



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

Antioxidatzaileek hipoxia-iskemiak eragindako burmuin-kaltea murrizten dute, epe luze ikasketa eta memoria hobetuz

O. Arteaga, M. Revuelta, L. Urigüen, A. Álvarez eta E. Hilario

716-723 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.99>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia
Diputación Foral de Bizkaia

eman ta zabal zaku



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Antioxidatzaileek hipoxia-iskemiak eragindako burmuin-kaltea murrizten dute, epe luzeko ikasketa eta memoria hobetuz

Arteaga O¹., Revuelta M¹., Urigüen L²., Álvarez A¹., Hilario E¹.

¹Biologia Zelular eta Histologia saila, ²Farmakologia saila, Medikuntza eta Odontologia fakultatea. Euskal Herriko Unibertsitatea
olatz.arteaga@ehu.es

Laburpena

Hipoxia-iskemia neonatala gaitz komuna da gaur egun (jaioberrien % 0,01-0,1), oxigeno eta glukosaren fluxuaren etenak sortzen duena. Azken urtetako aurrerakuntza pediatrikoak ugariak izan badira ere, hipoxia-iskemia jasaten duten umeek heriotza edo behin betiko ondorio larriak pairatzen dituzte, hala nola, garun-paralisia, epilepsia eta adimen-atzeratasuna. Lan honen helburua resberatrola eta azido dokosahehexanoikoa antioxidatzaileek hipoxia-iskemiak sortutako burmuin-kaltea duten efektu neurobabeslea aztertzea da, hipokanpoko zelulen kaltea, astrogliosi errekatiboa, oligodendrozitoen bideragarritasuna eta memoria balioztatuz, horretarako Rice-Vannucci eredua erabiliko dugularik arratoietan kaltea eragiteko.

Hitz gakoak: hipoxia-iskemia, antioxidatzaileak, hipokanpoa, oligodendrozitoak, memoria

Abstract

One of the most common causes of mortality and morbidity in children is perinatal hypoxia-ischemia, so new and more effective neuroprotective strategies are urgently required, in order to minimize as much as possible the neurological consequences of this encephalopathy. In this sense, interest has grown in the neuroprotective possibilities of antioxidants. The aim of the present work was to evaluate the possible neuroprotective effect of resveratrol and docosahexanoic acid antioxidants in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats, determining hippocampal cell damage, reactive astrogliosis, oligodendroglial injury and long-term behavioral consequences, using the Rice-Vannucci experimental model.

Keywords: hypoxic-ischemic, antioxidants, hippocampus, oligodendrocyte, memory

1. Sarrera eta motibazioa

Hipoxia-iskemia (HI) neonatalak eta ondorioz sortutako entzefalopatia hipoxiko-iskemikoak gizarte eta osasun arazo kezkarria izaten jarraitzen du gaur egun. Oxigeno eta glukosaren murrizketak burmuinean kalteak eragin ditzakeen gaitz komuna da, jaioberrien % 0,01-0,1-ek pairatzen duena (du Plessis eta Volpe, 2002; Azra and Bhutta, 2006; Jiang et al., 2014). Azken urtetako aurrerakuntza pediatrikoak ugariak izan badira ere, HI jasaten duten umeek heriotza edo behin betiko ondorio larriak paira ditzakete: garun-paralisia, epilepsia, adimen-atzeratasuna, ikasteko zailtasunak, hiperaktibitatea eta arreta-defizita, eta ikusteko eta entzuteko gabeziak, kasu (Volpe, 2001; Low, 2004; Vannucci and Hagberg, 2004; Aridas, 2014).

Arrisku faktoreak eta diagnosi klinikoa

Ikerketa neuropatologiko eta epidemiologikoei esker hainbat arrisku faktore identifikatu izan dira bai amarengan zein fetuarengan, hala nola, anestesia transplazentala, sortzetiko sepsia, erditzeko trauma, sortzetiko biriketako eta bihotzeko anomaliak... Asfixia perinatala aldi prenatalan (erditzean edo aurretik) edo postnatalan suerta daiteke (McGuire, 2007).

HI neonatalaren diagnosi klinikoa bi irizpideren arabera da: alde batetik, jaioberriek jaio eta 5 minututara Apgar testan 7 puntu baino gutxiago erdiesten dutenean, hots, defizit neurologiko eta kardiobaskularra aurkezten dutenean, eta bestetik, odolaren pHa 7 baino baxuagoa dutenean, hau da, azidemia azaltzen dutenean, asfixia pairatu dutela diagnostika dezakete pediatrek. Izan ere, asfixia terminoa arnas gasen trukearen desoreka eta ondorengoko azidosi metabolikoaren garapena bezala defini dezakegu (MacLennan, 1999).

