



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Ingurune aberastua: nerabezaroan
alkoholarekin trataturiko C57BL6
saguen terapia eraginkorra?**

*Irantzu Rico-Barrio, Sara Peñasco,
Nagore Puente, Leire Reguero,
Jon Egaña-Huguet, Ianire Buceta,
Paula Torres-Maldonado,
Inma Gerrickagoitia, Izaskun Elezgarai
eta Pedro Grandes*

26-33 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.03>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



Ingurune aberastua: nerabezaroan alkoholarekin trataturiko C57BL6 saguen terapia eraginkorra?

Rico-Barrio, Irantzu¹; Peñasco, Sara¹; Puente, Nagore¹; Reguero, Leire¹; Egaña-Huguet, Jon¹; Buceta, Ianire¹; Torres-Maldonado, Paula¹; Gerrikagoitia, Inmaculada¹; Elezgarai, Izaskun¹; Grandes, Pedro^{1,2}

¹Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea, E-48940, Leioa

Medikuntza-zientzietako Saila, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, V8W 2Y2, Kanada
irantzu.rico@ehu.eus

Laburpena

Gehiegizko alkohol-kontsumoa, batez ere nerabezaroan, egungo gizarteak kezkatzen duen arazo larrienetako bat da. Hainbat ikerketek etanolak eta sistema endokannabinoidak (SE) elkar eragiten dutela agerian utzi dute, azken honen funtzioa eraldatuz. Ingurune aberastuak (IAk) aldaketa molekular, anatomiko zein funtzionalak eragiten ditu garunaren garapen prozesuan. Gure xedea, nerabezaroan droga honen kontsumoaren ondorioz sorturiko eraginei aurre egiteko aberastutako inguruneak helduaroko saguen hipokanpoan duen rola aztertzea izango da.

Hitz gakoak: Alkohola, ingurune aberastua, kognizioa, plastikotasuna, terapia.

Abstract

Alcohol drinking, especially during adolescence, is a serious public health concern. Ethanol interacts with the endocannabinoid system whose function may be altered in ethanol dependence. An enriched environment (EE) has been shown to significantly facilitate recovery from brain injury due to important anatomical, functional and molecular changes that occur along brain development. Here, we investigated the potential positive effects that EE will have to counteract the impairment induced by ethanol intake during adolescence in the adult mice hippocampus.

Keywords: Alcohol, enriched environment, cognition, plasticity, therapy.

1. Sarrera eta motibazioa

Alkohola egungo nerabeek kontsumitzen duten substantzia psikoaktibo ohikoena da. Azken urteetako inkesten arabera, adingabeko gazteak gero eta goizago hasten dira gehiegizko alkohol kontsumo intentsiboan murgiltzen, non, asteburuetakozko mozkorraldiak, intoxikazio etilikoak eta “binge drinking-a” edo betekadetan oinarritutako kontsumoa premiazkoa bilakatu egin den. Estatistiken arabera, lehenengo mozkorraldia 14.1 urterekin gertatzen da. Adin honetan, epe luzeko kalteak eta ondorio latzak pairatzeko arriskuak ez dira aintzat hartzen (Osasun Saila, 2014).

Nerabezaroa aldaketa denboraldi garrantzitsu bat da. Tarte horretan, garunean, etengabeko garapen eta heltze prozesu bat ematen da (Kyzar et al., 2016). Izan ere, asteburuo gizartean ezarrita dagoen larregizko alkohol kontsumoaren ohiturak aldaketa fisiologiko nabarmenak eragiten dituela jakitera eman dute azken urteotako ikerketek; neurotransmisioaren galera, plastikotasunaren asaldura (Clark et al., 2008; Keshavan et al., 2014; Tau eta Peterson, 2010), eta prozesu hauekin zuzenki erlazionatuta dagoen narriadura kognitiboa (Vetreno eta Crews, 2015) aipatzekoak dira, besteak beste. Gainera, droga honek sortarazten duen tolerantzia maila eta ageriko mendetasuna azpimarratu beharra dago. Hortaz, gizarte eragileak gero eta arduratuagoak daude, adingabeko gazteei zuzendutako prebentzio egitasmoak jorratzen.

