

2.1.3 Alterazioni neurochimiche negli adolescenti fumatori cronici di marijuana: uno studio di spettroscopia all'idrogeno (MRS-H¹)

Andrew P. Prescott^{1,2}, Allison E. Locatelli¹, Perry F. Renshaw^{1,3}, Deborah A. Yurgelun-Todd^{1,3}

¹ Brain Institute, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84108, USA

² Department of Radiology, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84108, USA

³ Department of Psychiatry, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT 84108, USA

Abstract

Tutti gli studi di neuroimaging e di neuropsicologia concordano sul fatto che un forte consumo di marijuana è associato a disfunzioni della corteccia cingolata. Tuttavia i dati sull'uomo che documentano alterazioni cerebrali biochimiche in vivo dopo esposizione cronica alla marijuana sono limitati. Precedenti studi di spettroscopia protonica di risonanza magnetica hanno dimostrato livelli ridotti di glutammato nei gangli basali e di N-acetil-aspartato nella corteccia prefrontale dorsolaterale in adulti consumatori cronici di marijuana. Non sono riferiti studi analoghi sulla popolazione adolescente. Questo studio si è basato sulla spettroscopia protonica di risonanza magnetica per determinare se fossero riscontrabili riduzioni di glutammato, N-acetil-aspartato e/o altre concentrazioni di metaboliti contenenti protoni nella corteccia cingolata anteriore (ACC) degli adolescenti consumatori di marijuana rispetto ad adolescenti non consumatori. Adolescenti consumatori di marijuana (N = 17; età media 17,8 anni) e soggetti di controllo, comparabili per età (N = 17; età media 16,2 anni) sono stati sottoposti a scansione con il sistema di MRI Siemens Trio 3T. I dati della spettroscopia protonica di risonanza magnetica sono stati acquisiti da un voxel di 22,5 mL posizionato bilateralmente rispetto all'ACC. Gli spettri sono stati tarati utilizzando un software commerciale e il valore dei diversi metaboliti, espressi come numeri integrali, è stato ottenuto normalizzando gli spettri in base al segnale di soppressione dell'acqua. Sono state effettuate analisi di varianza e di covarianza per raffrontare i livelli metabolitici intragruppo. Il gruppo consumatore di marijuana ha dimostrato riduzioni statisticamente significative di glutammato nel cingolo anteriore (-15%, $p < 0,01$), di N-acetil-aspartato (-13%, $p = 0,02$), di creatina totale (-10%, $p < 0,01$) e di mioinositolo (-10%, $p = 0,03$). La segmentazione tissutale tipizzata intra-voxel non ha rilevato differenze significative a livello di sostanza grigia/bianca o di contenuto di fluido cerebrospinale nei due gruppi. I ridotti livelli di glutammato e di N-acetil-aspartato nel gruppo di adolescenti consumatori di marijuana sono coerenti con i precedenti studi sull'uomo di MRS-H1 ed è probabile che corrispondano ad un'alterazione della neurotrasmissione glutammatergica del cingolo anteriore e dell'integrità neuronale di questi soggetti. I ridotti livelli di creatina totale e di mioinositolo osservati in questi soggetti potrebbero far ipotizzare rispettivamente un'alterazione dell'ACC e del metabolismo gliale. Tali risultati integrano precedenti studi di fMRI che evidenziavano un'alterazione della funzione del cingolo in consumatori di marijuana.

1. Introduzione

La marijuana è la sostanza illecita più comunemente utilizzata tra gli adolescenti negli Stati Uniti, con una prevalenza d'uso annua stimata a circa l'11%, il 24% e il 32% per le rispettive fasce d'età 13-14, 15-16 e 17-18 (Johnson et al. 2008). Si ritiene che un forte consumo di marijuana durante l'adolescenza possa causare un mutamento dei processi di maturazione neuronale registrati in questa fase critica dello sviluppo, provocando alterazioni neurobiologiche che si diffondono in tutti i circuiti cerebrali del soggetto adulto (Rubino e Parolaro, 2008). Tali cambiamenti possono determinare in ultima analisi alterazioni delle capacità decisionali, dell'elaborazione emotiva e delle prestazioni cognitive (Realini et al., 2009). Inoltre i cambiamenti neurobiologici indotti da marijuana possono rappresentare un rischio per lo sviluppo di psicosi nei soggetti a rischio (Semple et al., 2005).

Tutti gli studi di neuroimaging e di neuropsicologia concordano sul fatto che nei soggetti adulti l'uso cronico di marijuana è strettamente associato a disfunzioni del cingolo. Gli studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) negli adulti fumatori cronici di marijuana hanno dimostrato che i cambiamenti nell'attivazione della corteccia cingolata anteriore (ACC) sono associati ad un'alterazione della risposta affettiva (Gruber et al., 2009) e dei processi inibitori (Gruber e Yurgelun-Todd, 2005). Uno studio di imaging con tomografia a emissione di positroni (PET) e test di Stroop ha riferito ipoattività dell'ACC nei consumatori cronici di marijuana in astinenza da 25 giorni, implicando deficit persistenti delle funzioni cognitive esecutive (Eldreth et al., 2004). Inoltre uno studio di Bolla et al. (2002) ha dimostrato che il risultato del test di Stroop era correlato alla frequenza d'uso di cannabis, mentre un'indagine più recente ha rilevato che i soggetti con un pregresso uso di cannabis commettevano molti più errori su prove incongruenti del test di Stroop (Battisti et al., 2010).

Le alterazioni funzionali a livello di ACC nei consumatori cronici di marijuana sono molto spesso accompagnate da cambiamenti neurochimici. Il delta-9-tetraidrocannabinolo (delta-9-THC), il principale composto psicoattivo della marijuana, attiva il recettore cannabinoidi di tipo 1 (CB1) (Devane et al., 1988), un recettore accoppiato alla proteina G presente nel Sistema Nervoso Centrale. Molti recettori CB1 sono localizzati nelle terminazioni assoniche neuronali glutammatergiche dove, attraverso l'inibizione di correnti Ca^{2+} e la modulazione del gating del canale K^{+} , inibiscono il rilascio di glutammato (Hoffman et al., 2010). Il legame del glutammato corticale con il sottotipo di recettore N-metil-D-aspartato (NMDAR) raggiunge il picco durante la prima adolescenza per poi ridursi significativamente e rapidamente con l'età (Insel et al. 1990). Pertanto il glutammato svolge un ruolo critico nel rimodellamento neurochimico durante l'adolescenza e l'alterazione dei processi di sviluppo glutammatergici rappresenta una possibile conseguenza dell'uso cronico di marijuana. La quantificazione in vivo di tali differenze neurochimiche potrebbe fornire informazioni uniche e complementari ai dati emergenti di neuroimaging comportamentale, strutturale e funzionale.

