مقاله پژوهشی
Research Article

بررسی اثرات مخرب مصرف WIN 55212-2، آگونیست گیرنده کانابینوییدی، 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 کانابینوییدها از جمله حشیش و WIN 55212-2 (WIN) در طول دوره جنینی می تواند با آسیب در روند رشد جنین و نقص در عملکرد سیستم اعصاب مرکزی همراه باشد. **روش:** موش‌های گروه درمان روزانه ۰/۵ یا ۱ میلی گرم 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 هفته های 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 معنی داری در تعداد برخاستن بر روی دو پا و افزایش معنی داری 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 معنی داری 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 گروه گواه و حلال مشاهده شد. تعداد نوزادان و طول دوره حاملگی کاهش معنی داری در گروه WIN۱ mg/kg نسبت به گروه گواه، حلال و WIN۰/۵ mg/kg نشان داد درحالیکه درصد مرگ و میر افزایش معنی داری یافت. **نتیجه‌گیری:** مصرف کانابینوییدها در طی حاملگی باعث تخریب سلول‌های مغز شده و موجب آسیب به عملکرد سیستم اعصاب مرکزی از جمله کنترل حرکت، توان به خاطرآوری 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 ماری‌جوانا به طور وسیعی به عنوان داروهای غیر قانونی[1] جهت مصارف پزشکی، تفننی و تفریحی و یا در برخی مذاهب مصرف می‌شود (کاستلی[2] و همکاران، ۲۰۰۷؛ آرنولد[3]، ۲۰۰۰). اغلب دولت‌های غربی در اواخر قرن بیستم، استفاده‌های 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 می‌کرد. 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). کانابینوییدها بویژه در جوامع غربی به مقدار زیادی در زنان در طول دوره حاملگی استفاده می‌شود. با این‌حال، مطالعات انسانی و حیوانی نشان داده است که کانابینوییدها به آسانی از سد جفتی عبور می‌کنند و از طریق شیر مادر به فرزند منتقل می‌شوند و به دلیل اثرات منفی که بر رشد جنین دارد، مشکلاتی در سلامتی جنین ایجاد می‌کند (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ بناجیانو[4] و همکاران، ۲۰۰۷؛ هوتچینگز[5]، مارتین[6]، گاماگریس[7]، میلر[8] و فیکو[9]، ۱۹۸۹. ابراهیم[10] و گفروئرر[11]، ۲۰۰۳؛ بورتولاتو[12] و همکاران، همکاران، ۲۰۰۶). مصرف این مواد در دوره جنینی تأثیر بسزایی بر سیستم‌های نوروترانسمیتری متعدد از قبیل دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابارژیک، گلوتاماترژیک و اوپیوئیدرژیک دارد، بدین جهت باعث تغییرات اساسی و طولانی‌مدت روی الگوهای رفتاری می‌شوند (کاستلی و همکاران، ۲۰۰۷؛ ویوروس[13]، لیورنت[14]، مورنو[15]، مارکو[16]، ۲۰۰۵). سیستم کانابینوئیدی دارای یک فعالیت تعدیلی قوی روی انتقال سیناپسی در مغز پستانداران است. کانابینوئیدهای درون‌زایی همچون آناندومايد می‌توانند آزادسازی گلوتامات و گابا را در نواحی زیادی از مغز از جمله مخچه، هیپوکمپ و قشر مغز مهارکنند (فروند[17]، کاتونا[18]، پیوملی[19]، ۲۰۰۳؛ گالانته[20] و دیانا[21]، ۲۰۰۴؛ کیم[22]،ایزوکاوا[23]، لدنت[24]،

1. illicit drugs
2. Castelli
3. Arnold
4. Benagiano
5. Hutchings
6. Martin
7. Gamagaris
8. Miller
9. Fico
10. Ebrahim
11. Gfroerer
12. Bortolato
13. Viveros
14. Liorente
15. Moreno
16. Marco
17. Freund
18. Katano
19. Piomelli
20. Galante
21. Diana
22. Kim
23. Isokawa
24. Ledent

