



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

**TRPV1-KO saguek epilepsia krisi
arinagoak jasatearen zergatiak
bilatzen**

*Jon Egaña-Huguet, Irantzu
Rico-Barrio eta Izaskun Elezgarai*

80-87 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.10>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen

Egaña-Huguet, Jon ^{1,2}; Rico-Barrio, Irantzu ^{1,2}; Terradillos, Itziar ^{1,2}; Mendizabal-Zubiaga, Juan Luis ^{1,2}; Puente, Nagore ^{1,2}; Gerrikagoitia, Inmaculada ^{1,2}; Elezgarai, Izaskun ^{1,2}; Grandes, Pedro ^{1,2}.

¹ *Medikuntza eta Erizaintza fakultatea UPV/EHU, E-48940 Leioa*, ² *Achucarro Basque Center for Neuroscience, Bizkaiko zientzia eta teknologia parkea, 205. eraikuntza, Zamudio.*

Jon.egana@ehu.eus

Laburpena

CB1 hartzaileak sinapsi kitzikatzailetan glutamatoaren askapena erregulatzen du eta honek epilepsia gaixotasuna pairatzen duten zirkuitu neuronaletan babes funtzio bat bete dezakeela pentsatzen da. Kainato bitartez induzitutako epilepsia krisiak behatzean ikusi da TRPV1-KO saguek pairatzen duten status epilepticus-a jatorrizko saguek pairatzen dutena baino arinagoa dela. Ebidentzia hori oinarri harturik, lan honetan sagu hauetan sistema endokannabinoidearengan gertatzen diren egokitzapen aldaketak aztertu dira.

Hitz gakoak: CB1-TRPV1-KO-hipokanpoa-epilepsia

Abstract

The endocannabinoid type 1 receptor (CB1) regulates glutamate release to control the excitatory synaptic transmission playing a protective role in the modulation of neuronal circuits affected by the epileptic seizures. We have observed that seizures assessed by behavioural score were milder in TRPV1-KO than in WT mice subjected to the kainate-induced status epilepticus model. As so the aim of this study is to clarify the adaptative changes underlying these phenomena.

Key word: CB1-TRPV1-KO-hippocampus-epilepsy

Sarrera/ Momentuko egoera:

Jakina da marihuana landareak erabilera ludikoa izateaz gain, terapeutikoki ere oso eraginkorra izan daitekeela. Horregatik, azken urteetan gora egin dute landare honekin eta bere inguruarekin zerikusia duten ikerketek. Ikerketa hauek batetik, landareak terapeutikan izan dezakeen boterea aztertzen dihardute, ekoizten dituen kannabinoideak eta euron deribatuak ikertuz gure onurarako izan daitezkeen medikamendu berriak garatzeko. Eta bestetik, zenbait ikerketa, marihuana landareak gure gorputzean aktibatzen duen sistema endokannabinoidea, hau da, gizakian endogenoa den kannabinoide sistema aztertzen dabilta. Sistema hau ez da soilik gizakietan agertzen, beste hainbat bizidunetan, bai ugaztun zein arrainetan, aurkitu daiteke eta bere eginkizun bakarra ez da marihuana landarearen osagai aktiboa den α -THC-aren ekintza ahalbidetzea, izan ere, nerbio sisteman dagoen sistema modulatzailer nagusietako bat da frogatuta dauden beste funtzio batzuen artean. Hots, sistema honen bitartez neuronon aktibitatea kontrolatzen da. Gehiegizko aktibitate kitzikatzailera gertatuz gero kalte eta heriotza neuronala ematen dira toxikotasun mekanismoen ondorioz (Zhang et al. 2015). Gehiegizko kitzikapen hori gertatzen denean, sistema hau martxan jartzen da eta gehiegizko aktibitate hori eten dezake, horregatik esan daiteke sistema honek funtzio neurobabeslea duela (Monory et al. 2006). Adibidez azido kainikoaren bitartez eragindako krisi epileptikoetan anandamida

endokannabinoidearen produkzioa areagotzen da hipokanpoan, ondorioz CB1 hartzailearen aktibazioa eragiten da gehiegizko aktibazioaren aurka babesteko (Marsicano et al., 2003).

