



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Garun traumatismoen epe luzeko
eragina hipokanpoko CB1
hartzailean**

*Itziar Bonilla-Del Rio, Jon Egaña-Huguet,
Svein Achicallende, Edgar Soria-Gomez,
Almudena Ramos, Itziar Terradillos,
Amaia Mimenza, Maitane Serrano, Leire
Lekunberri, Ilazki Anaut-Lusar, Ianire
Buceta, Irantzu Rico-Barrio, Inmaculada
Gerrikagoitia, Katie Jay Neale,
Cristina Pinar, Juan Triviño-Paredes,
Patrick C Nahirney, Brian R Christie,
Nagore Puente, Izaskun Elezgarai eta
Pedro Grandes*

177-184 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.22>

ANTOLATZAILEA:



LAGUNTZAILEAK:



Garun traumatismoen epe luzeko eragina hipokanpoko CB₁ hartzailen

Bonilla-Del Río, I.^{1,2}, Egaña-Huguet, J.^{1,2}, Achicallende, S.^{1,2}, Soria-Gomez, E.^{1,2,3}, Ramos, A.^{1,2}, Terradillos, I.^{1,2}, Mimenza, A.^{1,2}, Serrano, M.^{1,2}, Lekunberri, L.^{1,2}, Anaut-Lusar, I.¹, Buceta, I.^{1,2}, Rico-Barrio, I.^{1,2}, Gerrikagoitia, I.^{1,2}, Neale, K.J.⁴, Pinar, C.⁴, Triviño-Paredes, J.⁴, Nahirney, P.C.⁴, Christie, B.R.⁴, Puente, N.^{1,2}, Elezgarai, I.^{1,2}, Grandes, P.^{1,2}

¹Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, ²Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, ³IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, ⁴Division of Medical Sciences, University of Victoria, Victoria, British Columbia, Canada

jon.egana@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun, garuneko traumatismo (GT) arinak osasun arazo garrantzitsua bilakatu dira duten intzidentzia altua dela eta. GT arinaren ezaugarri nabarmenetako bat asaldura kognitiboak dira. Garuneko lesio errepikakor arinak asaldura neurokognitibo larriagoekin lotu daitezke, nahiz eta egiturazko patologiarik ez egon. Halaber, GT arin baten ondoren, beste hainbat patologietan deskribatu den moduan, sistema endokannabinoidean aldaketak gertatzen direla frogatu da. Hortaz, ikerketa honen helburua GT arin batek ikaskuntzarekin eta oroimenarekin erlazionatutako garuneko hipokanpo eremuko CB₁ hartzailen banaketan eragin ditzakeen aldaketak zehaztea izan da.

Hitz gakoak: Garuneko traumatismoa; endokannabinoide-sistema; CB₁ hartzaila; mikroskopia elektronikoa

Abstract

Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) is a significant health issue due to its high prevalence in the youth. Cognitive impairments are some of the most prominent features and repeated mTBI (r-mTBI) can be associated with neurocognitive deficits even without overt structural damage. Changes in the endocannabinoid system have been shown to occur after mTBI. Thus, the aim of this investigation was to study the effect of r-mTBI (awake closed-head injury model) on CB₁ receptor distribution in the rat hippocampus, brain structure involved in learning and memory processing.

Key words: Traumatic brain injury; Endocannabinoid system; CB₁ receptor, Electron microscopy

1. Sarrera eta motibazioa

Garuneko traumatismoa (GT), kanpo indar mekaniko batek igorritako indarraren ondorioz entzefaloan eragiten den lesioari deritzo (Frieden et al., 2015). Gaur egun, traumatismo mota hau, mundu mailako kezka sanitario eta sozioekonomiko nagusietako bat da, 45 urte edo gutxiagoko pertsonen artean heriotza-kausa nagusietakoa izanik (Cole, 2004). Mundu osoan, 57 milioi pertsonak gaixotasun honen aurrekariak dituztela kontutan izanik, urtero 10 milioi ospitaleratze eta/edo heriotza dira GT-aren ondorio zuzenak (Langlois et al., 2006). Lesio hauen eragile nagusiak ibilgailu motordunen erorketak eta istripuak badira ere, kontaktu-kiroletan gertatutako kolpeek bere garrantzia dutela ikusi da (Frieden et al., 2015). Kolpe hauen ondorioz, kalte estruktural eta funtzional iraunkorrak eragiten dira garunean. Aldaketa horiek gizabanakoaren portaeran eragina izan dezakete, hala nola ikaskuntzan eta oroimenean, antsietatean edo/eta erabakiak hartzeko zailtasunean. GT-ak, lesio sarkor edo buruko lesio itxi moduan sailka daitezke. Sarkorrak direnean, garezurrean, duramaterrean eta garuneko parenkiman agertzen dira lesioak; aldiz, GT itxi batean, normalean, garezurrak eta garuneko beste egitura horiek bere horretan jarraitzen dute edo ez dute ageriko aldaketarik erakusten (Cassidy et al., 2004). Lesioaren larritasuna honako hauen arabera zehazten da: kontzientzia-maila (iraupena eta larritasuna, konortea galduz gero), oroimen-galerak eta asaldura neurologikoak. GT motarik ohikoena GT arina da, "konmozioa" ere esaten zaiona. Besteak beste, GT-aren sintoma klinikoak honako hauek izan daitezke: buruko mina, nahasmena, goragalea, oreka-arazoak, arreta-gabeziak, loaren asaldurak, ikasteko eta oroitzeko arazoak eta asaldura emozionalak

(Caine et al., 2014). Sintomak iraupen laburrekoak izan ohi dira, eta berez, egun edo aste batzuen buruan desagertu egiten dira. Hala ere, oraindik argitu gabe dauden arrazoiengatik, gizabanako batzuetan, GT-aren sintomak urtebete baino gehiago iraun dezakete (Hall et al., 2005a). GT bakar batek agerikoak ez diren, eta izaera iraunkorra izan dezaketen egiturazko edo funtzionaltasuneko defizitak eragin ditzake ere, eta gainera, garuna ondorengo lesioekiko kaltebera izatea, eta sentikortasun-leiho bat sortzea, non konmozio-gertaera arin ugari pilatzeak metatze-kalte larriagoa eta epe luzeko disfuntzio kognitiboa eragin dezaketen (Fehily eta Fitzgerald, 2017). GT arinak buruko lesio guztien % 80 dira (Frieden et al., 2015), horrela, lesio horiek oinarri hartuta, mundu osoan GT-en intzidentzia 100-300 pertsonakoa 100.000 biztanleko dela baieztatu daiteke (Cassidy et al., 2004). Hala ere, GT ez da oso ezaguna, pairatzen duten pertsona askok ez baitute arreta medikorik bilatzen.

