

2-arakidonoilglizerolaren efektua nitxo neurogenikoetan jaiotza inguruko asfixiaren ostean

The effect of 2-arachidonoylglycerol in neurogenic niches after perinatal asphyxia

Gorane Beldarrain¹, Malein Pacho¹, Antonia Ángeles Álvarez¹, Marc Chillida¹, Jon Ander Alart¹, María Moro¹, Miren Josune Canduela², Enrique Hilario¹ eta Daniel Alonso-Alconada¹

¹Zelulen Biologia eta Histologia Saila (UPV/EHU)

²Neurozientziak Saila (UPV/EHU)

gbeldarrain002@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoak (EHI), sarritan hipoxia-iskemiak (HI) eraginda, jaioberriengan kalte neurologikoa eragin dezake, bai eta heriotza ere. Hlax energia-gutxiegitasuna, erreazio kaltegarrien ur-jauzi metaboliko bat eta zelulen heriotza masiboa eragiten ditu, besteak beste. Hortaz, azken urteetan, zelulen galera hori konpentsatzeko mekanismoak bai eta zelulen heriotza murriztu dezaketen mekanismoak ere asko ikertu dira, hala nola lan honetan aztertutako 2-arakidonoilglizerola (2-AG). Ikerketen arabera, endokannabinoiden hantura, estres oxidatiboak eragindako kaltea eta glutamatoak eragindako eszitotoxikotasuna murriztu dezakete. Hori dela eta, gure lanean efektu horiek ikertu ziren egun ezagutzen diren bi nitxo neurogenikoetan: albo-bentrikuluetako bentrikulu azpiko gunean (*Subventricular zone* edo SVZ) eta hipokanpoko bihurgune horzduneko pikordun geruza azpiko gunean (*Subgranular zone* edo SGZ). Dirudenez, zelulen proliferazioa bultzatuz, Hlax eragindako kaltea konpentsa liteke. Horretarako, nitxo zelularitatea eta azalera neurtu genituen Hlax pairatu eta gero eta 2-AGaren tratamendua jaso eta gero. Emaitzek erakutsi zuten kaltetutako animalietan hemisferio ipsilateraletako azalera aldatzen zela, SGZan murriztuz eta SVZan emendatuz. Gainera, Hlax zelularitatea murriztu zuen SGZan, baina ez SVZan. 2-AGak, hala ere, morfologia eta zelularitatearen berrestea lortu zuen SGZan.

Gako-hitzak: 2-AG, nitxo neurogenikoak, bentrikulu azpiko gunea, pikordun geruza azpiko gunea.

Abstract

Hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), often caused by hypoxia-ischemia (HI), can lead to neurological damage in newborns, and often even to death. HI causes energy shortage, a waterfall of biochemical reactions and massive cell death, among others. Therefore, in recent years, the aim has been to develop mechanisms that compensate for that loss of cells, as well as mechanisms that promote lower cell death, such as 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Several research has shown that endocannabinoids can reduce neuro-inflammation, minimize damage from oxidative stress and reduce glutamate-related excitotoxicity. Hence, we examined those effects on the two neurogenic niches known so far: the subventricular zone (SVZ) of the lateral brain ventricles and the subgranular zone of the dentate gyrus (SGZ). It is believed that by promoting cell proliferation, the damage caused by hypoxia-ischemia could be compensated, so the cellularity and area of these niches were measured after hypoxia-ischemia and after the application of 2-AG. The results showed that the area of the ipsilateral hemispheres changed in the affected animals, decreasing in SGZ and increasing in SVZ. In

Gorane Beldarrain, Malein Pacho *et al.*

addition, HI reduced cellularity in SGZ, but not in SVZ. However, 2-AG helped to restore morphology and cellularity in SGZ.

Keywords: 2-AG, neurogenic niches, subventricular zone, subgranular zone.

Bidalia : 22/02/25

Onartua : 22/05/30

<http://doi.org/10.26876/Osagaiz.1.2022.436>

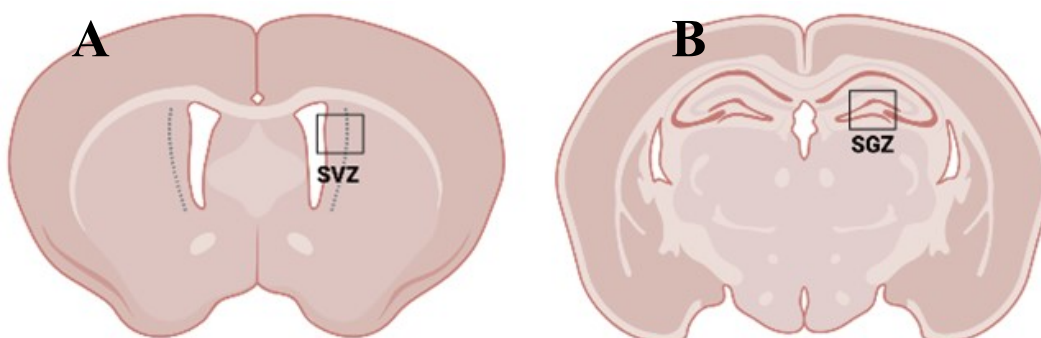
1. Sarrera eta helburuak

Klinikan, jaioberriaren entzefalopatia deritzo jaioberriaren lehen egunetan ager daitekeen eta kalte neurologikoa eragiten duen sindromeari. Zehazki, arnasa hartu eta mantentzeko zailtasunek, erreflexuen murrizketak, kontzientzia-maila baxuak eta, askotan, konbultsioek bereizten dute sindrome hori (1, 2). Askotan, jaioberriaren entzefalopatia ehunen oxigeno eskasiak eragiten du eta, aldi berean, asfixia hori lotuta egon ohi da ehunen perfusioaren murrizketarekin, hau da, iskemiarekin. Horrela, entzefalopatia hipoxiko-iskemiko (EHI) deritzon sindromea garatzen da (2).

Entzefalopatia hipoxiko-iskemikoa (EHI), oro har, 1.000 jaiotzatik 1-3tan gertatzen da, nahiz eta herrialde azpigaratuetan intzidentzia 10-20/1.000 izatera hel daitekeen. Pairatzen dutenen % 15-20 hil egiten da eta gainerakoen % 25ak behin betiko ondorio neurofisiologiko larriak izaten ditu, hala nola adimen-atzeratasuna, epilepsia, hiperaktibitatea edo garun-paralisia (3, 4).

Hila bezalako gertakarietan, zelulen heriotza masiboak eragiten dituztenetan, gakoak dira zelula berriak sortzeko gaitasuna mantentzen duten guneak. Momentura arte, bi nitxo neurogeniko identifikatu dira, jaiotza ostean mantentzen direnak: albo-bentrikuluen bentrikulu azpiko gunea (*Subventricular zone* edo SVZ) eta hipokanpoko bihurgune horzdunaren pikordun geruza azpiko gunea (*Subgranular zone* edo SGZ) (5, 6) (1. irudia).

1 irudia. Nitxo neurogenikoak.