آلگر[1]، ۲۰۰۲؛ برون[2]، برنوتز[3] و رگهر[4]، 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، لونز[5]، مکی[6] و مارتی[7]، ۲۰۰۲؛ گالانته 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 شیرخوارگی در معرض اگونیست‌های 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 نورواندوکرینی گزارش شده است (فرناندز لوپز[8] و همکاران، ۲۰۰۶؛ دلتریو[9]، ۱۹۸۶؛ وانگ[10]، دی[11]، ماکارون[12]، ۲۰۰۶؛ مورنو[13]، اسکوردو[14]، مونوز[15]، رودریگز[16] و ناوارو[17]، ۲۰۰۵؛ فرید[18] و اسمیت[19]، ۲۰۰۱؛ ناوارو[20]، رودریگز[21]، هرناندز، راموس[22] و فرناندز[23]، 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[24]، ریان[25]، ویلفورد[26]، دی[27] و گلداشمیت[28]، ۲۰۰۲). طبق یافته‌های موجود، پژوهش‌های بافتی و رفتاری کمی برای شناسایی اثرات ناشی از مصرف مزمن کانابینوییدها در مادران حامله بر روی جنین انجام شده است. با توجه به حضور گیرنده‌های کانابینوییدی بر روی سیناپس‌های موجود در کورتکس مخچه و هیپوکمپ که در اثر تداخل در روند طبیعی پیام‌رسانی به علت مصرف اگونیست‌های برون‌زاد می‌تواند

1. Alger
2. Brown
3. Brenowitz
4. Regehr
5. Levenes
6. Mackie
7. Marty
8. Fernandez Lopez
9. Delterio
10. Wang
11. Dey
12. Maccarrone
13. Moreno
14. Escuredo
15. Munoz
16. Rodriguez
17. Navaro
18. Freid
19. Smith
20. Navarro
21. Hernandez
22. Ramos
23. Fernandez
24. Richardson
25. Ryan
26. Wilford
27. Day
28. Goldschmidt

تأثیرگذار شود، از جمله تأثیر احتمالی این اگونیست‌ها 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 صحرائی پس از تولد پرداخته است.

روش

جامعه، نمونه و روش نمونه‌گیری

در این مطالعه از موش‌های صحرایی ماده از نژاد ویستار[1] 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 سانتی گراد)، در اتاق حیوانات دانشکده پزشکی شهید بهشتی نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. یک جفت موش صحرایی[2] ماده با یک موش صحرایی جهت جفت گیری در آخرین ساعات بعداز ظهر در یک قفس قرار گرفته و اسمیر واژینال در صبح روز بعد ساعت ۹ صبح تهیه می شد و روز مشاهده اسپرم به عنوان روز صفر در نظر گرفته شد. موش های حامله به طور تصادفی به گروه‌های گواه، حلال و درمانی تقسیم شدند (حداقل ۸ موش در هر گروه). موش های حامله در گروه های درمان روزانه ۰/۵ یا ۱ میلی گرم 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 میلی لیتر بر کیلوگرم تزریق شد. محلول ۱ درصد توئین/سالین به صورت زیر جلدی در حجم ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم در گروه حلال تزریق شد. انتخاب داروی WIN به این علت است که دارای تمایل و قدرت جذب[3] بالایی جهت اتصال به گیرنده‌های کانابینوییدی است و همچنین اغلب آثار ماری جوانا و حشیش را تقلید می‌کند

1. Wistar
2. Rat
3. affinity

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

مطالعات بافت شناسی

نوزادان نر موش های گروه های 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 گروه های گواه و WIN به مدت یک شب در محلول فیکساسیون به اضافه سوکروز فیکس شدند. بافت ها توسط میکروتوم انجمادی با ضخامت ۲۵ میکرومتر روز بعد برش زده شدند. برش ها جهت بررسی تغییرات پاتولوژیک با استفاده از فلوروجید[1] (یک مارکر فلورسانت برای تشخیص نورون های تخریب شده) رنگ آمیزی شدند (اسکمیود[2]، البرتسون[3]، اسلیکر[4]، ۲۰۰۰ و اسکمیود، هاپکینز[5]، ۱۹۹۷).