Kanpo indarren energia mekanikoa garunera nola transferitzen den eta estimulu fisiko horiek ehun bizian eta sare neural/glialean dituzten ondorioak ulertzea funtsezkoa da garuneko konmozioek eragindako lesioak ulertzeko. Garezurrak eta likido zefalorrakideoak ematen duten babesaren arabera, buruko lesioek, garezurraren haustura gabekoek ere, burmuin-ehuna kaltetu dezakete azelerazio- eta desazelerazio-indarren ondorioz, izan ere, ezaugarri fisikoak direla eta, burmuin-ehunak portaera ez-lineala erakusten du aplikatutako indarrei erantzunez (Prange-Kiel et al., 2003), hau da, indar ezberdinen aurrean burmuinak ez du era proportzionalen erantzuten. Erresonantzia magnetikoko irudiak erabiltzen dituzten azterketa klinikoei jakinarazi dutenez, GT moderatu edo larri baten ondoren kaltetutako garun egituren artean, hipokanpoa da sentikorrena (Serra-Grabulosa et al., 2005).

GT-aren indar biomekanikoei garezur barruan presio-gradienteak sortzen dituzte, neuronak, glia zelulak eta garuneko odol-hodiak kaltetzen dituztenak (Blennow et al., 2012). Beraz, GT-an gertatzen diren indar mekanikoei eragindako axoi-zuntzen kalteek, transmisio sinaptikoaren asalduak eta zirkuitu neuronalaren disfuntzioa eragin ditzakete. Gainera, odol-hodiak indar hauen aurrean sentiberak diren egiturak dira, izan ere, oso ohikoak izaten dira axoi lesio hauekin batera mikro odol-ateratzeak (Pittella eta Gusmão, 2003). Hainbat kapilarren hausturari, petekia hemorragia fenomeno deritzen, eta hauek, larritasun desberdineko GT pazienteetan behatzen direla deskribatu da (Mckee eta Daneshvar, 2015). Odol-fluxuaren etenaldi horiek, gertaera hipoxikoak sortarazten dituzte eta traumatismoaren osteko berehalako disfuntzioak eragin ditzakete. Gainera, GT baten ondoren, garuneko odol-hodietako erreaktibotasuna (garunak odol-fluxua oinarri-lerrotik gora eramateko duen ahalmena) galzorian jar lezake (Adams et al., 2018). Horren arabera, burmuinak jarduera neuronalak eragindako eskaera metabolikoa modulatzeko duen gaitasuna eta burmuinaren funtzionamendu normala kaltetuta egon daitezkeela ondorioztatu da. Horrek, besteak beste, disfuntzio mitokondrialak eragiten du, eta ATP-aren ekoizpena murriztea dakar, ondorioz, egoera energetikoa okertu egiten delarik (Vagnozzi et al., 2007). Uste denez, hasierako lesioen ondorengo gertaera horiek guztiak, ondorengo defizit akutuen kausa dira (Barkhoudarian et al., 2016) eta, epe luzera, alerazio iraunkorrak eragin ditzakete inguruko zeluletan eta burmuineko gainerako sistemetan, hala nola, sistema endokannabinoidean (eKBS).

eKBS kannabinoide-hartzaileek eta horiekin elkar eragiten duten molekulek osatzen dute. Horien artean, ezagunena, 1. motako hartzaile kannabinoidea (CB_1) da, eta berari eragiten dioten ligando endogenoak, endokannabinoideak (eKBak), 2-arakidonoil glizerola (2AG) eta N-arakidonoiletanolamida (AEA) dira. Horrez gain, sistemaren barne eKBak sintetizatzeko eta degradatzeko entzimak dauzkagu (Howlet et al., 1990). CB_1 hartzaileak hainbat zelula motetan aurki daitezke, astrozitoetan, neuronetan edota mikroglian adibidez, eta zelula barneko konpartimentuetan ere kokatzen dira, hala nola, mitokondrietan. Azken urteetan egin diren hainbat teknika histologiko funtsezkoak izan dira CB_1 hartzailearen zelula-mailako adierazpena eta kokapena definitzeko. Hala ere, zelula horietan duten adierazpen maila txikia dela eta, oso zaila da CB_1 hartzaileen banaketa azpi zelularra zelula mota batzuetan (adibidez, astrozitoetan) identifikatzea. Garunean, eKBS transmisio sinaptikoaren eta plastikotasunaren funtsezko modulatzailerak da eta hainbat prozesu fisiopatologikoetan parte hartzen eta erregulatzen dituela jakina da (Araque et al., 2017). Horregatik, GT bezalako egoera patologikoetan CB_1 hartzailearen adierazpena eta banaketa azpi zelularra ezagutzea funtsezko gaia da.

