

A felnőttkori hippokampális neurogenesis vizsgálata krónikus stressz és perifériás gyulladás egérmódeljeiben

Doktori (PhD) értekezés



Rusznák Kitti

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője, Programvezető: Prof. Dr. Pintér Erika

Témavezető: Prof. Dr. Czéh Boldizsár

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Laboratóriumi Medicina Intézet

Pécs

2023

Tartalomjegyzék

Bevezetés, Irodalmi áttekintés	4
1. A felnőttkori hippocampális neurogenesis és vizsgálata.....	4
2. A felnőttkori neurogenesis szerepe kórképekben.....	8
3. A felnőttkori neurogenézist befolyásoló drogok, szerek	11
4. Ízületi gyulladás és hatásai a neurogenézisre	13
5. A cannabis, az endokannabinoid rendszer és terápiás lehetőségük.....	16
6. A cannabis fő aktív hatóanyagai és hatásai különböző kórképekben.....	19
7. Stressz hatásai a központi idegrendszerre.....	26
Célkitűzések.....	28
1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre	28
2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippocampális neurogenesisre.....	28
Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek	30
1. Felhasznált Állatok	30
1.1. Arthritisz állatmodell során használt egerek	30
1.2. Krónikus stressz és marihuána expozíció során használt egerek	30
2. Kísérleti modellek.....	31
2.1. Komplet Freund adjuváns (CFA)-indukált arthritisz modell	31
2.2. Marihuánafüst expozíciós állatmodell.....	32
2.3. Krónikus stressz modell.....	32
3. In vivo mérések.....	33
3.1. In Vivo technikák a perifériás gyulladás igazolására.....	33
3.3. Magatartási vizsgálatok.....	37
4. Post mortem szövettani módszerek	38
5. Egyéb mérések.....	42
5.1. Vérvizsgálata	42
5.1.2. A gyulladást okozó citokinek koncentrációjának mérése.....	42
5.1.3. Vizelet marihuána tartalmának meghatározása	43
5.1.4. Marihuánafüst összetevőinek meghatározása	44
6. Statisztikai elemzések.....	45
7. Kísérleti terv és időbeosztás	45

Eredmények.....	48
1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre	48
1.1. Magatartási és fájdalom tesztek	48
1.2. In vivo képképzés	50
1.3. Vérkép elemzés	51
1.4. Immunhisztokémiai eredmények	53
1.5. A gyulladásos citokinek szintjei a hátsó mancsokban és a hippocampusban	56
2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippocampális neurogenesisre.....	58
2.1. A marihuánafüst és az egerek vizeletének elemzése.....	58
2.2. Testtömeg változás a marihuána és stressz kezelés hatására	59
2.3. Légzésfunkció vizsgálat	60
2.4. Magatartási tesztek.....	62
2.5. Immunhisztokémiai eredmények	65
Megbeszélés.....	71
1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre	71
2. A krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és hippocampusukban zajló felnőttkori neurogenesisre	74
Következtetések, kitekintés	80
Rövidítések jegyzéke	83
Irodalom jegyzék.....	85
Publikációs jegyzék.....	124
Köszönetnyilvánítás	127

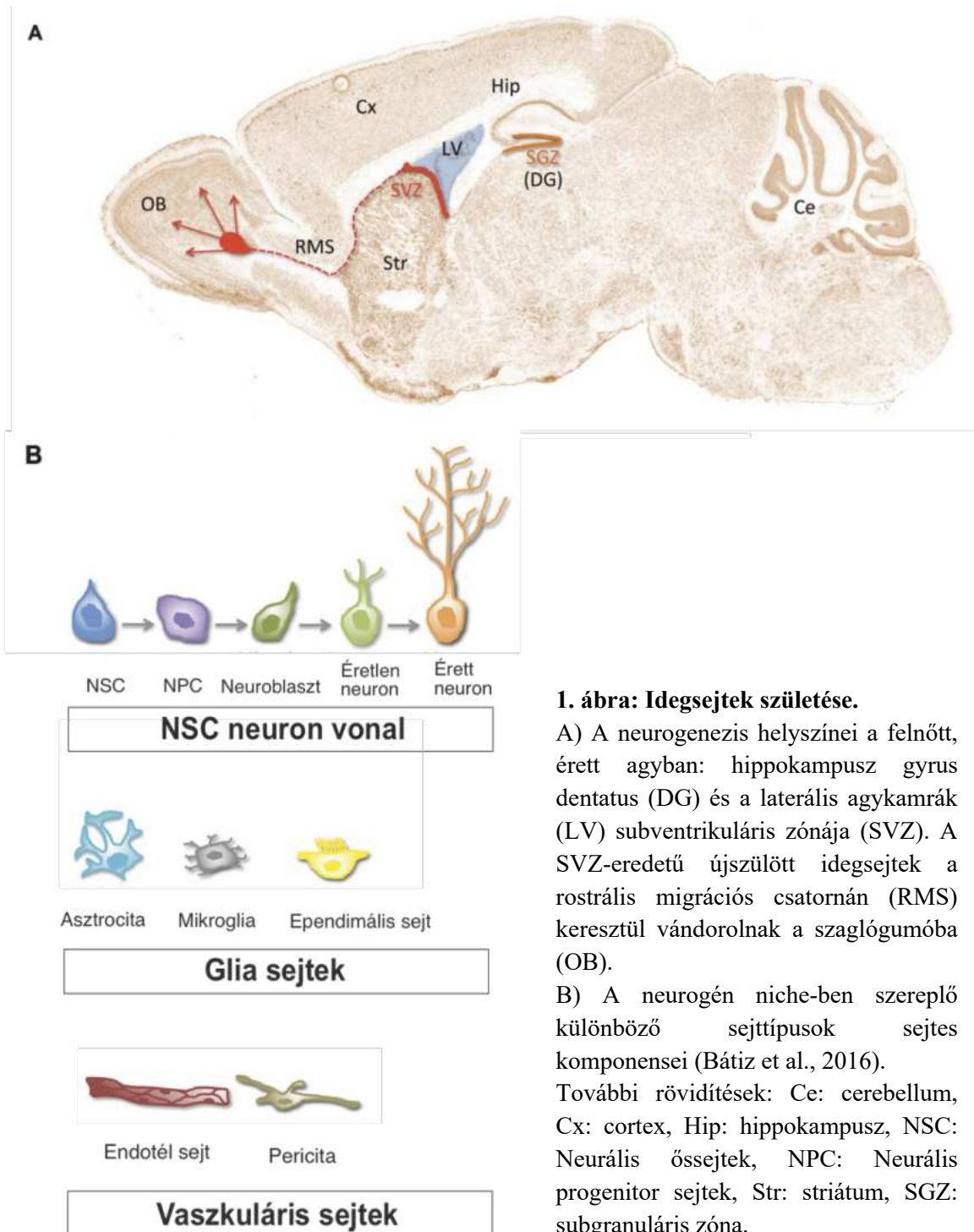
Bevezetés, Irodalmi áttekintés

1. A felnőttkori hippokampális neurogenesis és vizsgálata

A központi idegrendszer fejlődése bonyolult, időben és térben pontosan szabályozott dinamikus folyamat, amely genetikai, környezeti, biokémiai és fizikai tényezők precízen összehangolt sorozatát foglalja magában a korai embrionális stádiumtól a születés utáni életig (Greig et al., 2013). Ugyanakkor az őssejtek egy kis csoportja az egész élet során fennmarad és plaszticitást biztosítanak az idegrendszer működéséhez, javításához és megváltoztatásához (Gage és Temple, 2013). Az embrionális és korai posztnatális idegi őssejtek (*neural stem cells*, NSC) neuronokat és gliasejteket generálnak majd a proliferatív és multipotens NSC-k átalakulnak teljesen differenciált neuronokká vagy gliasejteké. Emlős élőlények agyában a neuronok a korai embrionális fejlődéstől a korai posztnatális stádiumig keletkeznek, és csak néhány neurogén zóna marad aktív felnőttkorban is (Urbán és Guillemot, 2014). A felnőtt agyban, bizonyos agyi struktúrákban az őssejtek egy igen kis száma fennmarad, és ezek hozzájárulnak bizonyos neuronok (és gliasejtek) folyamatos képződéséhez. Ezt a folyamatot nevezzük felnőttkori neurogenesisnek. A neuronális őssejtek képezik az embrionális és a felnőttkori neurogenesis eredetét is (Engler et al., 2018), bár egyes elméletek szerint a felnőtt agyban már nem léteznek igazi őssejtek, csak neuronális progenitor sejtek. Az elmúlt 25 év egyik mérföldkőnek számító eseménye az idegtudományi kutatásban a neuronális őssejtek kifejezés létrehozása volt, mint a neuronok és a glia egész életen át tartó forrása, és ez a koncepció eltörölte azt a dogmát, miszerint az idegrendszernek nincs regeneratív ereje.

A felnőttkori neurogenesis az elmúlt évtizedek egyik legjobban kutatott idegtudományi területévé nőtte ki magát (Yun et al., 2016). Felnőttkori neurogenesis emberben feltételezhetően nagyon ritka jelenség és az öregedéssel fordított arányban áll, így az életkor előrehaladtával az új idegsejtek képződésének mértéke jelentősen lecsökken (Isaev et al., 2018). Progenitor sejtek osztódása majd differenciálódása során alakulnak ki az új neuronok melyek beépülnek a neuronhálózatba. Csupán 40-50%-uk tud integrálódni, a többi újszülött neuron elpusztul (Biebl et al., 2000). A felnőtt, érett agy hippokampusz gyrus dentatusában, valamint a laterális agykamrák subventrikuláris zónájában képződnek új idegsejtek. A subgranuláris zóna újszülött neuronjai a gyrus dentatus granuláris sejtrétegébe vándorolnak, míg a subventrikuláris zónából származó új neuronok a szaglógumó felé migrálnak. Ezt szemlélteti a 1. ábra első képe (1.A ábra) amely a felnőtt egér agy neurogén régióit ábrázolja. Az idegi őssejtek egyik csoportjából fejlődnek az új idegsejtek egy

egyedülálló és specializált mikrokoznyezetben, amely "neurogén niche" néven ismert. A neurogén niche-ben jelen lévő különböző sejtípusok sejtés komponensei láthatóak az ábra második képén (1.B ábra) amely szemlélteti, hogy a neurális őssejt vonal mellett a neurogén niche-ek glia sejtékből (asztrociták, mikroglia és endimális sejték) és vaszkuláris sejtékből (endothel sejték, periciták) állnak (Bátiz et al., 2016).



1. ábra: Idegsejték születése.

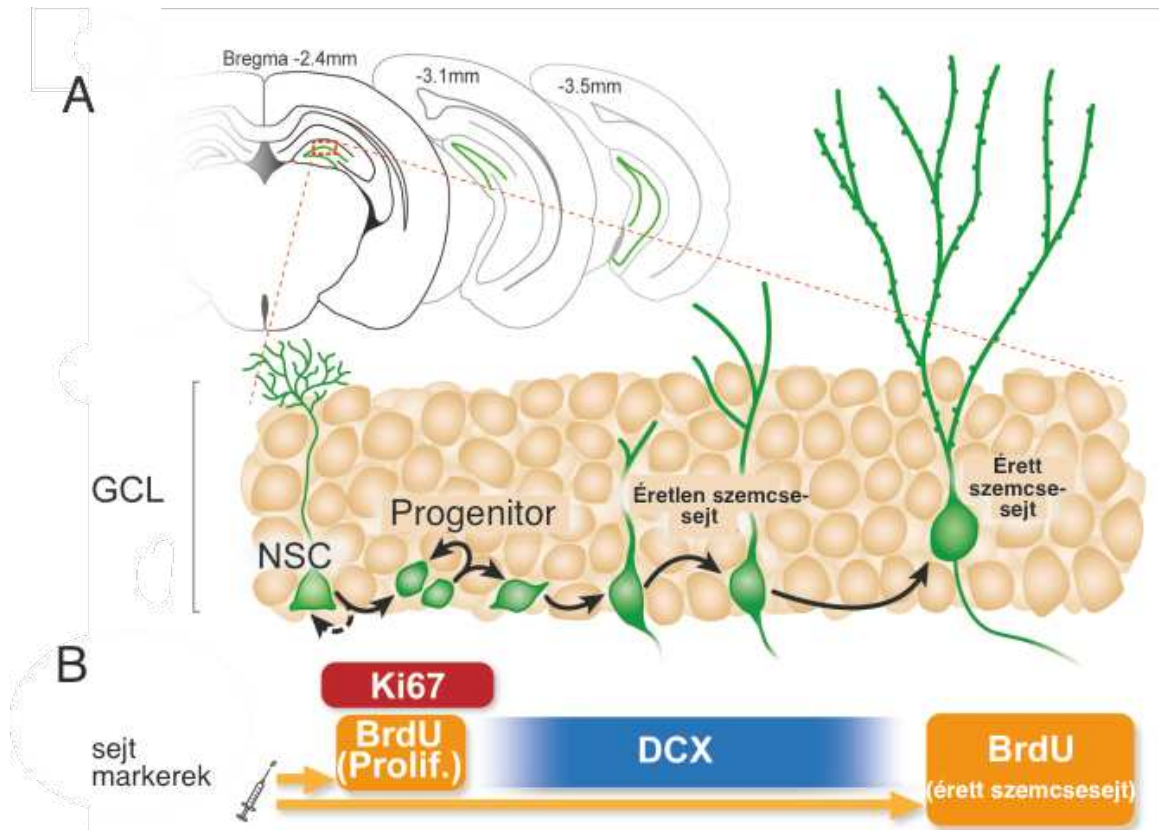
A) A neurogenesis helyszínei a felnőtt, érett agyban: hippocampus gyurus dentatus (DG) és a laterális agykamrák (LV) subventrikuláris zónája (SVZ). A SVZ-eredetű újszülött idegsejték a rostrális migrációs csatornán (RMS) keresztül vándorolnak a szaglógumóba (OB).

B) A neurogén niche-ben szereplő különböző sejtípusok sejtés komponensei (Bátiz et al., 2016).

További rövidítések: Ce: cerebellum, Cx: cortex, Hip: hippocampus, NSC: Neurális őssejték, NPC: Neurális progenitor sejték, Str: striátum, SGZ: subgranuláris zóna.

Az elmúlt évtizedekben kifejlesztett új technológiáknak köszönhetően lehetőségünk nyílik a gyrus dentatus neuronjainak tanulmányozására. Mára már vizsgálni tudjuk a neuronok számát, morfológiáját, dentritjeit és azok tüskéit is. Kutatásainkban a neuroplaszticitásnak ezt a jelenségét vizsgáltuk. A felnőttkori neurogenesis laboratóriumi állatokban és emberekben is hasonló módon zajlik. Egerekben és patkányokban 2–4 hétig, míg főemlősökben és emberekben pár héttel tovább tart az új neuronok proliferációja, differenciálódása a gyrus dentatusban (Yun et al., 2016). A felnőttkorban született neuronok a gyrus dentatusban nem helyettesítik a meglévő embrionális eredetű neuronokat, hanem hozzájárulnak a gyrus dentatus szemsesejtjeinek folyamatos megújulásához (Amrein et al., 2004, Bayer et al., 1982). Különböző módszerek állnak rendelkezésre a neurogenesis vizsgálatára az agyszövetben. Ezek többnyire post mortem szövettani eljárások. Az egyik, általunk is használt mesterséges jelölő anyag, amelyet intraperitoneálisan injektálunk az állatokba a leölés előtti napokban a timidin-analóg 5-bróm-2'-dezoxiuridint (BrdU), amely beépül a DNS-be a replikáció során (Clark et al., 2021) és a sejtciklus S fázisában lévő sejtek jelölésére használják mind az embrionális, mind a felnőtt osztódó sejtekben. A BrdU-val jelölt neuronok száma és a relatív helyzetük stabil maradt a szemsesejtrétegben legalább 11 hónapon keresztül, tehát ez a megállapítás arra utalhat, hogy az új neuronok hozzáadása a központi idegrendszerhez nem átmeneti (Kempermann et al., 2003). A BrdU jelölésen túl, a kutatásunk során specifikus markert is használtunk a neurogenesis vizsgálatára (2. ábra). A doublecortin (DCX), egy fehérje, amely elősegíti a mikrotubulusok polimerizációját. Vándorló neuroblasztokban és éretlen neuronokban expresszálódik, így a felnőttkori neurogenesis markereként használható a gyrus dentatusban (Dayer et al., 2005). Azonban nem minden újonnan született neuron expresszál DCX-et, tehát a posztmitózis neuronális progenitor sejtek és a korai éretlen neuronok jelölésére alkalmas (Brown et al., 2003). Számos további marker áll rendelkezésünkre a neurogenesis vizsgálatára például a PCNA (*proliferating cell nuclear antigen* / proliferáló sejtmag-antigén) és a Ki-67 markerek (Jinno, 2011). PCNA részt vesz a DNS replikációjában, így a PCNA is proliferációs markerként használható felnőttkori hippocampális neurogenesis kimutatásához (Jin et al., 2001; Limke et al., 2003). A PCNA a sejtciklus minden fázisában expresszálódik. Ezzel szemben a Ki-67 nem expresszálódik a nyugalmi fázis és a G1 fázis elején (Zacchetti et al. 2003), azonban nem mutattak ki szignifikáns különbséget a PCNA- és a Ki-67-pozitív sejtek számában a hippocampusban (Jinno 2011) tehát mind a PCNA, mind a Ki-67 képes megjelölni az osztódó sejteket, ezért megfelelően alkalmazható mindkét marker. Ezzel szemben Ki-67-

pozitív sejtek száma körülbelül 50%-kal magasabb, mint a BrdU-vel jelölt sejtek száma a gyrus dentatusban, mivel a BrdU csak a mitotikus folyamat S-fázisában tud beépülni a DNS-be (Kee et al. 2002).



2. ábra: Idegsejtek érése a hippocampusban

A) Hippokampusz gyrus dentatusban lejátszódó idegsejtek érési folyamata. B) Neurogenesis vizsgálatára használt biomarkerek (Clark et al., 2021). Rövidítések: GCL: granuláris sejtréteg, NSC: neuronális őssejt, DCX: doublekortin, BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin

Bármilyen neurogenézist befolyásoló beavatkozás értékeléséhez szükség lenne a neurogenesis *in vivo* monitorozására, és jelenleg ilyen képalkotó technikák nem állnak rendelkezésre a humán vizsgálatok során. A klinikusok számára elérhető képalkotó technikák közül a mágneses rezonancia képalkotás, a pozitronemissziós tomográfia (PET) vagy az optikai képalkotás segítségével jelentős előrelépés történt ebben az irányban az elmúlt évtizedben és egyes képalkotó technikák jelenlegi legmodernebb szintjén elméletileg lehetőség lenne a neurogenesis kimutatására is. A neurogenesis *in vivo* leképezését már sikerült egerekben transzgenikus modellrendszerek alkalmazásával elérni. A humán neurogenesis leképezéséhez azonban még mindig olyan módszerek kidolgozása szükségesek, amelyek *in vivo* megbízhatóan teszik láthatóvá az idegi őssejteket és a neuronális prekurzorokat (Couillard-Despres és Aigner, 2011).

2. A felnőttkori neurogenesis szerepe kórképekben

A tudomány jelenlegi állása szerint a központi idegrendszeri változások, mint például a gyrus dentatus strukturális rendellenességei, az idegsejtek számának csökkenései vagy a felnőttkori hippocampális neurogenesisben bekövetkezett változások hozzájárulhatnak számos idegrendszer fejlődési, pszichiátriai és neurodegeneratív betegség etiológiájához (Yun et al., 2016). A neurogenesis genetikai gátlása bizonyítja, hogy a felnőttkori neurogenesis szükséges az olyan kognitív funkciók fenntartásához, mint például a tanulás és a memória, úgy, hogy nagyfokú plaszticitást biztosít a neurális áramkörök számára (Gillotin et al., 2021). Mindezekon túl, a neurogenesisben bekövetkezett változások indikátorai lehetnek egyes betegségeknek ezért is kiemelten fontos a szerepe és vizsgálata. Számos faktor, külső és belső tényező is befolyásolhatja a neurogenézist, aminek következményeképpen idegrendszeri változások jöhetnek létre. Ezeknek a monitorozása és kivédése fontos a károsodások elkerülése végett és az egészséges idegrendszer fenntartásához is hozzájárulhat.

A neurogenesis képessége folyamatosan csökken az idő előrehaladtával és a neurogenesis idő előtti drasztikus csökkenését figyelték meg az Alzheimer-kór állatmodelljeiben és az emberi post mortem szövetekben (Hanspal és Gillotin, 2022). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az Alzheimer-kór súlyosbítja a fiziológias öregedés során a csökkent mértékű neurogenézist, és ennek fokozása jótékony hatással lehet a kognitív funkciókra és a tünetek enyhítésére (Disouky és Lazarov, 2021). A neurogenesis egy összetett, többlépcsős folyamat ahogy fentebb bemutatásra került (1.ábra), amely magában foglalja a neuronális őssejtek (NSC-k) proliferációját, valamint a neurális progenitor sejtek keletkezését, amelyek neuronokká differenciálódnak és beépülnek a gyrus dentatusban, majd végül összekapcsolódnak az entorhinalis kéreggel és a hippocampus többi részével (Gillotin et al., 2021). Ennek a neuronális hálózatnak a formálhatósága szerepet játszhat a tanulás és a memória szabályozásában. Fiziológias értelemben vett öregedés hatására fellépő sejtműködési zavarok negatívan hatnak a neurogenézisre is (Shors et al., 2001, Shors et al., 2002). Többek között a proteosztázis, és a homeosztázis szabályozása, a lipid metabolizmus és az epigenetikai változásoknak a vizsgálatai kínálnak ígéretes terápiás lehetőséget a neurogenesis életkorral és betegséggel összefüggő változásaira (Gillotin et al., 2021). Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a károsodott neurogenesis az Alzheimer-kór első jele lehet mivel a betegség kialakulása során progresszív tanulási és memóriazavarok, valamint a béta-amiloid fehérje lerakódások és a tau-hoz kapcsolódó neurofibrilláris problémák jelennek

meg, ahol a hippokampusz az egyik első érintett terület, mielőtt áterjedne más agyterületekre (Disouky és Lazarov, 2021). Mindezek tudatában a neurogenesis fokozása ígéretes terápiás jelentőséget hordozhat az Alzheimer-kór kognitív hiányosságainak enyhítésére (Gillotín et al., 2021).

A depresszió egyik jellemzője a hippokampális térfogat csökkenés (Videbech et al., 2004). Egerekben a kónikus stressz a CA3 piramissejtek sorvadását és a felnőttkori neurogenesis gátlását is eredményezi (Schoenfeld et al., 2017). Továbbá deklaratív tanulás és a memória romlását, valamint a kognitív funkciók csökkenését is megfigyelték a depressziós betegekben (Austin et al., 2001; Fossati et al., 2002). A mágneses rezonancia képalkotás kimutatta, hogy a depressziós egyéneknél csökkent a hippokampusz térfogata (Sheline et al., 1996, 1999; Bremner et al., 2000). A térfogati változások számos mechanizmushoz köthetők, például a neuronok vagy gliák fokozott apoptózisához, vagy a neurogenesis és gliogenesis csökkenéséhez (Sahay et al., 2007) vagy a dendritek komplexitásának megváltozásához a gyrus dentatusban (Reif et al., 2006). Bár a hippokampális neurogenesis nem feltétlenül vesz részt a depresszió patogenezisében, mégis fontos lehet az antidepresszáns kezelések terápiás hatásai szempontjából (Sahay és Hen, 2007), mivel ezek a gyógyszerek visszafordítják a hippokampális neurogenesis csökkenését, ezáltal új terápiás lehetőséget rejt magában a mentális betegségek kezelésére is (Mahar et al., 2014). A neurális őssejteket nagymértékben befolyásolják a monoaminerg neurotranszmitterek, különösen két neurotranszmitter a gyakori célpont a pszichiátriai farmakológiai terápiákban: a dopamin (DA) és a szerotonin (5-HT). Ezekről a monoaminokról már a korábbi tanulmányok alapján tudjuk, hogy befolyásolják a proliferációt és a neurogenesis a felnőtt agyban, és ezek a klasszikus neuromodulátorok jelentős hatást gyakorolhatnak a neurogenesisre, mivel a monoaminerg neurotranszmitterek szintje megváltozik az agyban pszichiátriai betegségek, életkor vagy neurodegeneráció esetén (Apple et al., 2017). A subgranuláris zóna neurális őssejtjei nagymértékben függenek a raphe magokból származó projekciók szerotonerg beidegzésétől (Mongeau et al., 1997). Kutatások kimutatták, hogy a felnőttkori hippokampális neurogenesis fokozódik az 5-HT transzporter hiányában szenvedő egerekben, mivel a genetikai manipuláció hatására megnövekedett az 5-HT extracelluláris szintje az agyban (Schmitt et al., 2007), valószínűleg azért, mert az 5-HT_{1A} receptor közvetíti a neurogén aktivitás nagy részét a gyrus dentatusban. Az 5-HT kimerülése és az 5-HT_{1A} receptorok egyidejű aktiválása fokozott proliferációt eredményez a subgranuláris zónában (Huang és Herbert, 2005) valamint az 5-HT_{1A} receptorok aktiválása önmagában is fokozza a

proliferációt (Santarelli et al., 2003), és az 5-HT1A receptorok blokkolása a gyrus dentatusban pedig csökkenti a progenitor sejtek proliferációját (Radley és Jacobs, 2002).

Kutatók azt tapasztalták a skizofrén betegeknél a hippocampusz post mortem vizsgálata során, hogy a subgranuláris zónában drasztikusan lecsökkent a proliferáló sejtek száma (Allen et al., 2015) viszont az 5-HT1A aktiválása javítja a kognitív tüneteket és elősegíti a neurogenezist skizofrénia esetén is (Schreiber és Newman-Tancredi, 2014, Sumiyoshi et al., 2001). A subgranuláris zóna 5-HT2C receptorainak agonistái szintén fokozzák a neurogenezist (Banasr et al., 2004).

A hippocampális neurogenezist az epilepsziás görcsrohamok is befolyásolják. Például a rohamaktivitás mind a köztes idegi progenitorok, mind a neuroblasztok rendellenes proliferációját idézi elő, és az újszülött szemcsesejtek abnormális morfológiai fejlődését és ektópiás migrációját eredményezi (Overstreet-Wadiche et al., 2006; Parent, 2007). Ezenkívül rohamok által megnövekedett számban született neuronok beépülhetnek a hippocampális áramkörökbe, és hozzájárulhatnak a rohamokkal összefüggő sérült kognitív funkciókhoz (Fabel és Kempermann, 2008). Az epilepsziás rohamok kezdetben szelektív neuronpopulációk sejthalálát eredményezik (Gorter et al., 2003) viszont az elhúzódó rohamok erőteljesen stimulálják a hippocampális neurogenezist (Bengzon et al., 1997; Parent et al., 1997), valamint az angiogenezist (Hellsten et al., 2000). A rohamok nemcsak az új neuronok képződését befolyásolják, hanem a neurogén sejtek egy részének az ektópiás helyekre való szétszóródását is indukálják. A betegek gyrus dentatus szemcsesejt rétegét gyakran abnormális diszperzió jellemzi, ektópiás neuronok jelennek meg a hilusban és a molekuláris rétegben, valamint az axonok szokatlan átrendeződése is megfigyelhető (Houser, 1990; Parent et al., 2006). Számos epilepsziás állatmodellben megfigyelték a több hónapig fennmaradó ektópiás szemcsesejteket a hilusban (Dashtipour et al., 2001; Parent et al., 2006). Ezek a sejtek felgyorsult funkcionális érést mutatnak, ami tartós túlingerlékenységet és a CA3 piramissejtekkel összhangban bekövetkező abnormális kitöréseket okoznak, és sokkal nagyobb százalékban mutatnak perzisztens bazális dendriteket, mint általában (Scharfman et al., 2000; Dashtipour et al., 2001; Overstreet-Wadiche et al., 2006). Mindezekon túl az ektópiás szemcsesejtek abnormálisan integrációja, valamint az újonnan született neuronok GABAerg interneuronná válása is hozzájárulhat a rohamok kialakulásához vagy terjedéséhez (Parent et al., 1999, 2006, Shetty és Hattiangady, 2007). Tehát a rohamok által generált új neuronok részt vehetnek a rohamok fenntartásában (Parent et al., 2007).

3. A felnőttkori neurogenézist befolyásoló drogok, szerek

Különböző faktorok, szerek, anyagok különböző módon képesek befolyásolni a felnőttkori neurogenézist. Vannak anyagok, drogok melyek gátlóan hatnak az új agysejtek születésére a hippokampuszban, más anyagok, például gyógyszerek pedig serkentik azt.

A pszichomotoros stimulánsok, mint a metamfetamin és a kokain negatívan hatnak a hippokampális neurogenézisre. A metamfetamin egyszeri expozíciója átmenetileg csökkentette a sejtproliferációt a gyrus dentatusban (Teuchert-Noodt et al., 2000). Az akut és a krónikus kokain expozíció is csökkentette a sejtproliferációt, de a várttal ellentétben nem lépett fel fenotípus zavar az újszülött sejteknél és nem befolyásolta a sejtek túlélését, valamint a dendritek elrendeződését és a dendritfa épségét sem (Yamaguchi et al., 2004, Dominguez-Escriba et al., 2006) A kokain neurogenézisére gyakorolt hatásai a dopamin D1 és/vagy D2 receptorok aktiválásából eredhetnek. In vitro vizsgálatok szerint a dopamin D1 receptor aktiválása csökkentette a progenitor sejtek átjutását a sejtciklus G (1) fázisból a S-fázisba (Ohtani et al., 2003) míg a D2- receptor aktiválás gátolta a neurális őssejt proliferációt (Kippin et al., 2005). Az opiátokkal végzett kutatások eredményei alapján a morfium többszöri expozíciója csökkentette a sejtproliferációt és a sejtek hosszú távú túlélését is, valamint a heroin adagolása is csökkentette a sejtproliferációt a gyrus dentatusban. Az opiátok posztnatális hippokampális neurogenézisre gyakorolt káros hatásait közvetítő molekuláris mechanizmusok sajnos nem ismertek még (Eisch et al., 2000). A kutatók megvizsgálták azt is, hogy hogyan hat a 3,4-metilén-dioxi-metamfetamin (más néven MDMA vagy ecstasy) a progenitor sejtek proliferációjára, valamint a prekursor sejtek túlélésére és érésére a patkányok gyrus dentatusában. Az eredmények azt mutatták, hogy az MDMA túlzott adagolása nem befolyásolja a citogenézist, viszont a sejtek túlélése 40%-ban lecsökkent, de ezek a sejtek normális arborizációt és dendriteket mutattak. Az MDMA felnőttkori hippokampális neurogenézisre gyakorolt negatív hatásai összefüggésbe hozhatóak a szerotonin szabályozási zavarokkal, redox aktivációval vagy az endokrin faktorokkal (Hernandez-Rabaza et al., 2006).

Az alkohol az egyik legintenzívebben tanulmányozott szer a függőség területén. Negatív korreláció van az alkoholfogyasztás és a felnőttkori hippokampális neurogenézis között, de az alkohol neurogenézisre gyakorolt hatását nagymértékben befolyásolja az adagolás, a bevitt mennyiség és az expozíció időtartama (Kang et al., 2016). Már az akut

alkoholfogyasztás is csökkenti a sejt proliferációt a gyrus dentatusban (Nixon és Crews 2002). Tehát a legtöbb addiktív drog, különösen, ha krónikusan alkalmazzák, megváltoztatja a neuronális progenitor sejtek proliferációját vagy a túlélési dinamikáját, így valamilyen módon, de káros hatással van a hippocampális neurogenesisre (Canales et al., 2007).

A farmakoterápiában alkalmazott antidepresszánsokról kimutatták, hogy szabályozzák a felnőttkori hippocampális neurogenesiset úgy, hogy fokozzák az idegi progenitor proliferációt, felgyorsítják a dendritikus fejlődést és fokozzák az újszülött neuronok túlélését (Warner-Schmidt és Duman, 2006 és Sahay és Hen, 2007). Számos különböző csoportba tartozó antidepresszánsok, például a monamin-újrafelvételt-gátlókat, a triciklusos szerek, az elektrokonvulzív sokk terápia és a foszfodiészteráz-gátlók mind megnövelte a hippocampális neurogenesiset rágcsálókban (Madsen et al., 2000; Malberg et al., 2000; Manev et al., 2001). A krónikus fluoxetin-kezelése nem csak serkenti a neurogenesiset hanem felgyorsította az éretlen neuronok érését (Wang et al., 2008) valamint meghosszabbította a sejtek túlélését is (Nakagawa et al., 2002).

Preklinikai szakirodalomban azt olvashatjuk, hogy számos nem farmakológiai alapú (de antidepresszáns hatású) terápiák is fokozhatják a hippocampális neurogenesiset, például a testmozgás, a tanulás és a környezeti ingergazdagítás is jótékony hatással van a kognitív funkciókra. Hat hetes fizikai gyakorlatot végző emberek lényegesen jobb teljesítményt nyújtottak a hippocampuszhoz kapcsolódó vizuális mintázatok szétválasztási feladatában (Horowitz et al., 2020; Poulou et al., 2017; Villeda et al., 2011).

Mindezek tudatában a neurogenesiset fokozó terápiás lehetőségeket a jövőben kiemelten kellene kezelni hiszen megoldást nyújthatnak az Alzheimer-kór, a neuropszichiátriai rendellenességek, például a depresszió kezelésében (Berger et al., 2020). Az új neuronok hozzáadása a hippocampusz sejtpopulációhoz számos lehetséges mechanizmus révén befolyásolhatja annak szerkezetét és működését, és új plaszticitási mechanizmust biztosít, amellyel megváltoztatható lesz bizonyos idegi hálózatok tulajdonságai. Neurogenesis hatására megemelkedik a gyrus dentatus szemcsesejt rétegének sejtszáma és a képlékeny éretlen neuronok többféle sejtípust generálhatnak, vagy serkenthetik az érett szemcsesejtek számát vagy cseréjét (Sahay et al., 2007). Az új neuronok részt vehetnek a hippocampusz összetett hálózatának finomításában, optimalizálva azt a jövőbeli memóriatároláshoz (Kempermann, 2002) vagy részt vehetnek a hippocampális memória kialakításában, és szerepet játszhatnak az események közötti időbeli folytonosság és összekapcsolás

megteremtésében (Ehninger és Kempermann, 2008). Továbbá az új neuronok hozzáadása a neurális hálózathoz növelné a tárolókapacitást, és megakadályozná a hálózati funkció összeomlását a megnövekedett memóriatárolást követően (Wiskot et al., 2006) valamint növelné az újonnan megszerzett információ stabilitását (Chambers et al., 2004) vagy javítaná az emlékek és az elraktározott információk felidézési képességet (Becker, 2005).

Mindezeken túl, fontos lenne nem csak biokémiai, hanem neurofiziológiai központi idegrendszeri biomarkerek fejlesztése is, amivel klinikailag is monitorozni tudnánk a hippocampális neurogenézist az emberekben (Gillotín et al., 2021).

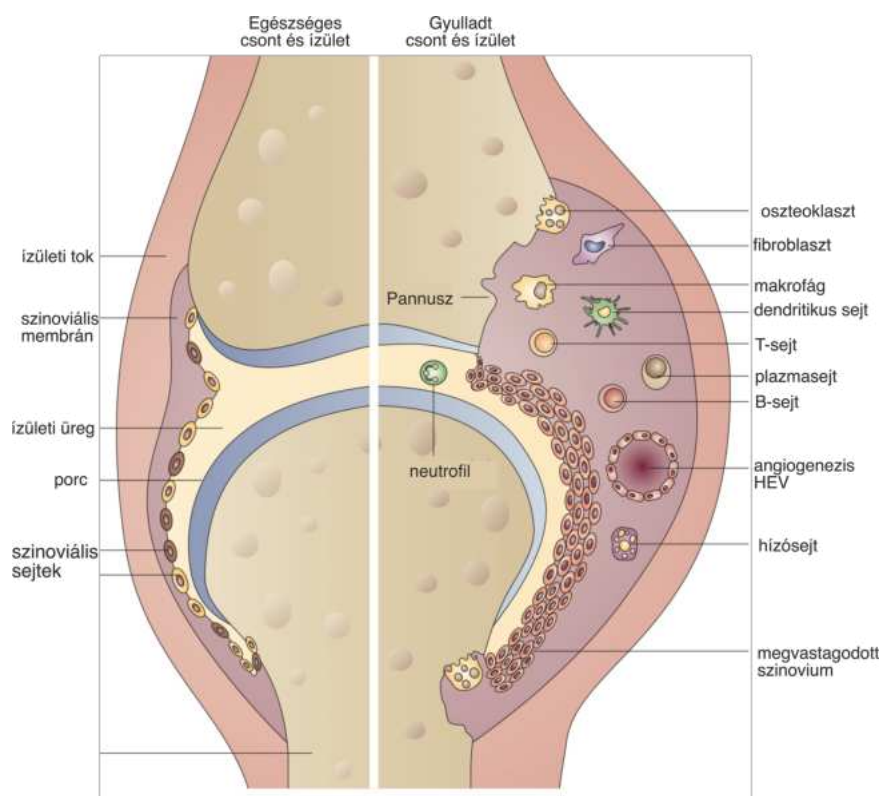
4. Ízületi gyulladás és hatásai a neurogenézisre

Ízületi gyulladás (arthritis) az ízületek heveny (akut) vagy idült (krónikus) formában megnyilvánuló gyulladásos reakciója, amely az érintett ízület duzzanatával, bőrpirosodásával, melegségével, fájdalommal és funkciójának csökkenésével jár. Gyulladás esetén az ízületi tokot belülről határoló ízületi hártya gyulladása miatt az ízületi folyadék felszaporodik, ez okozza a duzzanatot, valamint a feszülés miatt érzünk fájdalmat. Krónikus állapotnál általában jelentős mozgáskorlátozottság, fájdalom, ízület merevség és deformitás léphet fel (Harth and Nielson, 2019, Tang, 2019).

A reumatoid arthritisz, a krónikus ízületi gyulladások egy tisztázatlan etiológiájú szisztémás krónikus gyulladásos betegsége, amely progresszív és destruktív poliarthritisben manifesztálódik és az egyik legnagyobb egészségügyi probléma világszerte a magas prevalencia és a nem túl hatékony terápiás lehetőségek miatt. Krónikus fájdalom és ízületi károsodás jellemzi, amely rendszerint a disztálisról a proximálisabb ízületek felé halad (Kourilovitch et al., 2013). A reumatoid arthritisz éves előfordulási gyakorisága körülbelül 40/100 000 fő világszerte, a nőket két-háromszor nagyobb arányban érinti, mint a férfiakat (Ospelt et al., 2017). Az ízületi gyulladásban szenvedő betegek számára a fájdalom a leggyakoribb panasz (Horváth et al., 2016). Ebből kifolyólag a gyulladásos ízületi rendellenességek súlyosan ronthatják az életminőséget. A korai szakasz az érintett ízületek körüli ödéma és érzékenység jellemzi, melyeket később akár progresszív, visszafordíthatatlan degeneráció és csontok átalakulása kísérhet (Botz et al., 2014).

A reumatoid arthritisz patogenezisét tekintve, mint sok más betegségnél is, úgy jelen esetben is a genetikai és környezeti tényezők kölcsönhatása immunreakciók kaszkádját eredményezi. A betegségekre való fogékonyságot okozó genetikai tényezők közt a HLA fő hisztokompatibilitási komplex génjeit azonosították, emellett egyéb citokin-promoterek és

T-sejt jelátviteli gének is részt vesznek a patogenezisben (Gregersen et al., 1987). A betegség leginkább a kéz és a láb ízületeit érinteti. Egészséges állapotban az egy-két sejtrétegből álló speciális kötőszövet a szinoviális membrán termeli az ízületi folyadékot, amely segíti az ízületek mozgását és csökkenti a porcfelületek súrlódását (3. ábra). Reumatoid artritisz során ez a membrán megvastagodik, illetve a gyulladás hatására megjelennek a T- és B-sejtek, a fibroblasztok, a monociták, és makrofágok (Strand et al., 2007). Mivel az autoimmunitás fontos szerepet játszik a betegség patogenezisében, ezért az így termelődött antitestek aktiválják a komplement rendszert és a gyulladásos citokinek (TNF α , IL-1, IL-6) termelődését is. Ezeknek a citokineknek köszönhetően felszaporodnak mátrix-metalloproteázok (MMP) melyek hatására kialakul a porckopás és a szabad csontfelszín, így a csont eróziója is elkezdődik (Dolati et al., 2016, Harre et al., 2012). Külső, környezeti kockázati tényezőként főként a dohányzás és az alkoholfogyasztás szerepel, melyek akár 40-szeresére is növelheti a kockázatot, emellett egyéb tényezők, mint például a születési súly, a szoptatás, a társadalmi-gazdasági helyzet és a származási hely is növelhetik a fogékonyságot (Liao et al., 2009).



3. ábra: Az egészséges és a gyulladt ízületek, csontok.

Egészséges ízület látható a bal oldalon, illetve gyulladt ízület a jobb oldalon. A gyulladásnak köszönhetően az ízületi membrán megvastagodik és az ízületi üregben folyadék halmozódik fel mely duzzanatot okoz. illetve a gyulladás hatására megjelennek a T- és B-sejtek, a fibroblasztok, a monociták, dendritikus sejtek és makrofágok. Ezt követően heges kötőszövet alakul ki, amely

ráhúzódik a porcokra és az ízület mozgásának maradandó korlátozásával jár. Az ízületet alkotó csontok és azok porcfelszínei is károsodnak. (Strand et al., 2007)

A gyulladás hatására megjelenő sejtek és a keringő citokinek melyek elősegítik a gyulladás kialakulását gátolják a felnőttkori neurogenézist (Vallières et al., 2002; Monje et al., 2003; Goshen et al., 2008; Zunszain et al., 2012; Liu et al., 2014; Borsini et al., 2015; Kim et al., 2016). A neuroinflammáció is erősen gátolja a felnőttkori hippocampális neurogenézist (Das és Basu, 2008; Ekdahl et al., 2009; Ryan és Nolan, 2016; Troubat et al., 2021), de ellentmondásos eredményeket találtunk a perifériás vagy szisztémás gyulladás hatásáról (Chesnokova et al., 2016). Az első vizsgálatok, amelyek a perifériális gyulladás hatásait vizsgálták, bakteriális endotoxint (lipopoliszacharid: LPS) fecskendeztek be, hogy szisztémás gyulladást váltsanak ki az egerekben, és vizsgálták ennek hosszú távú következményeit a neurodegenerációra, a hippocampális neurogenézisre és a kognitív funkciókra (Ormerod et al., 2013; Valero et al., 2014; Hill et al., 2019; Perez-Dominguez et al., 2019). Egy másik kutatásban komplett Freund-adjuváns (CFA) injekciót alkalmaztak az artritisz kiváltására, ami a hippocampális prekursor sejtek proliferációját és a neurogenézis átmeneti serkentését eredményezte nőstény egerekben (Wolf et al., 2009). Süß és munkatársai vizsgálták a krónikus perifériás gyulladás hatásait a reumatoid artritisz TNF- α (tumor nekrozis faktor alfa) transzgenikus egérmodellben, illetve azt, hogy milyen hatással van a központi idegrendszerre (Süß et al., 2015, 2020). Ezek a transzgenikus egerek súlyos erőzív ízületi gyulladást mutattak, fokozott IL-1 β (interleukin-1 béta) és IL-6 (interleukin-6) expresszióval az ízületeikben, valamint a szérum TNF- α -szintje magas volt, de ezek a változások egyike sem befolyásolta a felnőttkori hippocampális neurogenézist vagy szorongásos szinteket, illetve a kialakuló depresszió-szerű tüneteket sem (Süß et al., 2015). Fontos megemlítenünk, hogy a depresszió nagymértékben elterjedt a reumatoid artritiszben szenvedő betegek körében, és a rossz klinikai kimenetellel is összefügg (Dickens et al., 2002; Matcham és et al., 2013).

A komplett Freund adjuváns (complete Freund adjuvant, CFA) egy olyan antigéneket tartalmazó parafinolajos szuszpenzió, amely elölt Mycobacterium tuberculosis-t tartalmaz melyek vonzzák a makrofágokat és egyéb antitesteket az injekció helyére, így fokozva az immunválaszt. A CFA beadásával hosszan tartó nocicepció indukálható mely glia aktivizációval, gyulladáscsökkentő mediátorok és gyulladást elősegítő citokinek (IL-1 β , TNF- α és IL-6) termelődésével jár a perifériás szövetben, valamint termikus és mechanikus hiperalgéziát vált ki (Zucoloto et al., 2019). A CFA-val kiváltott ízületi gyulladás egy jól

bevált gyulladáscsökkentő állatmodell, amelyet számos immunmoduláns és gyulladáscsökkentő gyógyszer tesztelésére használnak napjainkban. A szuszpenziót intraplantárisan és faroktöbbedva reumatoid artritiszhez hasonló gyulladáscsökkentő mechanizmusokkal destruktív monoarthritis indukálható egérben, ahol a gyulladási mechanizmusok akut és krónikus állapotában is vizsgálhatóak (Billiau al., 2001). Jelen kutatásunkban ezt az állatmodellt alkalmazzuk mert a perifériás gyulladás hatásait akartuk vizsgálni és többek között *in vivo* is bizonyítható a gyulladás megléte. Mindezen túl gyakori betegség, amely összefügghet a depresszióval is.

5. A *cannabis*, az endokannabinoid rendszer és terápiás lehetőségük

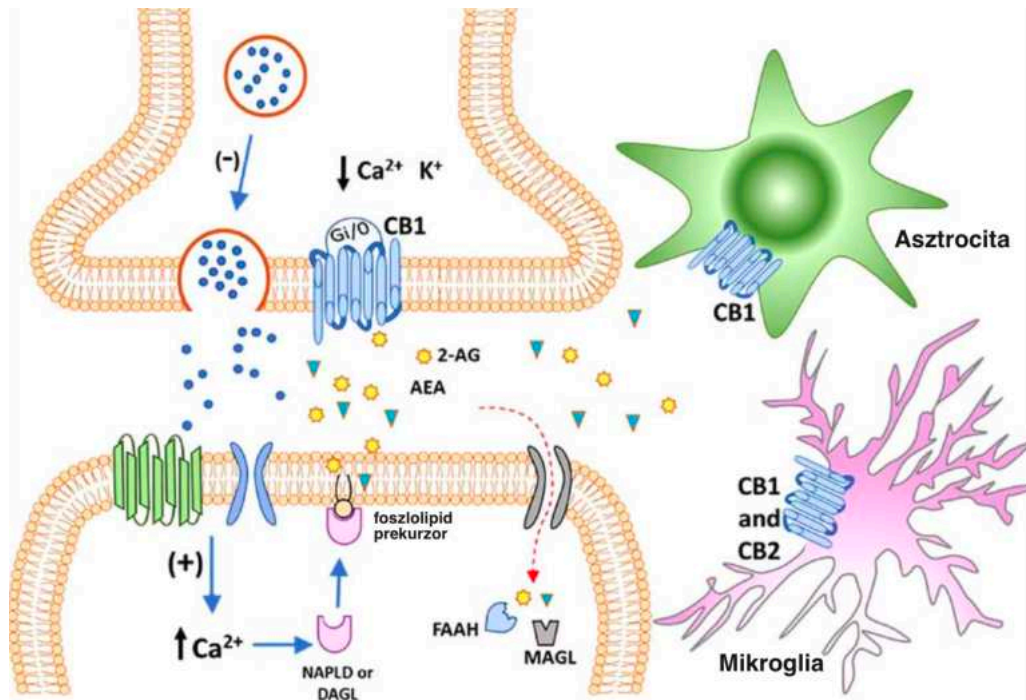
A *Cannabis sativa* a kétszikűek (*Magnoliopsida*) osztályába, ezen belül pedig a kenderfélék (*Cannabaceae*) családjába tartozik. A szárított, megtermékenyítetlen (termős) kendervirágzatot hívják marihuánának. A *cannabis* több mint 500 különböző vegyületet tartalmaz, ebből 60 farmakológiailag aktív kannabinoid. A *cannabis* számos másodlagos metabolitot is tartalmaz például terpéneket, amelyek közül néhány a kannabinoidokkal együtt szinergikusan hozzájárulhatnak a terápiás előnyökhöz (ElSohly et al., 2017). Széles körben elterjedt növény, amely számos élőhelyen és tengerszint feletti magasságban megtalálható, a tengerszinttől a Himalája alpesi lábáig (Merlin 2003). A *cannabis* termesztése és használata 5000-6000 éves múltra tekint vissza, ami megnehezíti a faj eredetének pontos meghatározását (Jiang et al., 2006). Ezenkívül az egyik legrégebb óta használt növényi élelmiszer- és textil rostforrás (Kriese et al., 2004). A *Cannabis sativa* gyógyászati felhasználásának története az ókorig nyúlik vissza. Az első beszámolók a növény gyógyászati felhasználásáról a Közel-Keletről és Ázsiából származnak az időszámításunk előtti 6. századból. A nyugati gyógyászatba való bevezetése jóval később, a tizenkilencedik század elején történt (Doyle és Spence, 1995, Zuardi 2006). Ezt a növényt a fájdalomra, a zöldhályogra, a hányingerre, a depresszióra és a neuralgia kezelésére javasolták (Guindon és Hohmann, 2009, Jarvinen et al., 2002, Slatkin, 2007 Viveros et al., 2007, Liang et al., 2004). A *cannabis* modern orvosi felhasználását, és a *cannabis* alapú gyógyszerek engedélyezett klinikai felhasználását továbbra is csak néhány betegségnél engedélyezik mint például a sclerosis multiplexnél fellépő fájdalomra, valamint a AIDS és kemoterápia során fellépő étvágytalanságra (Liang et al., 2004, Abrams et al., 2007).

A marihuána az egyik legszélesebb körben használt tiltott élvezeti szer és a Föld lakosságának körülbelül 2,5 %-a fogyasztja rendszeresen valamilyen formában (UNODC,

2017). A közelmúltban a *cannabis* használatot egyre több országban legalizálták gyógyászati és rekreációs célokra (Carliner et al., 2017; EMCDDA, 2017; Webster, 2018) ami megnövekedett fogyasztást eredményez, miközben az egészségre gyakorolt hosszútávú hatásai még nem teljesen ismertek (Volkow et al., 2014, 2016; Levine et al., 2017). Ezért is fontos megvizsgálni a marihuánafüst hosszantartó használatának következményeit. A marihuána lobbisták azzal érvelnek, hogy a marihuána biztonságos és természetes alternatív megoldást nyújthat különféle egészségügyi és mentális betegségben szenvedőknek, de a szakirodalmakban ellentmondó eredményeket olvashatunk a krónikus *cannabis* használat egészségügyi kockázatairól. A kannabidiolt (CBD), amely a *Cannabis sativa* egyik fő alkotóeleme és az endokannabinoid rendszer résztvevője, egyre gyakrabban tekintik a szorongás kezelésének lehetséges terápiás megoldásának (Blessing et al., 2015; Lee et al., 2017; Patel et al., 2017) mivel több kutatás szerint a kannabinoid jelátvitel elősegítése megelőzheti a stressz által kiváltott viselkedési változásokat (Campos et al., 2013; Scarante et al., 2017; Fogaça et al., 2018). A marihuána szorongásoldó hatékonysága máig vitatott kérdés mivel több kutatási eredmény szerint a marihuána által kiváltott öt mellékhatás közül az egyik maga a szorongás (Turna et al., 2017). A *cannabis* használatból adódó kognitív funkciók javítása vagy éppen károsodások közötti összefüggések is szintén vitatott témakör a kutatók körében. Számos klinikai és preklinikai kutatás szerint szoros összefüggés lehet a marihuána expozíció és a csökkent kognitív képességek között (Broyd et al., 2016; Curran et al., 2016; Volkow et al., 2016). A marihuána használata nem csak a kognitív funkciókra lehet káros hatással, hanem kiválthatja az agy makrostrukturális elváltozásait is. Megváltoztathatja a szürkeállomány morfológiáját, a fehérállományi traktus integritását is. Továbbá olyan rendellenes agyi működéseket eredményezhet, mint a fokozott agyi aktiváció, vagy rendellenes neurovaszkuláris működést indukálhat (Jacobus et al., 2012). Mindezekkel szemben egyes kutatások szerint a *cannabis* használat pozitívan hat különböző kognitív és végrehajtó funkciókra (Osborne et al., 2017; Gruber et al., 2018; Tervo-Clemmens et al., 2017). Továbbá, vita tárgyát képezik a rendszeres marihuánafüst belélegzésének légútra gyakorolt hatásai, valamint, hogy a tüdőrák kialakulására megnövekedett kockázati tényezőt jelentene (Gates et al., 2014; Martinasek et al., 2016; Chatkin et al., 2017; Stone et al., 2018). Ellentmondásos kutatási eredményeket olvashatunk a *cannabis* használat testsúlyra gyakorolt hatásairól is. Már ismert, hogy a marihuána fogyasztása serkenti az étvágyat és elősegíti a súlygyarapodást a humán immunhiányos vírussal (HIV) rendelkező-, vagy rákban szenvedő betegeknél. Ezzel szemben a népesség körében végzett kiterjedt epidemiológiai

vizsgálatok eredményei pedig azt mutatják, hogy a marihuána fogyasztók általában alacsonyabb testtömeg-indexekkel rendelkeznek (Sansone, 2014).

Az endokannabinoid rendszer központi szerepet játszik az egészséges fejlődő idegrendszer kialakulásában, valamint felnőttkorban modulálja az idegrendszeri hálózatok aktivitását és működését. Az endokannabinoid rendszer endogén kannabinoidokból vagyis az endokannabinoidokból, kannabinoid receptorokból és az endokannabinoidokat szállító, szintetizáló és lebontó fehérjékből áll, és az endokannabinoid rendszer számos más jelátviteli útvonalat befolyásol (Lu és Mackie, 2020). A kannabinoidok közé tartoznak a *Cannabis sativa* növény aktív összetevői, az endokannabinoidok és a szintetikus kannabinoidok is. Az idegi kannabinoid rendszer receptor–ligandum és receptor–receptor kölcsönhatások összetett sorozatát alkotja, amelyek különféle jelátviteli utakat is magukba foglalnak, mint például a növekedési faktor receptor és a G-protein receptor jelátvitelt, amelyek a fiziológiai folyamatok széles skáláját szabályozzák, például a felnőttkori neurogenezist is. A kannabinoidok a G-fehérjéhez kapcsolt 1-es és 2-es típusú kannabinoid receptorok aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat (CB1, illetve CB2 típusú receptorok), amelyek a központi idegrendszerben lokalizálódnak asztrocitákon, mikrogliaon és neuronokon is (Prenderville et al., 2015) (4. ábra). A kannabinoid receptorok nagymértékben expresszálódnak a hippokampusban is. A kutatások eredményei szerint a különféle kannabinoid ligandumok szabályozzák a sejtgenezist és a neurogenezist is az emlős agyban (Campos et al., 2013). Számos tanulmány vizsgálta már a különböző kannabinoidok felnőttkori hippokampális neurogenezisére gyakorolt hatását, de ezek a vizsgálatok vagy növényi eredetű kivonatokat vagy szintetikus kannabinoidokat használtak és egyes tanulmányok a pozitív, serkentő hatásról számoltak be (Jiang et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Marchalant és et al., 2009; Wolf és et al., 2010; Rivera et al., 2011; Suliman et al., 2018, Prenderville et al., 2015), míg mások szerint gátolja a felnőttkori neurogenezist a hippokampusban (Realini et al., 2011; Abboussi et al., 2014; Lee et al., 2014; Steel et al., 2014), vagy nincs hatása rá (Kochman et al., 2006; Maćkowiak et al., 2007; Steel et al., 2014). A legtöbb preklinikai kutatás vagy szintetikus kannabinoidokat, vagy *cannabis* kivonatokat használ a fiziológiai és viselkedési vizsgálatokban is. Általában az állatok a különböző dózisu szintetikus vegyületet befecskendezve kapják meg az akut vagy krónikus (10–14 napos) kezelési protokoll szerint.



4. ábra: Az endokannabinoid jelátvitel a felnőtt agyban.

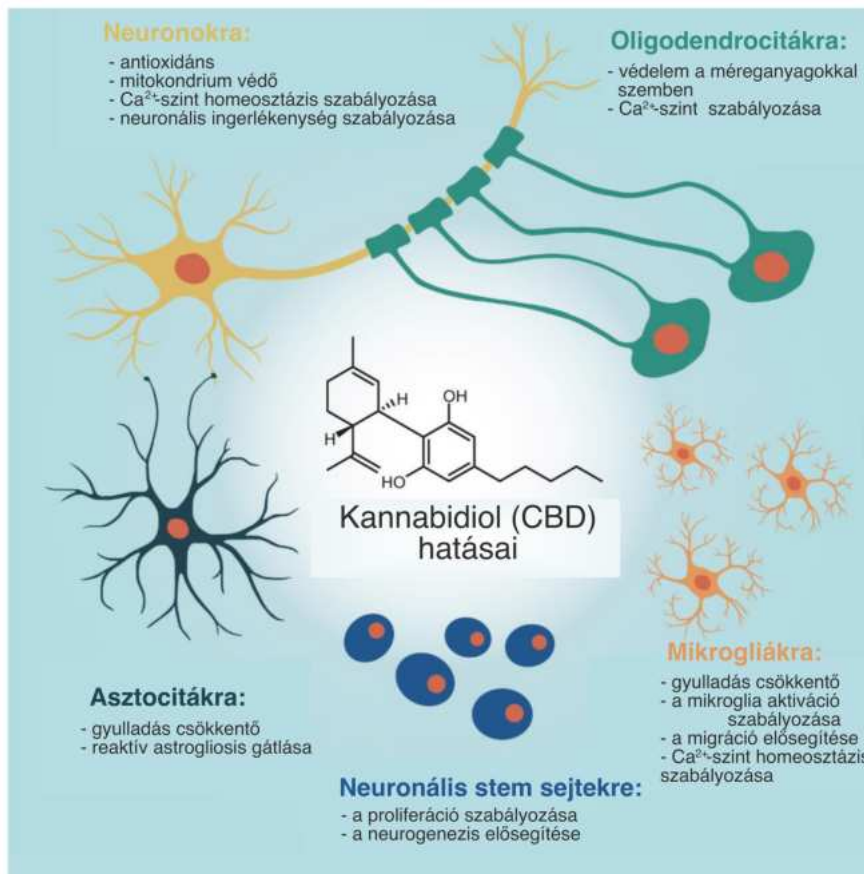
Az anandamid (AEA) és a 2-arachidonoil-glicerol (2-AG) kalcium (Ca^{2+})-függő módon (metabotróp vagy ionotróp receptor korábbi aktiválásával) képződik. Az endokannabinoidok speciális enzimek általi szintézise után aktiválják a pre-szinaptikus részen elhelyezkedő CB1 receptorokat. A CB1 egy Gi/o-kapcsolt receptor, aktiválása csökkenti a Ca^{2+} -áramokat és növeli a K^{+} -áramot, ami a neurotranszmitterek felszabadulásának gátlásához vezet. A 2-AG és az AEA hatását enzimatisz hidrolízis zárja; zsírsavamid-hidroláz (FAAH) és monoacilglicerol-lipáz (MAGL) lebontja az AEA-t, illetve a 2-AG-t. A CB1 receptor expresszálódik asztrocitákban és mikrogliaokban is, a CB2 receptor pedig aktivált mikrogliaiban, és feltételezhetően neuronokban is expresszálódik. Rövidítések: CB1: 1-es típusú kannabinoid receptor; CB2: 2-es típusú kannabinoid receptor; DAGL: diacil-glicerol-lipáz; NAPE-PLD: n-acil-foszfátidil-etanol-amin-specifikus foszfolipáz D (Oliveira et al., 2018).

6. A *cannabis* fő aktív hatóanyagai és hatásai különböző kórképekben

A *cannabis* sok bioaktív vegyületet tartalmaz, de a *cannabis*-hoz klasszikusan kapcsolódó pszichoaktív hatások többsége a *cannabis* fő pszichotróp összetevőjének, a Δ^9 -tetrahidrokannabinolnak (THC) és ennek a vegyületnek a kannabinoid receptorokkal való kölcsönhatásán keresztül valósul meg (Lu és Mackie, 2020). A THC a CB1 és a CB2 receptor részleges agonistája, az anandamiddal (N-arachidonoil-etanolamin; AEA) analóg vegyület (Pacher et al., 2006). A THC központi idegrendszerre gyakorolt hatásai közé tartozik a zavart pszichomotoros viselkedés, a rövid távú memória romlása, a fokozott étvágy, valamint az antinociceptív és hányinger-csökkentő hatások (Busto et al., 1989). A *cannabis* hosszú távú használatának ismert kockázatai tényezői közé tartoznak a csökkent IQ és agytömeg,

alacsonyabb kognitív funkciók, alacsony motiváció, rossz ítéletképesség, valamint előidézheti és ronthatja a pszichózist és a krónikus hörghurutot (Volkow et al., 2016) és mindezek a THC hatásainak tudhatóak be. A THC szív- és érrendszeri hatásai a krónikus *cannabis* használók körében már bizonyított, növeli a stroke és a szívroham kockázatát is (Wolf et al., 2013) mivel a THC aktiválja a vérlemezkéket a CB1 és CB2 receptorokon keresztül, ami a GPIIb-IIIa fokozott expressziójához és a VII faktor aktiválásához vezetett, amelyek erős trombogén fehérjék, és ezáltal stroke-ot és szívrohamot indukálnak (Deusch et al., 2004, Heiden et al., 1980). Egyes kutatások a THC jótékony hatásairól is beszámolnak, miszerint fájdalomcsillapító, izomrelaxáns és görcsoldó hatású (Pacher et al., 2006). Ezenkívül hörgőtágító (Williams et al., 1976), neuroprotektív antioxidáns (Hampson et al., 1998), és gyulladáscsökkentő hatása is van a kutatások szerint (Evans, 1991).

A kannabidiol (CBD) a *cannabis* másik összetevője, amely változó szinten van jelen a növényekben, és kölcsönhatásba lép az endokannabinoid rendszerrel, valamint más neuromoduláló rendszerekkel (5. ábra). A CBD-nek tulajdonítják a neuroprotektív hatásokat különböző neurológiai rendellenességekben, például mérsékli a reaktív oxigénfajták (ROS) túltermelését, segíti a kalcium (Ca^{2+}) homeosztázis fenntartását és a mitokondriális diszfunkció elleni védelemben is segít és helyreállítja a kóros neuronális aktivitásokat. Továbbá a CBD terápiás potenciállal rendelkezhet a gliasejteket célozva, beleértve a gliózist és gyulladás gátló hatását mikrogliaokban vagy asztrocitákban, valamint az oligodendrocitákra gyakorolt védő hatása is lehet. Az idegi őssejtekben (NSC) a CBD szabályozza a túlélést, a proliferációt és az idegi differenciálódást/érést is elősegíti (Kim et al., 2021).



5. ábra: A Kannabidiol hatásait összefoglaló ábra (Kim et al., 2021).

A kannabidiol a közelmúltban óriási érdeklődést váltott ki terápiás szerként (Ibeas et al., 2015), számos neuropszichiátriai rendellenesség kezelésében hasznosnak bizonyult, beleértve az autizmus spektrum zavart, szorongást, pszichózist, neuropátiás fájdalmat, rákos megbetegedésből adódó fájdalmat, migrént, sclerosis multiplexet, Alzheimer-kórt, Parkinson-kórt, Huntington-kórt, hipoxiás-ischaemiás sérülést és epilepsziát is (Chayasirisobhon, 2019) bár a kannabidiol molekuláris célpontjai továbbra sem tisztázottak (Ibeas et al., 2015). A CBD általában jól tolerálható és leggyakoribb mellékhatások a hasmenés és az aluszékonyosság (Chayasirisobhon, 2019). Állatokon végzett kutatások eredményei alapján a kannabidiol hasznosnak bizonyult gyulladásos és neuropátiás fájdalom kezelésére, ahol a kannabidiol per os adagolása antihyperalgéziás hatást fejtett ki patkányokban (Costa et al., 2004, 2007). 3 nM -os kannabidiol mikroinjekció a ventrolaterális periaqueductális szürkeállományba szabályozta az antinocicepció leszálló útvonalát (Maione et al., 2011).

CBD csökkenti a szorongást (Bergamaschi et al., 2011) is. A CBD szorongásoldó hatása alatt álló idegi mechanizmusokat képző technikáknak köszönhetően sikerült feltárni. A CBD beadása után a bal oldali halántéklebeny véráramlása csökkent és a bal amygdala aktivitása is mérséklődött (Stella et al., 1997). Továbbá kimutatták, hogy a CBD hatásosan csökkenti a pszichotikus tüneteket, mert a dopamin- és a glutamát által közvetített pszichózis szempontjából releváns útvonalakra is hatással van (Leweke et al., 2012) valamint a CBD felerősítheti a THC néhány jótékony hatását is, mivel csökkenti a THC pszichoaktivitását és ezáltal növeli a tolerálhatóságát is (Karniol et al., 1973). A CBD ellensúlyozhatja a CB1 receptor aktiválásának egyes funkcionális következményeit az agyban (Englund et al., 2013), a kutatók feltételezik, hogy az adenosin A1 receptorok aktivitásának közvetett serkentésével hozzájárul az egyensúlyban szerepet játszó nukleozid transzporter gátlásához (Schubart et al., 2011).

Számos kutatás szerint a *cannabis* hatékony terápiás potenciállal rendelkezik a migrénes fejfájás kezelésében. A kutatásban részt vevő migrénes felnőtt napi egy vagy annál több orvosi marihuánát fogyasztottak a migrén kezelésére vagy megelőzésére. A retrospektív vizsgálat során a marihuána inhalálása kevesebb mint felére csökkentette a migrén gyakoriságát. Ebben a tanulmányban a leggyakoribb mellékhatás az aluszékonyság volt (Rhyne et al., 2016). A *cannabis* migrénre gyakorolt pozitív hatásai is az endokannabinoid rendszerhez kapcsolódnak. Ami a CBD kannabinoid receptor-függő hatásait illeti, a CBD növeli az anandamid (N-arachidonoil-etanolamin; AEA) szintjét azáltal, hogy gátolja annak transzporter által közvetített újrafelvételét és a posztzinaptikusan található zsírsavamid-hidroláz (FAAH) általi lebomlását (Bisogno és Maccarrone, 2013) mivel a FAAH az anandamid lebontását közvetítő fő enzim (Rhyne et al., 2016). A CBD kötődik a zsírsavkötő fehérjékhez is, amelyek az anandamidot intracellulárisan szállítják a FAAH-hoz annak lebontása céljából, ami szerepet játszhat a CBD általi anandamid metabolizmus gátlásában (Locan et al., 2014, Kindred et al., 2017). Az anandamid szerotoninreceptor-válaszokat vált ki: az 5-HT_{1A} receptor fokozását és az 5-HT_{2A} receptor gátlását eredményezi (Boger et al., 1998). A periaqueductális szürkeállomány feltételezett migréngenerátor, amelyben az anandamid tónusos hatást fejt ki, és beadva fájdalomcsillapítást lehet kiválthatni, ha a CB1 receptor farmakológiailag blokkolt állapotban van (Walker et al., 1999). A migrén állatmodelljében az anandamid csökkentette a nitroglicerinnel kiváltott neurális aktivációt a nucleus trigeminalis caudalisban és az area postremában. Ezek az eredmények megerősítik az endokannabinoid rendszer fontos szerepét a migrénes epizódok kialakulásában (Greco et

al., 2011). Egy másik vizsgálat kimutatta, hogy a kannabinoid receptorok fő endogén agonistái vagyis az anandamid (N-arachidonoil-etanolamin; AEA) és a 2-arachidonoil-glicerin (2-AG) szintjei egyaránt jelentősen csökkentek az epizodikus, aura nélküli migrénben (Rossi et al., 2008). Mindezek tudatában tehát potenciális migrén elleni szer lehet a CBD mivel megnöveli az anandamid szintjét.