Alkohol kontsumoaren erregulazioan, endokannabinoidak sistema (ES) funtsezko eginkizun bat betetzen du. ES zelulen arteko komunikazio sistema fisiologiko moldakor neuromodulatzaile bat da, eta hainbat funtzio fisiologikotan parte hartzen du: ikasketan, oroimenean, lo-esnaldi zikloan,

metabolismoan eta adikzio erregulazioan, esaterako. Beraz, azken hamarkadan, sistema honek duen ahalmena itu-terapeutiko gisa aztertu egin da. ES bi oinarrizko endokannabinoidetaz (eKB) konposatuta dago: anadamina (AEA) eta 2-AG. EKB hauen efektuak bi hartzaile nagusien bitartez gauzatuko dira: CB₁ eta CB₂, hain zuzen ere. Ildo honetan, NAPE-PLD eta DAGL entzimak ditugu, eKB-en biosintesian parte hartzen dutenek eta bestalde, FAAH eta MAGL; AEA eta 2-AGren degradazioaz arduratzen direnak, hurrenez hurren (Di Marzo eta Piscitelli, 2015; Ianotti et al., 2016). Hainbat ikerketek etanolak eta sistema endokannabinoidiak elkar eragiten dutela agerian utzi dute, azken honen funtzioa eraldatuz.

Ingurune aberastua (IA) “objektu desberdinen, gizarte-elkarrekintzaren eta ariketa fisikoaren konbinazioa da” (Rosenweig et al., 1978). Oinarrizko ikerkuntzan, aberastutako ingurugiroak ohiko laborategi kaiolak baino handiagoak dira. Bertan, korrika egiteko gurpilak, aldapak, tunelak eta kolore, tamaina eta ehundura ezberdinetako objektuak kokatzen dira. Objektu hauei esker, animalien zentzumenen kitzikapena, ariketa fisikoa eta gizarte-elkarrekintza sustatu egiten dira, garunaren garapen prozesuko aldaketa molekular, anatomiko zein funtzionalak bermatuz. Hortaz, paradigma honek garun lesio berreskurapenean izan dezakeen parte-hartze garrantzitsua zein onuragarria azpimarratu beharra dago.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

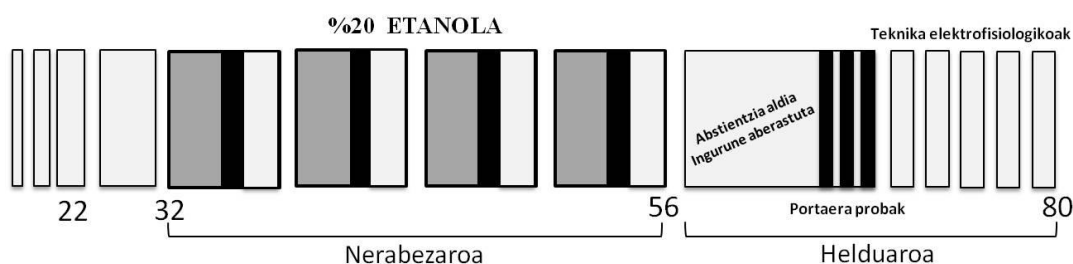
Adingabeko gazteen gehiegizko alkohol kontsumoaren prebalentzia-tasaren ohartarazpenak eta larregizko kontsumo honek dakartzan kalteen ezaguerak, ahobatezko eskakizun nabarmena eragin du bai osasun sisteman bai hiritargoan, prebentzio egitasmoak edo tratamendu berrien ikerketak burutzeko. Zentzu honetan, adikzio honen atzean ezkututzen diren mekanismo neurobiologiko eta neuropatologikoen ezaguerak, terapia eraginkor berrien garapenean lagun dezake, alkohol mendekotasunpean bizi diren pertsonen bizi kalitatea hobetuz.

