

بررسی اثرات مخرب مصرف WIN 55212-2، آگونیست گیرنده کانابینوئید، در دوران حاملگی بر عملکرد سیستم اعصاب مرکزی نوزادان موش‌های صحرایی

محمد شعبانی^۱، مهیار جان‌احمدی^۲، معظمه السادات رضوی‌نسب^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

مقدمه: مصرف کانابینوئیدها از جمله حشیش و WIN 55212-2 (WIN) در طول دوره جنینی می‌تواند با آسیب در روند رشد جنین و نقص در عملکرد سیستم اعصاب مرکزی همراه باشد. **روش:** موش‌های گروه درمان روزانه ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم WIN از روز ۵ تا ۲۰ حاملگی دریافت کردند. اثر WIN در مرحله جنینی بر میزان مرگ و میر، وزن، تغییرات بافتی، رفتار حرکتی و حافظه نوزادان در انتهای هفته‌های سوم، پنجم و هفتم پس از تولد مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** مصرف WIN در طول حاملگی باعث تخریب لایه‌های پورکنژ و گرانولار مخچه نوزادان شد. در بررسی فعالیت حرکتی در انتهای هفته سوم، پنجم و هفتم پس از تولد کاهش معنی‌داری در تعداد برخاستن بر روی دو پا و افزایش معنی‌داری در تعداد لیسیدن و خاراندن سر و صورت در گروه تحت درمان با WIN نسبت به گروه‌های گواه و حلال مشاهده شد. افزایش و کاهش معنی‌داری در تعداد دفعات و زمان ورود به اتاق تاریک در روز اول و هفتم پس از اکتساب در نوزادان موش‌هایی که دوره جنینی تحت درمان WIN بودند، نسبت به گروه‌های گواه و حلال مشاهده شد. تعداد نوزادان و طول دوره حاملگی کاهش معنی‌داری در گروه WIN ۱ mg/kg نسبت به گروه گواه، حلال و WIN ۰/۵ mg/kg نشان داد درحالی‌که درصد مرگ و میر افزایش معنی‌داری یافت. **نتیجه‌گیری:** مصرف کانابینوئیدها در طی حاملگی باعث تخریب سلول‌های مغز شده و موجب آسیب به عملکرد سیستم اعصاب مرکزی از جمله کنترل حرکت، توان به خاطر آوری و یادگیری نوزادان می‌شود.

کلید واژه‌ها: حشیش، WIN 55212-2، مخچه، دوره جنینی، فعالیت حرکتی، حافظه

۱. نویسنده مسئول: استادیار دانشگاه علوم پزشکی کرمان. پست الکترونیک: shabanimoh@yahoo.com

۲. استاد گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳. محقق مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان

مقدمه

مشتقات کانابیس از جمله حشیش و ماری جوانا به طور وسیعی به عنوان داروهای غیر قانونی^۱ جهت مصارف پزشکی، تفننی و تفریحی و یا در برخی مذاهب مصرف می شود (کاستلی^۲ و همکاران، ۲۰۰۷؛ آرنولد^۳، ۲۰۰۰). اغلب دولت های غربی در اواخر قرن بیستم، استفاده های پزشکی از کانابیس و مصرف آن را ممنوع کردند. تحریم دارو حاصل دیدگاهی بود که کانابیس را دارویی خطرناک برای سلامتی جسم و روان مطرح می کرد. اما، اخیراً این دیدگاه بطور قابل توجهی در جهت قانونی کردن و برداشتن تحریم جهت خصوصیات درمانی و پزشکی کانابیس تغییر یافته است (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ آرنولد، ۲۰۰۰). کانابینوئیدها بویژه در جوامع غربی به مقدار زیادی در زنان در طول دوره حاملگی استفاده می شود. با این حال، مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده است که کانابینوئیدها به آسانی از سد جفتی عبور می کنند و از طریق شیر مادر به فرزند منتقل می شوند و به دلیل اثرات منفی که بر رشد جنین دارد، مشکلاتی در سلامتی جنین ایجاد می کند (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ بناجیانو^۴ و همکاران، ۲۰۰۷؛ هوتچینگز^۵، مارتین^۶، گاماگریس^۷، میلر^۸ و فیکو^۹، ۱۹۸۹. ابراهیم^{۱۰} و گفروئر^{۱۱}، ۲۰۰۳؛ بورتولاتو^{۱۲} و همکاران، همکاران، ۲۰۰۶). مصرف این مواد در دوره جنینی تأثیر بسزایی بر سیستم های نوروترانسمیتری متعدد از قبیل دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابارژیک، گلوتاماترژیک و اوپیوئیدرژیک دارد، بدین جهت باعث تغییرات اساسی و طولانی مدت روی الگوهای رفتاری می شوند (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ ویوروس^{۱۳}، لیورنت^{۱۴}، مورنو^{۱۵}، مارکو^{۱۶}، ۲۰۰۵). سیستم کانابینوئیدی دارای یک فعالیت تعدیلی قوی روی انتقال سیناپسی در مغز پستانداران است. کانابینوئیدهای درون زایی همچون آناندوماید می توانند آزادسازی گلوتامات و گابا را در نواحی زیادی از مغز از جمله مخچه، هیپوکمپ و قشر مغز مهار کنند (فروند^{۱۷}، کاتونا^{۱۸}، پیوملی^{۱۹}، ۲۰۰۳؛ گالانت^{۲۰} و دیانا^{۲۱}، ۲۰۰۴؛ کیم^{۲۲}، ایزوکاوا^{۲۳}، لدنت^{۲۴}،

1. illicit drugs
4. Benagiano
7. Gamagaris
10. Ebrahim
13. Viveros
16. Marco
19. Piomelli
22. Kim