Az endokannabinoid és a terápiás kannabinoid használat terápiás megoldást jelenthet a szklerózis multiplex tünetek enyhítésében is. A szklerózis multiplex kísérleti egérmódeljein végzett vizsgálatok alapján a kannabinoidok a CB1- és CB2-receptorok stimulálásával csökkentették a rendellenes motoros tüneteket (Baker et al., 2001). Az endokannabinoidok részt vesznek az izommerevség szabályzásában és ha gátolják a metabolizáló enzimeik aktivitását akkor csökkennek a görcsök is (Iannotti et al., 2016).

A THC-t és CBD-t tartalmazó orálisan adható *cannabis* -kivonatok, a szájnnyálkahártyán alkalmazott *cannabis* -kivonatok, a nabiximolok (Sativex), a dronabinol (Marinol) és a nabilon (Cesamet), valamint a THC szintetikus orálisan adható változatai enyhíti a neuropátiás fájdalmat, az izommerevséget, a túlműködő húgyhólyagot és a szklerózis multiplex egyéb tüneteit is (Koppel et al., 2014, Torres- Moreno et al., 2018). Mindezek mellett fájdalomcsillapítás hatása lehet ezeknek a készítményeknek, mivel a kutatások szerint modulálja a perifériás hidegérzékeny tranziens receptorpotenciál (TRP) csatornákat (Turri et al., 2018).

Számos kutatás irányult a *cannabis* jótékony hatásainak feltárására Parkinson-kórban. A *cannabis*-szal kezelt Parkinson-kórban szenvedő betegek többsége az általános tünetek javulásáról számolt be, csökkent a remegés, az izommerevség és a fájdalom, valamint javultak a depressziós tünetek (Lotan et al., 2014). Ezeken a pozitív hatásokon felül sajnos a betegek nagy százaléka olyan nemkívánatos mellékhatásokról is beszámoltak, mint a zavartság, szorongás, hallucinációk, amnézia, pszichózis, köhögés, szédülés, és légszomj (Kindred et al., 2017). A dopaminerg neuronoknak nincs kannabinoid receptoruk, de a molekuláris vizsgálatok eredményei alapján lehetséges, hogy a kannabinoidok modulálják a dopamin jelátvitelt (Iannotti et al., 2016). A CB1 receptor nagy koncentrációban található a noradrenerg neuronokon a bazális ganglionokban, a caudatusban, a putamenben, a substantia nigrában, a globus pallidusban, a hippokampuszban és a kisagy molekuláris rétegében. A CB1 receptorok ezen specifikus lokalizációja megmagyarázhatja a *cannabis* kognitív és motoros aktivitásra gyakorolt hatásait (Maxwell et al., 2018). Ezenkívül a Parkinson-kóros

emberi agy post mortem vizsgálataiból az is kiderült, hogy a CB1 receptor szintje csökken a bazális ganglionokban (Hurley et al., 2003). Parkinson-kórban szenvedő betegek CBD kezelést kaptak, és az életminőség javulásáról számoltak be (Chagas et al., 2014). A CBD hatékony, biztonságos és jól tolerálható lehet a Parkinson-kór pszichózisának kezelésében (Zuardi et al., 2009). Továbbá a Parkinson-kórban szenvedő betegeknél a CBD enyhítette a remegést és az alvásproblémákra is jótékony hatással volt. A CBD Parkinson-kórban kifejtett hatásának magyarázata a G-fehérjéhez kapcsolt 6-os receptorhoz (GPR6) kapcsolódik. A GPR6-ot árva receptornak tekintik, mivel nincs endogén agonistája, azonban a GPR6 filogenetikailag rokon a kannabinoid receptorral. A kutatások eredményei alapján a CBD új inverz agonistaként működhet a GPR6 receptoron, ami azt jelentheti, hogy a CBD Parkinson-kórra gyakorolt lehetséges terápiás hatásai ezen a receptoron keresztül valósulhatnak meg (Laun et al., 2019, Brown et al., 2017).

A fenti kutatásokból látható, hogy a CBD hatóanyag számos terápiás potenciállal rendelkezhet a fájdalom, izommerevség és a központi idegrendszert érintő kórképekben is. Fentebb már említésre került, hogy a neurogenesis számos neuropszichiátriai és neurodegeneratív megbetegedésben szerepet játszik, és ezáltal a CBD potenciálisan hasznos vegyület lehet ezek kivédésére. Mindezekon túl a CBD-nek szorongásoldó hatása is van, csökkenti a depressziós tüneteket, a THC pedig javítja az étvágyat. Viszont a kutatások többnyire csak egyes hatóanyagokra korlátozódnak, a marihuánafüst, mint egy komplex, több vegyületet tartalmazó szernek a hatásait még nem ismerjük teljesen.

A *C. sativa*-n végzett kémiai vizsgálatok alapján eddig összesen 120 kannabinoidot izoláltak (ElSohly et al., 2017) ezért is fontos megemlíteni az egyéb kannabinoidokat is melyek megtalálhatóak a marihuánában és jótékony hatást tulajdonítanak nekik.

A kannabinol (CBN) a THC nem enzimatis oxidációs mellékterméke (Upton et al., 2013). A CBN nyugtató, görcsoldó hatású állatkísérletekben és humán vizsgálatokban, valamint jelentős gyulladáscsökkentő, antibiotikus és anti-MRSA hatást is mutatott (minimális gátló koncentráció 11 µg/ml) (Appendino et al., 2008; Evans, 2007; McPartland és Russo, 2001). Valamint alkalmazható pikkelysömörben szenvedőknél is (Wilkinson és Williamson, 2007). A CBN-nek TRPV2 agonista hatása is van, így az égési sérülések kezelésében is helyileg alkalmazható (Qin et al., 2008; Russo, 2014). Emellett serkenti a nyugalmi mezenchimális őssejtek szaporodását a csontvelőben, ezzel elősegítve a csontképződést (Scutt és Williamson, 2007).

Az elmúlt években több kutatás foglalkozott a cannabigerol (CBG) potenciális terápiás alkalmazási lehetőségeivel. A CBG egy alacsonyabb koncentrációban előforduló kannabinoid a marihuánában. Az állatkísérletek szerint a CBG-nek gyulladáscsökkentő és antibakteriális hatásai vannak, és enyhén vérnyomáscsökkentő szer is (Russo et al., 2011). A kutatások eredményei alapján a CBG rákellenes tulajdonságokat is mutatott, különösen mellrák ellen lehet hatékony. Ezenkívül gátolja az aldóz-reduktázt, amely közvetve növeli a vér glükózsintjét, ami cukorbetegséghez vezethet és ezáltal a CBG hatékony terápiás potenciállal rendelkezhet a cukorbetegség kezelésére (Zagožen et al., 2020). Valamint egy 2018-as állatkísérletben a CBG javította gyulladással járó bélbetegség tüneteit, amely az egyik leggyakoribb bélbetegség (Borelli et al., 2013). További kutatások szerint a CBG potenciálisan hatásos lehet az álmatlanság, a szorongás, a krónikus fájdalom kezelésére is (Cascio et al., 2009, Russo et al. 2011, 2022).

A tetrahydrocannabivarin (THCV) szintén egy kannabinoid, amely alacsonyabb koncentrációban fordul elő a marihuánában. A THCV a THC természetben előforduló analógja, de eltérő farmakológiai hatásokkal rendelkezik. A THCV nagy dózis esetén CB1/CB2 agonistaként, alacsony dózison pedig CB1/CB2-semleges antagonistaként viselkedhet (Pertwee et al., 2007). A THCV akut intraperitoneális beadása rágcsálókban 3, 10 és 30 mg/ttkg dózisban csökkentette a felvett tápanyag mennyiségét és az állatok súlyát is (Riedel et al., 2008). Egy másik kutatásban, ahol elhízott egereket vizsgáltak, orálisan adagolva a THCV (2,5–12,5 mg/kg) csökkentette a testzsírtartalmat, növelte az energiafelhasználást, valamint csökkentette az éhomi inzulin szintet és a 30 perces inzulinválaszt a glükóz tolerancia teszten (Wargent et al., 2013). Egy 2018-as humán klinikai vizsgálatban a THCV csökkentette a testsúlyt, a testzsír százalékot és az éhségérzetet (Jadoon et al., 2016). Feltehetően a THCV-t jelenleg több klinikai vizsgálatban is vizsgálják, hogy meghatározzák a potenciális terápiás alkalmazási lehetőségeit, mint például az étvágytalanság, a cukorbetegség, a testsúly és az érzelmi rendellenességek kezelésére.

A kannabikromén (cannabichromene -CBC) a nem pszichoaktív kannabinoidok egyike, amely gyulladáscsökkentő (DeLong et al., 2010), fájdalomcsillapító és nyugtató (Davis et al., 1983) hatású, valamint pro-apoptotikus és antiproliferatív hatásokat is mutat humán prosztata karcinóma, humán emlőkarcinóma, humán gyomor adenokarcinóma daganatsejtvonalakban (Izzo et al., 2009). A CBC-nek gombaellenes és antibakteriális hatása is van (Turner és Elsohly, 1981), és gátolja *Staphylococcus aureus* törzsek szaporodását is (Fellermeier et al., 1998).

A cannabidivarin (CBDV) hatásai még csak részlegesen ismertek, de a kutatási eredmények alapján émelygés és hányás kezelésére is alkalmas lehet (Rock et al., 2014). Ezenfelül a CBDV jelentős görcsoldó tulajdonságokkal rendelkezik, amelyek felvehetik a versenyt a CBD terápiás potenciáljával az epilepszia, különösen a részleges rohamok kezelésében (Williams et al., 2014).

7. Stressz hatásai a központi idegrendszerre

A mai rohanó világunkban már-már elfogadott, hogy mindennapi stressznek vagyunk kitéve. Szervezetünk stressznek éli meg a számunkra kellemetlen, fenyegető vagy veszélyes eseményeket legyen az akár külső tényező vagy a testünkben zajló folyamat (McEwen et al., 1998). A stressz hatására rövid távon mind a glükokortikoidok, mind a katekolaminok akut emelkedése segít a szervezet egészét felkészíteni a stresszhatás kivédésére, valamint elősegíti a stresszes események emlékké alakítását ezáltal egy védelmi funkciót is ellátnak (McGaugh et al., 2000, Roozendaal et al., 2000). A hippokampusz részt vesz az epizodikus, deklaratív, kontextuális és térbeli tanulásban és memóriában, valamint szerepet játszik az autonóm és vegetatív funkciók, például az ACTH szekréció szabályozásában is (Eichenbaum et al., 1992, Sapolsky et al., 1992), ezért hosszútávon a stresszhormonok és különösen a glükokortikoidok hozzájárulnak a kognitív funkciók károsodásához és az agyi struktúrák, például a hippokampusz károsodásához is (McEwen et al., 1995, Sapolsky et al., 1992). Többek között a hippokampusz neuronjai is expresszálják a mellékvese szteroidok receptorait. Kétféle mellékvese hormon receptort különböztetünk meg: az I. típusút (mineralokortikoid) és a II. típusút (glükokortikoid), melyek megtalálhatóak a hippokampuszban is és ezek a receptorok a neuronok ingerlékenységére gyakorolt különféle hatásokat közvetítenek, neurokémia- és szerkezeti plaszticitás változásokat eredményeznek (DeKloet et al., 1998). A hormonok által közvetített hatások nem csak a génexpresszióra vannak hatással, hanem a piramissejtek dendritjeinek átrendeződésére is az Ammon-szarvban (Kerr et al., 1992, McEwen et al., 2000). Akut stressz esetén az agy próbál a változó körülményekhez alkalmazkodni. Krónikus stressz esetén a plaszticitás sérül és az agy kevésbé lesz képes adaptálódni. A hosszantartó stressz hatására a lokális neurotranszmitterek, valamint a szisztémás hormonok kölcsönhatásba lépve strukturális és funkcionális változásokat idéznek elő az agyban, amelyek magukban foglalják a hippokampális neurogenesis gátlását is (McEwen et al., 2000). Stressznek kitett patkányoknál továbbá megfigyelhetőek olyan morfológiai elváltozások is mint például a gyrus dentatus, CA1 és CA3 régiók neuronjainak dendritfa

zsugorodása, dendritfán lévő tüskék számának csökkenése melyek hatására a szinapszisok száma is lecsökken, így az ingerültvezetési képesség már nem olyan hatékony, mint ép állapotban (Joëls et al., 2007). A hippocampális felnőttkori neurogenesis a neuroplaszticitás egyedülálló formája és az elmúlt húsz évben jelentős figyelmet kapott. Ezek a felnőttkorban újonnan született neuronok alapvető szerepet játszanak a normál kognitív működésben és a tanulásban (Denny et al., 2014; Anacker és Hen, 2017). A stressz erőteljesen gátolja a prekursor sejtek proliferációját, és gátolja az újonnan keletkezett neuronok túlélését is (Gould et al., 1997; Czéh et al., 2001, 2002; Cameron és Schoenfeld, 2018) és ezekből a kutatási eredményekből azt feltételezhetjük, hogy a neurogenesis gátlása révén a stressz szerepet játszhat különféle pszichiátriai rendellenességek kialakulásában, mint például a depresszióban, a szorongásban vagy a skizofréniában (Santarelli et al., 2003; Snyder et al., 2011; Surget et al., 2011; Kim et al., 2012; Schoenfeld and Cameron, 2015).

Célkitűzések

1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre

Kutatásunk legfőbb célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a periférián zajló gyulladás hogyan hat a központi idegrendszerre mivel erre irányuló kísérletes eredmények igen ellentmondásosak a szakirodalomban. Emellett célunk, hogy feltérképezzük, hogy az akut és krónikus ízületi gyulladásnak milyen hatásai vannak az egerek központi idegrendszerére és a felnőttkori neurogenesisre a hippocampusban.

Továbbá kutatásunk során szeretnénk bizonyítani azt a hipotézisünket, mely szerint a perifériás gyulladás hatására a periférián megjelent gyulladásos citokinek átjutnak a vér-agy gáton, vagy az agyban a gyulladásos citokinek expresszálódnak.

Hipotézisek

1. A periférián kialakult ízületi gyulladás negatívan hat a központi idegrendszerre, gátolja a neurogenesiset és ezzel párhuzamosan neuroinflammatorikus választ vált ki a hippocampusban.
2. A perifériás gyulladás hatására a központi idegrendszerben is fokozódni fog a citokinek mennyisége.

2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippocampális neurogenesisre

A fiatal felnőtt társadalom azon része, akik rendszeresen marihuánát használnak, azok szerint a marihuána oldja a stresszt ezért kutatásunk legfőbb célkitűzése az volt, hogy életszerű körülményeket imitáljunk ezért tehát kísérleti egereket több héten keresztül naponta stresszeltünk és a stressz expozíció végén az állatok marihuánafüstöt inhaláltak. Azt vizsgáltuk, hogy milyen hatása van a krónikus stressz és/vagy krónikus marihuánafüst expozíciónak a felnőttkori neurogenesisre. Ezen felül vizsgáltuk még a marihuánafüst expozíció hatását az állatok életműködésére (súlygyarapodás) és egészségi állapotára (légzésfunkciós tesztek) valamint az állatok magatartására kifejtett hatását is, részben kognitív magatartási tesztekkel, részben az állatok szorongási szintjét mérő vizsgálatokkal.

Hipotézisek

1. A marihuánafüstnek stresszoldó hatása van.
2. A marihuánafüstöt inhalált egereknél károsodik a légzésfunkció.
3. A krónikus stressznek kitett állatok súlygyarapodása csökken, a marihuána expozíciónak kitett állatoknál a súlygyarapodás fokozódik a kontroll egerekhez képest.
4. A krónikus marihuánafüst expozíció serkenti a neurogenézist, a krónikus stressz pedig gátolja azt.
5. A marihuánafüst hatására változnak - sérülnek vagy javulnak - a kognitív funkciók.

Kísérleti modellek, vizsgálati módszerek

1. Felhasznált Állatok

1.1. Artritisz állatmodell során használt egerek

A kutatás során 82 darab fiatal felnőtt (8-12 hetes) hím C57BL6/J törzsből származó laboratóriumi egeret (*Mus musculus*) használtunk fel, melyek a kísérlet kezdetén 18 ± 5 gramm tömegűek voltak. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházából származtak és a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpontjában lévő állatházban tartottuk konstans $24-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, és 12 órás világos-sötét ciklusban. Minden nap friss táp és víz állt az állatok rendelkezésére. Az állatkísérletet a 40/2013 (II.14.) számú állatkísérletekről szóló kormányrendelet, valamint a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelveket támogató nyilatkozatot betartva végeztük. Kutatásunkat a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága az Állatkísérletekről szóló Etikai Kódexének megfelelően jóváhagyta, a kísérlet végzésére etikai engedéllyel rendelkeztük melynek engedélyszáma: BA02/2000-28/2020 volt.

A kísérleti állatokat akut (7 napig tartó) és krónikus (21 napig tartó) kezelésnek tettük ki, mindkét csoportnál voltak kontroll és CFA-val kezelt állatok tehát 4 különböző csoportra osztottuk a randomizálás szabályai szerint:

1. csoport az **akut kontroll csoportot**, melyeken semmilyen expozíció nem történt.
2. csoport a CFA-val indukált akut artritisz csoport, más néven **akut CFA csoport**
3. csoport alkotja az **krónikus kontroll csoportot**, melyeken semmilyen expozíció nem történt.
4. csoport a CFA-val indukált krónikus artritisz csoport, más néven **krónikus CFA csoport**.

1.2. Krónikus stressz és marihuána expozíció során felhasznált egerek

A kutatás során 36 darab felnőtt hím NMRI törzsből származó laboratóriumi egeret (*Mus musculus*) használtunk fel, melyek a kísérlet kezdetén 20 ± 2 gramm tömegűek voltak. A kísérleti állatokat 4 csoportra osztottuk, csoportoként 9 darab állattal. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetének állatházában tartottuk konstans $24-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten, és 12 órás világos-sötét ciklusban. Minden nap friss táp és víz állt az állatok rendelkezésére, a stressz-paraméterként alkalmazott táp-, és

vízmegevonás kivételével. A krónikus stressz időszakában az egerek mozgásképtelen állapotban egy erre a célra rendelt csőben tartózkodtak. Az állatkísérletet a 40/2013 (II.14.) számú állatkísérletekről szóló kormányrendelet, valamint a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről szóló 2010/63/EU irányelveket támogató nyilatkozatot betartva végeztük. Kutatásunkat a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága az Állatkísérletekről szóló Etikai Kódexének megfelelően jóváhagyta, a kísérlet végzésére állatetikai engedéllyel rendelkezünk melynek engedélyszáma: BA02/2000-35/2016 volt.

A kutatás során az egereket 4 különböző csoportra osztottuk a randomizálás szabályai szerint.

1. csoport a **kontroll csoport**, melyeken semmilyen expozíció nem történt.
2. csoport a **stressz csoport**, ide tartoznak azok az állatok melyeket minden hétköznapi 6 órán keresztül krónikus stressz ért.
3. csoport egyedei minden hétköznapi napi 2x30 percen keresztül (hetente 10 alkalommal) marihuánafüstöt inhaláltak, ők alkotják a **cannabis csoportot**.
4. csoportba tartozó egerek hétköznaponként 6 órán át tartó stressz és a stresszelés időtartamának utolsó 2 órájában 2x30 percen keresztül (fél órás szellőztetési periódusokkal) tartó marihuána expozícióban részesültek, a csoport neve: **stressz+cannabis csoport**.

2. Kísérleti modellek

2.1. Komplet Freund adjuváns (CFA)-indukált artritisz modell

CFA-modell elterjedt krónikus ízületi gyulladásos modell. A Komplet Freund adjuváns 1 mg/ml koncentrációban tartalmaz hővel előlt Mycobacterium tuberculosis-t egy paraffinolajos szuszpenzióban (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), amelyből egereknek 20µl mennyiséget a jobb hátsó talpába és a faroktőbe subcutan injekcióval adva reumatoid artritiszhez hasonló gyulladásos mechanizmusokkal destruktív monoartritisz indukálható. A szisztémás hatások fokozása érdekében a CFA injekciót másnap is beadtuk a faroktőbe (20 µl). A 7 és 21 napos kísérleti periódusban lábduzzadás, mechanikai hiperszenzitivitás, spontán súlyeloszlás, valamint makrofág NADPH oxidáz és neutrofil mieloperoxidáz aktivitás meghatározása történt. A kísérletek végén nátrium-pentobarbitállal (Euthanimal, 100 mg/kg i.p.) túllaltatást követően szívpunkcióval vérmintát vettünk, illetve a transzkardiális perfúziót

követően az agyukat is eltávolítottuk, hogy utána fénymikroszkópos szövettani analízisre feldolgozzuk.

2.2. Marihuánafüst expozíciós állatmodell

A marihuána expozícióhoz, hogy életszerű helyzetet imitáljunk, egy teljes test marihuánafüst expozíciós modellt választottuk. Az állatok marihuánafüst expozíciójára 2-csatornás Teague Enterprise típusú kisállat dohányoztató készüléket alkalmaztunk. Az expozíció hétköznaponként történt, napi 2x30 percig, 2 hónapon keresztül. Egy expozíció során egyszerre 2 szál, cigarettánként 0,8 grammnyi marihuána égett el 10 perc alatt (2 másodperces pöfékelési időtartammal, 1/perc/cigaretta pöfékelési gyakorisággal), melynek füstjét 30 percen keresztül inhalálták be az állatok, egy 30 percig tartó szellőztetési periódussal zárva. A szárított marihuánát, amely $0,35 \pm 0,02$ tömegszázalékos tetrahidrokannabinol (THC) tartalmazott, az Egészségügyi Nyilvántartási és Képzési Központ Kábítószerügyi Főosztályának határozata alapján az Országos Rendőrfőkapitányság bűnjelkezelő szerve biztosította. A 3. csoportba tartozó, csak marihuánafüstnek kitett állatok a saját ketreceikben, míg a 4. csoportba tartozó, krónikus stressznek kitett állatok az erre a célra szolgáló csőben voltak a dohányoztató készülékbe helyezve az alkalmazott stressz időtartamának utolsó 2 órája során.

2.3. Kónikus stressz modell

Az egereket naponta 6 órán keresztül immobilizáltuk reggel 8:00 és 14:00 óra között. A stressz során az állatokat jól szellőző polipropilén csövekbe helyeztük (belső átmérő: 3 cm; hosszúság: 11,5 cm) az előzőleg már alkalmazott jól ismert protokoll szerint (Scheich et al., 2017). Az immobilizációs stressz alatt az egerek élelem és víz nem állt a rendelkezésükre, nem tudtak mozogni és tisztálkodni. A kontroll egerek nem voltak kitéve semmilyen stressznek, kivéve a mindennapi kezelést. Azért alkalmaztuk ezt a mozgás korlátozó stressz protokollt, mert ez a protokoll megterhelő a rágcsálók számára, és szerkezeti változásokat eredményez a hippokampuszukban, például dendritfa atrófiát okoz és csökkenti a felnőttkori neurogenézist a gyrus dentatusban (McLaughlin et al., 2007, Veena et al., 2009; Yun et al., 2010).

3. In vivo mérések

3.1. In Vivo technikák a perifériás gyulladás igazolására

3.1.1 Mechanikai hiperszenzitivitás mérés (DPA)

A hátsó végtagon, a mechanikai túlérzékenységet dinamikus plantáris eszteziométerrel határoztuk meg (DPA, Ugo Basile Dynamic Plantar 37400, Comerio, Italy) (6. ábra). Az állatokat egy alul rácsos 15 x 15 cm méretű plexi ketrecbe helyeztük, amiben szabadon mozoghattak. Egy tompa végű tüvel fokozatosan növekvő erővel nyomást gyakoroltunk az állatok hátsó talpára, majd, amikor fájdalmat éreztek, lábukat elrántották, a digitális számlálóról pedig a mechanonociceptív küszöbértéket olvastuk le. A mechanonociceptív küszöbértékeket grammban (g) fejeztük ki.



6. ábra: A dinamikus plantáris eszteziométer

3.1.2. Elhárító reakció latenciaidejének mérése (Hot Plate)

Az elhárító reakció latenciaidejét állandó (50°C) hőmérsékletű forró lappal (*hot plate*, IITC Life Science Woodland Hills, CA, Egyesült Államok) (7. ábra) határoztuk meg. A készülék legfontosabb része egy fémlap (10x20 cm), amihez egy mikroprocesszor által vezérelt fűtőkészülék tartozik. Az egereket egyenként a már 50°C-os fémlapra helyeztük. Amikor az állat elhárító reakciót mutatott (nyalni, rázni, emelgetni kezdte a lábát) vagy elértük a maximális időtartamot (20 másodperc, amely még biztosan nem okoz szöveti károsodást), a mérést leállítottuk, az állatokat pedig azonnal eltávolítottuk a fémlapról. A mérés vége után a termociceptív küszöbnek megfelelő időpontot leolvastuk a készülék kijelzőjéről.



7. ábra: Állandó hőmérsékletű forró lap

3.1.3. Lábtérfogat meghatározása

A lábtérfogat mérését pletizmométerrel végeztük (Ugo Basile Plethysmometer 7140, Comerio, Italy) (8. ábra). Az állat hátsó lábát előre meghatározott jelig egy ehhez a műszerhez tartozó folyadékkal teli hengerbe merítettük. Ehhez a hengerhez csatlakozott egy másik, folyadékkal teli henger, melyben a transzducer a láb bemejtésekor bekövetkező folyadéktérfogatkiszorítást érzékelt. A térfogatot cm^3 -ben leolvastuk a digitális kijelzőről. A vizsgálathoz szükséges, hogy az állatokat rövid ideig (max.1 perc) a hátbőrüknél fogva tartsuk, amit a kézhez szoktatás után általában jól toleráltak.



8. ábra: Pletizmométer a láb térfogat mérésére.

3.1.4. Spontán súlyeloszlás meghatározása

A hátsó lábakra való spontán nehézkesedés mértékét BioSeb tehetetlenség teszt (Vitrolles, Franciaország) segítségével állapítottuk meg (9. ábra). Az állatokat egy érzékelő szenzorra helyeztük, amelyhez egy műanyag megfigyelő kamra és egy kamera tartozik. A kamrában az állatok szabadon mozoghattak, amelyről felvétel készült. Az érzékelő feladata a jobb és bal lábra eső terhelés érzékelése volt. A kezelt lábra eső százalékos terheléscsökkenést egy szoftver segítségével határoztuk meg.



9. ábra: Bioseb készülék a hátsó lábakra való spontán nehézkesedés mérésére.

3.1.5. In vivo optikai képalkotás

A neutrofil mieloperoxidáz (MPO) aktivitását biolumineszcens *in vivo* képalkotással vizsgáltuk (IVIS Lumina II, PerkinElmer, Waltham, USA) (10. ábra). Luminolt (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinindion) (100 mg / kg, Gold Biotechnology, Olivette, MO, USA) steril foszfát puffer oldatban (PBS, 20 mg / ml) oldva intraperitoneálisan injektáltuk az elaltatott egerekbe (100/10 mg / kg ketamin-xilazin) a CFA beadása utáni 2. és 16. napon. A makrofág NADPH oxidáz aktivitás kimutatására biolumineszcens képalkotáshoz i.p. lucigenin (bis-N-metil-akridinium-nitrát) biolumineszcens kontrasztanyagot használunk. (50 mg / kg, Santa Cruz Biotechnology) steril foszfát puffer oldatban (PBS, 20 mg / ml) oldva intraperitoneálisan injektáltuk altatásban lévő egerekbe (100/10 mg / kg ketamin-xilazin ip) a CFA beadása utáni 4. és 18. napon. A vizsgálat után az állatokat a teljes ébredésig melegítő alá helyeztük és monitoroztuk életfunkcióikat. A biolumineszcencia képalkotást 10 perccel az injekció beadása után végeztük az IVIS Lumina II alkalmazásával. Az adatokat a Living Image® szoftver segítségével elemeztük (Perkin-Elmer, Waltham, USA) és a ROI-kból származó értékeket tüntettük fel a grafikonokon.



10. ábra: IVIS Lumina II készülék

3.2. Légzésfunkció vizsgálat

A légzésfunkciós vizsgálatot teljes test pletizmográfal végeztük (PLY 3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, Egyesült Királyság) (11. ábra) éber, spontán légző állaton, a két hónapos kezelés időtartama kezdetén intakt mérésenként, majd kísérlet alatt az első, valamint a második hónap végén. Minden mérést ön-kontrollos módon végeztünk el az összes állaton. A vizsgálatunk során BioSystem XA szoftver (Buxco Research System) segítségével a következő paramétereket mértük az egereken: légzés frekvencia, tüdőkapacitás, perc ventiláció, belégzési idő, kilégzési idő, csúcs belégzési áramlás, csúcs kilégzési áramlás, relaxációs idő, valamint a légúti válaszkészséget jellemző ún. elnyújtott szünet érték. A hörgőszűkületet a muszkarin receptor agonista carbachol 0, 11, valamint 22 mM-os koncentrációjú oldat porlasztásával idéztük elő.



11. ábra: teljes test pletizmográf készülék

3.3. Magatartási vizsgálatok

3.3.1. Y-útvesztő teszt (Y-maze test)

Az egereket magatartás vizsgálatoknak vetettük alá hétvégeként, mikor az állatokat nem érte akutan sem marihuána, sem stressz behatás. Az Y-útvesztő teszt az egerek rövid távú memóriájának felmérésére szolgál. A vizsgálatban az állatokat egyenként egy Y alakú műanyag útvesztőbe helyeztük, melynek minden karja egyenlő hosszúságú, és 5 percig videóval rögzítettük a mozgásukat. Az Y-útvesztő mindegyik vége egy kinevezett irány volt, tehát az egér 3 lehetséges irányba indulhatott el (jobbra-balra-középre); a vizsgálatok kezdetén az újonnan vizsgálni kívánt állatot mindig az útvesztő középpontjára helyeztük orral a középső kar irányába. A mozgássorozatot a 3 lehetséges irány kombinációjaként írtuk le, mely során az állatok tájékozódását, valamint iránytanulását vizsgáltuk a találati, illetve hibaszázalék mérésével, azaz az állat milyen sorrendben haladt végig az egyes karokon. Karba való belépésként azt tekintettük, amikor az állat törzse a kar 1/3 részét elhagyta.

3.3.2. Nyílt terep teszt (Open Field test, OF)

A teszt az egerek szorongási szintjének vizsgálatára és lokomotoros aktivitás mérésére szolgál. A magatartás vizsgálatát új környezetben egy négyzet alapú dobozban végeztük, melyet egyenlő méretű központi és perifériás négyszögekre osztottuk. A teszt szintén 5 percig tartott, az egeret a középpontra helyeztük a vizsgálat kezdetén és mozgásmintázatát, viselkedését videóval rögzítettük. A magatartás vizsgálat során az alábbi paramétereket mértük: 1. Középen töltött idő a vizsgálat kezdetén: az állat hány másodpercet töltött a központi zónában az első 90 másodpercben. 2. Az állat hány másodpercet töltött középen a 91 és 300 másodperc között. 3. Periférián töltött idő: az állat hány másodpercet töltött a széli zónában. 4. Lokomóció: az állat hány másodpercet töltött helyzetváltozással járó mozgással az 5 perces periódus során. 5. Önápolás: az állat hány másodpercet töltött mosakodással. 6. A teszt során elvégzett első mosakodás látencia ideje. 7. Sebesség: keresztezett négyzetek száma/mozgással töltött idő.

3.3.3. Új tárgy felismerési teszt (Novel Object Recognition Test, NOR)

A harmadik magatartás vizsgálat az új tárgy-felismerési teszt, amely a kognitív funkciókat vizsgálta, különösen a felismerési memória értékelésére használják. Egy 3 napos, 5-5 percig

tartó kísérletsorozatból áll, a kísérlet első napja a fent részletezett nyílt terep teszt volt, mely során az állat megismerkedett az új környezettel. A kísérlet második napján a dobozban kihelyeztünk megjelölt pontokra két ugyanolyan színű, formájú és méretű tárgyat (duplo kocka). A harmadik napon az egyik tárgyat kicseréltük egy eltérő színű, formájú és méretű tárgyra. A tesztet az új és ismerős tárgyak felismerési idejének különbségei alapján értékeltük. Az új tárgy felismerési teszt során az alábbi paramétereket mértük mindegyik állatnál:

1. A régi tárgyhoz milyen gyakorisággal mentek oda az állatok.
2. Az új tárggyal való foglalkozások száma.
3. Két tárggyal való foglalkozás összesített ideje.

Ezekből az értékekből számolható a Rekogníciós index, valamint a Diszkriminációs index az alábbi képlet segítségével:

Rekogníciós index (%) = új tárggyaltöltött idő / (régi + új tárggyal töltött idő) x 100

Diszkriminációs index = (új tárggyal töltött idő-régi tárggyal töltött idő) / (régi + új tárggyal töltött idő)

4. Post mortem szövettani módszerek

4.1. Szövetek előkészítése immunhisztokémiai módszerekre

Az állatok a perfundálás előtti 3. és 4. napon intraperitoneálisan BrdU injekciót kaptak (200mg/kg, ip). BrdU-t oldottuk 0,007 N NaOH-ot tartalmazó steril 0,9% -os fizioiogiás sóoldatban 15 mg / ml koncentrációban. A BrdU egy timidin analóg vegyület, így beépül a DNS-be és az újonnan keletkező neuronok kimutathatóvá válnak. A leölés napján az egereket túlaltattuk ketamin-xylazin oldat intraperitoneális beadásával (0,1ml oldat / testtömeg gramm). Amikor az egerek nociceptív reflexei megszűntek megkezdtük a perfundálást. A mellkas felnyitása után a bal kamrába vezettünk egy infúziós rendszerrel összeköttetésben lévő tüt majd az első két percben 4°C-ra lehütött 0,9%-os fizioiogiás nátrium-klorid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk, vagyis átmostuk az artériás rendszert. Ezt követően tizenöt-húsz percig 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk. A fixálás végeztével az egereket dekapitáltuk és 4%-os paraformaldehidbe helyzetük a fejüket. Másnap a koponyából óvatosan kipreparáltuk az agyat, vigyázva, nehogy megsértsük az egér lágy agyszövetét. Az agyakat 0,1 M-os foszfát pufferben (PBS) tároltuk a további felhasználásig. Következő lépésként 50µm-es vastagságú agymetszeteket készítettünk az az egerek agyából vibratóm

(Leica VT1200 S automata vibratóm) segítségével. A koronális sorozatmetszeteket készítettünk a septotemporalis tengely mentén és a teljes hippocampuszt feldolgoztuk, melyeket 24 lyukú lemezben tároltunk és 0,05% nátrium-azidos 0,1M.-os foszfát puffert (pH 7,4) adtunk hozzá, melyeket a festésig 4 ° C-on tároltuk.

4.2. BrdU immunhisztokémia

A BrdU immunhisztokémiai kezelést megelőzően metszeteket előző nap felhúztuk felületkezelt Superfrost plusz tárgylemezre (Menzel-Glaser, Braunschweig, Németország). Másnap az alábbi protokoll szerint jártunk el: Először is nagyon fontos kiemelni, hogy minden lépés után háromszor tíz percig tartó 0,1M TRIS pufferoldatban mosást végeztünk a tárgylemezeken lévő metszeteken. Mivel a BrdU kedvezőbb eredményt ad hideg környezetben, ezért a TRIS oldatunk mindig hűtöttnek kell lennie. Második lépésként DNS-t denaturáltuk. A 0,1M citrátos oldatot előforraltuk 5 percig, majd ezt követően a lemezeket behelyeztük a 95 ° C-os oldatba 20 percre. Ezt követte egy húsz perces 1%-os hidrogén-peroxidos mosás, melynek célja a nonspecifikus peroxidáz enzimek inaktiválása. Ezután következett a tíz percig tartó membrán permeabilizáció 0,1%-os tripszinnel. A következő lépésben 2 M-os hidrogén-klorid oldatba helyeztük a metszeteinket harminc percig. Majd a blokkolás fázisa következett, 3%-os normál kecske szérumot (normal goat serum, NGS) szuszpendáltunk 0,5%-os Triton X-el PBS oldatba, így a nem specifikus kötődést megakadályoztuk. Majd a primer antitestet használtunk, amely jelen esetben egy egér Anti-BrdU antitest (DAKO, Bu20a klón, katalógusszám: M074401) volt 1:5000-hez hígításban, melynek inkubációs ideje egy éjszaka 4 ° C-on. Ez az immunhisztokémiai eljárást az avidin-biotin / diaminobenzidín vizualizációs módszerrel (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) végeztük, így másodlagos antitestként biotinizált anti-egér IgG-t (1:200) alkalmaztunk, melynek inkubációs ideje egy óra, 4 ° C-on. Ezután következett a 2 óráig tartó Avidin-Biotin Complex (1:200, Vectastain Elite ABC Kit, Vector) alkalmazása 4 ° C-on, majd a DAB-os reakció (1: 200, DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories). Ez a lépés után a dehidráció következett, melynek során 70%-os, 90%-os, 96%-os, és végül 100%-os alkoholba majd xilol oldatba helyeztük a lemezeinket 10-10 percekre. Végezetül Eukitt (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) fedőanyaggal fedtük a metszeteinket. A képeket egy Nikon Eclipse Ni-E mikroszkóp (Nikon Instruments Inc., Melville, USA) rendszerrel készítettük, valamint, hogy biztosítsuk az objektivitást a számszerűsítés előtt kódoltuk a

mintákat majd Neurolucida program segítségével meghatároztuk a gyrus dentatus területét, és manuálisan az újonnan született idegsejtek számát is.

4.3. Doublecortin immunhisztokémia

Az anti-doublecortin immunhisztokémiai módszerrel az 50 μ m vastagságú úsztatott agy metszetek megfestése 3 lépésben történt. A szabadon lebegő metszeteket 0,1 M PBS-ben 3x10 percig mostuk, majd 30 percen keresztül 3%-os hidrogén-peroxiddal kezeltük. A nonspecifikus kötődések meggátolása céljából az agyszeleteket egy órán keresztül 3%-os Bovine Albumin blokkolóban (Triton X-100-t tartalmazó PBS-ben) inkubáltuk. Ezt követően a metszeteket egy éjszakán át 4 ° C-on kecske anti-DCX antitesttel (Cell Signaling Technology Catalog # 4604) kezeltük (hígítás: 1:3000). Mosás után a metszeteket anti-kecske biotinizált szekunder antitesttel (1: 200, VectorLaboratories) inkubáltuk 2 órán keresztül. Ezután következett a 2 óráig tartó Avidin-Biotin Complex (1:200, Vectastain Elite ABC Kit, Vector) alkalmazása, majd a DAB-hívás (1: 200, DAB Peroxidase Substrate Kit, Vector Laboratories). Ezt a lépést követte a metszetek tárgylemezre való felhúzása majd a dehidráció fázisa, melynek során 70%-os, 90%-os, 96%-os, abszolút alkoholba majd xilol oldatba pihentettük a lemezeinket 10-10 percre. Végezetül Eukitt fedőanyag segítségével fedtük a tárgylemezeinket. A képeket a Nikon Eclipse Ni-E mikroszkóp rendszerrel készítettük, hogy biztosítsuk az objektivitást a számszerűsítés előtt kódoltuk a mintákat majd Neurolucida program segítségével meghatároztuk a gyrus dentatus területét, és manuálisan az újonnan született idegsejtek számát is.

4.4. Iba-1 immunhisztokémia

Az Iba-1 immunhisztokémiai jelöléssel a mikrogliaikat tettük láthatóvá az agyszeleteken. A módszer nagyon hasonló a fent említettekhez. A szabadon úszó metszeteket 0,1 M-os PBS-ben mostuk majd 30 percig 3%-os hidrogén-peroxiddal kezeltük. Ezt követően 1 órán át 3%-os normál kecskeszérumot (NGS; Vector Laboratories) valamint 0,5% Triton X-100-t tartalmazó PBS-ben inkubálva megakadályoztuk a nem specifikus kötődést. Ezt követően egy éjszakán át 4 °C-on poliklonális nyúl anti-Iba1 antitesttel (1) inkubáltuk (1: 2000, FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Németország, katalógusszám 019-19741). A metszeteket ezután nyúl elleni biotinilezett másodlagos antitesttel (1:200; Vector Laboratories) 2 órán át inkubáltuk, mostuk majd avidin-biotin komplexben (1:200;

Vectastain Elite ABC Kit, Vector) 2 órán át inkubáltuk. A jelölt sejteket DAB-reakcióval tettük láthatóvá. A metszeteket tárgylemezre tettük, szárítottuk és felszálló alkohol sorban dehidratáltuk, végül fedőlemez és Eukitt segítségével rögzítettük a metszeteket. A lépések közt háromszor tíz percre mostuk a metszeteket 0,1 M PBS-ben.

4.5. CD68 immunhisztokémia

A CD68 immunhisztokémiai jelöléssel az aktivált mikrogliaikat és makrofágokat tettük láthatóvá a hippocampusban. A módszer lépései szinte megegyeznek az előzőekben leírtakkal, egyedüli különbség a felhasznált primer antitest volt. Az immunfestés során nyúl monoklonális anti-CD68 antitestet (1:1000, AbCam, Cambridge, Egyesült Királyság, katalógusszám: 283654) használtunk.

4.6. Az immunpozitivitás mértékének meghatározása

Randomizálást és titkosítást követően a sejtszámlálást a NeuroLucida (7. verzió) rekonstrukciós rendszer (Microbrightfield, Colchester, VT, USA) segítségével végeztük, amelyhez csatlakozott egy Nikon Eclipse fénymikroszkóp (12. ábra) is, aminek a segítségével a sejteket 20-szoros nagyítás alatt vizsgáltuk. A sejtek mennyiségi meghatározásához módosított sztereológiai protokollt használtunk (Czéh et al., 2001). A BrdU+, DCX+, Iba1+ és CD68+ sejteket szisztematikusan számoltuk az 50 µm vastag metszetekből álló teljes metszet sorozatban, a hippocampális formáció teljes szeptotemporális tengelye mentén kiindulva (-0,94 és -3,88 között a Bregmához képest) (Franklin et al., 2008). Sorozat metszetekből minden negyedik metszetet megvizsgáltunk, amely állatonként 13-15 metszetet jelentett. BrdU+ és DCX+ t sejtréteget a szubgranuláris zónában két sejttest széles zónaként határoztuk meg. A szemcsesejtréteg belső határa mentén, mérettől és alaktól függetlenül manuálisan megszámláltuk a sejteket. Az Iba1+ sejteket, valamint a CD68 + sejteket a gyrus dentatus szemcsesejtréteg felső része, valamint a hilus közötti területen számoltuk. BrdU+ és DCX+ sejtek esetén a jobb és a bal agyféltek gyrus dentatusát is vizsgáltuk így a teljes sejtszám mindkét félteke összes neuronszámaként szerepel. Az Iba1- és CD68+ sejteket állatonként 7 metszetben számszerűsítettük, és az eredményeket sejt sűrűségben fejeztük ki (sejtszám/mm³).



12. ábra: Nikon Eclipse fénymikroszkóp

5. Egyéb mérések

5.1. Vérvkép elemzés

A leölés alkalmával szív punkcióval vért vettünk az állatokból és a csecsemőknél használatos 250 μ l-es K₂EDTA csőben (Becton Dickinson, Magyarország) tároltuk. A vérelemzéseket egy automata kisállat hematológiai analizátorral (Sysmex XN-V) határoztuk meg. Az alábbi paramétereket mértük: Fehérvérsejt szám, vörösvérsejt szám, trombocita szám, hemoglobin koncentráció, neutrofil granulocita, bazofil granulocita, eozinofil granulocita, limfocita, valamint monocita szám és százalékos megoszlás.

5.1.2. A gyulladáshoz kapcsolódó citokinek koncentrációjának mérése

A leölés alkalmával szövetmintákat gyűjtöttünk, hogy a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek koncentrációját megmérjük a boka-ízületben és a hippokampuszban. A kimetszett boka ízületeket, valamint az agy hippokampusz részét 10 mg / ml fenil-metán-szulfonil-fluoridot (PMSF; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó proteáz inhibitor tartalmú jéghideg PBS-be helyeztük, jégen homogenizáltuk Micra D-9 Digitronic készülékkel (Art-modern Labortechnik, Müllheim, Németország) és 10 percig centrifugáltuk (4 °C, 12 500 fordulat / perc). A plazmát és a homogenizátumok felülúszóit -80 ° C-on tároltuk a mérésekig.

Luminex multiplex immunoesszé vizsgálatot végeztünk 8 jellegzetes gyulladáshoz kötődő citokin koncentrációjának meghatározására egy erre a kutatásra egyedileg tervezett Milliplex egér citokin / kemokin mágneses gyöngypanel segítségével (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). A vizsgált citokinek és kemokinek az alábbiak voltak: IL-1a, IL-4, IL-6, IL-10, KC, MIP-2, TNF-a, IL-16.

5.1.3. Vizelet marihuána tartalmának meghatározása

A kannabinoidok 97%-a plazmafehérjéhez kötődnek, minden szövetbe behatolnak, a vesében felhalmozódnak és vizelettel ürülnek (Nahas et al., 1981, Nahas és Latour, 1992). Ezért a krónikus marihuána expozícióban részesült állatok vizeletéből kannabinoid koncentrációt mértünk. A vizelet analitika a Pécsi Tudományegyetem Igazságügyi Orvostani Intézetében történt. A vizeletmintákat (egérenként 200-350 µl) az egerek hólyagjára gyakorolt finom, de határozott nyomásra reflexszerűen beindult hólyagürüléssel gyűjtöttük, és a mérésig + 4 ° C-on tároltuk. A delta-9-THC (tetrahydrocannabinol), cannabidol, cannabiol, valamint 11-nor-9-carboxy-THC koncentrációt fluorimetriás polarizált immunvizsgálattal határoztuk meg a kalibrált 25-135 µg / ml-es kimutatási tartományon belül a kontroll reagenshez képest.

Kisózással segített folyadék-folyadék mikroextrakciós méréseket végeztünk egy ACQUITY UPC2 szuperkritikus folyadékkromatográfiás rendszerrel (Waters), amelyhez Xevo TQ-S Triple Quadrupol Mass Spectrometer (Waters) kapcsolt. Az adatokat MassLynx szoftverrel (V4.1 SCN950) rögzítettük, és TargetLynx XS szoftverrel értékeltük ki. A vegyületek szétválasztását 3,0 mm × 100 mm-es, 1,7 µm szemcseméretű ACQUITY UPC2 Torus DIOL analitikai oszlopon (Waters) végeztük. A mozgófázis szén-dioxid és 5 mM ammónium-hidroxid metanolos elegyből állt, áramlási sebessége 1,2 ml/perc volt. A következő gradiensprofil alkalmaztuk: 99,9% a 0. percnél és 82,0% a 4,5. percnél. Minden minta beinjektálás előtt 2 percig tartó előkiegyenlítési időszakot alkalmaztunk. A szuperkritikus állapot fenntartására állandó 200 bar ellennyomást alkalmaztunk. A hőmérsékletet 45 °C-ra állítottuk be, és a beinjektált minta térfogata 1 µL volt. A megfelelő elektropray fenntartása érdekében további 5 mM ammónium-hidroxid metanolos oldatot alkalmaztunk 0,1 ml/perc áramlási sebességgel. Ezt az oldószert Waters 515 HPLC Pump szállította.

Az tömegspektrometriás (Mass Spectrometry, MS) mérés pozitív ion módban történt. Az ESI forrást 3,00 kV permetfeszültséggel üzemeltettük, a kúpos feszültség 30 V volt. A forrást

150°C-ra állítottuk be. Mind a deszolvatációs, mind a kúpos gázok nitrogént szállítottak 300 l/perc, illetve 150 l/perc sebességgel. A deszolvatációs gázt 300 °C-ra melegítettük. Az ütközőgáz argon volt, áramlási sebessége 0,13 ml/perc. Az MS/MS kísérleteket MRM (multiple response monitoring) módban végeztük, öt fragmentumot monitorozva optimális ütközési energiával.

5.1.4. Marihuánafüst összetevőinek meghatározása

A nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) és kromatográfias körülmények:

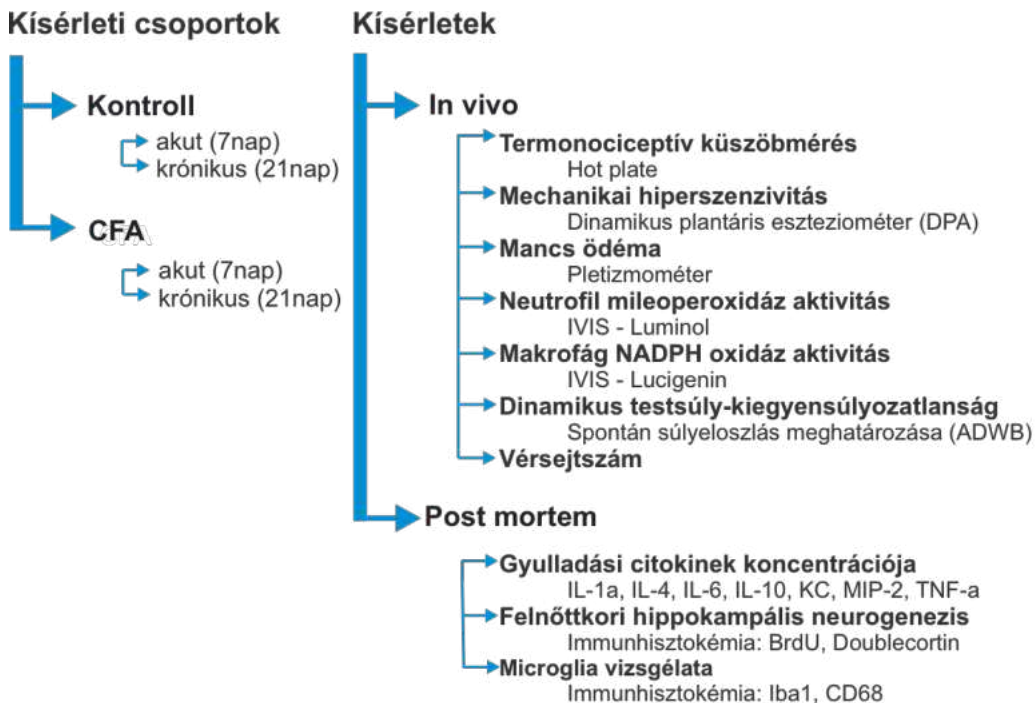
Két $0,77 \pm 0,03$ g marihuánát tartalmazó cigarettát készítettünk elő, és a dohányoztató készülékben elégettük. A képződött marihuánafüstöt vákuumszivattyúval egy metanolt tartalmazó gázmosó palackon pumpáltuk át. A mintát 5 cm^3 metanolban feloldottuk és membránszűrőn ($0,2 \mu\text{m}$) szűrtük. A használt HPLC rendszer egy Dionex P680 gradiens szivattyúból (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, Egyesült Államok), egy hélium gáztalanító rendszerből, egy $20 \mu\text{l}$ -es hurokkal ellátott Rheodyne 8125 befecskendező szelepből (Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Németország) és egy Dionex 340D UV-vis diódasoros detektorból (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, Egyesült Államok) állt össze. Az eluátumot környezeti hőmérsékleten, különböző hullámhosszakon, 209, 210 és 220 nm-en vizsgáltuk, ahol a vizsgált kannabinoidoknak abszorbancia-maximuma van. A kromatográfias elválasztást Kinetex, C18 fordított fázisú oszlop használatával ($2,6 \mu\text{m}$, $2,1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ belső átmérőjű) végeztük. A berendezés vezérléséhez és az adatok kiértékeléséhez Chromeleon adatkezelő szoftvert (6.60 SP3 Build 1485, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, Egyesült Államok) használtuk. A csúcokat a retenciók és a megfelelő vegyületek UV-spektruma alapján azonosítottuk, összehasonlítva a referencia értékekkel. A mennyiségi meghatározást a csúcsterületek módszerével végeztük. Minden mérésnél párhuzamosan három mérést végeztünk, és azok átlagolt értékeivel számoltunk. Minden kísérletet 25 °C -on végeztünk.

6. Statisztikai elemzések

Az eredményeket átlag \pm SEM értékben fejeztük ki. Az adatok elemzését a GraphPad Prism 7-es verziójával végeztük. A viselkedési adatokat két-utas ismételt mérési pontokat tartalmazó varianciaanalízissel (ANOVA) vagy két-utas ANOVA-val (idő \times CFA-kezelés), majd Sidak többszörös összehasonlításával post hoc teszttel elemeztük. Az *in vivo* képalkotó adatokat, a vérsejtszámot, a citokinkoncentrációt és a sejtszámokat a hippocampus gyrus dentatusában két-utas ANOVA-val (idő \times CFA-kezelés) elemeztük, majd Tukey post hoc teszttel egészítettük ki. A testtömegre és a tüdőfunkciós tesztekre vonatkozó adatokat háromutas ANOVA-val (idő \times stressz \times *cannabis* kezelés) elemeztük, majd Tukey többszörös összehasonlításával végeztük a post hoc tesztek. A többi adatot két-utas ANOVA-val (stressz \times *cannabis* kezelés) és Tukey post hoc teszttel elemeztük. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ értékre állítottuk be.

7. Kísérleti terv és időbeosztás

1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre



Tesztek akut fázisban	akut		1. hét						
	BL	0	1	2	3	4	5	6	7
ADWB									
Hot plate	3x								
DPA	3x								
ADWB	1x								
Pletizmométer	3x								
IVIS-Luminol									
IVIS-Lucigenin									
BrdU									

Tesztek krónikus fázisban	krónikus		1. hét							2. hét							3. hét						
	BL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
CFA																							
Hot plate	3x																						
DPA	3x																						
ADWB	1x																						
Pletizmométer	3x																						
IVIS-Luminol																							
IVIS-Lucigenin																							
BrdU																							

13. ábra: Kísérleti terv

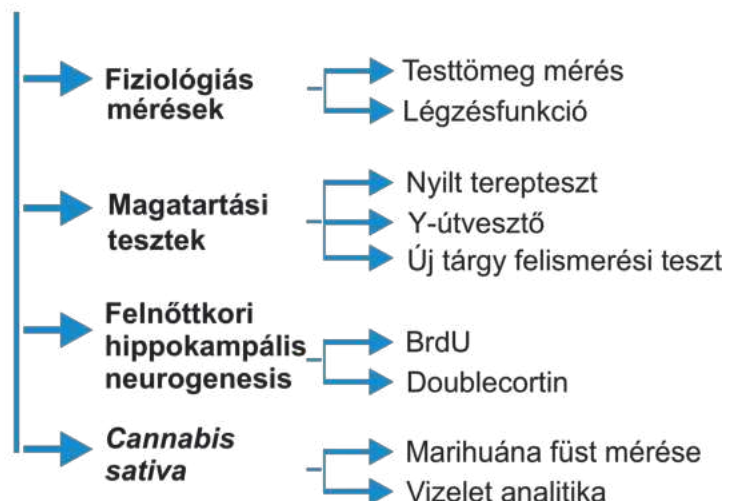
Kutatásunk során az ábrán látható csoportokra osztottuk az állatainkat és az alábbi *in vivo* és post mortem vizsgálatokat végeztük el. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns, CD68: differenciálási klaszter 68, DCX: doublecortin, Iba1: ionizált kalciumkötő adaptermolekula 1, IL: interleukin, TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa, BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin, KC: Keratinocita kemoattraktáns, MIP-2: makrofág gyulladási protein-2.

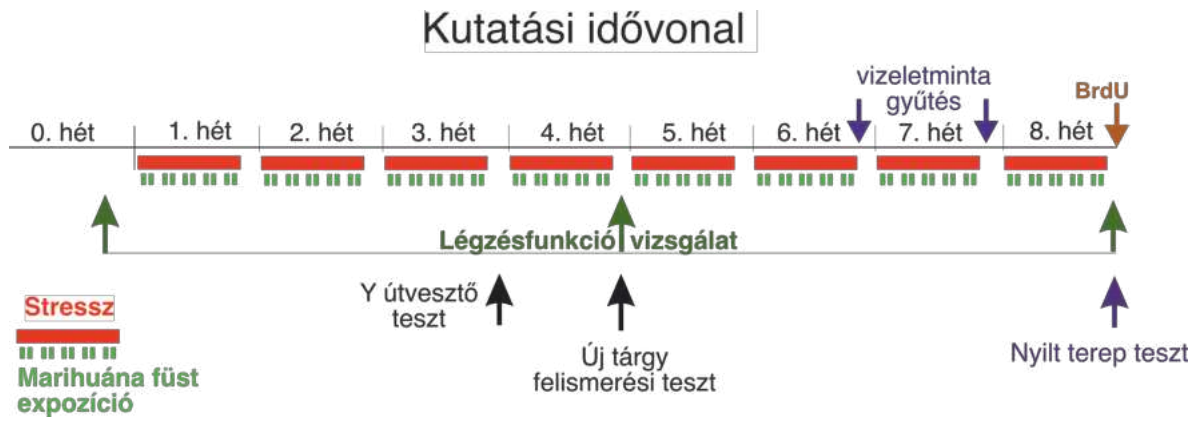
2. A krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és hippocampusukban zajló felnőttkori neurogenesisre

Kísérleti csoportok



Kísérletek





14. Ábra: Kísérleti terv

A csoportok beosztása, valamint az elvégzett vizsgálatok láthatóak az ábrán.

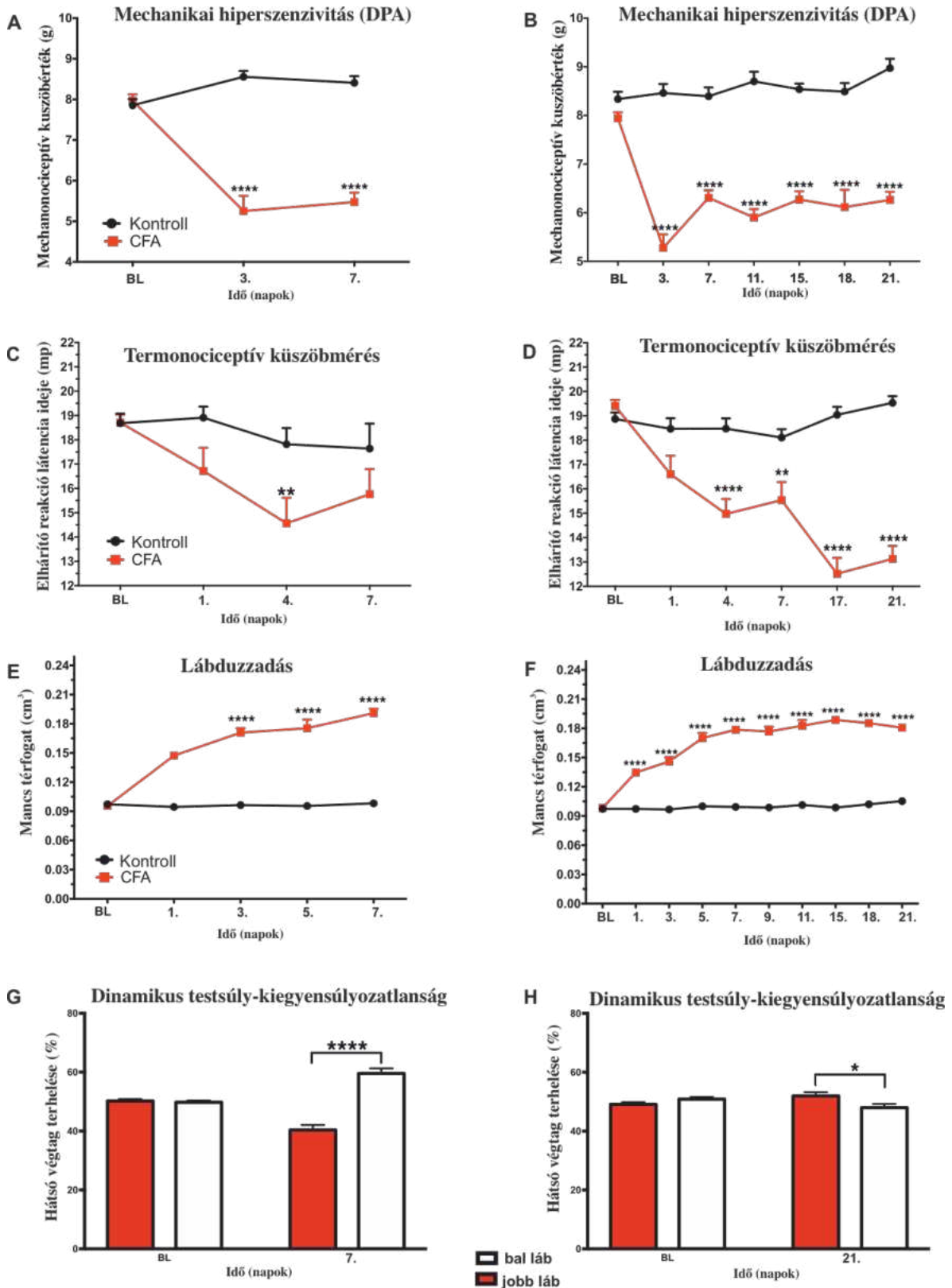
Rövidítések: BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin,

Eredmények

1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre

1.1. Magatartási és fájdalom tesztek

A CFA kezelés a hátsó mancsokban ödémát, termikus és mechanikai hiperalgéziát, valamint felborult súlyeloszlást idézett elő. A CFA injekciót kapott állatoknál a hátsó láb krónikus fájdalmára utaló viselkedési minták jelentkeztek a fájdalom tesztek során (15. ábra). A harmadik naptól kezdve érzékenyebbek voltak a mechanikai (15. A-B ábra) valamint a termikus ingerekre (15. C-D ábra), a fájdalom küszöb értékeik csökkentek, a fájdalom forrásától való eltávolodást hamarabb megkezdték, mint a kontroll csoportban lévő állatok. A CFA-val kezelt állatok hátsó lábának tartós ödémája is megfigyelhető (15. E-F ábra). Ezenkívül az ízületi gyulladásban szenvedő állatok testsúly-eloszlása is felborult, a nem kezelt, vagyis az ép lábukra helyezték testtömegük jelentős részét az akut gyulladás fázisban (15. G ábra). Összességében az eredmények azt mutatják, hogy a CFA-val kezelt állatok akut és krónikus fájdalomtól is szenvedtek, ami a gyulladás tipikus velejárója.



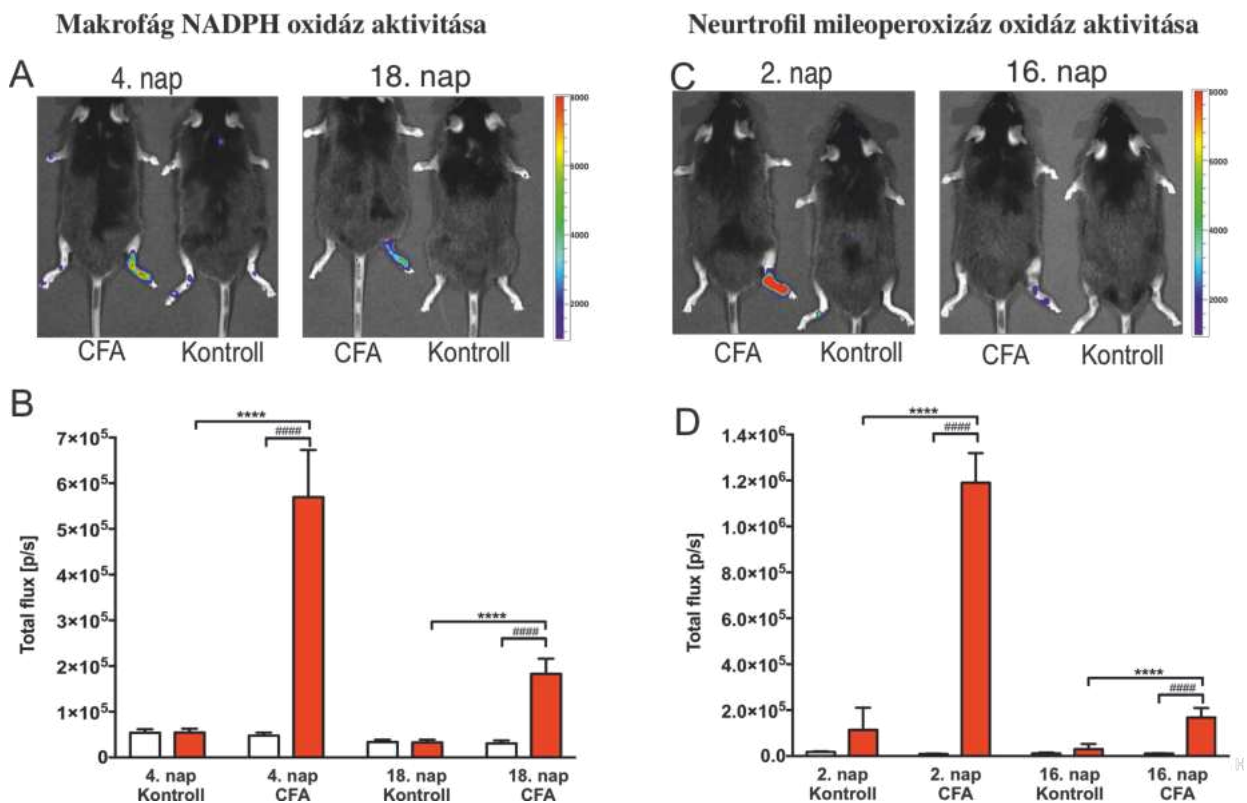
15. ábra: Viselkedési és fájdalom tesztek eredményei.

A CFA által kiváltott ízületi gyulladás miatt megnövekedett a fájdalomérzet, valamint a gyulladt hátsó végtagok ödémája is kimutatható. A CFA-val injektált egerekben csökkent a mechanonociceptív küszöbérték akut (A) és krónikus (B) gyulladás állapotokban, amit a dinamikus plantáris eszteziométer mutatott ki. Az ízületi gyulladásban szenvedő egerek akut (C) és krónikus (D) gyulladás állapotokban fokozott termikus érzékenységet mutattak a meleg hőingerekre, melyet a forró

lemez (*hot plate*) teszttel végeztünk. A CFA-val kezelt állatokban tartós gyulladási ödéma alakult ki mind akut (E), mind krónikus (F) állapotban. Az egerek testtömeg-eloszlása is megváltozott. Az állatok kevesebb súlyt helyeztek a gyulladt jobb oldali lábukra akut fázisban (G). * P <0,05; ** P <0,01; *** P <0,001; **** P <0,0001 a kontrollértékekkel szemben ugyanabban az időpontban. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns

1.2. *In vivo* képalkotás

A CFA-kezelés helyi gyulladást váltott ki. A reaktív oxigéngyök termelésének gyulladással összefüggő növekedését biolumineszcens képalkotással mutattuk ki (16. A és C ábra). Az akut fázisban a biolumineszcens jel növekedését tapasztaltuk, amely a krónikus fázisban lényegesen gyengült, de a jel azonban továbbra is jelentősen megemelkedett a krónikus fázisban (16. B és D ábra). Ezek az eredmények is megerősítik, hogy a CFA-val injektált egerek ízületi gyulladásban szenvedtek.