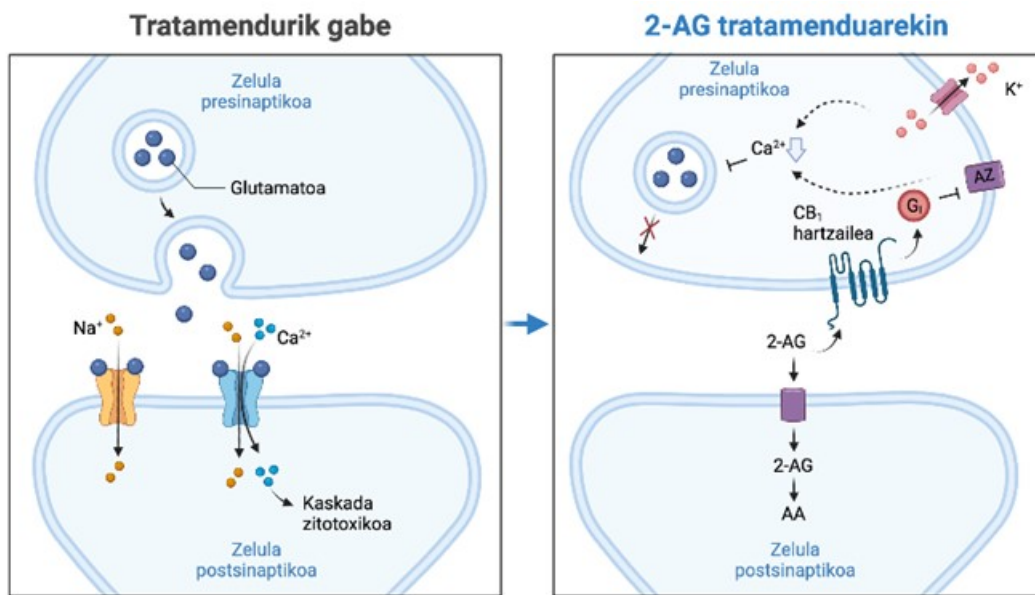
Jaiotza ostean bi nitxo neurogeniko mantentzen dira: albo-bentrikuluen bentrikulu azpiko gunea (*Subventricular zone* edo SVZ) (A) eta hipokanpoko bihurgune horzdunaren pikordun geruza azpiko gunea (*Subgranular zone* edo SGZ) (B).

Egun, hipotermia da klinikan EHIaren efektuak arintzeko erabiltzen den estrategia neurobabesle bakarra. Hila gertatu eta 6 ordura, kaltetutako metabolismoaren berreskurapen iragankorra gertatzen dela ikusi da, fase latente deritzona, alegia (7). Azken ikerketek erakutsi dute fase hori leiho terapeutiko bezala erabil daitekeela; izan ere, jaioberriaren lehen 6 orduetan hasi eta 72

orduz gorputz-tenperatura 3-4 °C jaitsiz, hilkortasuna eta HIaren ondoriozko desgaitasunak murrizten direla ikusi da, hala nola garun-paralisia edo defizit kognitiboa (8, 9).

Hipotermiaz gain, beste hainbat estrategia terapeutiko ere ikertzen ari dira, hala nola endokanabinoideak. Endokanabinoide-sistema (eCBS) nerbio-sistema zentralean (NSZ) zehar banatuta dagoen sistema neuromodulatzaile konplexua da, zeina mugimenduen koordinazioarekin, gorputz-tenperaturarekin, jateko gogoarekin, memoriarekin, ikasketarekin eta minarekin lotuta dagoen, besteak beste, eta hartzaile espezifikoek, ligando endogenoek eta horien sintesi- eta degradazio-mekanismoek osatzen duten (10, 11). 2-arakidonoilglicerola (2-AGa) cCBSaren parte den endokanabinoide bat da, neurogenesiarene erregulazioan parte hartzen duena eta neurotransmisore bezala jokatzen duena. Ohiko neurotransmisoreak ez bezala, 2-AGa ez da besikula presinaptikoetan metatzen, aldiz, beharrezkoa denean soilik sintetizatzen eta askatzen da. Neurona post-sinaptikoan Ca^{2+} ioiaren sarrera masiboa gertatzen denean, hau da, despolarizazioa gertatzen denean, 2-AGa sintetizatzen da kaltzio horren menpekoak diren entzimen bidez eta haren eragina neurona presinaptikoak pairatzen du (12, 13). Neurona presinaptikoan kokatzen diren hartzaileek, CB₁ motakoak direnak, G proteina baten bitartez, adenilato ziklasa entzima inhibitzen dute eta, hortaz, K⁺ kanalak zabaltzen eta Ca^{2+} intrazelularrera jaisten dira. Horren ondorioz, ez da glutamatoa askatzen ez eta eszitotoxikotasuna gertatzen ere (13, 14) (2. irudia).

2. irudia. 2-AGaren efektua zeluletan.



Tratamendurik ez dagoenean, EHia pairatzen denean, glutamatoaren askapena etengabe gertatzen da. Askapen horrek zeluletan sartzen diren ioien desoreka eragiten du eta Ca^{2+} intrazelularra emendatzen denez, heriotza zelularra eragingo duen kaskada zitotoxikoa gertatzen da. Aldiz, 2-AG bidezko tratamendua jasotzean, mintzeko CB₁ hartzaileak 2-AGarekin elkartu egiten dira, eta 2. mezularia den G proteina batek (G_i) adenilato ziklasa (AZ) inhibitzea eta K⁺ kanalak zabaltzea eragiten du. Ondorioz, Ca^{2+} ioiaren kontzentrazio intrazelularra murriztu egiten da eta ez da glutamatoaren askapena eta, hortaz, kaskada zitotoxikoa gertatzen. 2-AGa CB₁ hartzaileetatik askatzen denean, zelulen mintzetako hartzaileek barneratu egiten dute eta, behin zelula barnean, FAAH edo monoazilglicerol lipasa entzimek degradatu eta azido arakidoniko (AA) ematen dute, geroago mintzean txerta daitekeena.

Gorane Beldarrain, Malein Pacho *et al.*

Hipotermia bidezko tratamenduak dituen mugak ezagututa, lan honen helburua da tratamendu alternatiboen eraginkortasuna aztertzea. Gure hipotesiaren arabera, 2-AGa hipoxia-iskemia izan eta gero aplikatuz gero, nitxo neurogenikoetan gertatutako kaltea murriztu dezake bai zelularitatea emendatuz, bai nitxoaren azalera mantenduz bai eta neurogenesia bultzatuz ere. Izan ere, aurretik egindako lanetan ikusi da 2-AGak ehunen egoera hobetzen duela H1a gertatu eta 7 egun ondoren (15).

2. Material eta metodoak

2.1. Animaliak eta prozesu kirurgikoa

Ikerketa honetan 7 eguneko Wistar arratoi kumeak (Harlan Laboratories, Italia) erabili ziren. Kumaldiak 10 kumetara normalizatu ziren arratoiaren arteko garun eta gorputzen tamainadesberdintasunak murrizteko asmoz. Animalia horiekin egin ziren esperimentazio-prozedura guztiek Euskal Herriko Unibertsitateko Animalien Ongizaterako Batzordearen baimena jaso zuten. Horrez gain, prozedurek Osasun Institutu Nazionalak laborategiko animaliak zaintzeko eta erabiltzeko zehaztutako jarraibideak eta Europako Erkidegoen Zuzentaraua ere bete zituzten (86/609/EEE).

