

1 MOTAKO KANNABINOIDE HARTZAILE (CB₁) ASTROGLIALAREN ADIERAZPENA LOKI-LOBULO KO EPILEPSIA EREDUAN

Amaia Mimenza^{1,2}, Itziar Bonilla-Del Rio^{1,2}, Jon Egaña-Huguet^{1,2}, Ilazki Anaut-Lusar¹, Maitane Serrano^{1,2}, Leire Lekunberri^{1,2}, Inmaculada Gerrikagoitia^{1,2}, Izaskun Elezgarai^{1,2}, Nagore Puente^{1,2}, Pedro Grandes^{1,2}

(1)Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia), (2)Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia)

SARRERA ETA ARLOKO EGOERA

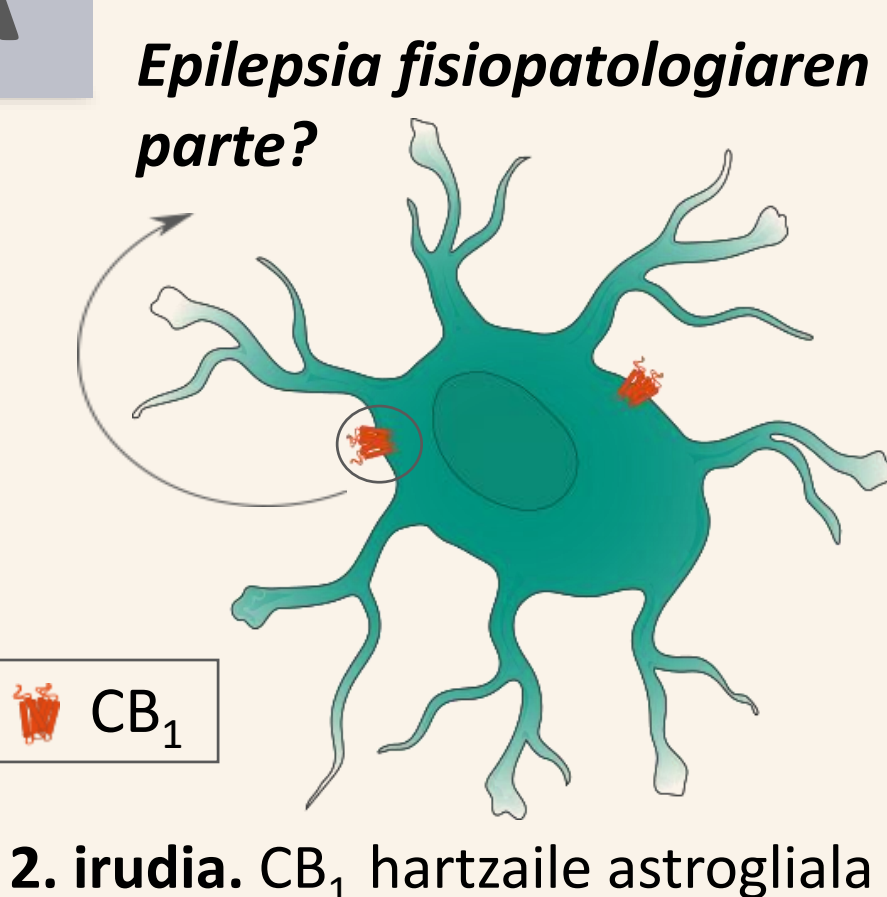
Loki-lobuloko epilepsia (LLE) mundu osoko pertsonen %1-3ri eragiten dien afekzio neurologiko ohikoenetako bat da. Horregatik, epilepsien fisiopatologia argitzea premiazkoa suertatzen da tratamendu antiepileptiko berriak garatu ahal izateko (Bates, 2015). Garuneko konputazio neuronalak izaera kitzikatzaileko jardura transmisore bizia behar du. Hala ere, jardura hori gehiegizkoa baldin bada, krisi epileptikoan agerpena eragiten du. Sistema endokannabinoideak (eKBS) neurona-sarearen kitzikagarritasunaren kontrolean duen berezko eginkizuna dela eta, kannabinoideek epilepsia tratatzeko interes farmakologiko handia piztu izan dute azkeneko urteotan (Monory et al, 2015). Neuronen mintzetan kokaturiko 1 motako kannabinoide hartzaileak (CB₁) krisi epileptikoan aurka babesten duela frogatuta dago (Marsicano et al, 2003). Astrozitoen (nerbio-sistema zentralako populazio zelularrik ugariena) CB₁ri dagokionez aldiz, literaturan aminoazido kitzikatzaileen erregulazioan duen eginkizunari buruzko emaitza kontraesankorrak daude.