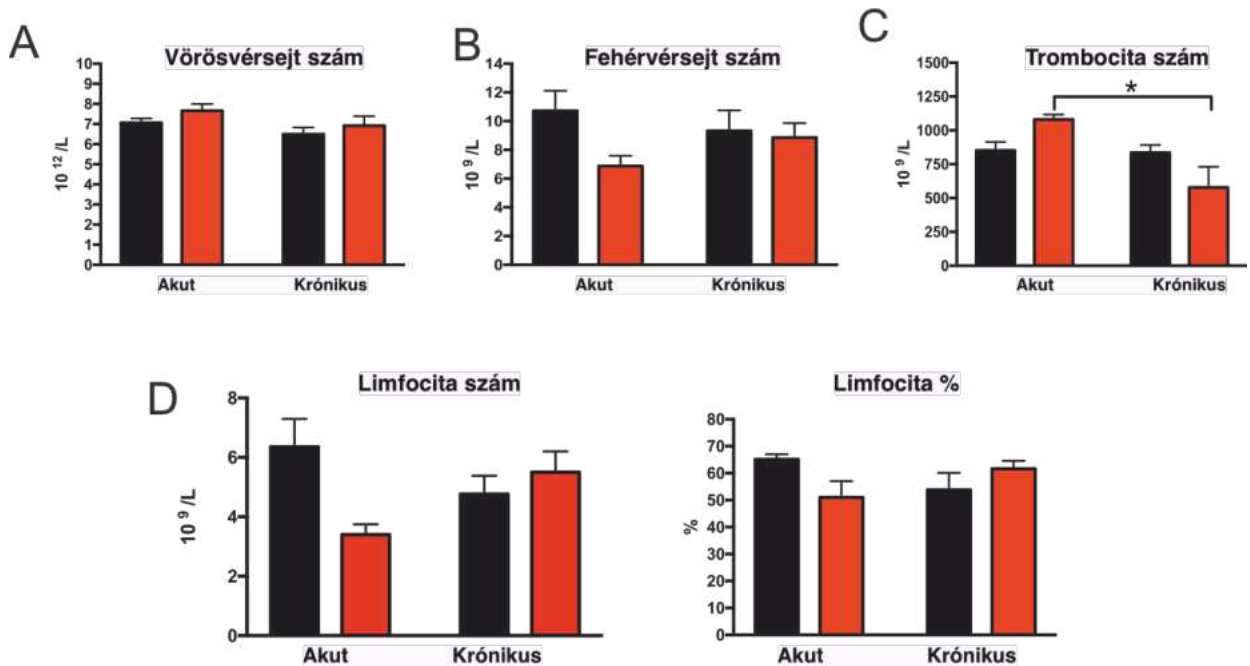
16. ábra: *In vivo* biolumineszcencia képalkotás.

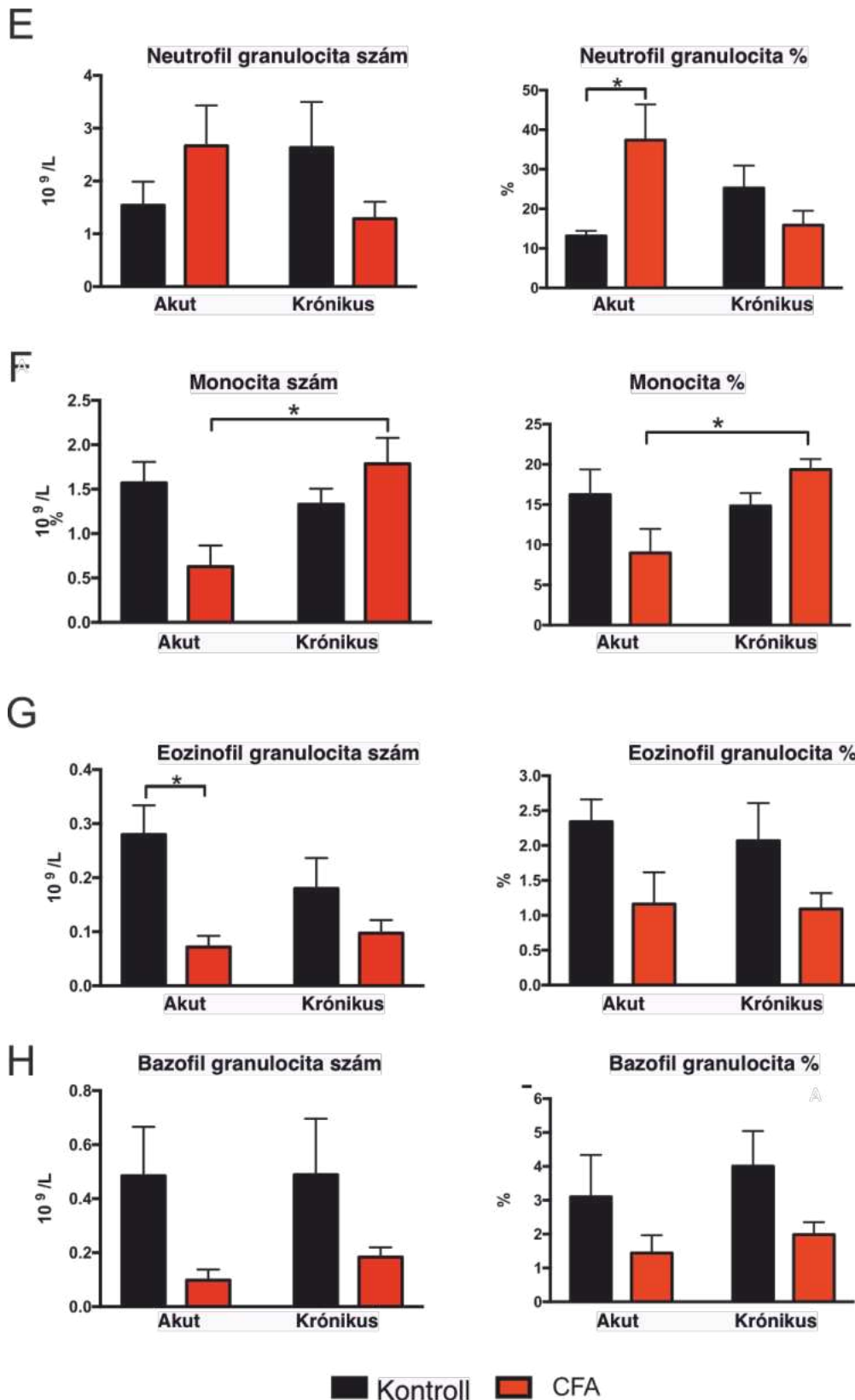
Ezzel a módszerrel a lokális gyulladást, vagyis a gyulladáshoz fagociták által generált reaktív oxigén gyökök jelenlétét mutatja ki. A: CFA-t kapott és kontroll állatok képei. Ezzel a módszerrel, illetve lucigenint injektálva az állatokba kimutathatjuk a makrofág NADPH-oxidáz aktivitását. A lucigenin reagál a makrofág NADPH oxidázokkal és biolumineszcencia jelet ad. A: Megfigyelhetjük a lucigenin által adott biolumineszcens jelet. B és D: A biolumineszcens jelek kvantitatív adatai. C: Luminol reakcióba lép a neutrofil granulociták mieloperoxidáz enzimeivel és segítségével biolumineszcens jelet ad amely B és D ábrán látható. A biolumineszcens szignál jelentősen megnövekedett mind a gyulladás akut, mind krónikus fázisában. **** P <0,0001 a kontroll egerek

azonos oldali hátsó végtagjaihoz képest azonos időpontokban. ##### $P < 0,0001$, szemben a CFA-val injektált állatok ellenoldali hátsó végtagjaival azonos időpontokban. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns.

1.3. Vérvizsgálás

A vérsejtek számában létrejövő változások a szisztémás gyulladás egyik jellemző tünete. Kísérletünkben a teljes eritrocita és leukocita sejtszám nem változott (17. A-B ábra), viszont a krónikus csoportban a vérlemezke szám csökkent a CFA-val kezelt állatokban az akut fázishoz képest ($t = 4,66$, $P < 0,05$, 17. C ábra). Megnövekedett neutrofil granulocita arány látható az CFA-val kezelt állatokban akut fázisban (összehasonlítva az akut kontrollokkal, $t = 3,93$, $P < 0,05$, 17. E ábra), és megnövekedett monocita arányt láthatunk a CFA-val kezelt állatokban a krónikus fázisban (az akut CFA csoporttal összevetve, $t = 4,89$, $P < 0,05$, 17. F ábra). Az eozinofil és bazofil granulociták százalékos aránya szignifikánsan csökkent a CFA-val kezelt egerekben (eozinofil: $F(1, 22) = 6195$, $P < 0,05$; bazofil: $F(1, 22) = 0,6883$, $P < 0,05$) (17. G-H ábra). Összefoglalva tehát a neutrofil granulociták százalékos arányának növekedése az akut CFA csoportban szisztémás akut gyulladásos reakciót jelez, míg a megnövekedett monociták aránya a krónikus CFA csoportban szisztémás krónikus gyulladásos reakcióra utal.





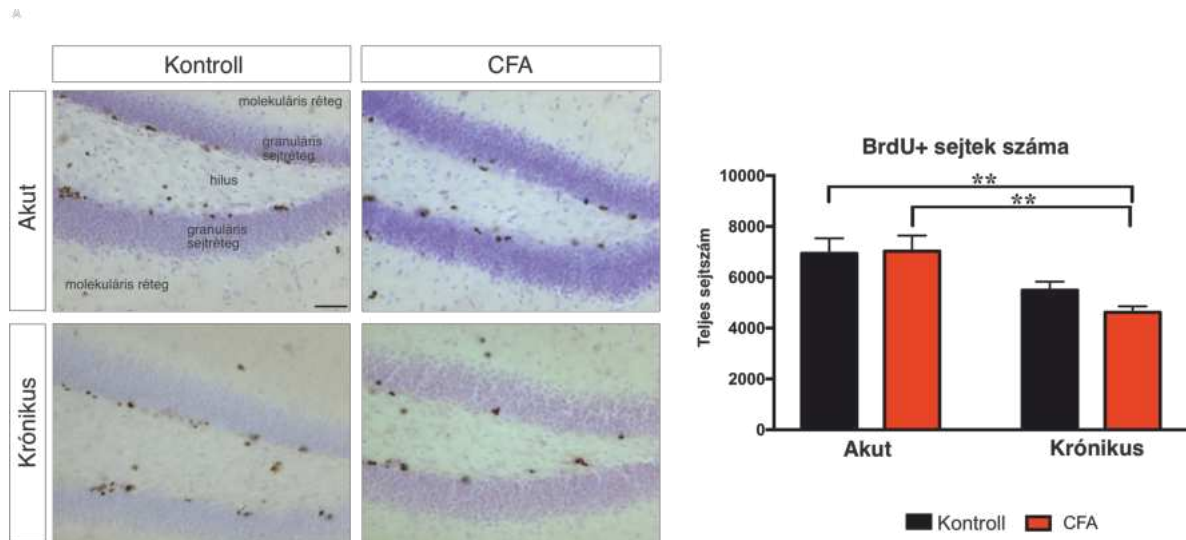
17. ábra: Az ízületi gyulladás megváltozott vérképet eredményez. A CFA-kezelés nem befolyásolta a vörösvérsejt (A) és a fehérvérsejt sejttszámot (B), de a vérelemezkeszám csökkent a krónikus CFA-val kezelt állatokban a kísérlet krónikus fázisában (C). A limfociták aránya nem változott (D), a neutrofil granulociták aránya viszont szignifikáns növekedést mutat az akut CFA csoportban. Továbbá szignifikáns különbséget láthatunk a monociták CFA-val kezelt akut és

krónikus csoportjai közt (F). Az eozinofil és bazofil granulociták százalékos aránya csökkent a CFA-val kezelt egerekben (G-H). * $P < 0,05$. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns.

1.4. Immunhisztokémiai eredmények

1.4.1. BrdU immunhisztokémia eredményei

A sejtproliferációt anti-BrdU immunhisztokémiával vizsgáltuk. Az akut gyulladás nem befolyásolta a BrdU-jelölt sejtek számát, de a krónikus gyulladás szignifikánsan alacsonyabb számú újszülött sejtet eredményez (18. ábra). A kétutas ANOVA (idő \times CFA-kezelés) szignifikáns időhatást mutatott ki ($F(1,30) = 17,91$, $P < 0,001$), a post-hoc Tukey-teszt pedig azt mutatta, hogy a krónikus CFA-val kezelt egerek sejtproliferációja csökkent az akut csoportokhoz képest ($t = 5,28$, $P < 0,01$). Figyelembe kell vennünk, hogy a CFA-kezelés mellett az életkor is szerepet játszhat a BrdU+ sejtek számának csökkenésében.

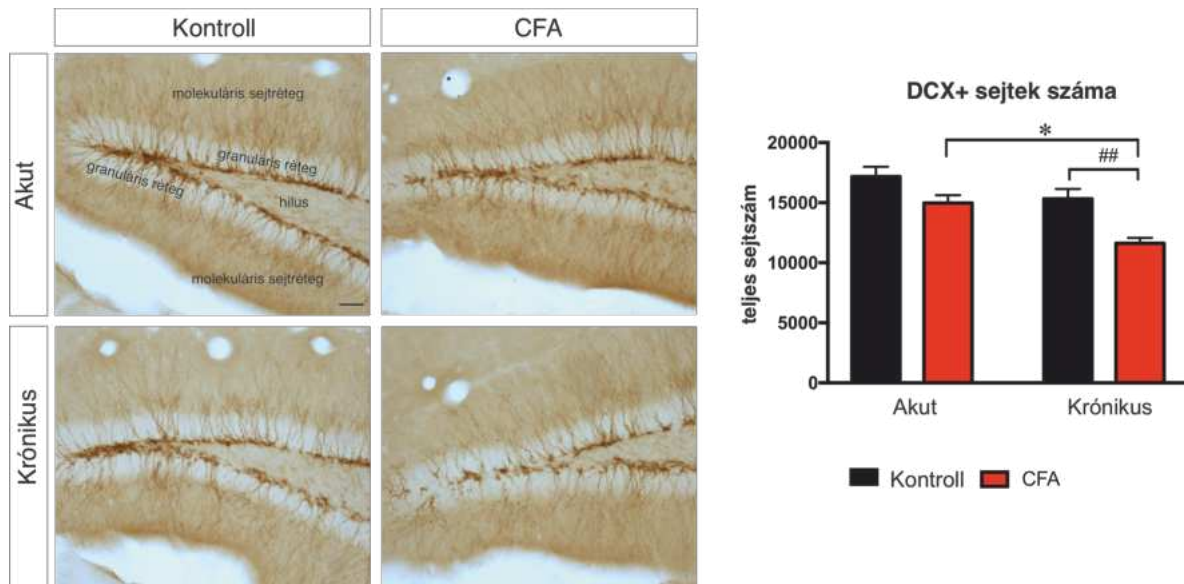


18. ábra: A krónikus ízületi gyulladás hatása a sejtproliferációra a gyrus dentatusban.

Reprezentatív képek, amelyek BrdU-immunpozitív sejteket mutatnak be a kontroll és a CFA-val kezelt egerek gyrus dentatusában. Valamint a szisztematikus sejtyszámolás adatainak eredményei láthatóak az ábra jobb oldalán. A grafikonok a BrdU+ sejtek teljes számát mutatják. Statisztika: 2-utas ANOVA (idő \times CFA kezelés), majd Tukey többszörös összehasonlítása, post hoc teszt. ** $P < 0,01$. Lépték: 50 μm mindegyik képnél. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns, BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin.

1.4.2. DCX immunhisztokémia eredményei

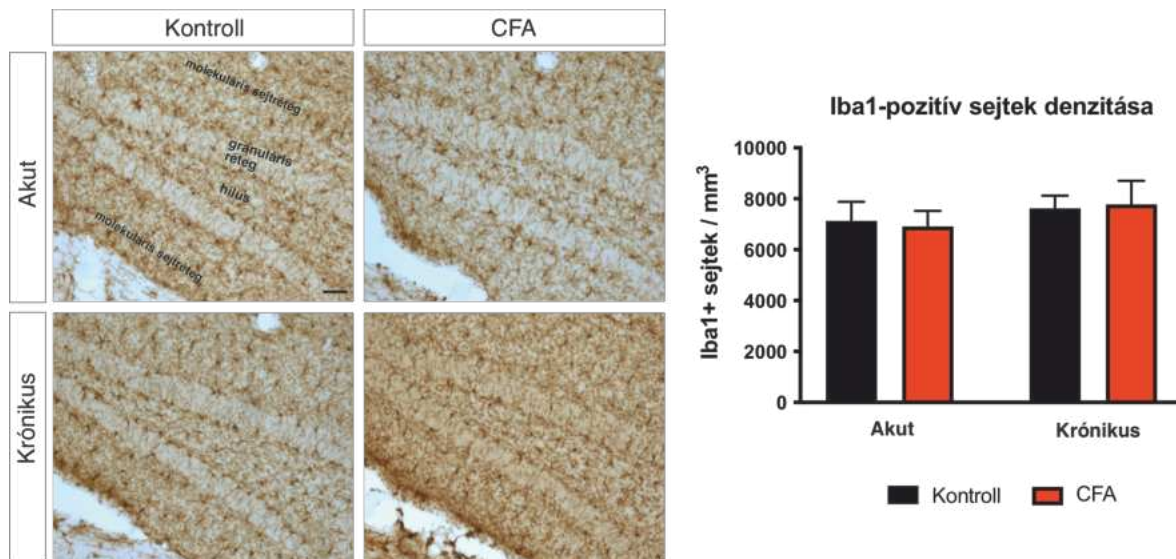
Az éretlen neuronok számát anti-doublecortin immunhisztokémiával vizsgáltuk. A krónikus ízületi gyulladás csökkentette a DCX+ sejtek számát a hippocampusban a CFA-val kezelt állatoknál (19. ábra). A kétutas ANOVA (idő × CFA kezelés) szignifikáns CFA-kezelési hatást ($F(1,30) = 17,89, P < 0,001$), valamint időhatást ($F(1,30) = 13,82, P < 0,001$) láthatunk. A Tukey teszttel végzett post-hoc összehasonlítás azt mutatta, hogy a krónikus CFA-val kezelt egerekben szignifikánsan csökkent a DCX+ sejtek száma a krónikus kontroll ($t = 5,47, p < 0,01$) és az akut CFA-val kezelt csoportokhoz képest ($t = 4,79, P = 0,01$). A krónikus CFA csoport DCX+ sejtszámának ez a csökkenése a krónikus ízületi gyulladás gátló hatását mutatja a felnőttkori hippocampális neurogenesisre.



19.ábra: A krónikus ízületi gyulladás gátolja a felnőttkori neurogenézist a gyrus dentatusban. Reprezentatív képek, amelyek doublecortin (DCX) -immunpozitív éretlen neuronokat mutatnak be kontroll és CFA-val kezelt egerek gyrus dentatusában. A szisztematikus sejtszámolás adatainak eredményei az ábra jobb oldalán láthatóak. A grafikonok a DCX+ sejtek teljes számát mutatják. A CFA-indukált krónikus ízületi gyulladásra rendelkező állatokban szignifikánsan csökkent a DCX+ sejtszám. Statisztikák: kétutas ANOVA (idő × CFA kezelés), majd Tukey többszörös összehasonlítása, post hoc teszt. * $P < 0,05$ krónikus CFA az akut CFA-val kezelt csoporthoz képest; ## $P < 0,01$ krónikus CFA az akut kontroll csoporttal szemben. Lépték: 50 μm mindegyik képnél. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns.

1.4.3. Az Iba1 immunhisztokémia eredményei

A hippokampális neurogenesis szabályozásának elsődleges befolyásoló tényezői a mikroglia lehetnek (Monje et al., 2003; Ekdahl et al., 2004; Sierra et al., 2010; Troubat et al., 2021), ezért számszerűsítettük az Iba1+ mikroglia számot a gyrus dentatusban (20. ábra). Nem találtunk semmilyen kezelésből eredő hatást az Iba1+ mikroglia sejtek számában. Tehát a következtetésünk alapján az ízületi gyulladás nem befolyásolta az Iba1-immunpozitív mikroglia számát a gyrus dentatusban. Az Iba1+ sejtek szemikvantitatív morfológiai vizsgálata alapján nem tapasztaltunk jelentős különbséget az aktivációjukban a vizsgált csoportok között.

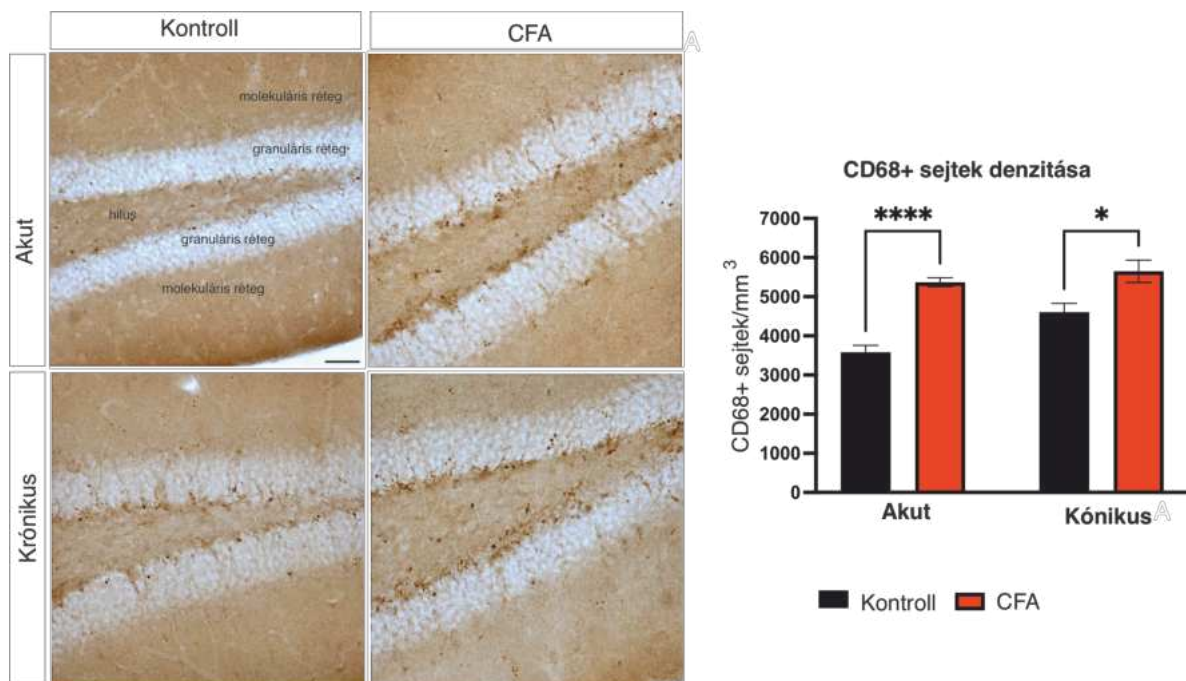


20. ábra: Iba1 immunhisztokémia eredményei. Reprezentatív képek, amelyek Iba1-immunpozitív mikroglia-t mutatnak be kontroll és CFA-val kezelt egerek gyrus dentatusában. Jobb oldalon látható a szisztematikus sejszámlálási adatok eredményei. A grafikonok az Iba1+ sejtek sűrűségét mutatják (Iba1+ sejszám / mm³). Statisztikák: kétutas ANOVA (idő × CFA kezelés), majd Tukey többszörös összehasonlítása, post hoc teszt. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns, Iba1: ionizált kalciumkötő adapter molekulakula-1. Lépték: 50 µm mindegyik képnél.

1.4.4. A CD68 immunhisztokémia eredményei

További immunhisztokémiai elemzést végeztünk a CD68 marker használatával, amely láthatóvá tette a CD68+ sejteket a gyrus dentatusban (21. ábra). A CD68 egy glikoprotein, amely főleg az endoszómális/lizoszómális kompartmentben található, és erősen expresszálódik a makrofágokban és más mononukleáris fagocitákban (Chistiakov et al., 2017), ezért jellemzően citokémiai markerként használják a monociták/makrofágok megjelenítésére a gyulladt szövetekben. Az Iba1 adatokkal ellentétben szignifikánsan

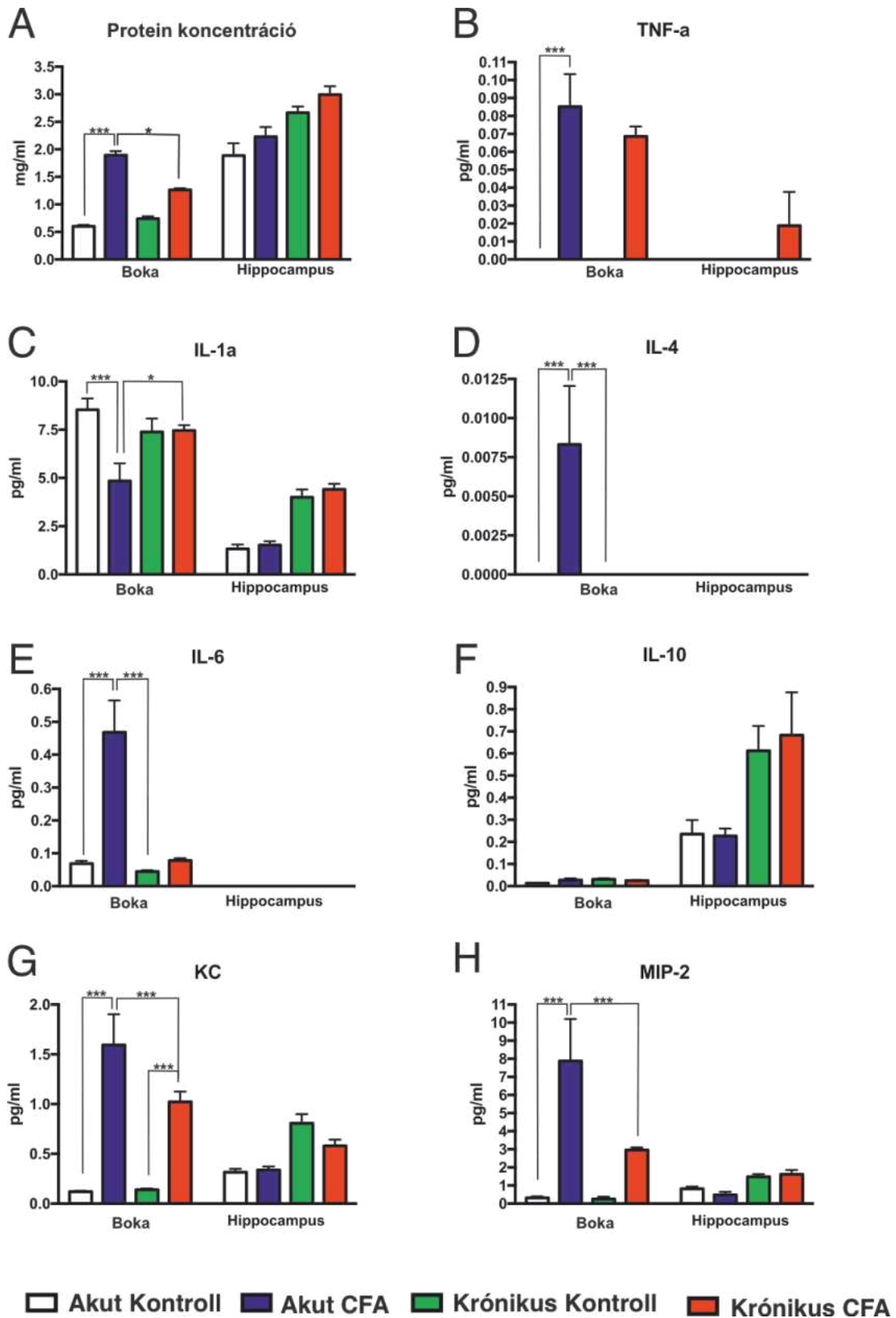
megnövekedett a CD68+ sejtek denzitása a gyrus dentatusban. A kétutas ANOVA (idő × CFA-kezelés) szignifikáns időhatást ($F(1, 23) = 8,397, p < 0,01$), valamint szignifikáns CFA-kezelési hatást ($F(1, 23) = 39,68, p < 0,0001$) mutatott. A post-hoc Tukey-teszt kimutatta, hogy az akut CFA-val kezelt egerekben a CD68+ sejtek denzitása szignifikánsan megnőtt az akut kontroll csoporthoz képest ($t = 7,83, p < 0,0001$). Hasonlóképpen, a CD68+ sejtszám szignifikánsan megnőtt a krónikus CFA csoportban a krónikus kontroll csoporthoz képest ($t = 4,72, p < 0,05$).



21. ábra: CD68 immunhisztokémiai eredményei. Szignifikánsan megnövekedett a CD68+ sejtek denzitása a gyrus dentatusban, mind az akut, mind a krónikus CFA kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest. Lépték: 50 μm mindegyik képnél. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns, CD68: differenciálási klaszter 68.

1.5. A gyulladáshoz vezető citokinek szintjei a hátsó mancsokban és a hippokampuszban

A hátsó mancsokban a gyulladás által kiváltott teljes fehérjekoncentráció növekedését láthatjuk (22.A. ábra). A hátsó végtagokban az akut CFA-kezelés növelte a TNF- α , IL-4, IL-6, KC és MIP-2 citokin koncentrációit, míg a krónikus fázisban a TNF- α és KC emelkedett (22. ábra). Egyes esetekben a mért citokinszintek vagy nem változtak a CFA-val kezelt hátsó végtagokban (IL-1 α , IL-10), vagy csökkentek (IL-1 α). A hippokampuszban a citokinszinteket nem változtatta meg a CFA-kezelés.



22. ábra: Az összes fehérje és a citokinek/kemokinek koncentrációja a hátsó végtagokban és a hippokampuszban. A gyulladás növelte az összfehérje koncentrációt az ízületekben, és hasonló tendenciát láthatunk a hippokampuszban is. Az akut ízületi gyulladás megnövelte a TNF- α , IL-4, IL-

6, KC és MIP-2 citokin koncentrációkat a hátsó végtagokban, míg a krónikus ízületi gyulladás növelte a TNF- α és KC szintet. A CFA-kezelés nem változtatta meg a citokinek szintjét hippocampusban. Statisztikák: háromutas ANOVA (szerv \times CFA kezelés \times idő), majd Tukey post hoc teszt. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. Rövidítések: CFA: komplett Freund-adjuváns; IL-1a: interleukin-1-alfa; IL-4: interleukin-4; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; KC: keratinocita eredetű kemokin; MIP-2: makrofág gyulladásos protein-2; TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa.

2. Krónikus stressz és marihuánafüst hatásai kísérleti egerek magatartására és a felnőttkori hippocampális neurogenesisre

2.1. A marihuánafüst és az egerek vizeletének elemzése

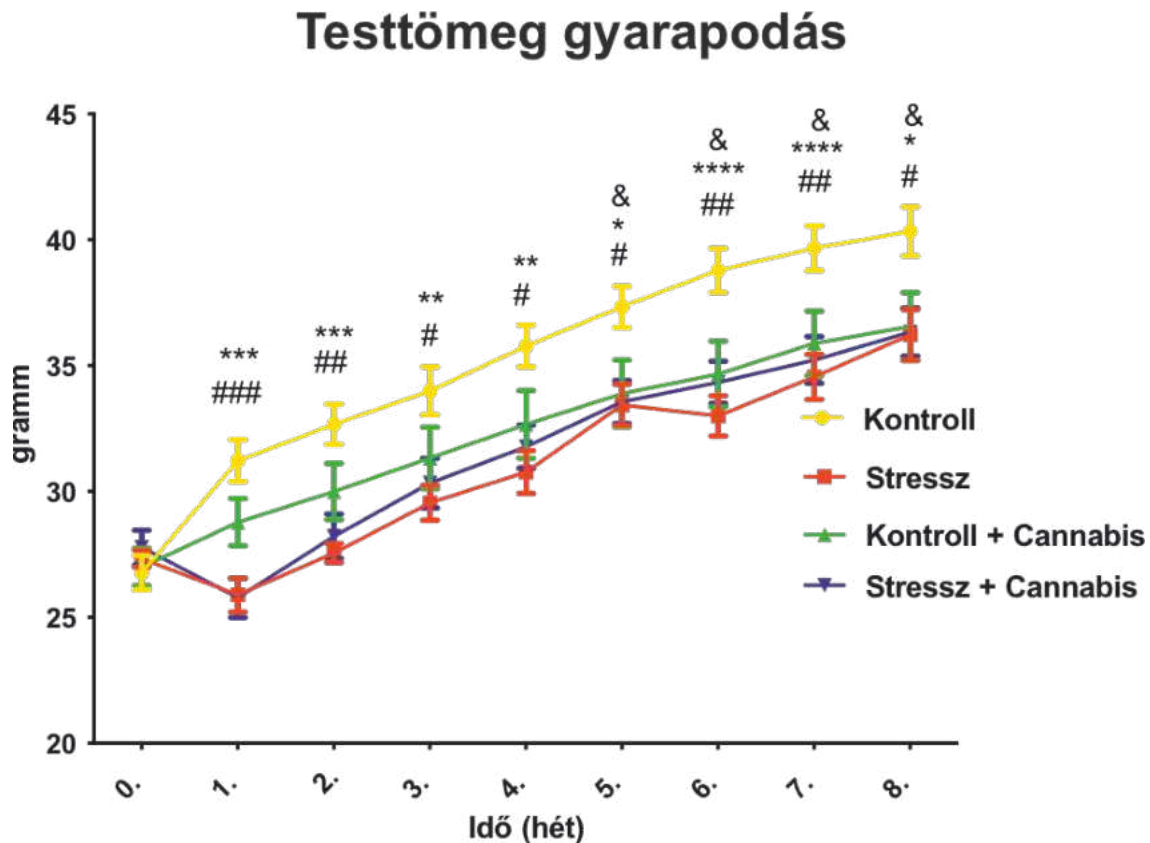
A kutatásunk során meghatároztuk a marihuánafüst 9-THC-, CBD- és CBN-tartalmát HPLC készülék segítségével. Továbbá vizeletmintákat gyűjtöttünk a marihuánafüstöt inhalált egerektől a 6. és 7. héten. A vizeletben a 9-THC, a 11-nor-9-karboxi-THC, a CBD és a CBN koncentrációját SFC/MS-MS módszerrel határoztuk meg. Az adatokat az 1. táblázat tartalmazza. A mérési eredményekből látható, hogy a marihuánafüstben körülbelül 10-szer magasabb volt a 9-THC koncentrációja, mint a CBD koncentrációja. Ez az arány még magasabb volt (30-szorosa) a vizeletmintákban. A 11-nor-9-karboxi-THC (a 9-THC egyik fő metabolitja) mennyisége $1,8 \pm 0,2$ ng/ml volt a vizeletben (1. táblázat).

	delta-9-THC ng/ml	cannabidiol ng/ml	cannabinol ng/ml	11-nor-9- carboxy-THC ng/ml
Marihuánafüst (ng/ml)*	427000 \pm 2000	35800 \pm 1100	258000 \pm 8000	-
Vizelet minta (ng/ml)	65,61 \pm 22,77	2,44 \pm 0,56	41,92 \pm 17,62	1,81 \pm 0,16
* A vegyületek mennyiségi adatai 1,6g elégetett marihuána füstjéből származnak. Az adatokat átlag \pm SEM-ben adtuk meg.				

1. táblázat: A marihuánafüst és a vizelet minta kémiai analízise

2.2. Testtömeg változás a marihuána és stressz kezelés hatására

A stressz és a cannabis expozíció csökkentette az állatok testtömeg-gyarapodását. Az állatok testtömegét minden nap megmértük, majd a napi értékekből egy átlagos tömeg/hét értéket számítottunk (23. ábra). A háromutas ANOVA-val végzett elemzés (idő × stressz × cannabis kezelés) azt mutatta, hogy mindhárom tényezőnek szignifikáns fő hatása volt: idő: $F(8,8) = 62,48$, $P < 0,001$; stressz: $F(1,8) = 13,81$, $P < 0,002$; és cannabis kezelés: $F(1,8) = 66,71$, $P < 0,001$. További szignifikáns kölcsönhatásokat láthatunk az idő × cannabis kezelés: $F(8,8) = 2,11$, $P < 0,001$ valamint a stressz × cannabis kezelés: $F(1,8) = 30,3$, $P < 0,01$ között. Az eredmények alapján a cannabis kezelés gátolja az állatok súlygyarapodást, illetve, a stressz által kiváltott testsúly gyarapodás gátlását a cannabis füst belégzése valamelyest enyhítette az állatoknál.



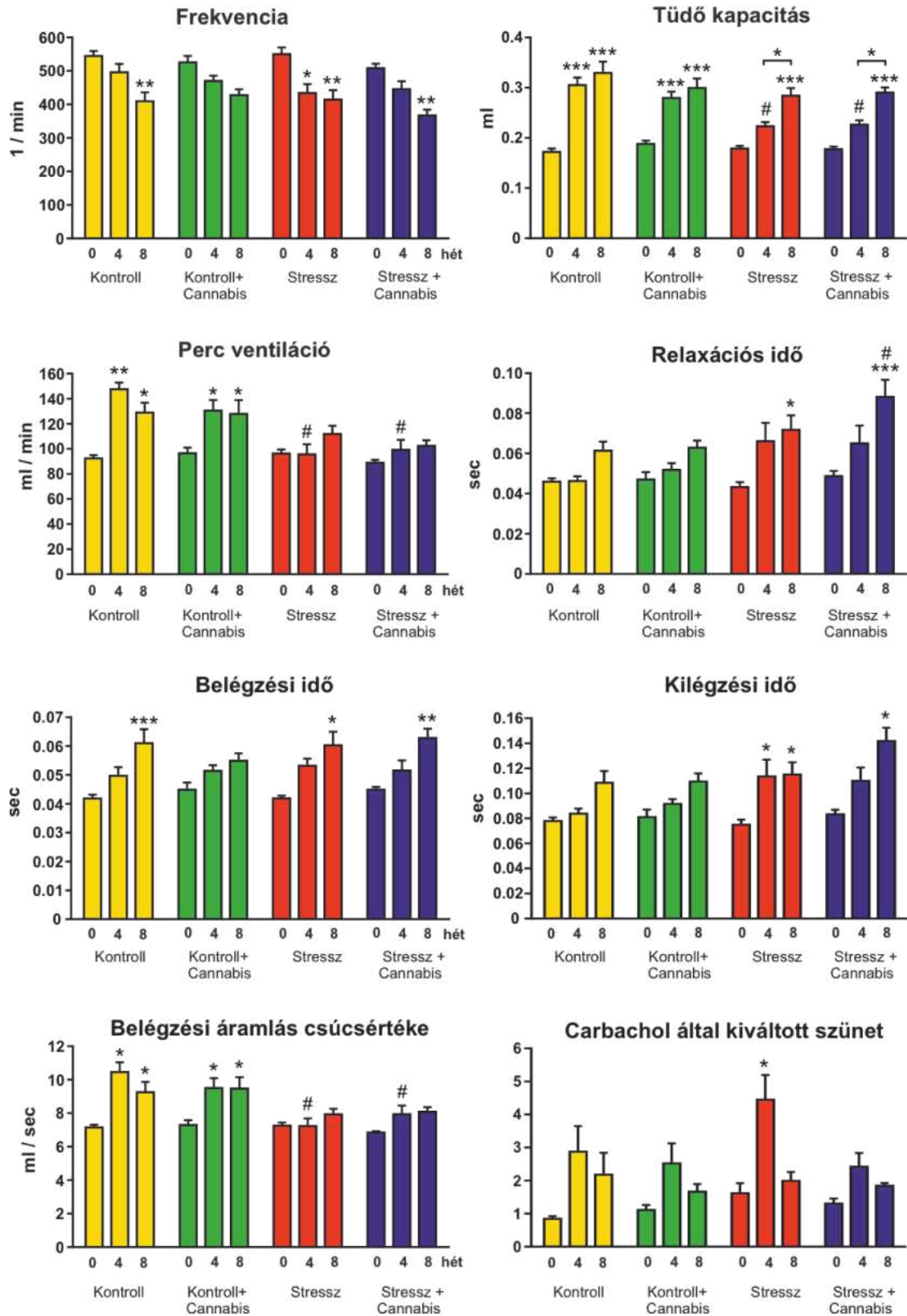
23.ábra: Testtömeg változása.

Az ismétlődő stressz és cannabis expozíció csökkentette az állatok testtömeg-gyarapodását. Tukey többszörös összehasonlítása további csoportok közötti különbségeket tárt fel meghatározott időpontokban: Kontroll és stressz csoport között: * $P < 0,05$, **= $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $< 0,0001$; Kontroll és stressz + cannabis csoport között: #= $P < 0,05$. ##= $P < 0,01$, ### = $P < 0,001$, Kontroll és kontroll + cannabis csoport között: &= $P < 0,05$.

2.3. Légzésfunkció vizsgálat

A stressz károsította a tüdőfunkciókat és a tüdő normális fejlődését, viszont, a marihuánafüst nem befolyásolta a tüdőfunkciókat. Ismétlődő légzésfunkció vizsgálatokat végeztünk, hogy megvizsgáljuk a hosszú távú stressz és a *cannabis* kezelés hatását a tüdőfunkciókra nézve. Azt feltételeztük, hogy a *cannabis* füstnek légzés, valamint tüdőkárosító hatása lesz. A kontroll méréseket a 0. héten végeztük az akkor még kezeletlen állatokon majd megismételtük a méréseket a 4. és 8. héten a stressz, valamint a *cannabis* füst kezelése után (24. ábra). A pletizmográfias mérések eredményeit a 24. ábra mutatja be. Az adatokat háromutas ANOVA-val (idő × stressz × *cannabis* kezelés) elemeztük, Tukey post hoc teszttel. Az életkornak, vagyis az időfaktornak volt a legerőteljesebb hatása a mért légzésfunkció paramétereire. Ahogy az állatok fejlődtek úgy a tüdőfunkció értékek is nőttek kivéve a belégzés gyakoriságát, amely a fejlődés során csökkent. A krónikus stressz negatívan hatott számos tüdőparaméter fejlődésére, például megváltoztatta a frekvenciát, az egy perc alatti légvételek számát, a belégzési csúcsáramlást, a kilégzési időt, a relaxációs időt és a légzési térfogatot is. Ezeknél a paramétereknél a háromutas ANOVA a stressz szignifikáns fő hatását, valamint szignifikáns idő × stressz kölcsönhatást mutatta ki. A krónikus marihuánafüstnek nem volt hatása a tüdőfunkciókra, kivéve a carbachol által kiváltott szünetet a légzési tesztben. A carbachol által kiváltott légzési szünet mérését a tüdő bronchiális hiperreaktivitásának elemzésére használjuk, ezáltal korrelálva a légúti gyulladás mértékével. Ebben a tesztben a hörgőszűkületet 50 µl porlasztott carbachol (22 mM) váltja ki.

Légzésfunkció



24. ábra: A stressz és a cannabis expozíció hatása a tüdőfunkciókra.

Ismétlődő teljes test pletizmográfias méréseket végeztünk szabadon mozgó állatokon. A háromutas

ANOVA (idő × stressz × *cannabis* kezelés) eredményei a stressz szignifikáns fő hatását és szignifikáns idő × stressz interakciót mutattak ki ezekre a paraméterekre. Tukey post hoc teszt további csoportkülönbségeket tárt fel: *P <0,05, **P <0,01, ***P <0,001 az ugyanazon kezelési csoport 0. hetének értékéhez képest. #P <0,05 a Kontroll csoporthoz képest ugyanazon a kísérleti héten.

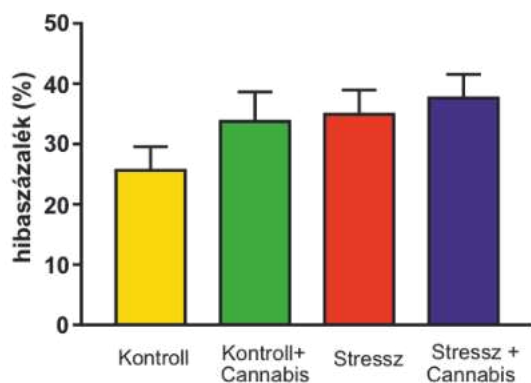
2.4. Magatartási tesztek

2.4.1. Kognitív teszt – Y labirintus teszt

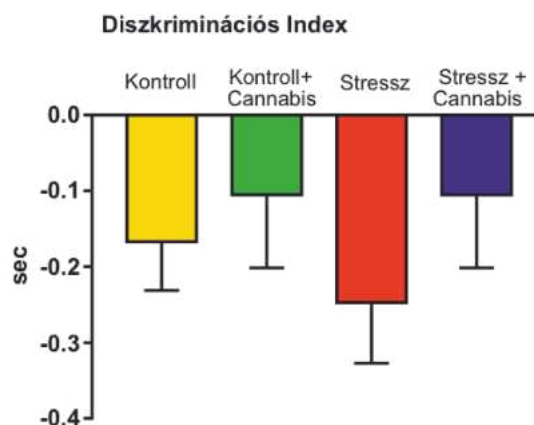
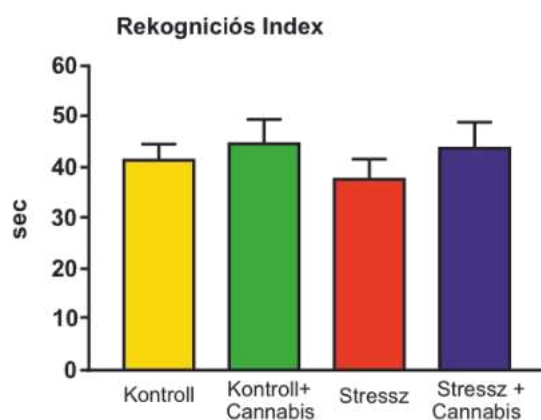
Eredményeink alapján sem a stressz, sem a marihuána expozíció nem befolyásolta az egerek kognitív funkcióit. Az állatok kognitív teljesítményét két különböző tanulási teszttel értékeltük. A 3. hét végén egy Y labirintus tesztet, a 4. hét végén pedig egy új tárgyfelismerési tesztet végeztünk (25. ábra). Ezekben az időpontokban sem a stressz, sem a marihuána expozíció nem volt hatással az állatok kognitív teljesítményére. Az állatok a tesztek elvégzése során nem álltak akutan sem marihuána, sem a stressz hatása alatt. Az Y labirintus tesztben mind a stresszelt mind a marihuánafüstöt inhalált állatok több hibát követtek el, vagyis olyan karokba léptek be melyeket már meglátogattak előzőleg, viszont statisztikailag nem volt különbség a csoportok között (25. A ábra). Az új tárgy felismerési tesztben a felismerési index (új tárggyal eltöltött idő/mindkét tárggyal töltött idő × 100) hasonló volt az összes kísérleti csoportban (25.B ábra). A marihuánafüstöt belélegzett állatoknál alacsonyabb volt a diszkriminációs index [(új tárggyal töltött idő – ismerős tárggyal eltöltött idő)/mindkét tárggyal töltött idő], de statisztikailag ez sem volt szignifikáns.

Kognitív tesztek

A Y labirintus teszt



B Új tárgy felismerési teszt

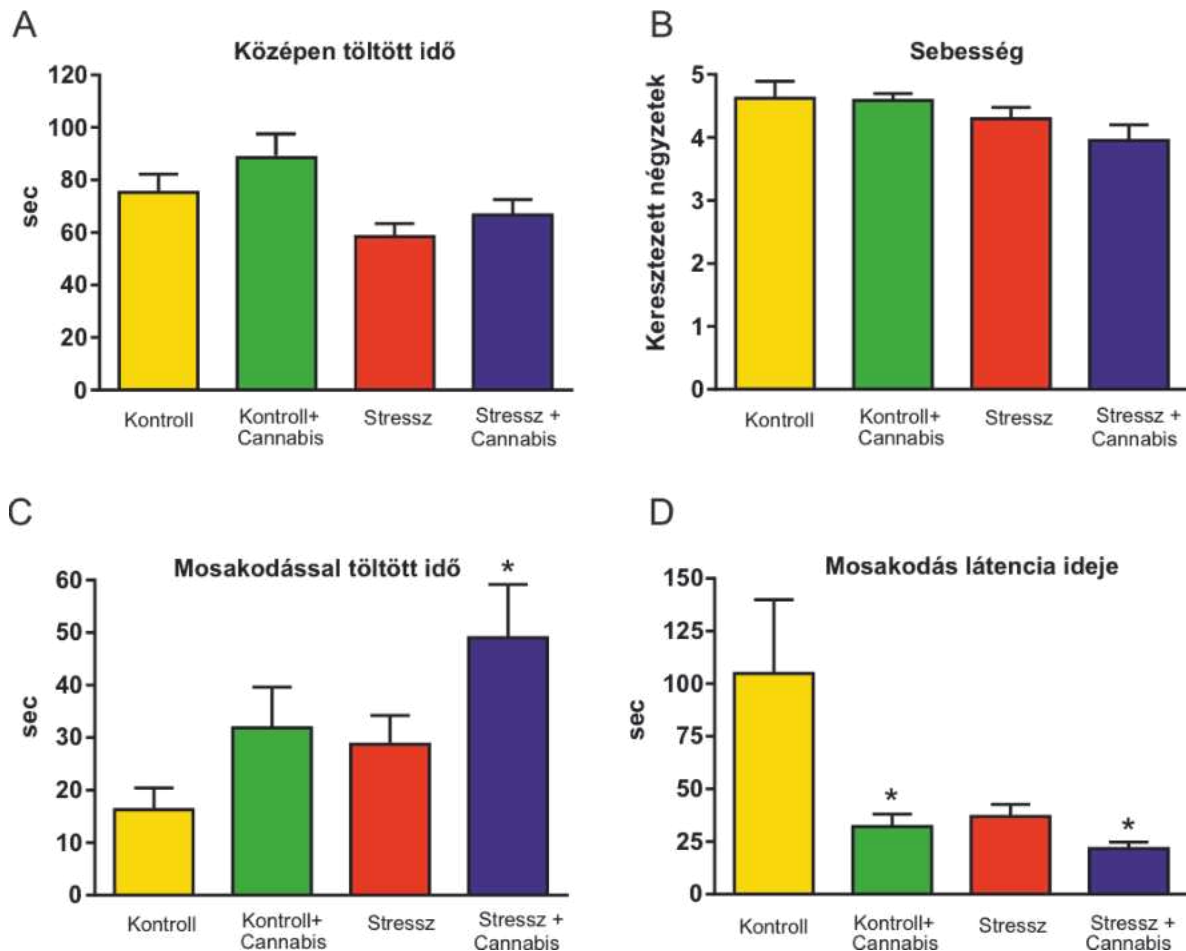


25. ábra: A kognitív tesztek eredményei.

A kognitív teljesítményeket az Y labirintus tesztel (A) és az új tárgyfelismerési tesztel (B) mértük. Az adatokat két-utas ANOVA-val (stressz \times cannabis kezelés) elemeztük Tukey post hoc tesztel kiegészítve.

2.4.2. Nyílt terep teszt

Ezzel a teszttel az állatok lokomotoros aktivitását és szorongás szintjét vizsgáltuk. Szorongással kapcsolatos spontán mozgásszervi aktivitást és önápolást vagyis a mosakodással töltött időt mértünk az állatoknál. Ezt a tesztet a kísérlet végén végeztük (8. hét végén), hogy értékeljük az állatok szorongással összefüggő spontán mozgásszervi aktivitását és az önápoló viselkedését (26. ábra). A stresszes egerek kevesebb időt töltöttek a rendelkezésükre álló terület közepén (26. A ábra). A kétutas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását tárta fel [$F(1,32) = 6,33, P < 0,05$], de a Tukey post hoc teszt nem talált további csoportkülönbségeket. Azok az állatok melyek szorongtak inkább a sarokban töltötték idejüket. Az állatok mozgássebességének mérésének eredményéből látható, hogy a stresszelt egerek csökkent érdeklődést mutattak az új környezet iránt és lassabbak voltak (25. B ábra). A két-utas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását eredményezte [$F(1,32) = 5,07, P < 0,05$]. A *cannabis* kezelés nem volt hatással az említett paraméterekre, bár a marihuánafüstnek kitett állatok általában több időt töltöttek a terület közepén. A *cannabis* kezelés viszont hatással volt az önápoló viselkedésre (26. C és D ábra). Mind a stresszelt, mind a *cannabis*-szal kezelt egerek lényegesen több időt töltöttek a mosakodással. A két-utas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását [$F(1,32) = 4,17, P < 0,05$], valamint a *cannabis* kezelés szignifikáns fő hatását [$F(1,32) = 6,11, P < 0,05$] mutatta ki, de nincs kölcsönhatás a két tényező között. Ezenkívül Tukey post hoc teszt szignifikáns különbséget mutatott ki a kontroll és a stressz + *cannabis* kezelt csoportok között ($q = 4,51, P < 0,05$) (26.C ábra). Ezenkívül a stresszel és/vagy *cannabis* kezelt egerek sokkal korábban kezdték meg az önápolást, mint a kontroll egerek (26. D ábra). Mértük a mosakodás látencia idejét is, és a kétutas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását [$F(1,32) = 4,71, P < 0,05$], valamint a *cannabis* kezelés szignifikáns fő hatását [$F(1, 32) = 6,89, P < 0,05$] mutatta ki, de nincs kölcsönhatás a két tényező között. Tukey post hoc teszt szignifikáns különbséget mutatott ki a kontroll és a kontroll + *cannabis* csoport ($q = 4,02, P < 0,05$), valamint a kontroll és a stressz + *cannabis* csoport között ($q = 4,60, P < 0,05$) (26. D ábra).



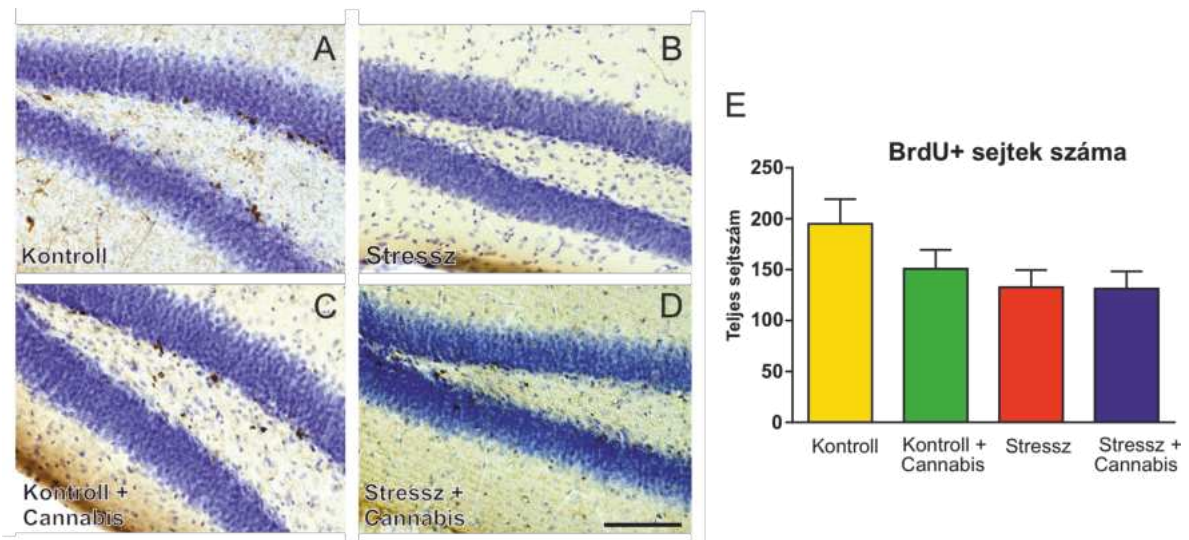
26. ábra: A nyílt terep teszt eredményei.

A ábra: Középen töltött idő: a stresszes egerek lényegesen kevesebb időt töltöttek a terület közepén. B ábra: Az állatok sebességét mutatja, a sebességét a mozgással töltött idő alatt áthaladt négyzetek számának számlálásával értékeltük. C ábra: Önápolással töltött idő: A stressz és *cannabis* együttes hatással volt az önápolásra. D ábra: Az önápolás látencia ideje: A stresszes és/vagy *cannabis*-szal kezelt egerek szignifikánsan hamarabb kezdték ápolni magukat, mint a kontroll egerek.

2.5. Immunhisztokémiai eredmények

2.5.1. BrdU-immunhisztokémia eredményei

A sejtprolifeációt a gyrus dentatusban a BrdU exogén proliferációs marker segítségével tettük láthatóvá (27. A–D ábra). A sejtproliferációt gátlását statisztikai analízisekkel nem tudtuk kimutatni, de trend szinten látható, hogy a stressz, valamint a *cannabis* kezelés hatására csökkent a BrdU+ sejtek száma a gyrus dentatusban a kontroll csoporthoz képest (27. E ábra). A két-utas ANOVA (stressz × *cannabis* kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását tárta fel [$F(1,32) = 4,43, P < 0,05$].



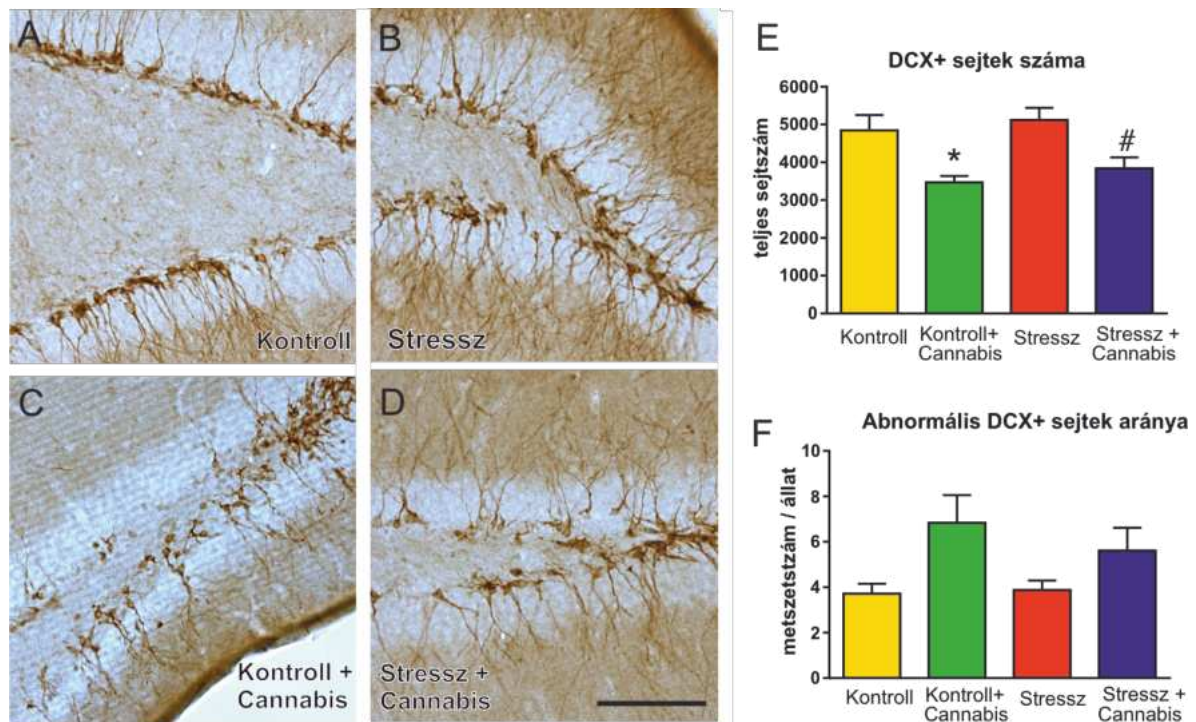
27. ábra: BrdU immunhisztokémia eredményei.

Reprezentatív képek, amelyek a BrdU-immunhisztokémiai jelölést mutatják be a különböző kezelési csoportokba tartozó állatok hippokampusz gyrus dentatus régiójában (A–D). E: A BrdU+ sejtek teljes száma a gyrus dentatusban. A stressz csökkentette a BrdU+ sejtek számát. A kétutas ANOVA (stressz \times cannabis kezelés) a stressz szignifikáns fő hatását mutatta ki ($P < 0,05$), de a cannabis kezelésnek nem volt statisztikailag szignifikáns hatása a sejtproliferációra. Lépték: 100 μ m mindegyik képnél. Rövidítések: BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin.

2.5.2. DCX-immunhisztomémia eredményei

A cannabis füst inhalálása hatással volt az éretlen idegsejtek számára, morfológiájára és migrációjára. Az éretlen neuronok populációját DCX-immunhisztokémiával tettük láthatóvá (28. A-D ábra). A stressznek nem volt hatása, de a cannabis kezelés jelentősen csökkentette a DCX+ neuronok számát a gyrus dentatusban (28. E ábra). A két-utas ANOVA (stressz \times cannabis kezelés) a cannabis kezelés szignifikáns fő hatását tárta fel [$F(1,32) = 18,86$, $P = 0,0001$]. Tukey post hoc tesztje további különbségeket tárt fel a kontroll és a cannabis inhalált állatok között ($q = 4,50$, $P < 0,05$, 28. E ábra), valamint a stressz és a stressz + cannabis csoportok között ($q = 4,19$, $p < 0,05$, 28. E ábra).

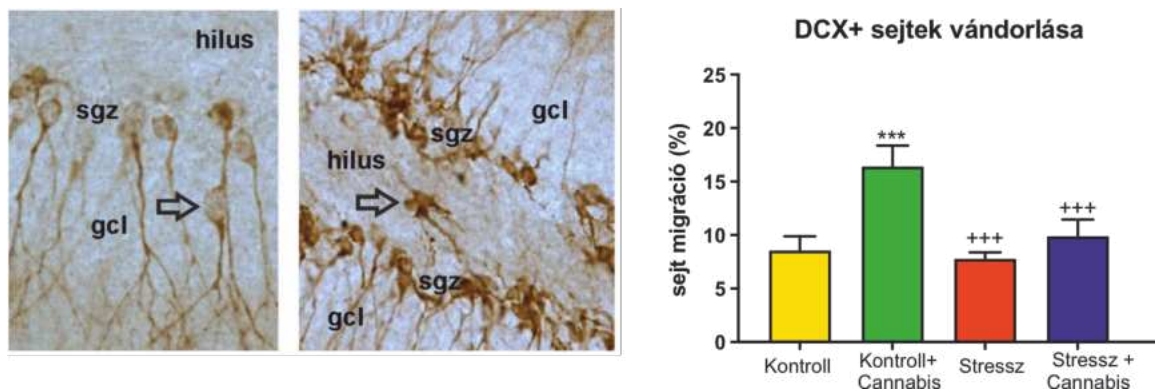
Az idegsejtek morfológiai változásait számszerűsítettük, aszerint, hogy állatonként hány metszetben találtunk rendellenes megjelenésű DCX+ éretlen neuronokat (28. F ábra). A két-utas ANOVA (stressz \times cannabis kezelés) kimutatta, hogy a cannabis kezelésnek szignifikáns hatása volt [$F(1,32) = 8,35$, $P = 0,01$], ami azt jelzi, hogy a kóros megjelenésű DCX+ sejtek előfordulása szignifikánsan magasabb volt a cannabis-szal kezelt állatokban.



28. ábra: DCX immunhisztokémia eredményei.

A reprezentatív képeket láthatunk a különböző kezelési csoportokba tartozó állatok hippokampusz gyurus dentatus régiójában (A–D). E: A DCX+ sejtek teljes száma a gyurus dentatusban. F: Abnormális morfológiával rendelkező DCX+ sejtek aránya statisztikai analízis segítségével. A marihuánával kezelt állatokban a DCX+ sejtek több mint 15%-a a szemcsesejtrétegbe, a hilusba vagy esetenként a molekuláris rétegbe vándorolt. *: $P < 0,05$, kontroll versus a kontroll + *cannabis* csoport, #: $P < 0,05$ a stressz és a stressz + *cannabis* csoport között. Lépték: 100 μm mindegyik képnél. Rövidítések: DCX: doublecortin.

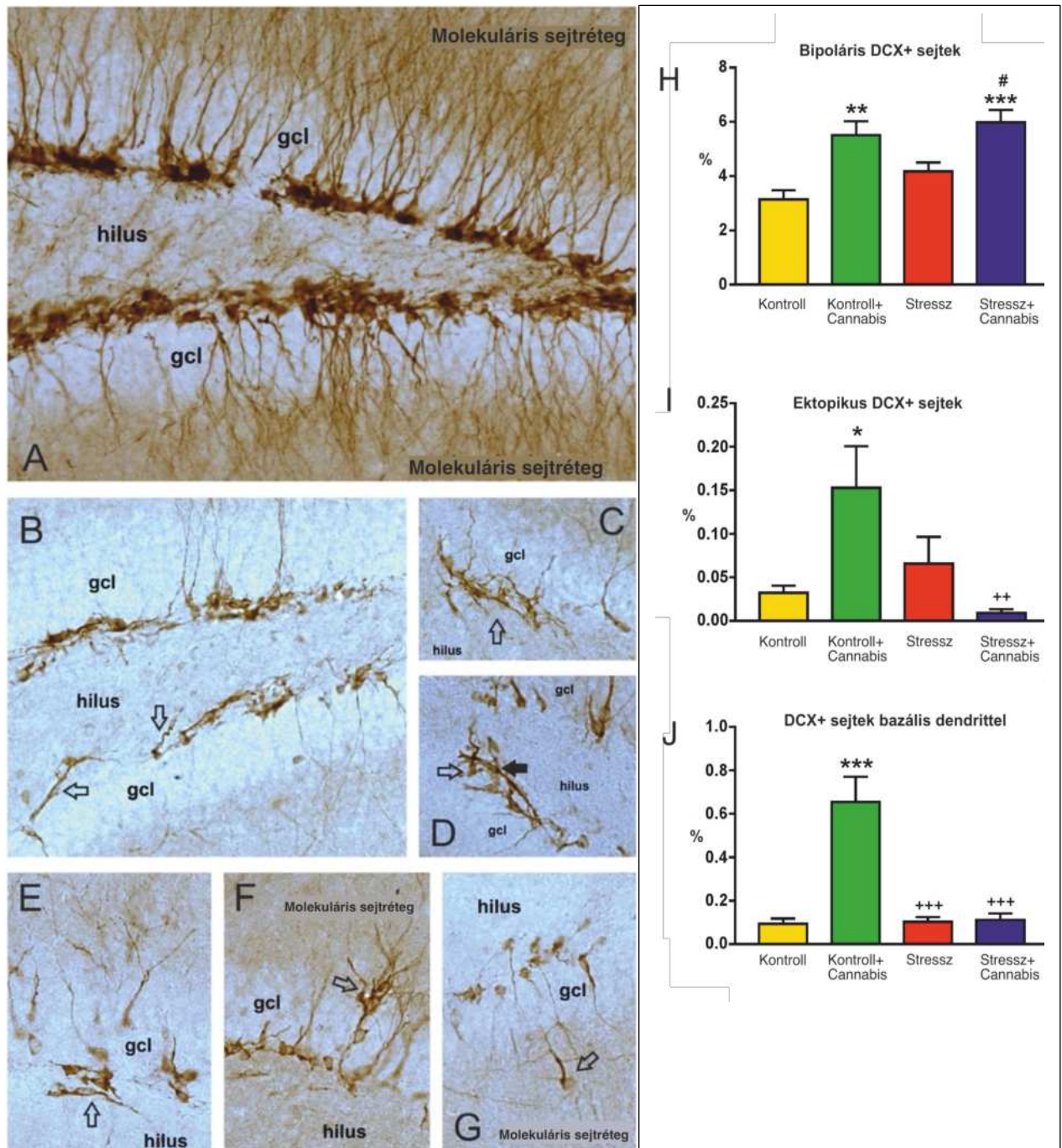
Számszerűsítettük a DCX+ sejtek migrációját is. A kontroll egerekben az éretlen neuronok többsége, (több mint 90%-a) a germinatív szubgranuláris zónában (sgz) található. A sejtek kis százaléka, (azaz <5%-a) vándorolt ki a szemcsesejtrétegbe (gcl) (29. ábra), emellett néhány sejtet a hilusban is találtuk. A kontroll állatok adataihoz képest a migrációs arányt jelentősen megváltoztatta a marihuána-expozíció.