La spettroscopia all'idrogeno (MRS-H1), tecnica di misurazione non invasiva che permette di rilevare un ampio spettro di neurometaboliti e neurotrasmettitori aminoacidi in vivo, è stata adottata per studiare i cambiamenti cerebrali biochimici derivanti dall'utilizzo cronico di marijuana nella popolazione adulta. Un precedente studio di MRS-H1 ha registrato una riduzione del glutammato dei gangli basali, della colina e del mioinositolo negli adulti consumatori cronici di marijuana rispetto a soggetti di controllo (Chang et al., 2006). Un successivo studio di imaging spettrografico MRS-H1 ha rilevato, nei fumatori occasionali di marijuana, una concentrazione ridotta di N-acetil-aspartato nella corteccia prefrontale

dorsolaterale, il che probabilmente corrisponde ad un'alterazione o disfunzione neuronale in questi soggetti (Hermann et al., 2007). La domanda critica se esistano o meno analoghe differenze neurochimiche negli adolescenti consumatori cronici di marijuana resta ad oggi aperta. Scopo dello studio è analizzare i livelli di neurometaboliti nell'ACC degli adolescenti consumatori di marijuana rispetto a controlli non consumatori. Sulla base dei precedenti dati di neuroimaging funzionale e sulla base dei risultati della MRS-H1 su adulti consumatori cronici di marijuana, abbiamo ipotizzato una riduzione delle concentrazioni di glutammato e di N-acetil-aspartato nell'ACC degli adolescenti consumatori di marijuana rispetto ai controlli.

2. Materiali e metodi

L'Institutional Review Board (IRB) dell'Università dello Utah ha approvato questo studio, che corrisponde ai criteri di ricerca sull'uomo secondo l'Accordo di Helsinki. Sono stati reclutati diciassette adolescenti consumatori di marijuana (MJ) e diciassette controlli sani della stessa età (HC) nella regione Salt Lake (Utah) attraverso annunci locali e passaparola. I soggetti MJ non erano a conoscenza dei criteri specifici (ad es. consumo di marijuana totale nell'arco della vita) o dello scopo dello studio al momento del reclutamento. Inizialmente tutti i soggetti sono stati sottoposti a una selezione telefonica per ottenere informazioni preliminari sull'uso di marijuana, e i soggetti MJ sono stati poi reclutati se riferivano di aver fumato almeno 100 volte nel corso dell'anno precedente. La Tabella 1 presenta le caratteristiche demografiche e le informazioni sulle variabili cliniche rilevanti per entrambe le coorti, inclusi i dati relativi alla scala di Hamilton per la depressione (HAM-D) e alla scala di Hamilton per l'ansia (HAM-A). I controlli non presentavano disturbi di Asse I secondo i criteri diagnostici del DSM-IV in base a interviste strutturate e cliniche, e non evidenziavano anamnesi familiare nei parenti di primo grado di disturbo bipolare o psicosi. I criteri di esclusione per tutti i soggetti riguardavano gravi handicap senso-motori (per es. sordità, cecità e paralisi); QI totale < 70; precedenti di claustrofobia, autismo, schizofrenia, anoressia nervosa o bulimia, altre dipendenze da droghe o dipendenza/abuso di alcol (nei 2 mesi precedenti allo scanning), patologia medica o neurologica attiva, precedenti terapie elettroconvulsivanti TEC; corpi metallici o impianti; gravidanza o allattamento in corso. Tutti i soggetti hanno fornito il consenso scritto e i genitori (o tutore legale) hanno fornito il consenso informato scritto per la partecipazione dei figli minorenni. Tutti gli adolescenti minori di 18 anni hanno compilato la Kiddie Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia per bambini e adolescenti (K-SADS-PL) (Kaufman et al., 1997), mentre i partecipanti maggiori di 18 anni hanno compilato l'Intervista clinica strutturata per il DSM-IV Patient Version (SCID-P). Il giorno dello scanning tutti i soggetti HC e MJ sono stati sottoposti a test tossicologico sull'urina (iScreen™, San Diego, CA) per individuare la presenza di cocaina, metanfetamina, tetraidrocannabinolo, oppiacei e benzodiazepine. I soggetti risultati positivi ad altre sostanze illecite sono stati esclusi dallo studio. In caso di effettivo arruolamento, è stato conservato un campione di urina, sottoposto ad analisi quantitativa di 9-carbossi-tetraidrocannabinolo tramite LC-MS/MS (ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT). Il valore massimo e il valore minimo di rilevamento per questa analisi erano rispettivamente pari a 1000 e 4ng/ml. Inoltre sono state ottenute da tutti i partecipanti informazioni riguardanti l'età del primo utilizzo di marijuana, l'età di utilizzo regolare e la frequenza di utilizzo. L'utilizzo totale di marijuana nel corso della vita è stato calcolato moltiplicando la media degli

spinelli fumati a settimana per la durata di utilizzo. Nessun soggetto riportava precedenti psichiatriche durante l'intervista telefonica, mentre le interviste diagnostiche dirette hanno rivelato che due soggetti MJ riferivano casi di abuso di alcol ma non di dipendenza, un soggetto MJ riportava un caso di abuso di alcol e di dipendenza e due soggetti dichiaravano un caso di depressione e di assunzione di antidepressivi al momento dello studio.

Tabella 1 - Caratteristiche demografiche dei gruppi di soggetti HC e MJ, inclusi i dati sulle variabili cliniche per la coorte MJ.

	HC N=17	MJ N=17
Sesso: maschio/femmina	8/9	15/2
Età (anni): media \pm DS/range	16.2 \pm 2.1/13-19	17.8 \pm 1.1/16-19
Età primo utilizzo (anni): media \pm DS/range	Non applicabile	15 \pm 1.5/12-17
Età utilizzo regolare (anni): media \pm DS/range	Non applicabile	15.8 \pm 1.5/12-17
Uso totale di MJ (numero di spinelli): media \pm DS/range	Non applicabile	1367 \pm 1292/235-5250
Test urina (ng/mL): media \pm DS/range	Non applicabile	399 \pm 381/16-1000*
Scala Depressione: media \pm DS/range	0.2 \pm 0.4/0-1	1.8 \pm 3.3/0-11
Scala Ansia: media \pm DS/range	1.5 \pm 2.4/0-7	1.9 \pm 2.1/0-7

* Due soggetti hanno evidenziato un totale negativo di cannabinoidi nell'urina subito prima dell'esame, mentre tre soggetti hanno evidenziato un totale di cannabinoidi superiore al range dinamico previsto dalla procedura del test (>1000g/ml). DS= deviazione standard.

Acquisizione dati

Tutte le misurazioni di MRS-H1 sono state condotte con uno scanner di RM a corpo intero Siemens MAGNETOM Trio™ 3.0T (Erlangen, Germania). Per tutti gli studi è stato utilizzato il software VB15 fornito da Siemens e non sono stati effettuati aggiornamenti hardware durante gli 8 mesi di durata dello studio. Inoltre le coorti HC e MJ sono state sottoposte a scansione interlacciata durante il periodo sperimentale. È stata usata una bobina di rilevazione magnetica a polarizzazione circolare per la trasmissione delle onde di radiofrequenza e una bobina di sola ricezione (phased array) a 12 canali per la ricezione del segnale. I soggetti erano in posizione supina all'interno della bobina da testa e sono stati applicati dei cuscinetti di spugna per ridurre al massimo i movimenti del capo del soggetto. La bobina è stata utilizzata con una configurazione a quattro cluster, ciascuno comprendente tre bobine individuali. Ciò ha consentito la ricezione del segnale e la produzione di dati da due cluster di bobine orientati anteriormente e due posteriormente. La compensazione dei gradienti di campo (B0) è stata inizialmente effettuata sul campo visivo di tutto il capo tramite metodo FASTMAP (Gruetter, 1993). Sono state utilizzate immagini MR tridimensionali (3D) ad alto contrasto e ad alta risoluzione pesate in T1 MP-RAGE per facilitare l'accurato posizionamento del voxel MRS e per la segmentazione tissutale tipizzata intravoxel (TR/TE/TI=2000/3.53/1100 ms; FOV=256x256x224 mm; risoluzione isotropica 1 mm orizzontale). È stata adottata una sequenza di spettroscopia a risoluzione puntuale (PRESS) per acquisire gli spettri di 1H MRS da un voxel di 3.0 cm x 2.5 cm x 3.0 cm con la dimensione inferiore lungo l'asse antero-posteriore. Il voxel MRS è stato posto obliquamente lungo il piano sagittale e posizionato bilateralmente per coprire una sostanza a predominanza grigia nell'ACC. È stata effettuata un'ulteriore compensazione locale del B0 sul voxel MRS