1. irudia. Epilepsia kasuak

HELBURUA

Orain arte, garuneko eKBSren ikerketan ahalegin guztiak neuronetarantz ardatzu egin dira. Kontuan hartuta astrozitoek epilepsian neuroinflamazioaren bitartez parte hartu ahalko luketela, honako ikerketa honetan CB₁ astroglialak epilepsia fisiopatologian esku hartzen duen zehaztu nahi dugu.

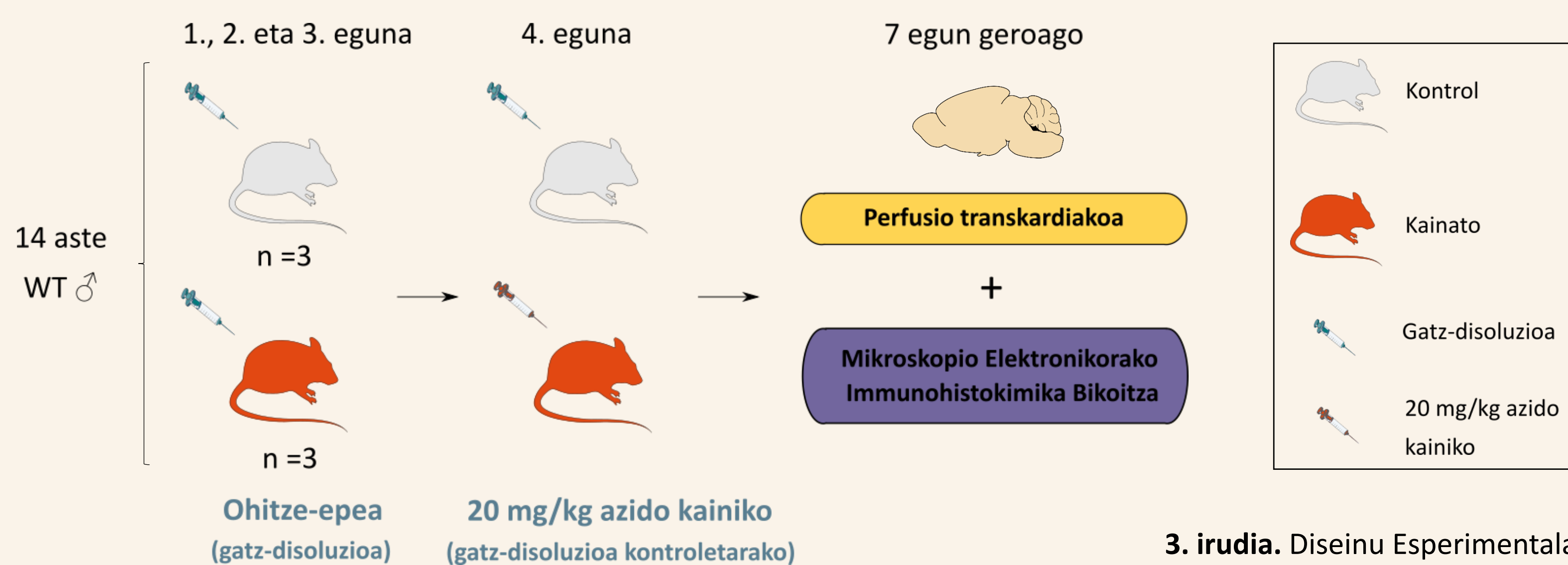


2. irudia. CB₁ hartzaile astrogliala

MATERIAL ETA METODOAK

DISEINU ESPERIMENTALA

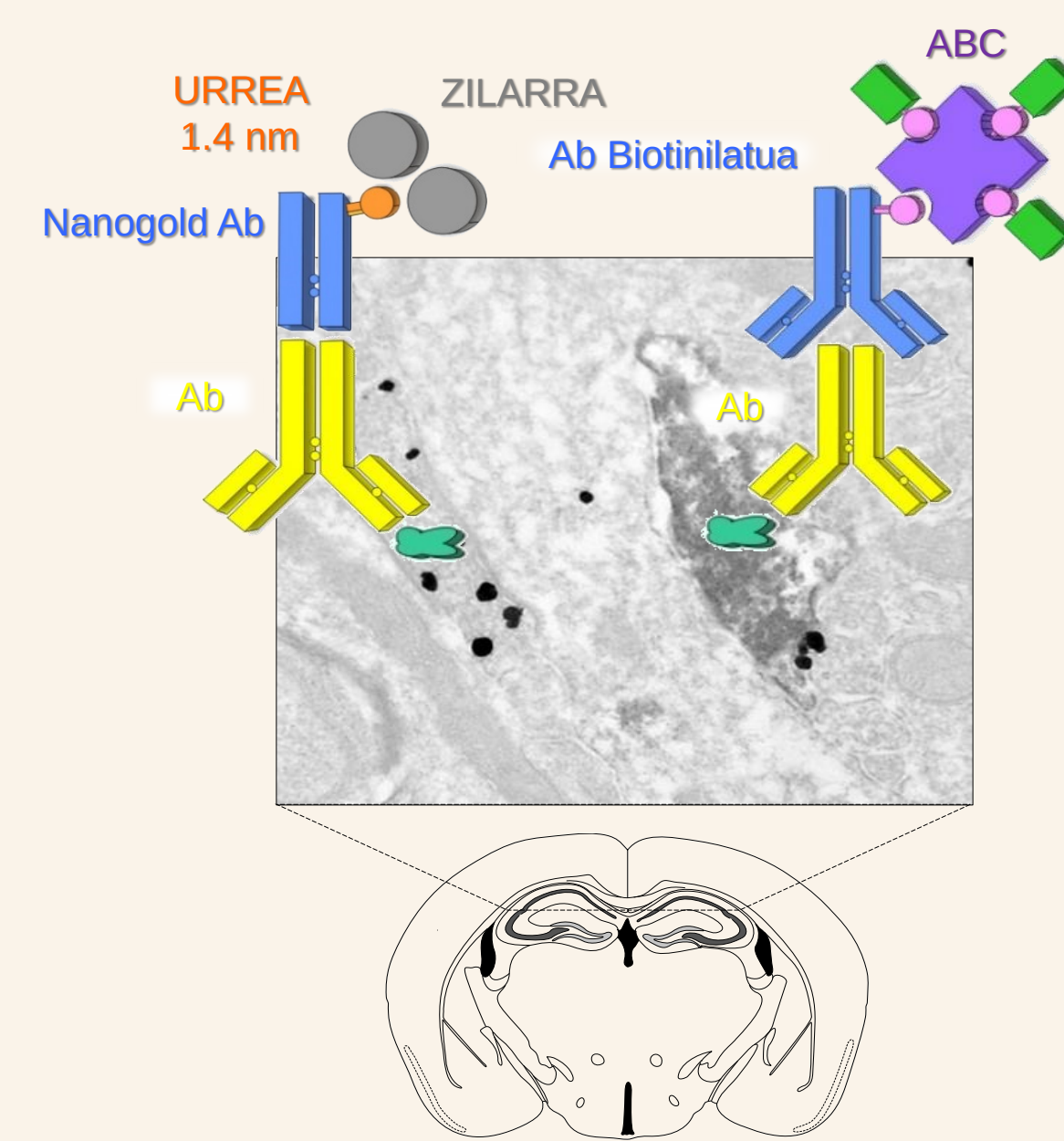
Azido kainikoak, karraskarietan estatus epileptikoa eragiten du. Literatura zientifikoan oso ondo deskribatutako LLE animalia-eredua da hau (Monory et al., 2006).