29. ábra: Elvándorolt sejtek a gyrus dentatusban.

A *cannabis*-szal kezelt állatokban a DCX+ sejtek >15%-a a subgranuláris zónán kívül található. A két-utas ANOVA (stressz × *cannabis* kezelés) eredményei alapján a *cannabis* kezelés jelentős szignifikáns hatást [$F(1,32) = 15,87, P < 0,001$] eredményezett, illetve a stressz szignifikáns hatását [$F(1,32) = 5,46, P < 0,05$] is, és szignifikáns kölcsönhatást is feltártunk a két tényező között [$F(1,32) = 5,96, P < 0,05$]. Ezenkívül Tukey post hoc tesztje szignifikáns különbségeket mutatott ki a kontroll és a kontroll + *cannabis* ($q = 6,42, p < 0,001$), a stressz és a kontroll + *cannabis* csoport között ($q = 6,32, P < 0,001$), és a stressz + *cannabis* és a kontroll + *cannabis* kezelt csoportok között ($q = 4,78, P < 0,01$). (***: $P < 0,001$ versus kontroll; +++: $P < 0,001$ a kontroll + *cannabis* kezelt csoporthoz képest). Rövidítések: DCX: doublecortin.

A *cannabis* hosszú távú expozíciója megváltoztatta a DCX+ neuronok morfológiáját. A kontroll egerekben szinte az összes DCX+ neuron a subgranuláris zónában (30. A ábra), azaz a hilus és a szemcsesejt réteg közötti sejtrétegben található. A normális sejtek DCX-et expresszáló dendritjei átnyúltak a granularis sejtrétegen, és szétágaznak a molekuláris rétegben. A *cannabis*-szal kezelt egerek gyrus dentatusában a DCX+ sejtek gyakran szokatlan, rendellenes megjelenést mutattak (30. ábra B-G). Például a *cannabis* kezelés jelentősen megváltoztatta az idegsejtek dendritjeit és sok sejt elvesztette dendritfáját emellett bipoláris DCX+ neuronokat (30. E. ábra), vagy bazális dendritekkel rendelkező neuronokat (30. G. ábra) figyeltünk meg. A kóros megjelenésű DCX+sejtek előfordulási gyakoriságára vonatkozó kvantitatív adatokat is a 30. ábra mutatja.



30. ábra: morfológiai eltérések a hippocampusban.

Reprezentatív képek, amelyek DCX+ éretlen neuronokat mutatnak be normál megjelenésű sejteket egy kontroll állatban (A), és abnormalis morfológiájú sejteket *cannabis*-szal kezelt egerekben (B-G), illetve a statisztikai analízis eredményei grafikonokon (H-J). D és E ábrán: A kitöltetlen nyíl egy bazális dendritekkel rendelkező neuronra-, a fekete nyíl pedig egy bipoláris megjelenésű sejtre mutat. G ábrán a kitöltetlen nyíl egy ektopiás DCX+ neuronra mutat. Rövidítések: DCX: doublecortin. Minden kép azonos nagyítással készült (20-szoros objektív).

Kontroll egerek gyrus dentatus régiójában a DCX+ sejtek fő dendritjei jellemzően párhuzamosan futottak egymással a szemcsesejt rétegben, így rendezett megjelenést kölcsönöztek a neuronoknak (30. A. ábra). Ezzel szemben a *cannabis*-szal kezelt állatokban a DCX+ neuronok gyakran elvesztették dendritjeiket (30. B. ábra) valamint egyes neuronoknak abnormális dendrit vetületeit keletkeztek a hilus felé (30. B. ábra fehér nyilak). Mindezekén túl felfedeztünk olyan DCX+ neuronokat is, amelyek dendritjei minden irányban kinyúlnak, és rendezetlen, kaotikus megjelenést kölcsönöznek az idegsejteknek (30. C. ábra). Továbbá megfigyeltünk még bazális dendritekkel rendelkező neuronokat (30. D. ábra) és bipoláris megjelenésű idegsejteket is (30. E. ábra). Bipoláris DCX+ neuronat találtunk a hilusban, ami granuláris sejtréteggel párhuzamosan futó dendrites vetületekkel rendelkezik (30. E. ábra). A granuláris sejtrétegből a molekuláris rétegbe vándorló neuronokat is felfedeztünk (30. G. ábra). Mindezek mellett bazális dendrittel rendelkező ektópiás DCX+ neuront is észrevettünk, amely teljesen kivándorolt a granuláris sejtrétegből a molekuláris rétegbe (30. G. ábra fehér nyíl).

A két-utas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a *cannabis* kezelés szignifikáns fő hatását eredményezte [$F(1,32) = 41,36, P < 0,001$], és Tukey post hoc tesztje szignifikáns különbségeket mutatott ki a kontroll és a kontroll + *cannabis* között ($q = 5,75, P < 0,01$), kontroll és stressz + *cannabis* csoportok ($q = 6,90, P < 0,001$), valamint a stressz és a stressz + *cannabis* csoportok között ($q = 4,26, P < 0,05$) (30. H. ábra). A *cannabis* kezelés növelte az ektópiás DCX+ sejtek gyakoriságát is, vagyis azon sejtek előfordulását, amelyeket a gyrus dentatus molekuláris rétegében találhatók (30. I. ábra). A bazális dendritekkel rendelkező DCX+ neuronok száma is sokkal magasabb volt a *cannabis*-szal kezelt állatokban (30. J. ábra). A két-utas ANOVA (stressz \times *cannabis* kezelés) a *cannabis* kezelés szignifikáns fő hatását [$F(1,32) = 22,45, P < 0,001$], valamint a stressz szignifikáns fő hatását [$F(1,32) = 19,75, P < 0,001$] mutatja, valamint szignifikáns kölcsönhatást a két faktor között [$F(1,32) = 21,10, P < 0,001$]. Ezenkívül Tukey post hoc tesztje további szignifikáns csoportkülönbségeket mutatott ki a kontroll és a kontroll + *cannabis* csoport között ($q = 8,87, p < 0,001$), a stressz és a kontroll + *cannabis* csoport között ($q = 8,47, P < 0,001$), valamint a kontroll + *cannabis* és a stressz + *cannabis* kezelt csoportok ($q = 8,47, P < 0,001$) között.

Megbeszélés

1. Akut és krónikus perifériás gyulladás hatása a felnőttkori hippocampális neurogenesisre

Az eredményeink alapján a krónikus CFA által kiváltott ízületi gyulladás gátolhatja a felnőttkori hippocampális neurogenesiset. A korábbi tanulmányok ellentmondásosak. Például a colitis állatmodellekben a felnőttkori neurogenesis gátlását írták le (Zonis et al., 2015; Nakagawasai et al., 2020), míg mások nem tapasztaltak sejtszámban bekövetkezett változást (Gampierakis et al., 2021). Ezzel szemben az artritisz állatmodellekben vagy a hippocampális sejtproliferáció és neurogenesis átmeneti növekedéséről számoltak be (Wolf et al., 2009), vagy a sejtszámok változatlan állapotáról (Süß et al., 2015). A kutatók úgy gondolják, hogy a krónikus szisztémás gyulladás hozzájárulhat a mentális zavarok, depresszió és a neurodegeneráció kialakulásához vagy súlyosbodásához (Dantzer et al., 2008; Perry et al., 2010; Berk et al., 2013). Az egyik hipotézis szerint a perifériás gyulladást elősegítő citokinek vagy kemokinek átjutnak a vér-agy-gáton és ezek a perifériás eredetű faktorok a központi idegrendszerben lévő citokinekkel/kemokinekkel együtt aktiválhatják a glia sejteket, amelyek további gyulladásos és neurotoxikus molekulák felszabadulását váltják ki. Mindezek hozzájárulhatnak a központi idegrendszer gyulladásához és a neurodegeneráció kialakulásához (Kempuraj et al., 2017). Ezzel a hipotézissel összhangban, egy friss tanulmány a krónikus vastagbélgyulladásban szenvedő állatok vérében és hippocampuszában megemelkedett a TNF-alfa, IL-1-béta, IL-6 és IL-10 citokin szinteket írt le, valamint a vastagbélgyulladás jelentősen megváltoztatta az újonnan keletkezett neuronok migrációs mintázatát is a hippocampusban. (Gampierakis et al., 2021).

CFA által kiváltott ízületi gyulladás modellünkben egyértelmű bizonyítékokat találtunk akut és krónikus perifériás gyulladásra. A lokális gyulladást in-vivo biolumineszcens képalkotással bizonyítottuk, és a viselkedési tesztek során az ízületi gyulladással összefüggő fájdalomra utaló túlérzékenységet is dokumentáltunk. A vérsejtek számában bekövetkezett változások is a perifériás gyulladásra utaltak.

A korábbi tanulmányok alapján az általunk vizsgált citokinek/kemokinek (IL-1 α , IL-4, IL-6, IL10, TNF- α , KC, MIP-2) szinte mind befolyásolhatja a neurogenesiset a hippocampusban. Különösen az IL-1 család a gyulladást elősegítő citokinek egy olyan csoportja, amely emelkedett szintje igazoltan gátolja a felnőttkori neurogenesiset (Kaneko et al., 2006; Goshen

et al., 2008; Koo és Duman, 2008; Garber et al. al., 2018; Pawley et al., 2020). Az IL-4 egy gyulladásgátló citokin, amely aktiválja a mikroglia, és szabályozza azok működését (Pepe et al., 2014; Rossi et al., 2018), és befolyásolhatja neuronok képtődését is (Butovsky et al., 2006). IL-6 kulcsszerepet játszik az akut gyulladás kialakulásában, valamint a krónikus gyulladással betegségek patogenezisében. Az IL-6 egy pro-inflammatorikus citokin, amelyet számos kutatás alátámaszt (Dinarello et al., 2011, Smith et al., 2016). Az IL-6 termelődése gyulladással folyamatokban alapvetően megnő és központi szerepet játszik az immunválaszban. A gyulladással folyamatokban a sejtekben termelődő IL-6 közvetlenül és átmeneti receptorokon keresztül hat az immunszabályozásra. A központi idegrendszerben termelődő IL-6 jelentős szerepet játszik a neuro-immun rendszer szabályozásában és a központi idegrendszeri gyulladással folyamatokban. (Erta et al., 2012, Dinarello et al., 2011, Smith et al., 2016) valamint kifejezett gátló hatást fejt ki a neurogenézisre (Vallières et al., 2002; Monje et al., 2003). Az IL-10 szerepet játszik az immunválasz szabályozásában, gyulladásgátló citokinként tartják számon és komplex módon szabályozza a neurogenézist. A kutatók úgy gondolják, hogy gátolja az idegsejtek termelődését úgy, hogy aktív ciklusban tartja a progenitor sejteket és ezáltal a neuronok változatlan állapotban maradnak (Perez-Asensio et al., 2013). A TNF- α egy másik erős gyulladáskeltő citokin, amely megnövekedett mennyisége a gyulladás akut fázisában figyelhető meg és központi szerepet játszik más citokinek aktiválásában. Számos tanulmány bizonyította, hogy a TNF- α gátolja a neurogenézist (Ben-Hur et al., 2003; Cacci et al., 2005; Iosif et al., 2006). Mindezeket túl valószínűleg a TNF- α felelős az idegi őssejtek átmeneti aktivációjáért perifériás gyulladás esetén (Belenguer et al., 2021). A MIP-2 és a KC kulcsszerepet játszanak a helyi gyulladással reakcióban, valamint a polimorfonukleáris leukociták kemotaxisában és infiltrációjában (Wolpe et al., 1989; Frink et al., 2007). Ismereteink szerint a felnőttkori neurogenézisben betöltött szerepüket még nem vizsgálták. Kutatásunkban mindkét citokin mennyisége megemelkedett a CFA-val kezelt állatoknál a kontroll állatokhoz képest. Mindezek alapján lehetséges, hogy ezek a citokinek és az általuk indukált molekuláris és/vagy sejtgyulladással faktorok gátolják a felnőttkori neurogenézist.

A felnőttkori neurogenézis jelensége és funkciója a kutatók körében máig széles körben vitatott téma (Spalding et al., 2013; Dennis et al., 2016; Sorrells et al., 2018; Duque és Spector, 2019; Lucassen et al. al., 2020). Az újonnan született idegsejtek termelődésében bekövetkezett változások számos mentális és neurológiai rendellenességben játszik feltehetően szerepet (Winner et al., 2011; Ruan et al., 2014; Yun et al., 2016). A kutatások

szerint a mikroglia a neurogenesis egyik fő helyi szabályzó lehetne, de a pontos szabályozási mechanizmust számos más tényező is befolyásolja (Ekdahl et al., 2009; Gemma és Bachstetter, 2013). Az akut és krónikus fázisban lévő mikroglia sejtek aktivált állapota eltér egymástól ezáltal a neurogenesis különböző szakaszaira gyakorolt hatása is ellentétes (serkentő vagy gátló) lehet, tehát a hatások érinthetik a sejtkepzést, az újszülött neuronok érését vagy akár a funkcionális integrációját is (Ekdahl et al., 2009; Sierra et al., 2014). A korábban publikált kutatások szerint a DSS-indukált vastagbélgyulladásban szenvedő egerek hippocampusában megnövekedett az aktivált mikroglia száma, valamint a térfogatuk, illetve az Iba1-protein fokozott expresszióját is kimutatták (Zonis et al., 2015; Nakagawasai et al., 2020).

A kutatási eredményeink alapján, a megnövekedett CD68+ makrofágok/aktivált mikroglia denzitást tapasztaltunk a hippocampusban, de nem találtunk változást az Iba1+ mikroglia denzitásában a CFA kezelés után. A CD68 egy glikoprotein, amely főleg az endoszómális/lizoszómális kompartmentben található, és erősen expresszálódik a makrofágokban és más mononukleáris fagocitákban. Ezért jellemzően citokémiai markerként használják a monociták/makrofágok vizualizálására a gyulladt szövetek hisztokémiai elemzésében (Chistiakov et al., 2017). Egyes tanulmányokban azonban az aktivált mikroglia markereként használják (Korzhevskii et al., 2016). Az összehasonlító vizsgálatok eredményei azt sugallják, hogy a különböző mikroglia markerek eltérő potenciállal rendelkeznek a neuropatológiai elemzések során, azaz a CD68-pozitivitás az immunaktivációt és a szövetkárosodásra adott választ tükrözi, míg az Iba1 olyan marker, amely alkalmasabb strukturális vizsgálatok kimutatására (Hendrickx et al., 2007). Egy másik tanulmány leírása szerint, a CD68+ kisméretű, kerek sejtek a sérült agyszövetben specifikus sejtmarkereket fejeznek ki, ami azt jelzi, hogy ezek a sejtek valójában nem aktivált mikroglia, hanem neutrofilek (Matsumoto et al., 2007). Érdekes módon a post mortem klinikai vizsgálatok a septicus sokkban elhunyt betegek hippocampusában és agykéregben megnövekedett CD68+ sejtek számáról is beszámolnak (Lemstra et al., 2007, Westhoff et al., 2019).

A hipotézisünk szerint a perifériás ízületi gyulladás növeli a citokinek szintjét az ízületekben és a hippocampusban is, de az utóbbit a kutatási eredményeink alapján nem tudtuk megerősíteni. A gyulladt ízületekben megemelkedett az összfehérje koncentráció és hasonló tendenciát figyelhettünk meg a CFA-val kezelt állatok hippocampusában is, különösen az akut fázisban. Mindezekből arra következtettünk, hogy a teljes

eredmények azt mutatják, hogy a marihuánát használók testtömeg-indexe általában alacsonyabb volt, mint a nem használóké (Sansone és Sansone, 2014). A marihuána és a benne lévő kannabinoidok, valamint a szervezetben termelődő, a kannabinoid receptorokat aktiváló anyagok (azaz endokannabinoidok) specifikus hatást gyakorolnak a táplálkozás szabályozására. Az endokannabinoidok fontos biomedátorok és metabolikus szabályozók az emlősök fiziológiájában, változatos és mindenütt jelenlévő moduláló hatásokkal, beleértve a testtömeg szabályozását (Vemuri et al., 2008). Az emlős szervezetében az endogén kannabinoid rendszer két legrelevánsabb receptora a CB1 és CB2 receptorok, amelyek túlnyomórészt az agyban, illetve az immunrendszerben helyezkednek el, valamint CB1 receptorok a test más területein is találhatóak, például a gyomor- és bélszövetben is. A CB agonizmusáról ismert, hogy serkentik a táplálékfelvételt, tehát a CB receptorok stimulálása az emlősökben kifejezetten növeli az étkezés utáni vágyat és elősegíti az energia zsírként történő lerakódását a zsírszövetekben (Kirkham, 2008). Ennek a paradigmának megfelelően az elmúlt években a kutatók a CB receptorok antagonizálásának hatásait vizsgálták, hogy csökkentsék a táplálékfelvételi ingereket. A kutatások eredményei alapján csökkent kalóriabevitelt és ezt követően súlycsökkenést figyeltek meg a CB receptorok antagonizálást követően. Patkányokon és egereken végzett empirikus vizsgálatok is azt mutatják, hogy a CB receptor farmakológiai blokája valóban gátolja a normál súlygyarapodást, csökkenti a táplálék felvétel utáni vágyat, és kevesebb tápanyagot vittek be az állatok, valamint a testsúlygyarapodásuk is lecsökkent (DiPatrizio et al., 2011, Riedel et al., 2009). Továbbá a marihuána hatásai a kezdeti testsúly státuszának függvényei is – azaz lehet, hogy a marihuána egy olyan anyagcsere-szabályozó anyag, amely növeli a testsúlyt alacsony testsúlyú embereknél, de a normál súlyú vagy túlsúlyos egyéneknél viszont nem. A marihuána fogyasztás nem mindig vezet testsúlycsökkenéshez vagy növekedéshez, mivel számos tényező befolyásolja az emberi anyagcserét és az energiaháztartást. Fontos megjegyezni, hogy a *cannabis* hatásai több tényezőtől is függenek, például a marihuána dózistól, használatának gyakoriságától vagy összetételétől; valamint az egyén biológiai jellemzőit és az előzetes egészségi állapotát is, testmozgási szokásaitól, esetleg a marihuánával egyidejűleg felírt gyógyszerektől (Degenhardt et al., 2001, (Sansone és Sansone, 2014).

Kísérletünkben a *cannabis* füst és a stressz egyaránt csökkentette az állatok testtömeggyarapodását, és ebben az esetben a két tényező között szignifikáns kölcsönhatást találtunk. Ez azt jelenti, hogy a *cannabis* kezelés segíthet a stressz által okozott testtömeg-csökkenésen is.

A marihuánafüst sok olyan rákkeltő és mérgeanyagokat is tartalmazhat, amelyek a dohányfüstben is megtalálhatóak, így a dohányzáshoz hasonlóan irritálhatja a légutakat (Csabai et al., 2016). Klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy a rendszeres *cannabis* fogyasztás összefüggésben áll különféle légúti gyulladásokkal (Jett et al., 2018). Helyes és munkatársai kutatási eredményei szerint a marihuána 4 hónapig tartó mindennapos belélegzése gyulladást, szövetpusztulást és tüdőtagulást eredményez egerekben (Helyes et al., 2017). Egy másik, az Egyesült Államokban végzett nagy egyedszámot vizsgáló követéses klinikai vizsgálat nem talált semmilyen káros spirometrikus változást a marihuána fogyasztása alatt (Kempker et al., 2015). Az utóbb említett eredményekkel összhangban a kutatásunkban a *cannabis* füst nem befolyásolta a tüdőfunkció egyik tényezőjét sem viszont az ismételt stresszhatás gátolta számos tüdőfunkciók normális fejlődését. Legjobb tudomásunk szerint a miénk az első olyan tanulmány, amely feltárta a krónikus stressz negatív hatását a tüdőfunkciókra. A szakirodalomban nem találtunk összehasonlítható kísérleti adatokat. Humán tanulmányok azonban dokumentálják, hogy a pszichés stressz gyermekeknél összefüggésben áll az asztmás megbetegedésekkel (Chen et al., 2006). Preklinikai vizsgálatok arról számoltak be, hogy az egerekben a krónikus stressz tüdőgyulladást okozhat (Kiank et al., 2008), és súlyosbíthatja az allergiás légúti gyulladást is (Okuyama et al., 2007).

Az állatok magatartására a viselkedési tesztekben sem a stressznek, sem a *cannabis* kezelésnek nem volt hatása a 3-4 hetes expozíció után. A nyílt terep tesztben, ahol az állatok szorongással összefüggő viselkedését vizsgáltuk 8 hetes kezelés után, a stressz szorongáskeltő hatást fejtett ki, míg – várakozásainkkal ellentétben – a *cannabis* csak enyhe tendenciát mutatott a stressz okozta szorongás enyhítésére. A marihuána inhalálása azonban jelentős hatással volt az állatok mosakodási magatartására. A *cannabis*-szal kezelt egerek hamarabb kezdték tisztogatni magukat, mint a kontroll egerek, és lényegesen több időt töltöttek ezzel a tevékenységgel. Az önápolás, mosakodás a rágcsálók veleszületett viselkedése, amelyet számos idegi áramkör szabályoz. Az aberráns önápolást számos neuropszichiátriai rendellenességet vizsgáló állatmodellre jellemző, beleértve a káros szerek használatára irányuló állatmodelleket is. Az önápolás vizsgálata is egy fontos szempont a transzlációs idegtudomány számára, mivel minden egyes betegségmodell eltérő ápolási fenotípust eredményezhet (Kalueff et al., 2016). Jelen tanulmányunk alátámasztja azt az elképzelést, hogy az önápolás mikrostruktúráját érdemes részletesebben megvizsgálni, mert

a rendellenes öntisztálkodási viselkedés jelezheti az állatok stressz- vagy szorongási szintjét az adott modellben (Kalueff et al., 2007).

A *cannabis* használatnak az egyén kognitív teljesítményére gyakorolt hatása valószínűleg a legvitatottabb kérdés ebben a témakörben. Egyes kutatások szerint a *cannabis* használat javíthat különféle kognitív funkciókon (Osborne et al., 2017; Tervo-Clemmens et al., 2018; Gruber et al., 2018), míg mások azt állítják, hogy rontja azokat (Volkow et al., 2014, 2016; Broyd et al., 2016; Curran et al., 2016). A kísérletünkben nem tudtuk kimutatni a marihuánafüst expozíciónak bármilyen (pozitív vagy negatív) hatását az állatok kognitív teljesítményére az új tárgyfelismerési és Y labirintus tesztekben. Több kutatás szerint a magas 9-THC- vagy alacsony CBD-tartalmú *cannabis* nagyobb kognitív károsodást okozhat (Colizzi és Bhattacharyya, 2017; Murphy et al., 2017). Esetünkben a kognitív tesztek a 3. és a 4. hét végén végeztük és előfordulhat, hogy ezekben az időpontokban nem álltak akutan az állatok a *cannabis* hatása alatt, így nem tudunk kimutatható különbségeket mérni. Valószínűleg eredményesebb lett volna, ha a kognitív tesztek a kísérlet végén végezzük el, amely lehetővé tette volna az állatok kognitív teljesítményének közvetlen összehasonlítását a felnőttkori neurogenesis eredményeivel. A kutatási terv alapján azért nem végeztünk kognitív tesztek a kísérlet végén, mert a tanulás befolyásolhatja a felnőttkori neurogenesis folyamatát (Gould et al., 1999), és el akartuk kerülni azokat a tesztek a kísérlet végén, amely zavarhatja a neuroplaszticitást.

A felnőttkori neurogenesis a neuroplaszticitás egy speciális formája mely a felnőtt hippocampus gyurus dentatusában játszódik és számos fiziológiai és patofiziológiai állapothoz kapcsolódik (Eisch et al., 2000; Mandyam et al., 2008; Noonan et al., 2010; Bayer et al., 2015). Kutatások alapján már tudjuk, hogy az endokannabinoid rendszer és a CB1 receptor hozzájárul a neurális progenitor sejtek proliferációjához és a neurogenesishez is (Aguado et al., 2005, 2007). Több tanulmány is vizsgálta a kannabinoidok hatását a felnőttkori hippocampális neurogenesisre (Prenderville et al., 2015), de legjobb tudomásunk szerint egyik tanulmány sem használt *cannabis* füstöt. A napjainkban fellelhető kutatások szintetikus kannabinoidokat vagy növényi eredetű kivonatokat fecskendeztek be a kísérleti állatokba és a kannabinoid kezelés pozitív, serkentő hatásáról számolnak be a felnőttkori neurogenesisre vonatkozóan (Jiang et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Marchalant et al., 2009; Wolf et al., 2010; Rivera et al., 2011; Suliman et al., 2018) valamint arról is, hogy a kannabinoid jelátvitel serkentése a hippocampusban megakadályozhatja a stressz által kiváltott viselkedési változásokat (Campos et al., 2013; Scarante et al., 2017; Fogaça et al., 2018).

Kutatásunkban vizsgáltuk tehát a felnőttkori hippocampális neurogenézist is, és megállapítottuk, hogy a krónikus stressz gátolta a progenitor sejtproliferációt a gyrus dentatusban, de a vártakkal ellentétben a marihuána dohányzás nem befolyásolta ezt. Ezzel szemben a *cannabis* füst expozíciója jelentős hatással volt a doublecortin-pozitív (DCX+) éretlen neuronokra. A *cannabis* szignifikánsan csökkentette a DCX+ neuronok számát a gyrus dentatusban, serkentette migrációjukat és a sejtek dendritjeinek morfológiáját is alaposan megváltoztatta a marihuána kezelés. A fellelhető irodalomban ellentmondásosak az eredmények a kannabinoidok DCX+ neuronokra gyakorolt hatásáról. Swiss egerekben a CBD ismételt adagolása kisebb dózisban (3 mg/kg) növelte a DCX+ sejtek számát, de magasabb dózisonál (30 mg/kg) negatív hatást váltott ki a hippocampusban (Schiavon et al., 2016). Egy másik tanulmány szerint a CBD-vel való táplálás serkentette felnőttkori neurogenézist a nőstény C57Bl/6 egerekben, viszont a THC-nek nem volt ilyen hatása (Wolf et al., 2010). Ezzel szemben egy másik kutatás eredményei szerint a WIN 55 212-2 kannabinoid receptor agonista napi injekciója 3 héten át serdülő patkányoknak csökkentette az újonnan keletkező neuronok számát a hippocampusban (Abboussi et al., 2014). Guimarães és munkatársai krónikus, kiszámíthatatlan stresszt (CUS) alkalmaztak az állatokon CBD többszöri injektálásával kombinálva, majd a CBD-kezelés szorongásoldó hatásáról számoltak be, valamint normalizálódott a progenitor sejtek proliferációja és hippocampális neurogenesis a stressznek kitett állatokban. Legújabb tanulmányukban a CBD-kezelés a CB1/CB2 receptorok aktiválása révén megakadályozhatja a stressz által kiváltott negatív hatásokat a felnőttkori neurogenesis gátlását is (Fogaça et al., 2018). További kutatások eredményei azt mutatják, hogy a CBD alkalmazása különféle kísérleti körülmények között növelheti a DCX+ sejtszámot (Schiavon et al., 2016; Mori et al., 2017). Egy másik tanulmány, amely a 9-THC és a CBD hatását hasonlította össze, azt találta, hogy a 9-THC csökkentheti a DCX+ sejtszámot (Wolf et al., 2010, Suliman et al., 2018). Ezek alapján és az eredményeink szerint a vizeletből mért magas 9-THC-tartalom megmagyarázhatja a csökkent DCX+ sejtszámot a hippocampusban. Egy másik kutatócsoport eredményei szerint a CBD-kezelés serkentheti a DCX+ sejtmigrációt a szubgranuláris zónából a gyrus dentatus granuláris zónájába (Fogaça et al., 2018). Ezek az eredmények összhangban vannak azzal a megállapítással, hogy az endokannabinoidok fontos szerepet játszanak az agy fejlődésében, szabályozzák a sejtproliferációt, migrációt, differenciálódást és túlélést (Harkany et al., 2007). Egy másik, a fejlődést tanulmányozó kutatás további bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a CB1/CB2 receptor agonista WIN

55,212-2 prenatális expozíciója megváltoztathatja az újonnan született neuronok vándorlását az agykéregben (Saez et al., 2014).

Ismereteink szerint a mi eredményeink az elsők, amelyek a DCX+ sejtek megváltozott dendritikus architektúrájáról számolnak be a *cannabis* kezelés hatására. A normál DCX+ sejtek DCX-et expresszáló dendritekkel rendelkeznek, amelyek a szemcsesejt rétegen keresztül molekuláris sejtrétegig ágaznak szét. Ezzel szemben sok DCX+ sejtet figyeltünk meg, amelyek elvesztették dendritikus DCX-expressziójukat a marihuána kezelés után, valamint a *cannabis*-szal kezelt állatokban a bipoláris DCX+ sejtek és a bazális dendritekkel rendelkező sejtek száma is megnövekedett. Az irodalomból ismert, hogy a szemcsesejteken lévő bazális dendriteket epilepsziás rohamok indukálhatják (Ribak et al., 2012; Hester és Danzer, 2014), így az ilyen sejtek jelenléte abnormális neurális áramkörre utalhat. Kontroll állatokban a DCX+ sejtek a gyrus dentatus subgranuláris zónájában lokalizálódnak. A *cannabis*-szal kezelt állatokban nagyobb gyakorisággal találtunk elvándorolt DCX+ sejteket ebből a régióból, és ezek a sejtek megjelentek a hilusban, a granuláris sejtrétegben, valamint a molekuláris sejtrétegben is. Az egyik lehetséges magyarázata annak, hogy a korábbi tanulmányok nem számoltak be ilyen abnormális megjelenésű sejtekről a kannabinoid kezelés után, hogy a mi kutatásunk sokkal körültekintőbb és alaposabb volt a korábbi tanulmányokhoz képest. A legtöbb tanulmány csak 5-6 metszetet vizsgált állatonként, míg mi a hippokampuszból minden harmadik metszetet vizsgáltunk, ami átlagosan 24 (12 pár) gyrus dentatust tartalmazó metszetsorozatot eredményezett állatonként.

Összefoglalva, az eredményeink alapján teljes mértékig egyik hipotézisünket sem tudtuk bizonyítani. A marihuánafüstnek nincs stresszoldó hatása a magatartási tesztek vizsgálata alapján, sőt, abnormális mosakodási magatartást figyeltünk meg ennél a csoportnál. Továbbá, füstöt inhalált egereknek nem károsodott a légzésfunkciója, viszont a stressznek kitett állatoknak igen, valószínűleg a csőben töltött idő alatt nem tudott a tüdejük a megszokott módon fejlődni. A várttal ellentétben, a kontroll egerekhez képest mindegyik csoport súlygyarapodása elmaradott volt. Mindezekén túl, nem tudtuk bizonyítani azt sem, hogy krónikus marihuánafüst expozíció serkentené a neurogenézist a hippokampuszban, éppen ellenkezőleg, a marihuánafüst csökkentette a neurogenézist mint ahogy a stressz is. A marihuánafüst inhalálása megváltoztatta az idegsejtek dendritjeit és sok sejt elvesztette dendritfáját, számos idegsejt vándorolt szokatlan területekre. Mindezek hatással lehetnek a normális ingerületvezetési képességre, és kóros neurológiai kórképeket predesztinálhatnak.

Következtetések, kitekintés

A felnőttkori hippocampális neurogenesis a kutatók körében egy intenzíven kutatott, ugyanakkor, a jelentősége szempontjából egy máig vitatott témakör. Fontos hangsúlyozni, hogy az irodalmi eredmények leginkább kísérleti állatokból (egerek és patkányok) származnak és jóval kevesebb bizonyíték származik főemlősökből, illetve humán mintákból. A két legfontosabb kérdés mindmáig tisztázásra vár: Vajon a kísérleti állatokban megfigyelt biológiai folyamatok, mennyire tükrözik az emberi agy működését? Vajon a felnőtt emberi hippocampusban milyen mennyiségű új neuron képződik, és ezek pontosan milyen fiziológiai folyamatokban vesznek részt (Kempermann et al., 2018; Lucassen et al., 2020)? A legfőbb probléma, hogy ezt a sejtszintű folyamatot leginkább csak post mortem szövettani módszerekkel lehet vizsgálni. Az irodalmi adatokból tudjuk, hogy a legtöbb eddig vizsgált állatfaj agyában, köztük több főemlős faj agyában is lejátszódik ez a folyamat (Augusto-Oliveira et al., 2019). Számos vizsgálat alátámasztja, hogy a felnőttkori hippocampális neurogenesis főemlősökben és rágcsálókban is hasonló módon zajlik, ugyanakkor jelentős különbségeket is kimutattak (Miller et al., 2013; Fasemore et al., 2018; Augusto-Oliveira et al., 2019). Az újonnan született sejtek érése lassabb a főemlősökben, mint a rágcsálókban, mivel a sejtek legnagyobb ingerlékenységével jellemezhető időszak jelentősen meghosszabbodhat a több évig vagy évtizedekig élő szervezetekben (Kohler et al., 2011; Yuan et al., 2014). A módszertani nehézségek ellenére bizonyított az is, hogy a felnőttkori hippocampális neurogenesis lejátszódik az emberi agyban is. 1998-ban publikálták az első kutatást arról, hogy előfordulhat-e emberben a felnőttkori neurogenesis. A szerzők kimutatták, hogy a BrdU beépült a felnőtt humán gyrus dentatus bizonyos sejtjeibe. Néhány hónappal a timidin analóg beadása után a BrdU+ sejtek kimutathatóak voltak több neuronális marker mellett, így demonstrálva a felnőttkorban született szemcsesejtek korlátozott populációjának jelenlétét embereknél (Eriksson et al., 1998). Egy 2013-ban publikált tanulmány pedig egy másik innovatív megközelítést alkalmazott az emberi agyban újonnan keletkezett sejtek kimutatására és számuk meghatározására. Ebben a kutatók radioaktív szénizotópok vizsgálatával megerősítették az újonnan képződött idegsejtek létezését a felnőtt emberi agyban (Spalding et al., 2013). Ez a két tanulmány kihasználta a nukleinsavak nagyobb posztmortem stabilitását a fehérjékhez képest, és megnyitotta az utat a terület jövőbeli fejlődése előtt. A következő években más csoportok, elsősorban az immunhisztokémia felhasználásán alapuló technikákkal hozzájárultak a felnőttkori hippocampális neurogenesis embereknél való előfordulását alátámasztó bizonyítékokhoz

(Boldrini et al., 2009; Crews et al., 2010; Knoth et al. al., 2010; Ernst et al., 2014, Moreno-Jiménez et al., 2021). Történtek próbálkozások arra vonatkozóan is, hogy in vivo mágneses rezonancia képalkotó vizsgálatok segítségével jelenítsék meg ezt a speciális sejtszintű folyamatot, de ezek a próbálkozások mindezülig nem hoztak átütő sikert (Ho et al., 2013).

Összefoglalásként, az itt bemutatott kutatások olyan mindennapi betegségeket és egészségügyi problémákat érintenek, amelyek gyakoriak. A Föld népességének körülbelül 2.5%-a fogyaszt marihuánát (UNODC, 2017), 0,5-1%-a szenved reumatoid artritiszben (Gibofsky et al., 2012) és a lakosság 40%-a volt stressz forrásnak kitéve és körülbelül 30%-a érzett fizikai fájdalmat vagy szomorúságot a felmérés előtti napokban (Gallup Global Emotions Report, 2022). Mindezek a tényezők negatívan hatnak a felnőttkori hippocampális neurogenesisre, melyek további egészségügyi problémák kialakulását vonhatja maga után. A neurogenesis hozzájárulhat a stresszkezeléshez és a stresszhormonok szabályozásához viszont a csökkent neurogenesis a stresszkezelés képességének csökkenéséhez és az érzelmi reaktivitás növekedéséhez vezethet. A hippocampusban bekövetkező új idegsejtek képződése kapcsolatba hozható a hangulati szabályozással is tehát a csökkent neurogenesis növelheti a depresszió, a szorongás és más hangulat zavarok kockázatát (Santarelli et al., 2003; Snyder et al., 2011; Surget et al., 2011; Kim et al., 2012; Schoenfeld and Cameron, 2015). A krónikus szisztémás gyulladás hozzájárulhat a mentális zavarok, depresszió és a neurodegeneráció kialakulásához vagy súlyosbodásához, valamint csökkentheti a neurogenesis mértékét is (Dantzer et al., 2008; Perry et al., 2010; Berk et al., 2013). A neurogenesis szerepet játszhat az agy regenerációs képességében, és hozzájárulhat a neurodegeneratív betegségek kockázatának csökkentéséhez. A csökkent neurogenesis lassíthatja az agyi sérülések utáni gyógyulási folyamatokat, például a stroke vagy a koponyatrauma utáni rehabilitációt, valamint neurodegeneratív betegségek, például az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór kialakulásának kockázatát növelheti (Hanspal és Gillotin, 2022, Disouky és Lazarov, 2021, Marchetti et al., 2020, Tang et al., 2022).

Az endokannabinoid rendszer és az endokannabinoidok fontos szerepet játszanak az agy fejlődésében, szabályozzák a sejtproliferációt, migrációt, differenciálódást és túlélést (Harkany et al., 2007). A marihuána fogyasztás gátolhatja az új idegsejtek termelését és integrálását a hippocampusban (Rusznák et al., 2018). A hosszú távú marihuána fogyasztás érzékelhető tanulási nehézségeket és a memóriazavarok előfordulását okozhatja. Az agy plaszticitásának csökkenése és az új idegsejtek termelésének gátlása is negatív hatással lehet a tanulásra, memóriára és kognitív funkciókra (Denny et al., 2014; Anacker és Hen, 2017),

tehát a csökkenő neurogenesis kognitív funkciók romlásához vezethet, mint például a tanulási képességek csökkenését okozhatja vagy memória problémákat, illetve a gondolkodási rugalmasság csökkenése is megfigyelhető (Gillotín et al., 2021).

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a felnőttkori hippocampális neurogenesis feltehetően fontos szerepet játszik az agy egészséges működésében és minden olyan hatás, mely megzavarja ezt a fiziológias folyamatot, különböző kórképek kialakulásához vezethet.

Rövidítések jegyzéke

2-AG: 2-arachidonoil-glicerin

5-HT: 5-hidroxi-triptamin / szerotonin

ABC: avidin-biotin complex / avidin-biotin komplex

ACTH: adrenocorticotropic hormone / adrenokortikotrop hormon

AEA: anandamid / N-arachidonoil-etanolamin

AIDS: acquired immunodeficiency syndrome / szerzett immunhiányos szindróma

ANOVA: analysis of variance / varianciaanalízis

BrdU: 5-bróm-2'-dezoxiuridin

CaCl₂: calcium chloride / kalcium-klorid

CA1: cornu ammonis 1 region of the hippocampal formation / cornu ammonis 1. számú régiója

CA3: cornu ammonis 3 region of the hippocampal formation / cornu ammonis 3. számú régiója

CBC: cannabichromene / kannabikromén

CBD: cannabidiol / kannabidiol

CBDV: cannabidivarin

CBG: cannabigerol

CBN: cannabinol / kannabinol

CD68: cluster of differentiation 68 / differenciálási klaszter 68

CFA: complete Freund's adjuvant / komplett Freund-adjuváns

DA: dopamin

DAB: 3,3'-diaminobenzidin

DCX: doublecortin

DG: dentate gyrus / gyrus dentatus

DNS: deoxyribonucleic acid / dezoxiribonukleinsav

DPA: dynamic plantar aesthesiometer / dinamikus plantáris eszteziométer

DSS: dextran sulfate sodium / dextranszulfát-nátriumot

EDTA: ethylene-diamine tetra-acetic acid / etilén-diamin-tetraecetsav

FAAH: fatty acid amide hydrolase / zsírsavamid-hidroláz

GABA: gamma-aminobutyric acid = gamma-amino-vajsav

GCL: granular cell layer / granuláris sejtréteg / szemcsesejt réteg

GPR6: G protein-coupled receptor 6 / G-fehérjéhez kapcsolt 6-os receptor

HIV: human immunodeficiency virus / humán immunhiányos vírus

HLA: human leukocyte antigen / Humán leukocita antigén

HPLC: high performance liquid chromatography / nagy teljesítményű folyadékkromatográfia

Iba1: ionized calcium-binding adapter molecule 1/ ionizált kalciumkötő adaptermolekula 1
IgG: immunglobulin G
IL: interleukin
i.p.: intraperitoneális
i.pl.: intraplantáris
i.v.: intravénás
K₂EDTA: dikálium-etilén-diamin-tetraecetsav
KC: keratinocita kemoattraktáns
LPS: lipopoliszacharid
LV: lateral ventricles / laterális agykamra
MDMA: 3,4-metilén-dioxi-metamfetamin (vagy ecstasy)
MIP-2: macrophage inflammatory protein-2/makrofág gyulladássos protein-2
MPO: mieloperoxidáz
MS: mass spectrometry / tömegspektrometria
NADPH: kükotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NaOH: nátrium-hidroxid
NGS: normal goat serum / normál kecske szérum
NSCs: neural stem cells / neuronális őssejtek
OB: olfactory bulb / bulbus olfactorius
OF: open field test / nyílt terep teszt
PBS: phosphate buffered saline / foszfát puffer
PFA: paraformaldehid
PCNA: proliferating cell nuclear antigen / proliferáló sejtmag-antigén
s.c.: szubkután/subcutan
S.E.M.: standard error of mean/átlag standard hibája
SVZ: subventrikuláris zóna
THC: Δ9-tetrahidrokannabinol
THCV: tetrahidrocannabivarin
TNF-α: tumor nekrozis faktor alfa
TRIS: trisz-(hidroximetil)-amino-metán
TRP: tranziens receptorpotenciál

Irodalom jegyzék

Abboussi O, Tazi A, Paizanis E, El Ganouni S. Chronic exposure to WIN55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis. *Pharmacol Biochem Behav.* 2014 May;120:95-102. doi: 10.1016/j.pbb.2014.02.014.

Abrams DI, Guzman M. Cannabis in cancer care. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Jun;97(6):575-86. doi: 10.1002/cpt.108.

Abrams DI, Jay CA, Shade SB, Vizoso H, Reda H, Press S, Kelly ME, Rowbotham MC, Petersen KL. Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology.* 2007 Feb 13;68(7):515-21. doi: 10.1212/01.wnl.0000253187.66183.9c.

Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2005 Oct;19(12):1704-6. doi: 10.1096/fj.05-3995fje.

Aguado T, Romero E, Monory K, Palazuelos J, Sendtner M, Marsicano G, Lutz B, Guzmán M, Galve-Roperh I. The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):23892-8. doi: 10.1074/jbc.M700678200.

Allen KM, Fung SJ, Weickert CS. Cell proliferation is reduced in the hippocampus in schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry.* 2016 May;50(5):473-80. doi: 10.1177/00048674155897

Amrein I, Slomianka L, Lipp HP. Granule cell number, cell death and cell proliferation in the dentate gyrus of wild-living rodents. *Eur J Neurosci.* 2004 Dec;20(12):3342-50. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03795.x.

Anacker C, Hen R. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 2017 Jun;18(6):335-346. doi: 10.1038/nrn.2017.45

Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., et al. (2008). Antibacterial cannabinoids from cannabis sativa: A structure–activity study. *Journal of Natural Products*, 71(8), 1427–1430. <http://doi.org/10.1021/np8002673>.

Apple DM, Fonseca RS, Kokovay E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. *Brain Res.* 2017 Jan 15;1655:270-276. doi: 10.1016/j.brainres.2016.01.023.

Augusto-Oliveira M, Arrifano GPF, Malva JO, Crespo-Lopez ME. Adult Hippocampal Neurogenesis in Different Taxonomic Groups: Possible Functional Similarities and Striking Controversies. *Cells.* 2019 Feb 5;8(2):125. doi: 10.3390/cells8020125. PMID: 30764477; PMCID: PMC6406791.

Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM. Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry.* 2001 Mar;178:200-6. doi: 10.1192/bjp.178.3.200.

Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di Marzo V. Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* 2001 Feb;15(2):300-2. doi: 10.1096/fj.00-0399fje.

Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Mar;29(3):450-60. doi: 10.1038/sj.npp.1300320.

Bátiz LF, Castro MA, Burgos PV, Velásquez ZD, Muñoz RI, Lafourcade CA, Troncoso-Escudero P, Wyneken U. Exosomes as Novel Regulators of Adult Neurogenic Niches. *Front Cell Neurosci.* 2016 Jan 19;9:501. doi: 10.3389/fncel.2015.00501.

Bayer R, Franke H, Ficker C, Richter M, Lessig R, Büttner A, Weber M. Alterations of neuronal precursor cells in stages of human adult neurogenesis in heroin addicts. *Drug Alcohol Depend.* 2015 Nov 1;156:139-149. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.09.005.

Bayer SA, Yackel JW, Puri PS. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science.* 1982 May 21;216(4548):890-2. doi: 10.1126/science.7079742

Becker S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus.* 2005;15(6):722-38. doi: 10.1002/hipo.20095.

Belenguer G, Duart-Abadia P, Jordán-Pla A, Domingo-Muelas A, Blasco-Chamarro L, Ferrón SR, Morante-Redolat JM, Fariñas I. Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell.* 2021 Feb 4;28(2):285-299.e9. doi: 10.1016/j.stem.2020.10.016.

Ben-Hur T, Ben-Menachem O, Furer V, Einstein O, Mizrachi-Kol R, Grigoriadis N. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2003 Nov;24(3):623-31. doi: 10.1016/s1044-7431(03)00218-5.

Bengzon J, Kokaia Z, Elmér E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10432-7. doi: 10.1073/pnas.94.19.10432

Bergamaschi MM, Queiroz RH, Chagas MH, de Oliveira DC, De Martinis BS, Kapczinski F, Quevedo J, Roesler R, Schröder N, Nardi AE, Martín-Santos R, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. *Neuropsychopharmacology*. 2011 May;36(6):1219-26. doi: 10.1038/npp.2011.6.

Berger T, Lee H, Young AH, Aarsland D, Thuret S. Adult Hippocampal Neurogenesis in Major Depressive Disorder and Alzheimer's Disease. *Trends Mol Med*. 2020 Sep;26(9):803-818. doi: 10.1016/j.molmed.2020.03.010.

Berk M, Williams LJ, Jacka FN, O'Neil A, Pasco JA, Moylan S, Allen NB, Stuart AL, Hayley AC, Byrne ML, Maes M. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med*. 2013 Sep 12;11:200. doi: 10.1186/1741-7015-11-200.

Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett*. 2000 Sep 8;291(1):17-20. doi: 10.1016/s0304-3940(00)01368-9.

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001 Dec;70(6):849-60.

Bisogno T, Maccarrone M. Latest advances in the discovery of fatty acid amide hydrolase inhibitors. *Expert Opin Drug Discov*. 2013 May;8(5):509-22. doi: 10.1517/17460441.2013.780021.

Blessing EM, Steenkamp MM, Manzanares J, Marmar CR. Cannabidiol as a Potential Treatment for Anxiety Disorders. *Neurotherapeutics*. 2015 Oct;12(4):825-36. doi: 10.1007/s13311-015-0387-1.

Boger DL, Patterson JE, Jin Q. Structural requirements for 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} serotonin receptor potentiation by the biologically active lipid oleamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4102-7. doi: 10.1073/pnas.95.8.4102.

Boldrini M, Underwood MD, Hen R, Rosoklija GB, Dwork AJ, Mann JJ, Arango V (2009) Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 34:2376–2389. 10.1038/npp.2009.75

Borrelli F, Fasolino I, Romano B, Capasso R, Maiello F, Coppola D, Orlando P, Battista G, Pagano E, Di Marzo V, Izzo AA. Beneficial effect of the non-psychoactive plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. *Biochem Pharmacol*. 2013 May 1;85(9):1306-16. doi: 10.1016/j.bcp.2013.01.017.

Borsini A, Zunszain PA, Thuret S, Pariante CM. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci*. 2015 Mar;38(3):145-57. doi: 10.1016/j.tins.2014.12.006.

Botz B, Bölcskei K, Kereskai L, Kovács M, Németh T, Szigeti K, Horváth I, Máthé D, Kovács N, Hashimoto H, Reglődi D, Szolcsányi J, Pintér E, Mócsai A, Helyes Z. Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Oct;66(10):2739-50. doi: 10.1002/art.38772

Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 2000 Jan;157(1):115-8. doi: 10.1176/ajp.157.1.115.

Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*. 2003 Dec 1;467(1):1-10. doi: 10.1002/cne.10874.

Brown KJ, Laun AS, Song ZH. Cannabidiol, a novel inverse agonist for GPR12. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):451-454. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.001.

Broyd SJ, van Hell HH, Beale C, Yücel M, Solowij N. Acute and Chronic Effects of Cannabinoids on Human Cognition-A Systematic Review. *Biol Psychiatry*. 2016 Apr 1;79(7):557-67. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.12.002.

Busto U, Bendayan R, Sellers EM. Clinical pharmacokinetics of non-opiate abused drugs. *Clin Pharmacokinet*. 1989 Jan;16(1):1-26. doi: 10.2165/00003088-198916010-00001.

Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci*. 2006 Jan;31(1):149-60. doi: 10.1016/j.mcn.2005.10.006.

Cacci E, Claassen JH, Kokaia Z. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res*. 2005 Jun 15;80(6):789-97. doi: 10.1002/jnr.20531.

Cameron HA, Schoenfeld TJ. Behavioral and structural adaptations to stress. *Front Neuroendocrinol*. 2018 Apr;49:106-113. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.02.002.

Campos AC, Ortega Z, Palazuelos J, Fogaça MV, Aguiar DC, Díaz-Alonso J, Ortega-Gutiérrez S, Vázquez-Villa H, Moreira FA, Guzmán M, Galve-Roperh I, Guimarães FS. The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Jul;16(6):1407-19. doi: 10.1017/S1461145712001502.

Canales JJ. Adult neurogenesis and the memories of drug addiction. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2007 Aug;257(5):261-70. doi: 10.1007/s00406-007-0730-6.

Carliner H, Brown QL, Sarvet AL, Hasin DS. Cannabis use, attitudes, and legal status in the U.S.: A review. *Prev Med*. 2017 Nov;104:13-23. doi: 10.1016/j.ypmed.2017.07.008.

Carroll BJ. Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*. 2004 Jul;161(7):1309-10; author reply 1310-1. doi: 10.1176/appi.ajp.161.7.1309-a.

Cascio MG, Gauson LA, Stevenson LA, Ross RA, Pertwee RG. Evidence that the plant cannabinoid cannabigerol is a highly potent alpha2-adrenoceptor agonist and moderately potent 5HT1A receptor antagonist. *Br J Pharmacol*. 2010 Jan;159(1):129-41. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00515.x

Chagas MH, Zuardi AW, Tumas V, Pena-Pereira MA, Sobreira ET, Bergamaschi MM, dos Santos AC, Teixeira AL, Hallak JE, Crippa JA. Effects of cannabidiol in the treatment of patients with

Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *J Psychopharmacol.* 2014 Nov;28(11):1088-98. doi: 10.1177/0269881114550355.

Chambers RA, Potenza MN, Hoffman RE, Miranker W. Simulated apoptosis/neurogenesis regulates learning and memory capabilities of adaptive neural networks. *Neuropsychopharmacology.* 2004 Apr;29(4):747-58. doi: 10.1038/sj.npp.1300358.

Chatkin JM, Zani-Silva L, Ferreira I, Zamel N. Cannabis-Associated Asthma and Allergies. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2019 Apr;56(2):196-206. doi: 10.1007/s12016-017-8644-1.

Chayasirisobhon S. Cannabis and Neuropsychiatric Disorders: An Updated Review. *Acta Neurol Taiwan.* 2019 Jun 15;28(2):27-39.

Chen E, Hanson MD, Paterson LQ, Griffin MJ, Walker HA, Miller GE. Socioeconomic status and inflammatory processes in childhood asthma: the role of psychological stress. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 May;117(5):1014-20. doi: 10.1016/j.jaci.2006.01.036. Epub 2006 Mar 9. PMID: 16675327.

Chesnokova V, Pechnick RN, Wawrowsky K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. *Brain Behav Immun.* 2016 Nov;58:1-8. doi: 10.1016/j.bbi.2016.01.017. Epub 2016 Jan 21. PMID: 26802985; PMCID: PMC4956598.

Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest.* 2017 Jan;97(1):4-13. doi: 10.1038/labinvest.2016.116.

Clark LR, Yun S, Acquah NK, Kumar PL, Metheny HE, Paixao RCC, Cohen AS, Eisch AJ. Mild Traumatic Brain Injury Induces Transient, Sequential Increases in Proliferation, Neuroblasts/Immature Neurons, and Cell Survival: A Time Course Study in the Male Mouse Dentate Gyrus. *Front Neurosci.* 2021 Jan 7;14:612749. doi: 10.3389/fnins.2020.612749.

Colizzi M, Bhattacharyya S. Does Cannabis Composition Matter? Differential Effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol and Cannabidiol on Human Cognition. *Curr Addict Rep.* 2017;4(2):62-74. doi: 10.1007/s40429-017-0142-2.

Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *Br J Pharmacol*. 2004 Sep;143(2):247-50. doi: 10.1038/sj.bjp.0705920.

Costa B, Trovato AE, Comelli F, Giagnoni G, Colleoni M. The non-psychoactive cannabis constituent cannabidiol is an orally effective therapeutic agent in rat chronic inflammatory and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 2007 Feb 5;556(1-3):75-83. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.11.006.

Crews L, Adame A, Patrick C, Delaney A, Pham E, Rockenstein E, Hansen L, Masliah E (2010) Increased BMP6 levels in the brains of Alzheimer's disease patients and APP transgenic mice are accompanied by impaired neurogenesis. *J Neurosci* 30:12252–12262. 10.1523/JNEUROSCI.1305-10.2010

Curran HV, Freeman TP, Mokrysz C, Lewis DA, Morgan CJ, Parsons LH. Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nat Rev Neurosci*. 2016 May;17(5):293-306. doi: 10.1038/nrn.2016.28.

Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12796-801. doi: 10.1073/pnas.211427898.

Czéh B, Welt T, Fischer AK, Erhardt A, Schmitt W, Müller MB, Toschi N, Fuchs E, Keck ME. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry*. 2002 Dec 1;52(11):1057-65. doi: 10.1016/s0006-3223(02)01457-9.

Czéh Boldizsár „Újszülött idegsejtek a felnőtt, érett agyban: Reménysugár vagy evolúciós zsákutca?” *Élet és Tudomány* 2014/ 4:105-107

Csbai D, Csekő K, Szaiffl L, Varga Z, Miseta A, Helyes Z, Czéh B. Low intensity, long term exposure to tobacco smoke inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Behav Brain Res*. 2016 Apr 1;302:44-52. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.022.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jan;9(1):46-56. doi: 10.1038/nrn2297.

Das S, Basu A. Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *J Neurosci Res*. 2008 May 1;86(6):1199-208. doi: 10.1002/jnr.21585

Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res*. 2001 Feb 2;890(2):261-71. doi: 10.1016/s0006-8993(00)03119-x.

Davis WM, Hatoum NS. Neurobehavioral actions of cannabichromene and interactions with delta 9-tetrahydrocannabinol. *Gen Pharmacol*. 1983;14(2):247-52. doi: 10.1016/0306-3623(83)90004-6. PMID: 6301931.

Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol*. 2005 Jan 31;168(3):415-27. doi: 10.1083/jcb.200407053.

De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joëls M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):269-301. doi: 10.1210/edrv.19.3.0331

De Oliveira, R., Oliveira, C., Guimarães, F., & Campos, A. (2019). Cannabinoid signalling in embryonic and adult neurogenesis: Possible implications for psychiatric and neurological disorders. *Acta Neuropsychiatrica*, 31(1), 1-16. doi:10.1017/neu.2018.11

Degenhardt L, Hall W, Lynskey M. The relationship between cannabis use and other substance use in the general population. *Drug Alcohol Depend*. 2001 Nov 1;64(3):319-27. doi: 10.1016/s0376-8716(01)00130-2.

DeLong GT, Wolf CE, Poklis A, Lichtman AH. Pharmacological evaluation of the natural constituent of Cannabis sativa, cannabichromene and its modulation by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Drug Alcohol Depend*. 2010 Nov 1;112(1-2):126-33. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2010.05.019.

Dennis CV, Suh LS, Rodriguez ML, Kril JJ, Sutherland GT. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2016 Dec;42(7):621-638. doi: 10.1111/nan.12337.

Denny CA, Kheirbek MA, Alba EL, Tanaka KF, Brachman RA, Laughman KB, Tomm NK, Turi GF, Losonczy A, Hen R. Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron*. 2014 Jul 2;83(1):189-201. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.018

Deusch E, Kress HG, Kraft B, Kozek-Langenecker SA. The procoagulatory effects of delta-9-tetrahydrocannabinol in human platelets. *Anesth Analg*. 2004 Oct;99(4):1127-1130. doi: 10.1213/01.ANE.0000131505.03006.74.

Dickens C, McGowan L, Clark-Carter D, Creed F. Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosom Med*. 2002 Jan-Feb;64(1):52-60. doi: 10.1097/00006842-200201000-00008.

Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720-32. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417.

DiPatrizio NV, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12904-8. doi: 10.1073/pnas.1104675108.

Disouky A, Lazarov O. Adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2021;177:137-156. doi: 10.1016/bs.pmbts.2020.09.002.

Dolati S, Sadreddini S, Rostamzadeh D, Ahmadi M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. *Biomed Pharmacother*. 2016 May;80:30-41. doi: 10.1016/j.biopha.2016.03.004.

Domínguez-Escribà L, Hernández-Rabaza V, Soriano-Navarro M, Barcia JA, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ. Chronic cocaine exposure impairs progenitor proliferation but spares survival and maturation of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci*. 2006 Jul;24(2):586-94. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04924.x.

Doyle E, Spence AA. Cannabis as a medicine? *Br J Anaesth*. 1995 Apr;74(4):359-61. doi: 10.1093/bja/74.4.359.

Duque A, Spector R. A balanced evaluation of the evidence for adult neurogenesis in humans: implication for neuropsychiatric disorders. *Brain Struct Funct*. 2019 Sep;224(7):2281-2295. doi: 10.1007/s00429-019-01917-6.

Ehninger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2008 Jan;331(1):243-50. doi: 10.1007/s00441-007-0478-3.

Eichenbaum H, Otto T, Cohen NJ. The hippocampus--what does it do? *Behav Neural Biol.* 1992 Jan;57(1):2-36. doi: 10.1016/0163-1047(92)90724-i.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7579-84. doi: 10.1073/pnas.120552597.

Eisch AJ, Barrot M, Schad CA, Self DW, Nestler EJ. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jun 20;97(13):7579-84. doi: 10.1073/pnas.120552597.

Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience.* 2009 Feb 6;158(3):1021-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.052.

ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2017;103:1-36. doi: 10.1007/978-3-319-45541-9_1.

EMCDDA, Guiney, C. (2017). Cannabis legislation in Europe: an overview. *Drugnet Ireland*, 10-11. *Cannabis Legislation in Europe: An Overview*. Available doi:10.2810/566650

Englund A, Morrison PD, Nottage J, Hague D, Kane F, Bonaccorso S, Stone JM, Reichenberg A, Brenneisen R, Holt D, Feilding A, Walker L, Murray RM, Kapur S. Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. *J Psychopharmacol.* 2013 Jan;27(1):19-27. doi: 10.1177/0269881112460109

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317. 10.1038/3305

Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 156:1072–1083. 10.1016/j.cell.2014.01.044

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci.* 2012;8(9):1254-66. doi: 10.7150/ijbs.4679.

Evans FJ. Cannabinoids: the separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Med.* 1991 Oct;57(7 Suppl):S60-7. doi: 10.1055/s-2006-960231.

Evans, F. J. (2007). Cannabinoids: The separation of central from peripheral effects on a structural basis. *Planta Medica*, 57(S 1), S60–S67. <http://doi.org/10.1055/s-2006-960231>.

Fabel K, Kempermann G. Physical activity and the regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Neuromolecular Med.* 2008;10(2):59-66. doi: 10.1007/s12017-008-8031-4.

Fasemore TM, Patzke N, Kaswera-Kyamakya C, Gilissen E, Manger PR, Ihunwo AO (2018) The distribution of Ki-67 and doublecortin-immunopositive cells in the brains of three Strepsirrhine primates: *Galago demidoff*, *Perodicticus potto*, and *Lemur catta*. *Neuroscience* 372:46–57. 10.1016/j.neuroscience.2017.12.037

Fellermeier M, Zenk MH. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* 1998 May 8;427(2):283-5. doi: 10.1016/s0014-5793(98)00450-5

Fogaça MV, Campos AC, Coelho LD, Duman RS, Guimarães FS. The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: Role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology.* 2018 Jun;135:22-33. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.03.001.

Forest Tennant, A Closer Look at Rheumatoid Arthritis Symptoms Are you showing signs of tender joints, stiffness, or fatigue? Arachnoiditis Research and Education Project, Practical Pain Management, 2018, May 17

Fossati P, Coyette F, Ergis AM, Allilaire JF. Influence of age and executive functioning on verbal memory of inpatients with depression. *J Affect Disord.* 2002 Apr;68(2-3):261-71. doi: 10.1016/s0165-0327(00)00362-1.

Franklin KBJ and Paxinos G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Third Edition. New York: Academic Press.

Frink M, Hsieh YC, Hsieh CH, Pape HC, Choudhry MA, Schwacha MG, Chaudry IH. Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage

after trauma-hemorrhage. *Shock*. 2007 Nov;28(5):576-81. doi: 10.1097/shk.0b013e31814b8e0d.

Gallup Global Emotions Report 2023

<https://www.gallup.com/analytics/349280/gallup-global-emotions-report.aspx>

Gage FH, Temple S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron*. 2013 Oct 30;80(3):588-601. doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.037.

Gampierakis IA, Koutmani Y, Semitekolou M, Morianos I, Polissidis A, Katsouda A, Charalampopoulos I, Xanthou G, Gravanis A, Karalis KP. Hippocampal neural stem cells and microglia response to experimental inflammatory bowel disease (IBD). *Mol Psychiatry*. 2021 Apr;26(4):1248-1263. doi: 10.1038/s41380-020-0651-6.

Garber C, Vasek MJ, Vollmer LL, Sun T, Jiang X, Klein RS. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1. *Nat Immunol*. 2018 Feb;19(2):151-161. doi: 10.1038/s41590-017-0021-y.

Gates P, Jaffe A, Copeland J. Cannabis smoking and respiratory health: consideration of the literature. *Respirology*. 2014 Jul;19(5):655-62. doi: 10.1111/resp.12298.

Gemma C, Bachstetter AD. The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*. 2013 Nov 22;7:229. doi: 10.3389/fncel.2013.00229.

Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. 2012 Dec;18(13 Suppl):S295-302. PMID: 23327517.

Gillot S, Sahni V, Lepko T, Hanspal MA, Swartz JE, Alexopoulou Z, Marshall FH. Targeting impaired adult hippocampal neurogenesis in ageing by leveraging intrinsic mechanisms regulating Neural Stem Cell activity. *Ageing Res Rev*. 2021 Nov;71:101447. doi: 10.1016/j.arr.2021.101447.

Gorter JA, Gonçalves Pereira PM, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH, Lucassen PJ. Neuronal cell death in a rat model for mesial temporal lobe epilepsy is induced by the initial status epilepticus and not by later repeated spontaneous seizures. *Epilepsia*. 2003 May;44(5):647-58. doi: 10.1046/j.1528-1157.2003.53902.x.

Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and

hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 2008 Jul;13(7):717-28. doi: 10.1038/sj.mp.4002055.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):260-5. doi: 10.1038/6365.

Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LA, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*. 1997 Apr 1;17(7):2492-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02492.1997.

Gould E, Reeves AJ, Fallah M, Tanapat P, Gross CG, Fuchs E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Apr 27;96(9):5263-7. doi: 10.1073/pnas.96.9.5263.

Greco R, Mangione AS, Sandrini G, Maccarrone M, Nappi G, Tassorelli C. Effects of anandamide in migraine: data from an animal model. *J Headache Pain*. 2011 Apr;12(2):177-83. doi: 10.1007/s10194-010-0274-4.

Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205-13. doi: 10.1002/art.1780301102. PMID: 2446635.

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci*. 2013 Nov;14(11):755-69. doi: 10.1038/nrn3586.

Gruber SA, Sagar KA, Dahlgren MK, Gonenc A, Smith RT, Lambros AM, Cabrera KB, Lukas SE. The Grass Might Be Greener: Medical Marijuana Patients Exhibit Altered Brain Activity and Improved Executive Function after 3 Months of Treatment. *Front Pharmacol*. 2018 Jan 17;8:983. doi: 10.3389/fphar.2017.00983.

Guindon J, Hohmann AG. The endocannabinoid system and pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009 Dec;8(6):403-21. doi: 10.2174/187152709789824660.

Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)-Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8268-73. doi: 10.1073/pnas.95.14.8268.

Hanspal MA, Gillotin S. A new age in understanding adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2022 Dec;17(12):2615-2618. doi: 10.4103/1673-5374.339472.

Harkany T, Guzmán M, Galve-Roperh I, Berghuis P, Devi LA, Mackie K. The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Feb;28(2):83-92. doi: 10.1016/j.tips.2006.12.004.

Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, Jakobsson PJ, Baum W, Nimmerjahn F, Szarka E, Sarmay G, Krumbholz G, Neumann E, Toes R, Scherer HU, Catrina AI, Klareskog L, Jurdic P, Schett G. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012 May;122(5):1791-802. doi: 10.1172/JCI60975.

Harth M, Nielson WR. Pain and affective distress in arthritis: relationship to immunity and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019 May;15(5):541-552. doi: 10.1080/1744666X.2019.1573675.