attraverso le normali routine automatiche e manuali per assicurare un'ampiezza del segnale di soppressione dell'acqua ≤ 9 Hz. La soppressione del volume esterno è stata raggiunta tramite sei bande di saturazione posizionate ad almeno 2 cm dalle facce del voxel MRS, e la saturazione delle bande è stata raggiunta utilizzando impulsi RF a pieno passaggio adiabatici secanti iperbolici. L'eliminazione dell'acqua a tre impulsi attraverso lo schema di effetti T1 (WET: Ogg et al., 1994) è stata intervallata con il modulo di soppressione del volume esterno per la soppressione totale dell'acqua. Per l'eccitazione e la rifocalizzazione selettiva della sezione, la frequenza del trasmettitore è stata posiziona-ta rispettivamente a 3.0 e 4.7 ppm per le acquisizioni di acqua soppressa e non soppressa. I parametri di acquisizione della MRS PRESS per ogni base dati sono i seguenti: TR=2000 ms, TE=30 ms, numero di eccitazioni (NEX)=128. È stato inoltre acquisito uno spettro di riferimento dell'acqua non soppressa (TR/TE=2000/30ms; NEX=4) utilizzato per la correzione della corrente di vortice degli spettri dei metaboliti e per la normalizzazione delle aree di picco dei metaboliti.

La segmentazione tissutale tipizzata del cervello in toto è stata effettuata su tutte le immagini MP-RAGE tramite lo strumento FAST (Zhang et al., 2001) fornito con la FMRIB Software Library disponibile gratuitamente (FSL; Smith et al., 2004). Successivamente sono state utilizzate funzioni scritte in MATLAB (versione R2009b, The MathWorks, Natick, MA) per estrarre il volume 3D corrispondente al voxel MRS posiziona-to per ottenere il contenuto tissutale intravoxel della materia grigia (GM), della materia bianca (WM) e del fluido cerebrospinale (CSF) per ogni soggetto. La frazione di materia grigia è stata calcolata in rapporto alla sostanza cerebrale totale, ovvero $100 \times GM / (WM + GM)$.

Segmentazione
tissutale

Tutti i dati riguardanti il decadimento libero dell'induzione (FID) sono stati salvati come file Siemens TWIX e trasferiti su personal computer per essere elaborati da funzioni di pre-elaborazione scritte e sviluppate con MATLAB. La correzione del peso e del profilo/fase del segnale è specifica per cluster di bobina e deve essere presa in considerazione prima della combinazione del segnale. Queste fasi sono state condotte in modo automatico dalle funzioni scritte in MATLAB e sono state apportate le correzioni segnalate di seguito. Il file di intestazione TWIX contiene coefficienti della funzione di pesatura specifici per singolo cluster di bobina, calcolati nel corso dei protocolli di routine del servizio Siemens. I FID dei singoli metaboliti e dell'acqua non soppressa di un determinato cluster di bobina sono moltiplicati per i fattori di pesatura rilevanti prima della ricombinazione dei cluster di bobina. La correzione della corrente di vortice è stata effettuata utilizzando un metodo a dominio di tempo precedentemente riferito in letteratura (Klose, 1990). In sostanza, i FID riguardanti i metaboliti con soppressione dell'acqua di un determinato cluster di bobina sono stati corretti per la corrente di vortice dividendo ogni punto per un fattore di fase determinato dal corrispondente punto di acqua non soppressa. L'analisi estensiva dei dati in vivo ha dimostrato che la sola correzione della corrente di vortice specifica per cluster ha prodotto quattro gruppi di FID con fase identica (dati non riportati). Successivamente ciò ha permesso la combinazione diretta dei quattro FID prima di qualsiasi fitting spettrale.

Elaborazione dati

Il fitting spettrale e la quantificazione del segnale sono stati effettuati tramite il software commerciale Linear Combination (LC) Model (Provencher, 1993; versione 6.1.4E). Gli spettri PRESS sono stati tarati utilizzando una base simulata generata attraverso la teoria della matrice densità come descritto in un precedente lavoro (Choi et al., 2008). Per le simulazioni, gli spostamenti chimici dei protoni e i valori costanti di accoppiamento (J) abbiamo

Quantificazione
spettrale

usato i valori pubblicati in letteratura (Govindaraju et al., 2000) e sono state generate funzioni di base per un totale di quattordici metaboliti, ovvero: alanina (Ala), aspartato (Asp), creatina totale (tCr: creatina + fosfocreatina), acido γ -amino butirrico (GABA), glutamina (Gln), glutammato (Glu), glicerofosfocolina (GPC), mioinositolo (Ins), lattato (Lac), N-acetil-asparato (NAA), N-acetil-aspartil-glutammato (NAAG), fosforilcolina (PCh), scillo-inositolo (sl) e taurina (Tau). Si segnala che gli integrali di GPC e di PCh sono stati combinati per fornire una stima quantitativa di colina totale (tCho). La "finestra di analisi" dell'LC Model è stata settata per coprire un range da 0.5 a 4.5 ppm. L'LC Model riporta stime di disuguaglianza di Cramér-Rao (CRLB) per ogni metabolita incluso nella base, il che consente l'acquisizione di fit spettrali affidabili. I fit dei metaboliti con CRLB<20% osservati in entrambi i gruppi di soggetti sono stati inclusi nell'analisi finale. Le aree di picco dei metaboliti sono state corrette per la frazione CSF utilizzando dati MRI segmentati e quindi normalizzati utilizzando il corrispondente integrale del segnale dell'acqua non soppressa (in scala: x 10⁻⁹). I rapporti metabolita/acqua calcolati sono presentati come media \pm deviazione standard (DS).

Analisi statistica

L'analisi della varianza one-way (ANOVA) è stata adottata per comparare i livelli di metaboliti medi per gruppo tramite OriginPro (versione 8.0; OriginLab Corporation, Northampton, MA). Inoltre l'analisi della covarianza (ANCOVA) per due campioni indipendenti è stata condotta con un calcolatore gratuito. L'analisi ANCOVA è stata utilizzata per testare le variabili demografiche potenzialmente confondenti (età e sesso), i fattori biologici (contenuto tissutale intravoxel) e i parametri tecnici MRS-correlati, incluso il rapporto segnale/rumore (SNR) e la full width half maximum (FWHM). I valori SNR e FWHM sono stati estratti direttamente dai file elaborati dall'LC Model per ogni soggetto sottoposto a scansione.

3. Risultati

Segmentazione tissutale

La Figura 1 (a) e (b) mostra le sezioni assiale e sagittale di singola porzione tissutale estratte da dati 3D MPRAGE registrati in un soggetto MJ. Il rettangolo nero corrisponde al voxel MRS posizionato a livello di ACC, obliquo rispetto al piano sagittale. La Tabella 2 riporta il contenuto tissutale intravoxel medio per gruppo per entrambe le coorti, e l'analisi statistica non ha rivelato differenze significative tra le stesse.