3. irudia. Diseinu Esperimentala

MIKROSKOPIO ELEKTRONIKORAKO IMMUNOHISTOKIMIKA

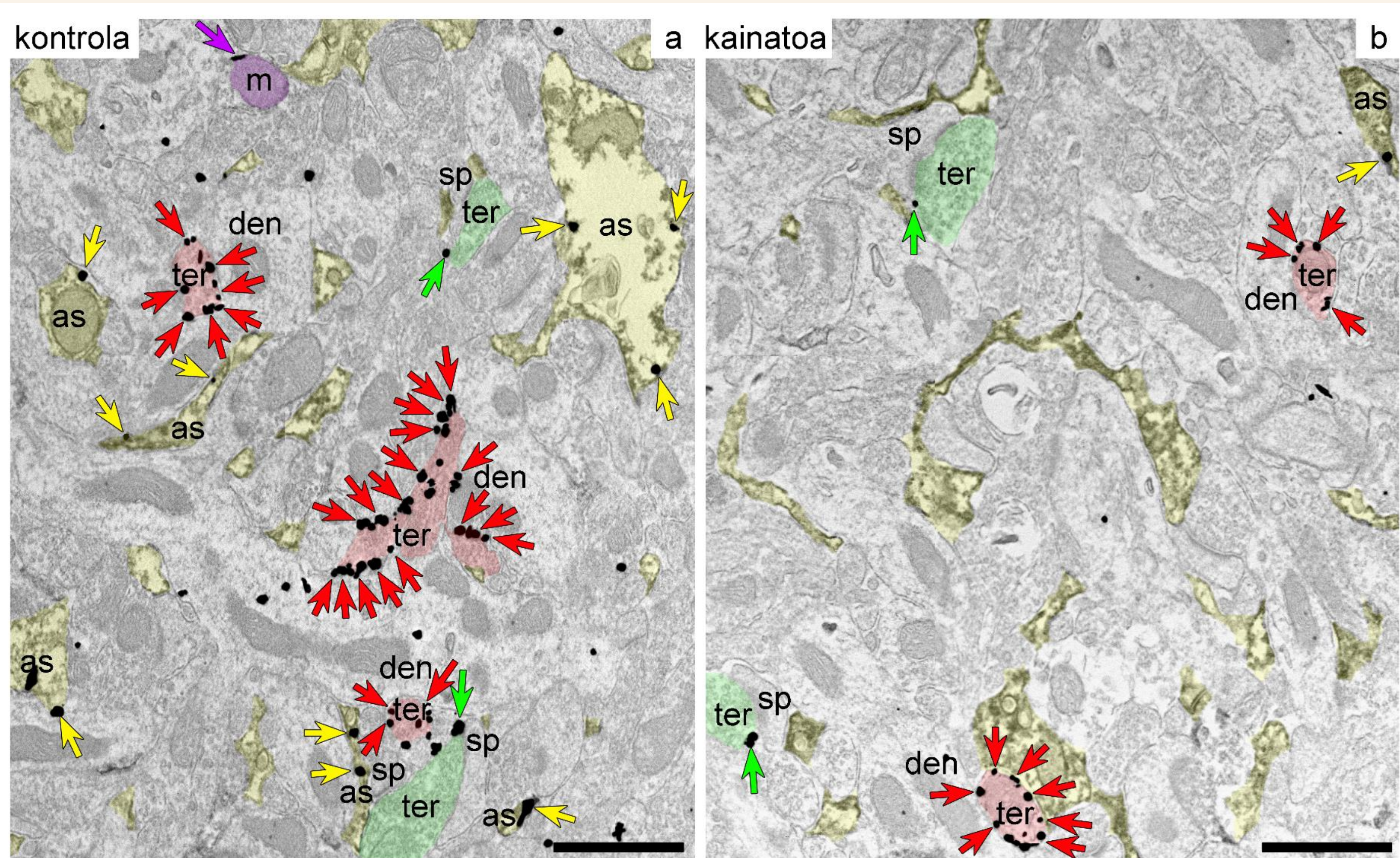
LLEren animalia-ereduan hipokanpoko bihurtune horzduneko geruza molekularrean (BHGM) astrozitoetako CB₁ hartzaileak aztertzeko, mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza erabili zen. Metodo horri esker, CB₁ azpizelularra eta astrozitoen markatzaile proteikoa (GLAST) aldi berean lokalizatu ahal izan ziren. CB₁ hartzaileak zilarrez bihurtutako 1,4nm-tako urre partikula bat erabiliz ikusarazten da. Astrozitoak aldiz, immunoperoxidasa metodoaren bitartez hautematen dira. JOEL JEM 1400 transmisiozko mikroskopia elektronikoaren bidez ateratako argazkietan, GraphPad softwarea erabiliz, CB₁ markatzaileko positiboak diren astrozitoen ehunekoaren analisi estatistikoa burutu zen.