Hori dela eta, ikerlan hau bi helburu nagusietan bideratuko da. Alde batetik, nerabezaroan alkohol kontsumoaren ondorioz sorturiko epe luzeko efektuen azterketa sakona egingo da. Zehazki, alkohol kontsumoaren eragina CB₁ hartzailearen bidezko transmisio sinaptiko kitzikatzaila eta plastikotasuna aztertuko da. Horretaz gain, oroimen prozesu kognitiboak, mugimenduen koordinazioa, oreka, animalien portaera depresiboa eta estutasun maila ikertuko da. Bestetik, ingurune aberastuak alkoholak eragindako lesio kognitiboetan nola eragiten duen aztertzeke dago, beraz, lan honen beste ardatz nagusia, nerabezaroan alkohol kontsumoaren ondorioz sorturiko efektuei aurre egiteko aberastutako inguruneak duen rola aztertzea izango da. Lortutako emaitzen ekarpenei esker, paradigma honek helduaroan eduki dezakeen ahalmen terapeutikoa aztertzeke aukera emango digu.

3. Ikerketaren muina

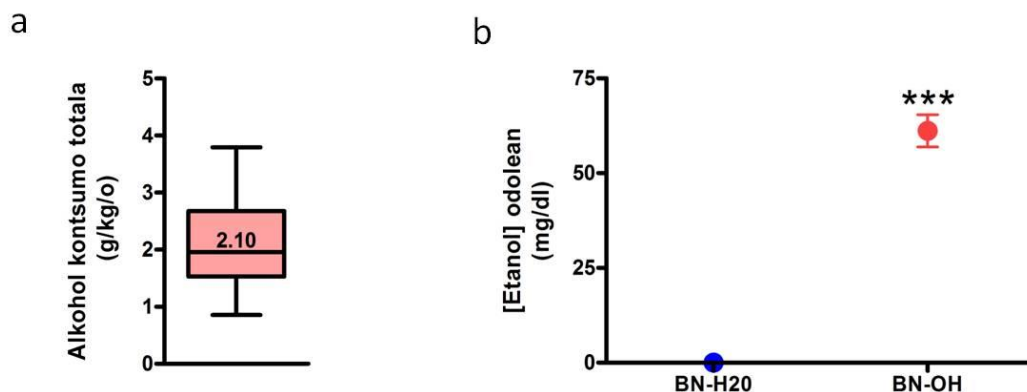
Azterlan honen helburua gauzatzeko, lau astetan zehar, nerabezaroko C57BL6 ar saguei, alkohola edateko protokolo bat ezarri zitzaion (1. irudia). Asteko lehenengo hiru egunetan, animaliak bi orduz segidan egon zitezkeen alkohola (%20) edota ura era aske batean edaten. Laugarren egunean, edateko denbora-tartea lau orduz luzatu zen eta asteko gainontzeko hiru egunak atseden gisa hartu ziren.

1. irudia. C57BL6 ar saguei ezarritako alkohola edateko lau asteko protokoloa eta diseinu esperimentalaren eskema



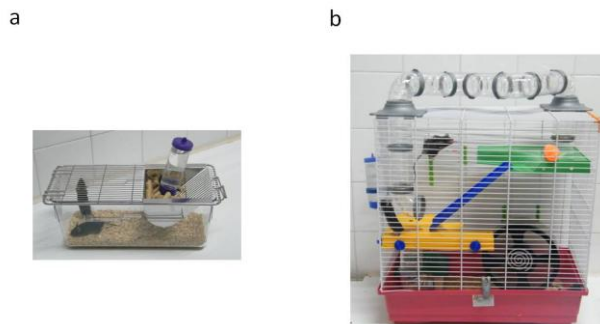
Ezarritako alkohol protokoloaren balioztapena bermatzeko animaliak edandako batz besteko alkohol kontsumo totalaren maila (2.a irudia) eta odoleko etanol kontzentrazioaren neurketa egin zen (2.b irudia).