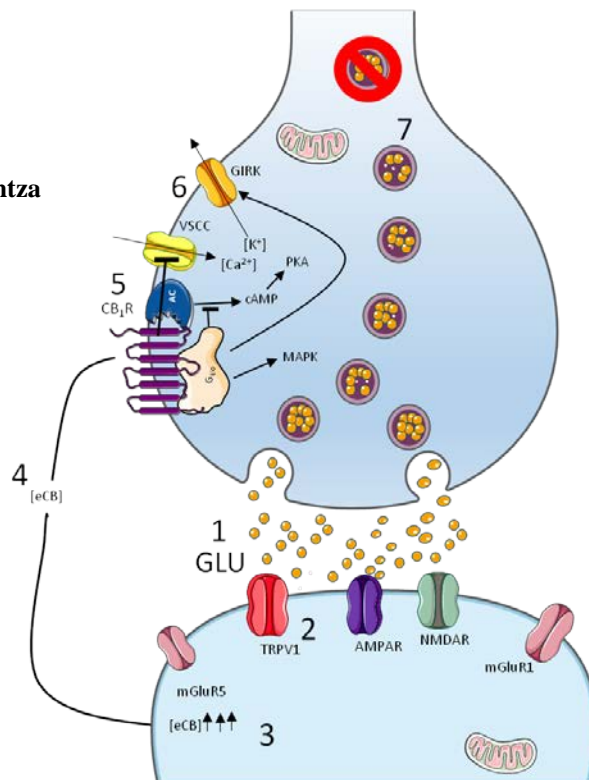
Endokannabinoide sistemaren barne hainbat osagai aurki ditzakegu. Lehenik, endokannabinoide nagusienak, batetik arakidonil-etanol-amina (AEA) daukagu, anandamida izenez ezaguna dena, eta bestetik 2-arakidonil-glizerola (2-AG). Hauek sintetizatu eta degradatzeko berriz, entzima espezifikoak dauzkagu. Anandamidaren sintesi entzima NAPE-PLD da eta 2-AG –rena DAGL α . Aldiz degradaziorako entzimak FAAH eta MAGL dira hurrenez hurren. Jarraitzeko, hartzaile kannabinoideak dauzkagu, lehen motakoa (CB1) eta bigarren motakoa (CB2). Hauek berezko kannabinoideak (endokannabinoideak) eta berezkoak ez direnak (fitokannabinoideak landareetan edota kannabinoide sintetikoak) ezagutzeko kapazak dira eta euren ekintza eta baita kokapena ere desberdina da. Lehen motako hartzailea nerbio sistema zentrolean aurkitzen da batez ere, bigarren motako hartzailea berriz zelula immunitarioetan aurkitzen da nagusiki. CB1 hartzailea mintz presinaptikoan kokatzen da. Gainontzeko neurotransmisore klasikoak ez bezala, endokannabinoideak eremu postsinaptikoan sintetizatzen dira beharrezkoak direnean eta presinapsiraino bidea egiten dute euren ekintza burutzeko (Howlett et al., 2002) (1. eskema).

Hartzaile hauetan eragiteaz gain, endokannabinoideak beste sistema batzuetako hartzaileekin ere elkarrekintzak sortzen dituzte, horien artean TRPV1 (Potenzial aldakorreko lehen motako hartzaile valinoidea) edota GPCR55 (G proteinetara loturiko hartzaile zurtza). TRPV1 hartzailea kanal kationiko ez selektibo bat da zeina hainbat sustantzia naturalen bidez, valinoideen bidez, pH baxuen bidez edota tenperatura altuen bidez aktibatzen den. Ondorioz neurotransmisoreen askapena erregulatzen du garuneko plastizidade sinaptikoan eraginez (Bhaskaran eta Smith, 2010). Hartzaile horiek kannabinoideengatik aktibatuak izan daitezke eta endokannabinoideen sintesian eragina izan dezaketela ikusi da (Chávez et al., 2014). Duela gutxi deskribatu da hartzaile hau, TRPV1-a hipokanpoko geruza molekularreko bide zulatzailean kokaturiko sinapsi kitzikatzaileen alde postsinaptikoan aurkitzen dela (Puente et al. 2014) eta gainera geruza horretan dauden sinapsi inhibitzaileen % 30 hartzaile honentzako immunopositiboak dira (Canduela et al. 2015).