2. Castelli
5. Hutchings
8. Miller
11. Gfroerer
14. Liorente
17. Freund
20. Galante
23. Isokawa

3. Arnold
6. Martin
9. Fico
12. Bortolato
15. Moreno
18. Katano
21. Diana
24. Ledent

آلگر^۱، ۲۰۰۲؛ برون^۲، برونوتز^۳ و رگهر^۴، ۲۰۰۳). این نقش تعدیلی به وسیله گیرنده‌های نوع نوع یک و دو کانابینوئیدی که در مخچه و هیپوکمپ به صورت پیش‌سیناپسی عموماً روی پایانه اکسونی متمرکزند، اعمال می‌شود (دیانا، لوز^۵، مکی^۶ و مارتی^۷، ۲۰۰۲؛ گالاته و دیانا، ۲۰۰۴). تراکم بسیار زیادی از گیرنده‌های نوع یک کانابینوئیدی در کورتکس مخچه پستانداران وجود دارد (بنجیانو و همکاران، ۲۰۰۷). تراکم و تمایز گیرنده‌های کانابینوئیدی مغزی در مراحل مختلف رشد قبل و بعد از تولد و انعکاس این تمایز در بلوغ، احتمال آسیب‌پذیری ویژه‌ای را در مصرف طولانی مدت کانابیس‌ها در فازهای خاصی از رشد افزایش می‌دهد (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷). در حیوانات بالغی که در طی دوره حاملگی و شیرخواری در معرض اگونیس‌های کانابینوئیدی قرار داشتند تغییرات ماندگاری در آزمون‌های رفتاری از جمله رفتارهایی در جفت‌گیری حیوان، توانایی یادگیری، حساسیت به درد، تمایلات جنسی و برخوردهای اجتماعی و اختلالات نورواندوکروینی گزارش شده است (فرناندز لویز^۸ و همکاران، ۲۰۰۶؛ دلتریو^۹، ۱۹۸۶؛ وانگ^{۱۰}، دی^{۱۱}، ماکارون^{۱۲}، ۲۰۰۶؛ مورنو^{۱۳}، اسکوردو^{۱۴}، مونوز^{۱۵}، رودریگز^{۱۶} و ناوارو^{۱۷}، ۲۰۰۵؛ فرید^{۱۸} و اسمیت^{۱۹}، ۲۰۰۱؛ ناوارو^{۲۰}، رودریگز^{۲۱}، هرناندز، راموس^{۲۲} و فرناندز^{۲۳}، ۲۰۰۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که استفاده از کانابیس با افزایش تحریک‌پذیری، اختلال در حافظه و یادگیری، آتاکسی و نقص در تصمیم‌گیری در مورد زندگی آینده همراه است (فرید، اتکینسون و گری، ۲۰۰۳؛ ریچاردسون^{۲۴}، ریان^{۲۵}، ویلفورد^{۲۶}، دی^{۲۷} و گلداسمیت^{۲۸}، ۲۰۰۲). طبق یافته‌های موجود، پژوهش‌های بافتی و رفتاری کمی برای شناسایی اثرات ناشی از مصرف مزمن کانابینوئیدها در مادران حامله بر روی جنین انجام شده است. با توجه به حضور گیرنده‌های کانابینوئیدی بر روی سیناپس‌های موجود در کورتکس مخچه و هیپوکمپ که در اثر تداخل در روند طبیعی پیام‌رسانی به علت مصرف اگونیس‌های برونزاد می‌تواند

1. Alger
4. Regehr
7. Marty
10. Wang
13. Moreno
16. Rodriguez
19. Smith
22. Ramos
25. Ryan
28. Goldschmidt

2. Brown
5. Levenes
8. Fernandez Lopez
11. Dey
14. Escuredo
17. Navaro
20. Navarro
23. Fernandez
26. Wilford

3. Brenowitz
6. Mackie
9. Delterio
12. Maccarrone
15. Munoz
18. Freid
21. Hernandez
24. Richardson
27. Day

بررسی اثرات مخرب مصرف WIN 55212-2، آگونیست گیرنده کانابینوئید، در دوران حاملگی بر عملکرد...

تأثیرگذار شود، از جمله تأثیر احتمالی این آگونیست‌ها می‌توان تأثیرگذاری آنها بر روند حافظه، تعادل و فعالیت‌های حرکتی با دخالت در سلول‌های موجود در هیپوکمپ و کورتکس مخچه نقش اساسی در این روندهای فیزیولوژیک ایفاء می‌کنند، لذا پژوهش حاضر به بررسی اثر مصرف دوره جنینی کانابینوئید WIN 55212-2 در دوره جنینی بر پاسخ‌های رفتاری، تغییرات بافتی و حافظه نوزادان موش صحرایی پس از تولد پرداخته است.

روش

جامعه، نمونه و روش نمونه‌گیری

در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده از نژاد ویستار^۱ با زایمان بار اول در محدوده ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد که از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات موسسه پاستور تهیه شدند. حیوانات در شرایط سیکل تاریکی روشنایی ۱۲ ساعته و دمای محیطی کنترل شده (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد)، در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی شهید بهشتی نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. یک جفت موش صحرایی^۲ ماده با یک موش صحرایی جهت جفت‌گیری در آخرین ساعات بعدازظهر در یک قفس قرار گرفته و اسمیر واژینال در صبح روز بعد ساعت ۹ صبح تهیه می‌شد و روز مشاهده اسپرم به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. موش‌های حامله به طور تصادفی به گروه‌های گواه، حلال و درمانی تقسیم شدند (حداقل ۸ موش در هر گروه). موش‌های حامله در گروه‌های درمان روزانه ۰/۵ یا ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن WIN (پودر، Sigma) از روز ۵ تا ۲۰ حاملگی دریافت کردند (این دوزها بر پایه مطالعات قبلی انتخاب شدند) (ریچاردسون و همکاران، ۲۰۰۳؛ ویوروس و همکاران ۲۰۰۵). داروی WIN در توئین ۸۰ و محلول سالین (یک درصد توئین/سالین) حل شد و در گروه درمانی به صورت زیر جلدی (s.c) در حجم ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تزریق شد. محلول ۱ درصد توئین/سالین به صورت زیر جلدی در حجم ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم در گروه حلال تزریق شد. انتخاب داروی WIN به این علت است که دارای تمایل و قدرت جذب^۳ بالایی جهت اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی است و همچنین اغلب آثار ماری‌جوانا و حشیش را تقلید می‌کند

1. Wistar
2. Rat
3. affinity

(ریچاردسون و همکاران ۲۰۰۲؛ ویوروس، ۲۰۰۵). تمامی آزمایش‌ها در زمان روشنایی، بین ساعات ۸ صبح الی ۴ عصر، به منظور جلوگیری از تأثیر نظم فیزیولوژیک شبانه‌روزی حیوان بر آزمایش‌ها، انجام گرفتند. نوزادان نر تمام گروه‌ها یک ساعت قبل از شروع آزمون به آزمایشگاه منتقل می‌شدند تا با شرایط آزمایشگاه خو بگیرند.

مطالعات بافت شناسی

نوزادان نر موش‌های گروه‌های گواه، حلال و WIN در هفته پنجم پس از تولد با استفاده از اتر عمیقاً بیهوش و کشته شدند. سپس سر آن‌ها جدا شده و مخچه آن‌ها جهت انجام مطالعات بافتی در زمان مناسب در محلول فرمالین ۱۰ درصد برای بهتر فیکس شدن فرو برده شد. در مرحله بعد بافت ورمیس مخچه گروه‌های گواه و WIN به مدت یک شب در محلول فیکساسیون به اضافه سوکروز فیکس شدند. بافت‌ها توسط میکروتوم انجمادی با ضخامت ۲۵ میکرومتر روز بعد برش زده شدند. برش‌ها جهت بررسی تغییرات پاتولوژیک با استفاده از فلوروجید^۱ (یک مارکر فلورسانت برای تشخیص نورون‌های تخریب شده) رنگ آمیزی شدند (اسکمیود^۲، البرتسون^۳، اسلیکر^۴، ۲۰۰۰ و اسکمیود، هاپکینز^۵، ۱۹۹۷).