Heiden D, Rodvien R, Jones R, Mielke CH Jr. Effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol on coagulation. *Thromb Res.* 1980 Mar 15;17(6):885-9. doi: 10.1016/0049-3848(80)90253-4.

Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennström M, Tingström A. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biol Psychiatry.* 2005 Dec 1;58(11):871-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.05.023.

Helyes Z, Kemény Á, Csekő K, Szőke É, Elekes K, Mester M, Sándor K, Perkecz A, Kereskai L, Márk L, Bona Á, Benkő A, Pintér E, Szolcsányi J, Ledent C, Sperlág B, Molnár TF. Marijuana smoke induces severe pulmonary hyperresponsiveness, inflammation, and emphysema in a predictive mouse model not via CB1 receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2017 Aug 1;313(2):L267-L277. doi: 10.1152/ajplung.00354.2016.

Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol.* 2017 Aug 15;309:12-22. doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.04.007.

Hernández-Rabaza V, Domínguez-Escribà L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ. Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology*. 2006 Oct;51(5):967-73. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.06.019.

Hester MS, Danzer SC. Hippocampal granule cell pathology in epilepsy - a possible structural basis for comorbidities of epilepsy? *Epilepsy Behav*. 2014 Sep;38:105-16. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.12.022.

Hill JD, Zuluaga-Ramirez V, Gajghate S, Winfield M, Sriram U, Rom S, Persidsky Y. Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain Behav Immun*. 2019 Feb;76:165-181. doi: 10.1016/j.bbi.2018.11.017.

Ho NF, Hooker JM, Sahay A, Holt DJ, Roffman JL. In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Mol Psychiatry*. 2013 Apr;18(4):404-16 doi: 10.1038/mp.2013.8. Epub 2013 Feb 26. PMID: 23439487; PMCID: PMC3711219.

Horowitz AM, Fan X, Bieri G, Smith LK, Sanchez-Diaz CI, Schroer AB, Gontier G, Casaletto KB, Kramer JH, Williams KE, Villeda SA. Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain. *Science*. 2020 Jul 10;369(6500):167-173. doi: 10.1126/science.aaw2622.

Horváth Á, Tékus V, Boros M, Pozsgai G, Botz B, Borbély É, Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res Ther*. 2016 Jan 8;18:6. doi: 10.1186/s13075-015-0904-y.

Houser CR. Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 1990 Dec 10;535(2):195-204. doi: 10.1016/0006-8993(90)91601-c.

Huang GJ, Herbert J. Serotonin modulates the suppressive effects of corticosterone on proliferating progenitor cells in the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat. *Neuropsychopharmacology*. 2005 Feb;30(2):231-41. doi: 10.1038/sj.npp.1300609.

Hurley MJ, Mash DC, Jenner P. Expression of cannabinoid CB1 receptor mRNA in basal ganglia of normal and parkinsonian human brain. *J Neural Transm (Vienna)*. 2003 Nov;110(11):1279-88. doi: 10.1007/s00702-003-0033-7.

Iannotti FA, Di Marzo V, Petrosino S. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. *Prog Lipid Res.* 2016 Apr;62:107-28. doi: 10.1016/j.plipres.2016.02.002.

Ibeas Bih C, Chen T, Nunn AV, Bazet M, Dallas M, Whalley BJ. Molecular Targets of Cannabidiol in Neurological Disorders. *Neurotherapeutics.* 2015 Oct;12(4):699-730. doi: 10.1007/s13311-015-0377-3.

Iosif RE, Ekdahl CT, Ahlenius H, Pronk CJ, Bonde S, Kokaia Z, Jacobsen SE, Lindvall O. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* 2006 Sep 20;26(38):9703-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2723-06.2006.

Isaev NK, Stelmashook EV, Genrikhs EE. Neurogenesis and brain aging. *Rev Neurosci.* 2019 Jul 26;30(6):573-580. doi: 10.1515/revneuro-2018-0084.

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Oct;30(10):515-27. doi: 10.1016/j.tips.2009.07.006. Epub 2009 Sep 2. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci.* 2009 Dec;30(12):609.

Jacobus J, Thayer RE, Trim RS, Bava S, Frank LR, Tapert SF. White matter integrity, substance use, and risk taking in adolescence. *Psychol Addict Behav.* 2013 Jun;27(2):431-42. doi: 10.1037/a0028235

Jadoon KA, Ratcliffe SH, Barrett DA, Thomas EL, Stott C, Bell JD, O'Sullivan SE, Tan GD. Efficacy and Safety of Cannabidiol and Tetrahydrocannabinol on Glycemic and Lipid Parameters in Patients With Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel Group Pilot Study. *Diabetes Care.* 2016 Oct;39(10):1777-86. doi: 10.2337/dc16-0650.

Järvinen T, Pate DW, Laine K. Cannabinoids in the treatment of glaucoma. *Pharmacol Ther.* 2002 Aug;95(2):203-20. doi: 10.1016/s0163-7258(02)00259-0.

Jett J, Stone E, Warren G, Cummings KM. Cannabis Use, Lung Cancer, and Related Issues. *J Thorac Oncol.* 2018 Apr;13(4):480-487. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.013.

Jiang HE, Li X, Zhao YX, Ferguson DK, Hueber F, Bera S, Wang YF, Zhao LC, Liu CJ, Li CS. A new insight into Cannabis sativa (Cannabaceae) utilization from 2500-year-old Yanghai Tombs, Xinjiang, China. *J Ethnopharmacol.* 2006 Dec 6;108(3):414-22. doi: 10.1016/j.jep.2006.05.034.

Jiang W, Zhang Y, Xiao L, Van Cleemput J, Ji SP, Bai G, Zhang X. Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J Clin Invest*. 2005 Nov;115(11):3104-16. doi: 10.1172/JCI25509.

Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Apr 10;98(8):4710-5. doi: 10.1073/pnas.081011098.

Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*. 2007 Aug-Sep;28(2-3):72-96. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.04.001.

Kalueff AV, Aldridge JW, LaPorte JL, Murphy DL, Tuohimaa P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat Protoc*. 2007;2(10):2538-44. doi: 10.1038/nprot.2007.367.

Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016 Jan;17(1):45-59. doi: 10.1038/nrn.2015.8. Epub 2015 Dec 17. Erratum in: *Nat Rev Neurosci*. 2016 Feb;17(2):118.

Kaneko N, Kudo K, Mabuchi T, Takemoto K, Fujimaki K, Wati H, Iguchi H, Tezuka H, Kanba S. Suppression of cell proliferation by interferon-alpha through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Dec;31(12):2619-26. doi: 10.1038/sj.npp.1301137.

Kang E, Wen Z, Song H, Christian KM, Ming GL. Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016 Sep 1;8(9):a019026. doi: 10.1101/cshperspect.a019026.

Karniol IG, Carlini EA. Pharmacological interaction between cannabidiol and delta 9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacologia*. 1973 Oct 23;33(1):53-70. doi: 10.1007/BF00428793.

Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods*. 2002 Mar 30;115(1):97-105. doi: 10.1016/s0165-0270(02)00007-9.

Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisén J. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*. 2018

Jul 5;23(1):25-30. doi: 10.1016/j.stem.2018.04.004. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29681514; PMCID: PMC6035081.

Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*. 2003 Jan;130(2):391-9. doi: 10.1242/dev.00203.

Kempermann G. Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2002 Feb 1;22(3):635-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-03-00635.2002.

Kempker JA, Honig EG, Martin GS. The effects of marijuana exposure on expiratory airflow. A study of adults who participated in the U.S. National Health and Nutrition Examination Study. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 Feb;12(2):135-41. doi: 10.1513/AnnalsATS.201407-333OC.

Kempuraj D, Thangavel R, Selvakumar GP, Zaheer S, Ahmed ME, Raikwar SP, Zahoor H, Saeed D, Natteru PA, Iyer S, Zaheer A. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*. 2017 Jul 24;11:216. doi: 10.3389/fncel.2017.00216.

Kerr DS, Campbell LW, Thibault O, Landfield PW. Hippocampal glucocorticoid receptor activation enhances voltage-dependent Ca²⁺ conductances: relevance to brain aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 15;89(18):8527-31. doi: 10.1073/pnas.89.18.8527.

Kiank C, Daeschlein G, Schuett C. Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice. *Brain Behav Immun*. 2008 Nov;22(8):1173-7. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.003.

Kim J, Choi H, Kang EK, Ji GY, Kim Y, Choi IS. In Vitro Studies on Therapeutic Effects of Cannabidiol in Neural Cells: Neurons, Glia, and Neural Stem Cells. *Molecules*. 2021 Oct 8;26(19):6077. doi: 10.3390/molecules26196077.

Kim JY, Liu CY, Zhang F, Duan X, Wen Z, Song J, Feighery E, Lu B, Rujescu D, St Clair D, Christian K, Callicott JH, Weinberger DR, Song H, Ming GL. Interplay between DISC1 and GABA signaling regulates neurogenesis in mice and risk for schizophrenia. *Cell*. 2012 Mar 2;148(5):1051-64. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.037.

Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Jan 4;64:277-84. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.008.

Kindred JH, Li K, Ketelhut NB, Proessl F, Fling BW, Honce JM, Shaffer WR, Rudroff T. Cannabis use in people with Parkinson's disease and Multiple Sclerosis: A web-based investigation. *Complement Ther Med*. 2017 Aug;33:99-104. doi: 10.1016/j.ctim.2017.07.002.

Kindred JH, Li K, Ketelhut NB, Proessl F, Fling BW, Honce JM, Shaffer WR, Rudroff T. Cannabis use in people with Parkinson's disease and Multiple Sclerosis: A web-based investigation. *Complement Ther Med*. 2017 Aug;33:99-104. doi: 10.1016/j.ctim.2017.07.002.

Kippin TE, Kapur S, van der Kooy D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci*. 2005 Jun 15;25(24):5815-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1120-05.2005.

Kirkham T. Endocannabinoids and the neurochemistry of gluttony. *J Neuroendocrinol*. 2008 Sep;20(9):1099-100. doi: 10.1111/j.1365-2826.2008.01762.x. Epub 2008 Jul 8. PMID: 18624929.

Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 yrs. *PLoS One* 5:e8809. 10.1371/journal.pone.0008809

Kochman LJ, dos Santos AA, Fornal CA, Jacobs BL. Despite strong behavioral disruption, Delta9-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Brain Res*. 2006 Oct 3;1113(1):86-93. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.080.

Kohler SJ, Williams NI, Stanton GB, Cameron JL, Greenough WT (2011) Maturation time of new granule cells in the dentate gyrus of adult macaque monkeys exceeds six months. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:10326–10331. 10.1073/pnas.1017099108

Koo JW, Duman RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jan 15;105(2):751-6. doi: 10.1073/pnas.0708092105.

Koppel BS, Brust JC, Fife T, Bronstein J, Youssof S, Gronseth G, Gloss D. Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline

Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2014 Apr 29;82(17):1556-63. doi: 10.1212/WNL.0000000000000363.

Korzhevskii D.E., Kirik O.V. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci. Behav. Physi.* 2016;46:284–290. doi: 10.1007/s11055-016-0231-z.

Kourilovitch M, Galarza-Maldonado C, Ortiz-Prado E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2014 Feb-Mar;48-49:26-30. doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.027.

Kramer JL. Medical marijuana for cancer. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar;65(2):109-22. doi: 10.3322/caac.21260.

Kriese, U., Schumann, E., Weber, W. *et al.* Oil content, tocopherol composition and fatty acid patterns of the seeds of 51 *Cannabis sativa* L. genotypes. *Euphytica* **137**, 339–351 (2004). doi: 10.1023/B.

Lapham GT, Lee AK, Caldeiro RM, McCarty D, Browne KC, Walker DD, Kivlahan DR, Bradley KA. Frequency of Cannabis Use Among Primary Care Patients in Washington State. *J Am Board Fam Med.* 2017 Nov-Dec;30(6):795-805. doi: 10.3122/jabfm.2017.06.170062.

Laun AS, Shrader SH, Brown KJ, Song ZH. GPR3, GPR6, and GPR12 as novel molecular targets: their biological functions and interaction with cannabidiol. *Acta Pharmacol Sin.* 2019 Mar;40(3):300-308. doi: 10.1038/s41401-018-0031-9.

Lee JLC, Bertoglio LJ, Guimarães FS, Stevenson CW. Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. *Br J Pharmacol.* 2017 Oct;174(19):3242-3256. doi: 10.1111/bph.13724

Lee TT, Wainwright SR, Hill MN, Galea LA, Gorzalka BB. Sex, drugs, and adult neurogenesis: sex-dependent effects of escalating adolescent cannabinoid exposure on adult hippocampal neurogenesis, stress reactivity, and amphetamine sensitization. *Hippocampus.* 2014 Mar;24(3):280-92. doi: 10.1002/hipo.22221.

Lemstra AW, Groen in't Woud JC, Hoozemans JJ, van Haastert ES, Rozemuller AJ, Eikelenboom P, van Gool WA. Microglia activation in sepsis: a case-control study. *J Neuroinflammation.* 2007 Jan 15;4:4. doi: 10.1186/1742-2094-4-4.

Levine A, Clemenza K, Rynn M, Lieberman J. Evidence for the Risks and Consequences of Adolescent Cannabis Exposure. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2017 Mar;56(3):214-225. doi: 10.1016/j.jaac.2016.12.014.

Leweke FM, Piomelli D, Pahlisch F, Muhl D, Gerth CW, Hoyer C, Klosterkötter J, Hellmich M, Koethe D. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012 Mar 20;2(3):e94. doi: 10.1038/tp.2012.15.

Liang YC, Huang CC, Hsu KS. Therapeutic potential of cannabinoids in trigeminal neuralgia. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2004 Dec;3(6):507-14. doi: 10.2174/1568007043336833.

Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 May;21(3):279-83. doi: 10.1097/BOR.0b013e32832a2e16.

Limke TL, Cai J, Miura T, Rao MS, Mattson MP. Distinguishing features of progenitor cells in the late embryonic and adult hippocampus. *Dev Neurosci*. 2003 Mar-Aug;25(2-4):257-72. doi: 10.1159/000072273.

Liu Q, Xin W, He P, Turner D, Yin J, Gan Y, Shi FD, Wu J. Interleukin-17 inhibits adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. 2014 Dec 19;4:7554. doi: 10.1038/srep07554.

Lotan I, Treves TA, Roditi Y, Djaldetti R. Cannabis (medical marijuana) treatment for motor and non-motor symptoms of Parkinson disease: an open-label observational study. *Clin Neuropharmacol*. 2014 Mar-Apr;37(2):41-4. doi: 10.1097/WNF.000000000000016.

Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2021 Jun;6(6):607-615. doi: 10.1016/j.bpsc.2020.07.016.

Lucassen PJ, Fitzsimons CP, Salta E, Maletic-Savatic M. Adult neurogenesis, human after all (again): Classic, optimized, and future approaches. *Behav Brain Res*. 2020 Mar 2;381:112458. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112458.

Lupien SJ, McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997 Jun;24(1):1-27. doi: 10.1016/s0165-0173(97)00004-0.

M. D. Merlin. "Archaeological Evidence for the Tradition of Psychoactive Plant Use in the Old World." *Economic Botany* 57, no. 3 (2003): 295–323. <http://www.jstor.org/stable/4256701>.

Maćkowiak M, Chocyk A, Markowicz-Kula K, Wedzony K. Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Res.* 2007 May 7;1148:43-52. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.014.

Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry.* 2000 Jun 15;47(12):1043-9. doi: 10.1016/s0006-3223(00)00228-6.

Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014 Jan;38:173-92. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.009.

Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, de Novellis V, Di Marzo V. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. *Br J Pharmacol.* 2011 Feb;162(3):584-96. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01063.x.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000 Dec 15;20(24):9104-10. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-24-09104.2000.

Mandyam CD, Wee S, Crawford EF, Eisch AJ, Richardson HN, Koob GF. Varied access to intravenous methamphetamine self-administration differentially alters adult hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry.* 2008 Dec 1;64(11):958-65. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.010.

Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 5;411(1-2):67-70. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00904-3.

Marchalant Y, Brothers HM, Norman GJ, Karelina K, DeVries AC, Wenk GL. Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol Dis.* 2009 May;34(2):300-7. doi: 10.1016/j.nbd.2009.01.014.

- Marchetti B, Tirolo C, L'Episcopo F, Caniglia S, Testa N, Smith JA, Pluchino S, Serapide MF. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: Wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair. *Aging Cell*. 2020 Mar;19(3):e13101. doi: 10.1111/accel.13101.
- Martinasek MP, McGrogan JB, Maysonet A. A Systematic Review of the Respiratory Effects of Inhalational Marijuana. *Respir Care*. 2016 Nov;61(11):1543-1551. doi: 10.4187/respcare.04846.
- Matcham F, Rayner L, Steer S, Hotopf M. The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Dec;52(12):2136-48. doi: 10.1093/rheumatology/ket169.
- Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Ii C, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res*. 2007 Apr;85(5):994-1009. doi: 10.1002/jnr.21198.
- Maxwell CR, Farmer J. Medical marijuana and Parkinson disease. *Practical Neurology*. 2018; 17:52-53.
- McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*. 1995 Apr;5(2):205-16. doi: 10.1016/0959-4388(95)80028-x.
- McEwen BS. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 May 1;840:33-44. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x.
- McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 2000 Dec 15;886(1-2):172-189. doi: 10.1016/s0006-8993(00)02950-4.
- McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000 Jan 14;287(5451):248-51. doi: 10.1126/science.287.5451.248.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res*. 2007 Aug 3;1161:56-64. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.042.
- McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2001). Cannabis and cannabis extracts: Greater than the sum of their parts? *Journal of Cannabis Therapeutics*, 1(3-4), 103-132. http://doi.org/10.1300/J175v01n03_08.

McPartland, J. M., & Russo, E. B. (2014). Non-phytocannabinoid constituents of cannabis and herbal synergy. *Handbook of cannabis*.

Miller JA, Nathanson J, Franjic D, Shim S, Dalley RA, Shapouri S, Smith KA, Sunkin SM, Bernard A, Bennett JL, Lee CK, Hawrylycz MJ, Jones AR, Amaral DG, Sestan N, Gage FH, Lein ES (2013) Conserved molecular signatures of neurogenesis in the hippocampal subgranular zone of rodents and primates. *Development* 140:4633–4644. doi: 10.1242/dev.097212

Mongeau R, Blier P, de Montigny C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Apr;23(3):145-95. doi: 10.1016/s0165-0173(96)00017-3.

Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science.* 2003 Dec 5;302(5651):1760-5. doi: 10.1126/science.1088417.

Moreno-Jiménez EP, Terreros-Roncal J, Flor-García M, Rábano A, Llorens-Martín M. Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *J Neurosci.* 2021 Mar 24;41(12):2541-2553. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020.

Mori MA, Meyer E, Soares LM, Milani H, Guimarães FS, de Oliveira RMW. Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2017 Apr 3;75:94-105. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.11.005.

Murphy M, Mills S, Winstone J, Leishman E, Wager-Miller J, Bradshaw H, Mackie K. Chronic Adolescent Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Treatment of Male Mice Leads to Long-Term Cognitive and Behavioral Dysfunction, Which Are Prevented by Concurrent Cannabidiol Treatment. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2017 Sep 1;2(1):235-246. doi: 10.1089/can.2017.0034.

Nahas G, Latour C. The human toxicity of marijuana. *Med J Aust.* 1992 Apr 6;156(7):495-7.

Nahas G, Leger C, Tocque B, Hoellinger H. The kinetics of cannabinoid distribution and storage with special reference to the brain and testis. *J Clin Pharmacol.* 1981 Aug-Sep;21(S1):208S-214S. doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02597.x.

Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Chen J, Fujioka T, Malberg J, Tsuji S, Duman RS. Localization of phosphorylated cAMP response element-binding protein in immature neurons of adult hippocampus. *J Neurosci.* 2002 Nov 15;22(22):9868-76. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-22-09868.2002.

Nakagawasai O, Yamada K, Takahashi K, Odaira T, Sakuma W, Ishizawa D, Takahashi N, Onuma K, Hozumi C, Nemoto W, Tan-No K. Liver hydrolysate prevents depressive-like behavior in an animal model of colitis: Involvement of hippocampal neurogenesis via the AMPK/BDNF pathway. *Behav Brain Res*. 2020 Jul 15;390:112640. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112640.

Nixon K, Crews FT. Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem*. 2002 Dec;83(5):1087-93. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01214.x.

Noonan MA, Bulin SE, Fuller DC, Eisch AJ. Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *J Neurosci*. 2010 Jan 6;30(1):304-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4256-09.2010.

Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG. Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci*. 2003 Apr 1;23(7):2840-50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-07-02840.2003.

Okuyama K, Ohwada K, Sakurada S, Sato N, Sora I, Tamura G, Takayanagi M, Ohno I. The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Allergol Int*. 2007 Mar;56(1):29-35. doi: 10.2332/allergolint.O-06-435.

Ormerod BK, Hanft SJ, Asokan A, Haditsch U, Lee SW, Palmer TD. PPAR γ activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav Immun*. 2013 Mar;29:28-38. doi: 10.1016/j.bbi.2012.10.017. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23108061;

Osborne AL, Solowij N, Weston-Green K. A systematic review of the effect of cannabidiol on cognitive function: Relevance to schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Jan;72:310-324. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.012.

Ospelt C, Gay S, Klein K. Epigenetics in the pathogenesis of RA. *Semin Immunopathol*. 2017 Jun;39(4):409-419. doi: 10.1007/s00281-017-0621-5.

Overstreet-Wadiche LS, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL. Seizures accelerate functional integration of adult-generated granule cells. *J Neurosci*. 2006 Apr 12;26(15):4095-103. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5508-05.2006.

Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):389-462. doi: 10.1124/pr.58.3.2.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2006 Nov;20(13):2405-7. doi: 10.1096/fj.06-6164fje.

Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* 2006 Jan;59(1):81-91. doi: 10.1002/ana.20699.

Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J Neurosci.* 1999 Jun 1;19(11):4508-19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04508.1999.

Parent JM, von dem Bussche N, Lowenstein DH. Prolonged seizures recruit caudal subventricular zone glial progenitors into the injured hippocampus. *Hippocampus.* 2006;16(3):321-8. doi: 10.1002/hipo.20166.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 1997 May 15;17(10):3727-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-10-03727.1997.

Parent JM. Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus. *Prog Brain Res.* 2007;163:529-40. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63028-3.

Patel S, Hill MN, Cheer JF, Wotjak CT, Holmes A. The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 May;76(Pt A):56-66. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.033.

Pawley LC, Hueston CM, O'Leary JD, Kozareva DA, Cryan JF, O'Leary OF, Nolan YM. Chronic intrahippocampal interleukin-1 β overexpression in adolescence impairs hippocampal neurogenesis but not neurogenesis-associated cognition. *Brain Behav Immun.* 2020 Jan;83:172-179. doi: 10.1016/j.bbi.2019.10.007.

Pepe G, Calderazzi G, De Maglie M, Villa AM, Vegeto E. Heterogeneous induction of microglia M2a phenotype by central administration of interleukin-4. *J Neuroinflammation.* 2014 Dec 31;11:211. doi: 10.1186/s12974-014-0211-6.

Perez-Asensio FJ, Perpiñá U, Planas AM, Pozas E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J Cell Sci.* 2013 Sep 15;126(Pt 18):4208-19. doi: 10.1242/jcs.127803.

Perez-Dominguez M, Ávila-Muñoz E, Domínguez-Rivas E, Zepeda A. The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response. *Neural Regen Res.* 2019 May;14(5):817-825. doi: 10.4103/1673-5374.249229.

Perry VH. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2010 Sep;120(3):277-86. doi: 10.1007/s00401-010-0722-x.

Pertwee RG, Thomas A, Stevenson LA, Ross RA, Varvel SA, Lichtman AH, Martin BR, Razdan RK. The psychoactive plant cannabinoid, Delta9-tetrahydrocannabinol, is antagonized by Delta8- and Delta9-tetrahydrocannabivarin in mice in vivo. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar;150(5):586-94. doi: 10.1038/sj.bjp.0707124.

Poulose SM, Miller MG, Scott T, Shukitt-Hale B. Nutritional Factors Affecting Adult Neurogenesis and Cognitive Function. *Adv Nutr.* 2017 Nov 15;8(6):804-811. doi: 10.3945/an.117.016261.

Prenderville JA, Kelly ÁM, Downer EJ. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. *Br J Pharmacol.* 2015 Aug;172(16):3950-63. doi: 10.1111/bph.13186.

Qin, N., Neeper, M. P., Liu, Y., Hutchinson, T. L., Lubin, M. L., & Flores, C. M. (2008). TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(24), 6231–6238. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0504-08.2008>. 28/24/6231

R. Sapolsky, in: *Stress, the Aging Brain and the Mechanisms of Neuron Death*, Vol. 1, Cambridge MIT Press, 1992, p. 423.

Radley JJ, Jacobs BL. 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res.* 2002 Nov 15;955(1-2):264-7. doi: 10.1016/s0006-8993(02)03477-7.

Realini N, Vigano' D, Guidali C, Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology.* 2011 Feb-Mar;60(2-3):235-43. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.09.003.

Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*. 2006 May;11(5):514-22. doi: 10.1038/sj.mp.4001791.

Rhyne DN, Anderson SL, Gedde M, Borgelt LM. Effects of Medical Marijuana on Migraine Headache Frequency in an Adult Population. *Pharmacotherapy*. 2016 May;36(5):505-10. doi: 10.1002/phar.1673.

Ribak C. E., Shapiro L. A., Yan X. X., Dashtipour K., Nadler J. V., Obenaus A., et al. Seizure-induced formation of basal dendrites on granule cells of the rodent dentate gyrus,” 2012. in *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th Edn, eds Noebels J. L., Avoli M., Rogawski M. A., Olsen R. W., Delgado-Escueta A. V. (Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information

Riedel G, Fadda P, McKillop-Smith S, Pertwee RG, Platt B, Robinson L. Synthetic and plant-derived cannabinoid receptor antagonists show hypophagic properties in fasted and non-fasted mice. *Br J Pharmacol*. 2009 Apr;156(7):1154-66. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00107.x.

Rivera P, Romero-Zerbo Y, Pavón FJ, Serrano A, López-Ávalos MD, Cifuentes M, Grondona JM, Bermúdez-Silva FJ, Fernández-Llebrez P, de Fonseca FR, Suárez J, Pérez-Martín M. Obesity-dependent cannabinoid modulation of proliferation in adult neurogenic regions. *Eur J Neurosci*. 2011 May;33(9):1577-86. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07650.x.

Rock, E. M., Kopstick, R. L., Limebeer, C. L., & Parker, L. A. (2013). Tetrahydrocannabinolic acid reduces nausea-induced conditioned gaping in rats and vomiting in *Suncus murinus*. *British Journal of Pharmacology*, 170(3), 641–648. <http://doi.org/10.1111/bph.12316>.

Rooszendaal B. 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*. 2000 Apr;25(3):213-38. doi: 10.1016/s0306-4530(99)00058-x.

Rossi C, Cusimano M, Zambito M, Finardi A, Capotondo A, Garcia-Manteiga JM, Comi G, Furlan R, Martino G, Muzio L. Interleukin 4 modulates microglia homeostasis and attenuates the early slowly progressive phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 14;9(2):250. doi: 10.1038/s41419-018-0288-4.

Rossi C, Pini LA, Cupini ML, Calabresi P, Sarchielli P. Endocannabinoids in platelets of chronic migraine patients and medication-overuse headache patients: relation with serotonin levels. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008 Jan;64(1):1-8. doi: 10.1007/s00228-007-0391-4.

Ruan L, Lau BW, Wang J, Huang L, Zhuge Q, Wang B, Jin K, So KF. Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: from bench to bedside. *Prog Neurobiol*. 2014 Apr;115:116-37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.12.006.

Russo EB, Cuttler C, Cooper ZD, Stueber A, Whiteley VL, Sexton M. Survey of Patients Employing Cannabigerol-Predominant Cannabis Preparations: Perceived Medical Effects, Adverse Events, and Withdrawal Symptoms. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2022 Oct;7(5):706-716. doi: 10.1089/can.2021.0058.

Russo EB. Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects. *Br J Pharmacol*. 2011 Aug;163(7):1344-64. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x

Ryan SM, Nolan YM. Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: can exercise compensate? *Neurosci Biobehav Rev*. 2016 Feb;61:121-31. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.12.004.

Saez TM, Aronne MP, Caltana L, Brusco AH. Prenatal exposure to the CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 alters migration of early-born glutamatergic neurons and GABAergic interneurons in the rat cerebral cortex. *J Neurochem*. 2014 May;129(4):637-48. doi: 10.1111/jnc.12636.

Sahay A, Drew MR, Hen R. Dentate gyrus neurogenesis and depression. *Prog Brain Res*. 2007;163:697-722. doi: 10.1016/S0079-6123(07)63038-6.

Sansone RA, Sansone LA. Marijuana and body weight. *Innov Clin Neurosci*. 2014 Jul;11(7-8):50-4.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9. doi: 10.1126/science.1083328.

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*. 2003 Aug 8;301(5634):805-9. doi: 10.1126/science.1083328.

Scarante FF, Vila-Verde C, Detoni VL, Ferreira-Junior NC, Guimarães FS, Campos AC. Cannabinoid Modulation of the Stressed Hippocampus. *Front Mol Neurosci*. 2017 Dec 19;10:411. doi: 10.3389/fnmol.2017.00411.

Scharfman HE. Epileptogenesis in the parahippocampal region. Parallels with the dentate gyrus. *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Jun;911:305-27. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06734.x.

Schiavon AP, Bonato JM, Milani H, Guimarães FS, Weffort de Oliveira RM. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2016 Jan 4;64:27-34. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.017.

Schmitt A, Benninghoff J, Moessner R, Rizzi M, Paizanis E, Doenitz C, Gross S, Hermann M, Gritti A, Lanfumey L, Fritzen S, Reif A, Hamon M, Murphy DL, Vescovi A, Lesch KP. Adult neurogenesis in serotonin transporter deficient mice. *J Neural Transm (Vienna)*. 2007 Sep;114(9):1107-19. doi: 10.1007/s00702-007-0724-6.

Schoenfeld TJ, Cameron HA. Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Jan;40(1):113-28. doi: 10.1038/npp.2014.230.

Schoenfeld TJ, McCausland HC, Morris HD, Padmanaban V, Cameron HA. Stress and Loss of Adult Neurogenesis Differentially Reduce Hippocampal Volume. *Biol Psychiatry*. 2017 Dec 15;82(12):914-923. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.05.013.

Schreiber R, Newman-Tancredi A. Improving cognition in schizophrenia with antipsychotics that elicit neurogenesis through 5-HT(1A) receptor activation. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Apr;110:72-80. doi: 10.1016/j.nlm.2013.12.015.

Schubart CD, Sommer IE, van Gastel WA, Goetgebuer RL, Kahn RS, Boks MP. Cannabis with high cannabidiol content is associated with fewer psychotic experiences. *Schizophr Res*. 2011 Aug;130(1-3):216-21. doi: 10.1016/j.schres.2011.04.017.

Scutt, A., & Williamson, E. M. (2007). Cannabinoids stimulate fibroblastic colony formation by bone marrow cells indirectly via CB2 receptors. *Calcified Tissue International*, 80(1), 50–59. <http://doi.org/10.1007/s00223-006-0171-7>.

Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH. Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*. 1999 Jun 15;19(12):5034-43. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-12-05034.1999.

Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 30;93(9):3908-13. doi: 10.1073/pnas.93.9.3908.

Shetty AK, Hattiangady B. Concise review: prospects of stem cell therapy for temporal lobe epilepsy. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2396-407. doi: 10.1634/stemcells.2007-0313.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*. 2001 Mar 15;410(6826):372-6. doi: 10.1038/35066584. Erratum in: *Nature* 2001 Dec 20-27;414(6866):938.

Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*. 2002;12(5):578-84. doi: 10.1002/hipo.10103.

Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay MÈ. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast*. 2014;2014:610343. doi: 10.1155/2014/610343.

Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):483-95. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.

Slatkin NE. Cannabinoids in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting: beyond prevention of acute emesis. *J Support Oncol*. 2007 May;5(5 Suppl 3):1-9.

Smith KJ, O'Neill LA. Interleukin-6 in neuroinflammation and potential therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2016; 15(4): 243–254.

Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*. 2011 Aug 3;476(7361):458-61. doi: 10.1038/nature10287.

Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):377-381. doi: 10.1038/nature25975.

Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Huttner HB, Boström E, Westerlund I, Vial C, Buchholz BA, Possnert G, Mash DC, Druid H, Frisén J. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*. 2013 Jun 6;153(6):1219-1227. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.002.

Steel RW, Miller JH, Sim DA, Day DJ. Delta-9-tetrahydrocannabinol disrupts hippocampal neuroplasticity and neurogenesis in trained, but not untrained adolescent Sprague-Dawley rats. *Brain Res*. 2014 Feb 22;1548:12-9. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.034.

Stella N, Schweitzer P, Piomelli D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*. 1997 Aug 21;388(6644):773-8. doi: 10.1038/42015.

Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 Jan;6(1):75-92. doi: 10.1038/nrd2196. PMID: 17195034.

Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R. Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) Induce Neurogenesis and Improve Cognitive Performances of Male Sprague Dawley Rats. *Neurotox Res*. 2018 Feb;33(2):402-411. doi: 10.1007/s12640-017-9806-x.

Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T, Sumiyoshi S, Sumiyoshi C, Meltzer HY. The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2001 May 15;49(10):861-8. doi: 10.1016/s0006-3223(00)01025-8.

Surget A, Tanti A, Leonardo ED, Laugeray A, Rainer Q, Touma C, Palme R, Griebel G, Ibarguen-Vargas Y, Hen R, Belzung C. Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol Psychiatry*. 2011 Dec;16(12):1177-88. doi: 10.1038/mp.2011.48.

Süß P, Hoffmann A, Rothe T, Ouyang Z, Baum W, Staszewski O, Schett G, Prinz M, Krönke G, Glass CK, Winkler J, Schlachetzki JCM. Chronic Peripheral Inflammation Causes a Region-Specific Myeloid Response in the Central Nervous System. *Cell Rep*. 2020 Mar 24;30(12):4082-4095.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.109.

Süß P, Kalinichenko L, Baum W, Reichel M, Kornhuber J, Loskarn S, Ettle B, Distler JH, Schett G, Winkler J, Müller CP, Schlachetzki JC. Hippocampal structure and function are maintained despite severe innate peripheral inflammation. *Brain Behav Immun*. 2015 Oct;49:156-70. doi: 10.1016/j.bbi.2015.05.011.

Tang CH. Research of Pathogenesis and Novel Therapeutics in Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2019 Apr 2;20(7):1646. doi: 10.3390/ijms20071646.

Tang H, Li Y, Tang W, Zhu J, Parker GC, Zhang JH. Endogenous Neural Stem Cell-induced Neurogenesis after Ischemic Stroke: Processes for Brain Repair and Perspectives. *Transl Stroke Res*. 2023 Jun;14(3):297-303. doi: 10.1007/s12975-022-01078-5. Epub 2022 Sep 3. Erratum in: *Transl Stroke Res*. 2022 Sep 21;: PMID: 36057034.

Tervo-Clemmens B, Simmonds D, Calabro FJ, Day NL, Richardson GA, Luna B. Adolescent cannabis use and brain systems supporting adult working memory encoding, maintenance, and retrieval. *Neuroimage*. 2018 Apr 1;169:496-509. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.12.041.

Teuchert-Noodt G, Dawirs RR, Hildebrandt K. Adult treatment with methamphetamine transiently decreases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm (Vienna)*. 2000;107(2):133-43. doi: 10.1007/s007020050012.

Torres-Moreno MC, Papaseit E, Torrens M, Farré M. Assessment of Efficacy and Tolerability of Medicinal Cannabinoids in Patients With Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2018 Oct 5;1(6):e183485. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2018.3485.

Troubat R, Barone P, Leman S, Desmidt T, Cressant A, Atanasova B, Brizard B, El Hage W, Surget A, Belzung C, Camus V. Neuroinflammation and depression: A review. *Eur J Neurosci*. 2021 Jan;53(1):151-171. doi: 10.1111/ejn.14720

Turna J, Patterson B, Van Ameringen M. Is cannabis treatment for anxiety, mood, and related disorders ready for prime time? *Depress Anxiety*. 2017 Nov;34(11):1006-1017. doi: 10.1002/da.22664.

Turner CE, Elsohly MA. Biological activity of cannabichromene, its homologs and isomers. *J Clin Pharmacol*. 1981 Aug-Sep;21(S1):283S-291S. doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02606.x.

Turri M, Teatini F, Donato F, Zanette G, Tugnoli V, Deotto L, Bonetti B, Squintani G. Pain Modulation after Oromucosal Cannabinoid Spray (SATIVEX[®]) in Patients with Multiple Sclerosis: A Study with Quantitative Sensory Testing and Laser-Evoked Potentials. *Medicines (Basel)*. 2018 Jun 21;5(3):59. doi: 10.3390/medicines5030059.

UNODC (2017). *Market Analysis of Plant-Based Drugs. Opiates, Cocaine, Cannabis World Drug Report 2017*. Vienna: United Nations Office on Drugs and Crime.

Upton Roy; Elsogly Mahmoud (ed.). *Cannabis inflorescence: cannabis spp.; standards of identity, analysis, and quality control*. American Herbal Pharmacopoeia, 2013.

Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 27;8:396. doi: 10.3389/fncel.2014.00396.

Valero J, Mastrella G, Neiva I, Sánchez S, Malva JO. Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. *Front Neurosci*. 2014 Apr 21;8:83. doi: 10.3389/fnins.2014.00083.

Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci*. 2002 Jan 15;22(2):486-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-02-00486.2002.

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Bhagya V, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *J Neurosci Res*. 2009 Mar;87(4):831-43. doi: 10.1002/jnr.21907.

Vemuri VK, Janero DR, Makriyannis A. Pharmacotherapeutic targeting of the endocannabinoid signaling system: drugs for obesity and the metabolic syndrome. *Physiol Behav*. 2008 Mar 18;93(4-5):671-86. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.012.

Videbech P, Ravnkilde B. Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*. 2004 Nov;161(11):1957-66. doi: 10.1176/appi.ajp.161.11.1957. PMID: 15514393.

Villeda SA, Luo J, Mosher KI, Zou B, Britschgi M, Bieri G, Stan TM, Fainberg N, Ding Z, Eggel A, Lucin KM, Czirr E, Park JS, Couillard-Després S, Aigner L, Li G, Peskind ER, Kaye JA, Quinn JF, Galasko DR, Xie XS, Rando TA, Wyss-Coray T. The ageing systemic milieu negatively regulates

neurogenesis and cognitive function. *Nature*. 2011 Aug 31;477(7362):90-4. doi: 10.1038/nature10357.

Viveros MP, Marco EM, Llorente R, Lamota L. The role of the hippocampus in mediating emotional responses to nicotine and cannabinoids: a possible neural substrate for functional interactions. *Behav Pharmacol*. 2007 Sep;18(5-6):375-89. doi: 10.1097/FBP.0b013e3282d28fb4.

Viveros MP, Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M. Endocannabinoid system and synaptic plasticity: implications for emotional responses. *Neural Plast*. 2007;2007:52908. doi: 10.1155/2007/52908.

Volkow ND, Baler RD, Compton WM, Weiss SR. Adverse health effects of marijuana use. *N Engl J Med*. 2014 Jun 5;370(23):2219-27. doi: 10.1056/NEJMra1402309.

Volkow ND, Swanson JM, Evins AE, DeLisi LE, Meier MH, Gonzalez R, Bloomfield MA, Curran HV, Baler R. Effects of Cannabis Use on Human Behavior, Including Cognition, Motivation, and Psychosis: A Review. *JAMA Psychiatry*. 2016 Mar;73(3):292-7. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.3278.

Walker JM, Hohmann AG, Martin WJ, Strangman NM, Huang SM, Tsou K. The neurobiology of cannabinoid analgesia. *Life Sci*. 1999;65(6-7):665-73. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00289-1.

Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R. Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci*. 2008 Feb 6;28(6):1374-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008.

Wargent ET, Zaibi MS, Silvestri C, Hislop DC, Stocker CJ, Stott CG, Guy GW, Duncan M, Di Marzo V, Cawthorne MA. The cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin (THCV) ameliorates insulin sensitivity in two mouse models of obesity. *Nutr Diabetes*. 2013 May 27;3(5):e68. doi: 10.1038/nutd.2013.9.

Warner-Schmidt JL, Duman RS. Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*. 2006;16(3):239-49. doi: 10.1002/hipo.20156.

Webster P. Debate over recreational cannabis use legalisation in Canada. *Lancet*. 2018 Feb 24;391(10122):725-726. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30430-6.

Westhoff D, Engelen-Lee JY, Hoogland ICM, Aronica EMA, van Westerlo DJ, van de Beek D, van Gool WA. Systemic infection and microglia activation: a prospective postmortem study in sepsis patients. *Immun Ageing*. 2019 Jul 30;16:18. doi: 10.1186/s12979-019-0158-7.

WHO Report: http://www.who.int/substance_abuse/facts/cannabis/en/

Wilkinson JD, Williamson EM. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. *J Dermatol Sci*. 2007 Feb;45(2):87-92. doi: 10.1016/j.jdermsci.2006.10.009.

Williams SJ, Hartley JP, Graham JD. Bronchodilator effect of delta1-tetrahydrocannabinol administered by aerosol of asthmatic patients. *Thorax*. 1976 Dec;31(6):720-3. doi: 10.1136/thx.31.6.720.

Williams, C. M., Jones, N. A., & Whalley, B. J. (2014). Cannabis and epilepsy. In *Handbook of cannabis* (pp. 547–563). Oxford, UK: Oxford University Press. <http://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0030>.

Winner B, Kohl Z, Gage FH. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2011 Mar;33(6):1139-51. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07613.x.

Wiskott L, Rasch MJ, Kempermann G. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*. 2006;16(3):329-43. doi: 10.1002/hipo.20167.

Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, Müller A, Melnik A, Waltinger TP, Ullrich O, Kempermann G. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal*. 2010 Jun 17;8:12. doi: 10.1186/1478-811X-8-12.

Wolf SA, Steiner B, Wengner A, Lipp M, Kammertoens T, Kempermann G. Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB J*. 2009 Sep;23(9):3121-8. doi: 10.1096/fj.08-113944.

Wolff V, Armspach JP, Lauer V, Rouyer O, Bataillard M, Marescaux C, Geny B. Cannabis-related stroke: myth or reality? *Stroke*. 2013 Feb;44(2):558-63. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.671347

Wolpe SD, Sherry B, Juers D, Davatelis G, Yurt RW, Cerami A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(2):612-6. doi: 10.1073/pnas.86.2.612.

Yamaguchi M, Suzuki T, Seki T, Namba T, Juan R, Arai H, Hori T, Asada T. Repetitive cocaine administration decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Oct;1025:351-62. doi: 10.1196/annals.1316.043.

Yuan TF, Li J, Ding F, Arias-Carrion O (2014) Evidence of adult neurogenesis in non-human primates and human. *Cell Tissue Res* 358:17–23. doi: 10.1007/s00441-014-1980-z

Yun J, Koike H, Ibi D, Toth E, Mizoguchi H, Nitta A, Yoneyama M, Ogita K, Yoneda Y, Nabeshima T, Nagai T, Yamada K. Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J Neurochem*. 2010 Sep;114(6):1840-51. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06893.x.

Yun S, Reynolds RP, Masiulis I, Eisch AJ. Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis.

Zacchetti A, van Garderen E, Teske E, Nederbragt H, Dierendonck JH, Rutteman GR. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS*. 2003 Mar;111(3):430-8. doi: 10.1034/j.1600-0463.2003.t01-1-1110208.x.

Zagožen M, Čerenak A, Kreft S. Cannabigerol and cannabichromene in *Cannabis sativa* L. *Acta Pharm*. 2020 Dec 31;71(3):355-364. doi: 10.2478/acph-2021-0021.

Zonis S, Pechnick RN, Ljubimov VA, Mahgerefteh M, Wawrowsky K, Michelsen KS, Chesnokova V. Chronic intestinal inflammation alters hippocampal neurogenesis. *J Neuroinflammation*. 2015 Apr 3;12:65. doi: 10.1186/s12974-015-0281-0.

Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Pinto JP, Chagas MH, Rodrigues GG, Dursun SM, Tumas V. Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *J Psychopharmacol*. 2009 Nov;23(8):979-83. doi: 10.1177/0269881108096519.

Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*. 2006 Jun;28(2):153-7. doi: 10.1590/s1516-44462006000200015.

Zuardi AW. History of cannabis as a medicine: a review. *Braz J Psychiatry*. 2006 Jun;28(2):153-7. doi: 10.1590/s1516-44462006000200015.

Zucoloto AZ, Manchope MF, Borghi SM, Dos Santos TS, Fattori V, Badaro-Garcia S, Camilios-Neto D, Casagrande R, Verri WA Jr. Probucof Ameliorates Complete Freund's Adjuvant-Induced

Hyperalgesia by Targeting Peripheral and Spinal Cord Inflammation. *Inflammation*. 2019 Aug;42(4):1474-1490. doi: 10.1007/s10753-019-01011-3.

Zunszain PA, Anacker C, Cattaneo A, Choudhury S, Musaelyan K, Myint AM, Thuret S, Price J, Pariante CM. Interleukin-1 β : a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Mar;37(4):939-49. doi: 10.1038/npp.2011.277.

Publikációs jegyzék

Az értekezés alapját képező eredeti közlemények

Kitti Rusznák, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Chronic marijuana smoke exposure does not influence the impact of long-term stress on physiology, cognition, emotion and adult hippocampal neurogenesis.

Frontiers in Pharmacology, 23 July 2018 | <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00786>

(Q1, IF: 3.845) Megosztott elsőszerező

Rusznák Kitti, Horváth Ádám István, Pohli-Tóth Kinga, Futácsi Anett, Kemény Ágnes, Kiss Gabriella, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Experimental Arthritis Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Cells* 2022, 11, 79., <https://doi.org/10.3390/cells11050791> (Q1, IF: 6.000)

Az értekezés alapját képező publikációk összesített impakt faktora: 9,845

Független citációk száma összesen: 20

További közlemények

Czárán D, Sasvári P, Horváth ÁI, Ella K, Sűdy ÁR, Borbély É, **Rusznák K**, Czéh B, Mócsai A, Helyes Z, Csépanyi-Kömi R. Lacking ARHGAP25 mitigates the symptoms of autoantibody-induced arthritis in mice. *Frontiers in Immunology* 2023 May 10;14:1182278. doi: 10.3389/fimmu.2023.1182278. PMID: 37234175; PMCID: PMC10208528. (Q1, IF: 7.300)

Tudományos konferenciákon való részvételek, poszter prezentációk

Poszter prezentáció nemzetközi konferenciákon

Rusznák Kitti, Horváth Ádám István, Pohli-Tóth Kinga, Futácsi Anett, Kemény Ágnes, Kiss Gabriella, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Experimental arthritis inhibits adult hippocampal neurogenesis in mice

FENS (Federation of Neuroscience Societies) Párizs, Franciaország, 2022. július 9-13

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás,
Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Physiology,
Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis.

EBBS (European Brain and Behaviour Society) 2019, Prága, Csehország, 2019.09.21-24.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás,
Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Phys- iology,
Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis,

IDK-Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, Magyarország 2019. május 24-
25.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma
Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

The effect of chronic stress and concomitant cannabis exposure on behaviour and adult
hippocampal neurogenesis in mice,

ECNP (European College of Neuropsychopharmacology) Workshop for Early Career
Scientists in Europe, Nizza, Franciaország, 2019, március 7 – 10.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár
The Effect of Chronic Stress and Concomitant Cannabis Exposure on Behavior and Adult
Hippocampal Neurogenesis in Mice,

FENS (Federation of Neuroscience Societies) Regional Meeting, Pécs, Magyarország 2017
szeptember 20-23.

Poszter prezentáció magyar konferenciákon

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

The effects of long-term cannabis smoke exposure in mice,

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 59. Nagygyűlése Pécs, 2018. augusztus 30 – szeptember 1.

Rusznák Kitti, Csekő Kata, Varga Zsófia, Csabai Dávid, Bóna Ágnes, Mayer Mátyás, Kozma Zsolt, Helyes Zsuzsanna, Czéh Boldizsár

A stressz és marihuána füst hatása kísérleti állatokban,

Magyar Pszichiátriai Társaság IX. Nemzeti Kongresszusa, Debrecen, Magyarország, 2018 január 24-27

Tanulmányutak:

Erasmus+ kutatói út: 2021 Május-Augusztus (4 hónap),

Trento, Olaszország

Università di Trento, CIBIO – Giovanni Piccoli, Ph.D

NFTÖ ösztöndíj, PTE-LMI kutatási támogatás: 2022 Február – Május (3 hónap)

New York City, USA

Columbia University – X. Shawn Liu, Ph.D.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani elsősorban témavezetőmnek, Prof. Dr. Czéh Boldizsárnak, a mesterszakos szakdolgozatom megkezdése óta nyújtott támogatásáért, oktatómunkájáért, kutatói példamutatásáért, tanácsaiért, segítségéért, továbbá nyitott és közvetlen magatartásáért, akihez mindig bizalommal fordulhattam bármilyen kérdés esetén és mindig támogatott a kutatóvá válás útján.

Továbbá szeretném megköszönni Prof. Dr. Helyes Zsuzsannának a közös kollaborálásaink során nyújtott segítségét, ötleteit és lelkesedését. Elhivatottsága és közvetlensége követendő példát jelent számomra a jövőben.

Mérhetetlenül hálás vagyok Furácsi Anett és Vudi-Garai Krisztina, a Szentágothai János Kutatóközpont Neurobiológiai kutatócsoport munkatársainak, akikre akár hétvégén is számíthattam és szövettani feldolgozásokban segítettek a kutatómunkámat. Köszönetemet szeretném kifejezni a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet minden dolgozójának, akik hozzájárultak munkámhoz, és külön köszönettel tartozom Dr. Csekő Katának és Dr. Horváth Ádám Istvánnak, akiktől nagyon sokat tanulhattam, valamint mindig nyitottak, kedvesek és türelmesek voltak, valamint köszönöm a kutatásainkban együttműködő munkatársaknak: Dr. Bóna Ágnesnek, Dr. Mayer Mátyásnak, Dr. Kozma Zsoltnak, Dr. Kemény Ágnesnek, és Dr. Kiss Gabriellának is hálás vagyok a segítségükért. Ezenfelül köszönöm a Laboratórium Medicina Intézet, valamint Prof. Dr. Miseta Attila támogatását.

Végül de nem utolsó sorban köszönöm a szüleimnek és családomnak, barátaimnak a fáradhatatlan támogatásukat, türelmüket, segítségüket, és hogy mindig mellettem álltak az álmaim megvalósításában.

A kutatásokat a Nemzeti Agykutatási Program (KTIA_NAP_13-2014-0019 és 20017-1.2.1-NKP -2017-00002), a GINOP-2.3.2-15-2016-00048 “Stay Alive” program valamint az EFOP-3.6.2-16-2017-00008 „A neuroinflammáció vizsgálat a neurodegeneratív folyamatokban: a molekulától a betegágyig” című projektje és a EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, „Átfogó fejlesztés a Intelligens szakosodási stratégiák megvalósítása a Pécsi Tudományegyetemen” és a TKP2021-EGA-16 projekt a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap támogatásával valósult meg. Mindezekon túl a kutatói útjaimat az ERASMUS+ és az NTP-NFTÖ támogatta.

A disszertáció alapjául szolgáló megjelent eredeti közlemények:

Article

Experimental Arthritis Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice

Kitti Rusznák^{1,2}, Ádám István Horváth^{3,4} , Kinga Pohli-Tóth¹, Anett Futácsi¹, Ágnes Kemény^{4,5}, Gabriella Kiss², Zsuzsanna Helyes^{3,4,6} and Boldizsár Czéh^{1,2,7,*} 

¹ Structural Neurobiology Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; rusznak.kitty@gmail.com (K.R.); 1998tothkinga@gmail.com (K.P.-T.); futacsi.anett@gmail.com (A.F.)

² Department of Laboratory Medicine, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; kiss.gabriella2@pte.hu

³ Molecular Pharmacology Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; adam.horvath@aok.pte.hu (Á.I.H.); zsuzsanna.helyes@aok.pte.hu (Z.H.)

⁴ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary; kemeny.agnes@pte.hu

⁵ Department of Medical Biology, Medical School, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

⁶ PharmInVivo Ltd., 7624 Pécs, Hungary

⁷ Histology and Light Microscopy Core Facility, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

* Correspondence: czeh.boldizsar@pte.hu



Citation: Rusznák, K.; Horváth, Á.I.; Pohli-Tóth, K.; Futácsi, A.; Kemény, Á.; Kiss, G.; Helyes, Z.; Czéh, B. Experimental Arthritis Inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *Cells* **2022**, *11*, 791. <https://doi.org/10.3390/cells11050791>

Academic Editor: Alexander E. Kalyuzhny

Received: 3 February 2022

Accepted: 18 February 2022

Published: 24 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Adult-born neurons of the hippocampal dentate gyrus play a role in specific forms of learning, and disturbed neurogenesis seems to contribute to the development of neuropsychiatric disorders, such as major depression. Neuroinflammation inhibits adult neurogenesis, but the effect of peripheral inflammation on this form of neuroplasticity is ambiguous. **Objective:** Our aim was to investigate the influence of acute and chronic experimental arthritis on adult hippocampal neurogenesis and to elucidate putative regulatory mechanisms. **Methods:** Arthritis was triggered by subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant (CFA) into the hind paws of adult male mice. The animals were killed either seven days (acute inflammation) or 21 days (chronic inflammation) after the CFA injection. Behavioral tests were used to demonstrate arthritis-related hypersensitivity to painful stimuli. We used in vivo bioluminescence imaging to verify local inflammation. The systemic inflammatory response was assessed by complete blood cell counts and by measurement of the cytokine/chemokine concentrations of TNF- α , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, KC and MIP-2 in the inflamed hind limbs, peripheral blood and hippocampus to characterize the inflammatory responses in the periphery and in the brain. In the hippocampal dentate gyrus, the total number of newborn neurons was determined with quantitative immunohistochemistry visualizing BrdU- and doublecortin-positive cells. Microglial activation in the dentate gyrus was determined by quantifying the density of Iba1- and CD68-positive cells. **Results:** Both acute and chronic arthritis resulted in paw edema, mechanical and thermal hyperalgesia. We found phagocytic infiltration and increased levels of TNF- α , IL-4, IL-6, KC and MIP-2 in the inflamed hind paws. Circulating neutrophil granulocytes and IL-6 levels increased in the blood solely during the acute phase. In the dentate gyrus, chronic arthritis reduced the number of doublecortin-positive cells, and we found increased density of CD68-positive macrophages/microglia in both the acute and chronic phases. Cytokine levels, however, were not altered in the hippocampus. **Conclusions:** Our data suggest that acute peripheral inflammation initiates a cascade of molecular and cellular changes that eventually leads to reduced adult hippocampal neurogenesis, which was detectable only in the chronic inflammatory phase.

Keywords: animal model; cell proliferation; chronic inflammation; cytokine; chemokine; chronic pain; dentate gyrus; hippocampus; microglia; neuroplasticity

1. Introduction

Neurogenesis in the adult brain is a unique form of neuroplasticity. Generation of newborn neurons has been reported in the adult hippocampus of humans [1,2], non-human primates [3,4] and rodents [5,6]. Newly generated neurons of the hippocampal dentate gyrus seem to play a significant role in specific forms of learning and memory processes [7–11]. Furthermore, disruption of adult neurogenesis may contribute to the development of various neuropsychiatric disorders, including depressive disorders [12,13].

Numerous external and internal factors influence the production of newborn neurons. An inflammatory niche and circulating pro-inflammatory cytokines are well-known inhibitors of adult neurogenesis [14–20]. Neuroinflammation is a potent inhibitor of adult hippocampal neurogenesis [21–24], but the available data regarding the influence of peripheral or systemic inflammation on this process are controversial [25]. The first studies investigating the effects of peripheral inflammation injected a bacterial endotoxin (lipopolysaccharide: LPS) to induce systemic inflammation in mice and investigated its long-term consequences on neurodegeneration, hippocampal neurogenesis and cognitive functions [26–29]. However, relatively few studies, thus far, have applied a model with inflammation of a specific organ. Some of these studies administered dextran sulfate sodium (DSS) to elicit experimental colitis and investigated its influence on adult neurogenesis [30–32]. The first study reported that both acute and chronic colitis can inhibit the production of adult-born neurons in the dentate gyrus and increase the expression of the activated microglia marker Iba1-protein in the hippocampus [30]. This was confirmed later by a demonstration in which DSS-treated mice had reduced adult hippocampal neurogenesis and increased activation of microglia and astrocytes [31]. More recently, a comprehensive study reported that acute colitis can in fact increase neurogenesis; though animals with chronic colitis had normal neurogenesis, the newborn neurons displayed deficits during their integration into the functional circuitry [32].

Another research line applied complete Freund's adjuvant (CFA) injections to trigger rheumatoid arthritis, which resulted in a transient increase in hippocampal precursor cell proliferation and neurogenesis in female mice [33]. More recently, the effect of chronic peripheral inflammation on neuroplastic changes in different regions of the central nervous system (CNS) has been studied thoroughly in a TNF- α transgenic mouse model of rheumatoid arthritis [34,35]. These transgenic mice manifest severe erosive arthritis with increased IL-1 β and IL-6 expression in their joints together with highly elevated TNF- α levels in the serum, but none of these alterations could influence adult hippocampal neurogenesis, anxiety levels, or depressive-like behavior of the animals [34]. Other studies, using unilateral CFA-treatment to create chronic pain models, also reported a reduced rate of adult neurogenesis [36,37]. Notably, depression is highly prevalent among patients with rheumatoid arthritis (or chronic pain), and it is also associated with poorer clinical outcomes [38,39]. Finally, a very recent publication demonstrated that adult hippocampal neurogenesis is involved in the maintenance of pathological pain induced by peripheral neuropathy [40].

Due to these contradictory findings in the literature, our aim was to further characterize the influence of peripheral inflammation on adult hippocampal neurogenesis using the CFA-induced arthritis model. We injected CFA to the hind limbs of male mice to trigger acute and chronic arthritis, and then we characterized the animals behaviorally. Next, inflammatory responses were studied with cellular and molecular methods, and, finally, we quantified adult-born neurons in the hippocampus. One subset of animals was killed seven days (acute inflammation) after the CFA injection, while another set was killed after 21 days (chronic inflammation). We used behavioral tests to assess the arthritis-related hypersensitivity to painful stimuli. Bioluminescence imaging was applied to verify local inflammation, and blood cell counts were performed to examine the systemic inflammatory response. We measured cytokine/chemokine levels of TNF- α , IL-1 α , IL-4, IL-6, IL-10, KC and MIP-2 in the hind paws, peripheral blood and hippocampus. Cytogenesis and newborn neurons of the dentate gyrus were visualized and quantified using BrdU- and

doublecortin-immunohistochemistry. Activated microglia and macrophages were labelled with Iba1- and CD68-antibodies, and cell densities were determined in the dentate gyrus. Our hypothesis was that chronic peripheral inflammation should elicit a parallel neuroinflammatory response in the hippocampus, and thereby inhibit adult neurogenesis in the dentate gyrus.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Experiments were performed on adult (9–12 week-old) male C57BL/6J mice weighing 20–30 g. In total, 80 mice were used in this experiment. They were bred in the Laboratory Animal House of the Department of Pharmacology and Pharmacotherapy at the University of Pécs and kept (group-housed) in the Laboratory Animal House of the Szentágotthai Research Centre under a standard 12-h light/dark cycle at 24 ± 2 °C with a relative humidity of 50–60%. Food and water were available *ad libitum* in the home cages.

This study was carried out according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) regarding the protection of animals used for scientific purposes. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (license number: BA02/2000-28/2020).

2.2. Experimental Design

The experimental design, including the animal groups, behavioral tests and physiological assessments, as well as the timeline of the procedures, is depicted in Figure 1. First, the animals were allowed to habituate to the new housing conditions for 14 days. Behavioral baseline values were determined during the second week of this habituation period. Afterwards, the animals were randomly divided into four experimental groups according to the treatment protocols and survival time: (1) Acute Control; (2) Acute CFA; (3) Chronic Control; (4) Chronic CFA ($n = 20$ /group). Mice were killed either 7 days (acute phase) or 21 days (chronic phase) after the CFA injections. All behavioral tests were performed during the light phase of the animals. We tested mice in an alternating order from the different experimental groups using a predefined sequence to minimize the potential effect of the circadian rhythm on the behavioral performance. One set of mice was perfused with a fixative and processed for histopathology, while the other set was killed for collection of blood and tissue samples of the hind paws and hippocampi to determine cytokine levels.

2.3. Induction of Joint Inflammation

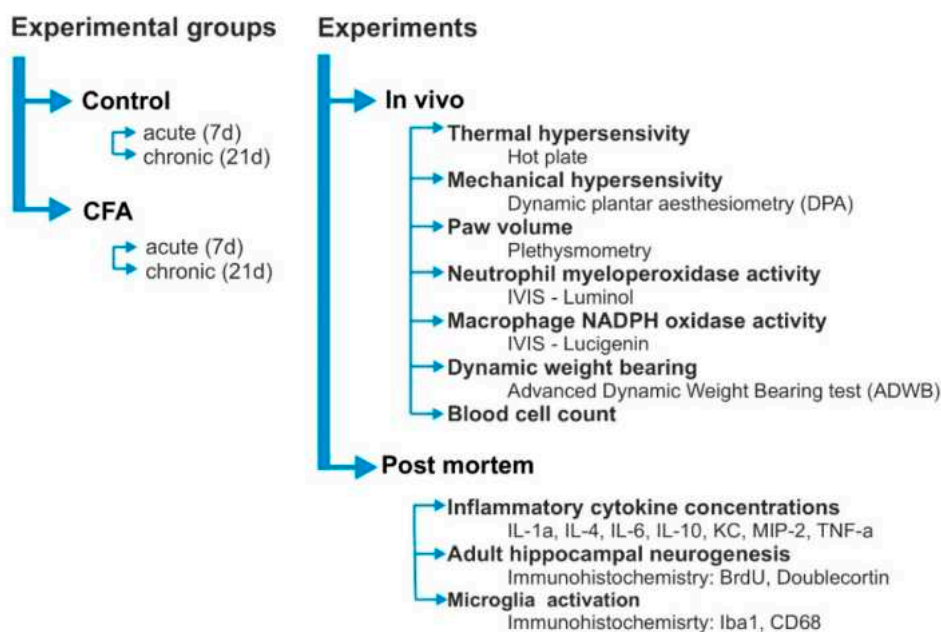
CFA-induced arthritis is a well-established rodent model of chronic arthritis [41–44], and it was elicited according to our standard protocol [45,46]. Inflammation of the right tibiotarsal joint was induced by subcutaneous injection of 20 μ L of complete Freund's adjuvant (CFA; consisting of heat-killed Mycobacterium tuberculosis suspended in paraffin oil, 1 mg/mL; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) into the plantar surface of the right hind paw and to the tail root under i.p. ketamine (100 mg/kg Calypsol, Gedeon Richter Plc., Budapest, Hungary) and xylazine (5 mg/kg Sedaxylan, Eurovet Animal Health B.V., Bladel, The Netherlands) anesthesia (on Day 0). An additional tail root injection was administered in the same volume on Day 1 to boost the systemic inflammatory effect.

2.4. Mechanonociception

Mechanical hypersensitivity was examined by measuring the mechanical paw withdrawal threshold of the hind paws using a dynamic plantar aesthesiometer (DPA, Ugo Basile, Gemonio, Italy). Mechanical hyperalgesia was calculated as the percentage decrease in the mechanonociceptive thresholds compared to the pre-treatment values [45,46]. Mice were placed in plexiglas boxes with a steel mesh floor, and a force of 2.5 g/s was applied via a 0.5 mm diameter straight metal filament to the plantar surface of the hind paw until

the animal lifted its foot. The mechanical withdrawal nociceptive threshold, inducing paw withdrawal, was the pressure expressed in grams (g). Animal numbers in this test: Acute Control ($n = 11$); Acute CFA ($n = 11$); Chronic Control ($n = 15$); Chronic CFA ($n = 15$).

A Experimental design



B Experimental Timeline

Tests and treatments	ACUTE		1. week						
	BL	0	1	2	3	4	5	6	7
CFA									
Hot plate	3x								
DPA	3x								
ADWB	1x								
Plethysmometry	3x								
IVIS-Luminol									
IVIS-Lucigenin									
BrdU									

Tests and treatments	CHRONIC		1. week							2. week							3. week						
	BL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
CFA																							
Hot plate	3x																						
DPA	3x																						
ADWB	1x																						
Plethysmometry	3x																						
IVIS-Luminol																							
IVIS-Lucigenin																							
BrdU																							

Figure 1. Experimental design and experimental timeline. (A) Mice were randomly divided into four groups: Acute Control; Chronic Control; Acute CFA and Chronic CFA ($n = 20$ /group). Various behavioral, physiological and histopathological studies were carried out to characterize the consequences of acute and chronic CFA-induced arthritis. (B) The experimental schedules for the Acute CFA- and Chronic CFA-treated animals, as well as their corresponding controls. Behavioral tests, in vivo imaging and treatments were performed on those days which have gray background. Abbreviations: advanced dynamic weight bearing (ADWB); baseline (BL); complete Freund’s adjuvant (CFA); dynamic plantar aesthesiometry (DPA).

2.5. *Thermonociception*

Thermal hypersensitivity was documented by the decreased latency in nocifensive behavior in response to noxious heat stimuli. The latency of nocifensive behavior (lifting, shaking or licking either hind paw) was measured using the Hot/Cold Plate analgesia meter (Ugo Basile, Gemonio, Italy). Latency time was expressed in seconds. The surface of the plate was maintained at 50 °C, and the cut-off time was 20 s. Animal numbers in this test: Acute Control ($n = 11$); Acute CFA ($n = 11$); Chronic Control ($n = 15$); Chronic CFA ($n = 15$).

2.6. *Bodyweight Imbalance*

Dynamic bodyweight imbalance (incapacitance) was determined with an advanced dynamic weight bearing apparatus (Bioseb, Vitrolles, France) and expressed as the ratio of the weight distributed on one hind limb divided by the total weight borne on both hind limbs [(weight borne on the left or right hind limb)/(weight borne on both hind limbs)] $\times 100$ [47]. Animal numbers: Acute CFA ($n = 19$); Chronic CFA ($n = 15$).

2.7. *Hind Paw Volume*

Hind paw volumes were measured with a Plethysmometer (Ugo Basile, Gemonio, Italy) and expressed in cm^3 . Animal numbers: Acute Control ($n = 11$); Acute CFA ($n = 11$); Chronic Control ($n = 15$); Chronic CFA ($n = 15$).