1. eskema

Endokannabinoide sistemaren ekintza mekanismoa

1. Sinapsia
2. Mintz postsinaptikoaren despolarizazioa
3. Endokannabinoideen sintesia
4. Endokannabinoideen askapena
5. CB1 hartzailearen aktibazioa
6. Mintz presinaptikoaren hiperpolarizazioa
7. Neurotrasmisoreen askapenaren etetea



Esan bezala, sistema honek sinapsi transmisioa modulatzeko duenez, burmuinean gertatzen den gehiegizko aktibitatea kontrolatu dezake, eta hori litzateke, hain zuzen ere, epilepsian ematen den fenomeno. Gaixotasun kroniko honetan burmuinaren gehiegizko kitzikapen bat gertatzen da hipokanpoan, izan ere, eremu honetan dauden zirkuitu kitzikatzaileak gehiegizko aktibitate hori garatzeko erraztasun gehiago daukate (Ben-Ari Y., 2002) eta horren ondorioz hipokanpoa endekatu egiten da.

Krisi epileptikoak bi motatakoak izan daitezke; partzialak, konbultsioak gorputz atal baten ematen direnean, eta orokortuak, gorputz osoan adierazten direnak (Bates, K. 2015). Epilepsia gaixotasuna nahi baino aruntagoa da, gaur egunean munduan 50 milioi pertsona baino gehiagok pairatzen duten gaixotasun kronikoa da eta urtean 2,4 milioi kasu berri agertzen direla kalkulatu da. Gaixotasun hau mundu osoko morbiditatearen %0,5 betetzen du eta Europa mailan urtean dakarren diru gastua 20.000 milioikoa da (OMS 2015).

Ikerketaren helburuak:

Gure laborategian aurretik egindako saiakera batzuetan, ikusi da TRPV1 hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguek (TRPV1-KO) jasaten duten status epilepticus-a, sagu normalek jasaten dutena baino arinagoa dela, bai jasandako mailan eta baita iraupenean ere. Emaizta horiek TRPV1 hartzaileak edo bere absentsiak eragiten dituen aldaketak onuragarriak izan daitezkeela epilepsian iradokitzen dute. Sistema endokanninoidearen eragin neurobabeslea kontutan hartuz eta potentzial terapeutikoa ezagututa (Chiarlone et al. 2014), garrantzitsua litzateke hipokanpoko neurona kitzikatzaileetan TRPV1-KO saguetan epilepsiaren aurreko babesean parte hartzen dauden neurona azpimoten CB1 hartzaileak aurkezten duen kokapena jatorrizko animaliekin konparatzea; CB1-aren espresio edo kokapen aldaketa izan baitaiteke epilepsia arintzearen erantzule.

Ikerketaren muina eta ondorioak:

Lan honen helburua betetzeko lehenik eta behin TRPV1 hartzailea espresatzen ez duten sagu transgenikoetan sistema endokannabinoidearen parte diren osagaiak aztertu dira. Horretarako teknika ezberdinak erabili ditugu. Batetik, sistemaren osagaiak diren hartzaile eta zenbait entzimen espresioa western blot teknikaren bidez aztertu da. Teknika horren bitartez jatorrizko saguen eta TRPV1-KO saguen hipokanpoetan hartzaile edo entzima desberdinen kantitatea alderatu da. Bestetik, teknika immunohistokimikoak erabiliz, argi mikroskopia eta mikroskopia elektronikoaren bitartez hain zuzen ere, CB1 hartzailearen espresioan eta kokapen orokor eta zehatzean dauden ezberdintasunak bilatu dira bi sagu moten artean.

