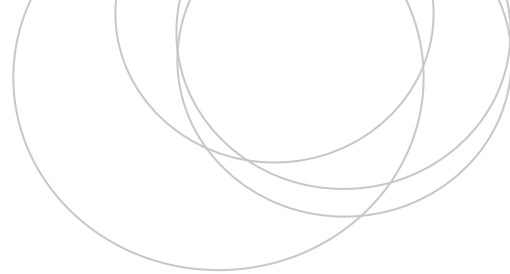




NEUROZIENTZIAK SAILA
DEPARTAMENTO DE NEUROCIENCIAS



MEDIKUNTZA ETA ERIZAINZA FAKULTATEA
FACULTAD DE MEDICINA Y ENFERMERÍA

Master Amaierako Lana
Neurozientziak Masterra

**Loki-lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean
hipokanpo mailan gertatzen diren aldaketak:
hipokanpoaren mendeko portaerak,
endokannabinoide sistema eta astrozitoak**

Egilea:
Ilazki Anaut Luser
Zuzendariak:
Izaskun Elezgarai Gabantxo
Irantzu Rico Barrio

AURKIBIDEA

1. SARRERA	2
1.1. Epilepsia	2
1.2. Loki-lobuluko epilepsia	3
1.3. Hipokanpoa eta Loki-lobuluko epilepsia	3
1.4. Endokannabinoide sistema	5
1.5. Helburuak	6
2. MATERIALA ETA METODOAK	7
2.1. Animaliak	7
2.2. Krisi exzitotoxikoen azido kainikoaren eredua.....	7
2.2.1. Azido kainikoaren peritoneo barruko administrazioa	7
2.2.2. Krisien larritasunaren neurketa	8
2.3. Portaera-probak	8
2.3.1. Barnesen labirintoa: oroimen- eta estrategia- espazialaren testa	9
2.3.2. Habia egiteko gaitasunaren azterketa	10
2.4. Immunozitokimika teknikak	10
2.4.1. Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa	10
2.4.2. Antigorputzak	10
2.4.3. Argi mikroskopiarako Avidina-Biotina peroxidaxa metodoa	11
2.4.4. Erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua mikroskopio elektronikorako	12
2.4.5. Azterketa semi-kuantitatiboa	14
2.5. Datuen analisia	14
3. EMAITZAK	15
3.1. Portaera-probak	15
3.1.1. Barnesen labirintoa	15
3.1.2. Habia egiteko gaitasunaren analisia	15
3.2. CB ₁ hartzailearen immunohistokimika eta dentsitate-aldaketaren neurketa	17
3.3. GFAPren immunohistokimika eta astrozitoen analisia.....	19
3.4. Astrozitoen eta CB ₁ R astrozitikoaren azterketa mikroskopio elektronikoaren bitartez	21
4. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK	22
5. ESKER ONAK	24
6. BIBLIOGRAFIA	25

LABURDURAK

2-AG: 2-arakidonoilglizerola	HE: Hipokanpoaren esklerosia
ABC: Avidina-biotina konplexua	AK: Azido kainikoa
AEA: Anandamida edo arakidonoiletanolamida	KAM: konbultsioen aurkako medikamentuak
BH: Bihurgune horzduna	KE: Kortex entorrinala
BL: Barnesen labirintoa	LLE: Loki-lobuluko epilepsia
CA: <i>Cornu ammonis</i>	MAGL: Monoazil glizerol lipasa
CB ₁ R: 1 motako kannabinoide hartzailea	NAPE-PLD: N-azilfosfatidiletanolamida-fosfolipasa D
CB ₂ R: 2 motako kannabinoide hartzailea	NMDA: N-metil-D-aspartato
DAB: 3,3'-diamenobentzidina	NSZ: Nerbio-sistema zentrala
DAGL α : α diazilglizerol lipasa	TF: Tanpoi fosfatao
EE: Estrategia espaziala	RE: Racineren eskala
EEG: Elektroentzefalograma	RE < 3: Racineren eskalan 3tik beherako epilepsia-krisiak izan zituzten saguak
EG: Estrategiarik gabe	RE > 3: Racineren eskalan 3tik gorako epilepsia-krisiak izan zituzten saguak
eKB: Endokannabinoide	GT: Giro tenperatura
ES: Estrategia seriala	TBS: Tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-soluzioa
FAAH: Gantz-azido amidohidrolasa, ingelesetik <i>Fatty acid amide hydrolase</i>	ZE: Zorizko estrategia
GFAP: Glia-proteina azido fibrilarra; ingelesetik Glial fibrillary acidic protein	
GLAST: Glutamato/aspartato garraiatzailea; ingelesetik Glutamate/aspartate transporter	

1. SARRERA

1.1. Epilepsia

Epilepsia adin guztietako pertsoneri eragiten dien asaldura neurologiko kronikoa da. Munduko Osasun Erakundeak (MOE) estimatu du mundu osoan zehar 50 milioi pertsona inguruk pairatzen dutela gaitz hau. Krisi epileptiko errepikakorrak dira epilepsiaren bereizgarri, eta gutxienez bi epilepsia-krisi pairatu behar dira epilepsia bezala diagnostika dadin. Krisi epileptiko deritze garuneko neurona-jarduera gehiegizkoa eta sinkronikoa denean sortzen diren keinu edota sintoma iragankorrei (Fisher et al., 2014). Burmuineko eskualde desberdinetan gerta daiteke neuronen gehiegizko kitzikapena, loki-lobuluan edo bekoki-lobuluan, kasu. Bestalde, epilepsia-krisiek nahigabeko mugimenduak eragin ditzakete gorputzaren atal batean (partziala)

edo gorputz osoan (orokorrak), eta batzuetan, konorte galera eta gernu-maskuriaren edo hesteen kontrolaren galera ere ekar ditzakete. Horrez gain, giharren zurruntasuna edo arreta galera laburrak, nahiz luzaroko konbultsio larriak sor ditzakete. Krisien frekuentzia ere aldakorra da, adibidez, urtean behin gerta daitezke edo hainbat aldiz egunean (Munduko Osasun Erakundea, 2019).

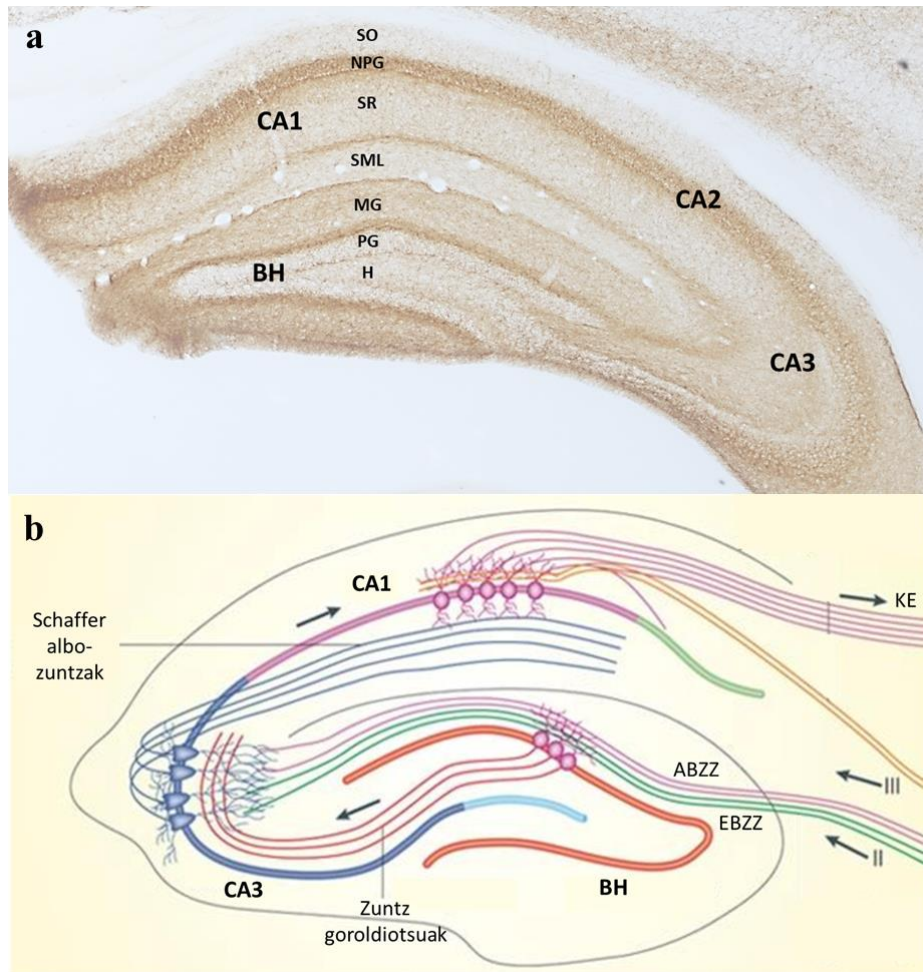
Epilepsiak kausa desberdinak izan ditzake: estrukturala (garuneko lesioak, adibidez), genetikoa (garuneko malformazioak, kasu), infekziosoa (meningitisa, entzefalitisa ...), metabolikoa edo immunologikoa. Hala ere, kasuen %50 inguruan gaixotasunaren jatorria ideopatikoa da. Kasu guztietan, epilepsiak ondorio neurologikoak, kognitiboak, psikologikoak eta sozialak dakartza. Epilepsia jasaten duten pertsonen erdia inguruk bestelako kondizio fisiko edo psikiatrikoak ere pairatzen dituzte. Esaterako, depresioa (%23) eta antsietatea (%20) dira prebalentzia handiena duten nahasmenduak. Umeen kasuan, aldiz, adimen-desgaitasuna da ohikoena (%30-40). Horrez gain, epilepsia gaixotasun neuroendekatzailerekin lotuta egoten da (Munduko Osasun Erakundea, 2019). Gaur egun, epilepsia ezin da sendatu, baina krisi epileptikoak medikamentuen bidez kontrola daitezke. Haatik, oraindik ez ditugu ezagutzen gaixotasun honen jatorriaren eta funtzionamenduaren inguruko alderdi asko.

1.1. Loki-lobuluko epilepsia (LLE)

Lan honetan loki-lobuluko epilepsian (LLE) zentratuko gara. LLE epilepsia partzial mota bat da, maiz epilepsiaren aurkako farmakoekin trataezina dena. Alabaina, kirurgia egiten den epilepsia mota ohikoena da, kasuen %50-73 suposatzen baitu (Téllez-Zenteno eta Hernandez-Ronquillo, 2011). LLE gehienek anormaltasun epileptogenetikoak loki-lobuluaren erdialdean aurkezten dituzte, hau da, hipokanpoan, amigdalari eta hipokanpo alboko bihurtunean (Engel, 2001). Halaber, LLEren bereizgarriak dira hipokanpoan gertatzen diren neuroendekapena, zuntz goroldiotsuen kimatze aberrantea, pikor-zelulen sakabanatzea eta astrogliosisa (Vrinda et al., 2018). Horrek guztiak hipokanpoaren esklerosia (HE) eragiten du, zeina LLEren etiologia nagusia den. Hala ere, ikusi da garuneko lesioek, aurretiko joera genetikoek, kortez-malformazioek edo garun barneko infekzioek ere HE eragin dezaketela. Horiek, aldi berean, hipokanpoaren kitzikakortasuna emendatzen dute eta, azkenik, bat-bateko krisiak gertatzen dira. Beraz, HE epilepsia-krisien jatorria zein ondorioa izan daiteke (Engel, 1996; Thom, 2014; Walker, 2015).

1.3. Hipokanpoa eta LLE

Ikerketa honetan hipokanpoan zentratuko gara. Izan ere, arestian azaldu den bezala, LLEn ez-ohiko neurona-jarduera hipokanpoan gertatzen da, besteak beste. Aldi berean, krisiekiko bereziki sentikorra den eremua da ere (Walker, 2015). Gizakietan hipokanpoa loki lobuluan kokatzen da. Karraskarietan, berriz, pareta kortezaren sakonetik loki kortezaren sakonera zabaltzen da (Knierim, 2015). Bai gizakian bai karraskarietan lau eskualde bereizten dira: *cornu ammonis* (CA) 1, CA2, CA3 eta bihurtune horzduna (BH) (1a. irudia). Horrez gain, CA1 eskualdean lau geruza bereiz daitezke alde dortsaletik bentralera: *stratum oriens*, neurona piramidalen geruza, *stratum radiatum* eta *lacunosum moleculare* geruza. Bihurtune horzduna, aldiz, hiru geruzaz osatuta dago: molekula-geruza, pikor-geruza eta hilusa.