Kalte hipoxiko-iskemikoaren indukzioa Rice-Vanucci modeloaren moldapena izan zen (16). Jaio eta 7 egunera (P7), arratoiari anestesia induzitu zitzaion (% 4 isofluranoa induziorako eta % 1 mantentzeko) eta ezkerreko karotidan korapilo bikoitza egin eta kauterizatu egin zen. EHI eredu honetan, kalte hipoxiko-iskemikoa ezkerreko karotidan korapiloa eta kauterizazioa eginez lortu zen, hortaz, ezker hemisferioa hemisferio ipsilateralra izan zen lan honetan eta eskuinekoa, aldiz, kontralateralra.

Jarraian, animaliak espontaneoki suspertzen utzi ziren ordubetez. Ondoren, hipoxia induzitzeko prozesua martxan jarri zen. Horretarako, animaliak (gehienez 4) hermetikoki itxitako beirazko eta 1.000 ml-ko ontzietan sartu ziren. Ontziak, aldi berean, 36,5 °C-ko bainuetan sartu ziren, % 8 oxigenoz eta % 92 nitrogenoz osatutako airearekin 120 minutuz. Jarraian, kumeek nahi gabeko temperatura-aldaketarik ez jasateko, tapaki termikoetan kokatu ziren eta haien suspertze espontaneoak aurrera eramanez berriro ere ordubetez.

Erabilitako talde esperimentalak honakoak izan ziren: kontrol-taldea (n = 10), hipoxia-iskemia taldea (HI; n = 13) eta HI+2-AG taldea (n = 11). Azken taldekoei, ebakuntza eta suspertze-prozedura bukatutakoan, 2-AGa injekzio intraperitoneal bakarrean eman zitzaion 2 mg/kg-ko kontzentrazioan, % 2 dimetilsulfoxidotan (DMSO), % 1 Tweenetan eta % 0,9 gatz-serumetan disolbatuta. DMSOak 2-AGa disolbatzen laguntzen du eta Tween zelulen mintzen iragazkortasuna emendatzen duen konposatua da, 2-AGa barneratzen laguntzen duena. Kontrol-taldeko animaliei, bestalde, anestesia eman, ebaketa egin eta berriz ere itxi ziren, karotidaren korapilorik egin gabe eta tratamendurik jasan gabe.

Behin prozedura hipoxiko-iskemikoa bukatuta, arratoiak ausaz banatu ziren talde esperimental ezberdinetan eta 14. egunean sakrifikatu ziren.

2.2. Nekropsia eta parafinan inkluitutako garunaren prozesamendua: mozketak eta tindaketak

P14an, hau da, hipoxia-iskemia induzitu eta 7 egunera, animaliak hil eta % 4 paraformaldehidoarekin (PFA) perfunditu ziren. Ondoren, garunak atera, 24 h PFAtan utzi eta ondoren, parafinan inkluitu ziren.

2.2.1. Mikrotomo bidezko mozketa

Behin garunak parafinazko bloketan inkluituta, mikrotomoan 5 μm -ko ebaketa seriatuak egin ziren blokeekin. Ebaketa horiek (animalia bakoitzeko 6-8) porta polilisinatuetan kokatu ziren eta lehortzen utzi ziren 24-48 orduz 37 °C-ko ganberan.

2.2.2. Hematoxilina-eosina bidezko tindaketa

Ikerketa morfologikoa egin ahal izateko, mikrotomoan moztutako laginak Shandon Varistain 24-4 (Thermo Scientific) gailu automatizatuan tindatu ziren Harris hematoxilina eta Y eosinarekin.

2.2.3. Nissl bidezko tindaketa

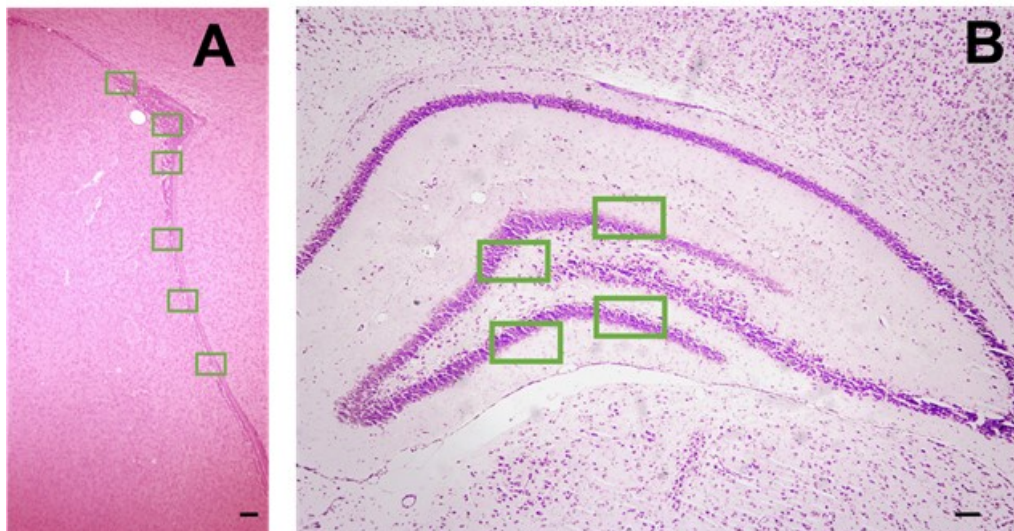
Laginak Nissl bidez ere tindatu ziren Shandon Varistain 24-4 (Thermo Scientific) gailu automatizatuan % 0,1 kresilo bioletazko tanpoi bat erabiliz.

2.3. Analisi histologikoa

Hematoxilina-eosina bidez tindatutako laginak Olympus BX-50[®] mikroskopia optikoan behatu ziren eta argazkiak Olympus CAMEDIA c-5050[®] kamerarekin egin ziren. Horretarako 4x eta 40x-ko handipenak erabili ziren. Argazkien prozesamendua ImageJ programarekin egin zen (NIH: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

Albo-bentrikuluetan, bentrikuluaren azalera eta SVZaren zelularitatea neurtu ziren. Bihurgune horzdunean aldagai berak neurtu ziren: SGZaren azalera eta zelularitatea. Zelularitatea neurtzeko, SVZan nitxoaren 6 gune ikertu ziren eta SGZan 4 (3. irudia). Horretarako, guneetako bakoitzean 40x handipeneko argazki bana atera zen eta ImageJ programarekin azalera unitateko zelula kantitatea neurtu zen.

3. irudia. Zelularitatea neurtzeko aztertutako nitxoetako guneak 4x handipenarekin.



SVZan 6 gune aztertu ziren (A). SGZan 4 gune aztertu ziren (B). Guneak lauki berdez adierazita ageri dira irudian eta horietako bakoitzean argazki bana atera zen 40x handipenarekin. A irudian hematoxilina-eosina bidezko tindaketa egin zen eta B irudian nissl bidezko tindaketa. Eskala-barra: 50 μm .