2. irudia. C57BL6 ar saguek lau astetan zehar edandako a) batz besteko alkohol kontsumo totalaren maila eta b) etanol kontzentrazioaren neurketa



Ondoren, bi asteko abstinentsia aldiak baliatuz, animaliak ingurune aberastuko karioletan barruratu ziren. Beraz, ikerketa honi hasiera emateko lau talde experimental osatu ziren: Baldintza normaletan hazitako kontrol taldea (BN-H₂O), baldintza normalean hazitako alkohol taldea (BN-OH), ingurune aberastuko kontrol taldea (IA-H₂O) eta ingurune aberastuko alkohol taldea (IA-OH) (3. irudia).

3. irudia. a) Ohiko laborategi kaiola eta b) ingurune aberasturiko kaiola



3.1 Portaera probak

Objektu berrien ezagutze proba

Ezagutze oroimena, objektu berrien probaren bitartez neurtu zen. Proba hau saguek daukaten objektu berrietara joateko berezko joeran oinarritzen da. Azterketa honen entrenatze prozesuan, berdinak diren bi objektu erakusten zaizkie saguei, hauek esplora dezaten. Bi ordu geroago, proba egiten da eta lehen esploratutako objektu ezagun horietako bat berri batengatik aldatzen da. Talde experimental ezberdinen ezagutze oroimena, bereizketa indizea (BI) kalkulatu zen neurtuko da. BI= denbora objektu berrian - denbora objektu ezagunean/denbora totala x 100.

Kokaleku berrien portaera proba

Ildo honetan, oroimen espaziala, kokaleku berrien portaera probaren bitartez neurtu zen. Proba hau saguek daukaten leku berrietara joateko berezko joeran oinarritzen da. Lehenik eta behin, ikusgai diren lau pista ipiniko dira portaera-aparatuak osatzen duen horma bakoitzean. Entrenatze prozesuan, bi objektu berdinen bitartez, bi kokaleku ezberdin erakutsiko zaizkie saguei, hauek esplora dezaten. Bi ordu geroago, proba egiten da eta entrenatze prozesuan esploratutako kokaleku ezagun horietako bat berri batengatik aldatuko da. Objektu berrien ezagutze proban bezala, talde esperimental bakoitzaren oroimen espaziala BI kalkulatuaz neurtuko da.

Bi portaera proba hauetan lortutako emaitzek, nerabezaro garaian larregizko alkohol kontsumoaren ondorioz narriadura kognitibo nabarmena gertatzen dela aditzera eman zuten. Hala ere, ezagutze eta espazial oroimen mailaren berreskurapena behatuz, aberastutako ingurugiroen erabilpena alkoholismoaren tratamenduan tresna baliagarria izan zitekeela iradoki zen.

Rotaroda

Mugimenduen koordinazioa rotarod izeneko aparatuaz burutzen da. Azterketa honen entrenatze prozesuan animaliak abiadura iraunkor batean mantendu behar dira rotarodaren gainean. Proba egunean, berriz, abiadura motel batekin hasi eta pixkanaka abiadura hau areagotzen hasiko zaie saguak aparatutik jausten diren arte. Hemen, zuzenki proportzionalak diren bi parametro neurtuko dira: latentzia, hau da, animaliek aparatuaren gainean irauten duten denbora eta erortze abiadura.

Oreka proba

Proba honen bitartez talde esperimental ezberdinen trebezi maila neurtzen da. Entrenatze prozesuan makila lodi bat erabiltzen da, animaliak alde batetik bestera ahalik eta azkarren pasa daitezten. Proba egunean, ordea, makila estutu eta saguen abilezia neurtuko da latentzia eta behatutako mailaren neurketa eginez.

Grafiketan beha daitekeen bezala, alkohol kontsumoak begi-bistako kalteak eragiten ditu bai mugimenduen koordinazioan bai orekan. Hala ere, IAren baldintzek parametro hauetan sortzen dituzten onurak azpimarra beharra dago.