1. irudia. Karraskarien garunaren egituraren eta funtzionamenduaren irudikapenak: a) hipokanpoaren lau eskualdeak: CA1, CA2, CA3 eta bihurgune horzduna (BH). CA1aren geruzak: SO, *stratum oriens*; NPG, neurona piramidalen geruza; SR, *stratum radiatum*; SML, *lacunosum moleculare* geruza. BHaren geruzak: ML, molekula-geruza; GL, pikor-geruza; H, hilusa. **b)** Zirkuitu trisinaptikoaren irudikapena: BHeko proiektzioek CA3ko neurona piramidalekin (urdinez) sinapsia egiten dute zuntz goroldiotsuen bidez (gorriz). CA3ko neuronek CA1eko neurona piramidaletara (arrosaz) bidaltzen dute informazioa Schaffer albo-zuntzen bitartez (urdinez). Azkenik, CA1eko zelula piramidalek kortex entorrinalean (KE) egiten dute sinapsia. ABZZ: alboko bide zulatzaileen zuntzak; EBZZ: erdialdeko bide zulatzaileen zuntzak. Deng eta kideen (2010) lanetik eraldatuta.

Hipokanpoko eremu desberdinak zirkuitu trisinaptikoaren bitartez konektatuta daude (1b.irudia). BHko pikor-zelulek kortex entorrinaletik (KE) jasotzen dute informazioa alboko eta erdialdeko bide zulatzaileen zuntzen bidez. Ondoren, CA3ko piramide-zelulek bidaltzen dute zuntz goroldiotsuen bitartez. Jarraian, CA3ko neuronek CA1eko zelula piramidalekin sinapsia egiten dute Schaffer albo-zuntzen bidez. Azkenik, zelula horiek informazioa KEra bidaltzen dute berriro (Deng et al., 2010). LLEn gertatzen den hipokanpoaren gehiegizko kitzikakortasunak BHean izan lezake jatorria; izan ere, pikor-zelulen sinapsiak glutamato kantitate handiak aska ditzake, eta baldintza patologikoetan, zelula horien gehiegizko jarduera hipokanpoko neuronentzat exzitotoxikoa izan daiteke (Botterill et al., 2019).

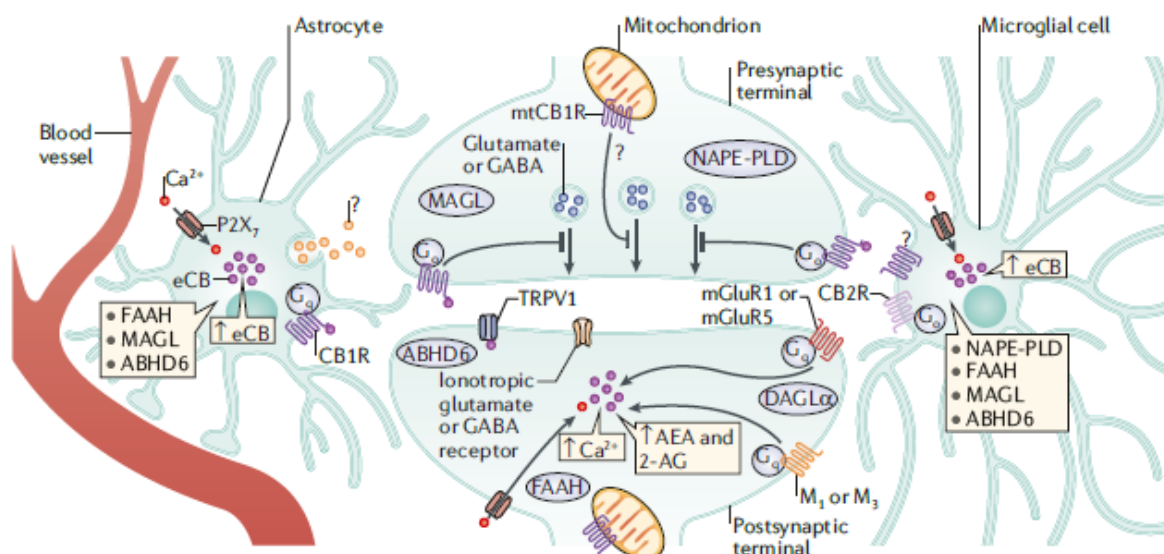
Hipokanpoa oroimen jardueran parte hartzen duen garunaren eskualdea da (Walker, 2015). Butler eta lankideek (2012) ikusi zuten epilepsiak eta hipokanpoaren kalte arinek epe luzera finkatzen den memorian eragina dutela. Beste alde batetik, Wilkinson eta lankideen (2012) ikerketak frogatu zuen LLEak ezagutza berrien eskurapenean eta erretentzioan eragina izan dezakeela ordu bateko denbora tarte laburrean. Gainera, badirudi erretentzio defizit hori

hipokanpoko atrofiarekin lotuta dagoela. Horrez gain, emaitzek iradokitzen dute LLE jasaten dutenek zenbait asteetan zehar eskuratutako ezagutzak azkarrago ahazten dituztela. Azken kasu horretan, ordea, badirudi epilepsia-krisiak direla epe-luzeko memorien finkapenean eragiten dutenak (Wilkinson et al., 2012).

1.4. Endokannabinoide sistema

Endokannabinoide (eKB) sistema nerbio-sistema zentralean (NSZ) zehar banatuta dagoen eta sinapsiaren transmisioaren modulazioan laguntzen duen seinalizazio-sistema konplexua da. Bere jardura oso espezifiko eta lokalizatua da (Lutz et al., 2015). Garuneko eremu desberdinetan, eKBen seinaleztapenak zelula mota askoren (neuronak, astrozitoak eta mikroglia) jardura hainbat modutan modulatu ditzake. Horrela, sinapsiaren transmisioan testuinguruaren araberako aldaketak sor ditzake, nerbio-jardura egokia bermatuz.

EKB sistemaren osagai nagusiak hurrengoak dira: 1 motako kannabinoide hartzaileak (CB_1R) eta 2 motako kannabinoide hartzaileak (CB_2R); horiek kitzikatzeko gai diren lipido endogenoak (eKB), horien artean ezagunenak: anandamida (AEA); arakidonoiletanolamida) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG); eta endokannabinoideen sintesi- eta degradazio-entzimak (2. irudia). Gantz-azido amidohidrolasa (FAAH) eta monoazil glizerol lipasa (MAGL) dira AEA eta 2-AG degradatzen dituzten entzimak eta N-azilfosfatidiletanolamida-fosfolipasa D (NAPE-PLD) eta α diazilglizerol lipasa (DAGL α) entzimak dira horiek sintetizatzen dituztenak.



2. irudia. EKB sistemaren osagaiak neuronetan, astrozitoetan eta mikroglia. Lutz eta kideen (2015) lanetik eraldatuta.

NSZeko hartzaile kannabinoide nagusia CB_1 da. CB_1R G-proteina bati atxikitutako hartzaile auresinaptikoa da, eta alde postsinaptikoan sintetizatzen diren eKBek aktibatzen dute. Bere jardueraren ondorioz terminal auresinaptikoko kaltzio-kanalak inhibititu eta potasio-kanalen kondukzioa emendatzen dira, besteak beste, sinapsi transmisioaren atzeranzko kontrolean parte hartzen duelarik.

Epilepsiadun pertsonen eKB sistemaren aldaketak gertatzen direla ikusi da. Adibidez, ikerketa batean behatu da orain dela gutxi LLE diagnostikatutako pazienteek anandamida-maila baxuagoa dutela likido zefalorrakideoan (Friedman eta Devinsky, 2015). Horrez gain, ikusi da epilepsiadun pertsonen hipokanpoan murrizten direla 2-AGren sintesi entzima (DAGL α), CB_1

hartailearen mRNA eta CB1 hartailearen terminal kitzikatzailen immunoerreaktibotasuna (Rosenberg et al., 2015).

Epilepsia-krisietan zehar neuronek jasaten duten gehiegizko kitzikapenak, askotan neurona horien funtzio galera edota zelula heriotza zitotoxikoa dakar (Walker, 2018). Azido kainikoaren (AK) animalia-eredu batean ikusi da eKBek babes funtzioa betetzen dutela: hipokanpoko CB₁R auresinaptikoa aktibatzen dute glutamatoaren gehiegizko askapena inhibitzeko eta, horrela, horrek dakarren exzitotoxikotasuna eragozteko (Rosenberg et al., 2017). Halaber, Guggenhuber eta kideek (2010) frogatu zuten bektore biralen bidez CB₁ hartailearen adierazpen mailak areagotuz, AKak hipokanpoan eragindako konbultsioen larritasuna eta heriotza zelularra murrizten direla. Beraz, CB₁ hartaileek krisi epileptikoak kontrolatu eta neuronak ondorengo heriotza zelularretik babes ditzakete.

Neurona-heriotzak gliosi errektiboa eragiten du. Hau da, neuronak kaltetzen diren eskualdeetan, astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia gertatzen da (Escartin et al., 2019). Astrozitoak funtzio estruktural, metaboliko eta homeostatiko anitzetan parte hartzen duten glia zelula mota bat dira. Astrozitoek ere CB₁ hartaileak aurkezten dituzte (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018) eta horien bidez neuronon arteko sinapsian modu aktiboan parte hartzen dute, sinapsi tripartittoa deritzon mekanismoaren bitartez (Navarrete eta Araque, 2008; Perea et al., 2009). Coiret eta lankideek (2012) ikusi dute astrozitoen CB₁ hartaileen aktibazioak neurona kitzikatzailen erantzuna emendatzen duela, epilepsia-krisiak denbora luzeagoan zehar mantentzen direlarik. Gainera, epilepsiadun pazienteetan ikusitako memoria urritasunekin lotuta egon litezke. Izan ere, hipokanpoko astrozitoen CB₁ hartaileek erregulatzen dute N-metil-D-aspartato (NMDA) hartaileentzako D-serina hornidura. Prozesu hori beharrezkoa da LTPa (*Long-Term Potentiation*) eragiteko bai eta ezagutze-oroimenerako ere (Robin et al., 2018). Haatik, oraindik ez dago oso argi astrozitoek epilepsian eta epilepsiak eragiten dituen aldaketetan duten erantzukizuna.

Epilepsiaren aurkako tratamendu nagusia konbultsioen aurkako medikamentuak dira (KAM). Gaur egun, farmako asko eskuragarri egon arren, pazienteen heren batek, gutxi gorabehera, ez dute lortzen konbultsioak kontrolatzea edo laster KAMen efektuekiko erresistente bilakatzen dira. Beraz, epilepsiaren aurkako tratamendurako estrategia berritzaileak garatzea premia da (Sanz eta Garcia-Gimeno, 2020). Azken urteotan, eKB sistemak neurona-sarearen kitzikagarritasunaren kontrolean duen berezko eginkizunak, interes farmakologikoa sortu du kannabinoideen erabileran oinarritutako epilepsiaren aurkako terapietan (Citraro et al., 2013; Monory et al., 2015). Horiek horrela, LLEren animalia-eredu batean eKB sistemak jasaten dituen aldaketak ezagutzea garrantzitsua da; izan ere, LLEren neuropatologian sakonduz, eKBetan oinarritutako farmakoak garatu eta horien efektuak ulertu ahalko ditugu.

1.5. Helburuak

Ikerketa honen helburua, alde batetik, loki-lobuluko epilepsiaren animalia-eredu batean hipokanpoaren mendekoak diren portaeren aldaketak aztertzea da. Horrela, oroimenean eta habia egiteko gaitasunean dituen eraginak neurtuko dira. Beste alde batetik, maila zelularrean gertatzen diren aldaketak aztertuko dira, CB₁ hartailearen adierazpenean eta astrozitoetan gertatzen diren aldaketetan arreta jarritz. Mikroskopia elektronikorako teknika

immunozitokimikoak erabiliko dira astrozitoetan gertatzen diren CB₁ hartzailaren aldaketak zehazteko.