مطالعات رفتاری

الف) آزمون فضای باز[6] با استفاده از سیستم ردیاب تصویری[7]: جهت بررسی رفتارهای حرکتی حیوان در انتهای هفته های سوم، پنجم و هفتم پس از تولد از آزمون فضای باز استفاده شد (حداقل ۱۵ موش جوان در هر گروه). نرم افزار اتوویژن[8] یک سیستم ردیاب تصویری برای اتوماسیون آزمایشات رفتاری از طراحی آزمایش تا تحلیل آماری داده های جمع‌آوری شده می باشد که می‌تواند برای اکثر تست‌های رفتاری در محدوده وسیعی از شرایط آزمایش استفاده شود. رایج‌ترین کاربرد اتوویژن 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 موش های 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 اتوویژن 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[1]، جکوبوسکا[2] و ازبی[3]، ۲۰۰۶).

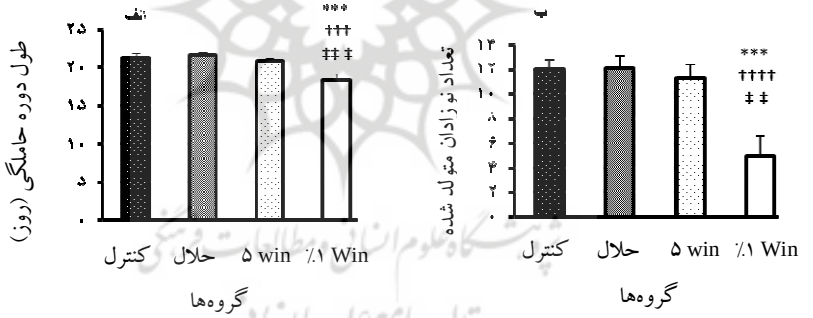
ب) آزمون یادگیری احترازی غیر فعال[4]: این آزمون با استفاده از دستگاه شاتل باکس[5] انجام شد. این ابزار از دو محفظه تاریک و روشن با اندازه برابر و یک درب قابل کنترل بین آن‌ها تشکیل شده است. حیوان‌ها (حداقل ۱۵ موش جوان در هر گروه) در انتهای هفته پنجم در مرحله سازش، داخل بخش روشن این دستگاه به گونه‌ای قرار داده می شدند که روی آن‌ها به سمت مقابل بخش تاریک باشد. درب بین دو محفظه بعد از ۱۰ ثانیه باز و اجازه داده می شود تا حیوان آزادانه وارد بخش تاریک گردد. مدت زمان تأخیر برای ترک محفظه روشن ثبت می شد. 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 می شدند. 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 می ماند و سپس می‌توانست از دستگاه خارج شود. مرحله یادگیری ۲ دقیقه بعد مجددا تکرار شده و اگر حیوان دوباره وارد ناحیه تاریک می شد، به او شوک اعمال می‌گردید. تعداد دفعاتی که حیوان شوک دریافت می‌کرد، پاسخ های احترازی یک و هفت روز بعد از مرحله یادگیری در مرحله به خاطر آوری مجددا اندازه گیری می شد هر یک از موش ها داخل محفظه روشن قرار داده شدند و زمان تاخیر برای ورود مجدد به محفظه تاریک ثبت می‌شد. در حین آزمون بخاطرآوری حیوان شُک 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 اندازه گیری 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 WIN۱ mg/kg با گروه‌های گواه، حلال و WIN۰/۵ mg/kg کاهش معنی داری را نشان داد (p< ۰/۰۰۱، شکل ۱) و درصد زنده ماندن در این گروه نسبت به گروه های دیگر کاهش چشمگیری داشت به طوریکه تمام نوزادان موش‌ها در همان چند روز اول تولد از بین می‌رفتند (شکل ۲).