2.8. *In Vivo Bioluminescence Imaging*

Inflammatory reaction of the joints was examined by in vivo bioluminescence imaging. We measured neutrophil myeloperoxidase (MPO) activity with luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazine-dione) and macrophage NADPH oxidase (Phox) activity with lucigenin (bis-*N*-methylacridinium nitrate) in order to detect reactive oxygen species [48]. Imaging of the animals was performed 10 min after the i.p. injection of luminol sodium salt (150 mg/kg; Gold Biotechnology, Olivette, MO, USA) dissolved in phosphate buffered saline (PBS; 30 mg/mL) and lucigenin (25 mg/kg; Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) dissolved in saline (2.5 mg/mL) using the IVIS Lumina III imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Acquisition times were 120 s for luminol-derived bioluminescence and 180 s for lucigenin-derived bioluminescence (Binning = 8, F/Stop = 1). Identical regions of interest (ROIs) were applied on the hind paws and ankle joints, and luminescence was expressed as the total radiance (total photon flux/s) within the ROIs [49]. Animal numbers: Acute Control ($n = 24$); Acute CFA ($n = 21$); Chronic Control ($n = 9$ –10); Chronic CFA ($n = 10$).

2.9. *Complete Blood Cell Count*

Shortly before killing the mice, blood samples were collected in 500 μL Microtainer blood sampling tubes containing K_2EDTA (Becton Dickinson, Hungary). Complete blood cell count was determined by a Sysmex XN-V automated hematology analyzer for veterinary use in a pre-defined mouse species whole blood mode. Animal numbers: Acute Control ($n = 5$); Acute CFA ($n = 5$); Chronic Control ($n = 8$); Chronic CFA ($n = 8$).

2.10. *Cytokine Concentrations*

Cytokine levels were determined postmortem from tissue samples of the ankles, peripheral blood and hippocampi. Blood samples were collected after decapitation. Excised and snap-frozen tissues were homogenized in cold PBS containing 10 mg/mL of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF, Sigma Aldrich, P7626) on ice with IKA's ultraturax device. Afterwards, samples were centrifuged for 20 min (4 °C, 4000 rpm), and supernatants were pooled from animals of the same treatment groups and stored at -80 °C.

A Milliplex assay based on the Luminex xMAP technology was performed to determine the protein concentrations of seven distinct cytokines/chemokines using customized Milliplex Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck Millipore

MCYTOMAG-70K, Merck Life Science Ltd., Budapest, Hungary). We measured concentrations of the following cytokines/chemokines: interleukin-1-alpha (IL-1 α); interleukin-4 (IL-4); interleukin-6 (IL-6); interleukin-10 (IL-10); tumor necrosis factor alpha (TNF- α); keratinocyte-derived chemokine (KC) and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2). Following previous optimizations, all samples were tested undiluted in a blind-fashion and in duplicate. The experiment was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 25 μ L volume of each sample, control, and standard was added to a 96-well plate (provided with the kit) containing 25 μ L of capture antibody coated, fluorescent color-coded bead mixture. Biotinylated detection antibodies and streptavidin-PE were added to the plate after the appropriate washing and incubation periods. After the last washing step, beads were resuspended in a 150 μ L volume of drive fluid, and the plate was read on the Luminex MagPix instrument. The Five-PL regression curve was used to plot the standard curves for all analytes via analyst software that analyzed the bead classifier and reporter median fluorescence intensities. Cytokine concentrations were normalized to the protein concentrations of the tissue homogenates, and the results are reported as pg/mL wet tissue. Cytokine concentrations in blood samples are reported as pg/mg of wet tissue. Animal numbers: Acute Control ($n = 6$); Acute CFA ($n = 6$); Chronic Control ($n = 6$); Chronic CFA ($n = 6$).

2.11. BrdU Injection, Tissue Fixation and BrdU-Immunocytochemistry

The thymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used to label newly synthesized DNA in proliferating cells. BrdU was dissolved in sterile 0.9% saline (containing 0.007 N NaOH) at a concentration of 15 mg/mL. We injected BrdU (200 mg/kg, i.p.) into the animals on two consecutive days, 3–4 days before the perfusion (Figure 1B).

Mice were anesthetized deeply with a mixture of ketamine (Calypsol inj. 50 mg/mL, Richter Gedeon) and xylazine (Sedaxylan[®] inj. 20 mg/mL, Eurovet Animal Health BV) 100/10 mg/kg and perfused transcardially with ice cold physiological saline and ice cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M of phosphate buffer.

Brains were sectioned with a Leica VT1200 vibrating blade microtome (Leica Biosystems, BioMarker Ltd., Budapest, Hungary) to collect serial 50- μ m coronal sections throughout the entire hippocampal formation along the septo-temporal axis. Every fourth section was slide-mounted on Superfrost slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) and coded to ensure objectivity before processing for immunocytochemistry. BrdU-immunohistochemistry protocol was carried out according to our standard protocol [50]. Briefly, the key steps include: cellular DNA was denatured in 0.1 M of citric acid at pH 6.0 and 95 °C for 20 min, and then sections were treated with 1% H₂O₂ in Tris for 20 min. Cellular membranes were permeabilized with 0.1% trypsin in 0.1 M of Tris for 10 min. Next, sections underwent acidification in 2N HCl in Tris for 30 min. Thorough rinsing in buffers was applied between each step. Nonspecific antibody binding was prevented by incubating sections for 1 h in 5% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Subsequently, sections were incubated for one night at 4 °C with mouse anti-BrdU (1:5000, DAKO, Clone Bu20a, Catalog # M074401). After incubation with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200, Vector Laboratories) for 1 h at 4 °C, sections were incubated in avidin-biotin-horseradish peroxidase (1:500; Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) for 2 h at 4 °C. BrdU-labeled cells were visualized in 0.025% 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) and 0.01% H₂O₂ in PBS for 10 min. After overnight drying at room temperature, sections were dehydrated in graded alcohol, cleared in xylene and coverslipped with Eukitt. Animal numbers used for all immunohistochemistry were: Acute Control ($n = 8$); Acute CFA ($n = 8$); Chronic Control ($n = 9$); Chronic CFA ($n = 9$).

2.12. Doublecortin (DCX), Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (Iba1) and CD68 Immunocytochemistry

DCX-labeling was used to visualize immature neurons [51,52], Iba1-labeling was applied to visualize activated microglia [53] and CD68-labeling was used to visualize activated microglia and macrophages [54]. Immunolabeling of DCX-positive cells was done as previously described in detail [50], and the protocols for Iba1- and CD68-immunohistochemistry were essentially the same. Briefly, free-floating serial sections were washed in 0.1 M of PBS, and then treated with 3% H₂O₂ for 30 min. After thorough rinsing, nonspecific binding was prevented by incubating the sections for 1 h in 3% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories) in PBS containing 0.5% Triton X-100. Subsequently, sections were rinsed in PBS and incubated for one night at 4 °C with a rabbit anti-DCX antibody (1:3000, Cell Signaling Technology, Wien, Austria, Catalog # 4604), a polyclonal rabbit anti-Iba1 antibody (1:2000, FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Germany, Catalog # 019-19741) or with rabbit monoclonal anti-CD68 antibody (1:1000, AbCam, Cambridge, UK, Catalog # 283654). After repeated rinsing, sections were incubated with anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Laboratories) for 2 h, washed and incubated in avidin-biotin-horseradish peroxidase (1:200; Vectastain Elite ABC Kit, Vector) for 2 h. Labelled cells were visualized with a DAB reaction (as above). Sections were mounted, dried and dehydrated in graded alcohol, and then cleared and coverslipped with Eukitt. All slides were coded before quantification to ensure objectivity. Images were acquired on a Nikon Eclipse Ti-U workstation (Auro-Science Consulting Ltd., Budapest, Hungary).

2.13. Cell Quantification in the Hippocampus

A single experimenter (KR), who was blind to the group identification of each animal, performed the data collection. The code was not broken until the cell counting analyses were completed. Cell counting was done using the Neurolucida (Version 7) reconstruction system (Microbrightfield, Colchester, VT, USA) attached to a Nikon Eclipse bright field microscope.

Cell quantification was carried out using a modified unbiased stereology protocol [55–57]. BrdU+, DCX+, Iba1+ and CD68+ cells were counted in a systematic manner in a complete series of 50- μ m thick sections starting at a random position along the entire septo-temporal axis of the hippocampal formation (between -0.94 and -3.88 relative to Bregma [58]). Every fourth section was examined for each label, yielding 13–15 sections per animal. All BrdU+ and DCX-labeled cells in the granule cell layer, together with the subgranular zone, which is defined as a zone two cell bodies wide along the inner border of the granule cell layer, were counted regardless of size or shape. The Iba1-positive cells of the dentate gyrus were counted in an area that included the upper- and lower-blades of the granule cell layer and the hilus. The cells were examined under $\times 200$ magnification, and cells in the outermost focal plane were omitted. The total number of BrdU+ and DCX+ cells was estimated by multiplying the number of cells counted in every fourth section by four. Both hemispheres were counted, and cell numbers are reported here as the total neuron numbers of both hemispheres. The Iba1- and CD68-positive cells were quantified in 7 sections/animal, and the results are expressed as densities (cell number/mm³).

2.14. Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Data analyses were performed using GraphPad Prism, Version 7. Behavioral data were analyzed with two-way repeated measures ANOVA or with two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Sidak's multiple comparisons post hoc test. The in vivo imaging data, blood cell counts, cytokine concentrations and cell numbers in the hippocampal dentate gyrus were analyzed with two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. CFA Treatment Induced Paw Edema, Thermal and Mechanical Hyperalgesia, as Well as Impaired Weight Distribution

The CFA-injected animals developed behavioral symptoms indicating chronic pain in their inflamed hind limbs (Figure 2). They had hypersensitivity to mechanical stimuli from Day 3 onwards (Figure 2A,B). For a detailed statistical analysis of these data, see Supplementary Table S1. Similarly, the CFA-treated animals displayed thermal hypersensitivity to noxious heat stimuli (Figure 2C,D, statistics in Supplementary Table S2). The CFA-injected mice had persisting edema of the inflamed hind paws (Figure 2E,F, statistics in Supplementary Table S3). Furthermore, animals with arthritis displayed significant bodyweight imbalance during the acute inflammatory phase (Figure 2G, statistics in Supplementary Table S4), which was reversed in the chronic inflammatory phase (Figure 2H, statistics in Supplementary Table S5). Overall, these data clearly document that the CFA-treated animals were suffering from chronic pain.

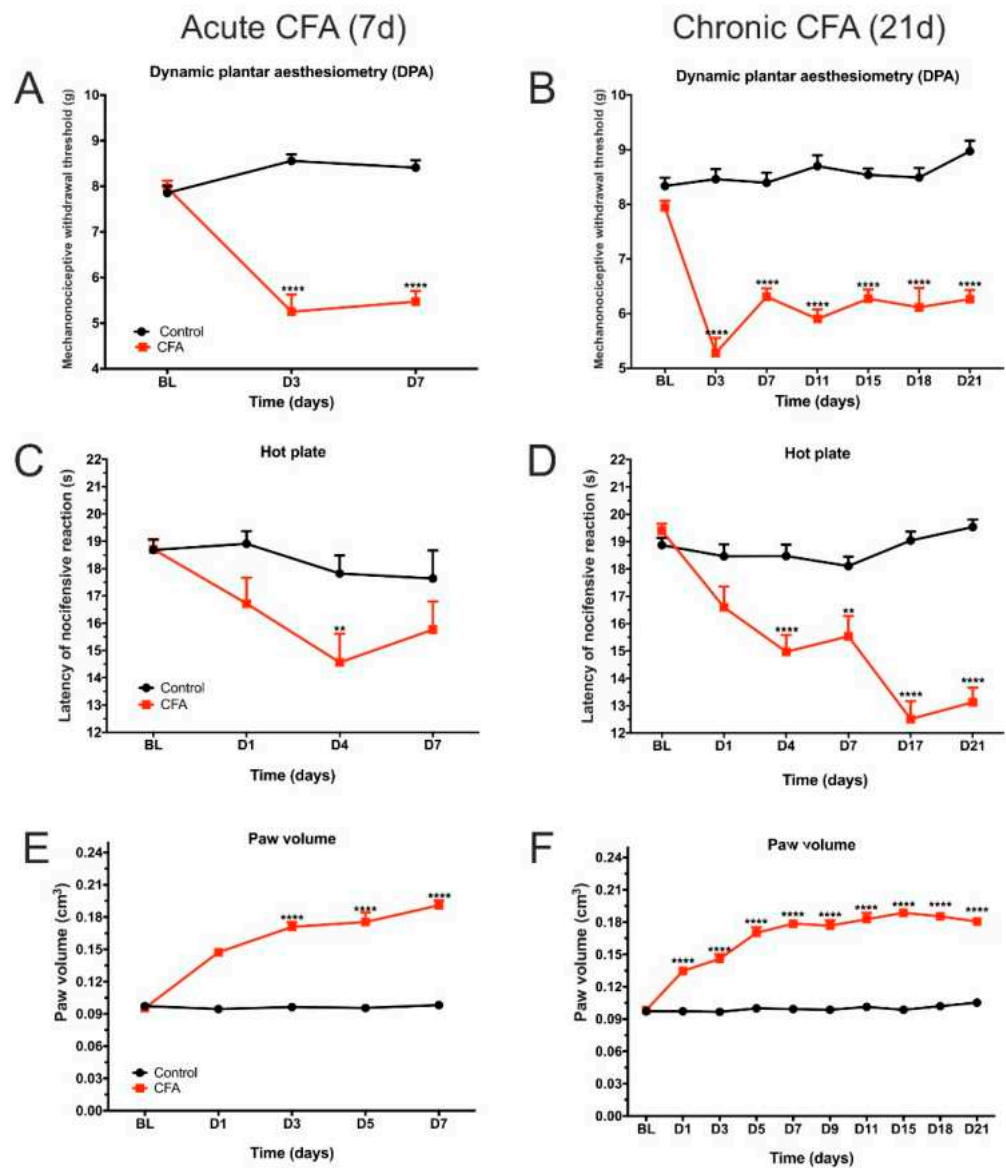


Figure 2. Cont.

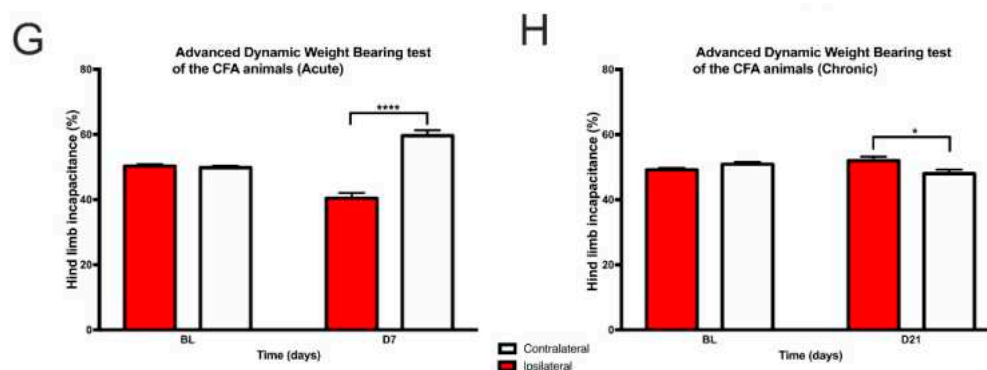


Figure 2. Behavioral testing revealed CFA-induced increase in pain sensitivity and edema of the inflamed hind limb. CFA-injected mice had reduced mechanonociceptive withdrawal threshold in acute (A) and chronic (B) inflammatory conditions, as revealed by the dynamic plantar aesthesiometry test. Mice with arthritis had increased thermal hypersensitivity in acute (C) and chronic (D) inflammatory conditions to noxious heat stimuli when tested with the hot plate test. CFA-treated animals developed sustained inflammatory edema both in acute (E) and chronic (F) conditions. Dynamic body weight distribution was also altered. Animals displayed bodyweight imbalance and reduced their bodyweight on the inflamed hind limbs during the acute phase (G), but this bodyweight imbalance was reversed on Day 21 in the Chronic CFA-treated animals (H). Y-axis of (A,B): mechanonociceptive withdrawal threshold. Y-axis of (C,D): latency of nocifensive reaction. Statistical analysis for A-F: two-way repeated measures ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Sidak's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ versus control values at the same time point. Statistical analysis for G-H: two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's post hoc test. Abbreviations: baseline (BL); complete Freund's adjuvant (CFA); day(s) (d and D). Red colored lines in B, D and F indicate the CFA-treated animals similarly to A, C, and E.

3.2. CFA-Treatment Induced Local Inflammation in the Hind Limbs

An inflammation-related increase in the production of reactive oxygen species was detected by bioluminescence imaging (Figure 3A,C). In the acute phase, we found a pronounced increase in the bioluminescent signal, which was substantially attenuated in the chronic phase. Nevertheless, the signal was still significantly elevated in the chronic phase (Figure 3B,D). Statistical analysis of the imaging data is described in Supplementary Tables S6–S9. These findings corroborate that the CFA-injected mice had sustained inflammatory arthritis.

3.3. Complete Blood Cell Counts Revealed Specific Cellular Changes of White Blood Cells

Erythrocyte and leukocyte cell counts were not altered (Figure 4A,B), but platelet numbers decreased in the Chronic CFA-treated animals compared to the acute phase ($t = 4.66$, $p < 0.05$, Figure 4C). In the case of lymphocytes, a two-way ANOVA analysis revealed significant interaction between CFA-treatment and time (absolute numbers: $F(1, 22) = 5.917$, $p < 0.05$; percentage: $F(1, 22) = 4.744$, $p < 0.05$). Similarly, we detected a significant interaction between CFA-treatment and time for the neutrophil granulocyte ratios (percentage: $F(1, 22) = 9.147$, $p < 0.01$). We also found an increased neutrophil granulocyte ratio in the Acute CFA-treated animals (compared to the Acute Controls, $t = 3.93$, $p < 0.05$, Figure 4E).

In the case of monocytes, a two-way ANOVA revealed a significant time effect for monocyte percentage ($F(1, 22) = 4.471$, $p < 0.05$) as well as significant interaction between CFA-treatment and time (absolute numbers: $F(1, 22) = 7.933$, $p < 0.01$; percentage: $F(1, 22) = 7.752$, $p = 0.01$). CFA treatment increased monocyte cell numbers as well as monocyte percentage of the Chronic CFA-treated animals compared to the Acute CFA group (absolute numbers: $t = 4.385$, $p < 0.05$; percentage: $t = 4.89$, $p = 0.01$, Figure 4F).

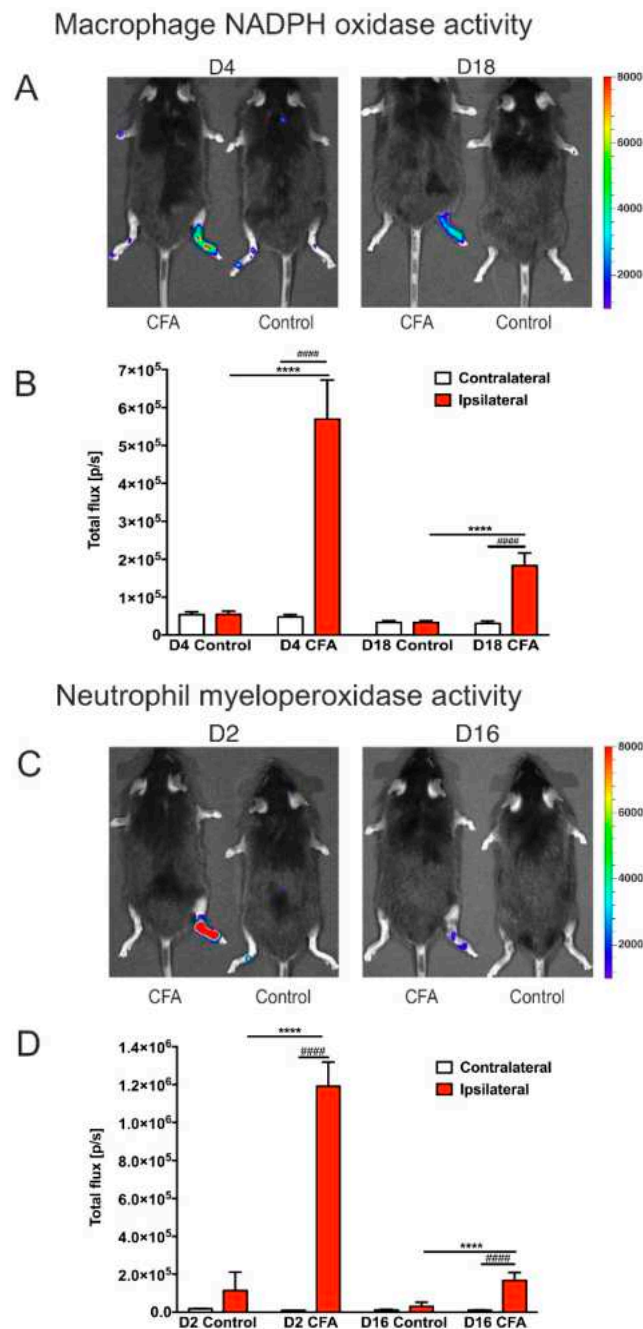


Figure 3. In vivo bioluminescence imaging demonstrating local inflammation, i.e., the presence of reactive oxygen species generated by the inflammatory phagocytes. **(A)** Images of CFA-injected and control mice. This method detects the macrophage NADPH oxidase activity after injection of lucigenin into the animals. Lucigenin reacts with the macrophage NADPH oxidases and gives a bioluminescence signal. Note the bioluminescence signals of the right hind limbs. **(B)** Quantitative data of the bioluminescent signals. **(C)** Bioluminescence signals were evoked by the injection of luminol, which reacts with the myeloperoxidase enzymes of the neutrophil granulocytes. **(D)** Quantitative data of the bioluminescence signals. The bioluminescence signal was significantly increased both in the acute and chronic phases of the inflammation. Statistical analysis: two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. **** $p < 0.0001$ versus the ipsilateral hind limbs of the control mice at the same time points. ##### $p < 0.0001$ versus the contralateral hind limbs of the CFA-injected animals at the same time points. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); day (D).

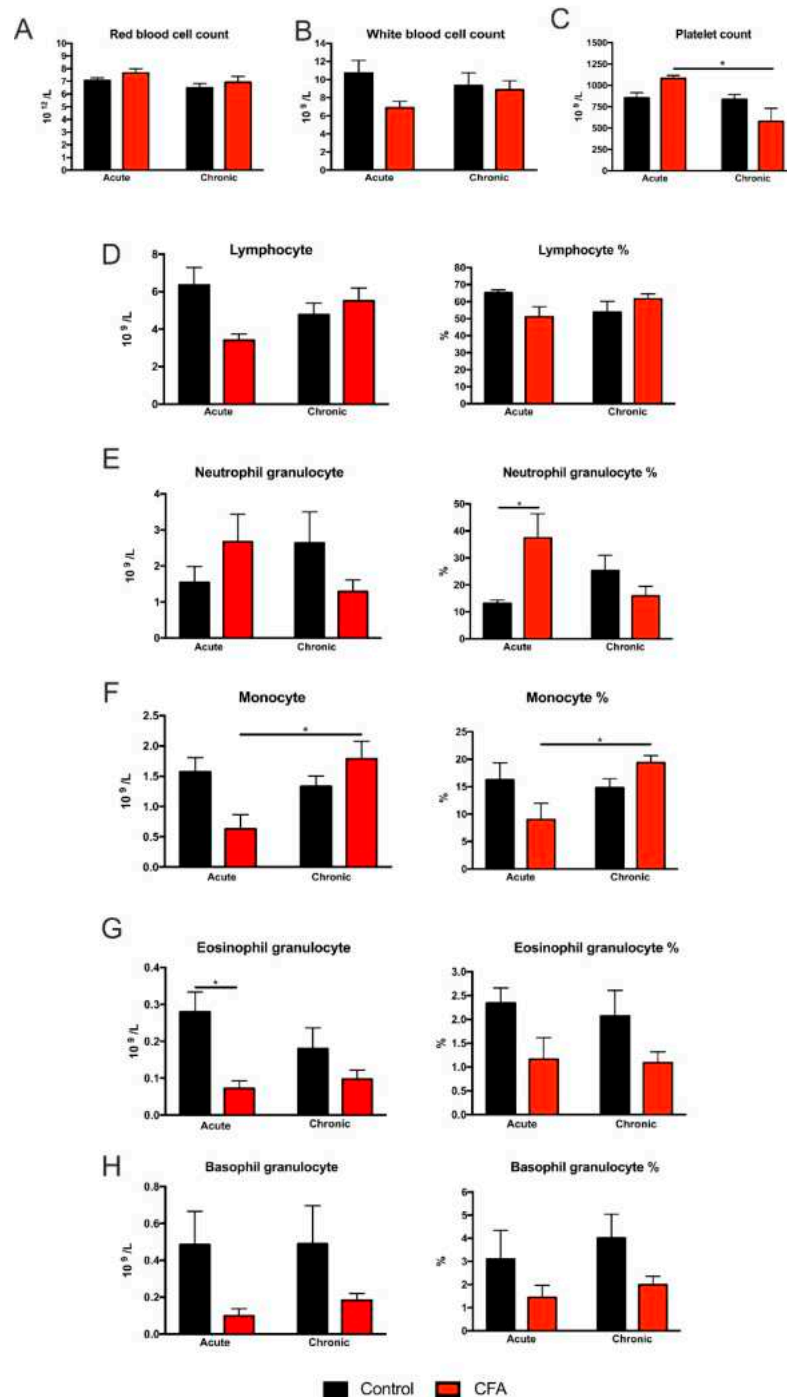


Figure 4. Inflammatory arthritis altered specific parameters of the complete blood cell count. Erythrocyte (A) and leukocyte cell numbers (B) were not influenced by the CFA treatment, but platelet numbers decreased in the Chronic CFA-treated animals compared to the acute phase (C). Lymphocyte cell numbers and percentage were not altered (D), but we found a significant increase in the neutrophil granulocyte ratio of the Acute CFA-treated animals (E). We also found a significant difference in monocyte cell numbers and the percentage between the Acute and Chronic CFA-treated animals (F). The total number of eosinophil granulocytes was reduced in the acute CFA-treated animals (G). Two-way ANOVA revealed a significant main effect of CFA-treatment on eosinophil and basophil granulocyte numbers and ratios (G,H). Statistical analysis: two-way ANOVA (time × CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); percentage (%).

CFA-treatment had a significant effect on eosinophil and basophil granulocytes. Two-way ANOVA revealed significant main treatment effects for eosinophils (absolute numbers: $F(1, 22) = 9.569$, $p < 0.01$; percentage: $F(1, 22) = 6.195$, $p < 0.05$) and also for basophils (absolute number: $F(1, 22) = 4.783$, $p < 0.05$; percentage: $F(1, 22) = 6.883$, $p < 0.05$) (Figure 4G,H). Furthermore, we found that the absolute number of eosinophil granulocytes significantly decreased in the Acute CFA-treated animals compared to the controls ($t = 4.168$, $p < 0.05$). For the detailed statistical analysis of the blood cell count data, please see Supplementary Tables S10–S22.

In sum, the increased percentage of neutrophil granulocytes in the Acute CFA group implies a systemic acute inflammatory reaction.

3.4. Chronic CFA-Induced Arthritis Inhibits Adult Neurogenesis in the Hippocampal Dentate Gyrus

Dentate cell proliferation was studied with quantitative anti-BrdU-immunohistochemistry. Acute inflammation had no influence on dentate cytogenesis, but, in the chronic inflammation group, we found a significantly lower number of newborn cells than in the acute phase (Figure 5). Two-way ANOVA (time \times CFA treatment) revealed a highly significant time effect ($F(1, 30) = 17.91$, $p < 0.001$) but no effect of CFA-treatment. Post-hoc Tukey's test revealed that Chronic CFA-treated mice had significantly reduced cell proliferation compared to the Acute CFA-treated group ($t = 5.28$, $p < 0.01$). This reduction of BrdU+ cell numbers in the Chronic CFA group was most likely the combined effect of age and CFA treatment, since there was no significant difference between the Acute Control and Chronic Control groups, which suggests that the difference between the Acute CFA and Chronic CFA groups is not simply an ageing effect. However, the number of BrdU+ cells were not different in the Chronic Control and Chronic CFA-treated groups. For the detailed statistical analysis, see Supplementary Table S23.

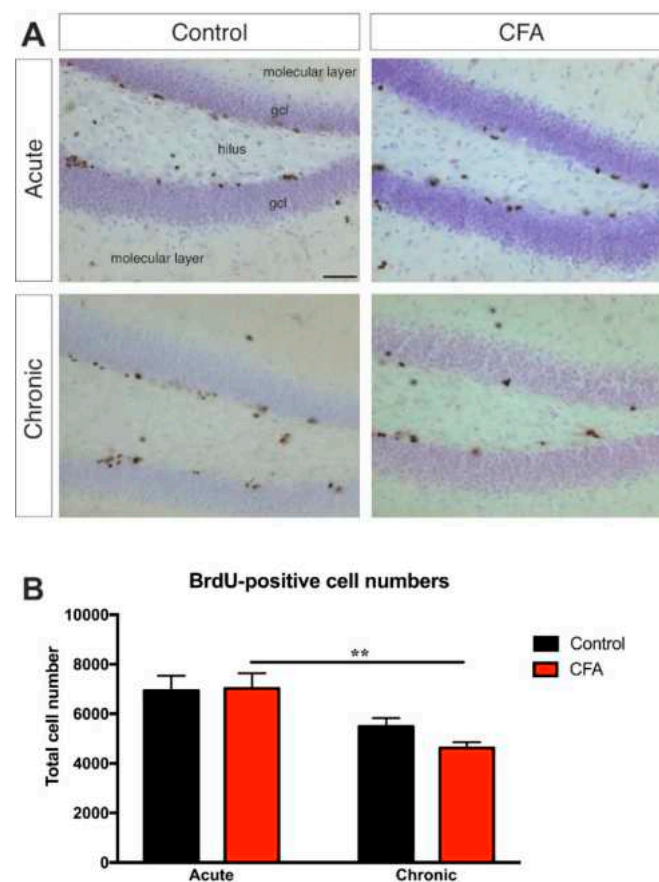


Figure 5. The effect of chronic arthritis on cell proliferation in the dentate gyrus. (A) Representative images demonstrating BrdU-immunopositive cells in the dentate gyrus of control and CFA-treated mice.

Scale bar: 50 μm for all images. (B) Results of the systematic cell quantification data. Graphs represent the total number of BrdU-positive cells in both hemispheres combined. Animals in the chronic CFA treatment group had significantly reduced dentate cell proliferation compared to the acute CFA-treated group. Two-way ANOVA (time \times CFA treatment) revealed a highly significant time effect but no effect of CFA-treatment, and the results of the post-hoc Tukey's test is shown on the graph: ** $p < 0.01$. Abbreviations: 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU); complete Freund's adjuvant (CFA); granule cell layer (gcl).

The number of newborn immature neurons was investigated with quantitative anti-doublecortin-immunohistochemistry. DCX is a widely used immuno-marker for immature neurons [52]. It is expressed just a few hours after neurogenesis, and the peak of its expression level is reached between Days 4–7 after neuronal birth [51]. Chronic arthritis reduced the number of doublecortin-positive cells in the hippocampus of the Chronic CFA animals (Figure 6). Acute inflammation had only a tendency to reduce dentate neurogenesis, but, in the chronic inflammation group, we found a significantly lower number of newborn granule cells. Two-way ANOVA (time \times CFA treatment) revealed a significant CFA treatment effect ($F(1, 30) = 17.89, p < 0.001$) as well as a significant time effect ($F(1, 30) = 13.82, p < 0.001$). Post-hoc comparison with Tukey's test revealed that Chronic CFA-treated mice had significantly reduced doublecortin-positive cells compared to the Chronic Control ($t = 5.47, p < 0.01$) and Acute CFA-treated groups ($t = 4.79, p = 0.01$). This reduction of doublecortin+ cell numbers of the Chronic CFA group demonstrates the inhibitory effect of chronic arthritis on adult hippocampal neurogenesis. For the detailed statistical analysis of the doublecortin+ cell number data, see Supplementary Table S24.

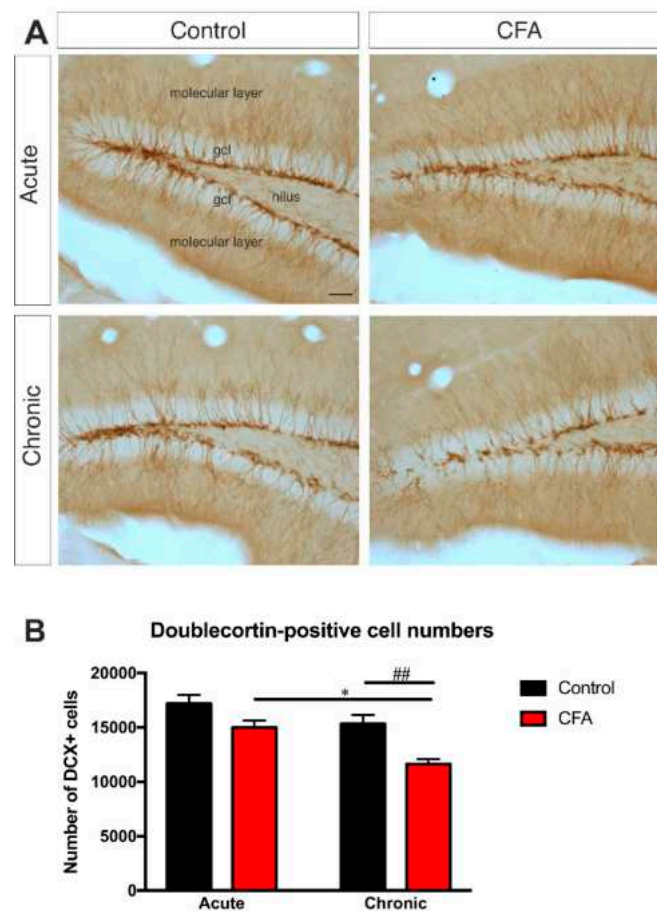


Figure 6. Chronic inflammatory arthritis inhibits adult neurogenesis in the dentate gyrus. (A) Representative images demonstrating doublecortin-immunopositive immature neurons in the dentate gyrus of control

and CFA-treated mice. Scale bar: 50 μm for all images. **(B)** Results of the systematic cell quantification data. Graphs represent the total number of doublecortin-positive cells in the dentate gyrus of both hemispheres combined. Animals in the CFA-induced chronic arthritis group had a significantly reduced number of DCX-positive cell numbers. Statistics: two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$ versus the Acute CFA-treated group; ## $p < 0.01$ versus the Chronic Control group. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); doublecortin (DCX); granule cell layer (gcl).

3.5. Peripheral Inflammation Activated Macrophages and Microglia in the Dentate Gyrus

Since activated microglia are prime cellular candidates for regulating adult hippocampal neurogenesis [15,22,24,59,60], we therefore also quantified the number of Iba1-positive microglia in the dentate gyrus. We did not find any treatment effect on Iba1+ microglial cell numbers (Figure 7, the detailed statistical analysis is shown in Supplementary Table S25).

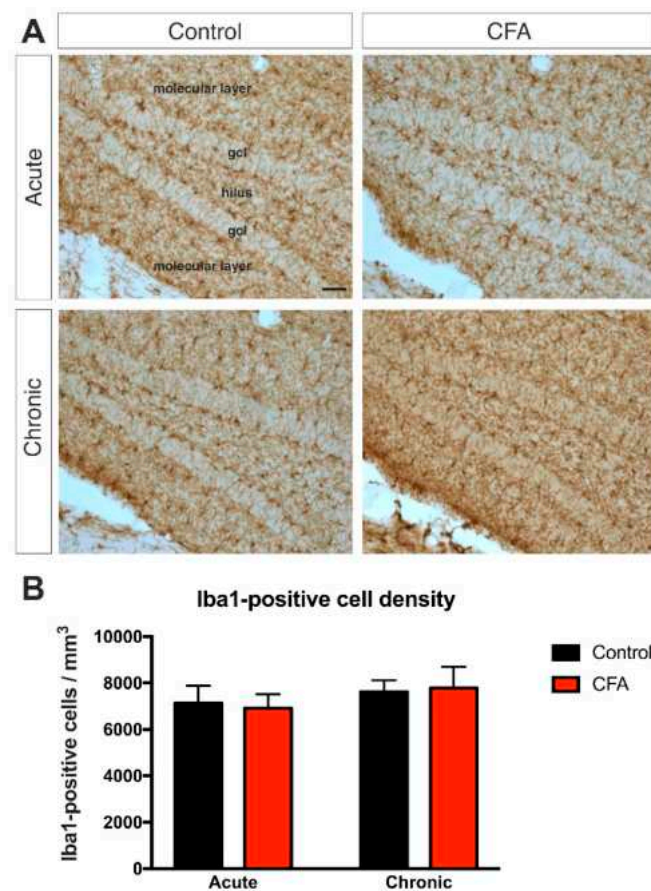


Figure 7. Inflammatory arthritis had no effect on the number of Iba1-immunopositive microglia in the dentate gyrus. **(A)** Representative images demonstrating Iba1-immunopositive microglia in the dentate gyrus of control and CFA-treated mice. Scale bar: 50 μm for all images. **(B)** Results of the systematic cell quantification data. Graphs represent the density of Iba1-positive cells (Iba1+ cell number/ mm^3) Statistics: two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); granule cell layer (gcl); ionized calcium binding adaptor molecule-1 (Iba1).

We also carried out an immunostaining to visualize CD68-positive cells in the dentate gyrus. CD68 is a glycoprotein that is mainly located in the endosomal/lysosomal compartment and strongly expressed in macrophages and other mononuclear phagocytes [61]. Therefore, it is typically used as a cytochemical marker to visualize monocyte/macrophages in the histochemical analysis of inflamed tissues. In contrast to the Iba1 data, we found a

significantly increased density of the CD68-positive cells in the dentate gyrus (Figure 8). Two-way ANOVA (time \times CFA treatment) revealed a significant time effect ($F(1, 23) = 8.397$, $p < 0.01$), as well as a highly significant CFA-treatment effect ($F(1, 23) = 39.68$, $p < 0.0001$), but no interaction. Post-hoc Tukey's test revealed that, in the Acute CFA-treated mice, CD68+ cell density was significantly increased compared to the Acute Control group ($t = 7.83$, $p < 0.0001$). Similarly, CD68+ cell numbers were significantly increased in the Chronic CFA group compared to the Chronic Control group ($t = 4.72$, $p < 0.05$) (Figure 8B). For the detailed statistical analysis, see Supplementary Table S26.

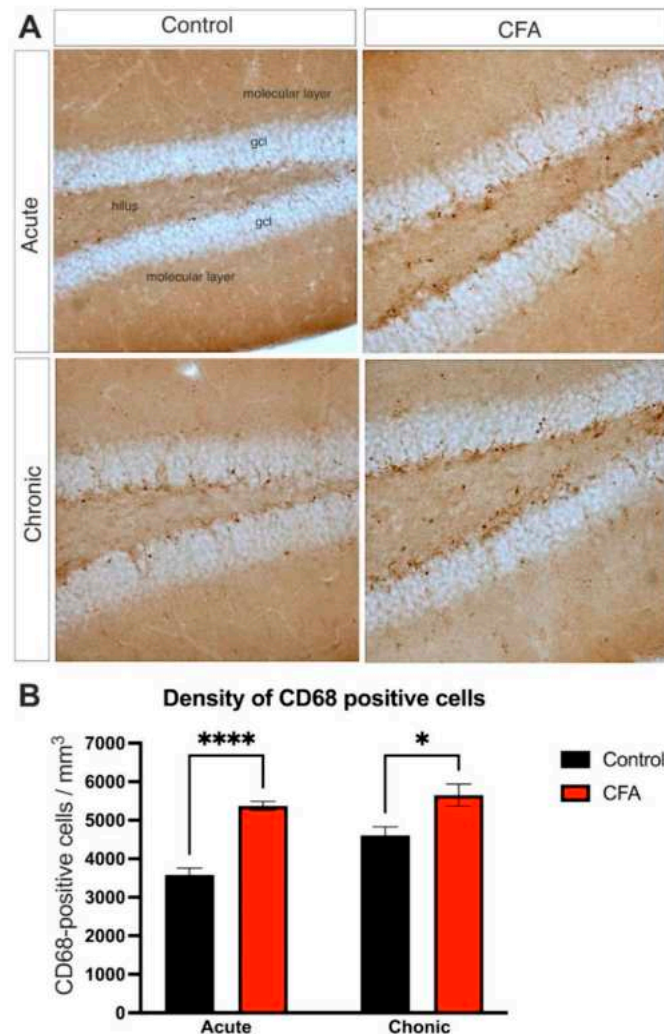


Figure 8. Inflammatory arthritis increased the number of CD68-immunopositive macrophages/activated microglia in the dentate gyrus. (A): Representative images demonstrating CD68+ microglia and macrophages in the dentate gyrus of control and CFA-treated mice. Magnification 20 \times for all images. (B): Results of the cell quantification data. Graphs represent the density of CD68-positive cells (CD68+ cell number/mm³). Statistics: two-way ANOVA (time \times CFA treatment) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); granule cell layer (gcl). * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ versus control values at the same time point.

3.6. CFA-Treatment Increased Inflammatory Cytokine Levels in the Inflamed Hind Paws, but Had Little or No Effect in the Peripheral Blood and Hippocampus

In the hind limbs, acute CFA treatment increased the cytokine concentrations of IL-4, IL-6, KC, MIP-2 and TNF- α , whereas the IL-1 α levels decreased. In the chronic inflammation phase, only the TNF- α and KC levels remained elevated (Figures 9 and 10). Similarly, both acute and chronic inflammation induced a pronounced increase in the total

protein concentrations in the hind paws (Figure 10D). In the peripheral blood samples, most of the measured cytokine levels were not altered in the CFA-treated animals, with the exception of an increase in the IL-6 concentration in the acute CFA-treated group (Figure 9C). In the hippocampus, cytokine levels were not altered by the CFA treatment (Figures 9 and 10). Although we found significant differences in the cytokine levels of IL-1 α , KC, MIP-2 and protein concentrations between the acute and chronic CFA-treated animals, when comparing the cytokine levels in the hippocampus between the CFA-treated mice and their corresponding controls, we could not detect any statistically significant difference (Figures 9 and 10). For the detailed statistical analysis, see Supplementary Tables S27–S48.

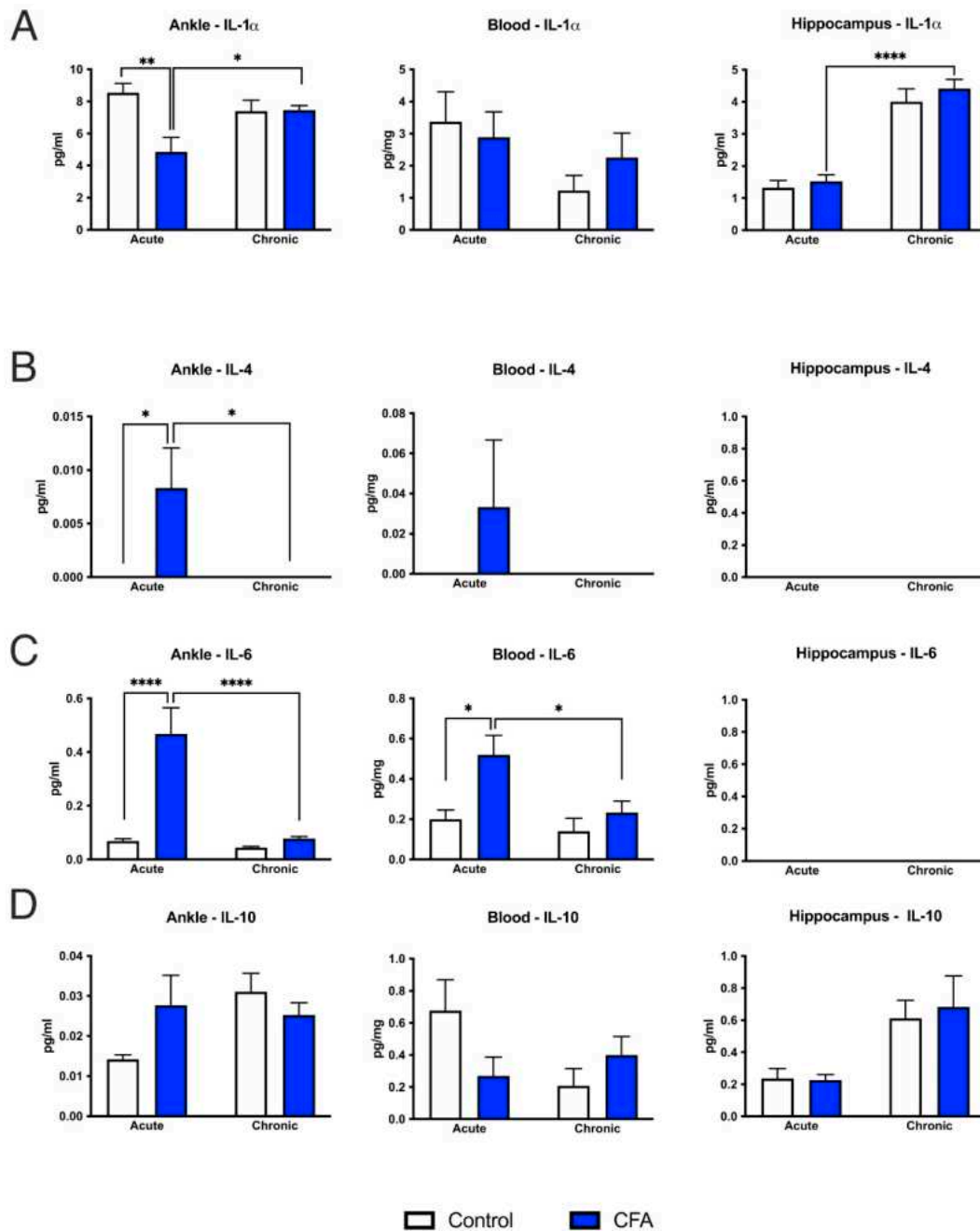


Figure 9. Cytokine/chemokine concentrations in the CFA-treated hind paws, peripheral blood and hippocampus. (A–C) In the hind paws, acute inflammation increased IL-4 and IL-6 concentrations

and decreased IL-1 α levels. (C) In the peripheral blood, only IL-6 levels increased in response to acute inflammation. In the hippocampus, CFA treatment did not alter any cytokine levels compared to the corresponding control groups. (D) IL-10 concentrations were not altered in any tissue by the CFA-treatment. On some graphs, there are no bars, which means that those cytokine concentrations were below the detection levels. Statistics: two-way ANOVA (CFA treatment \times time) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); interleukin-1-alpha (IL-1 α); interleukin-4 (IL-4); interleukin-6 (IL-6); interleukin-10 (IL-10).

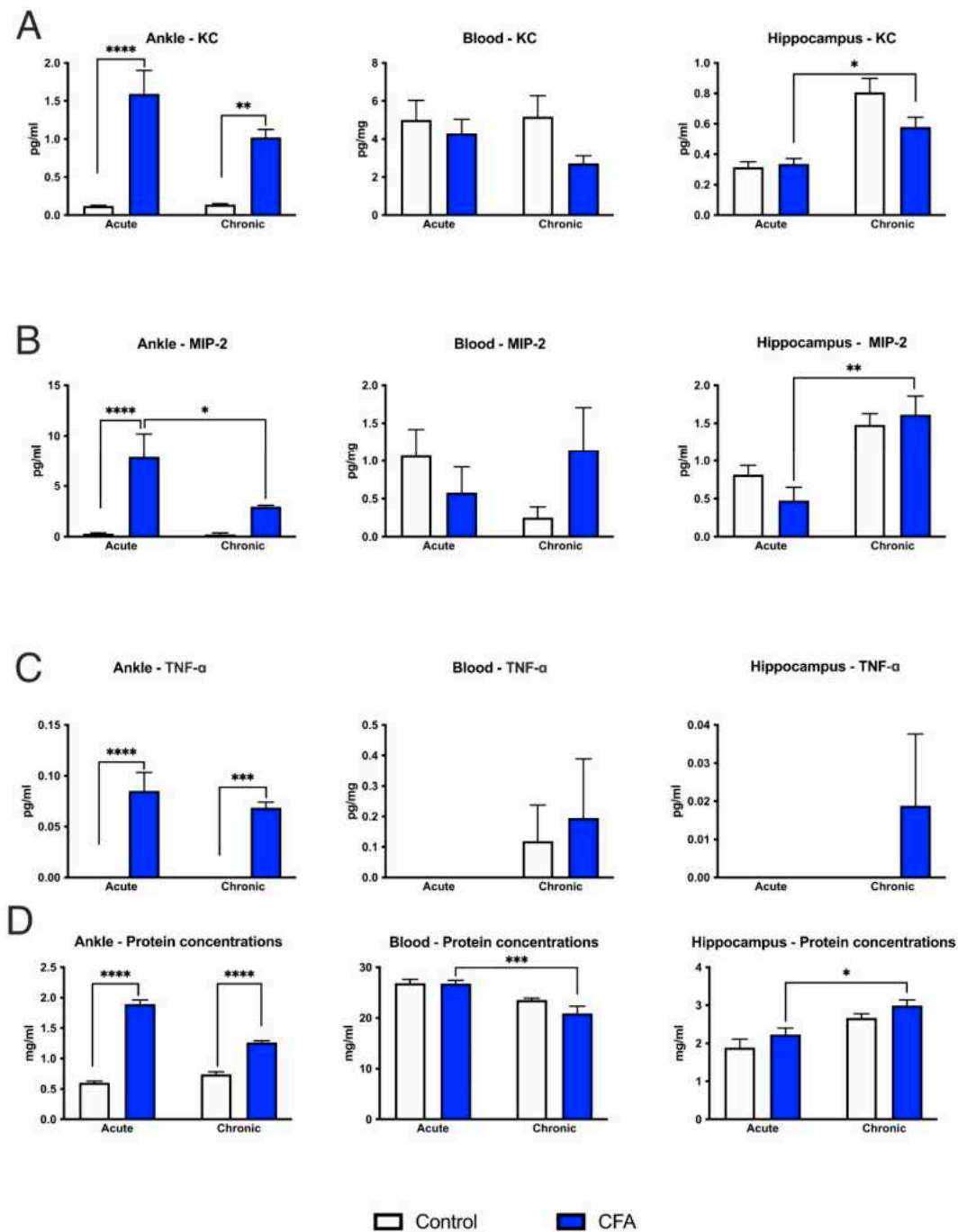


Figure 10. Cytokine/chemokine and total protein concentrations in the CFA-treated hind paws, peripheral blood and hippocampus. (A–C) In the hind paws, acute inflammation increased cytokine

concentrations of KC, MIP-2 and TNF- α , whereas chronic arthritis increased KC and TNF- α levels. In the peripheral blood, we found no change in these cytokine levels. In the hippocampus, CFA treatment did not alter any cytokine levels compared to the corresponding control groups. (D) Both acute and chronic inflammation increased total protein concentrations in the joints, and a similar trend was present in the hippocampus. On some graphs, there are no bars, which means that those cytokine concentrations were below the detection levels. Statistics: two-way ANOVA (CFA treatment \times time) followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. Abbreviations: complete Freund's adjuvant (CFA); keratinocyte-derived chemokine (KC); macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2); tumor necrosis factor alpha (TNF- α).

4. Discussion

Here, we report that chronic CFA-induced arthritis can inhibit neurogenesis in the adult hippocampus. Adult neurogenesis is a complex, multistep process, which involves cell proliferation, cell differentiation and maturation, as well as the integration of newborn neurons into the pre-existing circuit [62]. In the present experiment, cell proliferation (i.e., the number of BrdU+ cells) was not influenced by the peripheral inflammation, and the survival of newborn neurons (i.e., the number of DCX cells) was reduced in the CFA-treated animals. In other words, the CFA-induced changes in neurogenesis occurred during the early maturation phase of the newborn neurons, rather than during the proliferation phase.

In our CFA-induced experimental arthritis model, we found clear molecular, cellular and behavioral evidence of the acute and chronic peripheral inflammation in the hind paws. In the acute inflammatory phase, the blood cell count data suggested a more generalized, systemic inflammatory reaction, but this was not reflected in the cytokine/chemokine levels of the peripheral blood, except for IL-6, which increased. In the chronic phase, we found no evidence of a systemic inflammatory reaction in blood cell numbers or serum cytokine/chemokine concentrations. In the hippocampus, we found no change in the cytokine/chemokine levels, and the Iba1-positive microglia numbers also remained unaltered both in the acute and chronic inflammatory phase. However, we found a significantly increased density of the CD68-positive macrophages/activated microglia in the dentate gyrus of the CFA-treated mice, both in the acute and chronic inflammatory phases. Overall, these data suggest that acute peripheral inflammation initiates a cascade of molecular and cellular changes that eventually leads to reduced adult neurogenesis in the dentate gyrus since essentially all of the inflammatory reactions that we could detect in the blood were present only in the early phase of inflammation.

Previous studies reported controversial findings regarding the effect of peripheral inflammation on adult hippocampal neurogenesis. Data from experimental colitis models documented either inhibition of adult neurogenesis [30,31] or normal levels with deficits in the migration and integration of newborn neurons in the functional circuitry of the dentate gyrus [32], whereas experimental arthritis models reported either a transient increase in hippocampal precursor cell proliferation and neurogenesis [33] or no effect [34].

It is increasingly acknowledged that chronic systemic inflammations can contribute to the development and worsening of mental disorders, including depression and neurodegeneration [63–66]. One explanatory concept is that the systemic pro-inflammatory cytokines/chemokines can cause a breach in the blood brain-barrier and thereby enable the entry of immune cells and pro-inflammatory cytokines/chemokines into the brain. These peripheral-derived factors, together with the intrinsically generated cytokines/chemokines, can activate glial cells, which in turn trigger additional release of inflammatory and neurotoxic molecules that contribute to the development of neuroinflammation and neurodegeneration [66]. Indeed, a recent study reported that animals with chronic colitis had a parallel increase in the cytokine levels of TNF-alpha, IL-1-beta, IL-6 and IL-10 in their blood and hippocampus [32].

In our CFA-induced arthritis model, we found clear evidence of acute and chronic peripheral inflammation. We documented local inflammation with bioluminescence imaging, and arthritis-related hypersensitivity to painful stimuli was revealed by the behavioral tests.

Results of the complete blood cell counts also indicated inflammation at the periphery. Our hypothesis was that inflammatory arthritis should induce a parallel increase in cytokine levels in the joints, peripheral blood and the hippocampus, as well, but we could not confirm that. However, we did find a pronounced elevation of protein concentrations in the inflamed joints, and a similar trend was present in the hippocampus of the CFA-treated animals. Most likely, this increase in total protein concentrations was due to the elevated production of inflammatory mediators.

We focused on specific cytokines (IL-1 α , IL-4, IL-6, IL10, TNF- α , KC, MIP-2) since previous studies documented that these inflammatory mediators can influence neurogenesis in adult dentate gyrus. The IL-1 family is a potent group of pro-inflammatory cytokines, and elevated brain IL-1 levels can suppress adult neurogenesis [16,67–70]. IL-4 is an anti-inflammatory cytokine that can activate microglia and regulates the M1/M2 polarization of microglial cells [71,72]. Via these cellular effects, it can also eventually influence the production of neurons [73]. IL-6 is a pro-inflammatory cytokine produced at the site of inflammation and plays a central role in the acute phase response. It is a major cytokine in the central nervous system [74] and a potent suppressor of neurogenesis [14,15]. IL-10 plays a complex role in the regulation of the immune response, but it is typically regarded as an anti-inflammatory cytokine. It regulates neurogenesis in a complex manner. It maintains neural progenitors in an undifferentiated state by keeping the progenitors in an active cycle, reducing neuronal differentiation, and, ultimately, it seems to inhibit the endogenous production of newborn neurons [75]. TNF- α is another potent pro-inflammatory cytokine, typically increased in the acute phase of inflammation, and it plays a central role in initiating the cascade of other cytokines. Numerous studies investigated the effect of TNF- α on neurogenesis, most data document inhibition [76–78], while some report on a pro-neurogenic effect [79,80]. Furthermore, peripherally induced inflammation promotes the transient activation of adult neural stem cells, and TNF- α seems to mediate this effect [81]. MIP-2 and KC are members of the platelet-factor 4 cytokine superfamily, and they both play a key role in the local inflammatory reaction as well as in the chemotaxis and infiltration of polymorphonuclear leukocytes [82,83]. To the best of our knowledge, their role in adult neurogenesis has not yet been investigated.

A major limitation of our study is that it was a cross-sectional design with only two time points. Therefore, we cannot rule out the possibility that a more pronounced neuroinflammation response was present at earlier time points. Other molecular and/or cellular inflammatory factors—which were not studied here—may also play a significant role in the inhibitory effect of chronic arthritis on adult neurogenesis. Another possibility is that the reduced rate of adult neurogenesis was modulated by nociceptive input from the hind limb to the contralateral hemisphere. In this case, one would expect a unilateral change, i.e., decreased neurogenesis in the contralateral hippocampus. Since our original hypothesis was that circulating cytokines/chemokines should mediate the inhibitory effect of peripheral inflammation, we therefore did not focus on potential hemispheric asymmetries in adult hippocampal neurogenesis. Circulating signal mediators are unlikely to induce a unilateral effect. An important argument against the regulatory effect of direct sensory pain signal transduction is that the earlier studies, which used unilateral pain models, could not find any hemispheric differences in the rate of adult neurogenesis [36,37,84,85]. This again suggests that circulating signals mediate the inhibitory effect.

The presence and functional significance of adult neurogenesis in the human hippocampus are controversial and extensively debated issues [2,86–89]. Disturbed production of newborn neurons has been implicated in a large variety of mental and neurological disorders [13,90,91]. Microglial cells have been pointed out as potent local regulators of neurogenesis [22,92,93], but their exact regulatory role depends on numerous factors. Acutely activated microglia have different effects from chronically activated cells, and they can be further divided into different subpopulations based on their functional phenotype. Therefore, different microglial cells may even exert opposite effects (supportive or detrimental) on adult neurogenesis, and they act on the different stages of neurogenesis,

i.e., cell formation, maturation and functional integration of the newborn neurons [22,94]. Notably, a very recent systematic review concluded that the microglial changes induced by environmental stress seem to regulate neurogenesis and, in turn, may be responsible for the development of depressive-like behaviors, but the available data are not entirely conclusive, and other factors should not be dismissed [60]. Previous studies found an increased number and hypertrophy of activated microglia, as well as increased expression of the Iba1-protein in the hippocampi of mice with DSS-induced colitis [30,31]. Intraperitoneal administration of LPS can also activate hippocampal microglia [29]. Here, we found an increased density of the CD68+ macrophages/activated microglia in the hippocampus, but we did not see any change in the Iba1+ microglial density after the CFA treatment. CD68 is a glycoprotein that is mainly located in the endosomal/lysosomal compartment and strongly expressed in macrophages and other mononuclear phagocytes. Therefore, it is typically used as a cytochemical marker for visualization of monocyte/macrophages in the histochemical analysis of inflamed tissues [61]. However, in some studies, it is used as a marker for activated microglia [95]. Results of comparative studies suggest that the different microglial markers have different potential for neuropathological analysis, i.e., CD68-positivity reflects immune activation and response to tissue damage, whereas Iba1 is a marker that is more suited for structural studies in the absence of pathology [96]. Yet another study documented that the CD68+ small, round cells in the damaged brain tissue express specific cellular markers, indicating that these cells are in fact not activated microglia but neutrophils [97]. Interestingly, post-mortem clinical studies also report on increased number of CD68+ cells in the hippocampi and neocortices of patients who died in septic shock [98,99].

5. Conclusions

Here, we report that chronic, but not acute, arthritis can inhibit adult hippocampal neurogenesis. Since almost all the inflammatory reactions in the circulating blood were found in the early phase of the inflammation, our present data therefore suggest that the key regulatory mechanisms are in fact triggered during the early inflammatory phase when a cascade of molecular and cellular events are initiated, which will eventually lead to reduced adult hippocampal neurogenesis. However, this negative impact on the hippocampus is detectable only several weeks later during the chronic inflammatory phase.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11050791/s1>, Supplementary Table S1: Statistical analysis of data generated with the dynamic plantar aesthesiometry test. Table S2: Statistical analysis of data generated using the hot plate test. Table S3: Statistical analysis of data generated by measuring hind paw volumes of the animals. Table S4: Statistical analysis of data obtained by measuring spontaneous bodyweight distribution of the acute CFA treated animals. Table S5: Statistical analysis of data obtained by measuring spontaneous bodyweight distribution of the chronic CFA treated animals. Table S6: Statistical analysis of the in vivo bioluminescent data detecting macrophage NADPH oxidase activity in the animals with acute CFA treatment. Table S7: Statistical analysis of the in vivo bioluminescent data detecting macrophage NADPH oxidase activity in the animals with chronic CFA treatment. Table S8: Statistical analysis of the in vivo bioluminescent data detecting the myeloperoxidase enzyme activity of neutrophil granulocytes in the animals of the acute inflammatory phase. Table S9: Statistical analysis of the in vivo bioluminescent data detecting the myeloperoxidase enzyme activity of neutrophil granulocytes in the animals of the chronic inflammatory phase. Table S10: Statistical analysis of the red blood cell count data. Table S11: Statistical analysis of the white blood cell count data. Table S12: Statistical analysis of the platelet count data. Table S13: Statistical analysis of the lymphocyte absolute number data. Table S14: Statistical analysis of the lymphocyte percentage data. Table S15: Statistical analysis of the neutrophil granulocyte absolute number data. Table S16: Statistical analysis of the neutrophil granulocyte percentage data. Table S17: Statistical analysis of the monocyte absolute number data. Table S18: Statistical analysis of the monocyte percentage data. Table S19: Statistical analysis of the eosinophil granulocyte absolute number data. Table S20: Statistical analysis of the eosinophil granulocyte percentage data. Table S21: Statistical analysis

of the basophil granulocyte absolute number data. Table S22: Statistical analysis of the basophil granulocyte percentage data. Table S23: Statistical analysis of the BrdU-positive cell number data. Table S24: Statistical analysis of the doublecortin-positive cell number data. Table S25: Statistical analysis of the Iba1-positive cell number data. Table S26: Statistical analysis of the CD68-positive microglia / macrophages cell number data. Table S27: Statistical analysis of the IL-1 α cytokine concentration data in the hind paws. Table S28: Statistical analysis of the IL-1 α cytokine concentration data in the peripheral blood. Table S29: Statistical analysis of the IL-1 α cytokine concentration data in the hippocampus. Table S30: Statistical analysis of the IL-4 cytokine concentration data in the hind paw. Table S31: Statistical analysis of the IL-4 cytokine concentration data in the peripheral blood. Table S32: Statistical analysis of the IL-6 cytokine concentration data in the hind paws. Table S33: Statistical analysis of the IL-6 cytokine concentration data in the peripheral blood. Table S34: Statistical analysis of the IL-10 cytokine concentration data in the hind paws. Table S35: Statistical analysis of the IL-10 cytokine concentration data in the peripheral blood. Table S36: Statistical analysis of the IL-10 cytokine concentration data in the hippocampus. Table S37: Statistical analysis of the KC concentration data in the hind paws. Table S38: Statistical analysis of the KC concentration data in the peripheral blood. Table S39: Statistical analysis of the KC concentration data in the hippocampus. Table S40: Statistical analysis of the MIP-2 concentration data in the hind paws. Table S41: Statistical analysis of the MIP-2 concentration data in the peripheral blood. Table S42: Statistical analysis of the MIP-2 concentration data in the hippocampus. Table S43: Statistical analysis of the TNF- α concentration data in the hind paws. Table S44: Statistical analysis of the TNF- α concentration data in the peripheral blood. Table S45: Statistical analysis of the TNF- α concentration data in the hippocampus. Table S46: Statistical analysis of the protein concentration data in the hind paws. Table S47: Statistical analysis of the protein concentration data in the peripheral blood. Table S48: Statistical analysis of the protein concentration data in the hippocampus.

Author Contributions: K.R.: methodology, investigation, formal analysis, visualization, writing—original draft; Á.I.H.: methodology, investigation, formal analysis, writing—original draft; Á.K.: methodology, investigation, formal analysis, writing—original draft; G.K.: methodology, investigation, formal analysis; K.P.-T.: methodology, investigation, formal analysis; A.F.: methodology, investigation; Z.H.: conceptualization, supervision, funding acquisition; and B.C.: conceptualization, methodology, resources, writing—original draft, writing—review and editing, project administration, funding acquisition, supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by the following grant agencies: Hungarian Brain Research Program (2017-1.2.1-NKP-2017-00002), the European Social Fund EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, “Comprehensive Development for Implementing Smart Specialization Strategies at the University of Pécs” and by the TKP2021-EGA-16 project. Project TKP2021-EGA-16 has been implemented with the support provided from the National Research, Development and Innovation Fund of Hungary, financed under the TKP2021-EGA funding scheme. Á.K. received further support from the János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and according to European legislation (Directive 2010/63/EU) and Hungarian Government regulation (40/2013., II. 14.) regarding the protection of animals used for scientific purposes. The experiments were approved by the Animal Welfare Committee of the University of Pécs and the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary and licensed by the Government Office of Baranya County (License Nr.: BA02/2000-28/2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy concerns.

Acknowledgments: We are grateful for the technical support of the *Animal Imaging and Histology and Light Microscopy* Core Facilities of the Szentágotthai Research Centre of the University of Pécs. The authors would like to thank Krisztina Vudi-Garai and Tamás Kiss for their technical assistance during the histological and in vivo imaging procedures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; nor in the writing of the manuscript or the decision to publish the results.

Abbreviations

ADWB: advanced dynamic weight bearing; BL: baseline; BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine; CFA: complete Freund's adjuvant; DCX: doublecortin; DPA: dynamic plantar aesthesiometry; DSS: dextran sulfate sodium; gcl: granule cell layer; Iba1: ionized calcium binding adaptor molecule-1; IL-1 α : interleukin-1-alpha; IL-4: interleukin-4; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; KC: keratinocyte-derived chemokine; LPS: lipopolysaccharide; MIP-2: macrophage inflammatory protein-2; MPO: myeloperoxidase; Phox: macrophage NADPH oxidase; TNF- α : tumor necrosis factor alpha.