Figura 1 - (a) Sezione assiale di singola porzione tissutale segmentata estratta da dati 3D MPRAGE di femmina MJ di 19 anni. La materia bianca, la materia grigia e il fluido cerebrospinale sono rappresentati rispettivamente da pixel di colore bianco, grigio chiaro e grigio scuro. (b) Corrispondente sezione sagittale di singola porzione tissutale segmentata estratta dagli stessi dati MPRAGE. Il rettangolo nero rappresenta il posizionamento del voxel MRS a livello di ACC, obliquo lungo la dimensione sagittale. Per questo soggetto le frazioni di tessuto di materia bianca, materia grigia e fluido cerebrospinale sono state stimate rispettivamente al 67%, al 23% e al 10%.

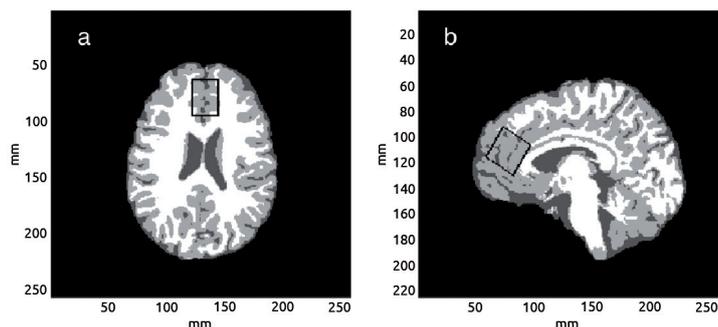


Tabella 2 - Frazione di materia grigia intravoxel e di contenuto di fluido cerebrospinale espresso come frazione % media del gruppo \pm DS.

Tipo di tessuto	HC	MJ	Dati statistici
GM	71 \pm 5	72 \pm 4	$F_{(1,32)}=0.90$, $p=0.34$
CSF	9 \pm 5	8 \pm 4	$F_{(1,32)}=0.40$, $p=0.54$

La Figura 2 mostra gli spettri MRS-H1 tarati con l'LC Model registrati in un soggetto HC e in un soggetto MJ (cfr. didascalia figura per i valori spettrali e per ulteriori dettagli). I parametri SNR e FWHM medi (\pm DS) del gruppo erano rispettivamente MJ 43 \pm 11; HC 49 \pm 8, $F_{(1,32)}=3.1$, $p=0.1$ e MJ 5.3 \pm 1.1 Hz; HC 4.9 \pm 0.7Hz, $F_{(1,32)}=1.82$, $p=0.2$. La tabella 3 riporta i valori CRLB risultanti per 6 metaboliti individuali, con valori CRLB medi stimati <20% per entrambi i gruppi di soggetti. Tali metaboliti sono Asp, tCr, Glu, Ins, NAA e tCho.

Analisi spettrale e statistica

Figura 2 - Dati MRS-H1 PRESS tarati con LC Model di soggetto HC di 13 anni (a) e di soggetto MJ di 19 anni (b). Gli spettri tracciati in nero corrispondono ai dati "grezzi" MRS-H1 con i fit di LC Model sovrapposti in rosso. Gli spettri residui (dati grezzi meno fit LC Model) si trovano al di sotto di ciascuno spettro. Le attribuzioni di segnale evidenziate in (a) si basano su (Covinduraju et al., 2000) e possono essere direttamente trasposte sullo spettro (b).

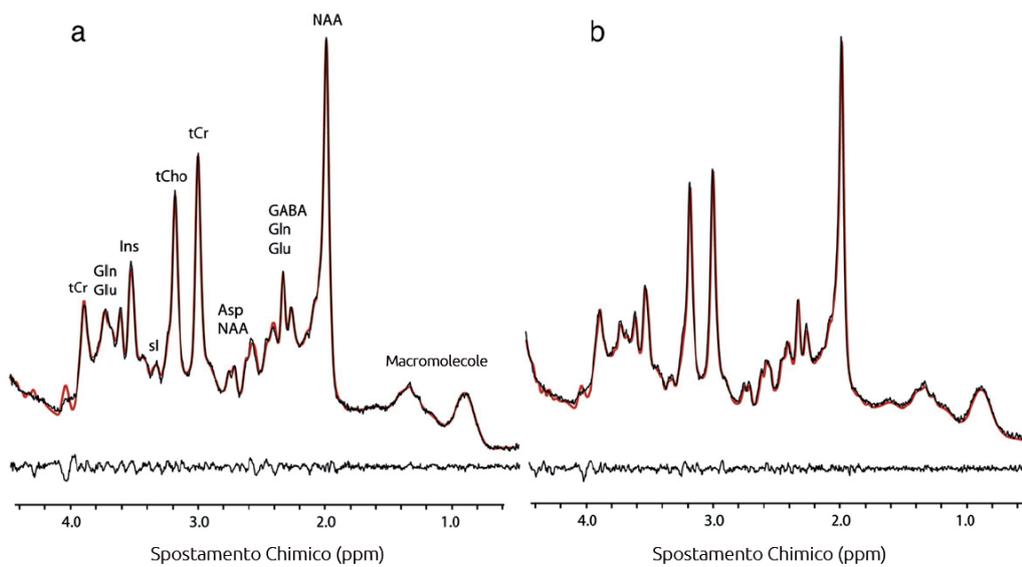
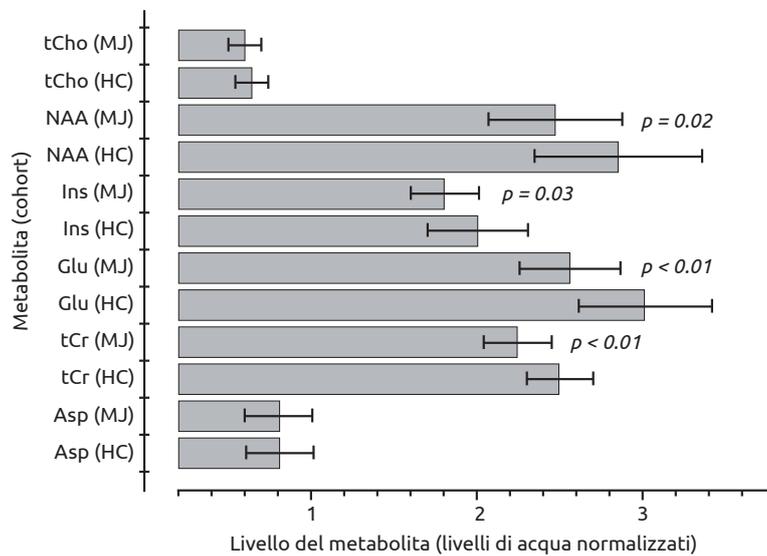


Tabella 3 - Valori medi CRLB (\pm DS) del gruppo elaborati con LC Model per sei metaboliti con valori medi stimati <20% per entrambe le coorti.

