *Science*. 168, 1159-66.
- Mechoulam, R., Carlini, E.A., 1978. Toward drugs derived from cannabis. *Die Naturwissenschaften*. 65, 174-9.
- Mechoulam, R., Ben-Shabat, S., Hanus, L., Ligumsky, M., Kaminski, N.E., Schatz, A.R., Gopher, A., Almog, S., Martin, B.R., Compton, D.R., et al., 1995. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 50, 83-90.
- Mechoulam, R., Parker, L.A., Gallily, R., 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol*. 42, 11S-19S.
- Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O., 2007. Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers*. 4, 1678-92.

- Meltzer, H.Y., 1989. Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 99 Suppl, S18-27.
- Mertgens, H., 2008. Kognitive und emotionale Verhaltensänderungen nach Blockade der anterioren Zerebralarterie bei Ratten (*Rattus norvegicus*). Diplomarbeit; MPI für neurologische Forschung sowie Zoologie der Universität zu Köln. pp. 185.
- Moore, T.H., Zammit, S., Lingford-Hughes, A., Barnes, T.R., Jones, P.B., Burke, M., Lewis, G., 2007. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*. 370, 319-28.
- Moreira, F.A., Aguiar, D.C., Guimaraes, F.S., 2006. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 30, 1466-71.
- Moura, P.J., Meirelles, S.T., Xavier, G.F., 2010. Long-term social recognition memory in adult male rats: factor analysis of the social and non-social behaviors. *Braz J Med Biol Res*. 43, 663-76.
- Munro, S., Thomas, K.L., Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365, 61-5.
- Murillo-Rodriguez, E., Desarnaud, F., Prospero-Garcia, O., 2006. Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci*. 79, 30-7.
- Murray, R.M., Morrison, P.D., Henquet, C., Di Forti, M., 2007. Cannabis, the mind and society: the hash realities. *Nature reviews. Neuroscience*. 8, 885-95.
- Nagai, H., Egashira, N., Sano, K., Ogata, A., Mizuki, A., Mishima, K., Iwasaki, K., Shoyama, Y., Nishimura, R., Fujiwara, M., 2006. Antipsychotics improve Delta9-tetrahydrocannabinol-induced impairment of the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 84, 330-6.
- Nahas, G., Leger, C., Tocque, B., Hoellinger, H., 1981. The kinetics of cannabinoid distribution and storage with special reference to the brain and testis. *J Clin Pharmacol*. 21, 208S-214S.
- Nahas, G.G., Frick, H.C., Lattimer, J.K., Latour, C., Harvey, D., 2002. Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Hum Psychopharmacol*. 17, 103-13.
- Naidu, P.S., Varvel, S.A., Ahn, K., Cravatt, B.F., Martin, B.R., Lichtman, A.H., 2007. Evaluation of fatty acid amide hydrolase inhibition in murine models of emotionality. *Psychopharmacology (Berl)*. 192, 61-70.
- Nakamura, E.M., da Silva, E.A., Concilio, G.V., Wilkinson, D.A., Masur, J., 1991. Reversible effects of acute and long-term administration of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) on memory in the rat. *Drug Alcohol Depend*. 28, 167-75.
- Navarro, M., Fernandez-Ruiz, J.J., De Miguel, R., Hernandez, M.L., Cebeira, M., Ramos, J.A., 1993. Motor disturbances induced by an acute dose of delta 9-tetrahydrocannabinol: possible involvement of nigrostriatal dopaminergic alterations. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 45, 291-8.
- Neitz, J., Jacobs, G.H., 1986. Reexamination of spectral mechanisms in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol*. 100, 21-9.
- Newberg, A.B., Moss, A.S., Monti, D.A., Alavi, A., 2011. Positron emission tomography in psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*. 1228, E13-25.