Garatzen ari den burmuinaren sentikortasuna

Burmuina gorputzeko organorik aktiboena da metabolikoki hitz eginda, arnasten dugun oxigenoaren %20 eta organismoko glukosaren %25 kontsumitzen ditu, gorputzeko pisuaren %2a soilik suposatzen duen arren. Arnasten dugun oxigenoaren %95a ATP-ra erreduzitzen da eta gainontzeko %5a oxigenoaren espezie erradikal (ROS) bezala askatzen da. Azken hauek prozesu askoren ondorioz sortzeaz gain hainbatetan parte hartzen dute eta hortaz, kantitate txikitari funtsezkoak dira bizitzarako.

Garatzen ari den burmuina helduena baino sentikorragoa da HI kalteen aurrean, bere gantz azido asegabeen kontzentrazio altuagatik, bere oxigeno-kontsumo ikaragarriagatik, antioxidatzaile gutxitasunagatik, mielinizazio gutxi izateagatik eta entzima antioxidatzaileen desorekagatik, besteak beste. Baldintza fisiologikoetan, entzima antioxidatzaileen sistemak errebox homeostasia orekatzen du zelulak kaltetuak suertatzea ekidituz, baina baldintza hipoxiko-iskemikoetan sistema honek huts egiten du eta ezin ditu zelulak kalte honetatik babestu. Laburbilduz, faktore oxidatzaile eta antioxidatzaileen arteko oreka apurtzen denean, hots, ROS eta erradikal askeak gehiegizko kopuruan daudenean, estres oxidatzailea azaltzen da.

HI kaltea zelula-mailan

Entzefalopatia neonatalaren ondorioak kaltearen intentsitate, iraunpena eta kokapenaren arabekoak dira (Ferriero, 2004; Juul eta Ferriero, 2014): bortizki kalteturiko umeen ehuneko txiki batek baino ez du inongo eragozpenik gabe biziraungo, %15-20a hilko den bitartean (Levene et al., 1985; Goñi de Cerio et al., 2013). Hipoxia-iskemiak teorikoki zelula guztiak kaltetzen dituen arren, denek ez dute modu berean erantzuten, neuronak sentikorrenak diren heinean astrozitoak erresistenteenak azaltzen dira (Northington et al., 2001; Hilario et al., 2005). Hala ere, astrozitoak kaltetuak izaten direnean, haien biziraupena murrитеaz gain, neurotransmisore kitzikatzaileak xurgatzeko eta erradikal askeak deusezteko gaitasuna mugatuta gera daiteke, eta honek, era berean, neuronen biziraupena arriskuan jartzen du (Chen and Swanson, 2003; Alvarez-Diaz et al., 2007). Oligodendrozitoak ere, nerbio sistema zentrolean mielinizazioaz arduratzen diren zelulak, oso sentikorrek dira, kalte hipoxiko-iskemikoaren aurrean mielinizazio prozesua eten egiten dute substantzia zurian lesioa eraginez (Rothstein eta Levison, 2005; Butt et al., 2014).

HI-kaltea maila molekularrean

Estres oxidatzaileak HI-ren osteko burmuin-kaltearen eragile nagusitzat hartzen da (Wagner et al., 2004). Burmuinak ez duenez oxigenorik ezta glukosarik eskuratzen, HI-ren ostean berehalako neuronen hondamena gertatzen da eta energia erreserbak agortu egiten dira, honek gertakizun biokimikoen turrusta bati hasiera ematen diolarik. Minan bi fase metaboliko bereizten dira eskematikoki, lehenengo eta behin energiaren erreserbak agortzean, eta bigarrena berroxigenazioagatik, non erradikal askeak ugaritzen diren. Energia agortzen denean fosforilazio oxidatiboa gutxitzen da eta zelulek oinarriko funtzioak betetzeko helburuarekin metabolismo anaerobikora jotzen dute. Metabolismo anaerobikoa energetikoki eraginkorra ez denez, ATP-aren maila murriztu egiten da, azido laktikoa metatzen da eta ioi-ponpek huts egiten dute. Hau dela eta, sodioa, kaltzioa eta ura zelularen barnealdera etengabe sartu egiten dira, mintzaren despolarizazioa ekarriz. Despolarizazioak neurotransmisore kitzikatzaileen gehiegizko askapena eragiten du, batik bat glutamatoarena, haien hartzaileak aktibatuz, eta ondorioz turrusta kitzikatzaile bat pizten da heriotza zelularra sustatuz. Minaren bigarren fasean, lehenengoa gertatu eta 6-48 orduren ostean azaltzen dena, berroxigenazioarekin erlazonaturik dago, bertan mitokondria kaltetu egiten da, lehenengo faseko kalteak hedatuz. Zitosoleko kaltzio askearen emendioak oxido nitrikoaren ekoizpena eragiten du eta erradikal askeak sortzen ditu. Azken hauek lipidoen, proteinen eta azido nukleikoen andeatzea eragiten dute. Energiaren agorpena, azidosia, glutamatoaren askapena, kaltzio intrazelularren metaketa, oxido nitrikoen toxikotasuna eta lipidoen peroxidazioaren konbinazioak zelulen heriotza dakar kasu askotan, bai nekrosi zein apoptosi bidezkoa. Hau guztia dela eta, estres oxidatzailea hain garrantzitsua da patologia honen garapenean eta hura ekiditea ezinbestekoa da hipoxia-iskemiak eragindako entzefalopatia murrizteko.