2. Ikerketaren Helburuak

Arestian aipatu bezala, GT eta garuneko konmozioak (edo GT arina) mundu mailako kezka soziosanitario nagusietako bat dira. Gazteen populazioan GT arin errepikakorrek, kontaktu kiroletan edota auto istripuetan gertatzen direnak adibidez, neuropatologiak eta ikaskuntza- eta oroimen-gabeziak eragin ditzakete helduaroan. Hala ere, gabezia horien irismena erakusten duten datu aurre kliniko gutxi daude. Honez gain, aurretiaz ikusi da antzeko gabeziak eragiten dituzten beste patologietan eKBS-an aldaketak gertatzen direla, nerabazaroko alkohol kontsumoan eragindako oroimen-asaldurak kasu (Peñasco et al., 2020).

Hori guztia kontutan izanik, ikerketa lan honetan arratoi gazteen GT arinaren ereduan CB₁ hartzailaren kokapenak pairatutako aldaketak aztertu dira, traumatismoa jasan eta 40 egunetara. Azterketa hori hipokanpoko bihurtune horzduneko geruza molekularreko (BHGM) neurona, astrozito eta konpartimentu azpi zelularretan egin da. Hartzaila honen adierazpena bukaera sinaptikoetan nagusi bada ere, azken urteetan deskribatu denez, aipatu bezala CB₁ hartzailak astrozito eta mitokondrietan ere adierazten dira, non ezinbesteko funtzioak betetzen dituzten, besteak beste, transmisio sinaptikoan (Jimenez-Blasco et al., 2020). Azterketa honen bidez, garun konmozio arinak, epe luzera, eragiten dituen asaldura kognitiboen bilakaeran parte har dezaketen mekanismoen ezagutzan sakondu nahi da.

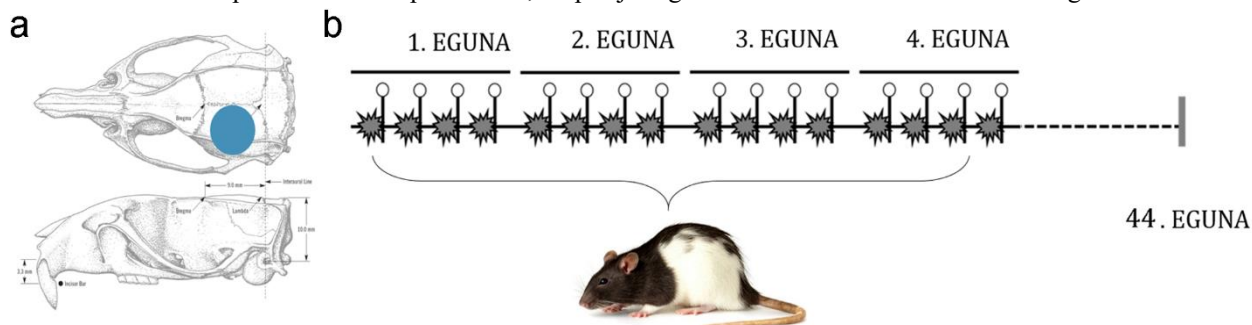
3. Ikerketaren muina

Garun traumatismo (GT) arinaren eredua:

Dagoeneko ezarria dagoen “Esna eginiko garun-lesio itxia” metodoa erabili zen “Awake closed head injury” ingelesez (ACHI) (Meconi et al., 2018; Pinar et al., 2019) GT eredu gisa. Eredu hori arratoi gazteetan buruko lesio arin bat sortzeko bereziki diseinatu zen eta hainbat kiroletan (boxeoan, errugbian, hockey-ean) gertatzen diren GT arin errepikakorren eredu gisa erabiltzen da.

Charles River laborategitik (St. Constant, Kanada) eratorritako Long-Evans arratoi gazteak (3-4 aste) erabili ziren. Hauek 2-3 animaliaiko taldeetan kaiolatu ziren, sexuaren arabera, eta 22 °C-tan mantentzen zen gela baten sartu ziren 12h:12h-ko argi eta iluntasun ziklotan, argiak goizeko 9-etan pizten zirelarik. Janaria eta ura *ad libitum* izan zuten une oro. Lesioa eragiteko, lehenik eta behin arratoiak immobilizatzen dira. Horretarako, aireztapen egokia ahalbidetzeko sudur zuloentzako irekidura bat duen plastikozko atxikitze-kono bigun bat erabili da (DC-200 eredua, Braintree Materials and methods 48 Scientific, Braintree, MA). Arratoiak ondo immobilizatuta daudenean, buruan 3D inprimatzaile baten bidez sortutako kasko bat jartzen zaie. Kono barruan, jarrera egokian kokatzeko eta burua behar zen tokian mantentzeko, gomazko banda elastiko bat eta bi aurpegiko zinta itsasgarri erabiltzen da, mugimendua ahalik eta gehien murrizteko. Jarraian, animaliak apar-sintetiko plataforma bigun batean jartzen dira (7.6 cm lodierako poliuretanozko xafla, McMaster-Carr, OH) eta lesio-aparatuaren azpialdean kokatzen dira. Kaskoaren goialdean kokaturiko disko biribil lau batek, talka, ezkerreko pareta kortexera desbideratzen du.