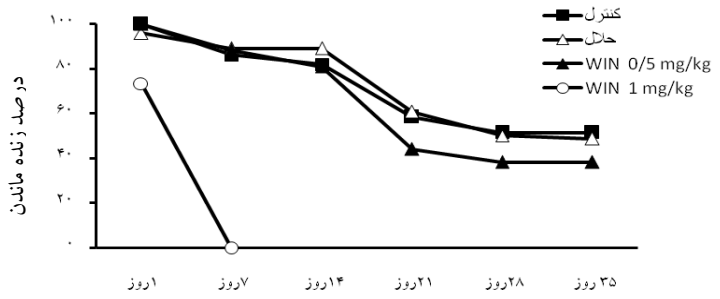
نمودار ۱: مقایسه طول دوره حاملگی (الف) و تعداد نوزادان متولد شده (ب) در گروه های مورد مطالعه

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

***: تفاوت معنی دار با گروه در سطح p< ۰/۰۰۱

†††، ††††: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه حلال با p<۰/۰۰۱ و p<۰/۰۰۰۱

‡‡ و‡‡‡: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه تحت درمان با WIN ./۵mg/kg با p< ۰/۰۱ و p< ۰/۰۰۱



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

گروه WIN۱ 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 هفته‌های اول، دوم، سوم، چهارم و پنجم پس از تولد تنها در انتهای هفته اول بین گروه WIN۰/۵ mg/kg با گواه و حلال اختلاف معنی داری مشاهده شد (جدول ۱).

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

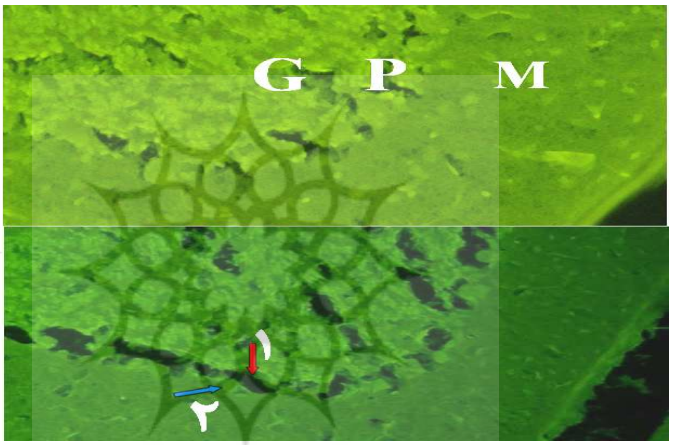
گروه‌ها	روز ۱	روز ۸	روز ۱۵	روز ۲۲	روز ۲۹	روز ۳۶
گواه	۵/۵۱±۰/۱۰	۱۰/۷۱±۰/۲۲	۱۹/۱۱±۰/۵۰	۲۷/۷۸±۰/۸۴	۴۴/۷۶±۱/۶۸	۷۴±۲/۵۸
حلال	۵/۲۳±۰/۰۶	۱۰/۰۹±۰/۲۲	۱۸/۴۱±۰/۴	۲۷/۵۳±۰/۶۳	۴۲/۰۴±۲/۴۵	۷۱/۶۶±۱/۰۳
WIN ۰/۵mg/kg	۵/۵۰±۰/۱۳	۹/۷۱±۰/۳۳	۱۸/۱±۰/۳۹	۲۶/۰۸±۰/۷۶	۳۹/۶۶±۱/۵۶	۶۹/۵۸±۲/۰۵

***: تفاوت معنی دار با گروه در سطح p< ۰/۰۰۱

††: تفاوت معنی دار با گروه حلال p< ۰/۰۱ (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 (۰/۵ mg/kg) WIN بر روی نورون های پورکنژ از رنگ آمیزی فلوروجید استفاده شد. ترتیب طبیعی لایه سلول‌های پورکنژ 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 موش‌های