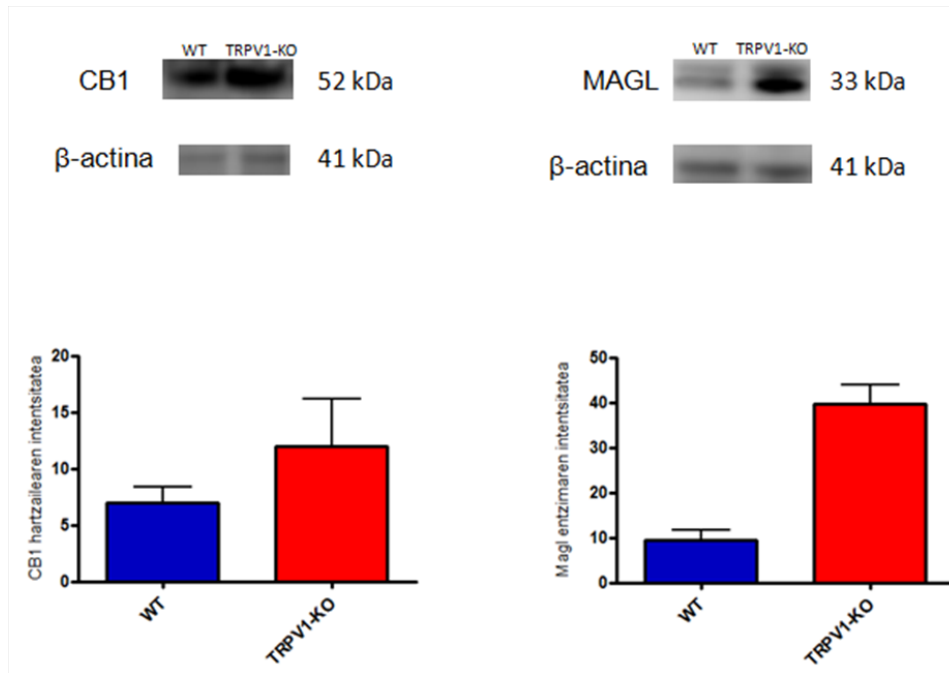
Ikerketa honetan erabili diren saguak, bi hilabeteko C57BL6 anduiko saguak dira, bai kontrol zein TRPV1-KO animaliak. Hauetan aztertu den eremua hipokanpoa izan da eskualde hau baita aldi baterako epilepsia medialarekin zuzenki erlazionatutako eremua. Epilepsia mota honetan hipokanpoaren endekapena gertatzen da bere funtzioaren galerarekin batera.

Lehenik eta behin bi sagu hauen artean ezberdintasunak bilatzeko western blot teknika erabili da. Teknika honen bitartez ikusi da CB1 hartzailearen eta baita ere MAGL sintesi entzimaren espresioan handipen bat dagoela TRPV1 hartzailea ez duten saguen hipokanpoetan (1. irudia).

Hipokanpoan ematen den handipen hau zehaztasun handiagoz aztertzeko eta aldaketak izaera orokorra duten edo hipokanpoaren eskualde jakin batzuetara mugatzen diren ezagutzeko teknika immunohistokimikoak erabili dira. CB1 hartzailearen lotzen diren antigorputzak erabiliz, ikusi dugu

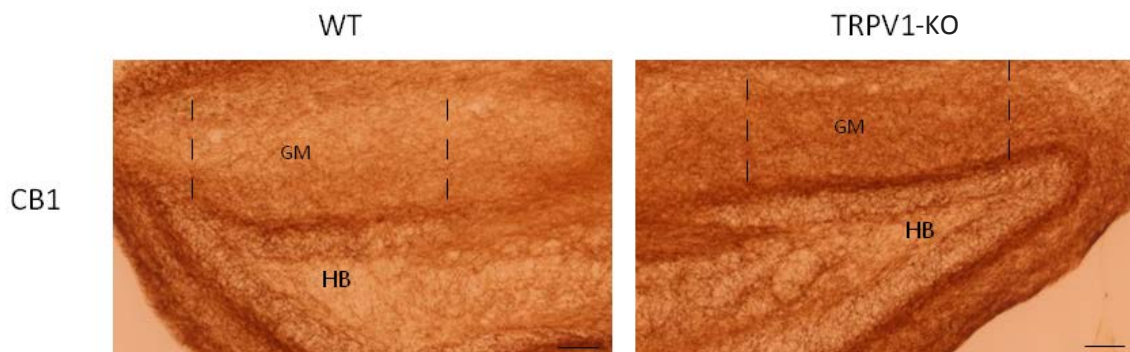
hipokanpoan CB1 hartzaillearen espresioan handipen bat gertatzen dela TRPV1-KO saguetan eta handipen hau hipokanpoaren hortz bihurgunean nabarmenagoa dela (2. irudia). Eredu honetan hainbat geruza ezberdin badaude ere, analisi hau geruza molekularra deritzon zonaldearen lehen herenera zuzendu da, bertan baitago CB1 hartzaille gehien eta desberdintasunak nabariagoak izan daitezke, hala ere, etorkizunean gainerakoak aztertzeko asmoa dago.