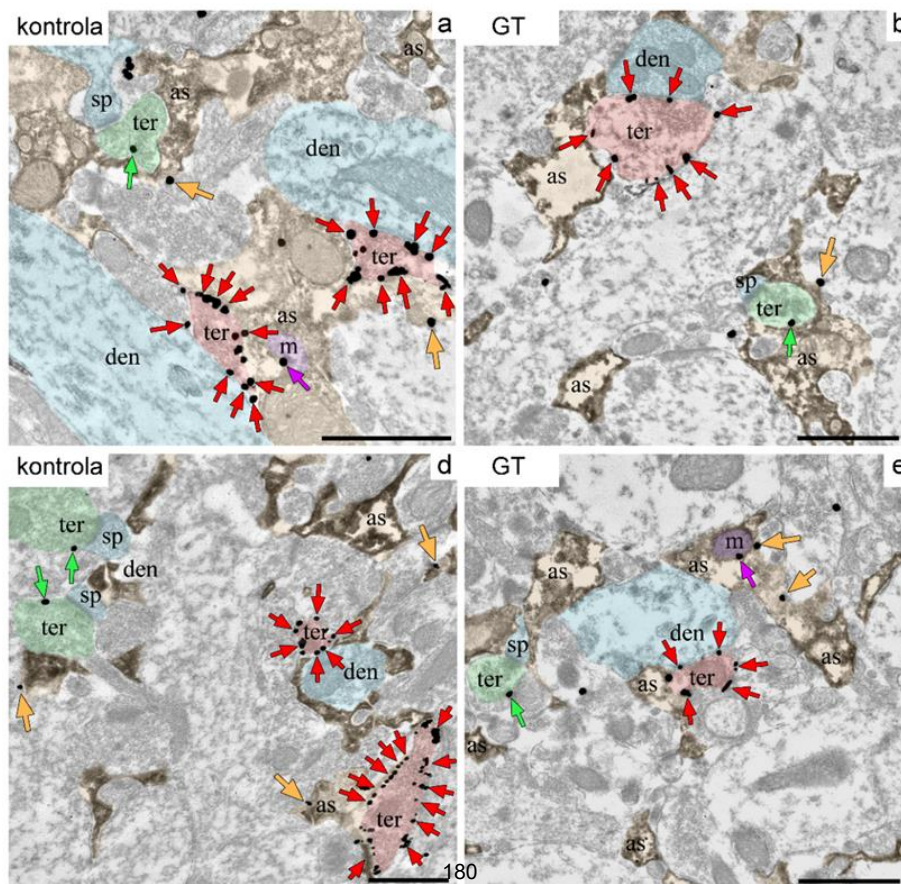
1. irudia: “Esna eginiko garun-lesio itxia” eragiteko eredua. (a) Inpaktuaren tokia ezkerreko pareta kortexaren eremura mugatzen da. Arratoiaren garezurreko diagrama (Paxinos eta Watson, 2005). (b) Jaio eta 25. egunetik aurrera, arratoiak 4 inpaktu jaso zituzten egunean, 4 egunez eta 40 eguneko biziraupena utzi zitzaizen. Kontrol animalietan prozedura bera aplikatu zen, kolpea jaso gabe. Aurretik erabilitako metodo frogatua da



Lesioa eragiteko, animalia estereotaxi-marko batean kokatzen da “kontrolatutako kortez inpaktua” eragiteko erabiltzen den eraldatutako gailuaren azpian (Impact One, Leica Biosystems Inc., ON, Kanada). Talkarako punta ere eraldatzen da, 7 mm-ko diametroa duen goma zapal bat gehituta. Jarraian talka-punta kaskoarekin bertikalki lerrokatzen da, kolpea aukeratutako eremura bideratzeko. Lesioa eragiteko parametroak ondorengoak dira: 6 m/s-ko abiadura, 10 mm-ko sakonera eta 0.1 s-ko latentzia. Behin arratoiak gelditu dagoelarik, eta kaskoa eta talka-punta zuzen lerrokatuta daudenean, kolpea kontrol-kaxaren bidez eragiten da. Bukatzeko animaliak immobilizazio poltsatik atera eta 40 egunez bizirik mantentzen dira.

Arratoiak ausaz esleitu ziren bi multzoetako bati: lesiorik gabekoa (kontrola) edo lesioekin (kolpatua). Esperimentu guztietan bi sexuak sartu ziren. Jaio eta 25. eta 28. egunen artean, hauek barne, lesionatutako taldeko animaliek 4 inpaktu jaso zituzten egunean (4 egunez, 16 guztira). Kontrol arratoiak lesionatutako animalien prozedura bera jarraitu zuten, immobilizazio-poltsan eta lesio-plataforman jarritz, kaskoa jarritz eta pistoiaren soinua entzunez, baina kolpea jaso gabe. Animaliak lesioa jaso eta 40. egunean anestesiapeko bihotzean zeharreko perfusioari ekin zitzaion eta nerbio ehuna mikroskopio elektronikorako prestatu zen. Brian R. Christie doktorearen eta Patrick Nahirney doktorearen laborategiak (Medikuntza Zientzien Dibisioa, Victoriako Unibertsitatea, Victoria, BC, Kanada) burutu zuten GT arinak eragiteko protokolo hau eta baita perfusioa ere. Arratoi hauen garunak immunohistokimikarako prestatu ziren eta hauetan erretxinan murgildu-aurreko urte eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua aplikatu zen. Honen bidez, CB₁ hartzailearen topografia eta adierazpena, mikroskopio elektronikoan behatu eta aztertu zen. Hartzailea, bai arratoi-kontrolatan (2a eta 2d irudiak) zein kolpatutako arratoiengan, hots, GT-a pairatutako arratoiengan (2b eta 2e irudiak) aurkitu zen garuneko zelula eta konpartimentu azpi-zelular garrantzitsuenetan.

2. irudia: Erretxinan murgildu-aurreko urte eta peroxidasa metodo konbinatua mikroskopio elektronikorako. Bihurgune horzduneko geruza molekularreko argazkiak. (a, d) Egoera kontrolean, CB₁ hartzailearen markaketa bukaera sinaptiko kitzikatzailetan (ter, gezi berdeak) zein inhibitzaileetan (ter, gezi gorriak), astrozitoetan (as, gezi laranja) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) behatu daiteke. (b, d) Garun traumatismoan, CB₁ hartzaileak astrozitoetan (as, gezi laranja) eta mitokondrietan (m, gezi moreak) daude, baina ez dira hain ugariak bukaera sinaptiko kitzikatzailetan (ter, gezi berdeak) eta inhibitzaileetan. Eskala barrak: 1 µm.