مطالعات رفتاری

الف) آزمون فضای باز^۶ با استفاده از سیستم ردیاب تصویری^۷: جهت بررسی رفتارهای حرکتی حیوان در انتهای هفته‌های سوم، پنجم و هفتم پس از تولد از آزمون فضای باز استفاده شد (حداقل ۱۵ موش جوان در هر گروه). نرم افزار اتوویشن^۸ یک سیستم ردیاب تصویری برای اتوماسیون آزمایشات رفتاری از طراحی آزمایش تا تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده می‌باشد که می‌تواند برای اکثر تست‌های رفتاری در محدوده وسیعی از شرایط آزمایش استفاده شود. رایج‌ترین کاربرد اتوویشن به عنوان وسیله‌ای برای اندازه‌گیری اثرات رفتاری داروها و درمان‌های همراه با جراحی است. این نرم افزار همچنین به طور فزاینده برای بررسی فنوتیپ رفتاری موش‌های اصلاح ژنتیکی شده نیز استفاده می‌شود. این دستگاه امکان تحت نظر قراردادن بسیاری از آزمون‌های واکنش‌های

1. Fluoro Jade

2. Schmued

3. Albertson

4. Slikker

5. Hopkins

6. Open Field

7. Etho vision video track system

8. etho vision

اجتماعی را می‌دهد. در پژوهش حاضر از اتوویشن پرو استفاده شد که در آن می‌توان رفتار موش را در ۱۶ محوطه ردیابی نمود، به طوریکه هر موش در مرکز ناحیه تعریف شده قرار می‌گرفت و رفتارهای حرکتی آن از طریق دوربین برای ۵ دقیقه ثبت می‌شد. محفظه فضای باز بین هر بار آزمایش با الکل تمیز و سپس خشک می‌شد (دورسون^۱، جکوبوسکا^۲ و ازبی^۳، ۲۰۰۶).

ب) آزمون یادگیری احترازی غیر فعال^۴: این آزمون با استفاده از دستگاه شاتل باکس^۵ انجام شد. این ابزار از دو محفظه تاریک و روشن با اندازه برابر و یک درب قابل کنترل بین آن‌ها تشکیل شده است. حیوان‌ها (حداقل ۱۵ موش جوان در هر گروه) در انتهای هفته پنجم در مرحله سازش، داخل بخش روشن این دستگاه به گونه‌ای قرار داده می‌شدند که روی آن‌ها به سمت مقابل بخش تاریک باشند. درب بین دو محفظه بعد از ۱۰ ثانیه باز و اجازه داده می‌شود تا حیوان آزادانه وارد بخش تاریک گردد. مدت زمان تأخیر برای ترک محفظه روشن ثبت می‌شد. اگر این زمان بیشتر از ۶۰ ثانیه باشد نشان دهنده عدم تمایل حیوان برای ورود به محیط تاریک است و حیوان از مطالعه خارج می‌شود. حیوان‌ها دو ساعت بعد از سازش مجدد به همان صورت قبل داخل ناحیه روشن قرار داده می‌شدند. مرحله یادگیری شبیه مرحله سازش بود، به جز اینکه بلافاصله بعد از ورود حیوان به محفظه تاریک درب بسته و به کف دست و پای حیوان شوک ۰/۵ mA در مدت دو ثانیه وارد می‌گردید. حیوان به مدت ۲۰ ثانیه داخل دستگاه می‌ماند و سپس می‌توانست از دستگاه خارج شود. مرحله یادگیری ۲ دقیقه بعد مجدداً تکرار شده و اگر حیوان دوباره وارد ناحیه تاریک می‌شد، به او شوک اعمال می‌گردید. تعداد دفعاتی که حیوان شوک دریافت می‌کرد، پاسخ‌های احترازی یک و هفت روز بعد از مرحله یادگیری در مرحله به خاطر آوری مجدداً اندازه‌گیری می‌شد هر یک از موش‌ها داخل محفظه روشن قرار داده شدند و زمان تأخیر برای ورود مجدد به محفظه تاریک ثبت می‌شد. در حین آزمون بخاطر آوری حیوان شوک دریافت نمی‌کرد. حداکثر زمان تا ورود به منطقه تاریک سیصد ثانیه است. در این مرحله، زمان ورود، مدت زمان ماندن و تعداد دفعات ورود به ناحیه تاریک اندازه‌گیری می‌شد (فرید، ۲۰۰۳).

1. Dursun

2. Jakubowska

3. Ozbay

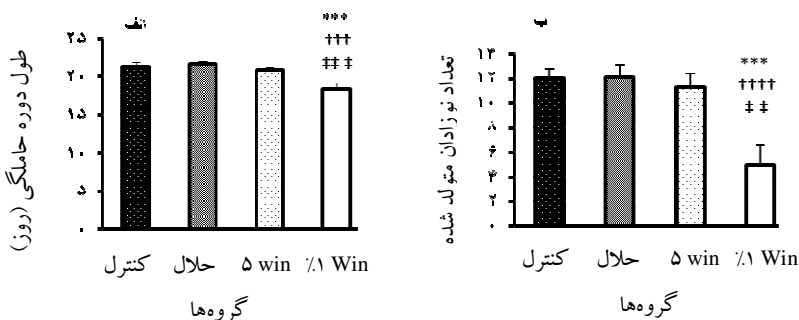
4. Passive avoidance test

5. Shuttle box

یافته‌ها

یافته‌ها در چهاربخش تأثیر مصرف دوره جنینی عصاره حشیش بر فاکتورهای تولید مثل، مطالعات بافتی، مطالعات رفتاری و تأثیر مصرف عصاره حشیش در دوره بارداری بر روی حافظه و یادگیری نوزادان متولد شده گزارش شده است.

الف) تأثیر مصرف دوره جنینی عصاره حشیش بر فاکتورهای تولید مثل: در این تحقیق اثر مصرف دوره جنینی WIN بر فاکتورهای تولید مثل از جمله طول دوره حاملگی، تعداد نوزادان متولد شده، وزن نوزادان و درصد زنده ماندن نوزادان متولد شده در گروه‌های مورد مطالعه بررسی شد. تجزیه و تحلیل تعداد نوزادان و طول دوره حاملگی بین گروه WIN 1 mg/kg با گروه‌های گواه، حلال و WIN 0.5 mg/kg کاهش معنی داری را نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۱) و درصد زنده ماندن در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها دیگر کاهش چشمگیری داشت به طوری که تمام نوزادان موش‌ها در همان چند روز اول تولد از بین می‌رفتند (شکل ۲).