1. irudia



CB1 eta MAGL proteinen espresioa sagu hipokanpoan. Ardatz bertikalean bi proteinen espresio erlatiboa adierazten da. Ardatz horizontalean berriz aztertutako bi taldeak. WT: jatorrizko sagua TRPV1-KO: TRPV1 espresatzen ez duen sagua

2. irudia

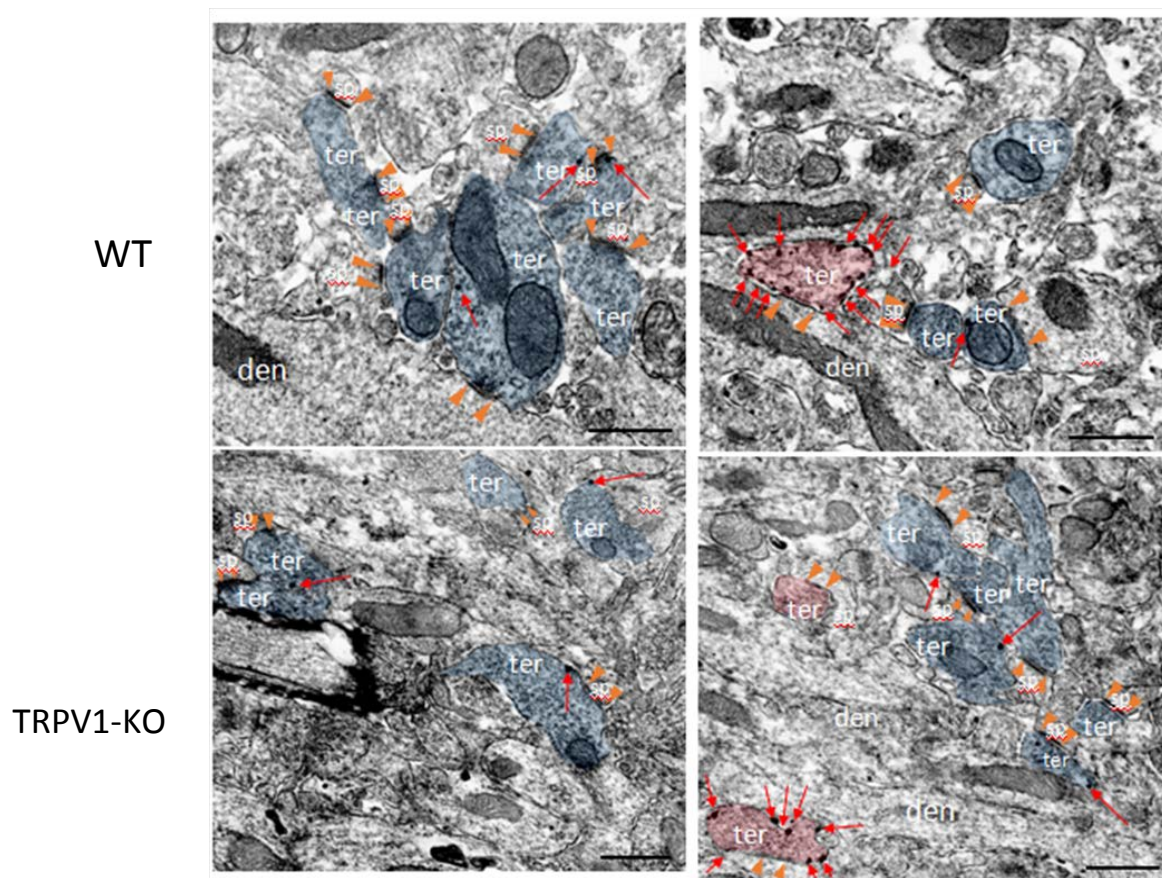


Argi mikroskopio bidezko CB1 hartzaillearen markaketa hipokanpoko hortz bihurgunean jatorrizko eta TRPV1-KO saguetan. Marra bertikalek geruza molekularren eskumako eta ezkerreko mugak adierazten ditu. WT: jatorrizko sagua TRPV1-KO: TRPV1 espresatzen ez duen sagua. GM: geruza molekularra eta HB: hortz bihurgunea; Eskala barra: 0,5 μm