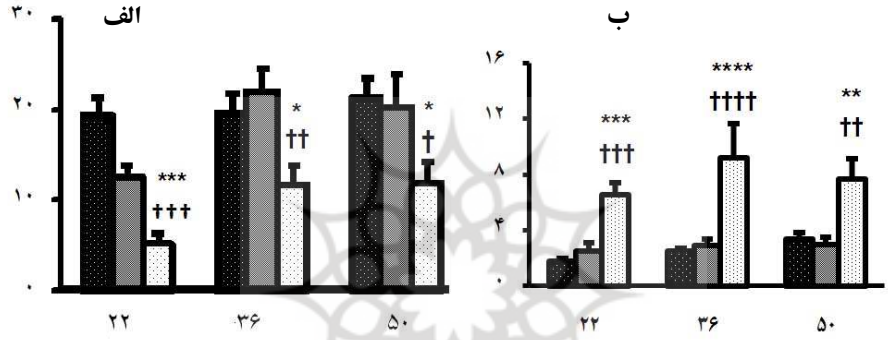
تیمار شده باWIN، مناطق تخریب شده به صورت نقاط سیاه و توخالی، هم در لایه سلول‌های پورکنژ و هم در لایه محتوی سلول‌های گرانولی به وضوح قابل تشخیص است. همچنین نورون های پورکنژ به صورت پراکنده و نامنظم در لایه میانی قشر مخچه با شدت بسیار رنگ گرفته اند و تراکم ظاهری نورون های پورکنژ در این گروه (شکل۳ ب) کمتر از گروه گواه (شکل۳ 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 لایه های 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 سلول های پورکنژ قرار دارند. نوک پیکان ۱ (قرمز) محل هایی 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[1] در نوزادان موش‌هایی که مادرانشان در طی حاملگی تحت درمان با WIN بوده اند، کاهش معنی داری نسبت به گروه حلال و گواه (p<۰/۰۵) داشت (شکل الف ۴) در حالیکه رفتار لیسیدن و خاراندن سر و صورت[2] 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 گوشه‌ای 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 ۳۶، ۲۲ و ۵۰ پس از تولد به ترتیب در شکل‌های الف و ب

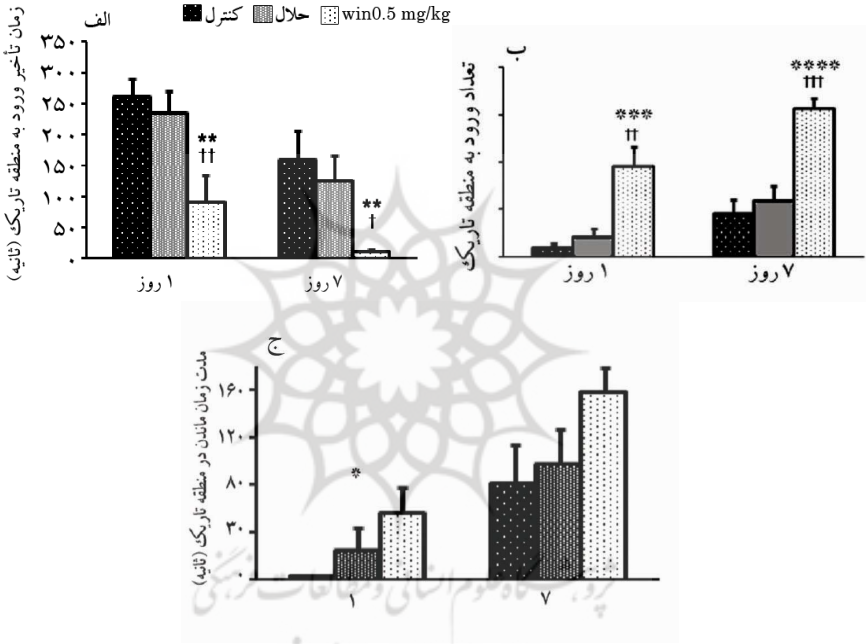
*، **، ***، **** : به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۵، p< ۰/۰۱ ، p< ۰/۰۰۱، p< ۰/۰۰۰۱

†, ††, †††, ††††: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه حلال در سطح p< ۰/۰۵، p< ۰/۰۱، p< ۰/۰۰۱، p< ۰/۰۰۰۱

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 موش‌هایی که در دوره حاملگی مادرانشان تحت درمان WIN با مقدار ۰/۵ 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 ۱و ۷ پس از دریافت بین گروه گواه و حلال تفاوت