- Nuechterlein, K.H., Dawson, M.E., 1984. A heuristic vulnerability/stress model of schizophrenic episodes. *Schizophr Bull.* 10, 300-12.
- Nunez, E., Benito, C., Pazos, M.R., Barbachano, A., Fajardo, O., Gonzalez, S., Tolon, R.M., Romero, J., 2004. Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse.* 53, 208-13.
- O'Shea, M., McGregor, I.S., Mallet, P.E., 2006. Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J Psychopharmacol.* 20, 611-21.
- Ohno-Shosaku, T., Maejima, T., Kano, M., 2001. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron.* 29, 729-38.
- Onaivi, E.S., Green, M.R., Martin, B.R., 1990. Pharmacological characterization of cannabinoids in the elevated plus maze. *J Pharmacol Exp Ther.* 253, 1002-9.
- Patel, S., Hillard, C.J., 2006. Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther.* 318, 304-11.
- Patricelli, M.P., Cravatt, B.F., 1999. Fatty Acid Amide Hydrolase Competitively Degrades Bioactive Amides and Esters through a Nonconventional Catalytic Mechanism. *Biochemistry.* 38, 14125-14130.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol. 5, Elsevier Academic Press.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14, 149-167.
- Pertwee, R.G., 2006. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S163-71.
- Petitot, F., Jeantaud, B., Reibaud, M., Imperato, A., Dubroeuq, M.C., 1998. Complex pharmacology of natural cannabinoids: evidence for partial agonist activity of delta9-tetrahydrocannabinol and antagonist activity of cannabidiol on rat brain cannabinoid receptors. *Life Sci.* 63, PL1-6.
- Pinto, L., Capasso, R., Di Carlo, G., Izzo, A.A., 2002. Endocannabinoids and the gut. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 66, 333-41.
- Piomelli, D., Giuffrida, A., Calignano, A., Rodriguez de Fonseca, F., 2000. The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 21, 218-24.
- Piomelli, D., 2003. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 4, 873-84.
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T.R., Dasse, O., Monaghan, E.P., Parrott, J.A., Putman, D., 2006. Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev.* 12, 21-38.
- Poeggeler, B.H., Barlow-Walden, L.R., Reiter, R.J., Saarela, S., Menendez-Pelaez, A., Yaga, K., Manchester, L.C., Chen, L.D., Tan, D.X., 1995. Red-light-induced suppression of melatonin synthesis is mediated by N-methyl-D-aspartate receptor activation in retinally normal and retinally degenerate rats. *J Neurobiol.* 28, 1-8.

- Popelar, J., Groh, D., Pelanova, J., Canlon, B., Syka, J., 2006. Age-related changes in cochlear and brainstem auditory functions in Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging*. 27, 490-500.
- Powell, C.M., Miyakawa, T., 2006. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry*. 59, 1198-207.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 463, 3-33.
- Puente, N., Cui, Y., Lassalle, O., Lafourcade, M., Georges, F., Venance, L., Grandes, P., Manzoni, O.J., 2011. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci*. 14, 1542-7.
- Qi, J., Leahy, R.M., Cherry, S.R., Chatziioannou, A., Farquhar, T.H., 1998. High-resolution 3D Bayesian image reconstruction using the microPET small-animal scanner. *Phys Med Biol*. 43, 1001-13.
- Quinn, H.R., Matsumoto, I., Callaghan, P.D., Long, L.E., Arnold, J.C., Gunasekaran, N., Thompson, M.R., Dawson, B., Mallet, P.E., Kashem, M.A., Matsuda-Matsumoto, H., Iwazaki, T., McGregor, I.S., 2008. Adolescent rats find repeated Delta(9)-THC less aversive than adult rats but display greater residual cognitive deficits and changes in hippocampal protein expression following exposure. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 33, 1113-26.
- Raichle, M.E., Mintun, M.A., 2006. Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci*. 29, 449-76.
- Rakhshan, F., Day, T.A., Blakely, R.D., Barker, E.L., 2000. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 292, 960-7.
- Ramos, A., 2008. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol Sci*. 29, 493-8.
- Redgrave, P., Mitchell, I.J., Dean, P., 1987. Descending projections from the superior colliculus in rat: a study using orthograde transport of wheatgerm-agglutinin conjugated horseradish peroxidase. *Exp Brain Res*. 68, 147-67.
- Reijmers, L.G.J.E., Peeters, B.W.M.M., 1994. Effects of acoustic prepulses on the startle reflex in rats: a parametric analysis. *Brain Research*. 667, 144-150.
- Resstel, L.B.M., Joca, S.R.L., Moreira, F.A., Correa, F.M.A., Guimaraes, F.S., 2006. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behavioural Brain Research*. 172, 294-298.
- Rodgers, R.J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, Defence and the Elevated Plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 801-810.
- Rodriguez de Fonseca, F., Ramos, J.A., Bonnin, A., Fernandez-Ruiz, J.J., 1993. Presence of cannabinoid binding sites in the brain from early postnatal ages. *Neuroreport*. 4, 135-8.
- Rodriguez De Fonseca, F., Gorriti, M.A., Fernández-Ruiz, J.J., Palomo, T., 1994. Downregulation of Rat Brain Cannabinoid Binding Sites After Chronic Δ9-Tetrahydrocannabinol Treatment. *Pharmacol Biochem Behav*. 47, 33-40.
- Romero, J., Berrendero, F., Manzanares, J., Perez, A., Corchero, J., Fuentes, J.A., Fernandez-Ruiz, J.J., Ramos, J.A., 1998. Time-course of the cannabinoid receptor down-regulation in the adult rat brain caused by repeated exposure to delta9-tetrahydrocannabinol. *Synapse*. 30, 298-308.