نمودار ۱: مقایسه طول دوره حاملگی (الف) و تعداد نوزادان متولد شده (ب) در گروه‌های مورد مطالعه

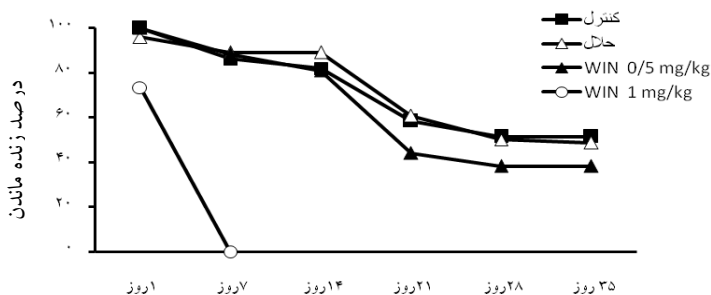
نتایج به صورت Mean \pm SEM گزارش شده است (تعداد: حداقل ۸ سر)

***: تفاوت معنی دار با گروه در سطح $p < 0.001$

++++, +: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه حلال با $p < 0.0001$ و $p < 0.001$

++ و +: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه تحت درمان با WIN 0.5 mg/kg با $p < 0.01$

و $p < 0.001$



سن نوزادان بعد از تولد

نمودار ۲: فراوانی نسبی نوزادان زنده مانده در گروه های مورد مطالعه در روز اول و در پایان هفته های اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم پس از تولد

گروه WIN 1 mg/kg به علت تغییرات عمده ای که در ملاک های تولد و تولید مثل ایجاد کرد از مطالعه کنار گذاشته شد. طی بررسی وزن نوزادان در روز اول، انتهای هفته های اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم پس از تولد تنها در انتهای هفته اول بین گروه mg/kg WIN 0.5 با گواه و حلال اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه وزن نوزادان (گرم) در گروه های مورد مطالعه در روز اول، انتهای هفته های اول تا پنجم پس از تولد

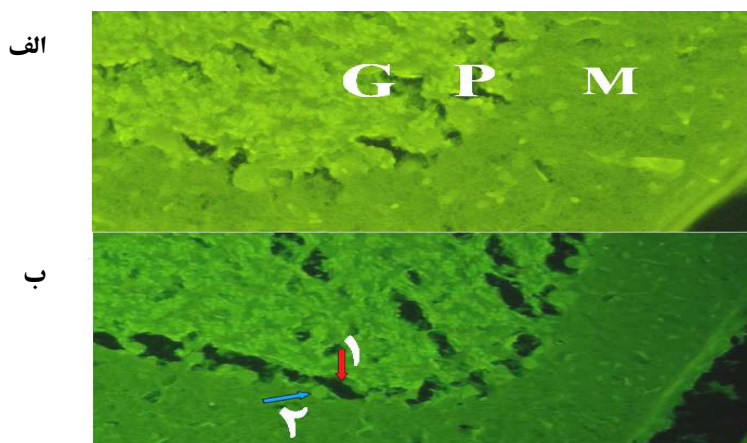
گروه ها	روز ۱	روز ۸	روز ۱۵	روز ۲۲	روز ۲۹	روز ۳۶
گواه	5/51±0/10	10/71±0/22	19/11±0/50	27/78±0/84	44/76±1/68	74±2/58
حلال	5/23±0/06	10/09±0/22	18/41±0/04	27/53±0/63	42/04±2/45	71/66±1/03
WIN 0.5 mg/kg	5/50±0/13	9/71±0/33	18/1±0/39	26/08±0/76	39/66±1/56	69/58±2/05

***: تفاوت معنی دار با گروه در سطح $p < 0/001$

††: تفاوت معنی دار با گروه حلال $p < 0/01$ (تعداد: حداقل ۳۰ سر)

ب) تأثیر عصاره حشیش در دوره جنینی بر تغییرات بافتی کورتکس مخچه: به منظور بررسی اثرات تخریبی و تغییرات پاتولوژیک احتمالی مصرف جنینی WIN (0.5 mg/kg) بر روی نرون های پورکنز از رنگ آمیزی فلوروجید استفاده شد. ترتیب طبیعی لایه سلول های پورکنز با لایه مولکولی و گرانولی در قشر مخچه پس از رنگ آمیزی با فلوروجید در هر سه گروه گواه، حلال و تیمار مشاهده شد (شکل الف ۳). در موش های

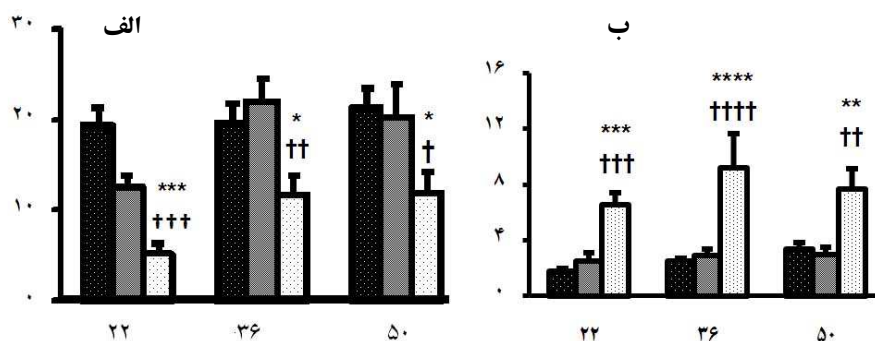
تیمار شده با WIN، مناطق تخریب شده به صورت نقاط سیاه و توخالی، هم در لایه سلول‌های پورکنژ و هم در لایه محتوی سلول‌های گرانولی به وضوح قابل تشخیص است. همچنین نورون‌های پورکنژ به صورت پراکنده و نامنظم در لایه میانی قشر مخچه با شدت بسیار رنگ گرفته اند و تراکم ظاهری نورون‌های پورکنژ در این گروه (شکل ۳ ب) کمتر از گروه گواه (شکل ۳ الف) است. این مساله باعث شده است که جسم سلولی نورون‌های پورکنژ سالم در گروه تیمار که تراکم کمتری دارند با وضوح بهتری نسبت به سلول‌های پورکنژ گروه گواه که دارای تراکم بالاتری هستند، قابل رویت باشند.



شکل ۳: تغییرات بافتی قشر مخچه

در شکل الف، ترتیب لایه‌های قشر مخچه و تراکم بالایی از سلول‌های پورکنژ در حیوان گواه مشاهده می‌شود؛ لایه مولکولی (M)، لایه سلول‌های پورکنژ (P) و لایه گرانولی (G). شکل ب، لایه‌های مختلف قشر مخچه ۳۰ روز پس از تولد در حیوانی را نشان می‌دهد که در دوره جنینی تحت درمان با WIN/5212-2 بوده است. جسم سلولی نورون‌های پورکنژ گروه تیمار به صورت پراکنده و نامنظم و با تراکم کمتری نسبت به گروه گواه در لایه سلول‌های پورکنژ قرار دارند. نوک پیکان ۱ (قرمز) محل‌هایی را که دچار تخریب شده‌اند و پیکان ۲ (آبی) اجسام سلولی از سلول‌های پورکنژ سالم را نشان می‌دهد.