Metabolita	HC	MJ
Asp	14 \pm 3	14 \pm 3
tCho	2 \pm 0,2	2,3 \pm 0,5
tCr	2 \pm 0,2	2 \pm 0,4
Glu	5,2 \pm 0,7	5,9 \pm 0,8
Ins	3,1 \pm 0,7	3,5 \pm 0,5
NAA	2,3 \pm 0,5	2,7 \pm 0,6

La Figura 3 mostra un istogramma con i rapporti medi metabolita/acqua del gruppo per Asp, tCr, Glu, Ins, NAA e tCho. La coorte MJ ha evidenziato un livello significativamente ridotto nell'ACC dei livelli di acqua normalizzata di Glu (MJ 2.55 ± 0.30 ; HC 3.00 ± 0.39 , $F_{(1,32)} = 12.5$, $p < 0.01$), tCr (MJ 2.24 ± 0.23 ; HC 2.49 ± 0.19 , $F_{(1,32)} = 9.3$, $p < 0.01$), Ins (MJ 1.80 ± 0.20 ; HC 2.00 ± 0.30 , $F_{(1,32)} = 5.3$, $p = 0.03$) e NAA (MJ 2.46 ± 0.40 ; HC 2.84 ± 0.50 , $F_{(1,32)} = 5.8$, $p = 0.02$). Non sono state osservate differenze significative dell'ACC nei livelli di Asp (MJ 0.80 ± 0.20 ; HC 0.81 ± 0.20 , $F_{(1,32)} = 0.05$, $p = 0.8$) o di tCho (MJ 0.60 ± 0.10 ; HC 0.64 ± 0.10 , $F_{(1,32)} = 3.5$, $p = 0.1$). È importante notare che l'integrale del segnale grezzo dell'acqua (unità arbitrarie) si è dimostrato coerente nelle due coorti di soggetti (MJ 2.85 ± 0.11 ; HC 2.8 ± 0.11 , $F_{(1,32)} = 0.9$, $p = 0.35$). Nella maggior parte dei casi, i test ANCOVA effettuati per la covarianza degli effetti di età, sesso, SNR, FWHM e frazione di sostanza grigia hanno prodotto effetti trascurabili sui livelli di metaboliti medi nei gruppi HC e MJ (dati non riportati). Tuttavia la covarianza per il sesso ha aumentato la rilevanza dei ridotti livelli di Glu nell'ACC osservati nei soggetti MJ ($F_{(1,31)} = 16.2$, $p < 0.001$), mentre la covarianza per l'SNR ha mitigato la rilevanza dei risultati riguardanti il NAA ($F_{(1,31)} = 2.1$, $p = 0.02$). Infine l'analisi di correlazione effettuata per esaminare il rapporto tra i livelli di metabolita e l'utilizzo totale di marijuana nell'arco della vita, l'età di primo utilizzo di marijuana e la concentrazione di cannabinoidi al momento della scansione, non ha raggiunto la significatività statistica per nessun metabolita. Inoltre per ciascun metabolita non è stata osservata alcuna correlazione tra la concentrazione di HAM-D e di metaboliti.

Figura 3 - Rapporti metabolita/acqua misurati per 6 metaboliti nelle coorti HC e MJ. Si riportano i valori medi del gruppo; le barre di errore rappresentano la DS.



4. Discussione

In base ai dati in nostro possesso, questo è il primo studio ad aver utilizzato MRS-H1 in vivo per individuare alterazioni nei metaboliti e neurotrasmettitori a livello di ACC negli adolescenti consumatori di marijuana rispetto ai soggetti di controllo non consumatori. I risultati principali di questo studio sono individuabili in livelli significativamente ridotti di Glu (-15%), NAA (-13%), Ins (-10%) e tCr (-10%) nell'ACC della popolazione adolescente MJ.

La stabilità fisiologica, sulla quale esiste ampio consenso, della risonanza del protone metile (CH₃) del tCr per età, sesso e varietà di patologie cerebrali, ne ha determinato la frequente adozione come riferimento interno per la normalizzazione dei dati. Tuttavia livelli ridotti di tCr sono stati osservati in molti tipi di tumore (Howe e Opstad, 2003) e a seguito di evento ischemico (Munoz Maniega et al., 2008) e una recente indagine ha inoltre dimostrato livelli differenziali di tCr in soggetti con disturbo bipolare, pazienti schizofrenici e controlli sani (Ongur et al., 2009). Pertanto per il presente studio MRS trasversale abbiamo inizialmente misurato i livelli di tCr dell'ACC in entrambi i gruppi di soggetti in base al segnale dell'acqua tissutale come standard di riferimento interno. Questa analisi ha messo in luce livelli significativamente ridotti di tCr normalizzato per l'acqua nella coorte MJ sebbene per entrambi i gruppi fossero stati calcolati integrali di segnale dell'acqua e voxel MRS delle frazioni di GM, WM e CSF comparabili. Pertanto per il presente studio è stato fondamentale che tutti i livelli di metabolita fossero normalizzati per l'acqua tissutale.

Sono stati utilizzati i metodi di imaging spettroscopico MRSI e MRS-H1 per analizzare gli effetti dell'uso cronico di marijuana sui metaboliti cerebrali nella popolazione adulta (Chang et al., 2006; Hermann et al., 2007) ancorché nessuno di questi precedenti studi riferisse livelli ridotti di tCr nell'ACC dei consumatori di marijuana. La concentrazione ridotta di tCr osservata in questo studio riflette probabilmente lo status energetico alterato dell'ACC nel gruppo di adolescenti MJ, benché a causa della natura composita del picco del protone tCr non sia ancora chiaro se la riduzione osservata dipenda dalla modulazione della creatina e/o della fosfocreatina. Ulteriori studi di spettroscopia RM fosforo (³¹P) condotti su coorti di adolescenti MJ e HC saranno fondamentali per analizzare questo potenziale squilibrio creatina/fosfocreatina.

Il livello ridotto di Glu nell'ACC (-15%) rilevato nella popolazione adolescente MJ è uno dei risultati più rilevanti di questo studio. Questa osservazione è coerente con i livelli ridotti di Glu nei gangli basali (-12%) precedentemente registrati negli adulti consumatori di marijuana (Chang et al., 2006) pur non essendo state riferite analoghe misurazioni MRS-H1 a voxel singolo dell'ACC. Il tono glutammatergico dell'ACC è chiaramente alterato nella popolazione adolescente MJ sebbene, come di seguito evidenziato, non si possano trarre conclusioni univoche basate sui livelli ridotti di Glu nell'ACC osservati nel presente studio. Il Glu viene innanzitutto immagazzinato nelle vescicole dei neuroni ed è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del cervello dei mammiferi. Inoltre il Glu è il precursore del GABA (principale neurotrasmettitore inibitorio) e del NAAG (neurotrasmettitore peptidico). In quanto neurotrasmettitore, il Glu viene rilasciato nello spazio sinaptico e viene rapidamente trasportato nelle cellule astroglia dove viene convertito enzimaticamente in Gln. Successivamente il Gln viene reinviato ai neuroni per la conversione in Glu. Tuttavia i livelli ridotti di Glu potrebbero derivare da alterazione neuronale (conversione Gln → Glu) e/o da disfunzione gliale con ridotto assorbimento di Glu o reinvio compromesso del Gln ai neuroni. La riduzione del Glu nell'ACC della nostra popolazione MJ è interessante e potrebbe essere correlata alle alterazioni comportamentali osservate nei consumatori di marijuana. È noto che i recettori CB1 si trovano in posizione presinaptica nei neuroni e che l'attivazione di tali recettori, così come attraverso il composto attivo della cannabis (Δ⁹-THC), comporta la soppressione del rilascio dei neurotrasmettitori di glutammato e GABA (Hajos e Freund, 2002).