Epe luzeko eraginak

Aurretik aipatu bezala, hipoxia-iskemiak eragindako burmuin-kalteak epe luzeko kognizio arazoak dakartza. Bereziki memorian eragina du, izan ere hipokanpoa eta kortex zerebrala dira HI-ren ostean kaltetuen azaltzen diren zonaldeak (Dere et al., 2007; Broadbent et al., 2010). Zonalde hauen funtzioa guztiz erlazionatuta dagoenez memoria eta ikasteko gaitasunarekin, HI pairatzen duten umeez adimen-atzeratasuna eta ikasteko zailtasunak izaten dituzte, haien bizitza mugaturik geratzen delarik.

2. Ikerketaren helburuak

Gizakion babes-sistema antioxidatzailea haurdunaldiaren azken hiruhilabetera arte garatzen ez denez, jaioberriek superoxido dismutasa eta glutathion peroxidasa entzima antioxidatzaileen urritasuna dute. Hori dela eta, zentzuzkoa izango litzateke HI pairatzen dutenean umeei antioxidatzaileak ematea tratamendu moduan. Gure helburua arratoietan HI burmuin-kaltean resberatrola eta azido dokosahexanoikoa (DHA) bezalako antioxidatzaileen efektu neurobabeslea aztertzea da, kaltea eragiteko Rice-Vannucci animalia-eredua erabiliko dugularik.