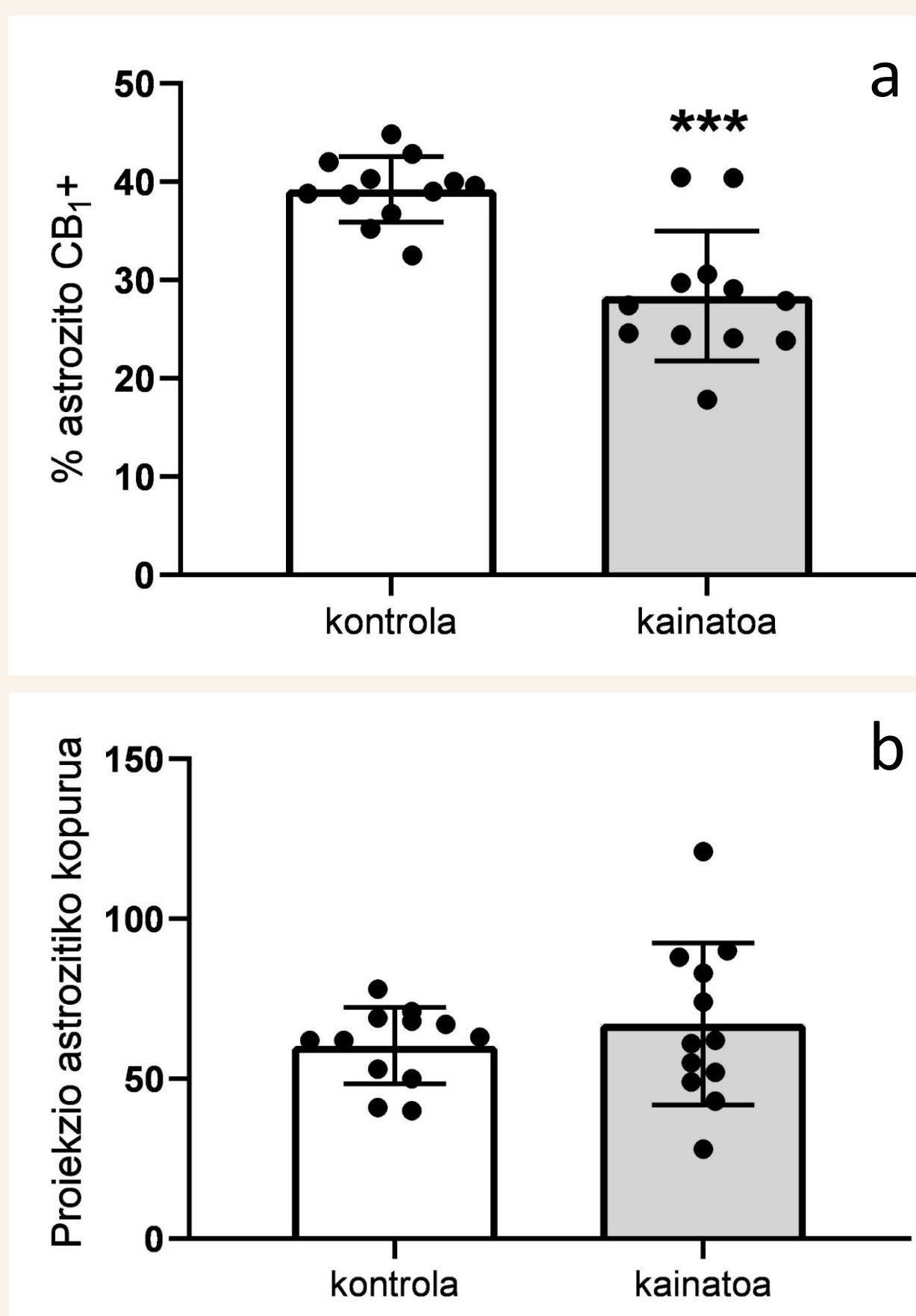
4. irudia. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza (Puentes et al., 2019tik egokitua). Ab: antigorputza.

EMAITZAK

Espero bezala, hipokanpoko BGHM geruzan CB₁ hartzaileak neuronetan eta mitokondrioetan ez ezik astrozitoetan ere aurkitu genuen (4. irudia). CB₁ hartzailearen adierazpenaren azterketak, hartzailearekin markatutako astrozitoen proportzioa kainato animalia-ereduko saguetan nabarmen murriztu zela agerian utzi zuen (***) (p < 0,001) (5. irudia a). Ultramicrografia bakoitzeko (290µm²) proiektzio astrozitikoaren kopuruari dagokionez, ez ziren ezberdintasun adierazgarriak antzeman (p > 0,05) (5. irudia b).