2. MATERIALA ETA METODOAK

2.1. Animaliak

8 asteko 36 C57BL/6j sagu ar heldu (Janvier-labs) erabili ziren esperimentuak egiteko. Saguak banaka gorde ziren plexiglasezko kutxa estandarretan (17 cm x 14,3 cm x 36,3 cm) eta esperimentuak egin baino lehen, gutxienez, aste 1 eduki zuten ingurunera girotzeko. Animaliak esperimentu guztietan zehar egoera estandarretan mantendu ziren, tenperatura konstantea (22 °C) zen gela batean, eta janaria eta ura *ad libitum* izan zutelarik. Saguak 12/12 h argitasun/iluntasun ziklo batean mantendu ziren, 21:00etan iluntasun fasean sartzen zirelarik. Portaera-probak saguen argitasun fasean zehar egin ziren, 9:30etik 15:00etara bitartean.

Esperimentuak Sinapsiaren neuroanatomia funtzional eta ultraestrukturalaren laborategian egin ziren, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Medikuntza eta Erizaintzako fakultateko Neurozientziak Sailean. Animaliekin egiten den Esperimentaziorako Etika Batzordeak erabilitako protokolo guztiak onetsi zituen (CEEA/M20/2020/109), zeinak bat datozen Europar Batasunaren Kontseiluaren 2010eko irailaren 22ko Zuzentarauarekin (2010/63/UE) eta espainiar erregulazioarekin (53/2013 Errege Dekretua, 2013-02-08ko BOE). Ahalegin guztiak egin ziren animalien mina eta sufrimendua minimizatzeko, bai eta erabilitako animalien kopurua txikiagotzeko ere. Esan beharra dago, animaliekin lan egiteko akreditazio berezi bat beharrezkoa denez, animalien maneia eskatzen zuen prozedura oro, hau da, azido kainikoaren administrazioa, portaera-probak eta perfusioa, beste ikertzaile baten laguntzarekin egin zela.

2.2. Krisi exzitotoxikoen azido kainikoaren (AK) eredia:

Krisi exzitotoxikoen AKaren eredia asko erabiltzen da LLE eredu bezala. Izan ere, kainatoa AMPA eta AKren glutamato hartzailen agonista da eta kitzikapenaren eta inhibizioaren arteko desoreka eragiten du (Falcón-Moya et al., 2018; Nirwan et al., 2018). AKak sortzen dituen konbultsioek giza LLEren ezaugarrien antzekoak diren neurona galera, astrogliosisia eta hipokanpo esklerosisia eragiten dituzte (Falcón-Moya et al., 2018). Horrela, AKren ereduak epileptogenesiaren azpian dauden mekanismo molekularrak, zelularrak eta farmakologikoak ulertzen lagundu du, LLE jasaten duten pazienteetan ikusten diren ezaugarri neuropatologikoak eta elektroentzefalografikoak erakusten baititu (Lévesque eta Avoli, 2013).

2.2.1. Azido kainikoaren (AK) peritoneo barruko administrazioa

Saguei (n = 36) azido kainikoa (AK) administratu baino lehenago, animaliek egokitze-fase bat eduki zuten egoerak eragin zitzakeen estresa eta antsietatea txikitzeko. Egokitze-faseak bi egun iraun zituen. Lehenengo, saguak injekzioak egingo ziren gelara eraman ziren (tenperatura eta aire-fluxua kontrolatuta zeuden bertan) giro berrira ohitzeko. 30 minutu pasa eta gero, guztiei gatz-soluzioa (NaCl 0,9%) peritoneo barrutik injektatu zitzaizkien. Modu horretan, hartuak

izatera eta zitzadara ohi zitezen lortu nahi zen. Animaliak bi orduz utzi ziren gela horretan eta, ondoren, euren jatorrizko gelara eraman ziren.

Hirugarren egunean, prozedura berdina jarraitu zen baina batzuei kainatoa eman zitzaien. Saguak, ausaz, bi taldetan bereizi ziren: kontrol taldea (n = 10) eta AK taldea (n = 26). Kontrol taldeari, aurreko egunetan bezala, soluzio fisiologikoa injektatu zitzaion. AK taldeari, ordea, azido kainikoa (25mg/kg) 10 ml gatz-soluzioan diluituta eman zitzaion.

Egokitze-fasea zein AKren administrazioa saguen argitasun fasean zehar eta eguneko ordu berean egin ziren.

2.2.2. Krisien larritasunaren neurketa

AKren administrazioaren hurrengo bi orduetan saguak ebaluatu ziren. Krisien larritasuna 10 minuturo ebaluatu zen Racineren eskala egokitu bat jarraituz. Racinek eskala bat (RE) garatu zuen amigdalaren estimulazio-ereduan konbultsioak ebaluatzeke, konbultsio motorren garapenaren eta EEGan gertatzen diren aldaketen arteko lotura ezarriz (1972). Gaur egun, oraindik ere RE erabiltzen da, eta maiz epilepsia- eta konbultsio-eredu ezberdinetara moldatzen da (Vinogradova eta van Rijn, 2008; Lüttjohann et al., 2009).

1 Taula. Krisi epileptikoen intentsitate-maila neurtzeko erabilitako Racineren eskala (RE).

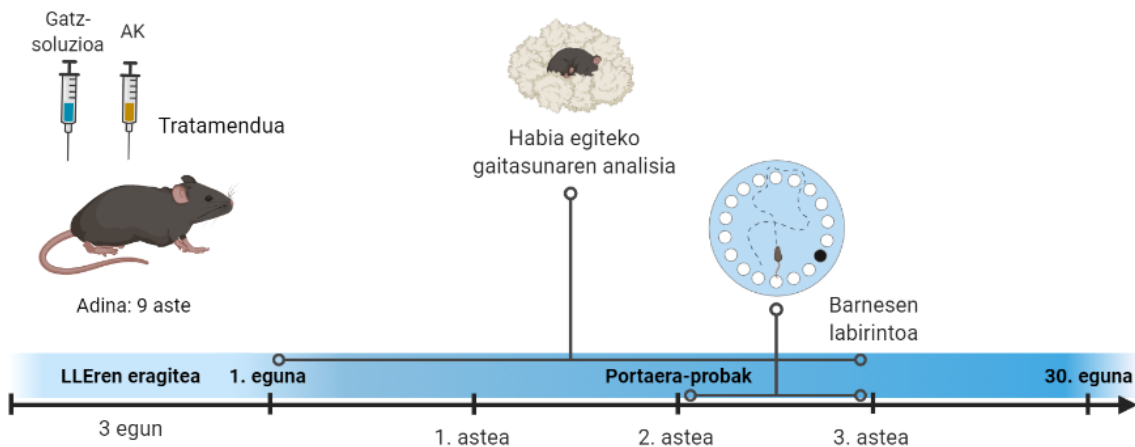
Intentsitate-maila	Sintomak
1	Mugiezintasuna eta begirada finko mantentzea
2	Buztanaren tentetzea eta aurreko gorputz-adarren klonusa
3	Altxatzea eta mugimendu errepikakorrak erakustea
4	Altxatzea eta erortzea
5	Etengabe altxatzea eta erortzea
6	Krisi tonikoklonikoak gorputz-jarrerara galerarekin, korrika basatia eta saltoak ematea
7	Heriotza

Racineren eskala eraldatuan zazpi intentsitate-maila definitu ziren, animaliek jasandako sintometan oinarrituta (1. Taula). Animaliek aldi bakoitzean eskuratutako intentsitate baliorik altuena hartu zen kontuan analisisa egiteko.

AK kantitate berdina (25mg/kg) jaso zuten animaliek intentsitate-maila desberdineko krisiak pairatu zituztenez, eta laborategiko aurretiko beste ikerketa batzuetako esperientzian oinarrituz, animalia horiek bi taldetan banatu genituen: Racineren eskalan 3tik beherako krisiak izan zituztenak (RE < 3) eta 3tik gorakoak izan zituztenak (RE > 3). Gainera, krisien intentsitatearen neurketan zehar 6 sagu hil ziren (hilkortasun-tasa = %23) Beraz, azkenean, ikerketa 3 talde esperimentaletan banatutako 30 sagurekin burutu zen: kontrolak (n = 10), RE < 3 (n = 10) eta RE > 3 (n = 10).

2.3. Portaera-probak

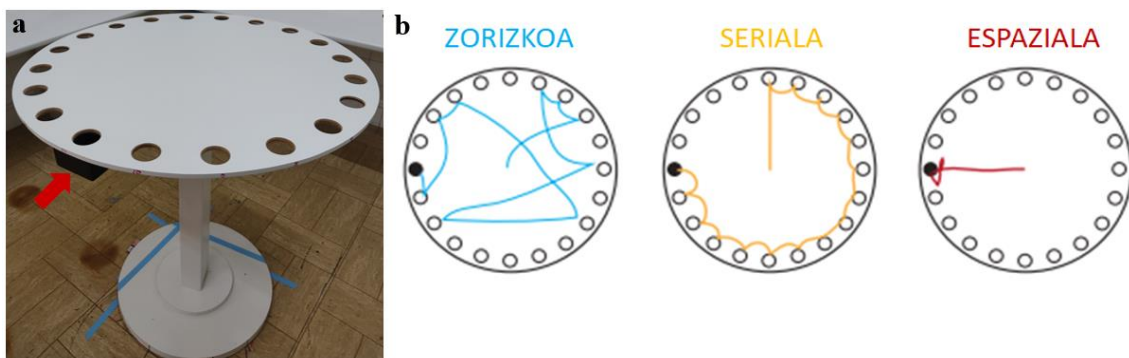
Epilepsia-krisiek hipokanpoaren mendekoak diren portaeretan izan ditzaketen eraginak neurtzeko portaera-probak burutu ziren (3. irudia). Alde batetik, AKren injekzioaren egunetik bi astera, Barnesen labirintoaren testa egin zen memoria-espaziala aztertzeke; eta beste alde batetik, AKren administrazioaren egunaren osteko hiru asteetan zehar saguen habia egiteko gaitasuna aztertu zen.



3. irudia. AKaren administrazio-egunaren ondorengo 30 egunetan zehar saguekin egin ziren portaera-proben kronograma. Injekzio-egunetik (0 eguna) bi astea Barnesen labirintoaren testa burutu zen. Bestalde, administrazio-egunaren hurrengo hiru asteetan zehar saguen habiak aztertu ziren. Saguak 30. egunean perfundu ziren.

2.3.1. Barnesen labirintoa: oroimen- eta estrategia- espazialaren testa (BL)

Barnesen labirintoa (BL) saguen memoria espaziala aztertzeko ingurune lehorreko portaera-proba da (Bach et al., 1995). Oroimen mota hori hipokanpoaren mendekoa da. Saguek ihes-kutxa finko baten eta inguruan kokaturiko ikusmen-seinaleen arteko lotura ikasten dute. Rueda-Orozco eta lankideek (2008) deskribatutako BLrako egokitutako protokolo bat erabili zen proba honetan. Horrela, perimetroan zehar 20 zulo banatuta dituen plataforma zirkular goratua erabili zen (4a. irudia). Ihes-kutxa zulo baten azpian finkatu zen eta gainerako 19 zuloak hutsik utzi ziren (4a. irudia). Saguek argi distiratsua eta eremu ireki altuak higuin dituztenez, labirintoaren altueraren diseinua eta gaineko argiztapen-iturria izan ziren ihesa eragiteko faktore motibatzaileak. Ihes-kutxa eta laguntza bisualak leku berdinean mantendu ziren saiakuntza osoan zehar. Sagu bakoitzarekin egunero 4 proba egin ziren 5 egunetan zehar. Saguek ihes-kutxa aurkitzeko hiru bilaketa-estrategia sekuentzia erabili ohi dituzte: zorizkoa, seriala eta espaziala (4b. irudia).