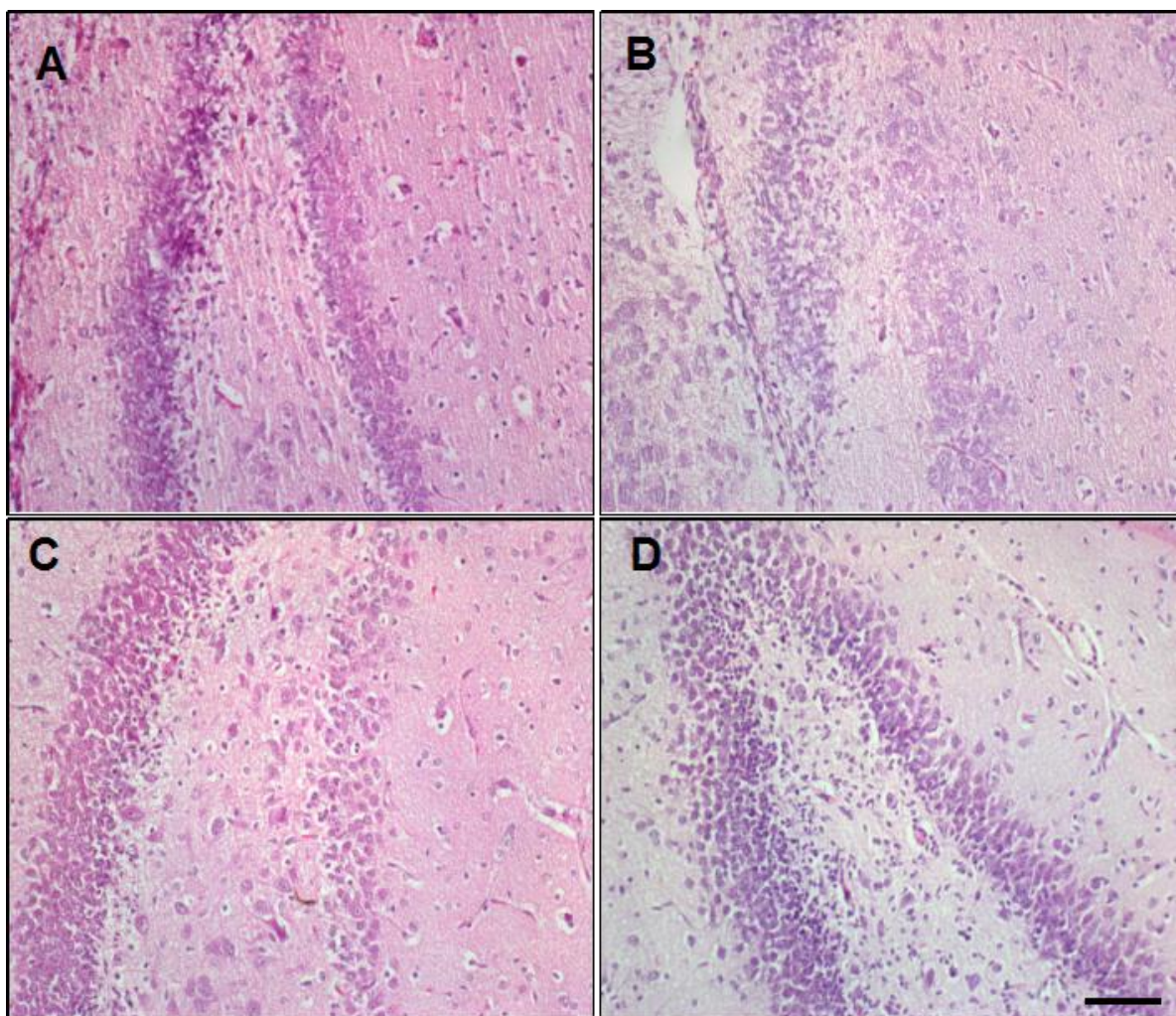
3. Ikerketaren muina

Gure emaitzek antioxidatzaileek hipoxia-iskemiak eragindako burmuin kaltea hobetzen dutela baieztatzen dute, batez ere histologikoki zein epe luzerako jarrerak hobetuz.

Arratoiek 7 egun zituztenean (P7) hipoxia-iskemia eragin zitzaizen Rice-Vannucci eredua erabiliz. Hortaz, burmuin-kaltea eragiteko, lehenengo eta behin, ezkerreko arteria karotida komuna behin betiko okluidu egin zitzaizen, eta bi ordutako atsedean prozesu baten ostean, animaliak 135 minutuz asfixiatu egin ziren oxigeno kontzentrazioa %8-ra jaitsiz. Resberatrola (20 mg/kg) zein DHA (1 mg/kg) intraperitonealki injektatu zitzaizen dosi bakar baten bidez, hipoxia eragin baino 10 minutu lehenago. Kaltea sortu eta zazpi egunen buruan (P14), animaliak hil eta perfunditu egin ziren, burmuinaren sekzioak erdietsiz. Lagin hauek Nissl-arekin tindatu eta Gliaren Proteina Azido Fibrilarra (GFAP) eta Mielinaren Proteina Basikoarekin (MBP) immunomarkatu egin genituen, neuronek, astrozitoek eta oligodendroitoek pairatutako mina aztertzeko, hurrenez hurren. Arratoiek 90 egun zituztenean (P90), T labirinto eta objektu berriaren miaketa testak burutu ziren. Estatistikarako faktore bakarreko ANOVA ($p < 0.0001$) erabili zen.