- Rubino, T., Sala, M., Vigano, D., Braidà, D., Castiglioni, C., Limonta, V., Guidali, C., Realini, N., Parolaro, D., 2007. Cellular Mechanisms Underlying the Anxiolytic Effect of Low Doses of Peripheral Delta(9)-Tetrahydrocannabinol in Rats. *Neuropsychopharmacology*.
- Rubino, T., Vigano, D., Realini, N., Guidali, C., Braidà, D., Capurro, V., Castiglioni, C., Cherubino, F., Romualdi, P., Candeletti, S., Sala, M., Parolaro, D., 2008. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology*. 33, 2760-71.
- Rubino, T., Realini, N., Braidà, D., Guidi, S., Capurro, V., Vigano, D., Guidali, C., Pinter, M., Sala, M., Bartesaghi, R., Parolaro, D., 2009. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus*. 19, 763-72.
- Rueda-Orozco, P.E., Soria-Gomez, E., Montes-Rodriguez, C.J., Martinez-Vargas, M., Galicia, O., Navarro, L., Prospero-Garcia, O., 2008. A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 198, 565-76.
- Saitoh, K., Tilson, H.A., Shaw, S., Dyer, R.S., 1987. Possible role of the brainstem in the mediation of prepulse inhibition in the rat. *Neuroscience Letters*. 75, 216-222.
- Salio, C., Fischer, J., Franzoni, M.F., Conrath, M., 2002. Pre- and postsynaptic localizations of the CB1 cannabinoid receptor in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience*. 110, 755-64.
- Sanudo-Pena, M.C., Romero, J., Seale, G.E., Fernandez-Ruiz, J.J., Walker, J.M., 2000. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol*. 391, 269-74.
- Scherma, M., Medalie, J., Fratta, W., Vadivel, S.K., Makriyannis, A., Piomelli, D., Mikics, E., Haller, J., Yasar, S., Tanda, G., Goldberg, S.R., 2008. The endogenous cannabinoid anandamide has effects on motivation and anxiety that are revealed by fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition. *Neuropharmacology*. 54, 129-40.
- Schiffer, W.K., Mirrione, M.M., Dewey, S.L., 2007. Optimizing experimental protocols for quantitative behavioral imaging with 18F-FDG in rodents. *J Nucl Med*. 48, 277-87.
- Schmid, H.H., Berdyshev, E.V., 2002. Cannabinoid receptor-inactive N-acyl ethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 66, 363-76.
- Schmid, S., Brown, T., Simons-Weidenmaier, N., Weber, M., Fendt, M., 2010. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit startle-mediating giant neurons in the caudal pontine reticular nucleus but do not mediate synaptic depression/short-term habituation of startle. *J Neurosci*. 30, 10422-30.
- Schneider, M., Koch, M., 2002. The cannabinoid agonist WIN 55,212-2 reduces sensorimotor gating and recognition memory in rats. *Behav Pharmacol*. 13, 29-37.
- Schneider, M., Koch, M., 2003. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1760-9.