ج) یافته های مطالعات رفتاری: بررسی حاضر نشان داد که در آزمون فضای باز در انتهای هفته های سوم، پنجم و هفتم پس از تولد تعداد برخواستن روی دو پا^۱ در نوزادان موش هایی که مادرانشان در طی حاملگی تحت درمان با WIN بوده اند، کاهش معنی داری نسبت به گروه حلال و گواه ($p < 0/05$) داشت (شکل الف ۴) در حالیکه رفتار لیسیدن و خاراندن سر و صورت^۲ در این گروه افزایش معنی داری نسبت به گروه گواه و حلال داشت و موش ها در بیشتر زمانیکه رفتارشان در فضای باز بررسی می شد در گوشه ای کز کرده و به تمیز کردن خود و رفتار گرومینگ می پرداختند (شکل ب ۴).



نمودار ۴: مقایسه فاصله تعداد ایستادن روی دو پا و لیسیدن و خاراندن سر و صورت در گروه های مورد مطالعه در روزهای ۲۲، ۳۶ و ۵۰ پس از تولد به ترتیب در شکل های الف و ب

*، **، ***، ****: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح $p < 0/05$

$p < 0/0001$ ، $p < 0/001$ ، $p < 0/01$

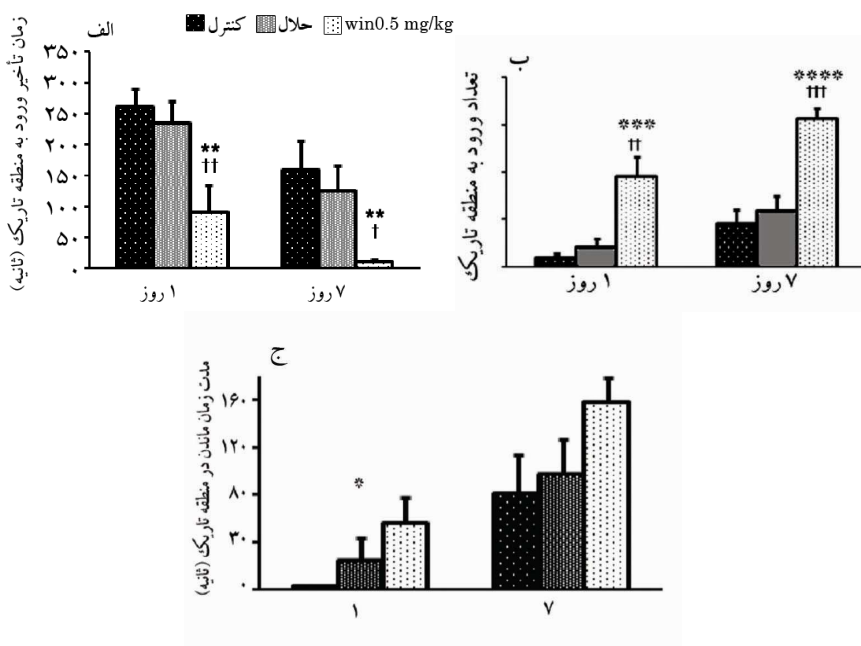
†، ††، †††، ††††: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه حلال در سطح $p < 0/05$

$p < 0/0001$ ، $p < 0/001$ ، $p < 0/01$

د) تأثیر مصرف عصاره حشیش در دوره بارداری بر روی حافظه و یادگیری نوزادان متولد شده: در بررسی اثر تجویز مزمن WIN بر اکتساب و بخاطر آوری نوزادان موش هایی که در دوره حاملگی مادرانشان تحت درمان WIN با مقدار $0/5 \text{ mg/kg}$ بودند، تعداد دفعات آموزشی این گروه در مقایسه با گواه تفاوت معنی داری نشان نداد. زمان و تعداد دفعات ورود به اتاق تاریک در روزهای ۱ و ۷ پس از دریافت بین گروه گواه و حلال تفاوت

1. Rearing Frequency
2. grooming frequency

معنی داری نشان نداد. اما میان گروه تحت درمان با WIN با گروه‌های گواه و حلال در روز اول در سطح ($p < 0/01$) و در روز هفتم در سطح ($p < 0/05$) اختلاف معنی داری مشاهده شد (شکل ۵ الف و ۵ ب). زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز اول پس از دریافت، افزایش معنی داری در گروه تحت درمان WIN نسبت به گروه گواه نشان داد ($p < 0/05$). زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز هفتم پس از دریافت تفاوت معنی داری بین گروه‌ها نداشت (شکل ۵ ج).



نمودار ۵: آزمون به یاد آوری حافظه، تعداد دفعات ورود به اتاق تاریک و مدت زمان سپری شده در اتاق تاریک در گروه‌های مورد مطالعه در روزهای ۱ و ۷ پس از یادگیری و در انتهای هفته هفتم پس از تولد به ترتیب در قسمت‌های الف، ب و ج

*، **، ***، ****، به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با کنترل در سطوح $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ ، $p < 0/001$ ، $p < 0/0001$.
 †، ††، †††، ††††، به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه حلال در سطوح $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ ، $p < 0/001$.

بحث و نتیجه گیری:

در بررسی بافتی موش‌های تیمار شده با WIN 55212-2، مناطق تخریب‌شده به وضوح به صورت نقاط سیاه و توخالی در لایه سلول‌های پورکتز و در لایه محتوی سلول‌های گرانولی قابل تشخیص بود. نورون‌های پورکتز در این گروه، به صورت پراکنده و نامنظم در لایه میانی قشر مخچه با شدت بسیار رنگ شده و تراکم ظاهری نورون‌های پورکتز کمتر از گروه گواه بود. ماری جوانا بخصوص با اثر روی مدار خلفی گردش خون مغز ممکن است به عنوان عامل خطر ساز برای سکنه‌های مغزی در کودکان در نظر گرفته شود. مصرف ماری جوانا اثراتی حاد مانند سرگیجه، اختلال در تعادل و افت فشار خون وضعیتی و در دوزهای بالا پرفشاری عمومی و برادیکاردی به همراه دارد. برخلاف سکنه‌های مخچه‌ای متعارف در افراد غیر معتاد که ایسکمی در یک رگ خونی مشاهده می‌شود، در سکنه‌های مخچه‌ای ناشی از مصرف ماری جوانا چندین رگ خونی دچار انفارکتوس می‌شوند. صدمه به مخچه به علت نداشتن مدارهای گردش خون جانبی قوی از خطر بالاتری برای بروز انفارکتوس در مصرف کنندگان ماری جوانا برخوردار است. ماری جوانا با ایجاد اسپاسم رگی، کاهش فشار خون، اختلال در سیستم خودتنظیمی عروقی و رفلکس وازوموتور می‌تواند باعث انفارکتوس و آسیب به بافت مخچه شود (گلر^۱، لفتیس^۲ و برینک^۳، ۲۰۰۴). منطقه وسیعی از کورتکس مخچه و مغز اغلب به دنبال سوء مصرف داروهای مخدر به خصوص کانابیس، هروئین و الکل دچار آتروفی می‌شوند. آتروفی شدید قسمت فوقانی ورمیس مخچه و لوب فرونتال بیشتر گزارش شده است (کالا^۴ و ماستاگلیا^۵، ۱۹۸۰). تراکم بالایی از گیرنده‌های نوع یک کانابینوئیدی در انتهای آکسون‌های سیناپس دهنده با سلول‌های پورکتز وجود دارد. اثرات این گیرنده‌ها از طریق اتصال به جی پروتئین‌ها اعمال می‌شود. با توجه به بیان بالای این گیرنده‌ها در مخچه و مغز، در صورتی که آنها دچار تغییر شوند منجر به نقص‌هایی در کنترل سیستم حرکتی خواهند شد (هرکنهام^۶، گرون^۷، لین^۸، کاستا^۹ و ریچ فیلد^{۱۰}، ۱۹۹۱؛ تسو^{۱۱}، برون، ادو^{۱۲}، مکی و واکر، ۱۹۹۷؛ دویه^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۹). مصرف مزمن کانابینوئیدها منجر به غیر حساس

1. Geller
4. Cala
7. Groen
10. Richfield
13. Dowie

2. Loftis
5. Mastaglia
8. Lynn
11. Tsou

3. Brink
6. Herkenham
9. Costa
12. Udo

شدن و کاهش گیرنده‌های کانابینویدی در مغز می‌شود و به صورت معنی‌دار باعث افزایش سطح CAMP و فعالیت PKA می‌شود (روبینو^۱ و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین می‌تواند باعث کاهش فعالیت سیستم مزولیمیک شده و به عنوان یک فاکتور با خطر بالا و قابل توجه برای پیشرفت و توسعه اسکیزوفرنی در بالغین تلقی شود (زامیت^۲، البک^۳، اندرسون^۴، لاندبرگ^۵ و لوئر^۶، ۲۰۰۲). تغییر در تعداد ایستادن روی دو پا علائمی دال بر تغییرات در فعالیت‌های حرکتی خودبخودی و رفتار جستجوگرانه حیوان است در حالی که تغییر در تعداد رفتار وسواس گونه‌ی لیسیدن و خاراندن سر و صورت^۷ نشان‌دهنده آسیب احتمالی، رفتار وسواسی و کاهش فعالیت حرکتی است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج میلر^۸ و ویلکر^۹ (۱۹۷۳) هم‌خوانی دارد و نشان می‌دهد که مصرف مزمن WIN در دوره حاملگی باعث کاهش فعالیت حرکتی و رفتار جستجوگرانه نوزادان پس از تولد می‌شود. میلر و همکارانش (۱۹۷۳) کاهش دو معیار حرکتی در موش سالم شامل آمولیشن^{۱۰} و ایستادن روی دو پا^{۱۱} را در مصرف تتراهیدوروکانابینول^{۱۲} گزارش کردند (میلر و ویلکر، ۱۹۷۳). حال آنکه، مرئو^{۱۳} و همکاران (۲۰۰۳) تفاوت معنی‌داری در این دو پارامتر متعاقب تجویز مزمن WIN در دوران حاملگی بر متولدین ۴۰ و ۸۰ روز پس از تولد با گروه گواه مشاهده نکردند. اما افزایش فعالیت حرکتی و نقص در به خاطر آوری به دنبال مصرف مزمن کانابیس گزارش شده است (مرئو و همکاران، ۲۰۰۳). مصرف این مواد در طول دوره حاملگی به دلیل تاثیری که می‌تواند بر رشد جنین داشته باشد مشکلات اساسی در سلامتی نوزادان ایجاد می‌کند (بنجیانو و همکاران، ۲۰۰۱؛ بنجیانو و همکاران، ۲۰۰۷؛ فروند و همکاران، ۲۰۰۳؛ ریچاردسون و همکاران، ۲۰۰۳؛ ویوروس و همکاران، ۲۰۰۵). سیستم‌های مغزی در طول تکامل جنین دارای رشد سریعی هستند که اگر تکامل آن‌ها به صورت کامل انجام نشود در مراحل بعدی زندگی این نواقص قابل جبران نیستند، بنابراین هرگونه تغییری در رشد و تکامل سیستم عصبی در این دوره همراه با نقص‌هایی در عملکرد سیستم اعصاب مرکزی از جمله فعالیت‌های حرکتی و شناختی خواهد بود (هوینزینک^{۱۴} و مولدر^{۱۵}، ۲۰۰۶). در پژوهشی که توسط میسور^{۱۶}، مارتز^{۱۷} و کارلینی^{۱۸}

- | | | |
|----------------|-------------|-------------|
| 1. Rubino | 2. Zammit | 3. Allebeck |
| 4. Andreasson | 5. Lundberg | 6. Lewis |
| 7. grooming | 8. Miller | 9. Wikler |
| 10. ambulation | 11. rearing | 12. THC |
| 13. Mereu | 14. Huizink | 15. Mulder |
| 16. Masur | 17. Martz | 18. Carlini |