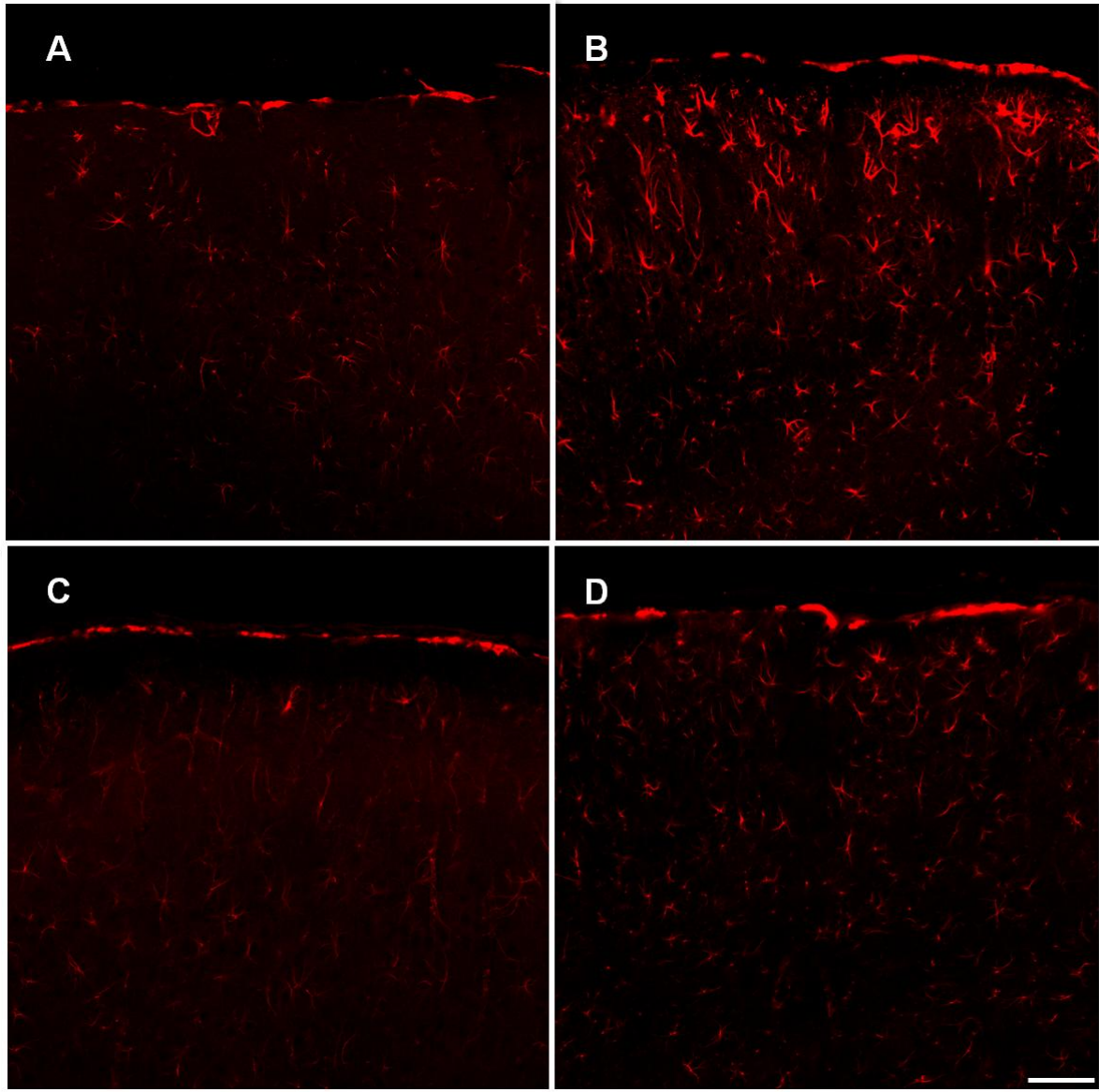
Histologikoki antioxidatzaileek eragindako onurak esangarriak dira, alde batetik burmuineko ehun garela murrizten dutelako, eta bestetik, kalteturiko zelulen kopurua murrizten dutelako. Hipokanpoko dentate gyrus zonaldean adibidez, HI-ren osteko zelulen galera eta kaltea nabariak dira 1. irudian ikus dezkegun bezala, non neuronen morfologia eta tamaina aldakorrek diren, kaltetuak dauden seinale. Bestalde, animaliei emandako tratamenduek zelulak babesten dituzte, neuronen morfologia eta dentate guryaren egitura mantentzen dituztelarik.

1. irudia: Mikroskopia optikoz lortutako Nissl-arekin tindaturiko hipokanpoko dentate gyrus zonaldearen argazki adierazgarriak (P14), A) Animalia kontrolak, B) Animalia hipoxiko-iskemikoa, C) Resberatrolarekin trataturiko animalia hipoxikoa, D) DHA-rekin trataturiko animalia hipoxikoa. HI-ren osteko zelulen galera eta kaltea nabariak dira, baina antioxidatzaileek zelulak babesten dituzte, neuronen morfologia eta dentate guryaren egitura mantenduz. Marra: 40 μ m.