4. irudia. a) Barnesen labirintoaren egitura eta ihes-kutxaren kokapenaren adibide bat (gezi gorria); eta b) saguek ihes-kutxa aurkitzeko erabiltzen dituzten 3 bilaketa-estrategia sekuentzien irudikapena.

Probak baldintza berdinetan burutu ziren; gela berean, beti ere saguen argi fasean eta denbora-tarte berean. Horrez gain, saiakerak hasi baino 30 minutu lehenago, animaliak portaera-proba burutuko zen gelara lekualdatzen ziren, girora egoki zitezen. Saiakuntza denak bi behatzailek kontrolatu zituzten eta Any-maze softwarearen bitartez grabatu ziren. Lehenengo proban, saguak ihes-kutxan minutu batez mantendu ziren hau berau ezagutu zezaten. Ondorengo saiakeretan, aldiz, saguak labirintoaren erdian ipini ziren eta labirintoa libreki

arakatzen utzi zitzairen 4 minutuz edo ihes-kutxa aurkitu arte. Usaimen-aztarnak ekiditeko, materiala EtOH % 70-arekin garbitu zen saiakuntza bakoitzaren aurretik.

Emaitzak hurrengo moduan kalifikatu ziren: 1) estrategiarik gabe (EG): ihes-kutxa ez zen esplorazioaldian aurkitu; 2) zorizko estrategia (ZE): ihes-kutxa ausazko bilaketa baten ondoren aurkitu zen, hainbat zuloren miaketa eta gero; 3) estrategia seriala (ES): segidan kokaturiko zuloak esploratu ondoren ihes-kutxa aurkitu zen; 4) estrategia espaziala (EE): saguak labirintoaren erditik, ikusmen-pistak baliatuz ihes-kutxa aurkitu zuen. Bestalde, proba bakoitzean, kutxan sartzeko beharrezkoa izan zitzairen denbora neurtu zen eta ihes-kutxa aurkitu arte aztertutako zuloak (erroreak) zenbatu ziren.

2.3.2. Habia egiteko gaitasunaren azterketa

Karraskarientzako habiak oso garrantzitsuak dira gorputz-tenperatura mantentzeko, harrapakarrietatik babesteko eta ugalketarako (Deacon, 2006). Habien eraikuntza hipokanpoaren medekoa da; izan ere, ikusi da hipokanpoko kalteak habia egiteko gaitasuna murrizten duela saguetan (Jirkof, 2014). Hori dela eta, kainatoaren administrazioak jarduera horretan eraginak izan ditzakeen aztertu egin da.

Habien eraikuntzarako erabilitako materiala paperezko zapiak izan ziren. Sagu bakoitzaren kutxan zapi bana jarri zen, tolestuta. Arestian esan bezala, habiak AKren administrazioaren egunaren osteko 3 asteetan zehar aztertu ziren, astean behin. Aldi bakoitzean, saguek ordura arte erabilitako zapia bildu zen eta berri bat jarri zitzairen. Analisisetan, paperezko zapien azaleraren azterketa egin da, saguek habiak eraikitzekeo papera zulutzen eta apurtzen baitute. Argazki-kamera (Panasonic Lumix) eta irudi digitalen analisirako ImageJ programa erabili ziren zapien azalera neurtzeko.

2.4. Immunohisto(zito)kimika teknikak

2.4.1. Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa

AKren administrazioaren egunetik 30 egunera, 17 sagu peritoneo barneko ketamina/xilazina nahasketa baten bidez (80/10mg/kg gorputz-pisua) sakonki anestesiatu ziren eta bihotzean zeharreko perfusioa egin zitzairen ezkerreko bentrikulutik. Lehenik, gatz fosfato-disoluzio bat pasarazi zen (0.1 M PBS, pH 7.4) giro tenperaturan 20 segundoz, eta, ondoren, hurrengo osagaiak zituen hoztutako disoluzio finkatzailea pasarazi zen: %4 formaldehidoa (unean paraformaldehidotik despolimerizatua), % 0.2 azido pikrikoa eta %0.1 glutaraldehidoa, dena fosfato-gatzekeo disoluzioan disolbatuta (0.1 M PBS, pH 7.4). Gero, garunak kontu handiz garezurretik atera ziren, eta ondoren, aste batez, finkatze-soluzioan murgildu ziren, 4°C-tara mantendu zirelarik. Ondoren, garunak 0.1 M-eko tanpoi fosfatozko (TF) disoluzio finkatzaile diluitu batean (4 °C-tan) biltegitatu ziren, horiek erabili ziren arte. Disoluzio horri % 0.025 sodio azida gehitu zitzaion kontserbaziorako.

2.4.2. Antigorputzak

Antigorputz primarioak dagozkien antigorputz sekundarioekin konbinatuta erabili ziren argi mikroskopiarako immunoperoxidasa metodorako, eta mikroskopia elektronikorako

erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinaturako. 2. eta 3. tauletan erabilitako antigorputzak azaltzen dira.

2 Taula. Immunozitokimika teknikan erabilitako antigorputz primarioak eta horien ezaugarriak.

Antigorputza	Kontzentrazioa	Fabrikatzailea; espezia; mota, katalogo zenbakia; RRID
Anti-cannabinoid receptor type-1 (CB ₁)	2 µg / ml IHC	Frontier Institute co., ltd; ahuntza, poliklonala; CB1-Go-Af450; AB_2571592
Anti-cannabinoid receptor type-1 (CB ₁)	2 µg / ml IHC	Frontier Institute co., ltd; akuria, poliklonala; CB1-GP-Af530; AB_2571593
Anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP)	20 ng/ ml IHC	Sigma-Aldrich; sagua, monoklonala; G3893; AB_257130
Anti-glutamate/aspartate transporter (GLAST)	0,6 mg/ ml IHC	Untxia, poliklonala; anti-A22 rabbit 8D0161; AB_2314561

3 Taula. Immunozitokimika teknikan erabilitako antigorputz sekundarioak eta horien ezaugarriak.

Antigorputza	Kontzentrazioa	Fabrikatzailea; katalogo zenbakia; RRID
Biotinilatutako saguaren aurkako antigorputza	7,5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA-2000; AB_2313581
Biotinilatutako ahuntzaren aurkako antigorputza	7,5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA-5000; AB_2336126
1.4 nm-tako urre partikulari atxikitutako akuriaren aurkako IgG antigorputza (Fab' zatiarekin)	0.8 µg/ ml ICH	Nanoprobes Inc; Cat-2055; AB_2802149
Biotinilatutako untxiaren aurkako antigorputza	7,5 µg/ ml ICH	Jackson ImmunoResearch laboratories, inc.; Cat-711-506-152; AB_2616595

2.4.3. Argi mikroskopiarako Avidina-Biotina peroxidasa metodoa

Metodo immunohistokimiko honek avidina-biotina konplexua (ABC) erabiltzen du alde zurretik gehitutako antigorputz biotinilatutako sekundarioaren seinalea anplifikatzeko. Lehenik, antigorputz sekundario horrek intereseko proteina identifikatzeko erabiltzen den antigorputz primarioa ezagutu duelarik. ABC teknika hori, biotinari lotzen zaion peroxidasa eta avidina nahastean datza, eta erabiltzen den proportzio horretan, avidinari biotina lotzeko zenbait leku libre geratzen zaizkio. Antigorputz sekundarioaren biotina, avidinaren balentzia askeekin elkartzean, AB konplexuak eratzen ditu. Konplexu horiek elkarren segidan elkartzen dira, eta antigorputz sekundarioaren seinalea indartzen dute. Horrez gain, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) seinale hori ikusarazteko erabiltzen da. Kromogeno hori hidrogeno peroxidoa duen ingurune batean oxidatzen da, eta prezipitazio marroi gorrixka bat sortzen du. AB konplexuaren peroxidasa hidrogeno peroxidoaren deskonposizio-erreakzioa katalizatzen duenean eta oxigeno askeko espezieak eratzen dituztenean, prezipitazioa agertzen da. Positibo faltsuak

baztertzeke, aldi bereko kontrol negatiboak egin dira esperimentu guztietan. Protokoloan jarraitutako pausuak hurrengoak dira:

1. Burmuina bibrotomoz egindako 45 μm -ko lodierako koroa-ebaketetan moztu zen (Leica VT 1000s), eta giro tenperaturan (GT) 0,1 M-ko tanpoi fosfatoan (TF, pH 7,4) bildu ziren.
2. Hipokanpo ebakinak aurrez inkubatu ziren blokeo-soluzio batean utzi ziren 30 minutuz GTn: % 10 behi albumina (BSA), % 0,1 sodio azida, eta % 0,5 X-100 tritoidituen tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-disoluzioan (TBS 1X, pH 7,4).
3. Ondoren, ebakinak dagokien antigorputz primarioan inkubatu ziren (2. taula). Blokeo-soluzioan prestatu ziren, eta 2 egunez 4°C-tan emeki mugitzen mantendu ziren, blokeo-soluzioan soilik inkubatutako kontrol negatiboekin.
4. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen (30 minutuz), gehiegizko antigorputza kentzeko garbiketa-soluzio bat erabiliz: BSA % 1ean eta X-100 tritoidia % 0,5ean, 1X TBSn disolbatuta.
5. Ebakinak garbiketa-soluzioan prestatutako antigorputz sekundario biotinilatuekin inkubatu ziren (1:200) (3. taula), ordubetez GTn, garbitzeko disoluzioan prestatuta, etengabeko mugimendu konstante batean.
6. Berriro ere, ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan.
7. Ebakinak avidina-biotina konplexuan (1:50; avidina-biotina peroxidasa konplexua, Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, AEB) inkubatu ziren ordu batez GTn, garbiketa-soluzioan prestatuta.
8. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen, lehenik garbiketa-soluzioan, eta azken garbiketarako 0,1 M TF eta % 0,5 X-100 tritoidia duen disoluzioa erabiliz egin ziren.
9. Ehunak 5 minutuz inkubatu ziren DABa % 0,05ean, hidrogeno peroxidoa % 0,01ean eta X-100 tritoidia % 0,5ean dituen 0,1 M TFFtan prestatutako disoluzioan.
10. Ehunak behin baino gehiagotan garbitu ziren X-100 tritoidi % 0,5eko proportzioan duen 0,1 M TF disoluzioan.
11. Laginak aldeztetik gelatinizatutako portetan muntatu ziren.
12. Ebakinak alkohol gradiente gorakor batean deshidratatu ziren, eta portak graduazio bakoitzean (50°, 70°, 96° eta 100°) 5 minutuz mantendu ziren.
13. Portak xilolez argitu ziren (3 x 5 min).
14. Ebakinak DPXa medio gisa erabiliz estali ziren. Azkenik, laginak aztertu eta argazkiak atera ziren Zeiss AxioCam mikroskopio konposatu batekin, mikroskopiora akoplaturiko Zeiss AxioCamHRc kameraren bidez.

2.4.4. Erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua mikroskopio elektronikorako

Teknika honetan, urrezko partikula nanometrikoak erabiltzen dira proteinen kokapena ultraegitura mailan deskribatzeko (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017, 2018; Puente et al., 2019). Ikerlan honetan, CB₁Rren kokapen zelularra deskribatzeko urrezko partikulen bidezko immunomarkaketa erabili da, eta astozitoak behatzeko, aldiz, peroxidasa bidezko immunomarkaketa. Horrek guztiak aldi bereko bi markaketa ahalbidetzen du. Ureztako partikulen tamaina txikiak (1,4 nm) ehunean sakonago sartzea errazten du, eta, beraz, metodoaren sentikortasuna handia da. Horrez gainera, antigorputza eta epitopoaren arteko lotura, osmio tetroxidoaren eraginpean egon aurretik eta erretxina tenperatura altuetan

polimerizatu aurretik gertatzen denez, erretxinan murgildu-aurreko metodoak mikroskopia elektronikoko beste metodo batzuek baino hobeto mantentzen ditu antigeno-antigorputz erreakzioak. Esperimentu bakoitzean aldi bereko kontrol negatiboak egin ziren.