Emaizak:

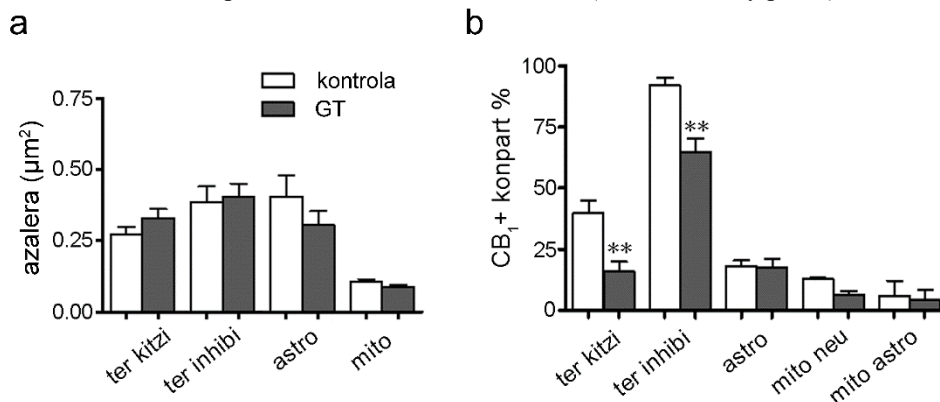
“Esna eginiko garun-lesio itxia” GT ereduaren egitura aldaketak astrozito, neurona eta mitokondrien morfologian aztertzeaz gain, konpartimentu horietan CB₁ hartzailearen banaketa ere aztertu zen, lesioa izan eta 40 egunetara. Zehazki, ultra-egitura mailan, buruan jasotako kolpeek eragin ditzaketen moldaketa morfologikoak argitzeko, aipatutako konpartimentu zelularrek betetako azalera neurtu zen eta CB₁ hartzailearen adierazpenarekin erlazionatuta, hainbat konpartimentutan, hartzaile honekiko positiboak ziren bukaera sinaptikoen ehunekoa eta hauen dentsitatea aztertu ziren. Mitokondriei dagokienez, kanpo mintzean CB₁ hartzailea erakusten zuten ehunekoa zenbatu zen. Gainera, CB₁ hartzaile astrozitikoaren urre partikulen eta sinapsi hurbilenaren arteko distantzia ere aztertu zen. Horiek guztiak FIJI sofwerre baliatuz eskuz zenbatu ziren.

Lehenik eta behin, aipatu beharra dago, bukaera sinaptiko kitzikatzailen, inhibitzaileen, prozesu astrozitikoaren eta mitokondrien tamaina ez zela nabarmen aldatu garun traumatismo arinen ondorioz. Horrela, konpartimentu hauetarako ondorengo azalerak neurtu ziren argazkiko (azalera osoa argazkiko 290 μm^2): bukaera sinaptiko kitzikatzailak, arratoi kontrolatan: $0.27 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ betetzen zuten eta kolpatutakoetan berriz: $0.33 \pm 0.03 \mu\text{m}^2$. Bukaera sinaptiko inhibitzaileei dagokionez, kontrol arratoiaren: $0.38 \pm 0.05 \mu\text{m}^2$ betetzen zuten eta kolpatutakoetan: $0.40 \pm 0.04 \mu\text{m}^2$. Prozesu astrozitikoari dagokionez, kontrol arratoiaren: $0.40 \pm 0.07 \mu\text{m}^2$ betetzen zuten eta kolpatutakoetan: $0.30 \pm 0.05 \mu\text{m}^2$. Azkenik mitokondriak, kontrol arratoiaren: $0.10 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ betetzen zuten eta kolpatutakoetan: $0.08 \pm 0.01 \mu\text{m}^2$ ($p > 0.05$) (3a irudia).

CB₁ hartzailearen banaketaren azterketak berriz, hartzailearekin markatutako bukaera sinaptiko kitzikatzailen (Kontrolak: % 39.80 ± 5.05 ; Kolpatutakoak: % 15.97 ± 3.93) zein inhibitzaileen proportzioak (Kontrolak: % 91.94 ± 3.40 ; Kolpatutakoak: % 64.56 ± 5.79) (** $p < 0.01$) nabarmen murriztu zirela agerian utzi zuen 16 kolpe jaso zuten animalietan. Hala ere, CB₁ hartzaileako positibo diren bai prozesu astrozitikoaren zein mitokondrien ehunekoak ez ziren nabarmen aldatu kolpeak jaso eta 40 egunetara. Horrela, prozesu astrozitikoaren ehunekoari dagokionez, kontrol arratoiaren % 18.13 ± 2.171 positiboa zen bitartean, kolpatutako arratoiaren % 17.44 ± 3.13 -koa zen ($p > 0.05$). Mitokondria CB₁ positiboari dagokionez, neuronetan eta astrozitoetan kokatutako mitokondrien artean bereiztu zen, eremu azpi zelular hauen artean ezberdintasunik zegoen edo ez argitzeko. Horrela bada, animalia kontrolatan, mitokondria neuronalen % 12.06 ± 0.43 CB₁ hartzaileako positibo ziren eta kolpatutakoaren artean % 6.44 ± 1.58 ($p > 0.05$). Astrozitoetan kokaturiko mitokondriei dagokionez, kontrol-arratoiaren % 6.00 ± 6.00 CB₁ hartzaileako positibo ziren bitartean, kolpatutako arratoiaren % 4.167 ± 4.167 ziren positibo ($p > 0.05$) (3b irudia).

3. irudia: 40 egunetara bihurtune horzduneko geruza molekularren burututako azterketa estatistikoa kolpatutako zein kolpatu gabeko kontrol arratoiaren. (a) Batz besteko konpartimentuen azalera (μm^2). (b) CB₁ positiboak diren konpartimentuen ehunekoa. Datuak batezbestekoa $\pm$ SEM adierazten dira. $p > 0.05$; ** $p < 0.01$.

Proba ez-parametrikoren bidez aztertu ziren (Mann-Whitney proba).