Lehenik eta behin, normaltasun-proba bat egin zen Saphiro-Wilk testaren bidez, izan ere, $n < 50$ zen. Bestalde, bariantzen homogeneotasuna ere ikertu zen. Normaltasuna eta bariantzen homogeneotasuna zuten taldeekin T Student edo bide bateko ANOVA test estatistiko parametrikokoak egin ziren eta, aldiz, normaltasunik edo/eta bariantzen homogeneotasunik ez zuten taldeekin U Mann Whitney edo Kruskal-Wallis test ez-parametrikokoak. T Student eta U Mann Whitney testak talde experimental bereko animalien hemisferio kontralateralak eta

Gorane Beldarrain, Malein Pacho *et al.*

ipsilateralak konparatzeko erabili ziren eta ANOVA eta Kruskal-Wallis, aldiz, talde ezberdinetako animalien hemisferio ipsilateralak haien artean bai eta kontralateralak haien artean konparatzeko erabili ziren. Kasu guztietan, emaitzak esangarriak zirela ondorioztatu zen beti ere $p < 0,05$ izan zenean.

3. Emaitzak

3.1. Bentrikuluaaren azalera

Lehenengo analisi konparatibo honetan, ehunaren kaltea aztertu zen zeharka. Izan ere, bentrikuluaaren dilatazioak lotura du jasandako kaltearekin. Lortutako emaitzak 2. irudian beha daitezke.

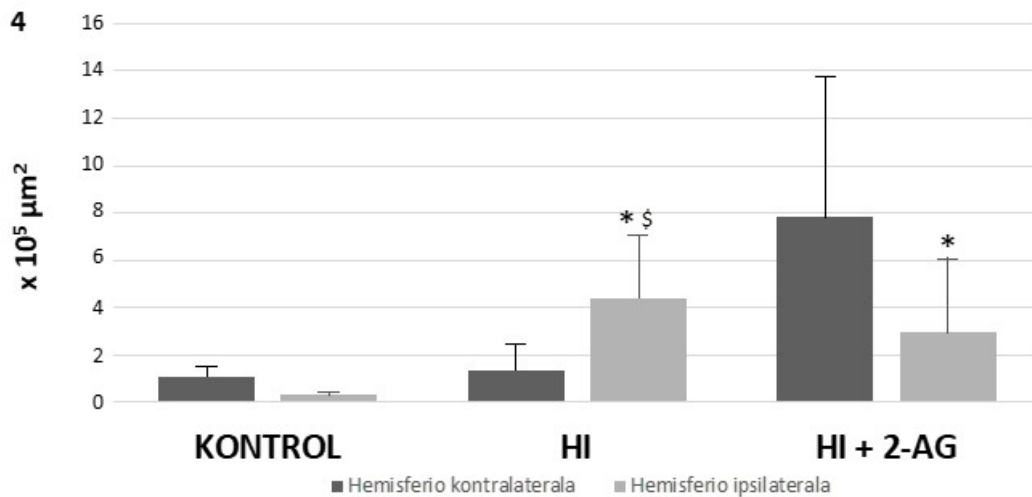
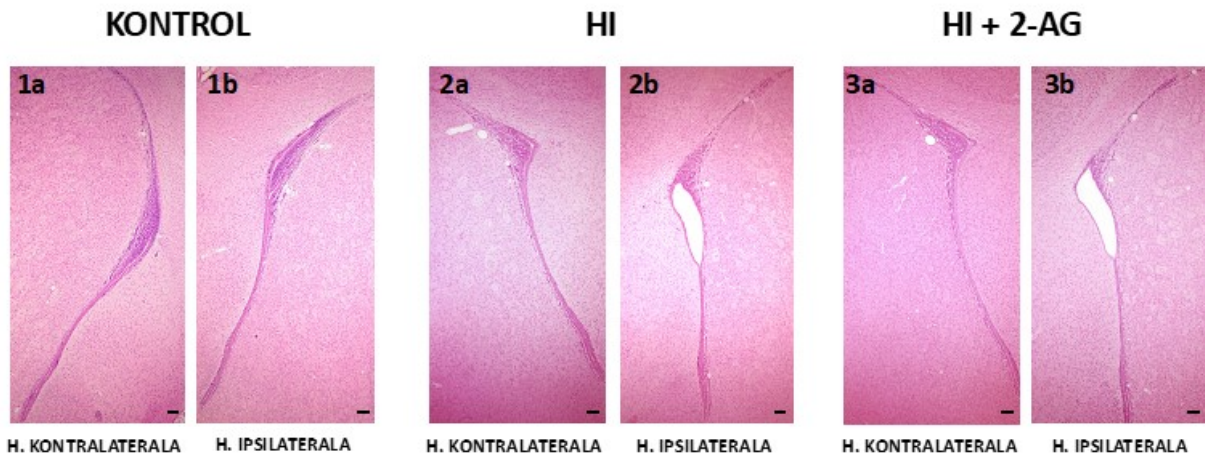
Hainbat konparazio egin ziren, bai talde esperimenteren bereko laginen artean bai eta talde esperimenteren ezberdinetako laginen artean ere. Lehenik eta behin, talde esperimenteren bakoitzean, hemisferio kontralateralak, hau da, kalterik jasan ez zutenak, hemisferio ipsilateralekin, hau da, kaltearekin, konparatu ziren eta HI taldean besterik ez ziren desberdintasun esangarriak behatu (H. kontralaterala $136.222,48 \pm 108.661,90 \mu\text{m}^2$ vs H. ipsilaterala $438.472,23 \pm 269.000,20 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$).

Jarraian, talde esperimenteren ezberdinetako hemisferio kontralateralen datuak haien artean konparatu ziren eta ez zen lortu emaitza estatistikoki esanguratsurik.

Azkenik, gauza bera egin zen hemisferio ipsilateralekin, eta, kasu horretan, desberdintasunak behatu ziren kontrol eta HI taldeak konparatzean (Kontrol $33.524,75 \pm 12.580,78 \mu\text{m}^2$ vs HI $438.472,23 \pm 269.000,20 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$) bai eta kontrol eta HI + 2-AG taldeak konparatzean ere (Kontrol $33.524,75 \pm 12.580,78 \mu\text{m}^2$ vs HI + 2-AG $295.260,57 \pm 313.711,81 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$). HI eta HI + 2-AG taldeak alderatzean, aldiz, desberdintasunak ez ziren estatistikoki esanguratsuak izan (HI $438.472,23 \pm 269.000,20 \mu\text{m}^2$ vs HI + 2-AG $295.260,57 \pm 313.711,81 \mu\text{m}^2$).

Hortaz, ikusi zen Hla pairatu eta gero, bentrikuluaaren azalera modu esangarrian emendatzen zela eta 2-AG bidez tratatutako laginetan ez zen ikusi azaleraren emendio hori murrizten zenik (4. irudia).

4. irudia. Albo-bentrikuluaren azalera.