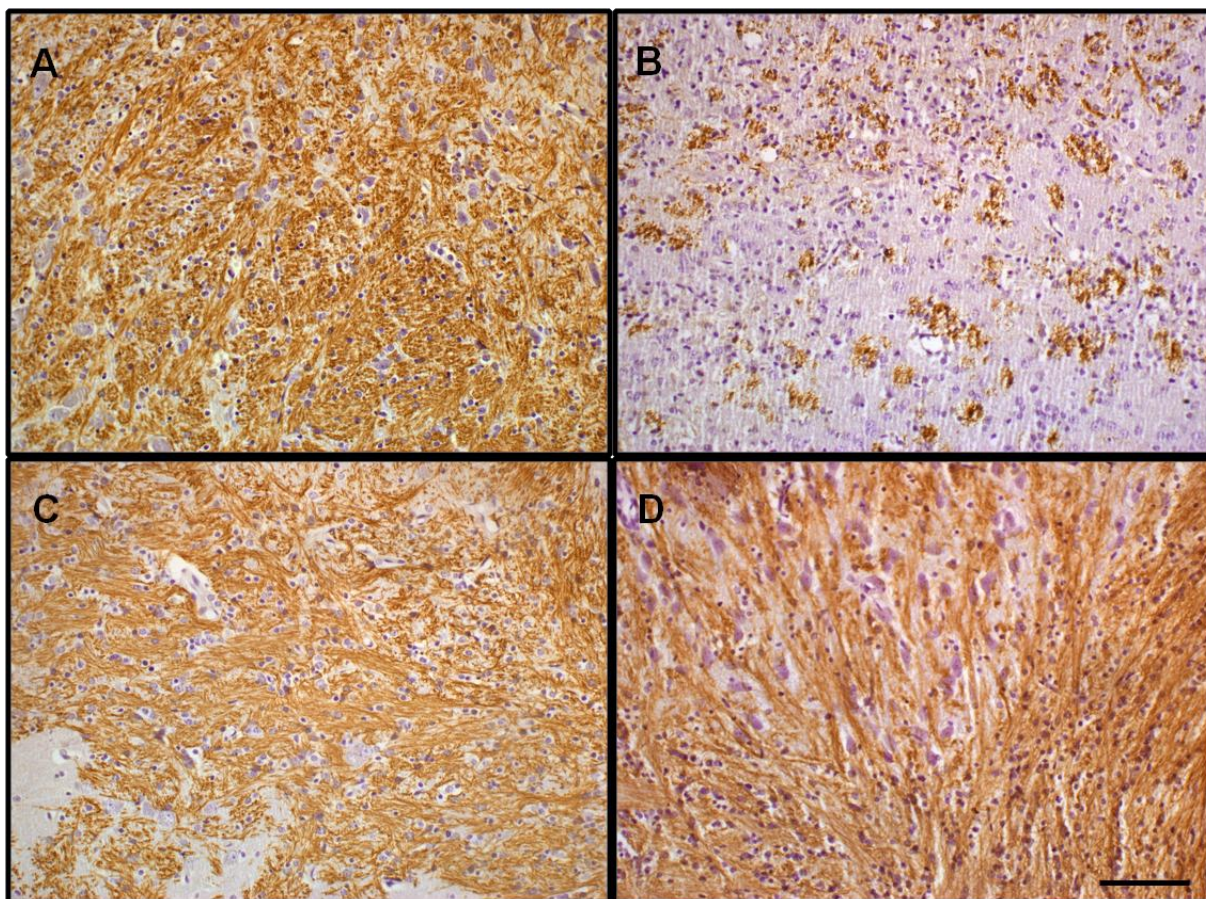
Hipoxia-iskemiaren ostean astrozitoen egoera aztertzeko, Gliaren Proteina Azido Fibrilarra (GFAP) erabili genuen haiek immunomarkatzeko, hots, astrogliosisa analizatzeko. HI-ren aurrean astrozitoak zelula erresistenteenak diren arren, animalia hipoxikoek erreaktibitate maila handiagoa aurkezten dute cortex zerebralean, kontrolekin konparatzen baditugu. Baina astrogliosi erreaktibito hori gutxitu egiten da animaliei resberatrola eta azido dokosahexanoikoa ematen diegunean (2.irudia).

1.irudia: Mikroskopia konfokalaren bitartez lortutako GFAP-rekin immunomarkaturiko irudi adierazgarriak cortex zerebralean (P14), A) Animalia kontrolak, B) Animalia hipoxiko-iskemikoa, C) Resberatrolarekin trataturiko animalia hipoxikoak, D) Azido dokosahexanoikoarekin trataturiko animalia hipoxikoak. Animalia hipoxikoek erreaktibitate maila handiagoa aurkezten duten bitartean, trataturiko arratoiek erreaktibitate gutxiago azaltzen dute, kontrolen antzera. Marra: 40 μ m.



Substantzia zuriaren kaltea eta epe luzeko minusbaliotasun kognitiboak dira hipoxia-iskemiak eragindako ondorioz nagusienak umerengan (Sanches et al., 2013). Substantzia zuriaren parte diren oligodendroitoen bideragarritasuna balioztatzeke, Mielinaren Proteina Basikoaren (MBP) immunomarkaketa egin genuen. Hipoxia-iskemiak oligodendroitoak kaltetzen ditu baina antioxidatzaileek min hau murrizten dute (3. irudia). Argazkietan argi ikusten da nola animalia HI-ek mielina galtzen duten, MBP-ren markaketa ia desagertu egiten delako striatum zonaldean. Trataturiko animalietan ez da galera hau bereizten, are gehiago, animalia kontrolen antzekoa da haien markaketa, resberatrolak eta azido dokosahexanoikoak oligodendroitoak babesten dituztela erakutsiz.