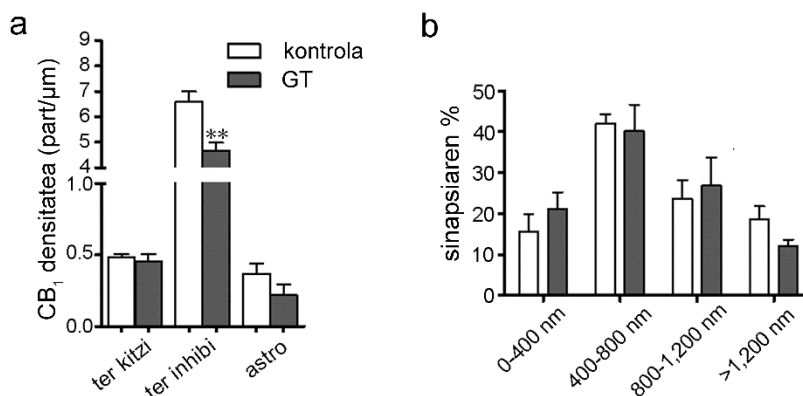


Gainera, CB₁ hartzailearen dentsitatean ere aldaketak behatu ziren. Dentsitateak, bukaera sinaptiko inhibitzaileetan nabarmen egin zuen behera kolpatutako animalietan, non kontrolak 6.58 ± 0.42 partikula/ μm agertzen zituzten euren mintzean eta kolpatutakoek berriz 4.66 ± 0.32 partikula/ μm (** $p < 0.01$).

0.01). Gainerako konpartimentu zelularretan ez zen aldaketa nabarmenik aurkitu. Horrela, bukaera sinaptiko kitzikatzaillean CB_1 hartzailearen dentsitatea kontrol-arratoietan 0.480 ± 0.027 partikula/ μm zen bitartean, kolpatutakoetan 0.455 ± 0.052 partikula/ μm izan zen ($p > 0.05$). Astrozitoetan CB_1 hartzaileen dentsitatea berriz kontrol-arratoietan 0.37 ± 0.068 partikula/ μm zen eta kolpatutakoetan 0.217 ± 0.073 partikula/ μm ($p > 0.05$) (4a irudia).

Horrez gain, CB_1 hartzaile astrozitikoen kokapenaren eta sinapsi hurbilenaren arteko distantzia ez zen nabarmen aldatu kolpeak jaso eta 40 egunetara. Horrela, kontrol arratoietan, aztertutako sinapsien ($n = 70$) % 15.60 ± 4.26 CB_1 hartzailetik 0-400 nm-ra zeuden; % 42.09 ± 2.23 CB_1 hartzailetik 400-800 nm-ra zeuden; % 23.72 ± 4.48 800-1.200 nm-ra; eta % 18.59 ± 3.21 1.200 nm baino gehiagoko distantziara zeuden. Kolpatutako arratoietan berriz, sinapsi guztien ($n = 70$) % 21.01 ± 4.20 hartzailetik 400 nm baino gutxiagora zeuden; % 40.18 ± 6.50 400-800 nm bitartean; % 26.81 ± 6.81 800-1.200 nm-ra; eta % 11.99 ± 1.65 1.200 nm-tik haratago kokaturik ageri ziren. Balio horien azterketa estatistikoak agerian utzi zuen ez zegoela alderik astrozitoetan CB_1 hartzailearen banaketan, kolpatu gabeko zein lesionatutako arratoien artean ($p > 0.05$) (4b irudia).

4. irudia: 40 egunetara bihurtune horzduneko geruza molekularren burututako azterketa estatistikoa kolpatutako zein kolpatu gabeko kontrol arratoietan. (a) CB_1 hartzaileen dentsitatea (partikulak/ μm). (b) CB_1 partikula astrozitikoetatik distantzia ezberdinetara dauden sinapsi hurbilenaren ehunekoa. Datuak batezbestekoa $\pm$ SEM adierazten dira. $p > 0.05$; ** $p < 0.01$. Proba ez-parametrikoren bidez aztertu ziren (Mann-Whitney proba).



4. Ondorioak

Emaitzen atalean xehetasunez deskribatzen den bezala, arratoi gazteengan, ezkerreko kortexean jasotako garun traumatismo arinek (16 kolpe), CB_1 hartzailearen adierazpenean aldaketak eragiten dituzte hipokanpo helduan. 40 egun igaro ondoren aldaketa esanguratsuak azaleratu ziren CB_1 hartzaileen banaketan, izan ere, CB_1 hartzaileekin markatutako bukaera sinaptiko kitzikatzaille zein inhibitzaileen proportzioa txikiagoa izan zen kolpeen ondorioz eta hartzailearen partikulen dentsitatea nabarmen murriztu zen bukaera sinaptiko inhibitzaileetan.

Aurretiaz, traumatismoak eragiteko beste eredu bat erabiliz, “pisu-jauste” moduan ezaguna, frogatu da kolpeak jaso eta 24 h-ra eta 72 h-ra, CB_1 hartzailearen ARNm-aren eta proteinaren adierazpena nabarmen murrizten direla garun traumatismo itxi baten ondoren, nahiz eta 2 aste geroago maila fisiologikoak berreskuratzen diren (López-Rodríguez et al., 2015). Halaber, CB_1 hartzaileen adierazpenean gertatzen diren aldaketa horiek, korrelazio negatiboa adierazi dute edema eraketarekin eta jokabide-asaldurekin (López-Rodríguez et al., 2015). Horrez gain, eredu horretan, inpaktuaren ondorengo lehen 5 minutuetan, kolpearen ondorioz gabezia funtzionalak eta hilkortasuna (% 5-15) eragin daitezkeela ikusi da, lesio mota horrek hainbat asaldura ezberdin eragin ditzakela berretsiz.