Hurrengo protokoloa aplikatu zen:

1. Burmuina bibrotomoz egindako 45 μm -ko lodierako koroa-ebaketetan moztu zen (Leica VT 1000S), eta 0,1 M-ko tanpoi fosfatoan (TF, pH 7,4) bildu ziren GTn.
2. Hipokanpo ebakinak aurrez inkubatu ziren blokeo-soluzio batean 30 minutuz GTn: % 10 BSA, % 0,1 sodio azida, eta % 0,02 saponina dituen eta tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-soluzioan (TBS 1X, pH 7.4).
3. Jarraian, ebakinak dagokien antigorputz primarioan (2. Taula) inkubatu ziren. Horiek, blokeo-soluzio ezberdin batean (% 10 behi-serumaren albumina (BSA), % 0,1 sodio azida eta % 0.004 saponina dituen eta tris-hidrogeno kloruroarekin bahetutako gatz-disoluzioan (TBS 1X, pH 7,4)) prestatu eta 2 egunez 4°C-tan emeki mugitzen mantendu ziren, blokeo-soluzioan soilik inkubatutako kontrol negatiboekin.
4. Ehunak % 1 BSA duen TBS 1X gatz-disoluzioan prestatutako garbiketa-soluzio batekin garbitu ziren 30 minutuz.
5. Ebakinak nanourrea zuen antigorputz sekundarioan eta antigorputz sekundario biotinilatuan inkubatu ziren (3. Taula). Bi antigorputz sekundarioak % 1 behi-serumaren albumina (BSA), % 0,1 sodio azida eta % 0,004 saponina dituen 1X TBS (pH 7,4) blokeo-soluzio batean prestatu ziren, eta 4 orduz mantendu ziren GTn etengabeko mugimendu batean.
6. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan (TBS 1X eta % 1 BSA) 30 minututan zehar.
7. Ondoren, immunomarkaketa bikoitzen kasuan, prozesatutako ebakinak garbiketa-soluzioan prestatutako avidina-biotina konplexuarekin (1:50) inkubatu ziren 1,5 orduz, etengabeko mugimenduan GTn.
8. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan, eta gau osoan utzi zen azken garbiketari, 4°C-tan zegoen irabiagailu batean.
9. Ebakinak 1X TBStan prestatutako % 1eko glutaraldehidoarekin finkatu ziren 10 minutuz GTn.
10. Ur ultrapuruarekin hainbat aldiz garbitu ziren 30 minututan zehar.
11. Urrezko partikulen seinalea areagotu egin zen HQ zilar-kitarekin (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, AEB).
12. Ehunak ur ultrapuruarekin garbitu ziren 10 minutuz.
13. Azken garbiketarak 0,1 M TFFtan (pH 7,4) egin ziren 30 minutuz.

14. ehunak % 0,05 DABa eta hidrogeno peroxidoa % 0,01ean dituen 0.1 M TFFtan prestatutako soluzioan inkubatu ziren 5 minutuz GTn.
15. Tindatutako ebakinak 0,1 M TFFtan prestatutako osmio tetraoxidoarekin osmifikatu ziren 20 minutuz GTn.
16. Ehunak behin baino gehiagotan garbitu ziren 0,1 M TFFtan 30 minutuz.
17. Ebakinak deshidratatu egin ziran alkohol gradiente gorakor batean, 5 minutuz mantendu ziren graduazio bakoitzeko (50°, 70°, 96°) eta 15 minutuz 100°ekoan (3 aldiz 5') eta, azkenik, propileno oxidoarekin beste 15 minutuz (3 aldiz 5').
18. Sekzioak 1:1 proportzioa duen epoxi 812 erretxina eta propileno oxidoaren nahasketa batean murgildu ziren irabiagailu batean gau batez GTn.
19. Ebakinak Epon 812 erretxinan murgildu ziren 2 orduz etengabeko mugimendu batean GTn.
20. Ehunak 60°C-tan zegoen labean sartu ziren 48 orduz, erretxina polimerizatzeko.
21. 50 nm-ko lodierako ebakin ultrafinak ultramikrotomo batean moztu ziren (RMC Products, PowerTome XL) eta nikelzko sareetan bildu ziren.
22. Sareak % 2,5 berunezko zitratoan kontrastatu ziren 20 minutuz GTn.
23. Azkenik, laginak mikroskopia elektronikoan aztertu eta argazkiak atera ziren. JEOL JEM 1400 plus mikroskopia elektronikoa erabili zen, zeinak bere kamera propioa daukan. Eginiko argazkiak 8.000x handipeneko 16 argazkiz osaturiko konposizioak izan ziren, 300 μm^2 -ko azalera bat hartzen zelarik.

2.4.5. Azterketa kuantitatiboa

Bi animalia kontrol eta bi RE > 3 erabili ziren mikroskopia elektronikoaren bidezko azterketa egiteko. Immunohistokimika-teknikekin prozesatutako ehunen hipokanpoak behatu ziren mikroskopia konposatuan, eta bihurtune horzdunaren geruzak identifikatu ziren. Horrela, gure interesekoa zen barneko molekula-geruza isolatu genuen.

Aukeratutako eremuak CB₁R-ren eta GLASTaren immunomarkaketa ona eta erreproduzigarria zuen, eta ultraegitura ona erakutsi zuen kuantifikazio fidagarri baterako. Bestalde, analisiaren baldintzak are gehiago normalizatzeko, ehun sakoneraren lehen 1,5 μm -ak baino ez ziren behatu. Partikula metalikoak astrozitoen mintzetan zenbatu ziren. Astrozitoak zelula-profilen barruan GLASTaren immunomarkaketaren produktua agertzen dutelako identifikatu ziren, GLAST positibotzat jo zirelarik. Image J (Fiji) software librea erabili zen hurrengo parametroak neurtzeko: CB₁R-ren partikulen dentsitatea prozesu astrozitikoaren mintzetan; prozesu astrozitikoaren azalera, perimetroa eta kopurua; eta astrozitoek hartzen duten eremuaren ehunekoa. Software berberaren bidez mikroskopia optikoko neurketak ere egin ziren, hau da, CB₁ hartzailaren dentsitate optikoa eta astrozitoen azalera aztertu ziren.

2.5. Datuen analisisa

Emaitzak batezbesteko \pm S.E.M. moduan adierazi dira software estatistiko pakete bat (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB) erabiliz. Analisi estatistikoak burutu aurretik datuek normalitatea eta homogenizitatea betetzen zituzten edo ez egiaztatu zen. Datu guztiak, komeni izan denaren arabera, T Student testaren eta bide bateko edo bi bideko ANOVA analisiaren bitartez aztertu ziren hiru talde esperimentalen elkarrekintza aztertzeko. Datuen normaltasuna betetzen ez zen kasuetan, test ez-parametrikokoak egin ziren: Kruskal-Wallis eta Mann-Whitney. $p < 0,05$ balioak estatistikoki adierazgarritzat jo dira.

3. EMAITZAK

3.1. Portaera-probak

3.1.1. Barnesen labirintoa (BL)

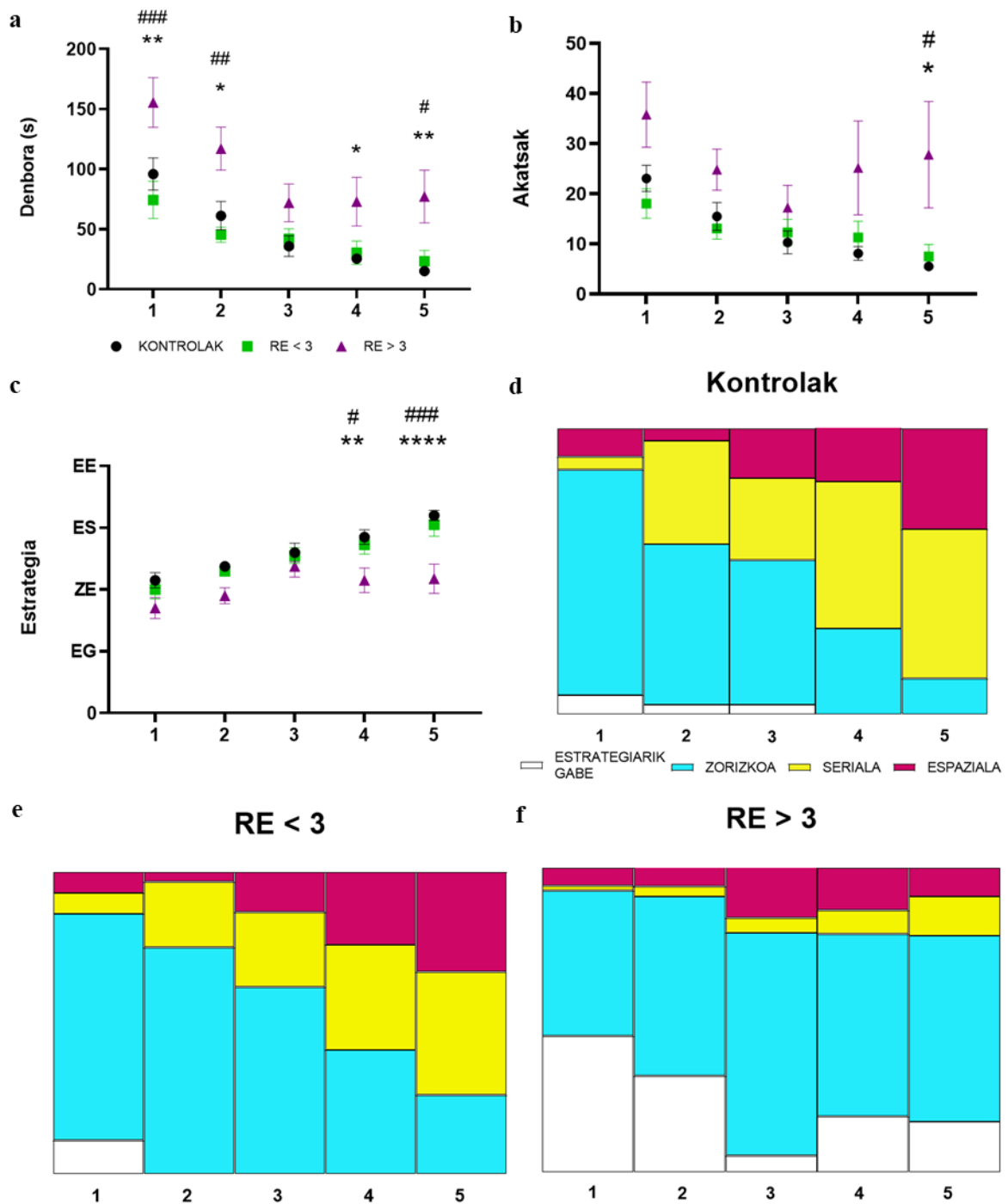
BL proban, sagu taldeek ihes-kutxa aurkitzeko behar izandako denboran desberdintasun adierazgarriak behatu dira (5a. irudia). Izan ere, RE > 3 saguek, batez beste, $98,92 \pm 16,43$ segundo behar izan dituzte eta kontrolek eta RE < 3 saguek, ordea, $46,80 \pm 14,48$ eta $43,03 \pm 8,767$ segundo hurrenez hurren ($p = 0.0395$). Hau da, epilepsia-krisi larriak jasan zituzten saguek bi aldiz denbora gehiago behar izan dute ihes-kutxa aurkitzeko. Kontrolen eta RE < 3 kainatoen arteko ezberdintasunak ez dira esangarriak ($p > 0,05$). Ihes-kutxa topatzeko egindako akatsetan ere alde nabarmena ikusi ahal da taldeen artean (5b. irudia). Bai kontrolek ($12,52 \pm 3,106$ akats eguneko) bai RE < 3 saguek ($12,45 \pm 1,69$) RE > 3 kainatoek ($26,18 \pm 2,98$) baino bi aldiz akats gutxiago egin dituzte eguneko ($p = 0,0103$). Kontrolen eta krisi epileptiko arinak jasan dituzten saguen arteko ezberdintasunak ez dira adierazgarriak ($p > 0,05$).