References

- Boldrini, M.; Fulmore, C.A.; Tartt, A.N.; Simeon, L.R.; Pavlova, I.; Puposka, V.; Rosoklija, G.B.; Stankov, A.; Arango, V.; Dwork, A.J.; et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 589–599.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spalding, K.L.; Bergmann, O.; Alkass, K.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Huttner, H.B.; Boström, E.; Westerlund, I.; Vial, C.; Buchholz, B.A.; et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* **2013**, *153*, 1219–1227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gould, E.; Reeves, A.J.; Fallah, M.; Tanapat, P.; Gross, C.G.; Fuchs, E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5263–5267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kornack, D.R.; Rakic, P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5768–5773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kuhn, H.G.; Dickinson-Anson, H.; Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 2027–2033. [[CrossRef](#)]
- Kempermann, G.; Gast, D.; Kronenberg, G.; Yamaguchi, M.; Gage, F.H. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* **2003**, *130*, 391–399. [[CrossRef](#)]
- Jessberger, S.; Clark, R.E.; Broadbent, N.J.; Clemenson, G.D., Jr.; Consiglio, A.; Lie, D.C.; Squire, L.R.; Gage, F.H. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn. Mem.* **2009**, *16*, 147–154. [[CrossRef](#)]
- Aimone, J.B.; Deng, W.; Gage, F.H. Adult neurogenesis: Integrating theories and separating functions. *Trends Cogn. Sci.* **2010**, *14*, 325–337. [[CrossRef](#)]
- Sahay, A.; Scobie, K.N.; Hill, A.S.; O'Carroll, C.M.; Kheirbek, M.A.; Burghardt, N.S.; Fenton, A.A.; Dranovsky, A.; Hen, R. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* **2011**, *472*, 466–470. [[CrossRef](#)]
- Gonçalves, J.T.; Schafer, S.T.; Gage, F.H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* **2016**, *167*, 897–914. [[CrossRef](#)]
- Surget, A.; Belzung, C. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: A mechanistic and integrative perspective. *Mol. Psychiatry* **2021**, 1–19, *in press*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Snyder, J.S.; Soumier, A.; Brewer, M.; Pickel, J.; Cameron, H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* **2011**, *476*, 458–461. [[CrossRef](#)]
- Yun, S.; Reynolds, R.P.; Masiulis, I.; Eisch, A.J. Re-evaluating the link between neuropsychiatric disorders and dysregulated adult neurogenesis. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1239–1247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vallières, L.; Campbell, I.L.; Gage, F.H.; Sawchenko, P.E. Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 486–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Monje, M.L.; Toda, H.; Palmer, T.D. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science* **2003**, *302*, 1760–1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goshen, I.; Kreisel, T.; Ben-Menachem-Zidon, O.; Licht, T.; Weidenfeld, J.; Ben-Hur, T.; Yirmiya, R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol. Psychiatry* **2008**, *13*, 717–728. [[CrossRef](#)]
- Zunszain, P.A.; Anacker, C.; Cattaneo, A.; Choudhury, S.; Musaelyan, K.; Myint, A.M.; Thuret, S.; Price, J.; Pariante, C.M. Interleukin-1 β : A new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 939–949. [[CrossRef](#)]
- Liu, Q.; Xin, W.; He, P.; Turner, D.; Yin, J.; Gan, Y.; Shi, F.D.; Wu, J. Interleukin-17 inhibits Adult Hippocampal Neurogenesis. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 7554. [[CrossRef](#)]
- Borsini, A.; Zunszain, P.A.; Thuret, S.; Pariante, C.M. The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends Neurosci.* **2015**, *38*, 145–157. [[CrossRef](#)]
- Kim, Y.K.; Na, K.S.; Myint, A.M.; Leonard, B.E. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2016**, *64*, 277–284. [[CrossRef](#)]

21. Das, S.; Basu, A. Inflammation: A new candidate in modulating adult neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 1199–1208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ekdahl, C.T.; Kokaia, Z.; Lindvall, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: The dual role of microglia. *Neuroscience* **2009**, *158*, 1021–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ryan, S.M.; Nolan, Y.M. Neuroinflammation negatively affects adult hippocampal neurogenesis and cognition: Can exercise compensate? *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2016**, *61*, 121–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Troubat, R.; Barone, P.; Leman, S.; Desmidt, T.; Cressant, A.; Atanasova, B.; Brizard, B.; El Hage, W.; Surget, A.; Belzung, C.; et al. Neuroinflammation and depression: A review. *Eur. J. Neurosci.* **2021**, *53*, 151–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chesnokova, V.; Pechnick, R.N.; Wawrowsky, K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *58*, 1–8. [[CrossRef](#)]
26. Ormerod, B.K.; Hanft, S.J.; Asokan, A.; Haditsch, U.; Lee, S.W.; Palmer, T.D. PPAR γ activation prevents impairments in spatial memory and neurogenesis following transient illness. *Brain Behav. Immun.* **2013**, *29*, 28–38. [[CrossRef](#)]
27. Valero, J.; Mastrella, G.; Neiva, I.; Sánchez, S.; Malva, J.O. Long-term effects of an acute and systemic administration of LPS on adult neurogenesis and spatial memory. *Front. Neurosci.* **2014**, *8*, 83. [[CrossRef](#)]
28. Hill, J.D.; Zuluaga-Ramirez, V.; Gajghate, S.; Winfield, M.; Sriram, U.; Rom, S.; Persidsky, Y. Activation of GPR55 induces neuroprotection of hippocampal neurogenesis and immune responses of neural stem cells following chronic, systemic inflammation. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *76*, 165–181. [[CrossRef](#)]
29. Perez-Dominguez, M.; Ávila-Muñoz, E.; Domínguez-Rivas, E.; Zepeda, A. The detrimental effects of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation on adult hippocampal neurogenesis depend on the duration of the pro-inflammatory response. *Neural Regen. Res.* **2019**, *14*, 817–825. [[CrossRef](#)]
30. Zonis, S.; Pechnick, R.N.; Ljubimov, V.A.; Mahgerefteh, M.; Wawrowsky, K.; Michelsen, K.S.; Chesnokova, V. Chronic intestinal inflammation alters hippocampal neurogenesis. *J. Neuroinflamm.* **2015**, *12*, 65. [[CrossRef](#)]
31. Nakagawasai, O.; Yamada, K.; Takahashi, K.; Odaira, T.; Sakuma, W.; Ishizawa, D.; Takahashi, N.; Onuma, K.; Hozumi, C.; Nemoto, W.; et al. Liver hydrolysate prevents depressive-like behavior in an animal model of colitis: Involvement of hippocampal neurogenesis via the AMPK/BDNF pathway. *Behav. Brain Res.* **2020**, *390*, 112640. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gampierakis, I.A.; Koutmani, Y.; Semitekolou, M.; Morianos, I.; Polissidis, A.; Katsouda, A.; Charalampopoulos, I.; Xanthou, G.; Gravanis, A.; Karalis, K.P. Hippocampal neural stem cells and microglia response to experimental inflammatory bowel disease (IBD). *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 1248–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wolf, S.A.; Steiner, B.; Wengner, A.; Lipp, M.; Kammertoens, T.; Kempermann, G. Adaptive peripheral immune response increases proliferation of neural precursor cells in the adult hippocampus. *FASEB J.* **2009**, *23*, 3121–3128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Süß, P.; Kalinichenko, L.; Baum, W.; Reichel, M.; Kornhuber, J.; Loskarn, S.; Ettl, B.; Distler, J.H.; Schett, G.; Winkler, J.; et al. Hippocampal structure and function are maintained despite severe innate peripheral inflammation. *Brain Behav. Immun.* **2015**, *49*, 156–170. [[CrossRef](#)]
35. Süß, P.; Hoffmann, A.; Rothe, T.; Ouyang, Z.; Baum, W.; Staszewski, O.; Schett, G.; Prinz, M.; Krönke, G.; Glass, C.K.; et al. Chronic Peripheral Inflammation Causes a Region-Specific Myeloid Response in the Central Nervous System. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 4082–4095.e6. [[CrossRef](#)]
36. Duric, V.; McCarson, K.E. Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression. *J. Pain* **2006**, *7*, 544–555. [[CrossRef](#)]
37. Zheng, J.; Jiang, Y.Y.; Xu, L.C.; Ma, L.Y.; Liu, F.Y.; Cui, S.; Cai, J.; Liao, F.F.; Wan, Y.; Yi, M. Adult Hippocampal Neurogenesis along the Dorsoventral Axis Contributes Differentially to Environmental Enrichment Combined with Voluntary Exercise in Alleviating Chronic Inflammatory Pain in Mice. *J. Neurosci.* **2017**, *37*, 4145–4157. [[CrossRef](#)]
38. Dickens, C.; McGowan, L.; Clark-Carter, D.; Creed, F. Depression in Rheumatoid Arthritis: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosom. Med.* **2002**, *64*, 52–60. [[CrossRef](#)]
39. Matcham, F.; Rayner, L.; Steer, S.; Hotopf, M. The prevalence of depression in rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Rheumatology* **2013**, *52*, 2136–2148. [[CrossRef](#)]
40. Tan, L.L.; Alfonso, J.; Monyer, H.; Kuner, R. Neurogenesis in the adult brain functionally contributes to the maintenance of chronic neuropathic pain. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 18549. [[CrossRef](#)]
41. Knight, B.; Katz, D.R.; Isenberg, D.A.; Ibrahim, M.A.; Le Page, S.; Hutchings, P.; Schwartz, R.S.; Cooke, A. Induction of adjuvant arthritis in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **1992**, *90*, 459–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chillingworth, N.L.; Donaldson, L.F. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J. Neurosci. Methods* **2003**, *128*, 45–52. [[CrossRef](#)]
43. Borbély, E.; Hajna, Z.; Sándor, K.; Kereskai, L.; Tóth, I.; Pintér, E.; Nagy, P.; Szolcsányi, J.; Quinn, J.; Zimmer, A.; et al. Role of tachykinin 1 and 4 gene-derived neuropeptides and the neurokinin 1 receptor in adjuvant-induced chronic arthritis of the mouse. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Horváth, Á.; Tékus, V.; Boros, M.; Pozsgai, G.; Botz, B.; Borbély, É.; Szolcsányi, J.; Pintér, E.; Helyes, Z. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis: In vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Helyes, Z.; Szabó, A.; Németh, J.; Jakab, B.; Pintér, E.; Bánvölgyi, A.; Kereskai, L.; Kéri, G.; Szolcsányi, J. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* **2004**, *50*, 1677–1685. [[CrossRef](#)]
46. Szabó, A.; Helyes, Z.; Sándor, K.; Bite, A.; Pintér, E.; Németh, J.; Bánvölgyi, A.; Bölcseki, K.; Elekes, K.; Szolcsányi, J. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: In vivo study using gene-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314*, 111–119. [[CrossRef](#)]
47. Tékus, V.; Borbély, É.; Kiss, T.; Perkecz, A.; Kemény, Á.; Horváth, J.; Kvarda, A.; Pintér, E. Investigation of Lake Hévíz Mineral Water Balneotherapy and Hévíz Mud Treatment in Murine Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Models. Evid Based Complement. *Alternat. Med.* **2018**, *2018*, 4816905. [[CrossRef](#)]
48. Tseng, J.C.; Kung, A.L. In vivo imaging of inflammatory phagocytes. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 1199–1209. [[CrossRef](#)]
49. Botz, B.; Bölcseki, K.; Kereskai, L.; Kovács, M.; Németh, T.; Szigeti, K.; Horváth, I.; Máthé, D.; Kovács, N.; Hashimoto, H.; et al. Differential regulatory role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the serum-transfer arthritis model. *Arthritis Rheumatol.* **2014**, *66*, 2739–2750. [[CrossRef](#)]
50. Rusznák, K.; Csekő, K.; Varga, Z.; Csabai, D.; Bóna, Á.; Mayer, M.; Kozma, Z.; Helyes, Z.; Czéh, B. Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Physiology, Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 786. [[CrossRef](#)]
51. Brown, J.P.; Couillard-Després, S.; Cooper-Kuhn, C.M.; Winkler, J.; Aigner, L.; Kuhn, H.G. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **2003**, *467*, 1–10. [[CrossRef](#)]
52. Couillard-Despres, S.; Winner, B.; Schaubeck, S.; Aigner, R.; Vroemen, M.; Weidner, N.; Bogdahn, U.; Winkler, J.; Kuhn, H.G.; Aigner, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **2005**, *21*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ito, D.; Imai, Y.; Ohsawa, K.; Nakajima, K.; Fukuuchi, Y.; Kohsaka, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.* **1998**, *57*, 1–9. [[CrossRef](#)]
54. Guillemin, G.J.; Brew, B.J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: A review of function and identification. *J. Leukoc. Biol.* **2004**, *75*, 388–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Czéh, B.; Michaelis, T.; Watanabe, T.; Frahm, J.; De Biurrun, G.; Van Kampen, M.; Bartolomucci, A.; Fuchs, E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12796–12801. [[CrossRef](#)]
56. Eisch, A.J.; Barrot, M.; Schad, C.A.; Self, D.W.; Nestler, E.J. Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7579–7584. [[CrossRef](#)]
57. Czéh, B.; Welt, T.; Fischer, A.K.; Erhardt, A.; Schmitt, W.; Müller, M.B.; Toschi, N.; Fuchs, E.; Keck, M.E. Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: Effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* **2002**, *52*, 1057–1065. [[CrossRef](#)]
58. Franklin, K.B.J.; Paxinos, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 2008.
59. Sierra, A.; Encinas, J.M.; Deudero, J.J.; Chancey, J.H.; Enikolopov, G.; Overstreet-Wadiche, L.S.; Tsirka, S.E.; Maletic-Savatic, M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 483–495. [[CrossRef](#)]
60. Nieto-Quero, A.; Chaves-Peña, P.; Santín, L.J.; Pérez-Martín, M.; Pedraza, C. Do changes in microglial status underlie neurogenesis impairments and depressive-like behaviours induced by psychological stress? A systematic review in animal models. *Neurobiol. Stress* **2021**, *15*, 100356. [[CrossRef](#)]
61. Chistiakov, D.A.; Killingsworth, M.C.; Myasoedova, V.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. CD68/macrosialin: Not just a histochemical marker. *Lab. Investig.* **2017**, *97*, 4–13. [[CrossRef](#)]
62. Ehninger, D.; Kempermann, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* **2007**, *331*, 243–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Dantzer, R.; O'Connor, J.C.; Freund, G.G.; Johnson, R.W.; Kelley, K.W. From inflammation to sickness and depression: When the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 46–56. [[CrossRef](#)]
64. Perry, V.H. Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* **2010**, *120*, 277–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Berk, M.; Williams, L.J.; Jacka, F.N.; O'Neil, A.; Pasco, J.A.; Moylan, S.; Allen, N.B.; Stuart, A.L.; Hayley, A.; Byrne, M.L.; et al. So depression is an inflammatory disease, but where does the inflammation come from? *BMC Med.* **2013**, *11*, 200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kempuraj, D.; Thangavel, R.; Selvakumar, G.P.; Zaheer, S.; Ahmed, M.E.; Raikwar, S.P.; Zahoor, H.; Saeed, D.; Natteru, P.A.; Iyer, S.; et al. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 216. [[CrossRef](#)]
67. Kaneko, N.; Kudo, K.; Mabuchi, T.; Takemoto, K.; Fujimaki, K.; Wati, H.; Iguchi, H.; Tezuka, H.; Kanba, S. Suppression of cell proliferation by interferon-alpha through interleukin-1 production in adult rat dentate gyrus. *Neuropsychopharmacology* **2006**, *31*, 2619–2626. [[CrossRef](#)]
68. Koo, J.W.; Duman, R.S. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 751–756. [[CrossRef](#)]
69. Garber, C.; Vasek, M.J.; Vollmer, L.L.; Sun, T.; Jiang, X.; Klein, R.S. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via IL-1. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 151–161. [[CrossRef](#)]

70. Pawley, L.C.; Hueston, C.M.; O'Leary, J.D.; Kozareva, D.A.; Cryan, J.F.; O'Leary, O.F.; Nolan, Y.M. Chronic intrahippocampal interleukin-1 β overexpression in adolescence impairs hippocampal neurogenesis but not neurogenesis-associated cognition. *Brain Behav. Immun.* **2020**, *83*, 172–179. [[CrossRef](#)]
71. Pepe, G.; Calderazzi, G.; De Maglie, M.; Villa, A.M.; Vegeto, E. Heterogeneous induction of microglia M2a phenotype by central administration of interleukin-4. *J. Neuroinflamm.* **2014**, *11*, 211. [[CrossRef](#)]
72. Rossi, C.; Cusimano, M.; Zambito, M.; Finardi, A.; Capotondo, A.; Garcia-Manteiga, J.M.; Comi, G.; Furlan, R.; Martino, G.; Muzio, L. Interleukin 4 modulates microglia homeostasis and attenuates the early slowly progressive phase of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Butovsky, O.; Ziv, Y.; Schwartz, A.; Landa, G.; Talpalar, A.E.; Pluchino, S.; Martino, G.; Schwartz, M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **2006**, *31*, 149–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Erta, M.; Quintana, A.; Hidalgo, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int. J. Biol. Sci.* **2012**, *8*, 1254–1266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Perez-Asensio, F.J.; Perpiñá, U.; Planas, A.M.; Pozas, E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis on adult brain. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 4208–4219. [[CrossRef](#)]
76. Ben-Hur, T.; Ben-Menachem, O.; Furer, V.; Einstein, O.; Mizrahi-Kol, R.; Grigoriadis, N. Effects of proinflammatory cytokines on the growth, fate, and motility of multipotential neural precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **2003**, *24*, 623–631. [[CrossRef](#)]
77. Cacci, E.; Claasen, J.H.; Kokaia, Z. Microglia-derived tumor necrosis factor- α exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *80*, 789–797. [[CrossRef](#)]
78. Iosif, R.E.; Ekdahl, C.T.; Ahlenius, H.; Pronk, C.J.; Bonde, S.; Kokaia, Z.; Jacobsen, S.E.; Lindvall, O. Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Is a Negative Regulator of Progenitor Proliferation in Adult Hippocampal Neurogenesis. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9703–9712. [[CrossRef](#)]
79. Gerber, J.; Böttcher, T.; Hahn, M.; Siemer, A.; Bunkowski, S.; Nau, R. Increased mortality and spatial memory deficits in TNF- α -deficient mice in ceftriaxone-treated experimental pneumococcal meningitis. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 133–138. [[CrossRef](#)]
80. Bernardino, L.; Agasse, F.; Silva, B.; Ferreira, R.; Grade, S.; Malva, J.O. Tumor necrosis factor- α modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells* **2008**, *26*, 2361–2371. [[CrossRef](#)]
81. Belenguer, G.; Duart-Abadia, P.; Jordán-Pla, A.; Domingo-Muelas, A.; Blasco-Chamarro, L.; Ferrón, S.R.; Morante-Redolat, J.M.; Fariñas, I. Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF- α Receptor Signaling. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 285–299.e9. [[CrossRef](#)]
82. Wolpe, S.D.; Sherry, B.; Juers, D.; Davatellis, G.; Yurt, R.W.; Cerami, A. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 612–616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Frink, M.; Hsieh, Y.C.; Hsieh, C.H.; Pape, H.C.; Choudhry, M.A.; Schwacha, M.G.; Chaudry, I.H. Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. *Shock* **2007**, *28*, 576–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mutso, A.A.; Radzicki, D.; Baliki, M.N.; Huang, L.; Banisadr, G.; Centeno, M.V.; Radulovic, J.; Martina, M.; Miller, R.J.; Apkarian, A.V. Abnormalities in Hippocampal Functioning with Persistent Pain. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 5747–5756. [[CrossRef](#)]
85. Xia, S.H.; Hu, S.W.; Ge, D.G.; Liu, D.; Wang, D.; Zhang, S.; Zhang, Q.; Yuan, L.; Li, Y.Q.; Yang, J.X.; et al. Chronic Pain Impairs Memory Formation via Disruption of Neurogenesis Mediated by Mesohippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *Biol. Psychiatry* **2020**, *88*, 597–610. [[CrossRef](#)]
86. Dennis, C.V.; Suh, L.S.; Rodriguez, M.L.; Kril, J.J.; Sutherland, G.T. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2016**, *42*, 621–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Sorrells, S.F.; Paredes, M.F.; Cebrian-Silla, A.; Sandoval, K.; Qi, D.; Kelley, K.W.; James, D.; Mayer, S.; Chang, J.; Auguste, K.I.; et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* **2018**, *555*, 377–381. [[CrossRef](#)]
88. Duque, A.; Spector, R. A balanced evaluation of the evidence for adult neurogenesis in humans: Implication for neuropsychiatric disorders. *Brain Struct. Funct.* **2019**, *224*, 2281–2295. [[CrossRef](#)]
89. Lucassen, P.J.; Fitzsimons, C.P.; Salta, E.; Maletic-Savatic, M. Adult neurogenesis, human after all (again): Classic, optimized, and future approaches. *Behav. Brain Res.* **2020**, *381*, 112458. [[CrossRef](#)]
90. Winner, B.; Kohl, Z.; Gage, F.H. Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur. J. Neurosci.* **2011**, *33*, 1139–1151. [[CrossRef](#)]
91. Ruan, L.; Lau, B.W.; Wang, J.; Huang, L.; Zhuge, Q.; Wang, B.; Jin, K.; So, K.F. Neurogenesis in neurological and psychiatric diseases and brain injury: From bench to bedside. *Prog. Neurobiol.* **2014**, *115*, 116–137. [[CrossRef](#)]
92. Gemma, C.; Bachstetter, A.D. The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* **2013**, *7*, 229. [[CrossRef](#)]
93. Rodríguez-Iglesias, N.; Sierra, A.; Valero, J. Rewiring of Memory Circuits: Connecting Adult Newborn Neurons with the Help of Microglia. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Sierra, A.; Beccari, S.; Diaz-Aparicio, I.; Encinas, J.M.; Comeau, S.; Tremblay, M.É. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: How never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast.* **2014**, *2014*, 610343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Korzhevskii, D.E.; Kirik, O.V. Brain Microglia and Microglial Markers. *Neurosci. Behav. Physi.* **2016**, *46*, 284–290. [[CrossRef](#)]
96. Hendrickx, D.A.E.; Van Eden, C.G.; Schuurman, K.G.; Hamann, J.; Huitinga, I. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J. Neuroimmunol.* **2017**, *309*, 12–22. [[CrossRef](#)]
97. Matsumoto, H.; Kumon, Y.; Watanabe, H.; Ohnishi, T.; Shudou, M.; Li, C.; Takahashi, H.; Imai, Y.; Tanaka, J. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 994–1009. [[CrossRef](#)]
98. Lemstra, A.W.; Groen in't Woud, J.C.; Hoozemans, J.J.; Van Haastert, E.S.; Rozemuller, A.J.; Eikelenboom, P.; Van Gool, W.A. Microglia activation in sepsis: A case-control study. *J. Neuroinflamm.* **2007**, *4*, 4. [[CrossRef](#)]
99. Westhoff, D.; Engelen-Lee, J.Y.; Hoogland, I.C.M.; Aronica, E.M.A.; Van Westerloo, D.J.; Van de Beek, D.; Van Gool, W.A. Systemic infection and microglia activation: A prospective postmortem study in sepsis patients. *Immun. Ageing* **2019**, *16*, 18. [[CrossRef](#)]



Long-Term Stress and Concomitant Marijuana Smoke Exposure Affect Physiology, Behavior and Adult Hippocampal Neurogenesis

Kitti Rusznák^{1†}, Kata Csekő^{2,3†}, Zsófia Varga¹, Dávid Csabai¹, Ágnes Bóna⁴, Mátyás Mayer⁵, Zsolt Kozma⁵, Zsuzsanna Helyes^{2,3} and Boldizsár Czéh^{1,6*}

¹ Neurobiology of Stress Research Group, János Szentágotthai Research Centre and Centre for Neuroscience, Pécs, Hungary, ² Molecular Pharmacology Research Group, János Szentágotthai Research Centre and Centre for Neuroscience, Pécs, Hungary, ³ Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁴ Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁵ Department of Forensic Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary, ⁶ Department of Laboratory Medicine, University of Pécs Medical School, Pécs, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Carsten T. Wotjak,
Max-Planck-Institut für Psychiatrie,
Germany

Reviewed by:

Alline C. Campos,
Universidade de São Paulo, Brazil
Ismael Galve-Roperh,
Complutense University of Madrid,
Spain

*Correspondence:

Boldizsár Czéh
cze.h.boldizsar@pte.hu

† These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 26 April 2018

Accepted: 27 June 2018

Published: 23 July 2018

Citation:

Rusznák K, Csekő K, Varga Z,
Csabai D, Bóna Á, Mayer M,
Kozma Z, Helyes Z and Czéh B (2018)
Long-Term Stress and Concomitant
Marijuana Smoke Exposure Affect
Physiology, Behavior and Adult
Hippocampal Neurogenesis.
Front. Pharmacol. 9:786.
doi: 10.3389/fphar.2018.00786

Marijuana is a widely used recreational drug with increasing legalization worldwide for medical purposes. Most experimental studies use either synthetic or plant-derived cannabinoids to investigate the effect of cannabinoids on anxiety and cognitive functions. The aim of this study was to mimic real life situations where young people smoke cannabis regularly to relax from everyday stress. Therefore, we exposed young adult male NMRI mice to daily stress and concomitant marijuana smoke for 2 months and investigated the consequences on physiology, behavior and adult hippocampal neurogenesis. Animals were restrained for 6-h/day for 5-days a week. During the stress, mice were exposed to cannabis smoke for 2 × 30 min/day. We burned 2 “joints” (2 × 0.8 g marijuana) per occasion in a whole body smoking chamber. Cannabinoid content of the smoke and urine samples was measured by HPLC and SFC-MS/MS. Body weight gain was recorded daily and we did unrestrained, whole body plethysmography to investigate pulmonary functions. The cognitive performance of the animals was evaluated by the novel object recognition and Y maze tests. Anxiety-related spontaneous locomotor activity and self-grooming were assessed in the open field test (OFT). Adult neurogenesis was quantified *post mortem* in the hippocampal dentate gyrus. The proliferative activity of the precursor cells was detected by the use of the exogenous marker 5-bromo-2'-deoxyuridine. Treatment effects on maturing neurons were studied by the examination of doublecortin-positive neurons. Both stress and cannabis exposure significantly reduced body weight gain. Cannabis smoke had no effect on pulmonary functions, but stress delayed the maturation of several lung functions. Neither stress, nor cannabis smoke affected the cognitive functioning of the animals. Results of the OFT revealed that cannabis had a mild anxiolytic effect and markedly increased self-grooming behavior. Stress blocked cell proliferation in the dentate gyrus, but cannabis had no effect on this parameter. Marijuana smoke however had a pronounced impact on doublecortin-positive neurons influencing their number,

morphology and migration. In summary, we report here that long-term stress in combination with cannabis smoke exposure can alter several health-related measures, but the present experimental design could not reveal any interaction between these two treatment factors except for body weight gain.

Keywords: body weight, BrdU, *Cannabis sativa*, chronic stress, cognitive function, doublecortin, hippocampus, self-grooming

INTRODUCTION

Marijuana is the most widely used illicit drug, as about 2.5% of the world population consume cannabis regularly (UNODC, 2017). Cannabis is increasingly legalized worldwide for medical and recreational purposes (Carliner et al., 2017; EMCDDA, 2017; Webster, 2018), which results in an increasing consumption while the long-term consequences on health are not well understood (e.g., Volkow et al., 2014, 2016; Levine et al., 2017). Thus, it is important to investigate the outcomes of prolonged use.

Advocates argue that marijuana is a safe and natural alternative for the treatment of a variety of medical and mental health conditions, but ambiguous data are reported in the literature on the health risks imposed by chronic cannabis use. Cannabidiol (CBD), a major constituent of *Cannabis sativa* and several components of the endocannabinoid system are increasingly viewed as potential ‘druggable’ targets for the treatment for anxiety-related disorders (Blessing et al., 2015; Lee et al., 2017; Patel et al., 2017). Indeed, anxiety is among the top five medical symptoms for which North Americans report using medical marijuana while its anxiolytic effectiveness is still not well documented (Turna et al., 2017). The correlation between cannabis use and cognitive enhancement or impairment is also ambiguous. While numerous clinical and preclinical data suggest a strong correlation between marijuana exposure and impaired cognition, it does not conclusively demonstrate that cannabis consumption alone is sufficient to cause these deficits in humans (Broyd et al., 2016; Curran et al., 2016; Volkow et al., 2016; Levine et al., 2017). At the same time, there are reports on positive effect of cannabis use on various cognitive and executive functions (Osborne et al., 2017; Gruber et al., 2018; Tervo-Clemmens et al., 2018).

The consequences of prolonged marijuana inhalation on respiratory health and lung cancer is also debated (Gates et al., 2014; Martinasek et al., 2016; Chatkin et al., 2017; Stone et al., 2018). Similarly, there is conflicting data on the effect of cannabis use on body weight. Cannabis is known to stimulate appetite and potentially promote weight gain in patients suffering from human immunodeficiency virus or cancer, whereas, findings of the large epidemiological studies in the general population, consistently indicate that users of marijuana tend to have lower body mass indices (Sansone and Sansone, 2014).

Adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus is a unique form of neuroplasticity that has received substantial attention during the recent years. Adult-born neurons in the dentate play an essential role in normal cognitive

functioning and in specific forms of learning (Denny et al., 2014; Anacker and Hen, 2017). Stress is a potent inhibitor of the proliferative activity of the precursor cells and also blocks the survival of the newly generated neurons (Gould et al., 1997; Czéh et al., 2001, 2002; Cameron and Schoenfeld, 2018). In consequence, stress-induced disruption of adult neurogenesis may play a role in the development of various psychiatric disorders, including depression, anxiety, and schizophrenia (Santarelli et al., 2003; Snyder et al., 2011; Surget et al., 2011; Kim et al., 2012; Schoenfeld and Cameron, 2015).

Cannabinoid receptors are highly expressed in the hippocampus, and recent studies suggest that facilitation of the cannabinoid signaling in the hippocampus may prevent stress-induced behavioral changes (Campos et al., 2013; Scarante et al., 2017; Fogaça et al., 2018). Numerous studies investigated the effect of various cannabinoids on adult hippocampal neurogenesis (Prenderville et al., 2015), but these studies used either plant-derived extracts or synthetic cannabinoids. The results of these studies are also inconsistent. Some studies report on positive, stimulatory effect (Jiang et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Marchalant et al., 2009; Wolf et al., 2010; Rivera et al., 2011; Suliman et al., 2018), while others document negative, inhibitory effect on adult neurogenesis (Realini et al., 2011; Abboussi et al., 2014; Lee et al., 2014; Steel et al., 2014), or no effect at all (Kochman et al., 2006; Maćkowiak et al., 2007; Steel et al., 2014).

Most of the preclinical studies use either synthetic cannabinoid agents or cannabis extracts to investigate the physiological and behavioral consequences. Typically, animals are injected with various doses of the synthetic compound in an acute or chronic (10–14 days) treatment protocol. The aim of the present study was to mimic a real life situation where cannabis is smoked by adolescents on a daily basis to ease everyday stress. We used young adult mice and subjected them to daily stress over a 2-month period and during the stress exposure the animals were also exposed to cannabis smoke. To investigate the health risks of such a treatment protocol, we examined body weight gain, pulmonary functions, emotional responses and cognitive performance, as well as cellular changes in adult hippocampal neurogenesis. The *Cannabis sativa* used in this experiment was obtained from the local Hungarian Police Superintendancy. To determine the amount of tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), cannabinol (CBN), and cannabidiol (CBD) content of our sample, we did an HPLC analysis of the marijuana smoke and metabolites of these compounds were measured in urine samples collected from the animals.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Young male NMRI mice, weighing 20 ± 3 g (4 weeks of age; $n = 36$) at the beginning of the experiment, were used. In mice, the sexual maturity, i.e., the first vaginal estrus starts during puberty at postnatal day 25–50 depending on the mouse strain (Drickamer, 1981). This indicates, that the mice enrolled in this experiment were at their “late puberty” when the stress and cannabis treatment protocol started. Animals were purchased from “Toxi-Coop” Toxicological Research Center Ltd. (Budapest, Hungary), and kept (group-housed) in a temperature and humidity-controlled animal facility and maintained on a standard 12 h light/dark cycle (lights on at 8 AM). Food and water were available *ad libitum* in the home cages.

Ethical Considerations

The experimental procedures were carried out according to the 1998/XXVIII Act of the Hungarian Parliament on Animal Protection and Consideration Decree of Scientific Procedures of Animal Experiments (243/1988). The studies were approved by the Ethical Committee on Animal Research of the University of Pécs according to the Ethical Codex of Animal Experiments, and license was given (License No. BA02/2000-35/2016).

Experimental Design

The experimental design including the animal groups, behavioral tests and the timeline of the procedures are depicted on **Figure 1**. First, the animals were allowed to habituate to the new housing conditions for 10 days. Afterward the animals were divided into four experimental groups according to the stress and drug treatment protocols: Control, Control + Cannabis, Stress, and Stress + Cannabis ($n = 9$ /group). The long-term stress experiment lasted for 8 weeks. Animals were exposed to restraint stress every day, 5-days a week, but on the weekends they had rest. All the behavioral and the respiratory function tests were performed on weekends, when the animals were not subjected to stress or cannabis treatment. The behavioral testing started at 8:00 a.m. and measurement of one animal usually took 5–10 min. We tested the mice in an alternating order using a predefined sequence to minimize the potential effect of the circadian rhythm on the performance of mice from the different experimental groups.

Restraint Stress Procedures

Animals were immobilized daily for 6 h, between 08:00 a.m. and 14:00 p.m. During restraint, the animals were placed in well ventilated polypropylene tubes (internal diameter, 3 cm; length, 11.5 cm) according to our previous protocol (Scheich et al., 2017). During immobilization stress, mice did not have access to food or water. Control mice were not subjected to any kind of stress except daily handling. We used this restraint stress protocol because it has been demonstrated that this protocol is stressful for rodents and results in pronounced structural changes in the hippocampus, including dendritic atrophy and reduced adult

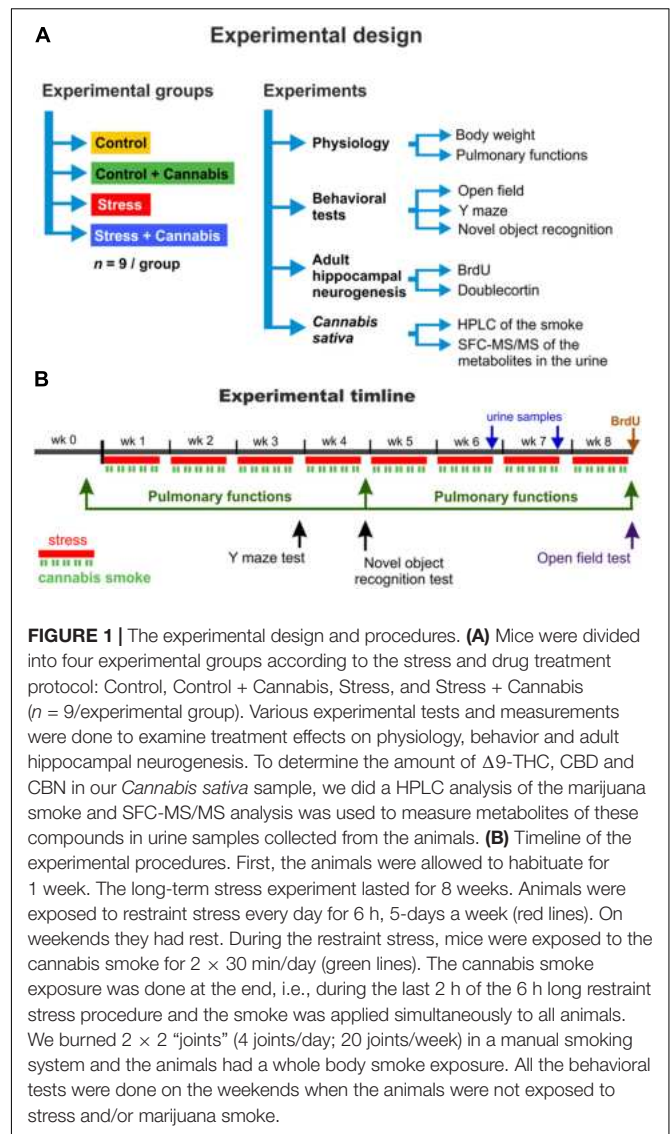


FIGURE 1 | The experimental design and procedures. **(A)** Mice were divided into four experimental groups according to the stress and drug treatment protocol: Control, Control + Cannabis, Stress, and Stress + Cannabis ($n = 9$ /experimental group). Various experimental tests and measurements were done to examine treatment effects on physiology, behavior and adult hippocampal neurogenesis. To determine the amount of $\Delta 9$ -THC, CBD and CBN in our *Cannabis sativa* sample, we did a HPLC analysis of the marijuana smoke and SFC-MS/MS analysis was used to measure metabolites of these compounds in urine samples collected from the animals. **(B)** Timeline of the experimental procedures. First, the animals were allowed to habituate for 1 week. The long-term stress experiment lasted for 8 weeks. Animals were exposed to restraint stress every day for 6 h, 5-days a week (red lines). On weekends they had rest. During the restraint stress, mice were exposed to the cannabis smoke for 2×30 min/day (green lines). The cannabis smoke exposure was done at the end, i.e., during the last 2 h of the 6 h long restraint stress procedure and the smoke was applied simultaneously to all animals. We burned 2×2 “joints” (4 joints/day; 20 joints/week) in a manual smoking system and the animals had a whole body smoke exposure. All the behavioral tests were done on the weekends when the animals were not exposed to stress and/or marijuana smoke.

neurogenesis in the dentate gyrus (McLaughlin et al., 2007; Veena et al., 2009; Yun et al., 2010).

Chronic Whole Body Cannabis Smoke Exposure

Dried marijuana was provided by the Hungarian Police Superintendancy after the necessary permission was obtained from the Drug Licensing Department operating at the Office of Health Authorization and Administrative Procedures (Budapest, Hungary; License No. 15259/2016/KAB).

The marijuana was chopped, and cigarettes containing 0.77 ± 0.03 g marijuana were prepared. Mice were exposed to whole body marijuana smoke in a two-port TE-2 smoking chamber (TE-2 Teague Enterprises) from the age of 5 week for 8 weeks, twice a day for 30–30 min. Two joints were burned per occasion (4 joints/day; 20 joints/week; 154.97 ± 5.18 mg total particulate material/ m^3) for 10 min with a puff duration

of 2 s and a puff frequency of 1/min/joint. This was followed by a 30 min long exposure period during which the smoke was driven into the chamber. After the smoke exposure there was a 20 min long ventilation period, during which the smoke was drawn out of the chamber by a vent hood, and then, the smoking session was repeated. Stressed mice were exposed to the cannabis smoke at the end, i.e., during the last 2 h of the 6 h long restraint stress procedure. Home cages containing the control animals, as well as mice subjected to the restraint stress were all placed in the smoking chamber simultaneously, therefore all mice were exposed to the marijuana smoke at the same time-point of their diurnal rhythm.

HPLC Equipment and Chromatographic Conditions

Two cigarettes containing 0.77 ± 0.03 g marijuana were prepared and burned down in a smoking system. The formed marijuana smoke was pumped through a methanol containing gas-washing bottle by a vacuum pump. Methanol was removed by using a rotary evaporator. The sample was dissolved in 5 cm³ of methanol and filtered through a membrane filter (0.2 μm). The HPLC system used consisted of a Dionex P680 gradient pump (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, United States), a helium degassing system, a Rheodyne 8125 injector valve with a 20 μL loop (Rheodyne Europe GmbH, Bensheim, Germany), and a Dionex 340D UV-vis diode array detector (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, United States). The eluate was monitored at ambient temperature at different wavelengths, 209, 210, and 220 nm, respectively, where the investigated cannabinoids have their absorbance maxima. Chromatographic separations were achieved using Kinetex, C18 reversed phase column (2.6 μm, 2.1 mm × 150 mm i.d.). A Chromeleon data management software (Version 6.60 SP3 Build 1485, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, United States) was used to control the equipment and for data evaluation. Peaks were identified by retention times and by UV spectrum of the respective compounds in comparison with those of the references. Quantification was carried out using the peak areas method. All measurements were made in triplicate.

The gradient consisted of two eluents: (A) water/methanol (90:10; v/v); (B) water/methanol (10:90; v/v) containing 50 mM of ammonium formate (adjusted to pH 5.20). The gradient profile was 0.0–20.0 min from 80% to 100% B, 20.0–25.0 min 100% B. After maintaining this condition for 5 min, the column was set to initial condition in 1 min and re-equilibrated under this condition for 4 min. The total runtime was 30 min. Flow rate was set to 0.2 mL/min, the injection volume was 20 μL. All experiments were carried out at 25°C.

Measurement of Cannabinoid Content of the Urine by SFC-MS/MS

Since cannabinoids have 97% plasma protein binding, penetrate to all tissues, and have high accumulation and urinary excretion (Nahas et al., 1981; Nahas and Latour, 1992), we determined the concentration of Δ⁹-THC, 11-nor-9-carboxy-THC, CBD and CBN in the urine. Urine samples (200–350 μl per mouse) were collected from all mice exposed to marijuana smoke by gently

applying lower abdominal pressure on the 6th and 7th week of the experimental protocol (**Figure 1**). Samples were stored at 4°C and analyzed within 5 days.

After salting-out assisted liquid-liquid microextraction measurements were performed by an ACQUITY UPC² supercritical fluid chromatography system (Waters) coupled with a Xevo TQ-S Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Waters). Data were recorded by MassLynx software (V4.1 SCN950) and evaluated by TargetLynx XS software. Separation of compounds was performed on a 3.0 mm × 100 mm, 1.7 μm particle size, ACQUITY UPC² Torus DIOL analytical column (Waters). The mobile phase consisted of the mixture of carbon dioxide (A) and 5 mM ammonium hydroxide in methanol (B) with flow rate of 1.2 mL/min. The following gradient profile was used: 99.9% A at 0.0 min and 82.0% A at 4.5 min. Pre-equilibration period lasting 2 min was applied before each injection. Constant 200 bar back pressure was used to maintain the supercritical state. The temperature was set at 45°C and the volume of injection was 1 μL. To sustain a suitable electrospray, additional solution consisted of 5 mM ammonium hydroxide in methanol was applied with flow rate of 0.1 mL/min. This makeup solvent was delivered by a Waters 515 HPLC Pump.

The MS measurement was performed in positive ion mode. The ESI source was operated with a spray voltage of 3.00 kV, cone voltage was 30 V. The source was set at 150°C. Both desolvation and cone gasses were nitrogen delivered at 300 and 150 L/min, respectively. Desolvation gas was temperatured at 300°C. Collision gas was argon with flow rate of 0.13 mL/min. MS/MS experiments were performed in MRM (multiple reaction monitoring) mode, monitoring five fragments with optimal collision energies.

Pulmonary Function Tests

Pulmonary functions were measured by unrestrained whole body plethysmography individually in conscious, spontaneously breathing, freely moving animals repeatedly in a self-controlled manner. We did a baseline measurement on Week 0 (before the stress and cannabis exposure started) and subsequent measurements on Week 4 and Week 8 of the experimental procedures (**Figure 1**). Mice were placed in the chamber of a whole body plethysmograph (PLY 3211, Buxco Europe Ltd., Winchester, United Kingdom). The flow transducers (TRD5700, Buxco Europe Ltd., Winchester, United Kingdom) were connected to the preamplifier module, which digitized the signals via an analog-to-digital converter (MAX2270 Buxco Europe Ltd.). Ventilation parameters frequency (f), tidal volume (TV), time of inspiration (Ti), time of expiration (Te), minute ventilation (MV), peak inspiratory flow (PIF), and relaxation time (RT) were measured every 10 s for 2 min and averaged by the BioSystem XA Software for Windows (Buxco Research Systems). We also determined the enhanced pause (Penh) value, which is a calculated parameter [(expiratory time/relaxation time)-1]/(max. expiratory flow/max. inspiratory flow). This parameter characterizes bronchoconstriction, which was induced by nebulizing 50 μl of 22 mM carbachol (a muscarinic acetylcholine receptor agonist). Acquisitions were taken in a

2-min-long baseline period aerosolized with saline and then 15 min after carbachol inhalation.

Y Maze Test

The Y maze test was performed at the end of the 3rd experimental week (Figure 1) in an open Y-shaped maze placed on the ground with three 35 cm long gray plastic arms with 5 cm inner width (labeled A, B, and C) at 120° angle from each other lit from above. Mice were placed in the center of the maze and were allowed to freely explore the three arms for 5 min, their behavior was recorded with a video camera. Since mice generally prefer visiting a new arm of the maze and show a tendency to enter the less recently explored arm, the number of entries and triads (three consecutive visits of alternating arms) to calculate the spontaneous alternation were assessed afterward. Entries were counted when all four paws entered the arm.

Novel Object Recognition Test

The novel object recognition test (NOR) was performed on the 4th week of the experimental procedures (Figure 1) in an open arena (45 × 45 cm with 30-cm-high surrounding walls) lit from above. The test lasted for 3 days: on the first day animals were habituated to the new environment for 10 min. On the second day two identical objects smaller than the mice were placed in the arena and mice were allowed to explore the objects for 5 min. On the last day, exactly 24 h later one of the identical objects was replaced with another object with different shape and color, and the behavior of the mice was recorded with a video camera for 5 min. The parameters of discrimination index [(time spent with novel object – time spent with familiar object)/time spent with both objects] and recognition index (time spent with novel object/time spent with both objects × 100) were assessed afterward.

Open Field Test

The open field test (OFT) was performed at the end of the experimental procedures (Figure 1) in an open arena (45 × 45 cm with 30-cm-high surrounding walls) lit from above with a floor divided into 25 equal squares (9 × 9 cm). The test started by placing each mice individually into the center of the arena and then their behavior was recorded with a video camera for 5 min. The following parameters were analyzed afterward: time spent in the central fields (reciprocally proportional to the level of anxiety), locomotor activity (the time spent with moving), velocity (the ratio of the number of crossed squares/time spent with moving), time spent with grooming and grooming latency (time spent until the first grooming).

BrdU Injection, Fixation and Post Mortem Processing of the Brain Tissue

The thymidine analog 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States). BrdU was dissolved in sterile 0.9% saline (containing 0.007 N NaOH) at a concentration of 15 mg/ml. To study cell proliferation, a single BrdU injection (200mg/kg, ip)

was administered on the last experimental day. Animals were then perfused 24 h after the BrdU injection.

At the end of the experiment, mice were anesthetized deeply with a mixture of ketamine (Calypsol inj. 50 mg/ml, Richter Gedeon) and xylazine (Sedaxylan® inj. 20 mg/ml, Eurovet Animal Health BV) 100/10 mg/kg administered intraperitoneally and then perfused transcardially with ice cold physiological saline, followed by freshly prepared ice cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer.

Brains were removed from the perfused animals, postfixed in perfusate overnight and sectioned on a Leica VT1200 S fully automated vibrating blade microtome. Serial coronal sections were cut throughout the entire hippocampal formation along the septo-temporal axis. The 50-µm sections were collected in series and stored in 0.1 M phosphate buffer (pH = 7.4) with 0.05% sodium azide at 4°C until staining.

BrdU Immunocytochemistry

Every third section was slide-mounted on Superfrost slides (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany), and coded to ensure objectivity before processing for immunocytochemistry. Immunohistochemistry was performed according to our standard protocol (Czéh et al., 2001, 2002, 2007). The sections were first washed in 0.1M Tris-buffer and then the DNA was denaturated in 0.1M citric acid at pH 6.0 and 95°C for 20 min. After treating the sections with 1% H₂O₂ in Tris for 20 min, the samples were washed in 0.1M Tris, and then, the cellular membranes were permeabilized with 0.1% trypsin in 0.1M Tris for 10 min. After thorough washing in Tris, the sections underwent acidification in 2N HCl in Tris for 30 min. After repeated rinsing in 0.1M Tris and PBS, non-specific binding was prevented by incubating the sections for 1h in 5% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories, Burlingame, CA, United States) in PBS containing 0.5% Triton X-100 at 4°C. Subsequently, the sections were incubated for one night at 4°C with 1:5000 mouse anti-BrdU (DAKO, Clone Bu20a, Catalog # M074401) in the incubation solution (1% NGS, 0.5% Triton X-100 and 0.5% TWEEN-20 in PBS). After washing, the sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:200, Vector Laboratories, Catalog # BA-9200) for 1 h at 4°C, thoroughly washed, incubated in avidin-biotin-horseradish peroxidase (1:500; Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) for 2 h at 4°C and then washed again. BrdU-labeled cells were visualized in 0.025% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.01% H₂O₂ in PBS for 10 min. Sections were washed in PBS and counterstained with cresyl violet. After overnight drying at room temperature, the sections were dehydrated in graded alcohol, cleared in xylene and coverslipped with Eukitt.

Doublecortin (DCX) Immunocytochemistry

Immunohistochemistry was performed according to our standard protocol (Csabai et al., 2016). Free-floating sections were washed in 0.1M PBS and then treated with 3% H₂O₂ for 30 min. After thorough washing in PBS, non-specific binding

was prevented by incubating the sections for 1 h in 3% normal goat serum (NGS; Vector Laboratories) in PBS containing 0.5% Triton X-100. Subsequently, the sections were repeatedly rinsed in PBS for 1 h and incubated for one night at 4°C with a rabbit anti-DCX antibody (1:3000 Cell Signaling Technology Catalog # 4604). After thorough washing, the sections were incubated with anti-rabbit biotinylated secondary antibody (1:200; Vector Laboratories) for 2 h, washed and incubated in avidin-biotin-horseradish peroxidase (1:100; Vectastain Elite ABC Kit, Vector) for 2 h. Labeled cells were visualized in 0.025% 3,3'-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.01% H₂O₂ in PBS for 10 min. The sections were mounted, dried overnight and then dehydrated in graded alcohol, cleared and coverslipped with Eukitt. Slides were coded before quantification to ensure objectivity. Images were acquired on a Nikon Eclipse Ti-U workstation.

Quantification of Adult Born Cells in the Dentate Gyrus

Cells were counted manually. A single experimenter (KR) who was blind to the group identification of each animal performed the data collection. The code was not broken until the cell counting analyses were completed. Cell counting was done using the NeuroLucida (Version 7) reconstruction system (MicroBrightfield, Colchester, VT, United States) attached to a Nikon Eclipse bright field microscope.

The quantitative analysis was carried out using a modified unbiased stereology protocol that has been reported to successfully quantify adult-born neurons in the dentate gyrus (Eisch et al., 2000; Czéh et al., 2001, 2002; Csabai et al., 2016). The BrdU⁺ and DCX⁺ cells were counted in a systematic manner in complete series of 50 μm thick sections starting at a random position along the entire septo-temporal axis of the hippocampal formation (from -0.94 to -3.88 relative to Bregma, according to the atlas of Franklin and Paxinos (2008)). Every third section throughout the dentate gyrus was examined, yielding a mean of 25 sections per animal. All BrdU⁺ and DCX-labeled cells in the granule cell layer together with the subgranular zone, defined as a two-cell-body-wide zone along the border of the granule cell layer, were counted regardless of size or shape. Cells were examined under ×200 magnification, omitting cells in the outermost focal plane. The total number of BrdU⁺ or DCX⁺ cells was estimated by multiplying the number of cells counted in every third section by three. Neuron numbers are reported here as total neuron number/hemisphere.

DCX⁺ neurons were quantified similarly to the BrdU⁺ cells as described earlier (Csabai et al., 2016). We not only counted DCX⁺ cells, but also analyzed their morphology and cell migration. To examine cell migration, the neurons were selectively counted in the hilus, in the subgranular zone (sgz) and in the granule cell layer (gcl). The ratio of cells located in these three different cellular layers was expressed in percentage. Furthermore, we also counted the number of ectopic DCX⁺ neurons, i.e., cells which migrated out of the gcl into the molecular layer of the dentate gyrus. The morphological features of the DCX⁺ cells were quantified in two different ways. First,

we did a semi-quantitative analysis in the following manner: we analyzed every 3rd serial section from each animal yielding 25 ± 3 sections/animal. After thorough visual inspection, every section was marked in which we observed abnormal looking DCX⁺ neurons (i.e., cells with irregular, disarrayed dendritic arbor). Data are reported as the number of sections including cells with abnormal morphology/animal. Afterward, we quantified the DCX⁺ neurons which had the most pronounced atypical appearance, i.e., bipolar DCX⁺ cells and DCX⁺ neurons with basal dendrites.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean ± SEM. The data on body weights and pulmonary function tests were analyzed with three-way ANOVA (time × stress × cannabis treatment) followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test. The rest of the data was analyzed with two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test.

RESULTS

Analysis of the Marijuana Smoke and Urine Samples

We performed a HPLC analysis to determine the Δ9-THC, CBD and CBN content of the marijuana smoke used in this study. Furthermore, we collected urine samples from the mice that were exposed to marijuana smoke on the 6th and 7th week of the experimental protocol (Figure 1). Concentration of Δ9-THC, 11-nor-9-carboxy-THC, CBD and CBN was determined by SFC/MS-MS in the urine. Data are reported in Table 1. The measurements revealed that the marijuana smoke had about 10× higher concentration of Δ9-THC than CBD. This ratio was even higher (30×) in the urine samples. The amount of 11-nor-9-carboxy-THC (a major metabolite of Δ9-THC) was 1.8 ± 0.2 in the urine (Table 1).

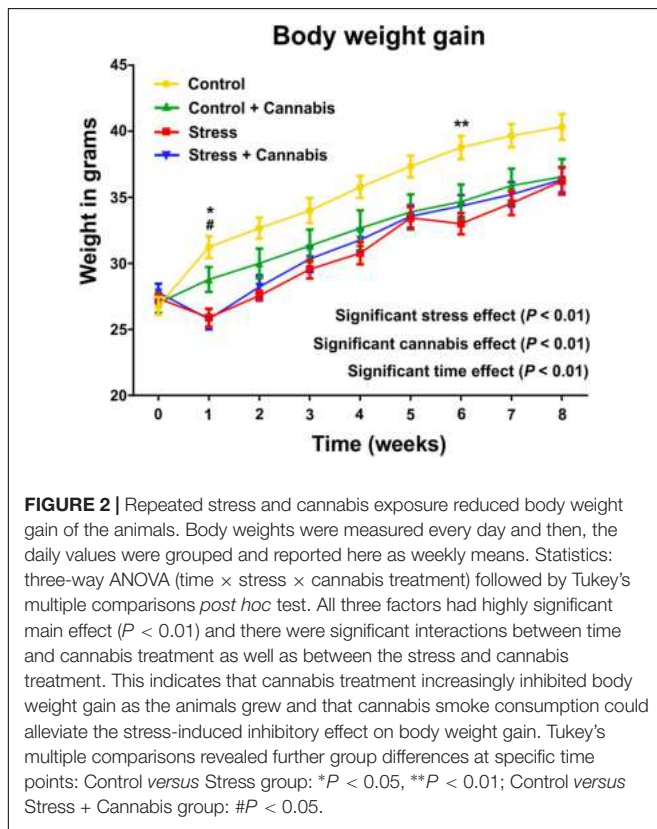
Stress and Cannabis Exposure Reduced the Body Weight Gain of the Animals

Body weights were determined every day and then, the daily values were grouped and reported here as mean body weight/week (Figure 2). Analysis with a three-way ANOVA (time × stress × cannabis treatment) revealed that all three factors had a significant main effect: time: $F(8,8) = 62.48$, $P < 0.001$; stress: $F(1,8) = 13.81$, $P < 0.002$; and cannabis treatment: $F(1,8) = 66.71$, $P < 0.001$. Furthermore, there were significant interactions between the following two factors: time × cannabis treatment: $F(8,8) = 2.11$, $P < 0.001$ and stress × cannabis treatment: $F(1,8) = 30.3$, $P < 0.01$. This indicates that cannabis treatment increasingly inhibited body weight gain as the animals grew and that cannabis smoke consumption could alleviate the stress-induced inhibitory effect on body weight gain. For the results of the *post hoc* comparisons on group differences please see Figure 2.

TABLE 1 | Cannabinoid concentrations in the marijuana smoke and urine samples.

	$\Delta 9$ -THC	CBD	CBN	11-nor-9-carboxy-THC
Marijuana smoke* (mg/mL)	0.427 ± 0.002	0.0358 ± 0.0011	0.258 ± 0.008	–
Urine samples (ng/mL)	65.6 ± 22.8	2.4 ± 0.6	41.9 ± 17.6	1.8 ± 0.2

*Chemical content of the smoke produced by burning 2 “joints” (2 × 0.77 g) of marijuana. Data are reported as mean ± SEM.



Stress Hindered the Maturation of Several Pulmonary Functions, but Marijuana Smoke Did Not Affect Lung Functions

We did repetitive lung plethysmography measurements in order to examine the effect of long-term stress and cannabis treatment on pulmonary functions. We hypothesized that long-term cannabis smoke exposure might affect lung functions. A baseline measurement was done on Week 0 (before the stress and cannabis exposure started) and subsequent measurements were done on Week 4 and Week 8 of the experimental procedures (Figure 1). Results of the plethysmography measurements are presented on Figure 3. Data were analyzed with a three-way ANOVA (time × stress × cannabis treatment) followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test. The main effects of the three-way ANOVA are presented in Table 2. Time (age) had the most pronounced effect on the pulmonary functional parameters. As the animals grew bigger all values of the pulmonary functions increased, except inhalation frequency,

which decreased during maturation. Chronic stress altered the development of several lung parameters, i.e., the frequency, minute ventilation, peak inspiratory flow, time of expiration, relaxation time and tidal volume. For these parameters the three-way ANOVA showed a significant main effect of stress as well as a significant time × stress interaction (Table 2). Chronic marijuana smoke exposure had no effect on any of the pulmonary functions except the carbachol-induced enhanced pause in breathing test (Table 2). The carbachol-induced enhanced pause is a functional parameter for the analysis of the bronchial hyper-reactivity of the lungs, correlating to the extent of airway inflammation. In this test bronchoconstriction is provoked by 50 μ l nebulized carbachol (22 mM).

Neither Stress, nor Marijuana Exposure Influenced Cognitive Behavior

The cognitive performance of the animals was evaluated using two different learning tests. We did a Y maze test at the end of Week 3 and a novel object recognition test at the end of Week 4 (Figure 1). Results of the cognitive tests are presented on Figure 4. At these time points, neither stress, nor marijuana exposure had any effect on the cognitive performance of the animals. In the Y maze, both the stressed and/or cannabis treated mice tended to make more errors, i.e., they entered to arms which have been recently visited, but statistically there were no difference between the groups (Figure 4A). In the novel object recognition test, the recognition index (time spent with novel object/time spent with both objects × 100) was similar for all experimental groups (Figure 4B). The cannabis treated animals had the tendency to have a lower discrimination index [(time spent with novel object – time spent with familiar object)/time spent with both objects], however, statistically this was not significant either (Figure 4A).

Anxiety-Related Spontaneous Locomotor Activity and Self-Grooming in the Open Field Test

We performed an OFT at the end of the experiment to evaluate the anxiety-related spontaneous locomotor activity and self-grooming behavior of the animals (Figure 1). Stressed mice spent less time in the center of the arena (Figure 5A). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed a significant main effect of stress [$F(1,32) = 6.33$, $P < 0.05$], but Tukey's *post hoc* test found no further group differences. Measurement of the velocity of the animals, i.e., the number of squares crossed during the time spent with movement, also revealed that stressed mice showed significantly reduced exploratory activity

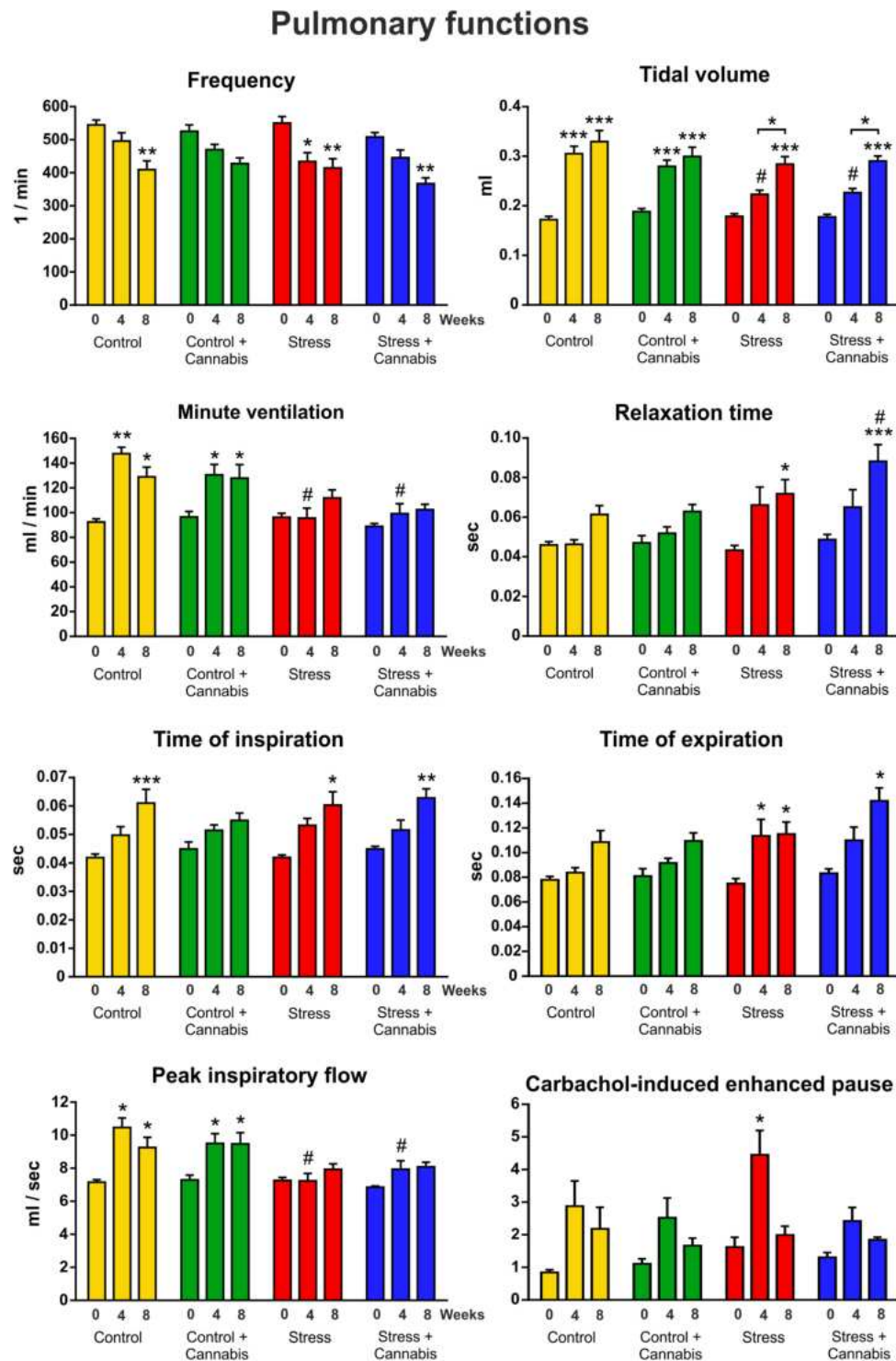


FIGURE 3 | The effect of repeated stress and cannabis exposure on pulmonary functions. We did repetitive whole body plethysmography measurements on freely moving animals. Baseline values were recorded on Week 0, before the stress and cannabis exposure started and then subsequent measurements were done on Week 4 and Week 8 of the experimental procedures. Time (age) had the most pronounced effect on lung functions. As the animals grew bigger almost all values increased. Chronic stress significantly blocked the maturation of several lung parameters (minute ventilation, peak inspiratory flow and tidal volume) whereas, the relaxation time and the time of expiration were increased. Results of the three-way ANOVA (time \times stress \times cannabis treatment) showed a significant main effect of stress and significant time \times stress interaction for these parameters. Marijuana smoke exposure affected only the carbachol-induced enhanced pause in breathing test. Tukey's multiple comparisons revealed further group differences: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to the value of Week 0 of the same treatment group. # $P < 0.05$ versus the Control group at the same experimental week.

TABLE 2 | Summary of the three-way ANOVA analysis (time × stress × cannabis treatment) of the pulmonary functional tests.

	Time (age)		Stress		Cannabis treatment		Interaction (time × stress)	
<i>f</i>	<i>F</i> = 35.95	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 4.38	<i>P</i> < 0.05	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MV	<i>F</i> = 18.94	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 33.1	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	<i>F</i> = 9.35	<i>P</i> < 0.001
Penh	<i>F</i> = 17.38	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	<i>F</i> = 3.99	<i>P</i> < 0.05	n.s.	n.s.
PIF	<i>F</i> = 17.55	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 26.24	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	<i>F</i> = 6.45	<i>P</i> < 0.01
RT	<i>F</i> = 20.50	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 12.71	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	<i>F</i> = 3.46	<i>P</i> < 0.05
Te	<i>F</i> = 25.69	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 10.28	<i>P</i> < 0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ti	<i>F</i> = 31.44	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
TV	<i>F</i> = 100	<i>P</i> < 0.001	<i>F</i> = 20.33	<i>P</i> < 0.001	n.s.	n.s.	<i>F</i> = 7.16	<i>P</i> < 0.01

Only the main effects of the three-way ANOVA are presented here. The results of the pulmonary functional tests are shown on **Figure 3**. *f*, frequency; MV, minute ventilation; n.s., non-significant; Penh, enhanced pause (induced by 22 mM carbachol); PIF, peak inspiratory flow; RT, relaxation time; Te, time of expiration; Ti, time of inspiration; TV, tidal volume.

(**Figure 5B**). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) yielded a significant main effect of stress [$F(1,32) = 5.07$, $P < 0.05$]. Cannabis treatment had no effect on these parameters, although animals exposed to marijuana smoke tended to spend more time in the center of the arena. However, cannabis treatment had a pronounced effect on self-grooming behavior (**Figures 5C,D**). Both the stressed and cannabis treated mice spent significantly more time with grooming. Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed a significant main effect of stress [$F(1,32) = 4.17$, $P < 0.05$], and a significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 6.11$, $P < 0.05$], but no interaction between the two factors. Furthermore, Tukey's multiple comparisons *post hoc* test revealed a significant difference between the Control and Stress + Cannabis treated groups ($q = 4.51$, $P < 0.05$) (**Figure 5C**). In addition to that, stressed and/or cannabis treated mice started the self-grooming much earlier than control mice (**Figure 5D**). We measured grooming latency and two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed a significant main effect of stress [$F(1,32) = 4.71$, $P < 0.05$], and a significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 6.89$, $P < 0.05$], but no interaction between the two factors. Tukey's *post hoc* test revealed a significant difference between the Control and Control + Cannabis groups ($q = 4.02$, $P < 0.05$), as well as between the Control and Stress + Cannabis treated groups ($q = 4.60$, $P < 0.05$) (**Figure 5D**).