Garun traumatismoak aztertzeke eredu asko existitzen badira ere, gaur egun gehiago erabiltzen dira inpaktu mekaniko ez sarkorrak eragiten dituztenak. Ikerketa honetan erabilitako ereduaren antzera, kalte fokalak erabili ordez, indar lineal eta birakariak erabiltzen dituztenak (Shultz et al., 2017). Ohikoa bihurtzen ari da GT arin baten ondoren garezurreko hausturarik, barne hemorragiarik eta heriotza zelular esanguratsurik agertzen ez dituzten ereduak erabiltzea (Shultz et al., 2017; Meconi et al., 2018). Brian R.

Christie doktorearen laborategiak duela gutxi sartu du ACHI eredua GT arinen ikerketetarako eredu gisa, lan hau, eredu horretan egon daitezkeen ultra-egitura mailako aldaketak deskribatzen lehenetarikoa delarik. Ereduek indar lineal eta birakariak sortzen ditu, eta garun traumatismo arinak modu fidagarrian ekoizteko gaitasuna frogatu du (Meconi et al., 2018).

Emaizta hauek argi eta garbi erakusten dute CB₁ hartzaiak aldaketa nabarmenak pairatzen dituela GT arinak pairatu eta 40 egunetara, bai bukaera sinaptiko kitzikatzailerik zein inhibitzaileen ehunekoa nabarmen jaisten delako eta baita ere hartzai dentsitatea nabarmen jaisten delako bukaera inhibitzaileetan. Beste faktoreen artean, aldaketa horiek garun osoko mikro odoleztatzetik txikiak lotzen dira, eta ez hori bakarrik, berriki egindako ikerketetan mikrogliarekin duten lotura ere aztertzen hasia da, hain zuzen ere, sukar mekanismoek abiarazitako prozesuen partaidetza duten garrantzia zentratu dira (Triviño-Paredes JS, argitaratu gabeko behaketak). Ez da aztertu CB₁ hartzaiaren adierazpena mikroglian, baina baditugu zenbait ultra egitura mailako ebidentzia non CB₁ hartzaiak zelula horietan, baldintza normaletan, oso maila baxuetan adieraz daitezkeela erakusten dutenak. Horrela, prozesu mikrogliaren % 9 inguruk CB₁ hartzaiak adierazten dutela ikusi dugu.

Bihurgune horzduneko geruza molekularrean, CB₁ hartzaiaren epe luzeko aldaketak, plastikotasun sinaptikoaren aldaketen oinarria izan daitezkeela deskribatu da (Peñasco et al., 2019; Castillo et al., 2012). Hipokanpoan plastikotasun hori ikaskuntzaren eta oroimenaren oinarrian dagoela jakina da (Monday et al., 2018). Horrekin loturik, Brian R. Christie doktorearen laborategian aldeztu aurretik frogatu dute GT arin bakar batek epe luzeko plastikotasunaren indartzean (ingelesez log-term potentiation edo LTP moduan ezaguna) eragin esanguratsua duela hipokanpoko eremu horretan (White et al., 2017), eta horrez gain behatu dute, GT arin batek kalte egin diezaiokela epe luzeko depresioaren (ingelesez log-term depression edo LTD moduan ezaguna) indukzioari (900 pultsu @ 1 Hz), lesioa izan eta 7 egunetara (Pinar et al., 2020).

CB₁ hartzaiak BHGMko bukaera sinaptiko kitzikatzailerik murrizteak, eKB-ek bideratutako plastikotasun sinaptikoan aldaketak eragin ditzkeela iradokitzen du. Aurretiaz, eremu horretan nerabezaroan alkohol kontsumoak eragindako CB₁ hartzaiaren galerak, plastikotasunaren desagertzearekin lotura duela ere frogatu da (Peñasco et al., 2020). Ikerketa horretan, CB₁ hartzaiak eragindako transmisio kitzikatzailerik etena eta eKB-LTD plastikotasun sinaptikoa desagertu egiten dira nerabezaroan alkohol-betekaden ereduaren eta galera horiek helduaroan ezagutza-oroimenaren asaldurarekin lotura zutela deskribatu zen. Horrela, oraindik frogatu gabe badago ere, gure emaitzek GT arinen ostean behatutako CB₁ hartzaiaren aldaketek plastikotasun sinaptikoaren moldaketak eta asaldura kognitiboak eragin ditzaketela iradokitzen dute.

5. Etorkizunerako norabidea

Aipatu bezala, CB₁ hartzaiak GT arinen ostean pairatutako aldaketak deskribatu dira lan honetan. Etorkizunerako helburuetako bat aldaketa horiek arratoien portaeran zer nolako eragina duten deskribatzea da, bai oroimena, ikaskuntza eta antsietate-mailak ebaluatuz. Honez gain, zelula mikroglietan CB₁ hartzaiak pairatutako aldaketak aztertzea interesgarria dela deritzogu, egoera patologikoetan erakutsi duten partaidetza aktiboa kontutan izanik. Horrekin batera, kolpatutako arratoietan hantura erantzuna aztertuko da, implikaturiko molekula pro eta anti inflamatorien mailak aztertuz, epe luzera egon daitezkeen aldaketetan hauen partaidetza berresteko.

6. Erreferentziak

- Adams, C., Bazzigaluppi, P., Beckett, T. L., Bishay, J., Weisspapir, I., Dorr, A., ... eta Stefanovic, B. (2018), Neuroglial dysfunction in a model of repeated traumatic brain injury. *Theranostics* 8, 4824–4836.
- Araque, A., Castillo, P. E., Manzoni, O. J. eta Tonini, R. (2017), Synaptic functions of endocannabinoid signaling in health and disease. *Neuropharmacology*, 124, 13–24.
- Barkhoudarian, G., Hovda, D. A. eta Giza, C. C. (2016), The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury – an Update. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 27, 373–393.
- Blennow, K., Hardy, J. eta Zetterberg, H. (2012), The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron* 76, 886–899.