1. Rearing Frequency
2. grooming frequency

معنی‌داری نشان نداد. اما میان گروه تحت درمان با WIN با گروه‌های گواه و حلال در روز اول در سطح (p< ۰/۰۱) و در روز هفتم در سطح (p< ۰/۰۵) اختلاف معنی داری مشاهده شد(شکل ۵ الف و ۵ ب). زمان سپری شده در اتاق تاریک در روز اول پس از دریافت، افزایش معنی‌داری در گروه تحت درمان WIN نسبت به گروه گواه نشان داد (p<۰/۰۵). 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 قسمت های الف، ب وج

*، **، ***، ****، به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با کنترل در سطوح p< ۰/۰۵، p< ۰/۰۱، p< ۰/۰۰۱، p< ۰/۰۰۰۱.

†، ††، †††: به ترتیب نشان دهنده تفاوت معنی دار با گروه حلال در سطوح p< ۰/۰۵، p< ۰/۰۱، p<۰/۰۰۱.

بحث و نتیجه‌گیری:

در بررسی بافتی موش‌های تیمار شده با WIN 55212-2، مناطق تخریب‌شده به وضوح به صورت نقاط سیاه و توخالی در لایه سلول‌های پورکنژ و در لایه محتوی سلول‌های گرانولی قابل تشخیص بود. نورون‌های پورکنژ در این گروه، به صورت پراکنده و نامنظم در لایه میانی قشر مخچه با شدت بسیار رنگ شده و تراکم ظاهری نورون‌های پورکنژ کمتر از گروه گواه بود. ماری‌جوانا بخصوص با اثر روی مدار خلفی گردش خون مغز ممکن است به عنوان عامل خطرساز برای سکته‌های مغزی در کودکان در نظر گرفته شود. مصرف ماری‌جوانا اثراتی حاد مانند سرگیجه، اختلال در تعادل و افت فشار خون وضعیتی و در دوزهای بالا پرفشاری عمومی و برادیکاردی به همراه دارد. برخلاف سکته‌های مخچه‌ای متعارف در افراد غیر معتاد که ایسکمی در یک رگ خونی مشاهده می‌شود، در سکته‌های مخچه‌ای ناشی از مصرف ماری‌جوانا چندین رگ خونی دچار انفارکتوس می‌شوند. صدمه به مخچه به علت نداشتن مدارهای گردش خون جانبی قوی از خطر بالاتری برای بروز انفارکتوس در مصرف‌کنندگان ماری‌جوانا برخوردار است. ماری‌جوانا 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[1]، لفتیس[2] و برینک[3]، ۲۰۰۴). منطقه وسیعی از کورتکس مخچه و مغز اغلب به دنبال سوءمصرف داروهای مخدر به‌خصوص کانابیس، هروئین و الکل دچار آتروفی می‌شوند. آتروفی شدید قسمت فوقانی ورمیس مخچه و لوب فرونتال بیشتر گزارش شده است (کالا[4] و ماستاگلیا[5]، ۱۹۸۰). تراکم بالایی از گیرنده‌های نوع یک کانابینوییدی در انتهای آکسون‌های سیناپس دهنده با سلول‌های پورکنژ 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 صورتی‌که آنها دچار تغییر شوند منجر به نقص‌هایی در کنترل سیستم حرکتی خواهند شد (هرکنهام[6]، گرون[7]، لین[8]، کاستا[9] و ریچ فیلد[10]، ۱۹۹۱؛ تسو[11]، برون، ادو[12]، مکی و واکر، ۱۹۹۷؛ دویه[13] و همکاران، ۲۰۰۹). مصرف مزمن کانابینوییدها منجر به غیر حساس

1. Geller
2. Loftis
3. Brink
4. Cala
5. Mastaglia
6. Herkenham
7. Groen
8. Lynn
9. Costa
10. Richfield
11. Tsou
12. Udo
13. Dowie