Il glutammato e il GABA sono i principali neurotrasmettitori aminoacidi eccitatori e inibitori del Sistema Nervoso Centrale e pertanto la modulazione del rilascio presinaptico di tali neurotrasmettitori determinerà alterazioni della plasticità sinaptica neuronale. È probabile che tali alterazioni della plasticità sinaptica siano associate ad una funzione neurocognitiva

alterata nei consumatori di marijuana, incluse le alterazioni mediate dalla rete del cingolo. Tuttavia saranno necessari ulteriori dati spettroscopici riguardanti la concentrazione di Gln e GABA nell'ACC al fine di disporre di informazioni critiche per trarre conclusioni più avvalorate. I valori CRLB osservati per il Gln e il GABA nel presente studio sono stati ritenuti non affidabili per l'inserimento nella nostra analisi finale dei dati. Per questo stiamo attualmente studiando strategie alternative di acquisizione ed elaborazione MRS-H1 per migliorare la quantificazione di Gln e di GABA (Schulte e Boesiger, 2006; Schulte et al., 2006).

Anche la riduzione di NAA a livello di ACC (-13%) osservata nella popolazione MJ è in linea con la letteratura precedente. Ridotti livelli di NAA sono stati dimostrati anche in un precedente studio MRS-H1 che ha riferito un decremento significativo dei livelli di NAA a carico della corteccia prefrontale dorsolaterale (-11%) nel maschio adulto fumatore occasionale di marijuana rispetto ai controlli sani (Hermann et al., 2007). Il NAA è un marker putativo della vitalità neuronale e il presente studio suggerisce una ridotta integrità neuronale e assonale (perdita e/o disfunzione) a livello di ACC nell'adolescente consumatore di marijuana. Poiché l'uso di cannabis è ritenuto un potenziale fattore di rischio per lo sviluppo di psicosi nei soggetti predisposti (Semple et al., 2005), è importante notare che i livelli ridotti di NAA nell'ACC degli adolescenti consumatori di marijuana sono analoghi alla riduzione della concentrazione di NAA nel lobo frontale e nell'ACC in pazienti schizofrenici (Buckley et al., 1994; Cecil et al., 1999; Ende et al., 2000).

Inoltre abbiamo rilevato una riduzione significativa dei livelli di Ins nell'ACC (-10%). L'Ins si trova principalmente negli astrociti e pertanto viene considerato un marker gliale (Brand et al., 1993). Ridotti livelli di Ins nella corteccia prefrontale sono stati precedentemente rilevati utilizzando MRS-H1 in condizioni caratterizzate da una significativa perdita gliale, quale un grave disturbo depressivo (Coupland et al., 2005). I ridotti livelli di Ins rilevati nel presente studio possono essere una conseguenza di perdita e/o disfunzione gliale.

Precedenti studi di MRS-H1 hanno rilevato alterazioni delle concentrazioni di metaboliti correlate all'età in soggetti adulti sani (Brooks et al., 2001; Sailasuta et al. 2008; Chang et al., 2009), ma la letteratura che documenta alterazioni metaboliche durante l'adolescenza è ad oggi limitata.

Uno studio di MRS-H1 ha analizzato i livelli di NAA in tutto l'arco dell'infanzia e dell'adolescenza dimostrando un aumento del rapporto NAA/Cho nella materia grigia con il raggiungimento del livello di picco a circa 10 anni di età e in successivo declino (Horska et al., 2002). Analoghe alterazioni di sviluppo sono possibili per Glu, Ins, e tCr e, per contribuire a inserire i risultati di questo studio in un contesto più ampio, saranno fondamentali ulteriori esaustivi studi MRS-H1 trasversali e longitudinali su popolazioni adolescenti sane.

L'analisi ANCOVA eseguita per verificare gli effetti delle variabili demografiche, tecniche e biologiche potenzialmente confondenti ha identificato principalmente effetti trascurabili sulla rilevanza statistica dei ridotti livelli di metaboliti nella popolazione MJ rispetto ai controlli, benché la covarianza per il sesso abbia aumentato la rilevanza dei risultati del Glu. Si noti che, sebbene di età analoga, i soggetti HC e MJ non erano confrontabili per sesso. Pertanto, per valutare più approfonditamente la potenziale influenza del sesso sui livelli di metaboliti, l'analisi ANOVA è stata ripetuta escludendo tutti i soggetti di sesso femminile dalle due coorti (MJ N=15; HC N=8). I risultati di questi test hanno evidenziato una riduzione di Glu ($F(1,21)=21, p<0.001$), NAA ($F(1,21)=7.2, p=0.01$), tCr ($F(1,21)=17, p<0.001$) e Ins ($F(1,21)=4.7, p=0.04$) nei soggetti MJ, confermando che alterazioni neurochimiche indotte dalla marijuana sono indipendenti dal sesso. Inoltre la covarianza per SNR ha eliminato la significatività dei ridotti livelli di NAA nella popolazione MJ. Questa osservazione può essere razionalizzata in quanto il software LC Model valuta l'SNR basandosi sulla risonanza

maggiore individuata nella finestra di analisi (0.5-4.5 ppm), utilizzando così la risonanza NAA 2.0 ppm per tutti i calcoli di SNR del presente studio. Abbiamo osservato un minore SNR stimato per la coorte MJ prossimo alla significatività statistica ($p=0.1$) e abbiamo motivo di credere che ciò dimostri ulteriormente la riduzione di NAA in questa popolazione. Ne consegue che la covarianza della concentrazione di NAA per l'SNR viola sostanzialmente l'analisi ANCOVA e produce medie arrotondate errate e inaffidabili. L'analisi di correlazione non ha raggiunto significatività statistica per nessun livello di metabolita rispetto a dati variabili clinici benché il nostro attuale campione MJ sia relativamente limitato ($N=17$). Stiamo progettando di arruolare altri soggetti MJ per studi analoghi ed è allo studio un aumento del numero di campioni riducendo l'età sia di primo uso che di uso regolare di marijuana.

Come precedentemente descritto, il nostro campione MJ comprendeva alcuni soggetti con precedenti di dipendenza o abuso comorbido di alcol e due soggetti con precedenti di depressione che stavano assumendo antidepressivi al momento della risonanza. La presenza di comorbidità e/o storia di comorbidità all'interno del gruppo MJ potrebbe essere un potenziale fattore confondente nel presente studio; successive indagini dovrebbero analizzare la relazione tra i consumatori di sola marijuana e quelli con diagnosi di comorbidità. Va tuttavia sottolineato che è stato riferito un disturbo dell'umore comorbido in soggetti con consumo di sostanze (Grella et al., 2001; Lubman et al., 2007; Guillem et al., 2009). Per esempio in uno studio di Lubman et al. (2007) sono stati riferiti tassi elevati di prevalenza di disturbi psichiatrici comorbidi e si è riscontrato che il 49% di quegli studi corrispondeva ai criteri di disturbo dell'umore attuale, con un 68% che riferiva precedenti nell'arco della vita. Ciò è coerente con un lavoro più recente in cui su 90 consumatori di cannabis un disturbo dell'umore era presente nel 48% dei soggetti negli ultimi 12 mesi (Guillem et al., 2009).