Depresio maila neurtzeko portaera proba

Sei minutuko proba hau depresio egoera eta gelditasun denboraren arteko erlazioan oinarritzen da. Ohitze prozesuan, saguak bi minutuz egongo dira buruz behera hari batetik eskegita. Probak osatzen duen gainontzeko lau minututan, saguek haritik eskegita jarraitzen dutela baliatuz, talde esperimental bakoitzaren gelditasun denbora neurtuko da, egoera depresiboaren islapen gisa. Beraz, zenbat eta tinkoago mantendu, orduan eta egoera depresibo sakonago batean murgilduta aurkituko dira animaliak.

Emaitzek adierazi dutenez, nerabezaroan gehiegizko alkohol kontsumoaren ondorioz ematen den depresioa epe luzean mantentzen den egoera bat da. Ingurune aberastuak, berriz, saguek kontrol egoera arruntera bueltatzeko ahalmena dutela adierazi du.

Estutasun maila neurtzeko argipeko-ilunpeko kutzaren portaera proba

Portaera proba honen bitartez animaliek islatzen duten estutasuna edo estres maila neurtuko dugu. Horretarako, bi zatitan banaturik dagoen kutxa erabiliko da; kutzaren lehenengo zatia ilunpean egongo da eta bestea, berriz, saguentzako estresagarria den argi bizian.

Portaera proba honetan ez dira taldeen arteko ezberdintasun nabarmenik antzeman. Hortaz, nerabezaro garaian alkoholaren kontsumoaren ondorioz eman daitekeen estutasuna, luzarora mantentzen ez den efektua da.

Teknika elektrofisiologikoak

Elektrofisiologiako tekniken bitartez, talde esperimental ezberdinen hipokanpoko neurotransmisioa eta plastikotasunaren ikerketa zertu zen. Zehazki, epe luzeko depresioaren (ELD) plastikotasun motaren azterketa sakona egin zen. Beste behin, aberastutako ingurugiroen ahalmena ikusi zen, non, alkohol kontsumoaren ondoriozko neurotransmisioaren eta ELDren galera berreskuratu egiten zen.

Behin IAk plastikotasunean eragiten dituen aldaketak aztertuta, farmako antagonista ezberdinen erabilpenaz CB₁ hartzailearen, 2-AGren eta AEAREN endokannabinoideen eta mGluR5 eta mGluR1 hartzaile metabotropikoen inplikazioa aztertu zen plastikotasun mota honetan.

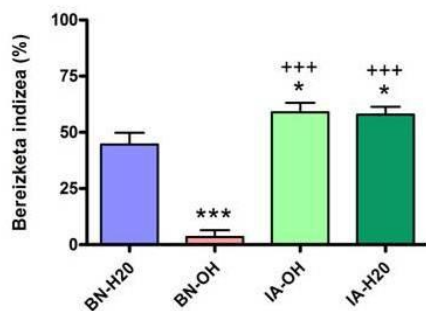
Emaitzek nola CB₁, mGluR5, mGluR1 hartzaileen hala 2-AG endokannabinoidearen inplikazio zuzena adierazi zuten behatutako epe luzeko depresioetan. AEAK, berriz, ez zuen inongo eraginik adierazi plastikotasun mota honetan.

4. Ondorioak

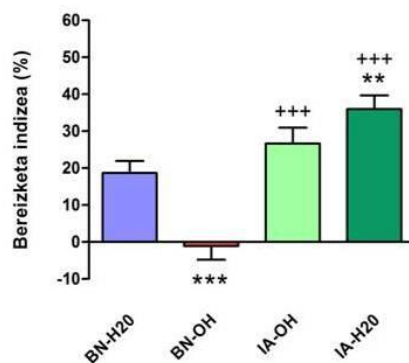
Nerabezaroan alkoholarekin tratatutako animaliek (BN-OH) epe luzeko galera esanguratsua adierazi zuten oroimen probetan, mugimendu koordinazioan eta orekan, urarekin tratatutako animaliekin alderatuz (BN-H₂O). Era berean, BN-OH taldeak egoera depresibo adierazkorrago bat aurkeztu zuen BN-H₂O taldearekin erkatuz. Halere, saguak ingurune aberastuko karioletan barneratzean (IA-OH) parametro guzti hauen berreskurapen adierazgarria ikus zitekeen (4. irudia). Bestalde, ez ziren taldeen arteko ezberdintasun esanguratsurik behatu estutasun maila neurtzerakoan.