شدن و کاهش گیرنده‌های کانابینوییدی در مغز می‌شود و به صورت معنی‌دار باعث افزایش سطح CAMP و فعالیت PKA می‌شود (روبینو[1] و همکاران، ۲۰۰۰). هم‌چنین می‌تواند باعث کاهش فعالیت سیستم مزولیمبیک شده و به عنوان یک فاکتور با خطر بالا و قابل توجه برای پیشرفت و توسعه اسکیزوفرنی در بالغین تلقی شود (زامیت[2]، البک[3]، اندرسون[4]، لاندبرگ[5] و لوئز[6]، ۲۰۰۲). تغییردر 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 وسواس‌گونه‌ی لیسیدن و خاراندن سر و صورت[7] نشان‌دهنده آسیب احتمالی، رفتار وسواسی و کاهش فعالیت حرکتی است. نتایج پژوهش حاضر با نتایج میلر[8] و ویلکر[9] (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 آمبولیشن[10] و ایستادن روی دو پا[11] را در مصرف تتراهیدوروکانابینول[12] گزارش کردند (میلر و ویلکر، ۱۹۷۳). حال آنکه، مرئو[13] 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 خاطرآوری به دنبال مصرف مزمن کانابیس گزارش شده است (مرئو و همکاران، ۲۰۰۳). مصرف این مواد در طول دوره حاملگی به‌دلیل 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 (هویزینک[14] و مولدر[15]، ۲۰۰۶). در پژوهشی که توسط میسور[16]، مارتز[17] و کارلینی[18]

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 کاهشی در لیسیدن و خاراندن سر و صورت و تعداد دفعات دفع به دنبال مصرف THC ۲/۵ mg/kg در موش‌های بالغ گزارش شده است. واردارِیس[۱]، ویسز[۲]، 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 حالی‌که 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 خاطرآوری بر اثر مصرف آگونیست گیرنده‌های نوع یک کانابینوییدی 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 خاطرآوری حافظه در نوزادان موش‌ها طی ۲۱ روز پس از تولد می‌شود. اما میلر و درئو[۵] و جویس[۶] (۱۹۷۳) تاثیری بر روند اکتساب و و به خاطرآوری 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 به‌خاطرآوری مواجه هستند. به نظر می‌رسد استفاده از کانابیس به‌دلیل 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 به‌خصوص در نواحی شکنج دندانه‌دار و CA3 یکی از مناطق مغز دارای بیشترین تراکم گیرنده‌های کانابینوییدی است (نستور[۱۱]، رابرتز[۱۲]، گاراون[۱۳] و هستر[۱۴]، ۲۰۰۸). مصرف کانابینوییدها با تأثیر بر روی گیرنده‌های کانابینوییدی نوع یک و فعال کردن چند مسیر پیام‌رسانی داخل سلولی مانند مهار فعالیت آدنیل‌سیکلاز، مهار

1. Vardaris
2. Weisz
3. Fazel
4. Rawitch
5. Drew
6. Joyce
7. Luo
8. Yin
9. Wu
10. Wei
11. Nestor
12. Roberts
13. Garavan
14. Hester

کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، فعال کردن کانال‌های پتاسیمی (به‌ویژه نوع سریع و رو به داخل یکسوساز) و تغییرات غیر قابل برگشت روی سیستم کانابینوییدی بدن باعث تغییر وضعیت هیجانی، خلق و خو و تداخل در حافظه کوتاه‌مدت می‌شوند (هرکنهام و همکاران، ۱۹۹۰؛ فروند و همکاران، ۲۰۰۳). تراکم گیرنده‌های کانابینوییدی 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 کانابینوییدها وجود دارد و مشخص شده است که مصرف کانابیس‌ها می‌تواند باعث کاهش تراکم ماده خاکستری در هیپوکمپ شود (ماتوچیک[1]، الدرت[2]، کادت[3] و بولا[4]، 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[5] و همکاران، ۲۰۰۲؛ جگر[6] 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 احتمالا 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
2. Eldreth
3. Cadet
4. Bolla
5. Block
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., Gesssa, GL. (2006). Prenatal exposure to a cannabinoid receptor agonist does not affect sensorimotor gating in rats. **Europian 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 marihuana 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 marihuana. **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 Dependent**, 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., Sa udo-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.