- Schneider, M., Drews, E., Koch, M., 2005. Behavioral effects in adult rats of chronic prepubertal treatment with the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2. *Behav Pharmacol.* 16, 447-54.
- Schneider, M., Schomig, E., Leweke, F.M., 2008. Acute and chronic cannabinoid treatment differentially affects recognition memory and social behavior in pubertal and adult rats. *Addict Biol.* 13, 345-57.
- Schwabe, K., Freudenberg, F., Koch, M., 2007. Selective breeding of reduced sensorimotor gating in Wistar rats. *Behav Genet.* 37, 706-12.
- Seillier, A., Advani, T., Cassano, T., Hensler, J.G., Giuffrida, A., 2010. Inhibition of fatty-acid amide hydrolase and CB1 receptor antagonism differentially affect behavioural responses in normal and PCP-treated rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13, 373-86.
- Seillier, A., Giuffrida, A., 2011. Inhibition of fatty acid amide hydrolase modulates anxiety-like behavior in PCP-treated rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 98, 583-6.
- Shaw, N.A., 1988. The auditory evoked potential in the rat--a review. *Prog Neurobiol.* 31, 19-45.
- Shoyama, Y., Yagi, M., Nishioka, I., Yamauchi, T., 1975. Biosynthesis of cannabinoid acids. *Phytochemistry.* 14, 2189-2192.
- Sim-Selley, L.J., Martin, B.R., 2002. Effect of chronic administration of R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl)methanone mesylate (WIN55,212-2) or delta(9)-tetrahydrocannabinol on cannabinoid receptor adaptation in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 303, 36-44.
- Sisk, C.L., Foster, D.L., 2004. The neural basis of puberty and adolescence. *Nat Neurosci.* 7, 1040-7.
- Stella, N., Schweitzer, P., Piomelli, D., 1997. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature.* 388, 773-8.
- Stiglick, A., Kalant, H., 1983. Behavioral effects of prolonged administration of delta 9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 80, 325-30.
- Stiglick, A., Kalant, H., 1985. Residual effects of chronic cannabis treatment on behavior in mature rats. *Psychopharmacology (Berl).* 85, 436-9.
- 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.
- Sun, J.H., Yaga, K., Reiter, R.J., Garza, M., Manchester, L.C., Tan, D.X., Poeggeler, B., 1993. Reduction in pineal N-acetyltransferase activity and pineal and serum melatonin levels in rats after their exposure to red light at night. *Neurosci Lett.* 149, 56-8.
- Sutcliffe, J.S., Marshall, K.M., Neill, J.C., 2007. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. *Behav Brain Res.* 177, 117-25.
- Swanson, L.W., 1998. *Brain Maps: Structure of the rat brain. A laboratory guide with printed and electronic templates for data, models and schematics.* Vol. 2nd revised edition, Elsevier.
- Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., 1993. Prepulse inhibition of acoustic startle in rats after lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. *Behav Neurosci.* 107, 104-17.