3. irudia: Mikroskopia optikoz lortutako MBPrekin immunomarkaturiko irudi adierazgarriak striatumean (P14), A) Animalia kontrolak, B) Animalia hipoxiko-iskemikoa, C) Resberatrolarekin trataturiko animalia hipoxikoa, D) Azido dokosahexanoikoarekin trataturiko animalia hipoxikoa. Arratoi hipoxiko-iskemikoek mielina galtzen dute, baina trataturiko animalieek ez, are gehiago, animalia kontrolen antzekoa da haien markaketa. Marra: 40 μ m.

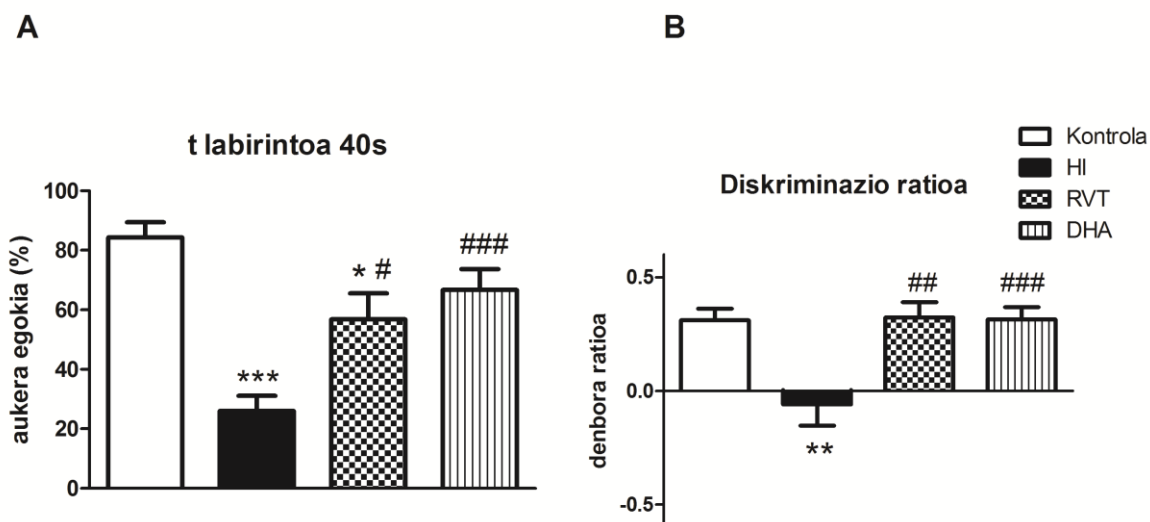


Animalien epe luzeko memoria aztertzeko bi jokaera test burutu genituen arratoiek 90 egun zituztenean, alde batetik memoria espaziala ebaluatzeko T itxurako labirinto baten oinarritutako test bat, eta bestetik, landutako memoria balioztatzeko objektu berrien miaketa testa. T labirintoan 40 segundoren ostean bide egokia zenbat aldiz aukeratu zuten aztertu zen, eta objektu berrien miaketa testan, animaliek objektu berrian egondako denbora eta objektu ezagunean egondakoa neurtu genuen, haien arteko ratio bat kalkulatu.

Resberatrola eta azido dokosahexanoikoak hipoxia-iskemiak eragindako defizit kognitiboak murrizten dituzte, ziurrenik burmuineko area neokortikalak eta subkortikalak (kortex sensorimotorra, hipokanpoa eta striatuma) eta bereziki, memoria eta ikasketaz arduratzen diren neuronen sarea babestuz eta mantenduz. Antioxidatzaileak HI kaltearen aurretik emateak histologikoki efektu neurobabeslea erakustez gain, efektu honek denboran zehar irauten du.

Gure emaitzek frogatzen duten moduan (4. irudia) trataturiko animaliek portaera hobetzen dute animalia HI-rekin aldentuz. Memoria espazialaren kasuan animalia tratatuek ez dituzte kontrolen balioak erdiesten baina bai ez-espazialaren kasuan. Dena den, kasu bietan animalia HI-rekin konparatzean hobekuntzak estatistikoki esangarriak dira.