Ultraegitura mailan, handipen hau zein neurona mota eta eskualdetan gertatzen den jakin nahi izan da eta horretarako teknika immunozitokimikoak mikroskopio elektronikoan aztertu dira (3. irudia). Azterketa eta kuantifikazioa egin ondoren, ikusi da terminal kitzikatzaileetan CB1 hartzaillearen handipen esanguratsua gertatzen dela (4A irudia), izan ere, jatorrizko animalien terminal kitzikatzaileetan $32,61 \pm 2,33$ -an CB1 hartzaillea dagoen bitartean, TRPV1 hartzailerik ez duten animalietan, eremu berdinean, CB1 hartzaillea agertzen duten terminal kitzikatzaileen ehunekoa $47,37 \pm 2,47$ -ra arte igotzen da. Kontutan edukiz, sagu mota bietan terminal kitzikatzaile kopuruan ezberdintasun esanguratsurik ez dagoela, ondorioztatu daiteke gora egin duena CB1 hartzaillearen presentzia dela. Hau ikusita, terminal inhibitzaileetan berdin gertatzen den aztertu da (4B irudia). Kasu honetan ere terminal inhibitzaile kopuruan aldaketarik ez egoteaz gain, ez da CB1 hartzaillea duten terminal inhibitzaileen handipen esanguratsurik behatu.

Terminal kitzikatzaileetan CB1 terminal positibo kopurua igotzeaz gain CB1 hartzaillearen dentsitatean ere handipen bat dago (4D irudia). Hau da, TRPV1-KO animalien terminal kitzikatzaileen mintzetan agertzen den CB1 hartzaillearen kopurua handiagoa da jatorrizko saguetan agertzen dena baino. Horrela, jatorrizko saguetan mintzeko mikrometro bakoitzeko $0,23 \pm 0,019$ partikula agertzen diren bitartean, TRPV1-KO animalietan mintzeko mikrometroko $0,32 \pm 0,021$ partikula ageri dira. Dentsitate aldaketa honen arrazoia CB1 hartzaillearen espresio igoera edo terminalen perimetroaren txikitzea izan daitekeenez, terminal kitzikatzaileen perimetroak neurtu dira. Azterketa horrek bi animali taldeen artean ez du ezberdintasun esanguratsurik aurkitu. Terminal inhibitzaileetan ez da CB1 hartzaillearen dentsitatean aldaketarik gertatu (4E irudia).

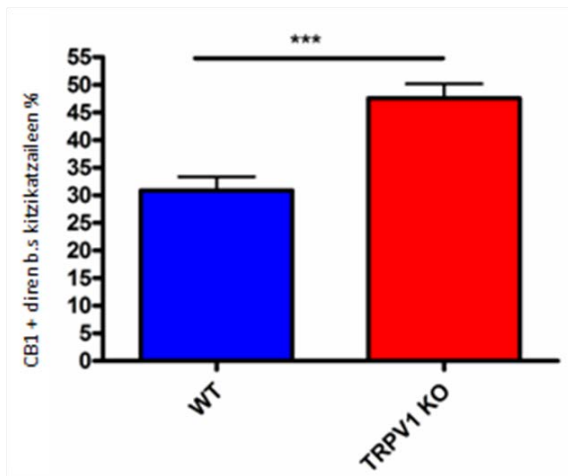
3. irudia



CB1 hartzaillearen kokapena hipokanpoko geruza molekularreko lehen herenean, neurona kitzikatzaile zein inhibitzaileetan, jatorrizko saguetan eta TRPV1-KO saguetan. Urdinez: bukaera sinaptiko kitzikatzaileak; Gorritz: bukaera sinaptiko inhibitzaileak; Geziburua gorriak: sinapsiak; Gezi gorriak: CB1 immunopartikulak; Ter: bukaera sinaptikoak; Sp: spina dendritikoak; Den: dendritak. Eskala barra 0,5 μ m