- Swerdlow, N.R., Martinez, Z.A., Hanlon, F.M., Platten, A., Farid, M., Auerbach, P., Braff, D.L., Geyer, M.A., 2000. Toward understanding the biology of a complex phenotype: rat strain and substrain differences in the sensorimotor gating-disruptive effects of dopamine agonists. *J Neurosci.* 20, 4325-36.
- Swerdlow, N.R., Geyer, M.A., Braff, D.L., 2001. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl).* 156, 194-215.
- Swerdlow, N.R., Shoemaker, J.M., Auerbach, P.P., Pitcher, L., Goins, J., Platten, A., 2004a. Heritable differences in the dopaminergic regulation of sensorimotor gating. II. Temporal, pharmacologic and generational analyses of apomorphine effects on prepulse inhibition. *Psychopharmacology (Berl).* 174, 452-62.
- Swerdlow, N.R., Shoemaker, J.M., Crain, S., Goins, J., Onozuka, K., Auerbach, P.P., 2004b. Sensitivity to drug effects on prepulse inhibition in inbred and outbred rat strains. *Pharmacol Biochem Behav.* 77, 291-302.
- Swerdlow, N.R., Shoemaker, J.M., Bongiovanni, M.J., Neary, A.C., Tochen, L.S., Saint Marie, R.L., 2007. Strain differences in the disruption of prepulse inhibition of startle after systemic and intra-accumbens amphetamine administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 87, 1-10.
- Szabo, B., Urbanski, M.J., Bisogno, T., Di Marzo, V., Mendiguren, A., Baer, W.U., Freiman, I., 2006. Depolarization-induced retrograde synaptic inhibition in the mouse cerebellar cortex is mediated by 2-arachidonoylglycerol. *J Physiol.* 577, 263-80.
- Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., Mechoulam, R., 1995. First direct evidence for the mechanism of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society.* 117, 9766-9767.
- Taura, F., Morimoto, S., Shoyama, Y., 1996. Purification and characterization of cannabidiolic-acid synthase from *Cannabis sativa* L.. Biochemical analysis of a novel enzyme that catalyzes the oxidocyclization of cannabigerolic acid to cannabidiolic acid. *J Biol Chem.* 271, 17411-6.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y., Morimoto, S., 2007. Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Lett.* 581, 2929-2934.
- Tchernichovski, O., Benjamini, Y., Golani, I., 1998. The dynamics of long-term exploration in the rat. Part I. A phase-plane analysis of the relationship between location and velocity. *Biol Cybern.* 78, 423-32.
- Thomas, A., Baillie, G.L., Phillips, A.M., Razdan, R.K., Ross, R.A., Pertwee, R.G., 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.* 150, 613-23.
- Tirelli, E., Laviola, G., Adriani, W., 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 27, 163-178.
- Trezza, V., Vanderschuren, L.J., 2008. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl).* 197, 217-27.
- Tseng, A.H., Craft, R.M., 2001. Sex differences in antinociceptive and motoric effects of cannabinoids. *Eur J Pharmacol.* 430, 41-7.
- Tseng, A.H., Harding, J.W., Craft, R.M., 2004. Pharmacokinetic factors in sex differences in $[\Delta^9]$ -tetrahydrocannabinol-induced behavioral effects in rats. *Behavioural Brain Research.* 154, 77-83.

- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M.C., Mackie, K., Walker, J.M., 1998. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 83, 393-411.
- Tsuang, M., 2000. Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry*. 47, 210-20.
- Valenti, M., Vigano, D., Casico, M.G., Rubino, T., Steardo, L., Parolaro, D., Di Marzo, V., 2004. Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol Life Sci*. 61, 945-50.
- van den Buuse, M., 2003. Deficient prepulse inhibition of acoustic startle in Hooded-Wistar rats compared with Sprague-Dawley rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30, 254-61.
- van der Staay, F.J., 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev*. 52, 131-59.
- van Os, J., Bak, M., Hanssen, M., Bijl, R.V., de Graaf, R., Verdoux, H., 2002. Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am J Epidemiol*. 156, 319-27.
- van Ree, J.M., Niesink, R.J., Nir, I., 1984. delta 1-Tetrahydrocannabinol but not cannabidiol reduces contact and aggressive behavior of rats tested in dyadic encounters. *Psychopharmacology (Berl)*. 84, 561-5.
- van Rossum, J.M., 1966. The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 160, 492-4.
- Vanderschuren, L.J.M.J., Niesink, R.J.M., Van Pee, J.M., 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 21, 309-326.
- Volkow, N.D., Swanson, J.M., 2003. Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry*. 160, 1909-18.
- Vollmar, S., Hampl, J.A., Kracht, L., Herholz, K., 2007. Integration of functional data (PET) into brain surgery planning and neuronavigation. In *Advances in Medical Engineering. Springer Proceedings in Physics*, Vol. 114, T.M. Buzug, D. Holz, J. Bongartz, M. KohlBareis, U. Hartmann, ed.^eds. Springer-Verlag Berlin, Berlin, pp. 98-103.
- Walker, S.C., Winn, P., 2007. An assessment of the contributions of the pedunculo-pontine tegmental and cuneiform nuclei to anxiety and neophobia. *Neuroscience*. 150, 273-90.
- Wallace, D.G., Martin, M.M., Winter, S.S., 2008. Fractionating dead reckoning: role of the compass, odometer, logbook, and home base establishment in spatial orientation. *Die Naturwissenschaften*. 95, 1011-26.
- Walter, H., Ciaramidaro, A., Adenzato, M., Vasic, N., Ardito, R.B., Erk, S., Bara, B.G., 2009. Dysfunction of the social brain in schizophrenia is modulated by intention type: an fMRI study. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 4, 166-76.
- Watanabe, K., Kayano, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, I., Yoshimura, H., 1996. Inhibition of anandamide amidase activity in mouse brain microsomes by cannabinoids. *Biol Pharm Bull*. 19, 1109-11.
- Wegener, N., Kuhnert, S., Thuns, A., Roese, R., Koch, M., 2008. Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 198, 375-85.