4. irudia: T labirintoa eta objektu berriaren miaketa testak burutu ziren, lau ikerketa taldeko arratoiek 90 egun zituztenean. A) T labirintoan 40 segundoren ostean bide egokia zenbat aldiz aukeratu zuten adierazten da. B) Objektu berrien miaketa testan diskriminazio ratio bat erabiltzen da (10 minututan, objektu berrian egondako denbora ken objektu ezagunean egondakoa, zati bi objektutan egondakoa). (*) $p < 0,0001$ vs Kontrola. (###) $p < 0,0001$ vs HI. Animalia hipoxiko-iskemikoek emaitza txarragoak eskuratu zituzten epe luzeko memoria aztertzean. Trataturiko animaliek, aldiz, memoria hobetzen dute, animalia kontrolen maila erdietsiz.**



4. Ondorioak

Gure emaitzek iradokitzen dute HI-ren aurrean resberatrola eta azido dokosahehexanoikoa bezalako antioxidatzaileak administratzeak eragin positiboa duela arratoiaren burmuinetan, zelulen kaltea leunduz, astrogliosi erreaktiboa gutxituz, oligodendrozoitoen bideragarritasuna mantenduz eta epe luzeko ikasketa eta memoria hobetuz.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunari begira gure erronka terapia konbinatuak frogatzea izango litzateke. Egun hipotermia erabiltzen denez, antioxidatzaile eta hipotermia arteko konbinaketa bat erabil zitekeen hipoxia-iskemiak sortutako burmuin-kalteak murrizteko, horretarako gizakiarekin antz gehiago duen beste animalia modelo batzuetara ikerketa hedatuz.

6. Erreferentziak

- Alvarez-Diaz A., Hilario E., de Cerio FG., Valls-i-Soler A., Alvarez-Diaz F.J. (2007), Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players, *Neonatology*, 92, 227-235.
- Aridas J.D., Yawno T., Sutherland A.E., Nitsos I., Ditchfield M., Wong F.Y., Fahey M.C., Malhotra A., Wallace E.M., Jenkin G., Miller S.L. (2014), Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: Closing the gap between experimental and clinical research, *Exp Neurol*, 261C, 281-290.
- Azra Haider B. eta Bhutta Z.A. (2006), Birth asphyxia in developing countries: current status and public health implications, *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 36,178-188.
- Broadbent N.J., Gaskin S., Squire L.R., Clark R.E. (2009), Object recognition memory and the rodent hippocampus, *Learn Mem*, 17, 5-11.
- Butt A.M., Fern R.F., Matute C. (2014), Neurotransmitter signaling in white matter, *Glia*, 62, 1762-1779.
- Chen Y. eta Swanson R.A. (2003), Astrocytes and brain injury, *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 137-149.
- Dere E., Huston J.P., De Souza Silva M.A. (2007), The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents, *Neurosci Biobehav Rev*, 31, 673-704.
- du Plessis A.J. eta Volpe J.J. (2002), Perinatal brain injury in the preterm and term newborn, *Curr Opin Neurol*, 15,151-157.
- Ferriero D.M. (2004), Neonatal brain injury, *N Engl J Med*, 351, 1985-1995.
- Goñi de Cerio F., Lara-Celador I., Álvarez A., Hilario E. (2013), Neuroprotective Therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury, *Brain Sci*, 3, 191-214.
- Jiang H., Lei J.J., Zhang Y.H. (2014), Protective effect of topiramate on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat, *Asian Pac J Trop Med*, 7, 496-500.
- Juul S.E. eta Ferriero D.M. (2014), Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury, *Clin Perinatol*, 41, 119-131.
- Levene M.L., Kornberg J., Williams T.H. (1985), The incidence and severity of post-asphyxial encephalopathy in full-term infants, *Early Hum Dev*, 11, 21-26.

- MacLennan A. (1999), *A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statement*, BMJ.
- McGuire W. (2007), *Perinatal asphyxia*, Clin Evid, Online.
- Rothstein R.P. eta Levison S.W. (2005), Gray matter oligodendrocyte progenitors and neurons die caspase-3 mediated deaths subsequent to mild perinatal hypoxic/ischemic insults, *Dev Neurosci*, 27, 149-159.
- Sanches E.F., Arteni N.S., Nicola F., Boisserand L., Willborn S., Netto C.A. (2013), Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage, *Neuroscience*, 237, 208-215.
- Vannucci S.J. eta Hagberg H. (2004), Hypoxia-ischemia in the immature brain, *J Exp Biol*, 207, 3149-3154.
- Volpe J.J. (2001), Perinatal brain injury: from pathogenesis, to neuroprotection, *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 7, 56-64.
- Warner D.S., Sheng H., Batinic-Haberle I. (2004), Oxidants, antioxidants and the ischemic brain, *J Exp Biol*, 207, 3221-3231.

7. Eskerrak

Lan hau Eusko Jaurlaritzaren laguntzari (IT 773/13 eta BFI-2011-129) esker gauzatu da.

Lan hau beste lan batetik eratorria da, nire bukatu gabeko tesiaren parte baita.