Erabilitako estrategiari dagokionez ere desberdintasun esanguratsuak behatu dira talde esperimentalen artean (5c-3f. irudiak). Horrela, kontrolek probaren azken egunean erakutsitako estrategiak hurrengoak izan dira: % 0 EG, % 12,5 ZE, % 52,22 ES eta % 35,28 EE (5d. irudia); RE < 3 saguek: % 0 EG; % 26,11 ZE; % 40,83 ES eta % 33,06 EE (5e. irudia); eta RE > 3 saguek: % 16,67 EG, % 61,11 ZE, % 12,78 ES eta % 9,44 EE (5f. irudia). Hots, RE > 3 kainatoek ihes-kutxa zoriz aurkitzen dute oro har, eta kontrolek eta RE < 3 saguek, aldiz, bilaketa-estrategia konplexuagoak garatzen dituzte.

Beraz, emaitza horiek guztiak aditzera ematen dute krisi larriak izan dituzten saguek oroimen espaziala kaltetuta dutela, oro har ihes-kutxa ausaz topatzen baitute. Kontrolek eta RE < 3 kainatoek, berriz, oroimen espaziala daukate, ihes-kutxaren kokapena ikasten dute eta.

3.1.2. Habia egiteko gaitasunaren analisia

Habia egiteko gaitasunari dagokionez, ezberdintasun adierazgarriak ikusi dira taldeen artean (6. irudia). AKren administratziotik egun batera, habien eraikuntzarako erabilitako paperezko zapien azalera alde nabarmena dago (6b. irudia). Alde batetik, kontrolek (habiaren azalera % $64,80 \pm 6,173$) RE < 3 (% $84,28 \pm 2,46$) eta RE > 3 saguek (% $98,33 \pm 0,40$) baino gehiago eraldatu zuten paperezko zapia ($p = 0,0033$ eta $p < 0,0001$ hurrenez hurren). Beste alde batetik, AK jaso zuten taldeen artean ere desberdintasuna esanguratsua da ($p = 0,029$).

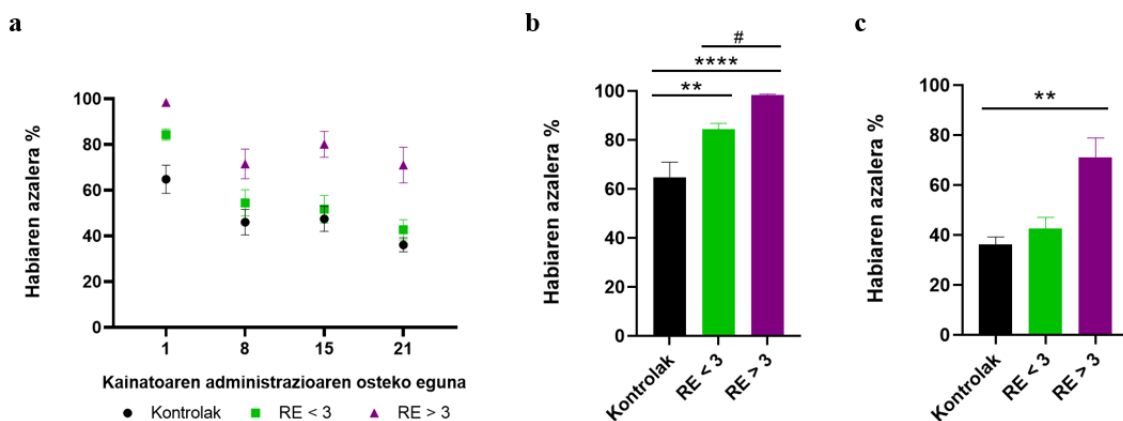


5. irudia. Barnesen labirintoaren emaitzak: **a)** Saguek ihes-kutxa aurkitzeko behar izandako denbora (segundotan). Bi bideko ANOVA. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$. # RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$. **b)** Ihes-kaxa topatzeko egindako errore kopurua. Bi bideko ANOVA. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. **c)** Saguek egun bakoitzean erabili duten batez besteko estrategia. Bi bideko ANOVA. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$. **d-f)** Talde esperimental bakoitzak egunero erabili duen bilaketa-estrategia bakoitzaren ehunekoa. d: kontrolak (n = 10), e: RE < 3 (n = 10) eta f: RE > 3 (n = 10).

Epilepsia-krisi arinak izan zituzten saguen kasuan, behin AKren efektua pasa zitzairenean, kontrolen antzeko gaitasuna erakutsi zuten habia egiteko ($p > 0,99$) (6a. irudia). Krisi larriak izan zituztenek, ordea, ez zuten hobera egin asteak pasa ahala (6a. irudia). Horrela, AKren injektiozik hiru astera, RE > 3 saguek nekez eraldatu zuten paperezko zapia (habiaren azalera % $71 \pm 7,79$)

kontrolekin konparatuta (% $36,12 \pm 3,08$) ($p = 0,0078$). RE < 3 saguekin (% $42,68 \pm 4,41$) alderatuz, antzeko joera ikusi ahal da ($p = 0,055$) (6c. irudia).

Hortaz, emaitzek aditzera ematen dute epilepsia-krisi larriek hipokanpoaren mendekoa den habia egiteko gaitasuna kaltetzen dutela. Izan ere, oro har RE > 3 saguek nekez eraldatzen dute paperezko zapia habia eraikitzeke. Gainera, AKak berak ere gaitasun horri eragiten dio, lehenengo egunean RE < 3 saguek ere habia egiteko zailtasunak aurkezten baitituzte. Hala ere, kainatoaren efektua iragankorra da.



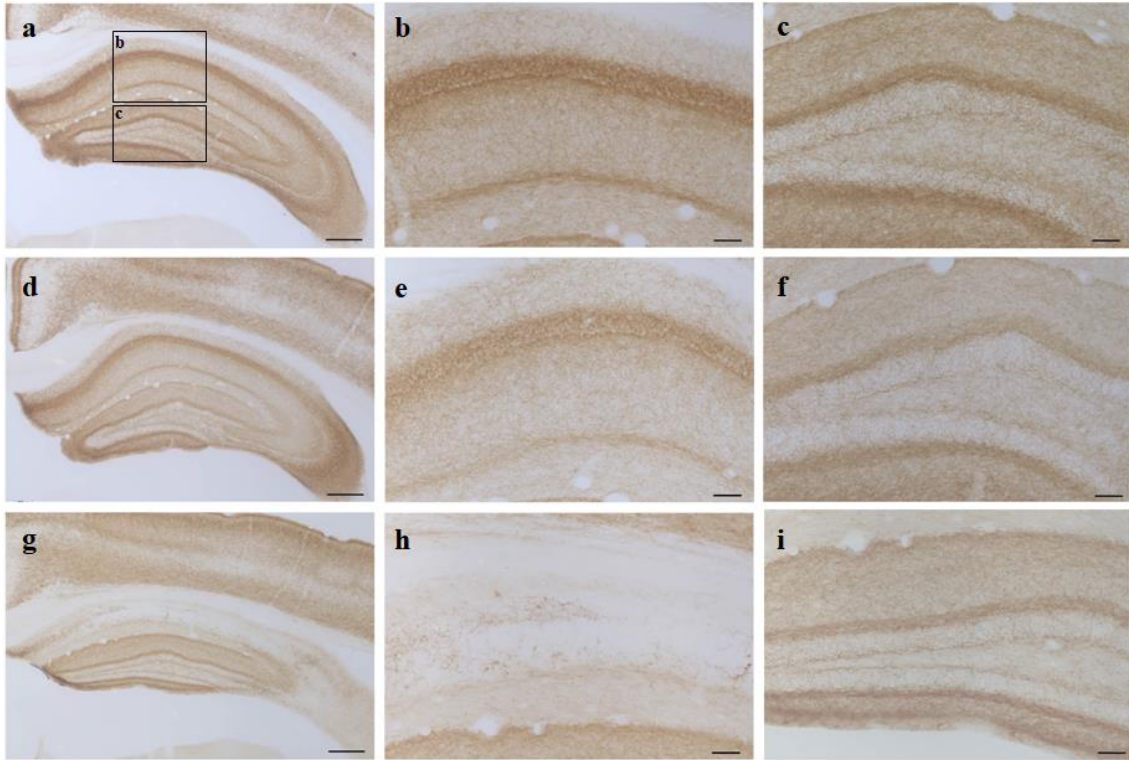
6. irudia. Habia egiteko gaitasunaren analisiak: **a)** Habiaren azalera (%) AKren injekzioaren hurrengo hiru asteetan zehar. Bi bideko ANOVA. **b)** Habiaren azalera (%) AKren administraziotik egun batera. Bide bateko ANOVA. * Esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz: ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$. # Esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz: # $p < 0,05$. **c)** Habiaren azalera (%) KAREN injekzio egunetik 21 egunera. Bide bateko ANOVA. ** $p < 0,01$. $n = 27$: kontrolak ($n = 7$), RE < 3 ($n = 8$) eta RE > 3 ($n = 8$).

3.2. CB₁ hartzaillearen immunohistokimika eta dentsitate-aldaketaren neurketa

CB₁ hartzaillearen immunotindaketa argi mikroskopiaren bidez aztertu da (7. irudia). Espero zen bezala CB₁ hartzaillearen immunotindaketa hipokanpoaren eskualde eta geruza gehienetan ageri da. Markaketa nabarmenena *Cornu Ammonis* (CA) eremuaren piramidegeruzaren inguruetan, *stratum radiatum*-ean eta *oriens*-ean eta bihurgune horzduneko molekula-geruzan agertzen da tratatu gabeko animalietan. Tindaketa horren erantzule nagusia bukaera sinaptiko inhibitzaileetan duen adierazpena bada ere, ezin dugu ahaztu bukaera kitzikatzailleetan, astrozitoetan eta mitokondrietan duen kokapena (Benard et al., 2012; Etienne Hebert-Chatelain et al., 2016; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018). Desberdintasun nabarmenak ikus daitezke RE > 3 kainatoen hipokanpoaren CA1 eskualdean, non tindaketa askoz ere eskasagoa den (7g. eta 7h. irudiak). Piramide-zelulen geruza ia guztiz desagertu da, eta zaila da *stratum oriens* eta *stratum radiatum* desberdintzea (7h. irudia). Bihurgune horzdunearan ere tindaketa argiagoa da, molekula-geruzan batez ere (7i. irudia). Hala ere, CA1 eskualdean ikus daitezke ezberdintasun handienak.

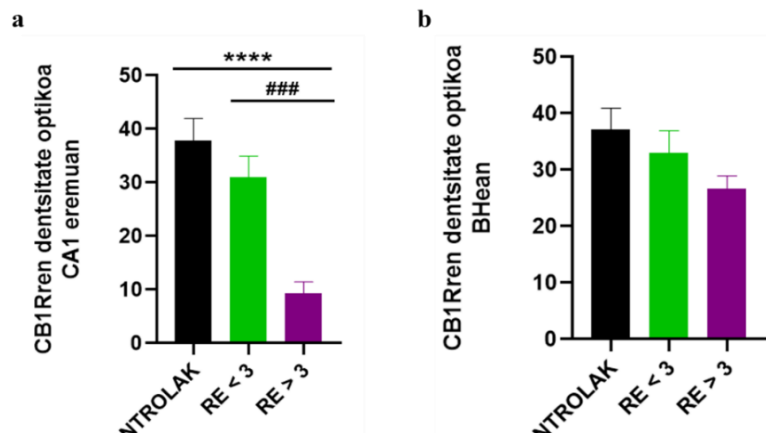
RE < 3 kainatoek, soluzio fisiologikoa jaso zutenekin alderatuz, tindaketa argiagoa aurkezten dute ere, baina desberdintasunak ez dira horren nabariak (5d.-5f. irudiak).

CA1 eskualdean, CB₁ hartzaillearen dentsitate optikoari dagokionez, ezberdintasun esangarriak behatu dira animalia taldeen artean ($p < 0,0001$ eta $p = 0,0005$ hurrenez hurren) (8a. irudia). Izan ere, kontroletan ($37,75 \pm 4,24$) eta RE < 3 kainatoetan ($31,05 \pm 3,89$) CB₁Rren



7. irudia. CB₁ hartzailerearen immunotindaketa sagu talde desberdinen burmuinean: a-c kontrola, d-f RE < 3 kainatoa eta g-i RE > 3 kainatoa. **a, d, g:** CB₁Rren immunotindaketa hipokanpo osoan. **b, e, h:** immunotindaketa CA1 eskualdean. **c, f, i:** immunotindaketa bihurtune horzdunean. Eskala barrak: 1000 μm a, d eta g-n; 200 μm gainerakoetan.