The Stress-Induced Inhibition of Cell Proliferation in the Dentate Gyrus Was Not Influenced by Cannabis Smoke Exposure

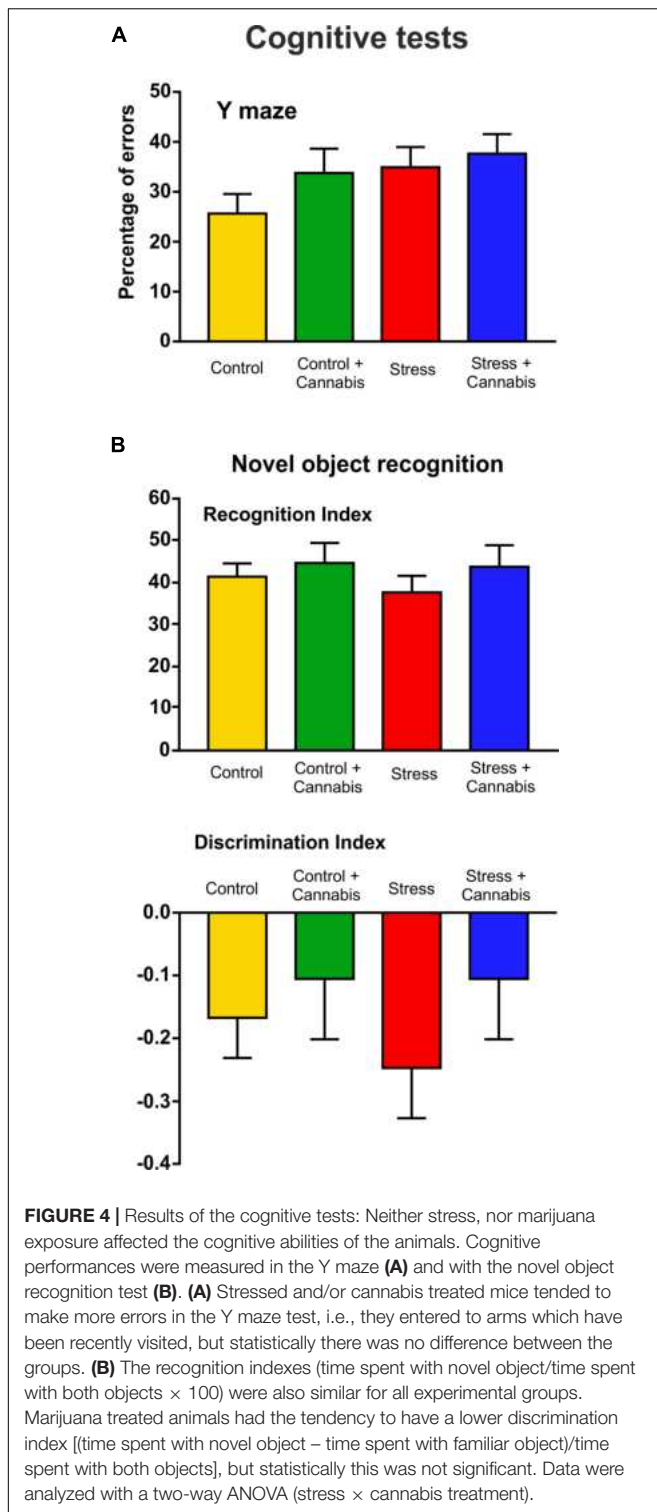
Cell proliferation in the dentate gyrus was visualized with use of the exogenous proliferation marker BrdU (**Figures 6A–D**). Stress significantly reduced the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus (**Figure 6E**). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed a significant main effect of stress [$F(1,32) = 4.43$, $P < 0.05$]. The number of BrdU-positive cells were also fewer in the dentate gyrus of mice of the Control + Cannabis group, but cannabis treatment had no statistically significant effect on cell proliferation.

Cannabis Smoke Exposure Had a Pronounced Effect on the Number, Morphology and Migration of the Doublecortin-Positive Immature Neurons

The population of immature neurons was visualized with DCX-immunohistochemistry (Brown et al., 2003; Rao and Shetty, 2004, **Figure 7**). Stress had no effect, but cannabis treatment significantly reduced the number of DCX-positive neurons in the dentate gyrus (**Figure 8A**). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed a highly significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 18.86$, $P = 0.0001$]. Tukey's *post hoc* test revealed further differences between the Control and Control + Cannabis ($q = 4.50$, $P < 0.05$) and between the Stress and Stress + Cannabis treated groups ($q = 4.19$, $P < 0.05$) (**Figure 8A**).

During the quantitative analysis of the DCX+ neurons we noticed that in the dentate gyrus of cannabis treated mice, DCX+ cells often had an unusual or abnormal appearance (**Figure 9**). For example, cannabis treatment significantly altered the dendritic morphology of the DCX+ cells. Many DCX+ cells lost their dendritic DCX-expression (**Figure 9B**) and occasionally we observed bipolar DCX+ neurons (**Figure 9E**), or cells with basal dendrites (**Figures 9B,G**). In order to quantify these morphological changes of the DCX+ cells, we quantified the number of sections/animal where we could find DCX+ neurons with abnormal appearance (**Figure 8B**). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) revealed that cannabis treatment had a significant main effect [$F(1,32) = 8.35$, $P = 0.01$] indicating that the incidence of DCX+ cells with abnormal appearance was significantly higher in the cannabis treated animals (**Figure 8B**).

We also quantified cell migration of the DCX+ cells. In control mice, the majority, i.e., >90% of the DCX+ immature neurons, were located in the germinative subgranular zone (sgz). A small percentage, i.e., <5% of the cells, migrated out of the sgz either to the granule cell layer (gcl) (**Figure 8C**), or some cells were also found in the hilus (**Figure 8D**). This ratio was significantly altered by the marijuana exposure. In the cannabis treated animals, >15% of the DCX+ cells were found outside of the sgz (**Figure 8E**). Two-way ANOVA (stress × cannabis treatment) yielded a highly significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 15.87$, $P < 0.001$], a significant main effect



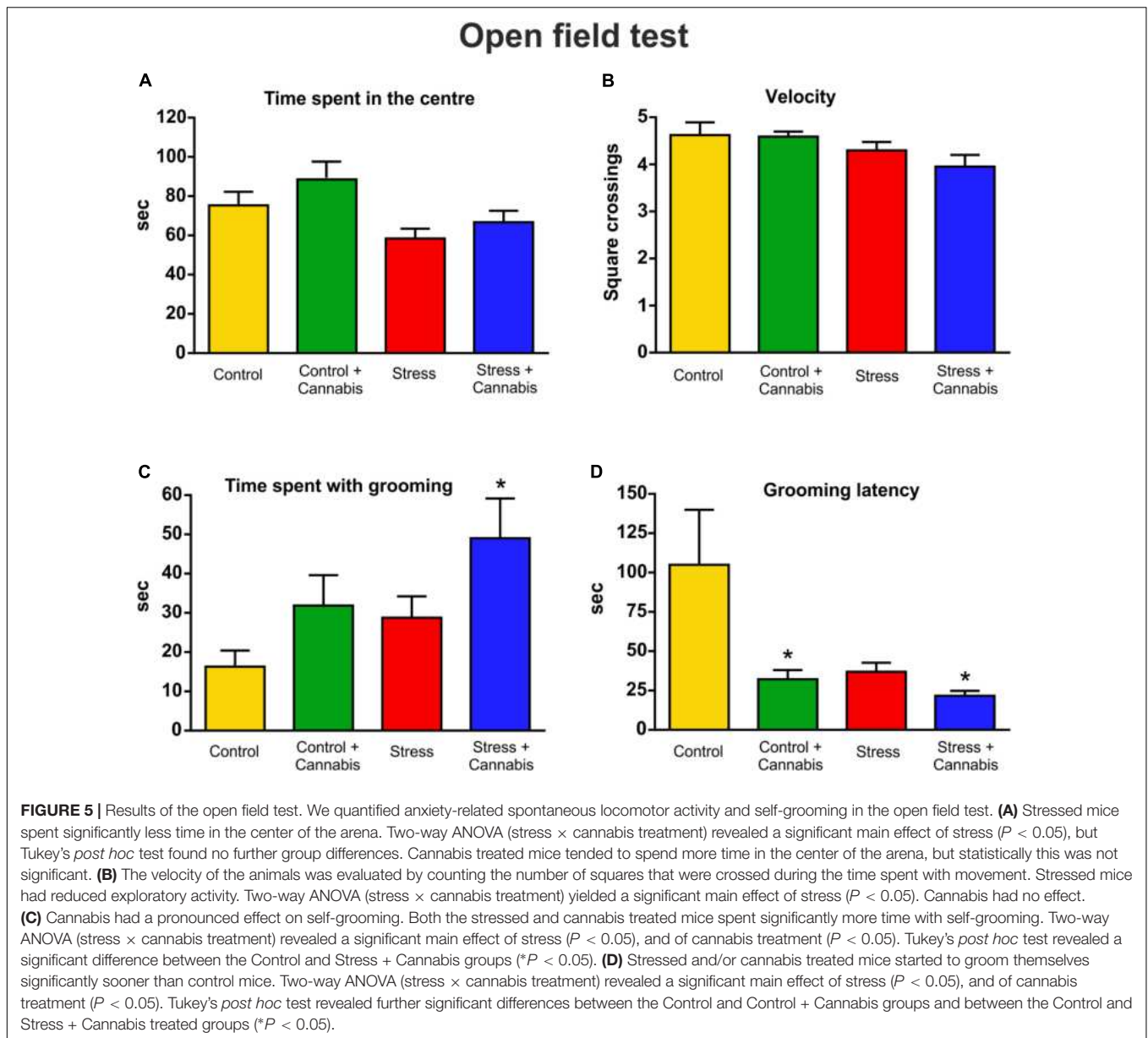
of stress [$F(1,32) = 5.46$, $P < 0.05$], and a significant interaction between the two factors [$F(1,32) = 5.96$, $P < 0.05$]. Furthermore, Tukey's *post hoc* test revealed significant differences between the Control and Control + Cannabis ($q = 6.42$, $P < 0.001$), Stress versus Control + Cannabis treated groups ($q = 6.32$, $P < 0.001$),

and between the Stress + Cannabis and Control + Cannabis treated groups ($q = 4.78$, $P < 0.01$) (Figure 8E).

Quantitative data on the incidence of DCX+ cells with abnormal appearance is shown on Figure 10. Cannabis treatment significantly increased the percentage of bipolar DCX+ cells. Two-way ANOVA (stress \times cannabis treatment) yielded a highly significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 41.36$, $P < 0.001$], and Tukey's *post hoc* test revealed significant differences between the Control and Control + Cannabis ($q = 5.75$, $P < 0.01$), Control versus Stress + Cannabis groups ($q = 6.90$, $P < 0.001$), and between the Stress and Stress + Cannabis groups ($q = 4.26$, $P < 0.05$) (Figure 10A). Cannabis treatment also increased the frequency of ectopic DCX+ cells, i.e., the incidence of cells that were found in the molecular layer of the dentate gyrus (Figures 9G, 10B). The number of DCX+ neurons with basal dendrites was also much higher in the cannabis treated animals (Figure 10C). Two-way ANOVA (stress \times cannabis treatment) revealed a highly significant main effect of cannabis treatment [$F(1,32) = 22.45$, $P < 0.001$], a significant main effect of stress [$F(1,32) = 19.75$, $P < 0.001$], and also a significant interaction between the two factors [$F(1,32) = 21.10$, $P < 0.001$]. Furthermore, Tukey's *post hoc* test revealed further significant group differences between the Control and Control + Cannabis treated groups ($q = 8.87$, $P < 0.001$), between the Stress and Control + Cannabis groups ($q = 8.47$, $P < 0.001$), and between the Control + Cannabis and Stress + Cannabis treated groups ($q = 8.47$, $P < 0.001$).

DISCUSSION

The principal aim of the present study was to model regular marijuana consumption of humans in an experimental setting. Since most of the users are young people who claim that they consume cannabis to relax from everyday stress therefore, we exposed young experimental mice to daily stress and concomitant cannabis smoke. While most experimental studies inject synthetic cannabinoids, we decided to use marijuana smoke exposure, because smoking is the most typical route of application in humans. Furthermore, we did a long-term, repeated exposure for 8 weeks, using daily restraint stress for 6 h/day and exposing animals to the smoke of 4 "joints"/day during the end of the restraint stress. Our results demonstrate that both stress and cannabis exposure significantly reduced body weight gain of the animals. However, cannabis could alleviate the stress-induced reduction of body-weight gain. We expected to see marijuana-induced changes in pulmonary functions, but instead it was the chronic stress which inhibited the maturation of most of the lung functions. In the behavioral tests measuring the cognitive performance of the animals, neither stress, nor cannabis treatment had any effect after 3 or 4 weeks of exposure. In the OFT, where we evaluated the anxiety related behavior of the animals after 8 weeks of treatment, stress had an anxiogenic effect, while cannabis had only a mild tendency to reverse the stress-induced anxiety. Marijuana however had a strong effect on self-grooming. Cannabis treated mice started to groom themselves



much sooner than controls and also spent significantly more time with grooming. Finally, we examined adult hippocampal neurogenesis and we found that chronic stress – as expected – blocked progenitor cell proliferation in the dentate gyrus, but marijuana smoking had no influence on that. In contrast to that, cannabis smoke exposure had a pronounced effect on the doublecortin-positive immature neurons. Cannabis significantly reduced the number of DCX+ neurons in the dentate gyrus, stimulated their migration and the dendritic morphology of the cells was also profoundly altered by the marijuana treatment. In sum, with this experimental design we found that long-term exposure to cannabis smoke had either no effect or negative impact on various health-related measures.

Cannabis contains over 500 different compounds (ElSohly and Gul, 2014), but the potency of marijuana is usually judged

based on the $\Delta 9$ -THC content of the preparation. We did a HPLC analysis to assess the major components of the cannabis smoke which was used in this experiment. Results of this analysis revealed that the $\Delta 9$ -THC content was 10-fold higher than its CBD content (Table 1). This difference was even more pronounced in the urine samples, where the $\Delta 9$ -THC content was 30-fold higher than the CBD content. Several reports indicate that the potency of marijuana sold on the streets has increased dramatically over the past few decades (Mehmedic et al., 2010; ElSohly et al., 2016) and it has been suggested that this increase in potency has been the reason for the rising emergency department visits involving marijuana use in the US (Data Spotlight, 2012).

Our principal aim was to mimic the regular cannabis consumption of humans. However, it is very difficult to define the average frequency of cannabis use in the general population.

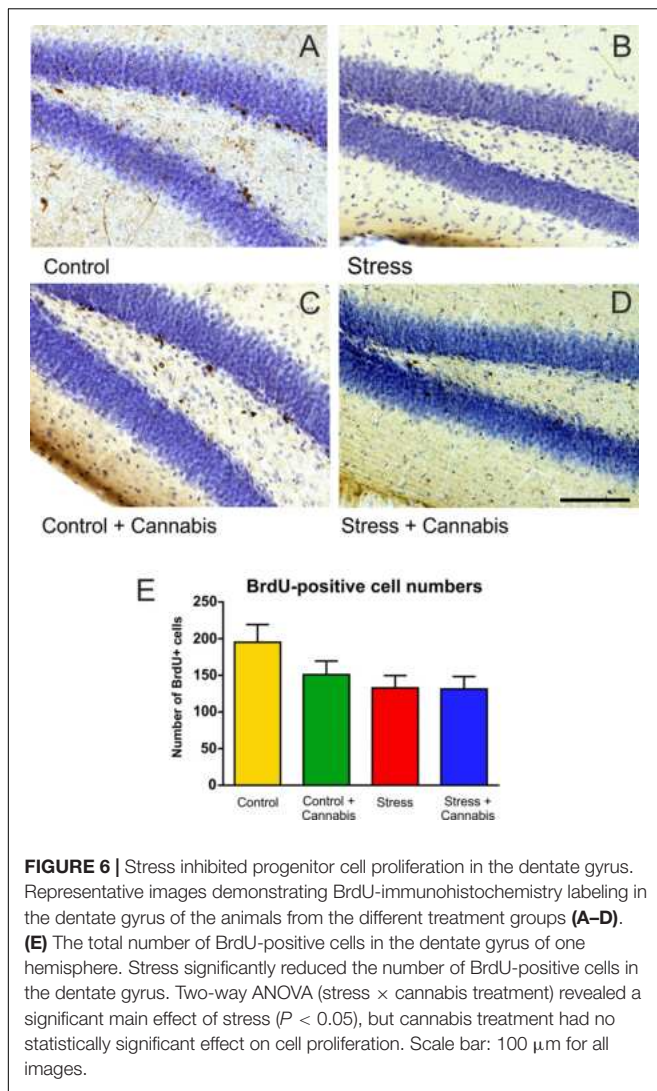


FIGURE 6 | Stress inhibited progenitor cell proliferation in the dentate gyrus. Representative images demonstrating BrdU-immunohistochemistry labeling in the dentate gyrus of the animals from the different treatment groups (A–D). (E) The total number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus of one hemisphere. Stress significantly reduced the number of BrdU-positive cells in the dentate gyrus. Two-way ANOVA (stress \times cannabis treatment) revealed a significant main effect of stress ($P < 0.05$), but cannabis treatment had no statistically significant effect on cell proliferation. Scale bar: 100 μm for all images.

A recent US survey documented that 3–4% of all primary care patients in Washington State report on a daily use, and 10–14% of them consume cannabis at least once a week or month (Lapham et al., 2017). Young adults (aged 18–29 years) use cannabis much more frequently and 6–12% of them report to consume it on a daily basis and 25–30% of them use it at least once a week or month (Lapham et al., 2017). US citizens, who consume cannabis regularly, report to use an average of 9.4 ± 9.7 joints weekly (1–60 joints/week) (Goodwin et al., 2008). From this perspective the regimen of cannabis exposure that we used, i.e., 4 joints/day (20 joints/week) was rather strong. Furthermore, we determined the THC/CBD/CBN and carboxy-THC concentrations in the urine of the mice. Our present cannabis treatment protocol resulted in a low (2 ng/mL) urine concentration of carboxy-THC. According to the guidelines of the Mayo Clinic, the presence of carboxy-THC in human urine samples at concentrations > 15.0 ng/mL is a strong indicator that the patient has used marijuana. The presence of carboxy-THC in urine > 100.0 ng/mL indicates relatively recent use, probably

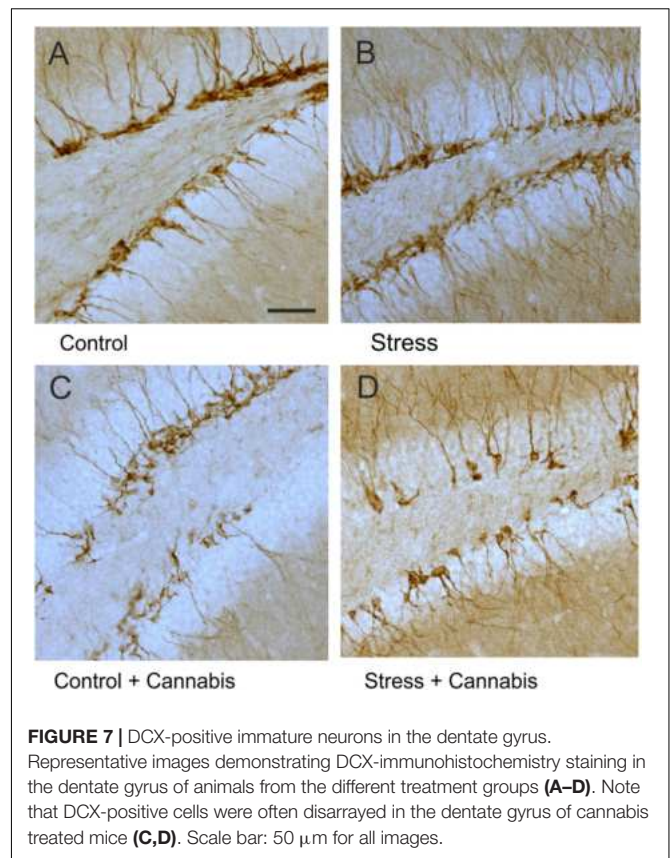
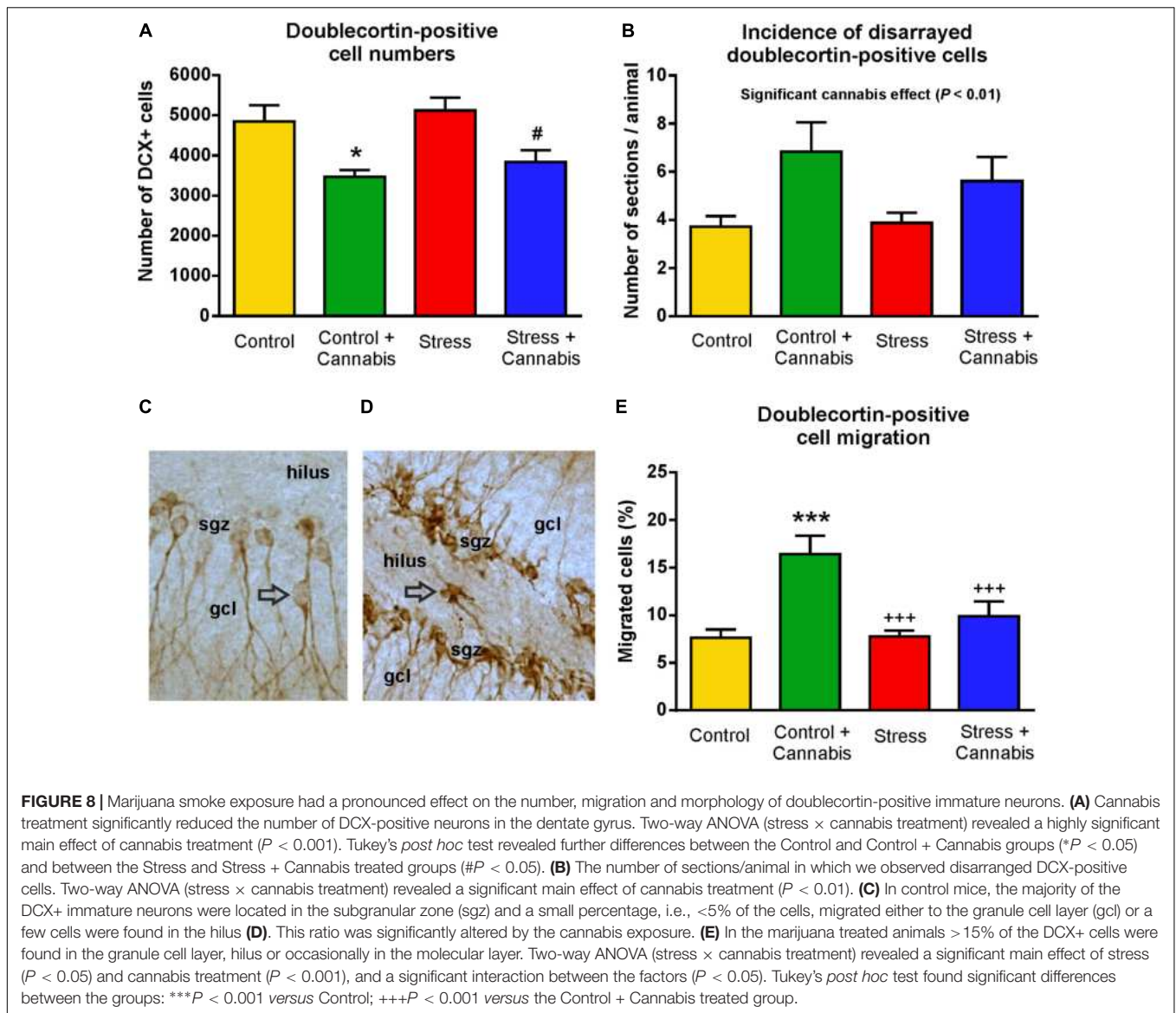


FIGURE 7 | DCX-positive immature neurons in the dentate gyrus. Representative images demonstrating DCX-immunohistochemistry staining in the dentate gyrus of animals from the different treatment groups (A–D). Note that DCX-positive cells were often disarrayed in the dentate gyrus of cannabis treated mice (C,D). Scale bar: 50 μm for all images.

within the past 7 days. Levels of > 500.0 ng/mL suggest chronic and recent use¹. In this comparison, our cannabis exposure regimen was modest. However, it should be emphasized that the drug metabolism rate of mice is much higher compared to humans. We are not aware of any study that evaluated the amount of marijuana smoke exposure that is necessary to reach serum or urine concentrations of THC/CBD/CBN and carboxy-THC comparable to the human samples. It has been documented that rats have to be exposed to the smoke of 60 cigarettes/day to reach serum levels of nicotine and cotinine that is comparable to human cigarette smokers (Small et al., 2010; Bruijnzeel et al., 2011). However, to apply such a high dose would be technically impossible for us and also we would not get an ethical permission to expose animals to e.g., 60 joints/day over a 2-month period.

The clinical findings describing the effects of marijuana on the body and mind are often conflicting. For example, cannabis is known to stimulate appetite and potentially promote weight gain in patients with cancer of HIV (Abrams and Guzman, 2015; Kramer, 2015) whereas, the large epidemiological studies involving the general population consistently report that users of marijuana tend to have lower body mass indices (Sansone and Sansone, 2014). Therefore, it is important that the well-controlled experiments should aim to mimic real life situations as much as possible. In our experiment, both cannabis smoke and stress

¹<https://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/8898>



reduced the body weight gain of the animals, and in this case we found a significant interaction between these two factors. This means that cannabis treatment could alleviate the stress-induced inhibitory effect on body weight gain.

Marijuana smoke contains many of the same toxins and carcinogens as tobacco smoke and thus, irritates the respiratory system similarly to tobacco. Clinical studies indicate that regular cannabis smoking alone is associated with airway inflammation (Jett et al., 2018). In our recent experimental study, daily marijuana inhalation for 4 months resulted in inflammation, tissue destruction, and emphysema (Helyes et al., 2017). In the present study, cannabis smoke did not affect any of the pulmonary functions. Notably, a large clinical study in the US could not find any adverse spirometric changes with cumulative lifetime marijuana use of up to 20 joint-years either (Kempker et al., 2015). In our present study, it was the repeated stress exposure that inhibited the development of several pulmonary

functions. To our best of knowledge, ours is the first study to reveal such negative effect of chronic stress on pulmonary functions. We could not find any comparable experimental data in the literature. However, human studies document that experiencing psychological stress in children is significantly associated with asthma morbidity (Chen et al., 2006). Preclinical studies reported that chronic stress in mice can result in pneumonia (Kiank et al., 2008) and can worsen allergic airway inflammation (Okuyama et al., 2007).

Several research groups investigated the behavioral effects of marijuana smoke or specific cannabinoid molecules in the OFT (e.g., Bruijnzeel et al., 2016; Murphy et al., 2017; Tomas-Roig et al., 2018). These studies report on mixed results. Repeated daily injection of Δ^9 -THC into adolescent or adult CD1 mice had no behavioral consequences in the OFT (Murphy et al., 2017). Injection of the CB1/CB2 receptor agonist WIN 55,212-2 to C57Bl6/J mice resulted in reduced locomotor activity, but

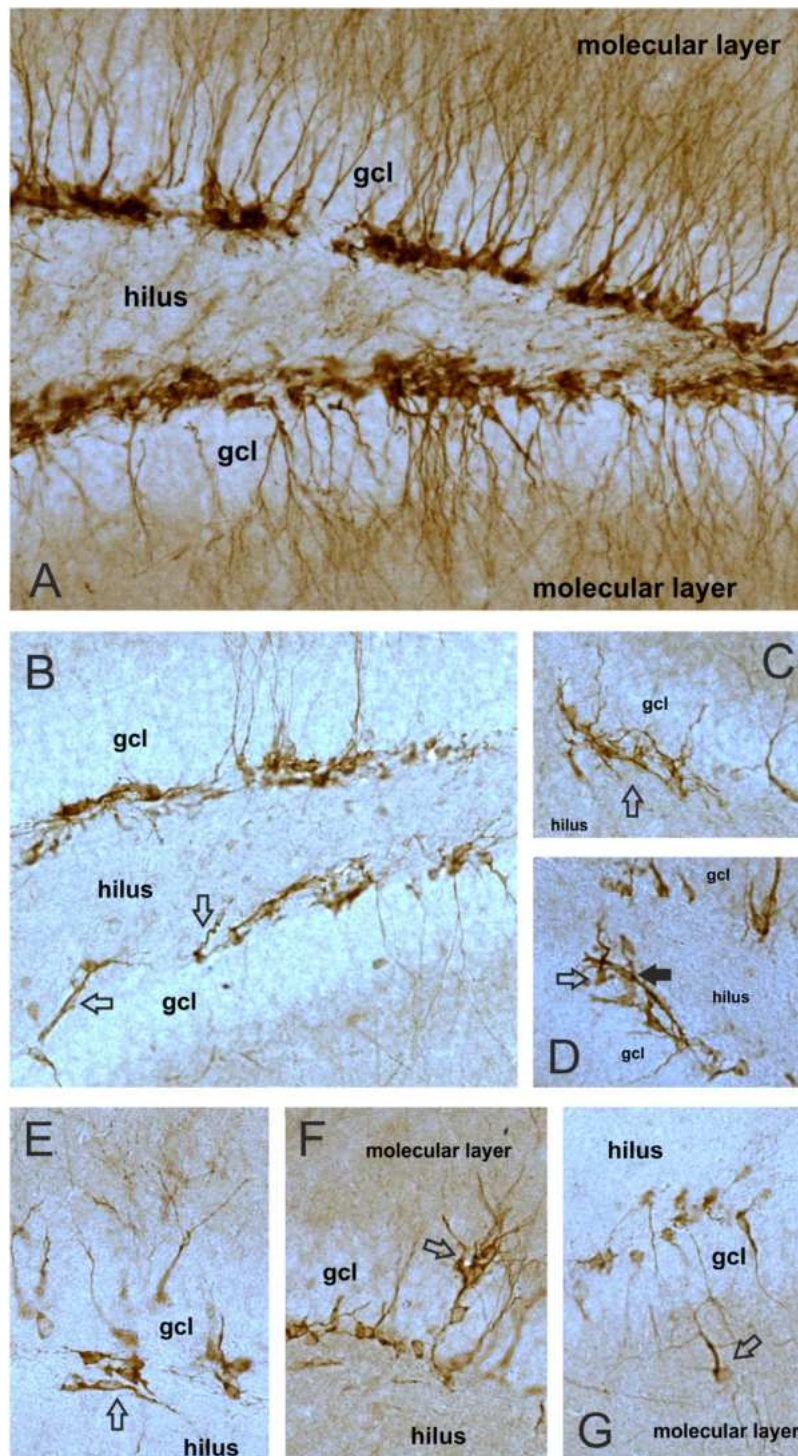
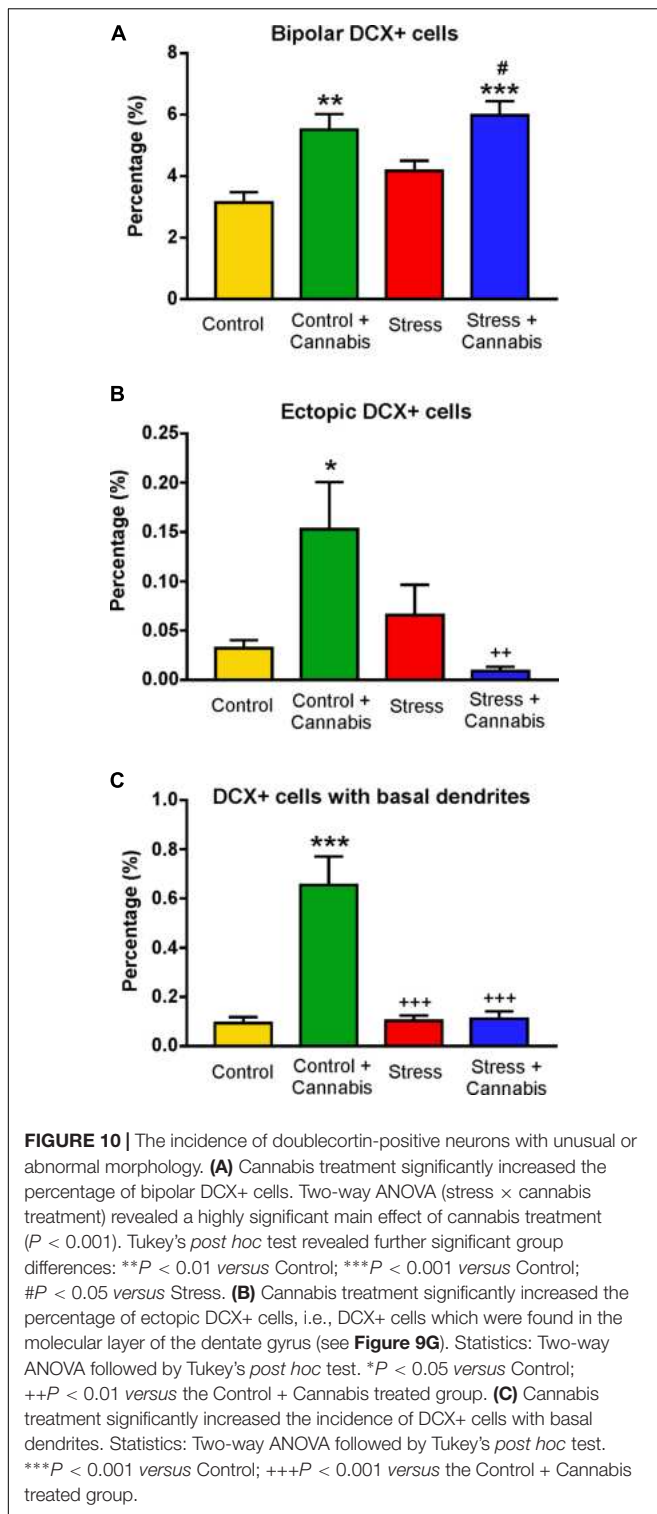


FIGURE 9 | Long-term cannabis exposure alters the morphology of DCX-positive neurons. Representative images demonstrating DCX+ immature neurons with normal appearance in a control animal (A) and cells with abnormal morphology in cannabis treated mice (B–G). (A) In control mice almost all the DCX+ neurons were located in the subgranular zone, i.e., in a cell layer between the hilus and granule cell layer (gcl). Normal DCX+ cells had DCX-expressing dendrites projecting through the gcl and arborized in the molecular layer. The principal dendrites were typically running parallel to each other in the gcl giving an orderly, well-aligned appearance to the neurons. (B) DCX+ neurons in the cannabis treated animals often lost their dendritic DCX-expression. Arrows point to neurons with abnormal dendritic projections into the hilus. (C) DCX+ neurons with dendrites projecting into all directions, giving a disorganized, chaotic appearance to the neurons. (D) Open arrow points to a neuron with basal dendrites, i.e., with dendritic projections into the hilus. Black arrow points to a cell with bipolar appearance. (E) A bipolar DCX+ neuron in the hilus with dendritic projections running parallel to the gcl. (F) Neurons migrating out of the gcl into the molecular layer. (G) An ectopic DCX+ neuron with basal dendrite that migrated completely out of the gcl into the molecular layer. All images were taken with the same magnification (20× objective).



had no effect on distance traveled in the center of the open field (Tomas-Roig et al., 2018). In rats, acute cannabis smoke exposure induced a brief increase in locomotor activity which was then followed by a prolonged decrease in locomotor activity and rearing (Bruijnzeel et al., 2016). In our study, cannabis

smoke exposure had no effect on locomotor activity or on anxiety-related behavior. Marijuana smoke also did not alter the anxiogenic effect of repeated stress. However, cannabis smoke had a pronounced effect on self-grooming. Both stressed and cannabis treated mice spent significantly more time with self-grooming and they also started to groom themselves significantly sooner than control mice. Self-grooming is a complex innate behavior of rodents which is regulated by several neural circuits. Aberrant self-grooming has been described in animal models of several neuropsychiatric disorders including substance abuse (Kalueff et al., 2016). The same review also suggested that self-grooming has a great value for translational neuroscience, since each disease model may result in a distinct grooming phenotype (Kalueff et al., 2016). Our present study supports the notion that the microstructure of self-grooming should be investigated in more detail, because abnormal grooming behavior could signal the stress or anxiety level of the animals in the specific models (Kalueff et al., 2007).

The effect of cannabis use on the cognitive performance of the individual is probably the most ambiguous issue. Recent data suggest that cannabis use can improve various cognitive and executive functions (Osborne et al., 2017; Tervo-Clemmens et al., 2018; Gruber et al., 2018), while others claim that it impairs cognition (Volkow et al., 2014, 2016; Broyd et al., 2016; Curran et al., 2016). In this experiment, we could not detect any (positive or negative) effect of marijuana smoke exposure on the cognitive performance of the animals in the novel object recognition and Y maze tests. It has been argued that a potential explanation for the conflicting data in the literature is the different ratio of Δ^9 -THC and CBD content in the marijuana samples used in the experiment (Fadda et al., 2004). Data suggests that high Δ^9 -THC or low CBD cannabis results in greater cognitive impairment (Colizzi and Bhattacharyya, 2017; Murphy et al., 2017). In our case, the cognitive tests were done at the end of the 3rd and 4th week (**Figure 1**) and it might be that the cannabis exposure was too short at these time points to result in a detectable difference. Probably, it might have been better to do the cognitive testing at the end of the experiment which would have also allowed us to directly compare the cognitive performance of the animals with the findings on adult neurogenesis. The reason why we did not do the cognitive testing at the end of the experiment was that it is known that learning can affect the process of adult neurogenesis (Gould et al., 1999) and we wanted to avoid too many testing at the end of the experiment that could interfere with each other and with neuroplasticity.

Neurogenesis in the adult hippocampal dentate gyrus is a special form of neuroplasticity that has been implicated in various physiological and pathophysiological conditions including substance abuse (Eisch et al., 2000; Mandym et al., 2008; Noonan et al., 2010; Bayer et al., 2015). It is well documented that the endocannabinoid system and the CB1 cannabinoid receptor mediate neural progenitor cell proliferation and neurogenesis (e.g., Aguado et al., 2005, 2007). Numerous studies investigated the effect of cannabinoids on adult hippocampal neurogenesis (reviewed recently by Prenderville et al., 2015), but to our best of knowledge, none of these studies used cannabis smoke exposure, instead they

all injected synthetic cannabinoids or plant-derived extracts to the experimental animals. There have been numerous reports on a positive, stimulatory effect of cannabinoid treatment on adult neurogenesis (Jiang et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Marchalant et al., 2009; Wolf et al., 2010; Rivera et al., 2011; Suliman et al., 2018). Furthermore, several reports suggested that facilitation of the cannabinoid signaling in the hippocampus may prevent stress-induced behavioral changes (Campos et al., 2013; Scarante et al., 2017; Fogaça et al., 2018). In our present study, chronic stress – as expected – reduced cell proliferation in the dentate gyrus, but cannabis smoke had no influence on this effect of stress. However, marijuana smoke had a distinct effect on the DCX+ cells, by reducing their number and affecting their morphology and migration. In the literature, one can find controversial data on the influence of cannabinoids on DCX+ neurons. In non-stressed Swiss mice, repeated administration of CBD at a lower dose (3 mg/kg) increased the number of DCX+ cells, but at a higher dose (30 mg/kg) it had a negative effect (Schiavon et al., 2016). Another study demonstrated that when CBD was fed to female C57Bl/6 mice it stimulated adult neurogenesis, whereas $\Delta 9$ -THC had no such effect (Wolf et al., 2010). Yet, more recently, it was shown that injection of $\Delta 9$ -THC to rats can stimulate adult neurogenesis (Suliman et al., 2018). Another study reported that daily injection of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 for 3 weeks to adolescent rats reduced the number of newly generated neurons in hippocampus (Abboussi et al., 2014).

To our best of knowledge, so far there was only one research group which carried out experiments where stress was combined with cannabinoid treatment and the consequences on behavior and hippocampal neuroplasticity were investigated. Guimarães and co-workers used chronic unpredictable stress (CUS) in combination with repeated injection of pure CBD and reported on a pronounced anxiolytic effect of CBD treatment which could also normalize the stress-induced inhibition of hippocampal progenitor cell proliferation and neurogenesis, i.e., it reversed the stress-induced reduction of BrdU- and DCX-positive cell numbers (Campos et al., 2013). In their more recent study, they replicated and extended these findings by demonstrating that CBD treatment can prevent the stress-induced inhibitory effects on adult neurogenesis via the activation of CB1/CB2 receptors (Fogaça et al., 2018). Our present experiment could not replicate these findings. There are several possible explanations for this: (1) The Guimarães group used a different stress protocol which lasted only for 14 days (Campos et al., 2013; Fogaça et al., 2018). It might be, that our stress protocol was too aggressive and/or lasted too long, as it was 4× longer than the protocol of the Guimarães group. (2) The Guimarães group treated their animals with pure CBD, whereas in our case the marijuana smoke included hundreds of molecules and had high $\Delta 9$ -THC content (10:1 ratio of $\Delta 9$ -THC : CBD content). Thus, it might be that in our case the high $\Delta 9$ -THC content concealed the beneficial effects of the CBD.

In the present experiment, marijuana reduced the number DCX+ cells, stimulated their migration and significantly altered their dendritic architecture. Future investigations are needed to

determine whether these cellular changes should be considered as positive or negative effects. Previous studies reported that CBD application can increase DCX+ cell numbers in various experimental conditions (Schiavon et al., 2016; Mori et al., 2017). Another study comparing the effects of $\Delta 9$ -THC with CBD found that $\Delta 9$ -THC can reduce DCX+ cell numbers (Wolf et al., 2010, but see also Suliman et al., 2018). High $\Delta 9$ -THC content of our sample might explain our finding on reduced DCX+ cell numbers. Other research group also documented that CBD treatment can stimulate DCX+ cell migration from the subgranular zone to the granular zone of dentate gyrus (Fogaça et al., 2018). This finding is in harmony with the knowledge that endocannabinoids play an important role during brain development regulating cell proliferation, migration, differentiation and survival (Harkany et al., 2007). A recent developmental study provided further evidence that prenatal exposure to the CB1/CB2 receptor agonist WIN 55,212-2 can alter the migration of early-born neurons in the cerebral cortex (Saez et al., 2014). To our best of knowledge our present data is the first to report on altered dendritic architecture of DCX+ cells in response to cannabinoid treatment. Normal DCX+ cells have DCX-expressing dendrites which project through the granule cell layer to the molecular layer. In contrast to that, we observed numerous DCX+ cells which lost their dendritic DCX-expression in the marijuana treated animals. Furthermore, in the cannabis treated animals, we observed an increased occurrence of bipolar DCX+ cells and cells with basal dendrites. It is known from the literature that basal dendrites on dentate granule cells can be induced by epileptic seizures (Ribak et al., 2012; Hester and Danzer, 2014) thus, the presence of such cells suggests abnormal neuronal circuitry, or cellular niche. We also found higher frequency of ectopic DCX+ cells in the cannabis treated animals. One possible explanation for the fact that previous studies did not report on such abnormal looking cells after cannabinoid treatment is that our analysis was much more careful and thorough compared to the previous studies. Most studies examine only 5–6 sections/animal, whereas we examined every 3rd sections from the serially cut hippocampus, yielding in average 25 analyzed sections/animal.

However, the present study has some limitations. As we already discussed, it is very difficult to find a marijuana dosage that is truly comparable to the human situation. Human consumption habits are highly variable and mice have a much higher metabolic rate compared to humans which makes it very difficult to reach comparable serum or urine concentrations of cannabinoid metabolites. Not to mention the fact that street marijuana samples have highly variable potency and efficacy. We cannot rule out the possibility that using a higher dose of cannabis, or a different sample having a different potency/efficacy could result in a different outcome in a similar experimental setting. We do not question that treatment with CBD has a positive effect in stressed animals as it has been well documented by others (e.g., Campos et al., 2013; Fogaça et al., 2018). Furthermore, employing other type of stress protocols may also yield different results. It is possible that in our study the stress procedures were too severe for the animals and that was the

reason why cannabis treatment could not alleviate the stress-induced effects.

To our best of knowledge, this is the first experimental study to combine chronic stress exposure with concomitant cannabis smoke inhalation. We report here that long-term exposure to these factors can influence several health-related measures, but our present experimental design could not reveal any significant interaction between these two factors (except for body weight gain). We report here for the first time, that chronic cannabis smoke can significantly alter the morphology of DCX+ neurons in the dentate gyrus and this finding deserves further investigations. In the present experiment, chronic cannabis smoke had either no effect or negative impact on the physical and mental condition of the animals. We should however, emphasize that modeling cannabis smoke consumption in experimental animals is a difficult issue, because (1) human smoking habits can be extremely variable, (2) rodents have a much higher metabolic rate, therefore, it is very difficult to apply cannabis smoke in dosage that results in a serum or urine concentrations of cannabinoid metabolites that are comparable to humans. Finally, the present study cannot rule out the possibility that application of different doses of cannabis smoke or pure CBD treatment may yield a different outcome in a similar experimental setting.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BC, ZH, and KC had the experimental concepts and designed the experiments. KR did the behavioral tests, DCX-immunohistochemistry and all cell counting, and prepared

the figures for the paper. KC carried out the treatment procedures, behavioral tests, and data analysis. ZV analyzed the behavioral data of the NOR and OFTs. DC did the BrdU-immunohistochemistry. AB did the HPLC analysis on the cannabis smoke. MM and ZK measured metabolites in the urine samples. All authors contributed to the writing of the paper and/or revising it critically for important intellectual content. All authors approved the final version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

This work was financially supported by the following grant agencies: Hungarian Brain Research Program (KTIA_NAP_13-2-2014-0019 and 20017-1.2.1-NKP-2017-00002) and EU Social Funds (EFOP-3.6.2-16-2017-00008 “The role of neuroinflammation in neurodegeneration: from molecules to clinics” and GINOP-2.3.2-15-2016-00048 “Stay Alive”). These grant agencies had no influence in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Emese Papp for her technical assistance in the immunohistochemistry staining.

REFERENCES

- Abboussi, O., Tazi, A., Paizanis, E., and El Ganouni, S. (2014). Chronic exposure to WIN55,212-2 affects more potently spatial learning and memory in adolescents than in adult rats via a negative action on dorsal hippocampal neurogenesis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 120, 95–102. doi: 10.1016/j.pbb.2014.02.014
- Abrams, D. I., and Guzman, M. (2015). Cannabis in cancer care. *Clin. Pharmacol. Ther.* 97, 575–586. doi: 10.1002/cpt.108
- Aguado, T., Monory, K., Palazuelos, J., Stella, N., Cravatt, B., Lutz, B., et al. (2005). The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 19, 1704–1706. doi: 10.1096/fj.05-3995fje
- Aguado, T., Romero, E., Monory, K., Palazuelos, J., Sendtner, M., Marsicano, G., et al. (2007). The CB1 cannabinoid receptor mediates excitotoxicity-induced neural progenitor proliferation and neurogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23892–23898. doi: 10.1074/jbc.M700678200
- Anacker, C., and Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 335–346. doi: 10.1038/nrn.2017.45
- Bayer, R., Franke, H., Ficker, C., Richter, M., Lessig, R., Büttner, A., et al. (2015). Alterations of neuronal precursor cells in stages of human adult neurogenesis in heroin addicts. *Drug Alcohol Depend.* 156, 139–149. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.09.005
- Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., and Marmar, C. R. (2015). Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurotherapeutics* 12, 825–836. doi: 10.1007/s13311-015-0387-1.9
- Brown, J. P., Couillard-Després, S., Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Aigner, L., and Kuhn, H. G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 467, 1–10. doi: 10.1002/cne.10874
- Broyd, S. J., van Hell, H. H., Beale, C., Yücel, M., and Solowij, N. (2016). Acute and chronic effects of cannabinoids on human cognition—a systematic review. *Biol. Psychiatry* 79, 557–567. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.12.002
- Brujnzeel, A. W., Bauzo, R. M., Munikoti, V., Rodrick, G. B., Yamada, H., Fornal, C. A., et al. (2011). Tobacco smoke diminishes neurogenesis and promotes gliogenesis in the dentate gyrus of adolescent rats. *Brain Res.* 1413, 32–42. doi: 10.1016/j.brainres.2011.07.041
- Brujnzeel, A. W., Qi, X., Guzha, L. V., Wall, S., Deng, J. V., Gold, M. S., et al. (2016). Behavioral characterization of the effects of cannabis smoke and anandamide in rats. *PLoS One* 11:e0153327. doi: 10.1371/journal.pone.0153327
- Cameron, H. A., and Schoenfeld, T. J. (2018). Behavioral and structural adaptations to stress. *Front. Neuroendocrinol.* 49, 106–113. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.02.002
- Campos, A. C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaça, M. V., Aguiar, D. C., Diaz-Alonso, J., et al. (2013). The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1407–1419. doi: 10.1017/S1461145712001502
- Carliner, H., Brown, Q. L., Sarvet, A. L., and Hasin, D. S. (2017). Cannabis use, attitudes, and legal status in the U.S.: a review. *Prev. Med.* 104, 13–23. doi: 10.1016/j.ypmed.2017.07.008
- Chatkin, J. M., Zani-Silva, L., Ferreira, I., and Zamel, N. (2017). Cannabis-associated asthma and allergies. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* doi: 10.1007/s12016-017-8644-1 [Epub ahead of print].
- Chen, E., Hanson, M. D., Paterson, L. Q., Griffin, M. J., Walker, H. A., and Miller, G. E. (2006). Socioeconomic status and inflammatory processes in childhood asthma: the role of psychological stress. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117, 1014–1020. doi: 10.1016/j.jaci.2006.01.036
- Colizzi, M., and Bhattacharyya, S. (2017). Does cannabis Composition matter? differential effects of Delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human cognition. *Curr. Addict. Rep.* 4, 62–74. doi: 10.1007/s40429-017-0142-2

- Csabai, D., Csekő, K., Szaiff, L., Varga, Z., Miseta, A., Helyes, Z., et al. (2016). Low intensity, long term exposure to tobacco smoke inhibits hippocampal neurogenesis in adult mice. *Behav. Brain Res.* 302, 44–52. doi: 10.1016/j.bbr.2016.01.022
- Curran, H. V., Freeman, T. P., Mokrysz, C., Lewis, D. A., Morgan, C. J., and Parsons, L. H. (2016). Keep off the grass? Cannabis, cognition and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 293–306. doi: 10.1038/nrn.2016.28
- Czéh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., et al. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12796–12801. doi: 10.1073/pnas.211427898
- Czéh, B., Müller-Keuker, J. I., Rygula, R., Abumaria, N., Hiemke, C., Domenici, E., et al. (2007). Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32, 1490–1503. doi: 10.1038/sj.npp.1301275
- Czéh, B., Welt, T., Fischer, A. K., Erhardt, A., Schmitt, W., Müller, M. B., et al. (2002). Chronic psychosocial stress and concomitant repetitive transcranial magnetic stimulation: effects on stress hormone levels and adult hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 52, 1057–1065. doi: 10.1016/S0006-3223(02)01457-9
- Data Spotlight (2012). CenterforBehavioralHealthStatisticsandQualityDrug Abuse Warning Network; November 13, Emergency Department Visits Involving Marijuana Among Adolescents Aged 15 to 17: Increase From 2005 to 2010 Varied by Gender. Rockville, MD: Center for Behavioral Health Statistics, and Quality.
- Denny, C. A., Kheirbek, M. A., Alba, E. L., Tanaka, K. F., Brachman, R. A., Laughman, K. B., et al. (2014). Hippocampal memory traces are differentially modulated by experience, time, and adult neurogenesis. *Neuron* 83, 189–201. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.018
- Drickamer, L. C. (1981). Selection for age of sexual maturation in mice and the consequences for population regulation. *Behav. Neural Biol.* 31, 82–89. doi: 10.1016/S0163-1047(81)91114-6
- Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W., and Nestler, E. J. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7579–7584. doi: 10.1073/pnas.120552597
- ElSohly, M., and Gul, W. (2014). “Constituents of cannabis sativa,” in *Handbook of Cannabis*, ed. R. G. Pertwee (Oxford: Oxford University Press), 3–22. doi: 10.1093/acprof:oso/9780199662685.003.0001
- ElSohly, M. A., Mehmedic, Z., Foster, S., Gon, C., Chandra, S., and Church, J. C. (2016). Changes in cannabis potency over the last 2 decades (1995–2014): analysis of current data in the United States. *Biol. Psychiatry* 79, 613–619. doi: 10.1016/j.biopsych.2016.01.004
- EMCDDA (2017). *Cannabis Legislation in Europe: An Overview*. Available at: http://www.emcdda.europa.eu/publications/adhoc/cannabis-legislation-europe_en
- Fadda, P., Robinson, L., Fratta, W., Pertwee, R. G., and Riedel, G. (2004). Differential effects of THC- or CBD-rich cannabis extracts on working memory in rats. *Neuropharmacology* 47, 1170–1179. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.08.009
- Fogaça, M. V., Campos, A. C., Coelho, L. D., Duman, R. S., and Guimarães, F. S. (2018). The anxiolytic effects of cannabidiol in chronically stressed mice are mediated by the endocannabinoid system: role of neurogenesis and dendritic remodeling. *Neuropharmacology* 135, 22–33. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.03.001
- Franklin, K. B. J., and Paxinos, G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd Edn. New York, NY: Academic Press.
- Gates, P., Jaffe, A., and Copeland, J. (2014). Cannabis smoking and respiratory health: consideration of the literature. *Respirology* 19, 655–662. doi: 10.1111/resp.12298
- Goodwin, R. S., Darwin, W. D., Chiang, C. N., Shih, M., Li, S. H., and Huestis, M. A. (2008). Urinary elimination of 11-nor-9-carboxy-delta9-tetrahydrocannabinol in cannabis users during continuously monitored abstinence. *J. Anal. Toxicol.* 32, 562–569. doi: 10.1093/jat/32.8.562
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., and Shors, T. J. (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 2, 260–265. doi: 10.1038/6365
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., and Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17, 2492–2498. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-07-02492.1997
- Gruber, S. A., Sagar, K. A., Dahlgren, M. K., Gonenc, A., Smith, R. T., Lambros, A. M., et al. (2018). The grass might be greener: medical marijuana patients exhibit altered brain activity and improved executive function after 3 months of treatment. *Front. Pharmacol.* 8:983. doi: 10.3389/fphar.2017.0983
- Harkany, T., Guzmán, M., Galve-Roperh, I., Berghuis, P., Devi, L. A., and Mackie, K. (2007). The emerging functions of endocannabinoid signaling during CNS development. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 83–92. doi: 10.1016/j.tips.2006.12.004
- Helyes, Z., Kemény, Á., Csekő, K., Szöke, É., Elekes, K., Mester, M., et al. (2017). Marijuana smoke induces severe pulmonary hyperresponsiveness, inflammation, and emphysema in a predictive mouse model not via CB1 receptor activation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 313, L267–L277. doi: 10.1152/ajplung.00354.2016
- Hester, M. S., and Danzer, S. C. (2014). Hippocampal granule cell pathology in epilepsy - a possible structural basis for comorbidities of epilepsy? *Epilepsy Behav.* 38, 105–116. doi: 10.1016/j.yebeh.2013.12.022
- Jett, J., Stone, E., Warren, G., and Cummings, K. M. (2018). Cannabis use, lung cancer, and related issues. *J. Thorac. Oncol.* 13, 480–487. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.013
- Jiang, W., Zhang, Y., Xiao, L., Van Cleemput, J., Ji, S. P., Bai, G., et al. (2005). Cannabinoids promote embryonic and adult hippocampus neurogenesis and produce anxiolytic- and antidepressant-like effects. *J. Clin. Invest.* 115, 3104–3116. doi: 10.1172/JCI25509
- Kalueff, A. V., Aldridge, J. W., LaPorte, J. L., Murphy, D. L., and Tuohimaa, P. (2007). Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. *Nat. Protoc.* 2, 2538–2544. doi: 10.1038/nprot.2007.367
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., and Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 45–59. doi: 10.1038/nrn.2015.8
- Kempker, J. A., Honig, E. G., and Martin, G. S. (2015). The effects of marijuana exposure on expiratory airflow. A study of adults who participated in the U.S. National health and nutrition examination study. *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12, 135–141. doi: 10.1513/AnnalsATS.201407-333OC
- Kiank, C., Daeschlein, G., and Schuett, C. (2008). Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice. *Brain Behav. Immun.* 22, 1173–1177. doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.003
- Kim, J. Y., Liu, C. Y., Zhang, F., Duan, X., Wen, Z., Song, J., et al. (2012). Interplay between DISC1 and GABA signaling regulates neurogenesis in mice and risk for schizophrenia. *Cell* 148, 1051–1064. doi: 10.1016/j.cell.2011.12.037
- Kochman, L. J., dos Santos, A. A., Fornal, C. A., and Jacobs, B. L. (2006). Despite strong behavioral disruption, Delta9-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Brain Res.* 1113, 86–93. doi: 10.1016/j.brainres.2006.07.080
- Kramer, J. L. (2015). Medical marijuana for cancer. *CA Cancer J. Clin.* 65, 109–122. doi: 10.3322/caac.21260
- Lapham, G. T., Lee, A. K., Caldeiro, R. M., McCarty, D., Browne, K. C., Walker, D. D., et al. (2017). Frequency of cannabis use among primary care patients in Washington State. *J. Am. Board Fam. Med.* 30, 795–805. doi: 10.3122/jabfm.2017.06.170062
- Lee, J. L. C., Bertoglio, L. J., Guimarães, F. S., and Stevenson, C. W. (2017). Cannabidiol regulation of emotion and emotional memory processing: relevance for treating anxiety-related and substance abuse disorders. *Br. J. Pharmacol.* 174, 3242–3256. doi: 10.1111/bph.13724
- Lee, T. T., Wainwright, S. R., Hill, M. N., Galea, L. A., and Gorzalka, B. B. (2014). Sex, drugs, and adult neurogenesis: sex-dependent effects of escalating adolescent cannabinoid exposure on adult hippocampal neurogenesis, stress reactivity, and amphetamine sensitization. *Hippocampus* 24, 280–292. doi: 10.1002/hipo.22221
- Levine, A., Clemenza, K., Rynn, M., and Lieberman, J. (2017). Evidence for the risks and consequences of adolescent cannabis exposure. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 56, 214–225. doi: 10.1016/j.jaac.2016.12.014
- Mačkowiak, M., Chocyk, A., Markowicz-Kula, K., and Wedzony, K. (2007). Acute activation of CB1 cannabinoid receptors transiently

- decreases PSA-NCAM expression in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Brain Res.* 1148, 43–52. doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.014
- Mandyam, C. D., Wee, S., Crawford, E. F., Eisch, A. J., Richardson, H. N., and Koob, G. F. (2008). Varied access to intravenous methamphetamine self-administration differentially alters adult hippocampal neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 64, 958–965. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.010
- Marchalant, Y., Brothers, H. M., Norman, G. J., Karelina, K., DeVries, A. C., and Wenk, G. L. (2009). Cannabinoids attenuate the effects of aging upon neuroinflammation and neurogenesis. *Neurobiol. Dis.* 34, 300–307. doi: 10.1016/j.nbd.2009.01.014
- Martinasek, M. P., McGrogan, J. B., and Maysonet, A. (2016). A systematic review of the respiratory effects of inhalational marijuana. *Respir. Care* 61, 1543–1551. doi: 10.4187/respcare.04846
- McLaughlin, K. J., Gomez, J. L., Baran, S. E., and Conrad, C. D. (2007). The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res.* 1161, 56–64. doi: 10.1016/j.brainres.2007.05.042
- Mehmedic, Z., Chandra, S., Slade, D., Denham, H., Foster, S., Patel, A. S., et al. (2010). Potency trends of Δ^9 -THC and other cannabinoids in confiscated cannabis preparations from 1993 to 2008. *J. Forensic Sci.* 55, 1209–1217. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01441.x
- Mori, M. A., Meyer, E., Soares, L. M., Milani, H., Guimarães, F. S., and de Oliveira, R. M. W. (2017). Cannabidiol reduces neuroinflammation and promotes neuroplasticity and functional recovery after brain ischemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 75, 94–105. doi: 10.1016/j.pnpbp.2016.11.005
- Murphy, M., Mills, S., Winstone, J., Leishman, E., Wager-Miller, J., Bradshaw, H., et al. (2017). Chronic adolescent Δ^9 -tetrahydrocannabinol treatment of male mice leads to long-term cognitive and behavioral dysfunction, which are prevented by concurrent cannabidiol treatment. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 235–246. doi: 10.1089/can.2017.0034
- Nahas, G., and Latour, C. (1992). The human toxicity of marijuana. *Med. J. Aust.* 156, 495–497.
- Nahas, G., Leger, C., Tocque, B., and Hoellinger, H. (1981). The kinetics of cannabinoid distribution and storage with special reference to the brain and testis. *J. Clin. Pharmacol.* 21(Suppl. 1), 208S–214S. doi: 10.1002/j.1552-4604.1981.tb02597.x
- Noonan, M. A., Bulin, S. E., Fuller, D. C., and Eisch, A. J. (2010). Reduction of adult hippocampal neurogenesis confers vulnerability in an animal model of cocaine addiction. *J. Neurosci.* 30, 304–315. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4256-09.2010
- Okuyama, K., Ohwada, K., Sakurada, S., Sato, N., Sora, I., Tamura, G., et al. (2007). The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Allergol. Int.* 56, 29–35. doi: 10.2332/allergolint.O-06-435
- Osborne, A. L., Solowij, N., and Weston-Green, K. (2017). A systematic review of the effect of cannabidiol on cognitive function: relevance to schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 72, 310–324. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.11.012
- Palazuelos, J., Aguado, T., Egia, A., Mechoulam, R., Guzmán, M., and Galve-Roperh, I. (2006). Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 20, 2405–2407. doi: 10.1096/fj.06-6164fje
- Patel, S., Hill, M. N., Cheer, J. F., Wotjak, C. T., and Holmes, A. (2017). The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76(Pt A), 56–66. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.12.033
- Prenderville, J. A., Kelly, Á. M., and Downer, E. J. (2015). The role of cannabinoids in adult neurogenesis. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3950–3963. doi: 10.1111/bph.13186
- Rao, M. S., and Shetty, A. K. (2004). Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 234–246. doi: 10.1111/j.0953-816X.2003.03123.x
- Realini, N., Viganò, D., Guidali, C., Zamberletti, E., Rubino, T., and Parolaro, D. (2011). Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology* 60, 235–243. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.09.003
- Ribak, C. E., Shapiro, L. A., Yan, X. X., Dashtipour, K., Nadler, J. V., Obenaus, A., et al. (2012). “Seizure-induced formation of basal dendrites on granule cells of the rodent dentate gyrus,” in *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*, 4th Edn, eds J. L. Noebels, M. Avoli, M. A. Rogawski, R. W. Olsen, and A. V. Delgado-Escueta (Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information).
- Rivera, P., Romero-Zerbo, Y., Pavón, F. J., Serrano, A., López-Ávalos, M. D., Cifuentes, M., et al. (2011). Obesity-dependent cannabinoid modulation of proliferation in adult neurogenic regions. *Eur. J. Neurosci.* 33, 1577–1586. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07650.x
- Saez, T. M., Aronne, M. P., Caltana, L., and Brusco, A. H. (2014). Prenatal exposure to the CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 alters migration of early-born glutamatergic neurons and GABAergic interneurons in the rat cerebral cortex. *J. Neurochem.* 129, 637–648. doi: 10.1111/jnc.12636
- Sansone, R. A., and Sansone, L. A. (2014). Marijuana and body weight. *Innov. Clin. Neurosci.* 11, 50–54.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., et al. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809. doi: 10.1126/science.1083328
- Scarante, F. F., Vila-Verde, C., Detoni, V. L., Ferreira-Junior, N. C., Guimarães, F. S., and Campos, A. C. (2017). Cannabinoid modulation of the stressed hippocampus. *Front. Mol. Neurosci.* 10:411. doi: 10.3389/fnmol.2017.00411
- Scheich, B., Vincze, P., Szöke, É., Borbély, É., Hunyady, Á., Szolcsányi, J., et al. (2017). Chronic stress-induced mechanical hyperalgesia is controlled by capsaicin-sensitive neurones in the mouse. *Eur. J. Pain* 21, 1417–1431. doi: 10.1002/ejp.1043
- Schiavon, A. P., Bonato, J. M., Milani, H., Guimarães, F. S., and Weffort de Oliveira, R. M. (2016). Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 64, 27–34. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.017
- Schoenfeld, T. J., and Cameron, H. A. (2015). Adult neurogenesis and mental illness. *Neuropsychopharmacology* 40, 113–128. doi: 10.1038/npp.2014.230
- Small, E., Shah, H. P., Davenport, J. J., Geier, J. E., Yavarovich, K. R., Yamada, H., et al. (2010). Tobacco smoke exposure induces nicotine dependence in rats. *Psychopharmacology* 208, 143–158. doi: 10.1007/s00213-009-1716-z
- Snyder, J. S., Soumier, A., Brewer, M., Pickel, J., and Cameron, H. A. (2011). Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature* 476, 458–461. doi: 10.1038/nature10287
- Steel, R. W., Miller, J. H., Sim, D. A., and Day, D. J. (2014). Delta-9-tetrahydrocannabinol disrupts hippocampal neuroplasticity and neurogenesis in trained, but not untrained adolescent sprague-dawley rats. *Brain Res.* 1548, 121–129. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.034
- Stone, E., Jett, J., Warren, G., and Cummings, K. M. (2018). Cannabis use. Lung cancer, and related issues. *J. Thorac. Oncol.* 13, 480–487. doi: 10.1016/j.jtho.2017.12.013
- Suliman, N. A., Taib, C. N. M., Moklas, M. A. M., and Basir, R. (2018). Delta-9-Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) induce neurogenesis and improve cognitive performances of male sprague dawley rats. *Neurotox. Res.* 33, 402–411. doi: 10.1007/s12640-017-9806-x
- Surget, A., Tanti, A., Leonardo, E. D., Laugeray, A., Rainer, Q., Touma, C., et al. (2011). Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation. *Mol. Psychiatry* 16, 1177–1188. doi: 10.1038/mp.2011.48
- Tervo-Clemmens, B., Simmonds, D., Calabro, F. J., Day, N. L., Richardson, G. A., and Luna, B. (2018). Adolescent cannabis use and brain systems supporting adult working memory encoding, maintenance, and retrieval. *Neuroimage* 169, 496–509. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.12.041
- Tomas-Roig, J., Piscitelli, F., Gil, V., Quintana, E., Ramió-Torrentà, L. L., Del Río, J. A., et al. (2018). Effects of repeated long-term psychosocial stress and acute cannabinoid exposure on mouse corticostriatal circuitry: implications for neuropsychiatric disorders. *CNS Neurosci. Ther.* doi: 10.1111/cns.12810 [Epub ahead of print].
- Turna, J., Patterson, B., and Van Ameringen, M. (2017). Is cannabis treatment for anxiety, mood, and related disorders ready for prime time? *Depress. Anxiety* 34, 1006–1017. doi: 10.1002/da.22664

- UNODC (2017). *Market Analysis of Plant-Based Drugs. Opiates, Cocaine, Cannabis. World Drug Report 2017*. Vienna: United Nations Office on Drugs and Crime.
- Veena, J., Srikumar, B. N., Raju, T. R., and Shankaranarayana Rao, B. S. (2009). Exposure to enriched environment restores the survival and differentiation of new born cells in the hippocampus and ameliorates depressive symptoms in chronically stressed rats. *Neurosci. Lett.* 455, 178–182. doi: 10.1016/j.neulet.2009.03.059
- Volkow, N. D., Baler, R. D., Compton, W. M., and Weiss, S. R. (2014). Adverse health effects of marijuana use. *N. Engl. J. Med.* 370, 2219–2227. doi: 10.1056/NEJMra1402309
- Volkow, N. D., Swanson, J. M., Evins, A. E., DeLisi, L. E., Meier, M. H., Gonzalez, R., et al. (2016). Effects of cannabis use on human behavior, including cognition, motivation, and psychosis: a review. *JAMA Psychiatry* 73, 292–297. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2015.3278
- Webster, P. (2018). Debate over recreational cannabis use legalisation in Canada. *Lancet* 391, 725–726. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30430-6
- Wolf, S. A., Bick-Sander, A., Fabel, K., Leal-Galicia, P., Tauber, S., Ramirez-Rodriguez, G., et al. (2010). Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun. Signal.* 8:12. doi: 10.1186/1478-811X-8-12
- Yun, J., Koike, H., Ibi, D., Toth, E., Mizoguchi, H., Nitta, A., et al. (2010). Chronic restraint stress impairs neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory in mice: possible involvement of a brain-specific transcription factor Npas4. *J. Neurochem.* 114, 1840–1851. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06893.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Rusznák, Csekő, Varga, Csabai, Bóna, Mayer, Kozma, Helyes and Czéh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.