- Wegener, N., Koch, M., 2009. Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res.* 1253, 81-91.
- Whitlow, C.T., Freedland, C.S., Porrino, L.J., 2002. Metabolic mapping of the time-dependent effects of delta 9-tetrahydrocannabinol administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 161, 129-36.
- Whitlow, C.T., Freedland, C.S., Porrino, L.J., 2003. Functional consequences of the repeated administration of Delta9-tetrahydrocannabinol in the rat. *Drug Alcohol Depend.* 71, 169-77.
- Wiley, J.L., O'Connell M, M., Tokarz, M.E., Wright, M.J., Jr., 2007. Pharmacological effects of acute and repeated administration of Delta(9)-tetrahydrocannabinol in adolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 320, 1097-105.
- Wiley, J.L., Burston, J.J., 2010. Chronic Delta9-tetrahydrocannabinol during adolescence increases sensitivity to subsequent cannabinoid effects in delayed nonmatch-to-position in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 94, 516-23.
- Willner, P., 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 83, 1-16.
- Willner, P., 1986. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 10, 677-90.
- Wong, D.F., Kuwabara, H., Horti, A.G., Raymond, V., Brasic, J., Guevara, M., Ye, W., Dannals, R.F., Ravert, H.T., Nandi, A., Rahmim, A., Ming, J.E., Grachev, I., Roy, C., Cascella, N., 2010. Quantification of cerebral cannabinoid receptors subtype 1 (CB1) in healthy subjects and schizophrenia by the novel PET radioligand [¹¹C]OMAR. *Neuroimage.* 52, 1505-13.
- Yamauchi, T., Shoyama, Y., Aramaki, H., Azuma, T., Nishioka, I., 1967. Tetrahydrocannabinolic acid, a genuine substance of tetrahydrocannabinol. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 15, 1075-6.
- Yeomans, J.S., Frankland, P.W., 1996. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Brain Res Rev.* 21, 301-14.
- Yeomans, J.S., Lee, J., Yeomans, M.H., Steidl, S., Li, L., 2006. Midbrain pathways for prepulse inhibition and startle activation in rat. *Neuroscience.* 142, 921-929.
- Yokoyama, S., Radlwimmer, F.B., Kawamura, S., 1998. Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Lett.* 423, 155-8.
- Yoshida, T., Hashimoto, K., Zimmer, A., Maejima, T., Araishi, K., Kano, M., 2002. The cannabinoid CB1 receptor mediates retrograde signals for depolarization-induced suppression of inhibition in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci.* 22, 1690-7.
- Yoshino, H., Miyamae, T., Hansen, G., Zambrowicz, B., Flynn, M., Pedicord, D., Blat, Y., Westphal, R.S., Zaczek, R., Lewis, D.A., Gonzalez-Burgos, G., 2011. Postsynaptic diacylglycerol lipase mediates retrograde endocannabinoid suppression of inhibition in mouse prefrontal cortex. *J Physiol.* 589, 4857-84.
- Zadicario, P., Avni, R., Zadicario, E., Eilam, D., 2005. 'Looping'-an exploration mechanism in a dark open field. *Behav Brain Res.* 159, 27-36.
- Zamberletti, E., Prini, P., Speziali, S., Gabaglio, M., Solinas, M., Parolaro, D., Rubino, T., 2012. Gender-dependent behavioral and biochemical effects of adolescent