Irudian hematoxilina-eosina bidez tindatutako kontrol-taldearen hemisferio kontralateral (1a) eta ipsilateral (1b), HI taldearen hemisferio kontralateral (2a) eta ipsilateral (2b) eta HI + 2-AG taldearen hemisferio kontralateral (3a) eta ipsilateral (3b) beha daitezke. 4: Bentrikuluaren azalera talde esperimental ezberdinetan. Hipoxia-iskemiak bentrikuluaren azalaren dilatazioa eragiten du, hemisferio ipsilateralean desberdintasunak baitaude kontrol eta HI taldeak (*p<0.01), kontrol eta HI + 2-AG taldeak (*p<0.01) bai eta HI taldearen bi hemisferioak alderatzean (§p<0.01). Eskala-barra: 50 μm.

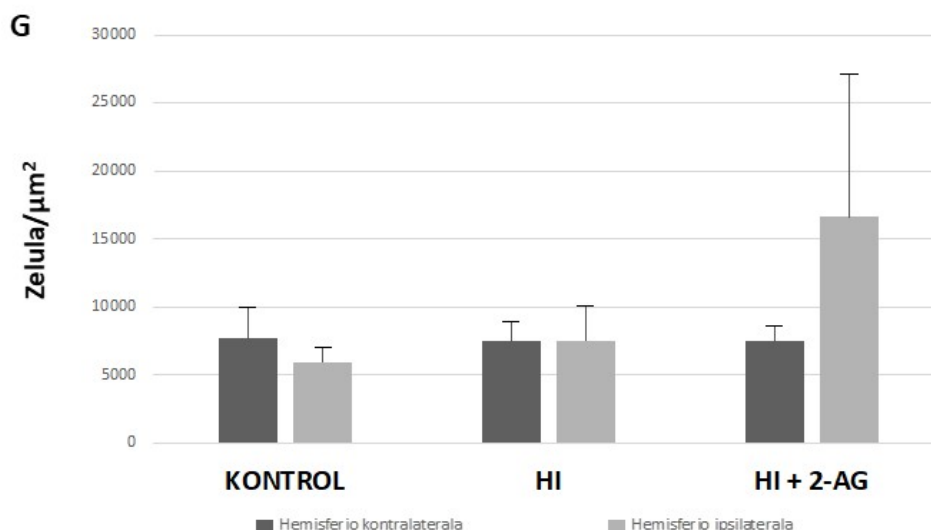
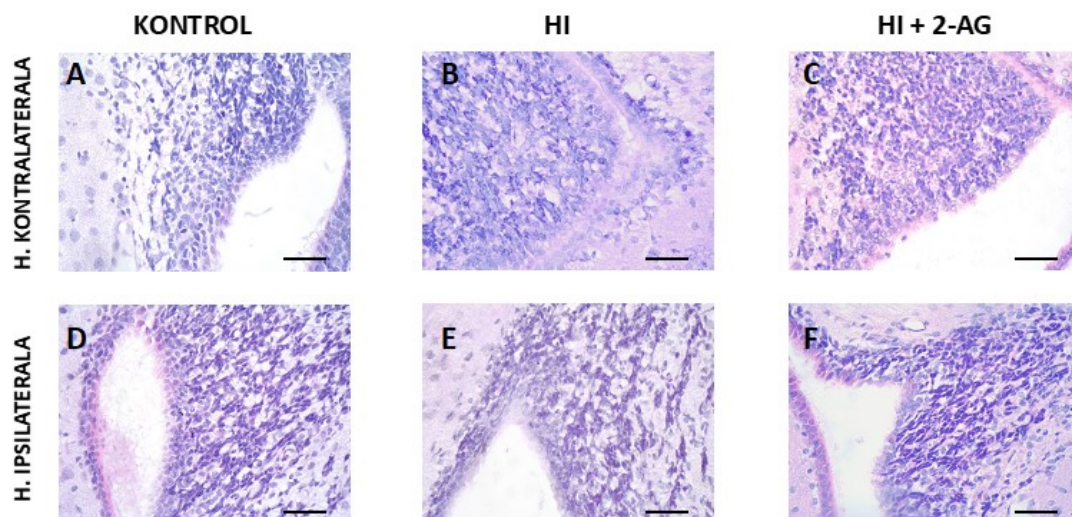
3.2. SVZko zelularitatea

Azaleraren kasuan bezala, zelularitatea (zelula/μm²) ere neurtu zen nitxoan jasandako kaltea kuantifikatzeko asmoz. Emaitzak 5. irudian beha daitezke.

Lehenik eta behin, aurreko nitxoan bezala, talde esperimental bereko laginen hemisferio kontralateralak ipsilateralekin konparatu ziren. Analsiak ez zuen emaitza esangarririk eman.

Jarraian, talde esperimental ezberdinak haien artean konparatu ziren. Hemisferio kontralateralen artean ez zen desberdintasun esanguratsurik behatu eta berdinean gertatu zen hemisferio ipsilateralak haien artean konparatzean.

5. irudia. Bentrikulu azpiko gunearen zelularitatea.



Irudian hematoxilina-eosina bidez tindatutako kontrol-taldearen hemisferio kontralateral (A) eta ipsilateral (D), HI taldearen hemisferio kontralateral (B) eta ipsilateral (E) eta HI + 2-AG taldearen hemisferio kontralateral (C) eta ipsilateral (F) beha daitezke. G: SVZaren zelularitatea talde esperimental ezberdinetan. Hipoxia-iskemiak, oro har, nitxoaren zelularitatea murrizten du, baina ez modu estatistikoki esangarrian. Eskala-barra: 50 μm.