4. irudia

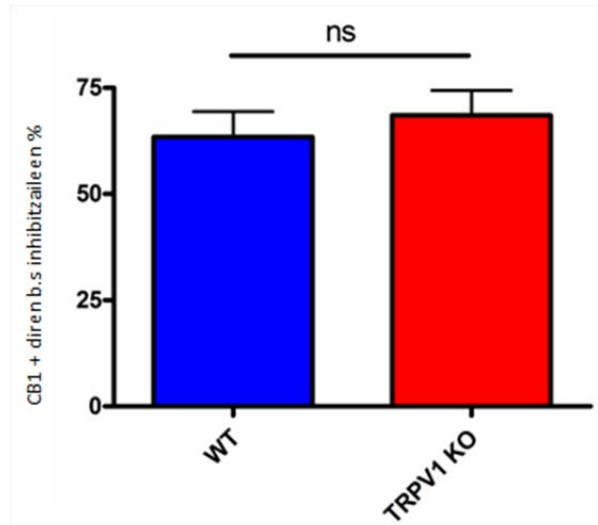
A)



CB1 espresioaren kuantifikazioa bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan.

CB1 immunopositiboak diren terminal kitzikatzaileen batz bestekoa jatorrizko saguetan % 30,87 ± 2,45-koa da. TRPV1-KO saguetan batz bestekoa %47,54 ± 2,63-koa da. Bi taldeen arteko aldea estadistikoki esanguratsua da ($p < 0,0001^{***}$, Mann Whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 328; TRPV1-KO: 345).

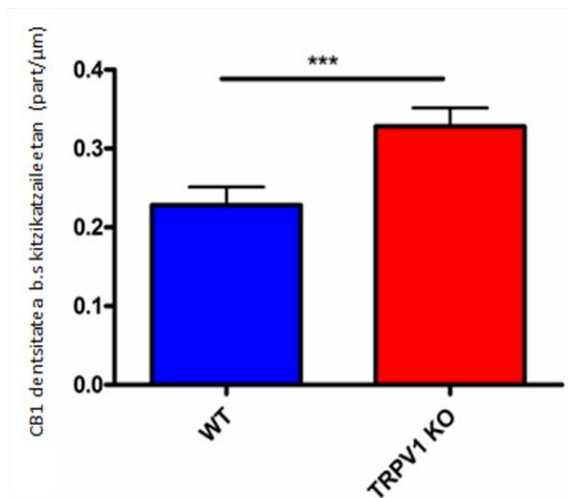
B)



CB1 espresioaren kuantifikazioa bukaera sinaptiko inhibitzaileetan

CB1 immunopositiboak diren terminal inhibitzaileen batz bestekoa jatorrizko saguetan %63,46 ± 5,95-koa izan da. TRPV1-KO saguetan berriz batz bestekoa %68,53 ± 5,85-koa da. Ez da bi taldeen arteko ezberdintasun estadistiko esanguratsurik ageri ($p > 0,05$ Mann whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 74; TRPV1-KO 72)

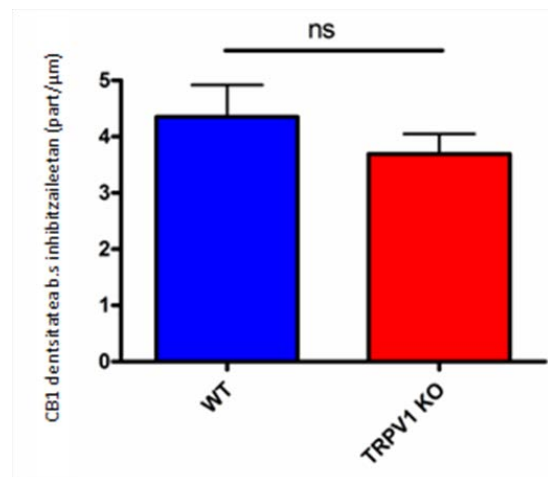
D)



Terminal kitzikatzaileen CB1 immunopartikulen dentsitatea hipokanpokoan.

CB1 immunopartikulen batz bestekoa mikrako 0,23 ± 0,023 partikulakoa da jatorrizko saguetan. TRPV1-KO saguetan berriz mikrako 0,33 ± 0,023 partikulakoa da. Bi taldeen arteko ezberdintasuna estadistikoki esanguratsua da ($p < 0,0001^{***}$ Mann Whitney test). (B.s: Bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 328; TRPV1-KO: 345).