- Caine, D., Purcell, L. eta Maffulli, N. (2014), The child and adolescent athlete: a review of three potentially serious injuries. *Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, 6, 22.
- Cassidy, J. D., Carroll, L., Peloso, P., Borg, J., Von Holst, H., Holm, L., ... eta Coronado, V. (2004), Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *Journal of Rehabilitation Medicine*, 28–60.
- Castillo, P. E., Younts, T. J., Chávez, A. E. eta Hashimoto, Y. (2012), Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*, 76(1), 70–81.
- Christie, B. R., Triviño-Paredes, J., Pinar, C., Neale, K. J., Meconi, A., Reid, H. eta Hutton, C. P. (2019), A Rapid Neurological Assessment Protocol for Repeated Mild Traumatic Brain Injury in Awake Rats. *Current protocols in neuroscience*, 89(1).
- Cole, T. B. (2004), Global Road Safety Crisis Remedy Sought. *Journal of the American Medical Association*, 291, 2531.
- Fehily, B. eta Fitzgerald, M. (2017), Repeated mild traumatic brain injury: potential mechanisms of damage. *Cell transplantation*, 26(7), 1131–1155.
- Frieden, R. T., Houry, D. eta Baldwin, G. (2015), The Report to Congress on Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation is a publication of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), in collaboration with the National Institutes of Health (NIH). Atlanta, GA: CDC.
- Hall, R. C. W., Hall, R. C. W. eta Chapman, M. J. (2005a), Definition, Diagnosis, and Forensic Implications of Postconcussional Syndrome. *Psychosomatics*, 46, 195–202.
- Howlett, A. C., Bidaut-Russell, M., Devane, W. A., Melvin, L. S., Johnson, M. R. eta Herkenham, M. (1990), The cannabinoid receptor: biochemical, anatomical and behavioral characterization. *Trends in neurosciences*, 13(10), 420–423.
- Jimenez-Blasco, D., Busquets-Garcia, A., Hebert-Chatelain, E., Serrat, R., Vicente-Gutierrez, C., ... eta Marsicano G (2020). Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. *Nature* 583, 603–608.
- Langlois, J. A., Rutland-Brown, W. eta Wald, M. M. (2006), The Epidemiology and Impact of Traumatic Brain Injury A Brief Overview. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 21, 375–378.
- López-Rodríguez, A. B., Acáz-Fonseca, E., Viveros, M. P. eta García-Segura, L. M. (2015), Changes in cannabinoid receptors, aquaporin 4 and vimentin expression after traumatic brain injury in adolescent male mice. Association with edema and neurological deficit. *PLoS one*, 10(6), e0128782.
- McKee, A. C. eta Daneshvar, D. H. (2015), “The neuropathology of traumatic brain injury,” in *Handbook of clinical neurology*, 45–66.
- Meconi, A., Wortman, R. C., Wright, D. K., Neale, K. J., Clarkson, M., Shultz, S. R. eta Christie, B. R. (2018), Repeated mild traumatic brain injury can cause acute neurologic impairment without overt structural damage in juvenile rats. *PLoS One* 13, e0197187.
- Monday, H. R., Younts, T. J. eta Castillo, P. E. (2018), Long-term plasticity of neurotransmitter release: emerging mechanisms and contributions to brain function and disease. *Annual review of neuroscience*, 41, 299–322.
- Paxinos, G. eta Watson, C. (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th ed., Academic Press. New York.
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., ... eta Grandes, P. (2019), Endocannabinoid long-term depression revealed at medial perforant path excitatory synapses in the dentate gyrus. *Neuropharmacology*, 153, 32–40.
- Peñasco, S., Rico-Barrio, I., Puente, N., Fontaine, C. J., Ramos, A., Reguero, L., ... eta Grandes, P. (2020), Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 45(2), 309–318.
- Pinar, C., Triviño-Paredes, J., Perreault, S. T., eta Christie, B. R. (2020), Hippocampal cognitive impairment in juvenile rats after repeated mild traumatic brain injury. *Behavioural brain research*, 387, 112585.
- Pittella, J. E. eta Gusmao, S. N. (2003), Diffuse vascular injury in fatal road traffic accident victims: its relationship to diffuse axonal injury. *Journal of forensic sciences*, 48(3), 626–630.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H. eta Rune, G. M. (2003), Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus*, 13, 226–234.
- Serra-Grabulosa, J. M., Junque, C., Verger, K., Salgado-Pineda, P., Maneru, C., eta Mercader, J. M. (2005), Cerebral correlates of declarative memory dysfunctions in early traumatic brain injury. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 76(1), 129–131.
- Shultz, S. R., McDonald, S. J., Haar, C. V., Meconi, A., Vink, R., van Donkelaar, P., ... eta Christie, B. R. (2017), The potential for animal models to provide insight into mild traumatic brain injury: translational challenges and strategies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 76, 396–414.
- Vagnozzi, R., Tavazzi, B., Signoretti, S., Amorini, A. M., Belli, A., Cimatti, M., ... eta Lazzarino, G. (2007), Temporal window of metabolic brain vulnerability to concussions. *Neurosurgery*, 61, 379–389.
- White, E. R., Pinar, C., Bostrom, C. A., Meconi, A. eta Christie, B. R. (2017), Mild traumatic brain injury produces long-lasting deficits in synaptic plasticity in the female juvenile hippocampus. *Journal of neurotrauma*, 34(5), 1111–1123.

7. Eskerrak eta aipamenak:

Lan honek hainbat erakunderen diru laguntza izan du: Eusko Jaurlaritza (IT1230-19); Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) eta 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); JEH doktorearen kontratua (PIC 280/20), eta IBDR doktorearena (BES-2016-076766); ESG doktoreak Ikerbasque eta MINECO funtsa (MICIU/AEI/FEDER-EU; PGC2018-093990-A-I00); 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) eta AM-ren Eusko Jaurlaritzako doktoratu aurreko ikertzaile kontratua.