Autodichiarazioni inaccurate riguardo l'età di prima assunzione di marijuana, di uso regolare e dell'assunzione totale non possono essere escluse. È difficile stabilire quanto autodichiarazioni inaccurate possano aver influito sulla nostra analisi di correlazione. Il test tossicologico delle urine per i cannabinoidi ha registrato un cutoff positivo relativamente ridotto (4 ng/mL), anche se a causa degli effetti della eliminazione della droga non è possibile utilizzare i dati per escludere in maniera assoluta un precedente uso di cannabis all'interno della popolazione HC. Un uso regolare di marijuana all'interno di questo gruppo sembra improbabile in quanto i soggetti sono stati tutti intervistati con domande aperte sul precedente utilizzo di sostanze. La ricerca futura si avvarrà l'analisi del capello per accertare la presenza di fumatori di cannabis ed escludere potenziali soggetti HC.

I parametri della dimensione del voxel sono stati selezionati per ottimizzare il tempo SNR per unità e prendiamo atto dei conseguenti effetti sul volume parziale. L'obiettivo principale del presente studio era quello di valutare le potenziali anomalie metaboliche nel volume lordo dell'ACC ma successivi studi potranno tuttavia far acquisire dati MRS-H1 da più sottoregioni dell'ACC. La segmentazione voxel MRS basata su dati di immagini MPRAGE ad alta risoluzione ha evidenziato un differenziale relativamente ridotto tra i contenuti tissutali della materia grigia e della materia bianca all'interno dei due gruppi, così ipotizzando un posizionamento analogo dei voxel in tutti gli studi.

Le differenze tra gruppi nei tempi di rilassamento spin-spin (T2) e spin-lattice (T1) del metabolita potrebbero spiegare il rapporto differenziale metabolita/acqua osservato nel nostro studio. La presente sezione discute brevemente questi effetti per il tCr e per l'acqua anche se le argomentazioni potrebbero tradursi direttamente nelle riduzioni osservate per Glu, Ins e NAA. Basandoci sui tempi di rilassamento precedentemente riportati T2 CH3 tCr

Limiti dello studio

3.0 T (164ms; Choi et al., 2006) e T1 (1100ms; Traber et al., 2004) i nostri calcoli mostrano che una riduzione del 34% nel T2 del tCr (104 ms) o un aumento del 30% nel T1 del tCr (1440 ms) spiegherebbero i livelli ridotti di tCr/acqua qui riportati. Benché i valori del metabolita siano stati corretti per la frazione CSF è utile prendere in considerazione la possibilità di differenziare i tempi di rilassamento tissutali e del CSF e il modo in cui le variazioni delle frazioni tissutali possono alterare i rapporti metabolita/acqua calcolati. Sulla base dei dati dell'ACC PRESS multi-TE (30-1000 ms) dell'acqua non soppressa registrati in 10 soggetti presso il nostro laboratorio, abbiamo calcolato la media dei tempi di rilassamento T2 del CSF e del tessuto rispettivamente a 437 ± 80 e 69 ± 2 ms. Pertanto frazioni differenziali di CSF produrrebbero valori di denominatori variabili in tutti i soggetti e ciò spiegherebbe i rapporti variabili metabolita/acqua. Utilizzando i nostri valori stimati di CSF e di acqua tissutale T2 abbiamo calcolato che è necessario un aumento della frazione di CSF dal 9 al 15% per spiegare la riduzione del 15% del Glu rilevata nei soggetti adolescenti MJ. Per il presente studio ciò è altamente improbabile a causa di frazioni molto simili di CSF tra le coorti HC e MJ. Abbiamo eseguito un'analoga analisi delle alterazioni frazionali di CSF in relazione ai tempi di rilassamento longitudinale utilizzando precedenti valori T1 di CSF (4163 ms; Lin et al., 2001) e di tessuto (1100 ms; Wansapura et al., 1999). Tale analisi ipotizza che, con una frazione iniziale di CSF del 9%, è necessario un aumento, di fatto irrealistico, del 23% del contenuto tissutale per spiegare la riduzione del 15% di Glu nei soggetti MJ. Ancorché sia improbabile che questi effetti dell'acqua abbiano influenzato significativamente i risultati, il nostro protocollo è stato modificato per misurare e tenere conto di questi effetti per ogni singolo soggetto.

Punti di forza dello studio

I nuovi risultati di questo studio forniscono un contributo unico per comprendere le alterazioni neurochimiche negli adolescenti che usano marijuana e sono complementari al corpus di dati neuropsicologici e di neuroimaging che emergono da questi gruppi. Abbiamo compiuto uno sforzo considerevole per arruolare coorti di soggetti ben caratterizzati. Solo tre soggetti MJ su diciassette presentavano depressione attuale o pregressa. Data la comorbidità di uso di alcol e marijuana, è utile notare che solo due dei diciassette soggetti MJ corrispondevano ai criteri diagnostici relativi al disturbo da abuso di alcol.

Da un punto di vista tecnico, tutti i dati acquisiti e analizzati nel presente studio sono risultati di alta qualità, caratterizzati da un elevato SNR e da una ridotta ampiezza del segnale. I fit spettrali hanno adottato metodi di simulazione spettrale all'avanguardia che generano spettri di base per singolo metabolita basati sull'effettiva sequenza PRESS utilizzata per studi in vivo. Per i raffronti tra gruppi sono stati utilizzati solo i metaboliti con adeguati ridotti valori CRLB riportati da LC Model (indicativo di fit spettrali affidabili). Abbiamo inoltre condotto numerose analisi ANCOVA per verificare la possibilità di variabili demografiche, biologiche o tecniche confondenti al fine di analizzare le alterazioni metaboliche rilevate nella popolazione MJ.

5. Conclusioni

In conclusione, i ridotti livelli di Glu e di NAA nella coorte MJ sono coerenti con i precedenti dati MRS-H1 su soggetti adulti e probabilmente riflettono un'alterazione della neurotrasmissione glutammatergica e della vitalità neuronale a carico dell'ACC di questi soggetti. I ridotti livelli di tCr e di Ins osservati nei soggetti MJ possono implicare rispettivamente

un'alterazione dello status energetico e del metabolismo gliale dell'ACC. Tali risultati approfondiscono precedenti dati fMRI che riportavano un'alterata funzione del cingolo in soggetti forti consumatori di marijuana. Stiamo attualmente investigando ulteriori modalità per sviluppare e implementare una metodologia che permetta la misurazione concomitante e affidabile di Glu, Gln e GABA per applicarla ad analoga popolazione adolescente.

Tradotto e riprodotto ad opera della redazione dall'originale versione in inglese pubblicata in *Neuroimage*. 2011 Jul 1;57(1):69-75, con il permesso dell'Editore. Titolo originale: Neurochemical alterations in adolescent chronic marijuana smokers: a proton MRS study.