4. irudia. a) Objektu berrien ezagutze proban eta b) kokaleku berrien portaera proban talde ezberdinek erakutsi dituzten bereizketa indizeak c) Rotarod aparatuan neurtutako latentzien adierazpena d) orekan proban lortutako emaitzen grafika eta talde esperimental bakoitzak aurkeztu dituen e) depresio maila eta f) estutasun mailaren neurketa.

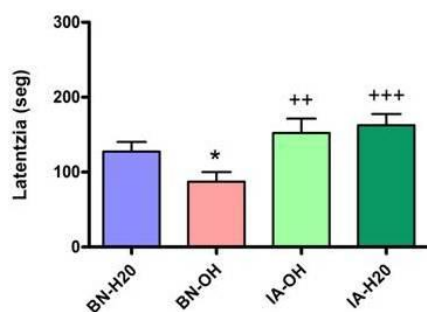
a) Objektu berrien ezagutze proba



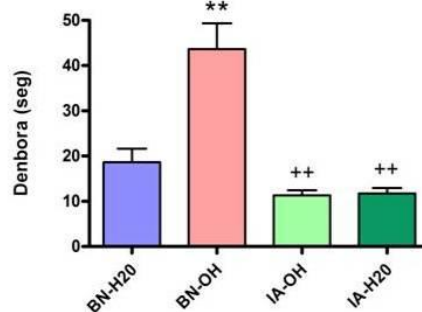
b) Kokaleku berrien portaera proba



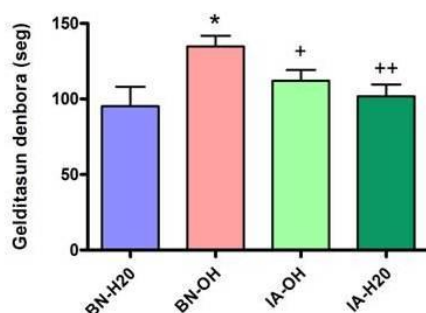
c) Koordinazio motorea



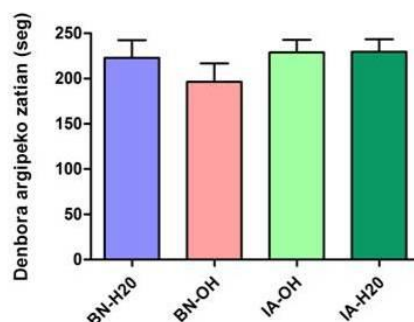
d) Oreka proba



e) Depresio maila

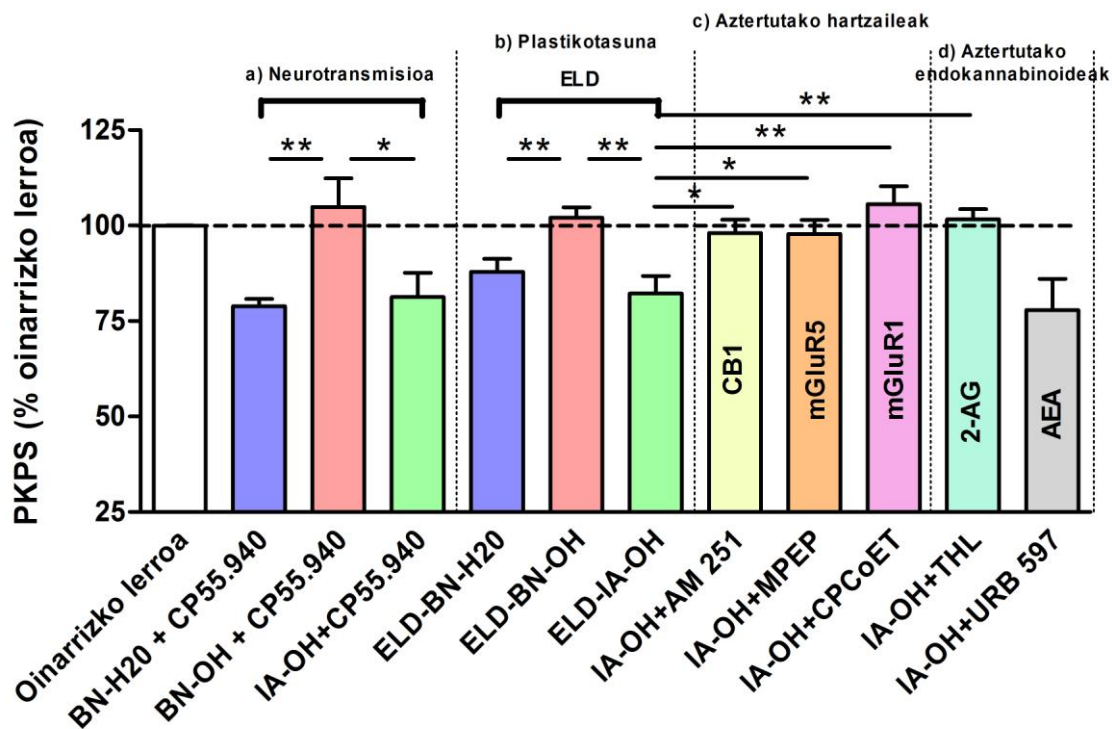


f) Estutasun maila



Ildo hau jarraituz, animalia alkoholikoek, kontrolekin parekatuz CB₁ hartzailearen bitarteko neurotransmisio eta plastikotasunaren gutxipena adierazi zuten hipokanpoan, kontroletan lortutako ELDK deuseztatuz. Harrigarriro, animalia hauek aberastutako karioletan sartzean CB₁-mendeko-neurotransmisioaren berreskurapena eta mGluR1-mGluR5-CB₁-2-AG-mendeko-ELDK-ren sustapena ematen zen, kontrol mailako plastikotasuna bermatuz. Bestalde, lortutako emaitzek, aztertutako plastikotasun mota honetan, AEaren inplikazioa ELDK hauetan baztertu zuten (5. irudia).