3.3. Hipokanpoaren azalera

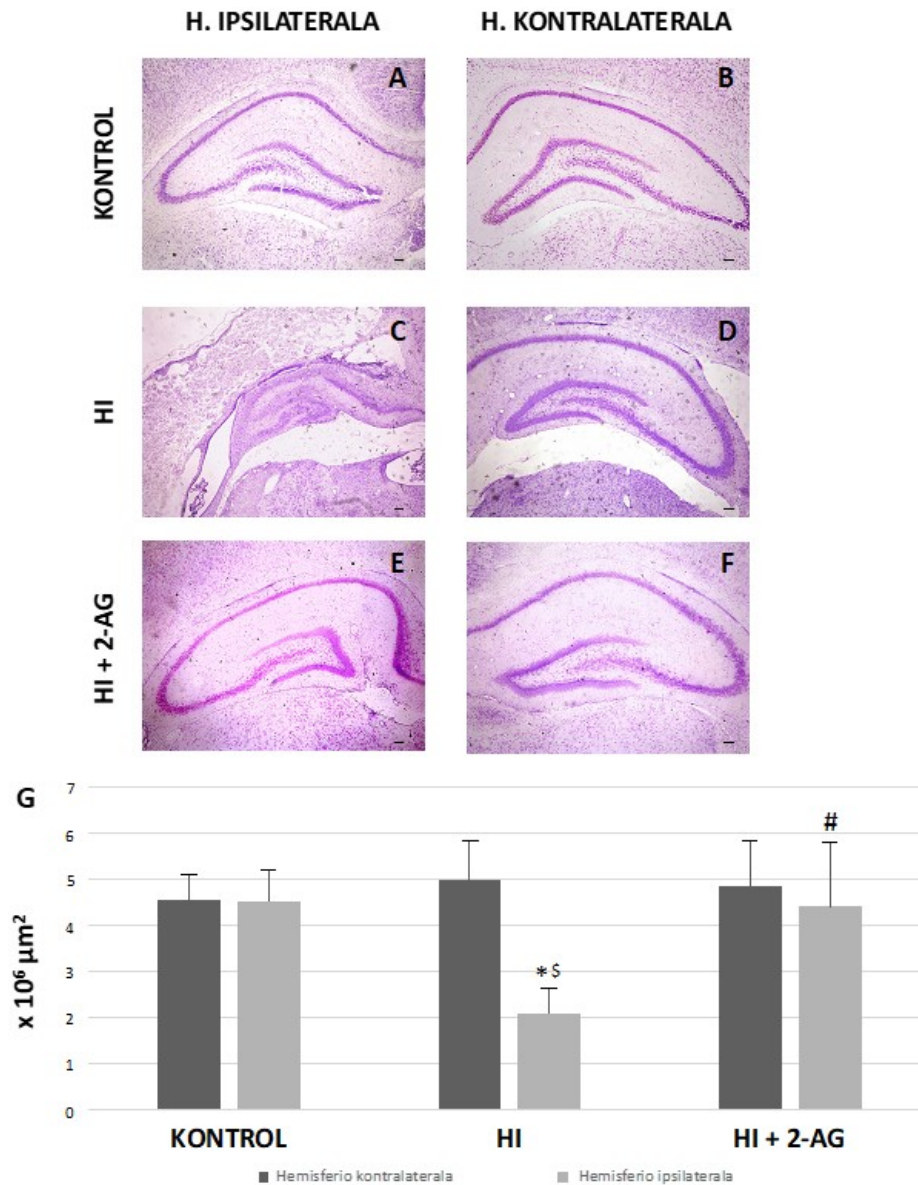
Hipokanpoan jasandako kalte-maila kuantifikatzeko, hipokanpoen azalera neurtu zen. Emaitzak 6. irudian beha daitezke.

Lehenik eta behin hemisferio kontralateralak eta ipsilateralak konparatu ziren talde esperimental bakoitzean. HI taldean soilik ikusi zen hemisferio ipsilateralean balioak baxuagoak zirela (Kontralateral $4.980.826,9 \pm 812.094,03 \mu\text{m}^2$ vs Ipsilateral $2.087.820,15 \pm 544.762,33 \mu\text{m}^2$ $p < 0,01$).

Ondoren, talde esperimentalak haien artean konparatu ziren. Hemisferio kontralateralean ez zen desberdintasun esanguratsurik aurkitu. Hemisferio ipsilateralak konparatzean, ikusi zen HI taldearen balioak kontrol taldearen balioak baino baxuagoak zirela (Kontrol $4.521.984,69 \pm 678.653,99 \mu\text{m}^2$ vs HI + 2-AG $4.391.038,53 \pm 1.391.514,14 \mu\text{m}^2$ $p < 0,001$), hau da, HI izan eta gero, azalera murrizten zela. Horrez gain, HI taldeko eta HI + 2-AG taldeko hemisferio ipsilateralak konparatzean, ikusi zen 2-AG tratamendua jaso eta gero, azaleraren balioak modu esangarrian

emendatzen zirela (HI 2.087.820,15 ± 544.762,33 μm² vs HI + 2-AG 4.391.038,53 ± 1.391.514,14 μm² p<0,01). Kontrol eta 2-AG taldeen arteko balioen artean, aldiz, ez zen desberdintasun esangarririk behatu, tratamendu-taldean kontrol-taldeko balioak berreskuratu ziren seinale (Kontrol 4.521.984,69 ± 678.653,99 μm² vs HI + 2-AG 4.391.038,53 ± 1.391.514,14 μm² p>0,05).

6. irudia: Hipokanpoko gunearen azaleraren analisia.



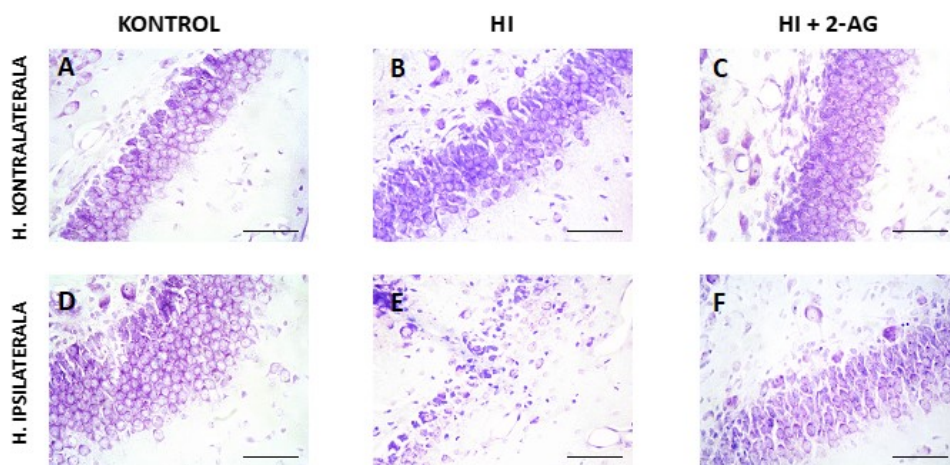
Irudian Nissl bidez tindatutako kontrol-taldearen hemisferio kontralateral (A) eta ipsilateral (D), HI taldearen hemisferio kontralateral (B) eta ipsilateral (E) eta HI + 2-AG taldearen hemisferio kontralateral (C) eta ipsilateral (F) beha daitezke. G: SGZaren azalera talde esperimental ezberdinetan. Hipoxia-iskemiak nitxoaren azalera murrizten du, desberdintasunak baitaude kontrol eta HI taldearen hemisferio ipsilateralaren artean (*p<0.05). Hala ere, 2-AG bidezko tratamenduak azalera berreskuratzen laguntzen du, desberdintasunak topatu baitira HI eta HI + 2-AG taldeak (\$p<0.01) bai eta kontrol eta HI + 2-AG taldeak konparatzean (*p<0.05). Eskala-barra: 50 μm.

Hipokanpoko pikordun geruza azpiko gunean ere zelularitatea (zelula/ μm^2) neurtu zen nitxoan jasandako kaltea baloratzeko. Emaitzak 7. irudian beha daitezke.

Kasu honetan ere lehenengo hemisferio kontralateralak eta ipsilateralak konparatu ziren talde esperimental bakoitzean. Emaitzak azaleraren analisisan ikusitakoarekin bat zetozen; zelulen dentsitateak behera egin zuen HI taldearen hemisferio ipsilateralean (Kontralateralak $90,46 \pm 24,94$ zelula/ μm^2 vs Ipsilateralak $33,07 \pm 24,29$ zelula/ μm^2 ; $p < 0,01$), baina beste taldeetan ez zen desberdintasun esangarririk behatu hemisferioen artean.