Bibliografia

- Battisti RA, Roodenrys S, Johnstone SJ, Pesa N, Hermens DF, Solowij N. Chronic cannabis users show altered neurophysiological functioning on Stroop task conflict resolution. *Psychopharmacology*. 2010;212:613–624.
- Bolla KI, Brown K, Eldreth D, Tate K, Cadet JL. Dose-related neurocognitive effects of marijuana use. *Neurology*. 2002;59:1337–1343.
- Brand A, Richter-Landsberg C, Leibfritz D. Multinuclear NMR studies on the energy metabolism of glial and neuronal cells. *Dev Neurosci*. 1993;15:289–298.
- Brooks JC, Roberts N, Kemp GJ, Gosney MA, Lye M, Whitehouse GH. A proton magnetic resonance spectroscopy study of age-related changes in frontal lobe metabolite concentrations. *Cereb Cortex*. 2001;11:598–605.
- Buckley PF, Moore C, Long H, Larkin C, Thompson P, Mulvany F, Redmond O, Stack JP, Ennis JT, Waddington JL. 1H-magnetic resonance spectroscopy of the left temporal and frontal lobes in schizophrenia: clinical, neurodevelopmental, and cognitive correlates. *Biol Psychiatry*. 1994;36:792–800.
- Cecil KM, Lenkinski RE, Gur RE, Gur RC. Proton magnetic resonance spectroscopy in the frontal and temporal lobes of neuroleptic naive patients with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1999;20:131–140.
- Chang L, Cloak C, Yakupov R, Ernst T. Combined and independent effects of chronic marijuana use and HIV on brain metabolites. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1:65–76.
- Chang L, Jiang CS, Ernst T. Effects of age and sex on brain glutamate and other metabolites. *Magn Reson Imaging*. 2009;27:142–145.
- Choi C, Bhardwaj PP, Seres P, Kalra S, Tibbo PG, Coupland NJ. Measurement of glycine in human brain by triple refocusing 1H-MRS in vivo at 3.0T. *Magn Reson Med*. 2008;59:59–64.
- Choi C, Coupland NJ, Bhardwaj PP, Kalra S, Casault CA, Reid K, Allen PS. T2 measurement and quantification of glutamate in human brain in vivo. *Magn Reson Med*. 2006;56:971–977.
- Coupland NJ, Ogilvie CJ, Hegadoren KM, Seres P, Hanstock CC, Allen PS. Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57:1526–1534.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34:605–613.
- Eldreth DA, Matochik JA, Cadet JL, Bolla KI. Abnormal brain activity in prefrontal brain regions in abstinent marijuana users. *Neuroimage*. 2004;23:914–920.
- Ende G, Braus DF, Walter S, Weber-Fahr W, Soher B, Maudsley AA, Henn FA. Effects of age, medication, and illness duration on the N-acetyl aspartate signal of the anterior cingulate region in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2000;41:389–395.
- Govindaraju V, Young K, Maudsley AA. Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites. *NMR Biomed*. 2000;13:129–153.
- Grella CE, Hser YI, Joshi V, Rounds-Bryant J. Drug treatment outcomes for adolescents with comorbid mental and substance use disorders. *Journal of Nervous and Mental Disease*. 2001;189:384–392.
- Gruber SA, Rogowska J, Yurgelun-Todd DA. Altered affective response in marijuana smokers: an fMRI study. *Drug Alcohol Depend*. 2009;105:139–153.
- Gruber SA, Yurgelun-Todd DA. Neuroimaging of marijuana smokers during inhibitory processing: a pilot investigation. *Brain Res Cogn Brain Res*. 2005;23:107–118.
- Gruetter R. Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils. *Magn Reson Med*. 1993;29:804–811.
- Guillem E, Pelissolo A, Vorspan F, Bouchez-Arbabzadeh S, Lepine JP. Sociodemographic profiles, addictive and mental comorbidity in cannabis users in an outpatient specific setting. *Encephale-Revue De Psychiatrie Clinique Biologique Et Therapeutique*. 2009;35:226–233.
- Hajos N, Freund TF. Pharmacological separation of cannabinoid sensitive receptors on hippocampal excitatory and inhibitory fibers. *Neuropharmacology*. 2002;43:503–510.
- Hermann D, Sartorius A, Welzel H, Walter S, Skopp G, Ende G, Mann K. Dorsolateral prefrontal cortex N-acetylaspartate/total creatine (NAA/tCr) loss in male recreational cannabis users. *Biol Psychiatry*. 2007;61:1281–1289.
- Helsinki Accord, <http://ohsr.od.nih.gov/guidelines/helsinki.html>.
- Hoffman AF, Laaris N, Kawamura M, Masino SA, Lupica CR. Control of cannabinoid CB1 receptor function on glutamate axon terminals by endogenous adenosine acting at A1 receptors. *J Neurosci*. 2010;30:545–555.
- Horska A, Kaufmann WE, Brant LJ, Naidu S, Harris JC, Barker PB. In vivo quantitative proton MRSI study of brain development from childhood to adolescence. *J Magn Reson Imaging*. 2002;15:137–143.
- Howe FA, Opstad KS. 1H MR spectroscopy of brain tumours and masses. *NMR Biomed*. 2003;16:123–131.
- Insel TR, Miller LP, Gelhard RE. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-methyl-



- D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*. 1990;35:31–43.
28. Klose U. In vivo proton spectroscopy in presence of eddy currents. *Magn Reson Med*. 1990;14:26–30.
 29. Lin C, Bernstein M, Huston J, Fain S. In vivo and in vitro measurements of T1 relaxation at 3.0T. Proc 9th meeting ISMRM; Glasgow. 2001. p. 1391.
 30. Lubman DI, Allen NB, Rogers N, Cementon E, Bonomo Y. The impact of co-occurring mood and anxiety disorders among substance-abusing youth. *J Affect Disord*. 2007;103:105–112.
 31. Munoz Maniega S, Cvorovic V, Armitage PA, Marshall I, Bastin ME, Wardlaw JM. Choline and creatine are not reliable denominators for calculating metabolite ratios in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2008;39:2467–2469.
 32. Ogg RJ, Kingsley PB, Taylor JS. WET, a T1- and B1-insensitive water-suppression method for in vivo localized 1H NMR spectroscopy. *J Magn Reson B*. 1994;104:1–10.
 33. Ongur D, Prescott AP, Jensen JE, Cohen BM, Renshaw PF. Creatine abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2009;172:44–48.
 34. Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med*. 1993;30:672–679.
 35. Realini N, Rubino T, Parolaro D. Neurobiological alterations at adult age triggered by adolescent exposure to cannabinoids. *Pharmacol Res*. 2009;60:132–138.
 36. Rubino T, Parolaro D. Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. *Mol Cell Endocrinol*. 2008;286:S108–S113.
 37. Sailasuta N, Ernst T, Chang L. Regional variations and the effects of age and gender on glutamate concentrations in the human brain. *Magn Reson Imaging*. 2008;26:667–675.
 38. Schulte RF, Boesiger P. ProFit: two-dimensional prior-knowledge fitting of J-resolved spectra. *NMR Biomed*. 2006;19:255–263.
 39. Schulte RF, Lange T, Beck J, Meier D, Boesiger P. Improved two-dimensional J-resolved spectroscopy. *NMR Biomed*. 2006;19:264–270.
 40. Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol*. 2005;19:187–194.
 41. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, Johansen-Berg H, Bannister PR, De Luca M, Drobnjak I, Flitney DE, Niazy RK, Saunders J, Vickers J, Zhang Y, De Stefano N, Brady JM, Matthews PM. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage*. 2004;23 Suppl 1:S208–S219.
 42. Traber F, Block W, Lamerichs R, Gieseke J, Schild HH. 1H metabolite relaxation times at 3.0 tesla: Measurements of T1 and T2 values in normal brain and determination of regional differences in transverse relaxation. *J Magn Reson Imaging*. 2004;19:537–545.
 43. Vassar Stats, <http://faculty.vassar.edu/lowry/ancova2L.html> (ultimo accesso 14/01/2011).
 44. Wansapura JP, Holland SK, Dunn RS, Ball WS., Jr NMR relaxation times in the human brain at 3.0 tesla. *J Magn Reson Imaging*. 1999;9:531–538.
 45. Zhang Y, Brady M, Smith S. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Trans Med Imaging*. 2001;20:45–57.