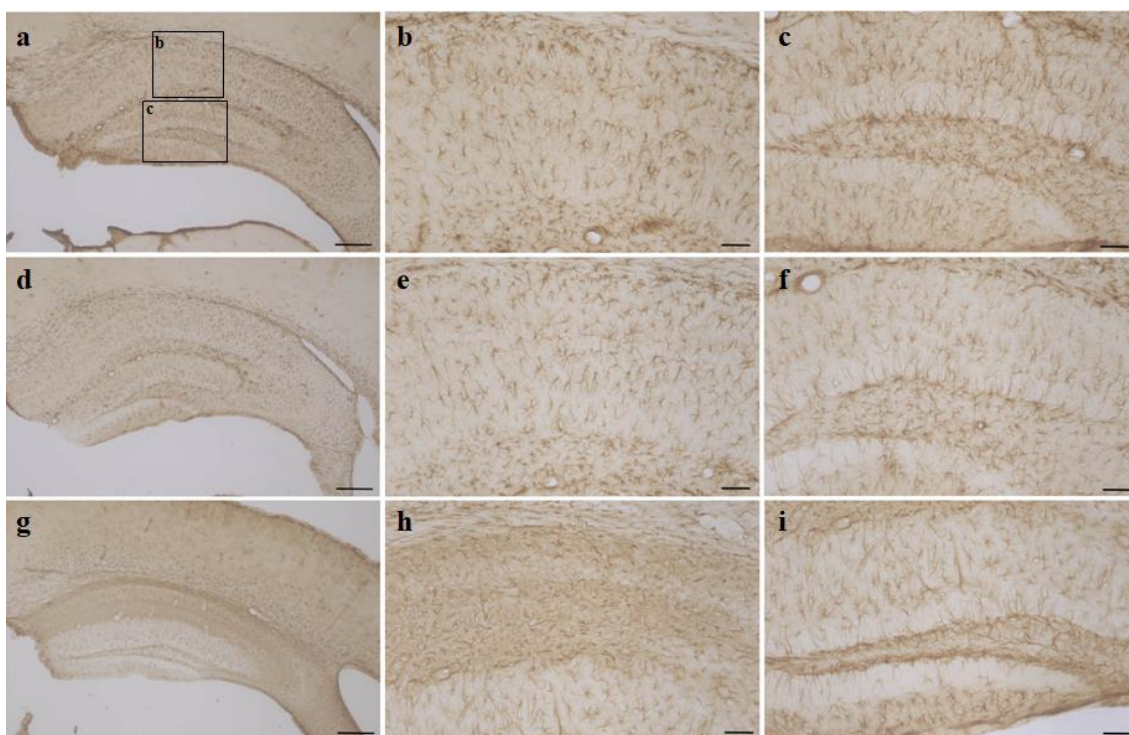
dentsitatea RE > 3 kainatoen ($9,32 \pm 2,14$) dentsitatearen hirukoitza da. Bihurtune horzdunean, ordea, ez dira desberdintasun adierazgarriak ikusi ($p > 0,05$) (8b. irudia). Hala ere, RE > 3 saguek ($26,71 \pm 2,22$) kontrolek ($37,21 \pm 3,74$) baino CB₁ hartzaille gutxiago adierazteko joera aurkezten dute ($p = 0,10$). Aldaketa horiek guztiak erakusten dute RE n 3tik gorako ezaugarriak azaleratzen dituzten animaliek CB₁ hartzailerean aldaketa bortitzak erakusten dituztela AK jaso eta hilabetera. Kainato kantitate berdina jaso zuten baina RE 3tik beherako ezaugarriak agertu zituzten animaliek, aldiz, esanguratsuak ez diren aldaketak jasan dituzte CB₁aren adierazpenean.



8. irudia. CB₁ hartzailerearen dentsitate optikoaren neurketak: a) CB₁R dentsitatea $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko, CA1 eskualdean. Bide bateko ANOVA. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz: **** $p < 0,0001$. # RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz: ### $p < 0,001$. b) CB₁R dentsitatea $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko, bihurtune horzdunean (BH). Kruskal-Wallis testa. $p > 0,05$. n = 16: kontrolak (n = 5), RE < 3 (n = 5) eta RE > 3 (n = 6).

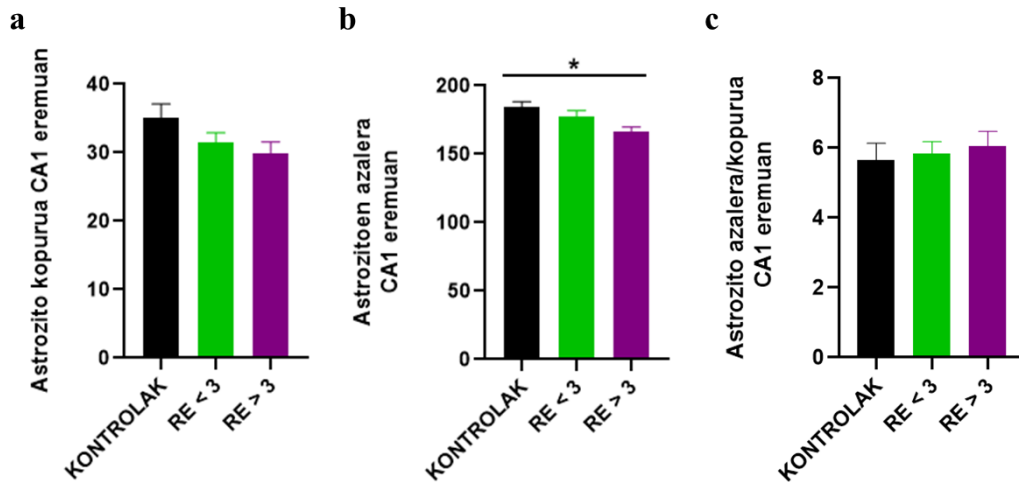
3.3. GFAPren immunohistokimika eta astrozitoen analisia

Astrozitoen GFAPren immunotindaketa argi mikroskopiaren bidez aztertu da (9. irudia). Kontrolak eta $RE < 3$ kainatoek antzeko tindaketa erakusten dute (9a. eta 9d. irudiak). Bi taldeetan astrozitoek forma eta antolamendu berdintsuak dituzte bai CA1ean baita bihurgune horzdunean ere (9a.-9f. irudiak). Alabaina, $RE > 3$ kainatoetan astrozitoak desitxuratuta agertzen dira, CA1ean batik bat (9h. irudia). Izan ere, zaila da zelula horien bereizgarria den izar itxura antzematea. Horrez gain, ez dute aurreko bi taldeetan ikus daitekeen antolamendua erakusten. Bihurgune horzdunean GFAP tindaketa argiagoa dela ikus daiteke, baina desberdintasunak ez dira CA1ean bezain begi-bistakoak (9i. irudia). Beraz, horrek guztiak iradokitzen du krisi epileptiko larriek astrozitoen morfologian eta antolamenduan aldaketak eragin dituztela, behintzat CA1 eskualdean.



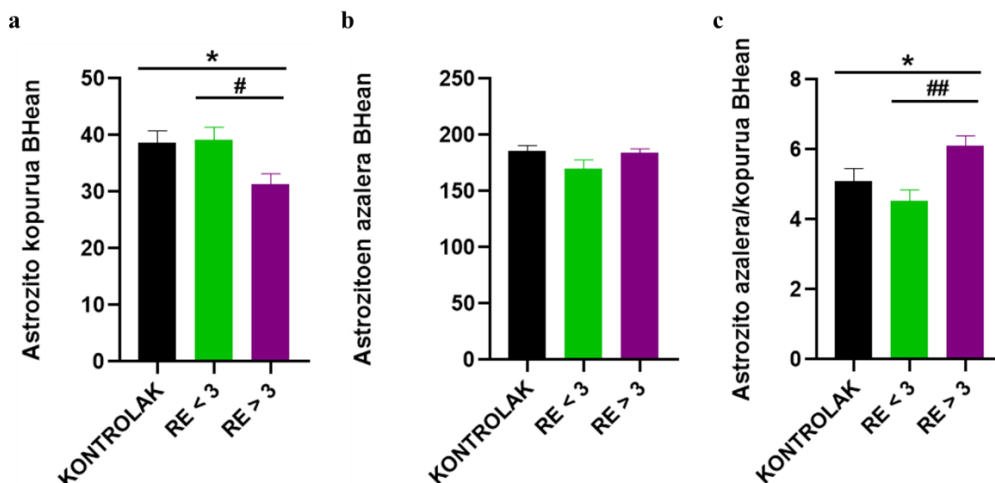
9. irudia. GFAP ren immunotindaketa sagu talde desberdinen burmuinean: a-c kontrola, d-f $RE < 3$ kainatoa eta g-i $RE > 3$ kainatoa. a, d, g: GFAPren immunotindaketa hipokampo osoan. b, e, h: immunotindaketa CA1 eskualdean. c, f, i: immunotindaketa bihurgune horzdunean. Eskala barrak: $1000 \mu\text{m}$ a, d eta g-n; $200 \mu\text{m}$ gainerakoetan.

Astrozito kopuruari dagokionez (10a. irudia), ez da desberdintasun esanguratsurik behatu hiru taldeen artean CA1 eskualdean ($p > 0,05$). Hau da, hirurek astrozito kopuru berdintsuak aurkezten dituzte. Astrozitoen azaleraren kasuan, berriz, ezberdintasun adierazgarriak ikus daitezke kontrolen ($184,1 \pm 4,39$) eta $RE > 3$ saguen artean ($166,2 \pm 3,62$) ($p = 0,013$) (10b. irudia). Azkenik, astrozito azalera astrozito kopuruarengatik zatitzerakoan, hiru taldeek balio berdintsuak aurkezten dituzte ($p > 0,05$) (10c. irudia). Hortaz, epilepsia-krisi larriak pairatu zituzten saguen CA1 eskualdean astrozitoek azalera txikiagoa hartzen dute.



10. irudia. Astrozitoen analisiak CA1 eremuan: a) Astrozito kopurua $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko. Bide bateko ANOVA. $p > 0,05$. b) Astrozitoen azalera $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko. Bide bateko ANOVA. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz: * $p < 0,05$. c) Astrozitoen azalera/kopurua $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko azaleran. Kruskal-Wallis testa. $p > 0,05$. n = 16: kontrolak (n = 5), RE < 3 (n = 5) eta RE > 3 (n = 6).

Bihurgune horzdunean, CA1ean ez bezala, hiru taldeen artean alde nabarmena behatu da astrozito kopuruan (11a. irudia). Izan ere, RE > 3 saguen ($31,39 \pm 1,79$) astrozito kopurua murrizten da kontrolekin ($38,67 \pm 2,08$) eta RE < 3 kainatoekin ($39,20 \pm 2,18$) konparatuz ($p = 0,025$ eta $p = 0,023$ hurrenez hurren). Astrozito azalera, aldiz, berdintsua da kontrol eta kainatoetan ($p > 0,05$) (11b. irudia). Azkenik, astrozito azalera astrozito kopuruagatik zatitzean ezberdintasun esangarriak ikusi dira taldeen artean (11c. irudia). Krisi larriak jasan dituzten saguek ($6,11 \pm 0,28$) kontrolek ($5,08 \pm 0,37$) eta RE < 3 saguek ($4,54 \pm 0,30$) baino ratio altuagoa aurkezten dute ($p = 0,047$ eta $p = 0,003$ hurrenez hurren). Alegia, RE > 3 saguetan astrozito gutxiagok betetzen dute azalera bera. Ondorioz, emaitzek iradokitzen dute RE n 3tik gorako ezaugarriak azaleratzen dituzten animalien bihurgune horzdunean astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia gertatu dela AK jaso eta hilabetera. Izan ere, zelula gutxiago egon arren, beste bi taldeen astrozito-azalera adina hartzen dute.