Talde esperimentalen arteko analisisan ere gauza bera ikusi zen. Hemisferio kontralateralen konparazioak ez zuen desberdintasun esangarririk erakutsi. Hemisferio ipsilateralen konparaketan, aldiz, ikusi zen Hlak zelulen dentsitatea jaitea eragiten zuela, kontrol eta HI taldeen konparazioan desberdintasunak behatu baitziren (Kontrol $70,07 \pm 10,75$ zelula/ μm^2 vs HI $33,07 \pm 24,29$ zelula/ μm^2 ; $p < 0,01$). Horrez gain, kontrola eta HI + 2-AG taldeak konparazioan ere ikusi zen 2-AG bidezko tratamenduak zelularitatea berreskuratzen lagundu zuela, zelularitateak berriro ere gora egin baitzuen bai kontrola tratamendu-taldearekin konparatzean (Kontrol $70,07 \pm 10,75$ zelula/ μm^2 vs HI + 2-AG $84,55 \pm 18,76$ zelula/ μm^2 ; $p < 0,05$), bai eta HI taldea tratatutako taldearekin konparatzean (HI $33,07 \pm 24,29$ zelula/ μm^2 vs HI + 2-AG $84,55 \pm 18,76$ zelula/ μm^2 $p < 0,01$) ere.

7. irudia. Hipokanpoko bihurtze horzdunaren pikordun geruza azpiko zelularitatea.



Irudian Nissl bidez tindatutako kontrol-taldearen hemisferio kontralateralak (A) eta ipsilateralak (D), HI taldearen hemisferio kontralateralak (B) eta ipsilateralak (E) eta HI + 2-AG taldearen hemisferio kontralateralak (C) eta ipsilateralak (F) beha daitezke. G: SGZaren zelularitatea talde esperimental

ezberdinetan. Hipoxia-iskemiak nitxoaren zelularitatea murrizten du, desberdintasunak baitaude kontrol eta HI taldearen hemisferio ipsilateralaren artean (* $p < 0.05$). Hala ere, 2-AG bidezko tratamenduak zelularitatea berreskuratzen laguntzen du, desberdintasunak topatu baitira HI eta HI + 2-AG taldeak ($p < 0.01$) bai eta kontrol eta HI + 2-AG taldeak konparatzean (* $p < 0.05$). Eskala-barra: 50 μm .

4. Eztabaida, ondorioak

Neurogenesi-gaitasuna ezagutu zenetik, interes handia dago zelula ama neuronalak eta neuronen aitzindariak ikertzeko. Izan ere, asko dira neuronen heriotza masiboagatik bereizten diren gaixotasunak, EHI sindromea barne, eta, beraz, neuronen proliferazioa zer gune eta zelulatan gertatzen den ondo ezagutzeak leio terapeutiko asko zabaltzen ditu gaixotasun horien tratamenduei dagokienez. Hala ere, neurogenesi horren izaeraren inguruan eztabaida handia dago. Autore batzuen arabera, hipoxia-iskemia izan eta gero, aitzindarien proliferazioaren emendio bat gertatzen da nitxo neurogenikoetan gertakariak eragindako zelulen heriotza konpentsatzeko asmoz (17-19). Beste autore batzuen arabera, aldiz, zelula kantitatea murriztu egiten da HI gertakariaren ondorioz (20). Iritzien desberdintasun horiek lotura izan dezakete kalte-mailarekin. Izan ere, badirudi kalte-mailak ere eragina duela neurogenesian: kaltea handia den kasuetan zelula amek neurogenesia murrizten dute (20), eta kaltea ertaina denean, aldiz, areagotu (17, 21).

Nitxoei dagokienez, modu desberdinean erantzuten dute bai hipoxia-iskemiarekiko eta 2-AG tratamendurekiko. Gure lanean, eta beste autore batzuen lanetan, ikusi da HI izan eta gero, albo-bentrikuluaren azalera edo morfologia aldatu egiten dela (15). Izan ere, Hlak gorputz ildaskatuaren atrofia eragiten du eta horrek, aldi berean, haren alboan dagoen bentrikuluaren hedapena eragiten du (17, 21, 22). Hipokanpoan ere morfologia-aldaketa gertatzen da, baina Hlak kontrako efektua du gune horretan; izan ere, hedapena eragin beharrean tamainaren murrizketa indusitzen du. Azken nitxo horretan, zelularitatearen murrizpena ikusi da HI izan eta gero, bai gure lanean bai beste hainbat autorenen lanetan ere (23, 24). Zelulen galera horrek aldi berean azalera gertatutako murrizketa azal lezake. Bestalde, SVZan, badirudi zelula heldugabeak ez direla hain sentikorak hipoxia-iskemiarekiko. Metabolismo anaerobioa sarritan erabiltzen dute eta, gainera, glukogeno granuluak aurkitu dira haien baitan, HI bezalako gertakarietan energia-iturri izan daitezkeenak. Mekanismo horiei esker, zelulek HI gertakari baten aurrean ez lukete hainbesteko estres oxidatiborik pairatuko eta, hortaz, zelulen heriotza maila baxuagoan gertatuko litzateke (25).

Endokanabinoideak terapia bezala gailentzen ari diren konposatuak dira, erakutsi dituzten propietate neurobabesleak direla eta. Ikerketen arabera, endokanabinoide endogenoek, 2-AGa barne, hipoxia-iskemiak berak bultzatuta, zelulen proliferazioa eragiten dute (26, 27) eta exogenoki emandako kasuetan ere eraginkorrak direla ikusi da (15, 28). Hipoxia-iskemiaren ur-jauzi eszitotoxikoaren ondorioz, 2-AGa ekoizten da eta garuneko CB1 hartzailak aktibatzen dira, azkenik, hartzaille horiek K^+ kanalak zabaltzea eragiten dute eta Ca^{2+} ioiaren sarrera oztokatzen da. Ondorioz, glutamatoak eragiten duen ur-jauzia, mikrogliaaren aktibazioa, hantura-erantzuna eta zelulen heriotza eteten dira (26, 28, 29). Gure emaitzetan ez genuen 2-AGaren efektua behatu SVZ nitxoan, baina bai SGZan. Ikusi da 2-AGaren hartzailak SVZan 21 eguneko banakoetan dutela haien adierazpen-maila maximoa. Gure lanean, 14 eguneko arratoiak erabili ziren, hortaz, izan liteke 2-AGaren efektua ikusteko goizegi izatea (30-32). Bestalde, eta aurreko nitxoan ez bezala, esan daiteke 2-AGak baduela neurogenesia indusitzeko gaitasuna SGZan. Izan ere, nitxo horretan ikusi da 2-AGaren hartzailen adierazpen-maila altua dela jaiotza inguruko garai goiztiarrean (32).

Laburbilduz, esan daiteke Hlak efektu desberdina duela nitxo neurogeniko bakoitzean. Albo-bentrikuluetan, azalera gora egiten du hipokanpoan beheara egiten duen bitartean eta zelularitateari dagokionez, SVZan zelula kantitatea konstante mantentzen da SGZan murriztu egiten den bitartean. 2-AGak ere efektu desberdina izan du nitxo bakoitzean, eta hipokanpoan emaitza hobeak lortu dira. Hori horrela, ondoriozta daiteke Hlaren efektuak nitxo bakoitzean ezberdinak diren bezala, tratamenduek ere ezberdinak izan behar dutela eraginkortasuna bermatzeko. Hala ere, ikerketa gehiago egitea beharrezkoa da. Esaterako, laginak sexuaren arabera banatzea interesgarria izan liteke. Izan ere,

Gorane Beldarrain, Malein Pacho *et al.*

zenbait autorek lortutako emaitzak ezberdinak izan dira kasu batzuetan eta, beraz, ikerketa sakonagoak egitea beharrezkoa da emaitza horien arteko lotura ezartzeko.