(۱۹۷۱) انجام شده است کاهش در لیسیدن و خاراندن سر و صورت و تعداد دفعات دفع به دنبال مصرف ۲/۵ mg/kg THC در موش‌های بالغ گزارش شده است. وارداریس^۱، ویسز^۲، فازل^۳ و روویچ^۴ (۱۹۷۶) به دنبال تجویز تتراهیدروکانابینول با استفاده از آزمون فضای باز، کاهش در رفتار تهاجمی را مشاهده کردند. ناوارو و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که مواجهه شدن جنین با عصاره حشیش باعث کاهش فعالیت حرکتی در موش‌های نر می‌شود، در حالی که موش‌های ماده متولد شده از مادران در معرض عصاره حشیش در طی حاملگی فعالیت حرکتی نوزادان آن‌ها افزایش می‌یابد (ناوارو و همکاران، ۱۹۹۴). این مطالعه با تجویز WIN در دوره حاملگی مادران باعث کاهش زمان ورود و افزایش تعداد ورود به اتاق تاریک در نوزادان موش‌ها در هفته هفتم پس از تولد شد که می‌تواند دال بر اختلال در روند به خاطر آوری بر اثر مصرف آگونیست گیرنده‌های نوع یک کانابینوئیدی باشد. در مرحله یادگیری و اکتساب تفاوتی بین گروه دارو، حلال و گواه مشاهده نشد. ریچاردسون و همکاران (۲۰۰۳) با تجویز THC به موش‌های حامله نشان دادند که ماده موثره در کانابیس باعث نقص در اکتساب و به خاطر آوری حافظه در نوزادان موش‌ها طی ۲۱ روز پس از تولد می‌شود. اما میلر و درئو^۵ و جوینس^۶ (۱۹۷۳) تاثیری بر روند اکتساب و به خاطر آوری پس از تجویز دوزهای ۵ و ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم THC مشاهده نکردند. یافته‌های پژوهش حاضر با نتایج مرئو و همکاران (۲۰۰۳) هماهنگ است که مشخص کردند، نوزادان موش‌هایی که مادران آن‌ها در دوران حاملگی کانابیس مصرف کرده‌اند، با نقص‌هایی در به خاطر آوری مواجه هستند. به نظر می‌رسد استفاده از کانابیس به دلیل فعال کردن کلسینورین و تأثیر بر روند LTP و LTD باعث بهبود نقص القاء شده در حافظه و یادگیری توسط مواد شیمیائی می‌شود (لو^۷، یین^۸، وو^۹ و وی^{۱۰}، ۲۰۰۳). ساختارهای هیپوکمپ به خصوص در نواحی شکنج دنداندار و CA3 یکی از مناطق مغز دارای بیشترین تراکم گیرنده‌های کانابینوئیدی است (نستور^{۱۱}، رابرتز^{۱۲}، گاراون^{۱۳} و هستر^{۱۴}، ۲۰۰۸). مصرف کانابینوئیدها با تأثیر بر روی گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع یک و فعال کردن چند مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی مانند مهار فعالیت آدنیل سیکلاز، مهار

1. Vardaris
4. Rawitch
7. Luo
10. Wei
13. Garavan

2. Weisz
5. Drew
8. Yin
11. Nestor
14. Hester

3. Fazel
6. Joyce
9. Wu
12. Roberts

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، فعال کردن کانال‌های پتاسیمی (به‌ویژه نوع سریع و رو به داخل یکسوساز) و تغییرات غیر قابل برگشت روی سیستم کانابینویدی بدن باعث تغییر وضعیت هیجانی، خلق و خو و تداخل در حافظه کوتاه‌مدت می‌شوند (هرکنهام و همکاران، ۱۹۹۰؛ فروند و همکاران، ۲۰۰۳). تراکم گیرنده‌های کانابینویدی در طول مراحل مختلف رشد متغیر است و این گیرنده‌ها در استفاده طولانی‌مدت و سوء‌مصرف کانابیس‌ها دستخوش تنظیم کاهشی و کاهش حساسیت می‌شوند که این مسئله به‌خصوص در هیپوکمپ موش‌های بالغ گزارش شده است (نستور، ۲۰۰۸). شواهدی مبنی بر تغییرات در مورفولوژی نورون‌های هیپوکمپ در مصرف مزمن کانابینویدها وجود دارد و مشخص شده است که مصرف کانابیس‌ها می‌تواند باعث کاهش تراکم ماده خاکستری در هیپوکمپ شود (ماتوچیک^۱، الدرت^۲، کادت^۳ و بولا^۴، ۲۰۰۵). استفاده از روش تصویربرداری ثابت کرده است که جریان خون در قشر پری‌فرونتال و فعالیت قشر پاراهیپوکمپال در طول حافظه کلامی و یادگیری‌های ارتباطی در مصرف‌کنندگان کانابیس کاهش می‌یابد (بلوک^۵ و همکاران، ۲۰۰۲؛ جگر^۶ و همکاران، ۲۰۰۷).

لذا تغییرات مشاهده شده در پژوهش حاضر بر روی فعالیت حرکتی، سیستم یادگیری و حافظه نوزادان موش‌هایی که مادران آن‌ها در دوره حاملگی تحت درمان با کانابیس بوده‌اند و هم‌چنین مطالعات بافتی از تئوری تغییرات اساسی و طولانی‌مدت روی الگوهای رفتاری در اثر مصرف کانابیس حمایت می‌کند و این تغییرات احتمالاً با اثرات اعمال شده توسط کانابیس‌ها روی سیستم‌های ناقل عصبی مثل دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابا ارژیک، گلوتاماترژیک و اوپیوئیدارژیک می‌تواند در ارتباط باشد (ویوروس و همکاران، ۲۰۰۵؛ کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷).

منابع

- Arnold, J. C. (2000). **The behavioural and neural effects of cannabinoids: Studies using Lewis and Wistar strain rats.** University of Sydney, Sydney.
- Benagiano, V., Lorusso, L., Flace, P., Girolamo, F., Rizzi, A., Sabatini, R. (2007). Effects of prenatal exposure to the CB-1 receptor agonist WIN 55212-2 or CO on the GABAergic neuronal systems of rat cerebellar cortex. **Neuroscience**, 149(3), 592-601.

1. Matochik
4. Bolla

2. Eldreth
5. Block

3. Cadet
6. Jager

- Benagiano, V., Roncali, L., Virgintino, D., Flace, P., Errede, M., Rizzi, A. (2001). GABA immunoreactivity in the human cerebellar cortex: a light and electron microscopical study. **Histochemical Journal**, 33(9-10), 537-543.
- Block, R. I., O'Leary, D. S., Hichwa, R. D., Augustinack, J. C., Boles Ponto, L. L., Ghoneim, M. M. (2002). Effects of frequent marijuana use on memory-related regional cerebral blood flow. **Pharmacological and Biochemical Behavior**, 72(1-2), 237-250.
- Bortolato, M., Frau, R., Orru, M., Casti, A., Aru, G. N., Fa, m., Manunta, M., usai, a., Mereu, G., Gessa, GL. (2006). Prenatal exposure to a cannabinoid receptor agonist does not affect sensorimotor gating in rats. **European Journal of Pharmacological**, 531(1-3), 166-170.
- Brown, S. P., Brenowitz, S. D., & Regehr, W. G. (2003). Brief presynaptic bursts evoke synapse-specific retrograde inhibition mediated by endogenous cannabinoids. **Natural Neuroscience**, 6(10), 1048-1057.
- Cala, L. A., & Mastaglia, F. L. (1980). Computerized axial tomography in the detection of brain damage: Alcohol, nutritional deficiency and drugs of addiction. **The Medical journal of Australia**, 2(4), 193.
- Castelli, M. P., Paola Piras, A., D'Agostino, A., Pibiri, F., Perra, S., Gessa, G. L. (2007). Dysregulation of the endogenous cannabinoid system in adult rats prenatally treated with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2. **Eurology Journal of Pharmacological**, 573(1-3), 11-19.
- Dalterio, S. L. (1986). Cannabinoid exposure: effects on development. **Neurobehavioral Toxicol Teratol**, 8(4), 345-352.
- Diana, M. A., Levenes, C., Mackie, K., & Marty, A. (2002). Short-term retrograde inhibition of GABAergic synaptic currents in rat Purkinje cells is mediated by endogenous cannabinoids. **Journal of Neuroscience**, 22(1), 200-208.
- Dowie, M. J., Bradshaw, H. B., Howard, M. L., Nicholson, L. F. B., Faull, R. L. M., & Hannan, A. J. (2009). Altered CB1 receptor and endocannabinoid levels precede motor symptom onset in a transgenic mouse model of Huntington's disease. **Neuroscience**, 163(1), 456-465.
- Dursun, I., Jakubowska-Dogru, E., & Uzbay, T. (2006). Effects of prenatal exposure to alcohol on activity, anxiety, motor coordination, and memory in young adult Wistar rats. **Pharmacological and Biochemical Behavior**, 85 (2), 345-355.
- Ebrahim, S. H., & Gfroerer, J. (2003). Pregnancy-related substance use in the United States during 1996-1998. **Obstet Gynecol**, 101(2), 374-379.
- Fernandez-Lopez, D., Martinez-Orgado, J., Nunez, E., Romero, J., Lorenzo, P., & Moro, M. A. (2006). Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. **Pediatric Research**, 60(2), 169-173.
- Freund, T. F., Katona, I., & Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Review**, 83(3), 1017-1066.
- Fried, P. A., & Smith, A. M. (2001). A literature review of the consequences of prenatal marijuana exposure. An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. **Neurotoxicol Teratol**, 23(1), 1-11.
- Fried, P. A., Watkinson, B., & Gray, R. (2003). Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marijuana. **Neurotoxicol Teratol**, 25(4), 427-436.