- delta-9-tetrahydrocannabinol in adult maternally deprived rats. *Neuroscience*. 204, 245-57.
- Zammit, S., Allebeck, P., Andreasson, S., Lundberg, I., Lewis, G., 2002. Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: historical cohort study. *Bmj*. 325, 1199.
- Zavitsanou, K., Garrick, T., Huang, X.F., 2004. Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28, 355-60.
- Zuardi, A.W., Shirakawa, I., Finkelfarb, E., Karniol, I.G., 1982. Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 76, 245-50.
- Zuardi, A.W., Morais, S.L., Guimarães, F.S., Mechoulam, R., 1995. Antipsychotic Effect of Cannabidiol. *J Clin Psychiatry*. 56, 485-486.
- Zuardi, A.W., Crippa, J.A.S., Hallak, J.E., Moreira, F.A., Guimarães, F.S., 2006a. Cannabidiol, a *Cannabis sativa* constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res*. 39, 421-429.
- Zuardi, A.W., Hallak, J.E., Dursun, S.M., Morais, S.L., Sanches, R.F., Musty, R.E., Crippa, J.A., 2006b. Cannabidiol monotherapy for treatment-resistant schizophrenia. *J Psychopharmacol*. 20, 683-6.

16. Danksagung

Zuallererst möchte ich Frau PD Dr. Heike Endepols und Herrn Prof. Dr. med. F.-Markus Leweke danken, ohne die es diese Arbeit nicht gegeben hätte. Ich möchte beiden für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen danken und dafür, dass sie mich immer unterstützt und mir vieles ermöglicht haben. Heike Endepols möchte ich zudem für die vielen technischen Fertigkeiten danken, die ich von ihr lernen durfte sowie für die gemeinsame Zeit im Labor.

Prof. Dr. Wolfgang Walkowiak danke ich ganz herzlich für die Promotionsbetreuung.

Mein Dank geht auch an die vielen netten Kollegen im MPI, insbesondere an Christiane Schäfer, ohne die der reibungslose Ablauf des dritten Teils der Lösungsmittelstudie nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonderer Dank gilt außerdem Elena Höfener, Fabienne Jung, und Hanna Mertgens für ihre mentale Unterstützung, die vielen hilfreichen Diskussionen, die tatkräftige Unterstützung im Labor, die letzten Korrekturen des Manuskripts und vor allem für die heitere Atmosphäre in unserem Büro. Auch Markus Gramer möchte ich herzlich für seine Unterstützung und die aufheiternden Besuche „bei uns da unten“ danken.

Meinen lieben ECNP-Kollegen Dr. med. Dagmar Koethe, Carola Schäfer und insbesondere Franziska Pahlisch möchte ich ebenfalls ganz herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die schöne Zeit danken. Außerdem hätte ich ohne Franziska Pahlisch den Ratten nicht „ins Gehirn schauen“ können. Mein Dank geht ebenso an Malte Bumb, der mir in den letzten Monaten in Mannheim viel Arbeit abgenommen hat, damit ich mich voll und ganz meiner Doktorarbeit widmen konnte.

Meinem Mann Jens Rohleder und meiner Familie gilt ebenfalls ein ganz besonderer Dank, da sie immer an mich glauben und mir Kraft geben.

17. Erklärung

"Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Walkowiak, Frau PD. Dr. Endepols und Herrn Prof. Dr. med. F.-Markus Leweke betreut worden."