3. Eskerrak eta oharak

Lan hau UPV/EHUK (GIU17/018) eta BIO 18/IC/003k finantzatu zuten partzialki. M. Pachok lkasiker programaren (Eusko Jaurlaritza) beka jaso zuen.

6. Erreferentzia bibliografikoak

1. De Vries LS, Jongmans MJ. Long-term outcome after neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2010 Mai 5;95(3): F220–F224.
2. Gunn AJ, Thoresen M. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy. *Handb. Clin. Neurol.* 2019;162: 217–237.
3. Lai MC, Yang SN. Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Biomed Biotechnol* 2011 Abe 13; 2011: 1–6.
4. Yıldız EP, Ekici B, Tatlı B. Neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: An update on disease pathogenesis and treatment. *Expert Rev. Neurother.* 2017 Mai 4;17(5): 449–459.
5. Morton MC, Neckles VN, Seluzicki CM, Holmberg JC, Feliciano DM. Neonatal Subventricular Zone Neural Stem Cells Release Extracellular Vesicles that Act as a Microglial Morphogen. *Cell Rep.* 2018 Api 3;23(1): 78–89.
6. Hochgerner H, Zeisel A, Lönnerberg P, Linnarsson S. Conserved properties of dentate gyrus neurogenesis across postnatal development revealed by single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci.* 2018 Urt 15;21(2):290-299.
7. Moral Y, Robertson N, Cerio F, Alconada D. Hipoxia-isquemia neonatal: bases celulares y moleculares del daño cerebral y modulación terapéutica de la neurogénesis. *Rev Neurol.* 2019 Urt 1;68(01): 23–36.
8. Roka A, Azzopardi D. Therapeutic hypothermia for neonatal hypoxic ischaemic encephalopathy. *Early Hum Dev.* 2010 Eka 1;86(6):361–367.
9. Wassink G, Davidson JO, Dhillon SK, Zhou K, Bennet L, Thoresen M, Gunn AJ. Therapeutic Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2019 Urt 14;19(2): 2.
10. Pacher P, Bátkai S, Kunos G. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2006 Ira 1;58(3): 389–462.
11. Lu HC, Mackie K. Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* 2021 Eka;6(6): 607–615.
12. Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist.* 2007 Api 7;13(2): 127–137.
13. Silveira KM, Wegener G, Joca SRL. Targeting 2-arachidonoylglycerol signalling in the neurobiology and treatment of depression. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2021 Api 27;129(1): 3–14.
14. Mechoulam R, Parker LA, Gallily R. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 2002 Urt 16;42(S1): 11S–19S.

15. Lara-Celador I, Castro-Ortega L, Alvarez A, Goñi-de-Cerio F, Lacalle J, Hilario E. Endocannabinoids reduce cerebral damage after hypoxic-ischemic injury in perinatal rats. *Brain Res.* 2012 Ira 20;1474: 91–99.
16. Rice JE III, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol.* 1981; 9: 131–141.
17. Yang Z, Levison SW. Hypoxia/ischemia expands the regenerative capacity of progenitors in the perinatal subventricular zone. *Neuroscience.* 2006 Abe 31;139(2): 555–564.
18. Li G, Liu J, Guan Y, Ji X. The role of hypoxia in stem cell regulation of the central nervous system: From embryonic development to adult proliferation. *CNS Neurosci Ther.* 2021 Aza 24;27(12): 1446–1457.
19. Tapia-Bustos A, Perez-Lobos R, Vío V, Lespay-Rebolledo C, Palacios E, Chiti-Morales A, Bustamante D, Herrera-Marschitz M, Morales P. Modulation of Postnatal Neurogenesis by Perinatal Asphyxia: Effect of D1 and D2 Dopamine Receptor Agonists. *Neurotox Res.* 2017 Urt;31(1): 109–121.
20. Levison SW, Rothstein RP, Romanko MJ, Snyder MJ, Meyers RL, Vannucci SJ. Hypoxia/ischemia depletes the rat perinatal subventricular zone of oligodendrocyte progenitors and neural stem cells. *Dev Neurosci.* 2001 Mai;23(3): 234–247.
21. Ong J, Plane JM, Parent JM, Silverstein FS. Hypoxic-ischemic injury stimulates subventricular zone proliferation and neurogenesis in the neonatal rat. *Pediatr Res.* 2005 Ira 1;58(3): 600–606.
22. Niimi Y, Levison SW. Pediatric brain repair from endogenous neural stem cells of the subventricular zone. *Pediatr Res.* 2017 Aza 8;83(1-2): 385–396.
23. Liu CL, Siesjö BK, Hu BR. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience.* 2004 Abe 31;127(1): 113–123.
24. Vieira M, Fernandes J, Carreto L, Anuncibay-Soto B, Santos M, Han J, Fernández-López A, Duarte CB, Carvalho AL, Santos AE. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the up-regulation of endogenous RIP3. *Neurobiol. Dis.* 2014 Abu 1;68: 26–36.
25. Romanko MJ, Rothstein RP, Levison SW. Neural Stem Cells in the Subventricular Zone are Resilient to Hypoxia/Ischemia whereas Progenitors are Vulnerable. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Uzt 1;24(7): 814–825.
26. Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 2005 Uzt 21;19(12): 1704–1706.
27. Schuele LL, Schuermann B, Bilkei-Gorzo A, Gorgzadeh S, Zimmer A, Leidmaa E. Regulation of adult neurogenesis by the endocannabinoid-producing enzyme diacylglycerol lipase alpha (DAGLa). *Sci Rep.* 2022 Urt 12;12(1): 633.
28. Fernández-López D, Lizasoain I, Moro MA, Martínez-Orgado J. Cannabinoids: well-suited candidates for the treatment of perinatal brain injury. *Brain Sci.* 2013 Uzt 10;3(3): 1043–1059.
29. Zhuang SY, Bridges D, Grigorenko E, McCloud S, Boon A, Hampson RE, Deadwyler S A. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. *Neuropharmacology.* 2005 Eka 1;48(8):1086–1096.
30. Berrendero F, Garcia-Gil L, Hernandez ML, Romero J, Cebeira M, de Miguel R, Ramos JA, Fernández-Ruiz JJ. Localization of mRNA expression and activation of signal transduction

Gorane Beldarrain, Malein Pacho *et al.*

mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development. *Development*. 1998 Abu 15;125(16): 3179–3188.

31. Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernández-Ruiz JJ. Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse*. 1999 Ira 1;33(3): 181–191.
32. Fernandez-Ruiz J, Berrendero F, Hernandez ML, Ramos JA. The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends Neurosci*. 2000 Urt 1;23(1): 14–20.