5. irudia. a) CB₁ hartzailearen bitarteko neurotransmisio sinaptiko kitzikitzailaren azterketa (CP55.940: CB₁ hartzailearen agonista) b) epe luzeko depresioaren (ELD) azterketa c) IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden hartzaile ezberdinen implikazioa (AM 251: CB₁ hartzailearen antagonista; MPEP : mGluR5 hartzailearen antagonista; CPCoET: mGluR1 hartzailearen antagonista) eta d) IA-OH taldeko plastikotasunaren azpian dauden endokannabinoide ezberdinen implikazioa (THL: DAGL-ren inhibitzailea; URB 597: FAAH-ren inhibitzailea)



5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

1947. urtean, Donald Hebbek aberastutako ingurugiroen potentzialtasuna deskribatu zuenetik, hainbat eta hainbat ikerketak egiaztatu dituzte IAren baldintzen efektu onuragarriak: odol hodi berrien sorrera (Sirevaag et al., 1988), neurogenesiaren sustapena (During eta Cao, 2006) edo neurotrofinen adierazpena (Pham et al., 2002), esaterako. Beraz, paradigma honen efektu mesedegarri hauek berrestu egin ostean, ez da harritzekoa urtetan zehar, zentzumen anitzeko terapia edo tresna neurobabesle gisa aldarrikatu izana. Izan ere, ezagunak dira dagoeneko Alzheimer (Cracchiolo et al., 2007), Parkinson (Herring et al., 2008) edo Huntington (Nithianantharajah et al., 2008) bezalako gaixotasun neuroendekapenezkoetan IAk eragindako osasun hobekuntzak. Ildo hau jarraituz, IAren erabilpena alkoholismoaren terapian norabide egingarria du. Ikerlan honek sendo aurkeztu ditu paradigma honen onurak, beraz, etorkizunari begira IA tresna baliagarria bilakatu daiteke alkoholismoaren menpe bizi diren edo bizi izan diren pertsonen osasun kalitatea hobetzeko.