E)



Terminal inhibitzaileen CB1 immunopartikulen dentsitatea hipokanpokoan.

CB1 immunopartikulen batz bestekoa mikrako 4,35 ± 0,57 partikulakoa da jatorrizko saguetan. TRPV1-KO saguetan berriz mikrako 3,69 ± 0,35 partikulakoa da. Ez da bi taldeen arteko ezberdintasun estadistiko esanguratsurik ageri ($p > 0,05$ Mann whitney test). (B.s: bukaera sinaptikoa. Aztertutako bukaera kopurua, WT: 74; TRPV1-KO: 72).

Lan honen emaitzak adierazten dute, TRPV1 hartzailea ez duten saguetan, CB1 hartzailearen espresioan handipen bat ematen dela. Handipen hau, zehazki, geruza molekularreko lehen hereneko terminal kitzikatzailleetan ematen dela behatu da. Horrez gainera hartzailearen mintzeko espresioa ere handitu egin da

Guzti honek iradokitzen du TRPV1-KO saguek status epilepticus arinagoak pairatzen dituztenaren oinarrian, pentsa daiteke sistema endokannabinoiden espresio maila eta bere aktibitatearen areagotuta izatearen ondorioz izan daitekeela.

Etorkizunerako planteatutako norabidea

Lan honetan hipokanpoko geruza molekularreko lehen hereneko eremua aztertu da. Azterketa hau hipokanpoko beste eremuetara zabaldu nahiko genuke eta azterketa honetatik lortutako emaitzak lobulu tenporalerako epilepsia sagu ereduan aztertu. Erabiliko dugun eredia hipokanpo barneko kainato injekzioa da. Modu horretara, jatorrizko animalietan zein TRPV1-KO-etan epilepsiak sistema endokannabinoiden eragiten dituen aldaketak aztertuko dira eta kannabinoideetan oinarritutako tratamendu bat garatzen ahaleginduko gara.

Eskerrak eta oharrak:

Lan hau burutzeko hainbat erakunderen diru laguntzaz baliatu da. Euskal gobernutik Pedro Grandes jaunari BCG IT764-13 laguntza esleitu zaio; SAF2015-65034-R laguntza Pedro Grandes jaunari ministeriotik ; Euskal Herriko unibertsitate UPV/EHU UFI11/41 laguntza; Adikzio nahasmenduen saretik - Instituto de Salud Carlos III-RD12/0028/0004 laguntza Pedro Grandeseri eta JEH Euskal Herriko Unibertsitatearen kontratu dauka (PIF 15/255).

Erreferentziak

Bates, K. (2015) Epilepsy: Current evidence-based paradigms for diagnosis and treatment. *Neurology*; 42:217-232

Ben-Ari Y. (2002 iraila) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*; 3(9):728-39

Bhaskaran, M.D. eta Smith B.N. (2010) Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*; 223:529-536

Canduela, M.J. et al. (2015) Visualization by high resolution immunoelectron microscopy of the transient receptor potential vanilloid-1 at inhibitory synapses of mouse dentate gyrus. *PLoS One*; Mar 16; 10(3):e0119401

Chávez A. E. et al (2014) Compartment-Specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*. 34(50):16621-29

Chiarlone, A. et al. (2014) A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America*; 1-6

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T.I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A. & Pertwee, R. G (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.*;54(2):161-202

Marsicano, G et al. (2003) CB1 cannabinoid receptors are on demand defense against excitotoxicity. *Science*; 302: 84-88

Monory, K. et al. (2006) The endocannabinoid System Controls Key Epileptogenic circuits in the Hippocampus. *Neuron*; 51:455-466

Munduko osasun erakundea, Osasunaren 68. Mundu asanblada (2015) Carga mundial de epilepsia y necesidad de medidas coordinadas en los países para abordar sus consecuencias sanitarias y sociales y su conocimiento por el público. *Idazkaritzako informea*; A68/12: 3-4

Puente, N et al. (2014) The transient receptor potential vallinoid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* Man 220(2); 12187-94

Zhang, L-N. et al. (2015) Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*; 24:161-165