- Galante, M., & Diana, M. A. (2004). Group I metabotropic glutamate receptors inhibit GABA release at interneuron-Purkinje cell synapses through endocannabinoid production. **Journal of Neuroscience**, 24(20), 4865-4874.
- Geller, T., Loftis, L., & Brink, D. S. (2004). Cerebellar infarction in adolescent males associated with acute marijuana use. **Pediatrics**, 113(4), 365.
- Herkenham, M., Groen, B. G. S., Lynn, A. B., De Costa, B. R., & Richfield, E. K. (1991). Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum. **Brain research**, 552(2), 301-310.
- Herkenham, M., Lynn, A. B., Little, M. D., Johnson, M. R., Melvin, L. S., de Costa, B. R. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 87(5), 1932-1936.
- Huizink, A. C., & Mulder, E. J. (2006). Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. **Neuroscience Biobehavioral Review**, 30(1), 24-41.
- Hutchings, D. E., Martin, B. R., Gamagaris, Z., Miller, N., & Fico, T. (1989). Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. **Life and Science**, 44(11), 697-701.
- Jager, G., Van Hell, H. H., De Win, M. M., Kahn, R. S., Van Den Brink, W., Van Ree, J. M. (2007). Effects of frequent cannabis use on hippocampal activity during an associative memory task. **Eurological and Neuropsychopharmacol sciences**, 17(4), 289-297.
- Kim, J., Isokawa, M., Ledent, C., & Alger, B. E. (2002). Activation of muscarinic acetylcholine receptors enhances the release of endogenous cannabinoids in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, 22(23), 10182-10191.
- Luo, J., Yin, J. H., Wu, H. Z., & Wei, Q. (2003). Extract from Fructus cannabis activating calcineurin improved learning and memory in mice with chemical drug-induced dysmnesia. **Acta Pharmacol Sin**, 24(11), 1137-1142.
- Masur, J., Martz, R. M., & Carlini, E. A. (1971). Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) delta9-trans-tetrahydrocannabinol on the behavior of rats in an open-field arena. **Psychopharmacologia**, 19(4), 388-397.
- Matochik, J. A., Eldreth, D. A., Cadet, J. L., & Bolla, K. I. (2005). Altered brain tissue composition in heavy marijuana users. **Drug & Alcohol Dependend**, 77(1), 23-30.
- Mereu, G., Fa, M., Ferraro, L., Cagiano, R., Antonelli, T., Tattoli, M. (2003). Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100(8), 4915-4920.
- Miller, L. L., Drew, W. G., & Joyce, P. (1973). 9-THC: effect on acquisition and retention of a one-trial passive avoidance response. **Behavioral & Biological**, 8(3), 421-426.
- Moreno, M., Escuredo, L., Munoz, R., Rodriguez de Fonseca, F., & Navarro, M. (2005). Long-term behavioural and neuroendocrine effects of perinatal activation or blockade of CB1 cannabinoid receptors. **Behavior and Pharmacologia**, 16(5-6), 423-430.

- Navarro, M., De Fonseca, F. R., Hernandez, M. L., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1994). Motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity in adult rats perinatally exposed to cannabinoids. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 47(1), 47-58.
- Nestor, L., Roberts, G., Garavan, H., & Hester, R. (2008). Deficits in learning and memory: parahippocampal hyperactivity and frontocortical hypoactivity in cannabis users. **Neuroimage**, 40(3), 1328-1339.
- Richardson, G. A., Ryan, C., Willford, J., Day, N. L., & Goldschmidt, L. (2002). Prenatal alcohol and marijuana exposure: effects on neuropsychological outcomes at 10 years. **Neurotoxicol Teratol**, 24(3), 309-320.
- Rubino, T., Vigano, D., Massi, P., Spinello, M., Zagato, E., Giagnoni, G. (2000). Chronic [Delta]-9-tetrahydrocannabinol treatment increases cAMP levels and cAMP-dependent protein kinase activity in some rat brain regions. **Neuropharmacology**, 39(7), 1331-1336.
- Schmued, L. C., Albertson, C., & Slikker, W. J. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Research**, 751(1), 37-46.
- Schmued, L. C., & Hopkins, K. J. (2000). Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. **Brain research**, 874(2), 123-130.
- Tsou, K., Brown, S., Saudo-Pe a, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1997). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. **Neuroscience**, 83(2), 393-411.
- Vardaris, R. M., Weisz, D. J., Fazel, A., & Rawitch, A. B. (1976). Chronic administration of delta-9-tetrahydrocannabinol to pregnant rats: studies of pup behavior and placental transfer. **Pharmacol Biochemical Behavior**, 4(3), 249-254.
- Viveros, M. P., Liorente, R., Moreno, E., & Marco, E. M. (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. **Behavior and Pharmacologia**, 16(5-6), 353-362.
- Wang, H., Dey, S. K., & Maccarrone, M. (2006). Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility. **Endocrine Review**, 27(5), 427-448.
- Zammit, S., Allebeck, P., Andreasson, S., Lundberg, I., & Lewis, G. (2002). Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: historical cohort study. **British Medical Journal**, 325 (7374), 1199.