6. Erreferentziak

- Clark, D.B., Thatcher, D.L. eta Tapert, S.F. (2008) Alcohol, psychological dysregulation and adolescent brain development, *Alcoholism, clinical and experimental research*, 32, 375-385.
- Cracchiolo, J.R., Mori, T., Nazian, S.J., Tan, J., Potter, H. eta Arendash, G.W. (2007), Enhanced cognitive activity over and above social or physical activity is required to protect Alzheimer's mice against cognitive impairment, reduce Abeta deposition, and increasesynaptic immunoreactivity. *Neurobiology of learning and memory*, 88, 277-294.
- Di Marzo, V. eta Piscitelli, F. (2015), The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids, *Neurotherapeutics*, 12, 692-698.
- During, M.J. eta Cao, L. (2006), VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis, *Current alzheimer research*, 3, 29-33.
- Herring, A., Yasin, H., Ambree, O., Sachser, N., Paulus, W. eta Keyvani. K. (2008), Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in Tg-CRND8 mice, *Brain Pathology*, 18, 32-39.
- Iannotti, F.A., Di Marzo, V. eta Petrosino, S. (2016), Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: targets, metabolism and role in neurological disorders, *Progress in lipid research*, 62, 107-128.
- Keshavan, M.S., Giedd, J., Lau, J.Y., Lewis, D.A. eta Paus, T. (2014). Changes in the adolescent brain and the pathophysiology of psychotic disorders, *Lancet Psychiatry*, 1, 549-558.
- Kyzar, E.J., Zhang, H., Sakharkar, A.J. eta Pandey, S.C. (2016), Adolescent alcohol exposure alters lysine demethylase I (LSD I) expression and histone methylation in the amygdale during adulthood, *Addiction Biology*, 1-14.
- Nithianantharajah, J., Barkus, C., Murphy, M. eta Hannan, A.J. (2008), Gene-environment interactions modulating cognitive function and molecular correlates of synaptic plasticity in Huntington's disease transgenic mice, *Neurobiology of disease* 29, 490-504.
- Pham, T.M., Winblad, B., Granholm, A.C. eta Mohammed, A.H. (2002), Environmental influences on brain neurotrophins in rats, *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 73, 167-175.
- Sirevaag, A.M., Black, J.E., Shafron, D. eta Greenough, W.T. (1988), Direct evidence that complex experience increases capillary branching and surface area in visual cortex of young rats, *Brain research*, 471, 299-304.
- Rosenzweig, M.R., Bennett, E.L., Hebert, M. eta Morimoto, H. (1978), Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments, *Brain research*, 153, 563-576.
- Tau, G.Z. eta Peterson, B.S. (2010), Normal development of brain circuits, *Neuropsychopharmacology*, 35, 147-168.
- Vetreno, R.P. eta Crews, F.T. (2015), Binge ethanol exposure during adolescence leads to a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is associated with impaired adult cognitive functioning, *Frontiers in neuroscience* 9, 35.

7. Esker onak

Ikerlan honek Eusko Jaurlaritzako (IT764-13); SAF2015-65034-R (MINECO/FEDER), Euskal Herriko Unibertsitateko (UFI 11/41) eta Red de Trastornos Adictivos-Instituto de Salud Carlos III-ko RD12/0028/0004 diru laguntzen babesa jaso du.