5. irudia. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunohistokimika bikoitza. CB₁ hartzailearen kokapen azpizelularra bihurtune horzduneko geruza molekularrean: CB₁ hartzailearen markaketa (a) kontrol taldean eta (b) KA taldean. CB₁ hartzaileak bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan (ter, gezi berdeak) zein inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak), astrozitoetan (as, gezi orriak) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) behatu daiteke. Eskala barrak: 1µm



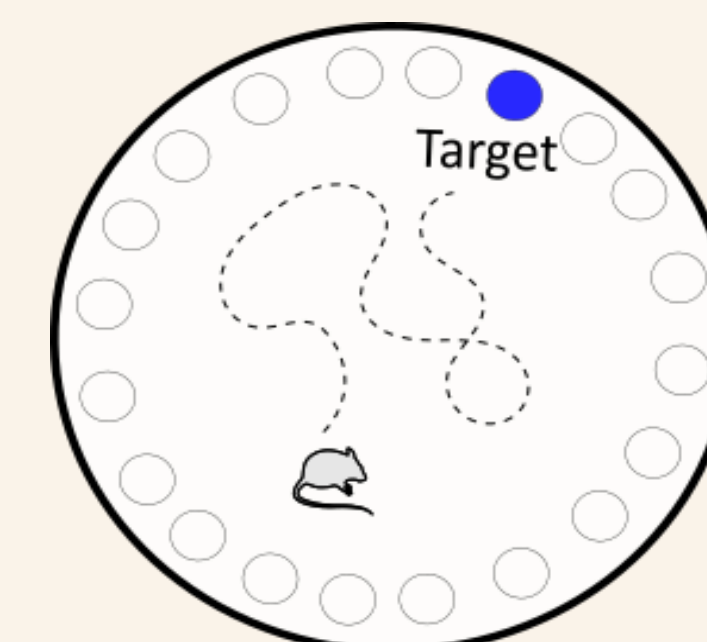
6. irudia. BGHMean burututako azterketa estatistikoa. (a) CB₁ positiboak diren astrozitoen ehunekoak. (b) Astrozito kopurua ultramicrografia bakoitzeko (290µm²). Datuak batezbestekoa ± SEM adierazten dira. Proba parametrikoren bidez aztertu ziren (unpaired t test *** p < 0,001)

ONDORIOA

Kainatoa administratu eta aste batera, CB₁ hartzailearekin markatutako astrozitoen proportzioa nabarmen txikiagotu zen sagu ar helduetan. Horrek garrantzi handiagoa hartzen du proiektzio astrozitikoaren kopurua aldatzen ez dela kontuan hartzen badugu. Hemendik, ondorio garbi bat atera dezakegu: **CB₁ hartzaile astrogliala krisi epileptikoetan konprometita geratzen da.**

ETORKIZUNEAN

- Azido kainikoak proiektzio astrozitikoaren morfologian eragiten dituen aldaketak aztertu.
- Kainatoak eragindako CB₁ astroglialaren murrizketak zitokina proinflamatorio eta antiinflamatorioen mailan duen eragina Western Blot tekniken bitartez analizatu.
- Saguei portaera frogak egin (Barnes laberintoa, adibidez). Izan ere, astrozitoen CB₁ hartzailearen delezioak identifikazio-oroimena kaltetzen du (Santello et al., 2019).



7. irudia. Barnes Laberintoa

Eskerrak:

Lan hau honako diru-laguntzei esker burutu da: Eusko Jaurlaritzak (IT1230-19); Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); MINECO/FEDER, UE (SAF2015-65034-R); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00); AM-k Euskal Jaurlaritzako Hezkuntza Saileko doktoreak ez diren ikertzaileak prestatzeko doktoratu aurreko programaren beka bat dauka. MS, LL, IT eta SA-ren Euskal Herriko Unibertsitateko doktoratu aurreko ikertzaileen kontratuak (PIF 19/164; PIF 18/315; PIF 17/292 eta PIF 16/251); JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766).