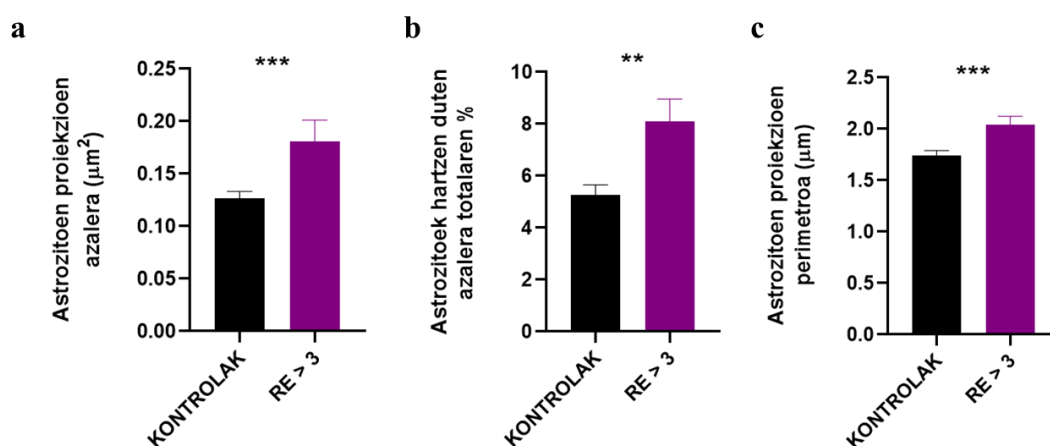


11. irudia. Astrozitoen analisiak bihurgune horzdunean (BH): a) Astrozito kopurua $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko. Bide bateko ANOVA. * RE > 3 taldearen esangarritasun estatistikoa kontrol taldearekin konparatuz: * $p < 0,05$. # Esangarritasun estatistikoa RE < 3 taldearekin alderatuz: # $p < 0,05$. b) Astrozitoen azalera $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko. Bide bateko ANOVA. $p > 0,05$. c) Astrozitoen azalera/kopurua $2,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ -ko azaleran. Bide bateko ANOVA. * $p < 0,05$. ## $p < 0,01$. n = 16: kontrolak (n = 5), RE < 3 (n = 5) eta RE > 3 (n = 6).

3.4. Astrozitoen eta CB₁R astrozitikoaren azterketa mikroskopio elektronikoaren bitartez

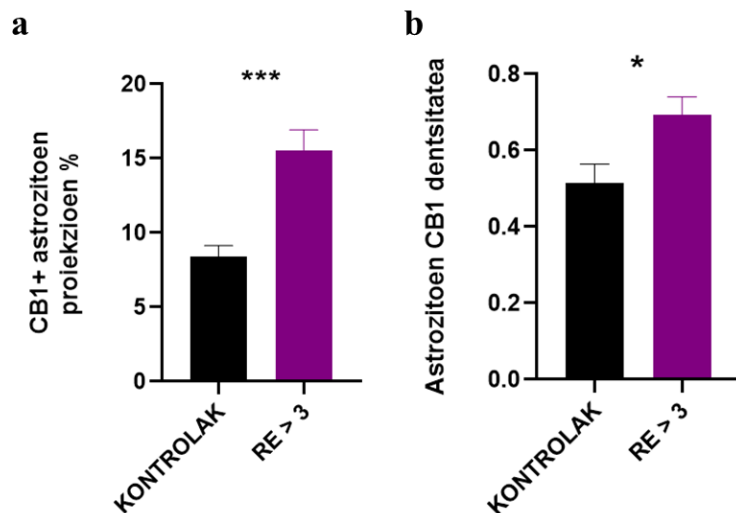
Argi mikroskopiaren bitartez CB₁ hartzailearen adierazpenean eta astrozitoen morfologian gertatzen diren aldaketak ikusita, astrozitoen eta horiek adierazten duten CB₁ hartzailearen azterketa egin zen mikroskopio elektronikoaren bitartez bihurtune horzduneko molekula-geruzan. Kontrolen eta RE < 3 saguen artean ez denez ezberdintasun esangarririk ikusi, analisiak animalia kontrolekin eta RE > 3-rekin burutu ziren.

Astrozitoen proiektzioen azalerari dagokionez, desberdintasun esanguratsuak behatu dira bi taldeen artean (12a. eta 14. irudiak). Izan ere, epilepsia-krisi larriak izan zituzten saguen astrozitoek ($0,18 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$) kontrolenak ($0,12 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$) baino proiektzio handiagoak erakusten dituzte ($p = 0,0005$). Halaber, RE > 3 saguetan astrozitoek azalera handiagoa betetzen dute (azalera totalaren % $8,10 \pm 0,85$) ($p = 0,0047$) (12b. irudia). Horrez gain, kainatoetan ($2,04 \pm 0,08 \mu\text{m}$) proiektzioen perimetroa ere handiagoa da kontrolekin alderatuz ($1,74 \pm 0,04 \mu\text{m}$) ($p = 0,0007$). Beraz, emaitzek aditzera ematen dute krisi larriek astrozitoen hipertrofia eta hiperplasia eragiten dutela molekula-geruzan, astrozitoen proiektzioak handiago bilakatzen direlarik.

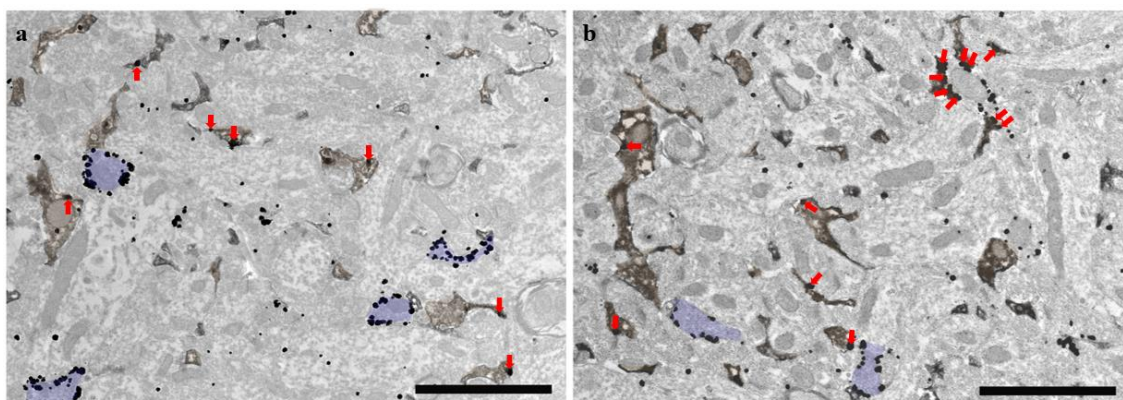


12. irudia. Astrozitoen morfologiaren analisiak bihurtune horzduneko molekula-geruzan: a) astrozitoen proiektzioen azalera (μm^2). Mann-Whitney testa. *** $p < 0,001$. b) Astrozitoek hartzen duten azalera totalaren %. Mann-Whitney testa. ** $p < 0,01$. c) Astrozitoen proiektzioen perimetroa (μm). Mann-Whitney testa. *** $p < 0,001$. n = 4: kontrolak (n = 2) eta RE > 3 (n = 2).

CB₁ hartzaile astrozitikoari dagokionez, RE > 3 saguek CB₁ hartzailearentzako positiboak diren proiektzio gehiago aurkeztu zituzte (proiektzioen % $15,54 \pm 1,38$), kontrolen ia bikoitza (% $8,42 \pm 0,70$) ($p = 0,0004$) (13a. irudia). Gainera, proiektzio horiek CB₁ dentsitate handiagoa erakusten dute (RE > 3: $0,69 \pm 0,04$; eta kontrolak: $0,51 \pm 0,05$) ($p = 0,0228$) (13b. eta 14b. irudiak). Hortaz, RE > 3 kainatoen astrozitoek CB₁ hartzaile gehiago adierazten dute bihurtune horzduneko molekula-geruzan.



13. irudia. Astrozitoen CB₁ hartzaillearen analisiak bihurgune horzduneko molekula-geruzan: **a)** CB₁ hartzaillearentzako positiboak diren proiektzioen %. Student t proba ez parekatua. ***p<0,001. **b)** Astrozitoen CB₁ hartzaillearen dentsitatea. Mann-Whitney testa. *p<0,05. n = 4: kontrolak (n = 2) eta RE > 3 (n = 2).



14. irudia. CB₁ hartzaillearen kokapena astrozitoetan (marroiez) eta bukaera inhibitzaileetan (urdinez). **a)** Kontrola. **b)** RE > 3 kainatoa. Gezi gorriak: astrozitoen CB₁ hartzailleak. Eskala barrak: 2 µm.

4. EZTABAIDA ETA ONDORIOAK

Master amaierako lan honetan epilepsia-krisiek hipokanpoan eta hipokanpoaren mendekoak diren portaeretan duten eragina aztertu da. Alde batetik, emaitzek frogatu dute REn 3tik gorako epilepsia-krisiak izan dituzten animaliek oroimen espaziala eta habia egiteko gaitasuna kaltetuta dituztela. REn 3tik beherako epilepsia-krisiak izan dituztenek, berriz, kontrol taldearen antzeko trebetasunak aurkeztu dituzte; indibiduen artean AKarekiko sentikortasunaren aldakortasuna dagoela iradokitzen duelarik. Beraz, ondoriozta dezakegu krisi epileptiko larriek oroimen espazialean eta habia eraikitze gaitasunean eragin kaltegarriak dituztela. Beste alde batetik, epilepsia-krisi larriek KAREN administratziotik hilabete batera, hipokanpoaren egituraren aldaketak eragin dituztela ikusi dugu. Gure erudian CA1 eskualdean gertatu dira aldaketa nabarmenak. Bertan, CB₁ hartzaillearen immunotindaketa eta dentsitate optikoa askoz urriagoa da RE > 3 saguetan. Izan ere, CB₁ek animalia kontrolatan CA1ek erakusten duten, eta konpartimendu inhibitzaileen adierazgarria den, immunomarkaketa desagertu da. Horrek geruzen desegituraketa eta zelulen heriotza gertatu direla iradokitzen du.

Hala ere, hori zehaztasunez aztertzeko esperimenduak egin beharko dira etorkizunean. Astrozitoen kasuan, argi mikroskopiaren bidez ikusi dugu CA1 eskualdean zelula horiek azalera txikiagoa hartzen dutela. BHean, ordea, astrozito gutxiago daude baina beste bi taldeen astrozitoek bezain beste azalera betetzen dute. Zehaztasun gehiagoz, mikroskopio elektronikoaren bidez egindako azterketek frogatu dute BHeko molekula-geruzako astrozitoek proiektzio handiagoak dituztela eta azalera handiagoa betetzen dutela. Aldi berean, CB₁ gehiago adierazten dute. Hortaz, ondoriozta dezakegu krisi epileptiko larriek KAREN injekziotik hilabete batera, CB₁ hartzailaren adierazpenaren murrizketa, CB₁ astrozitikoaren adierazpenaren emendioa eta gliosi erreaktiboa eragiten dituztela hipokanpoan.

Arestian esan den moduan, saguekin egindako portaera-probek erakutsi dute 3tik gorako epilepsia-krisiak izan zituzten saguek oroimen espaziala kaltetuta dutela. Aurretik egindako beste ikerketa batzuek ere frogatu dute LLEk oroimen espazialaren urritasuna eragiten duela. Bai animalia-ereduekin (Chauvière et al., 2009; Kalemenev et al., 2015) bai gizakiekin egindako ikerketetan (Amlerova et al., 2013) ikusi da. Hori dela eta, oroimen espazialaren azterketa baliagarria izan liteke LLEk eragindako kalteak detektatzeko.

Oroimen espazialaren galera CA1ean ikusitako CB₁ hartzailaren desagerpenaren ondorio izan daiteke. Izan ere, hainbat ikerketek erakutsi dute eKB sistemak ikaskuntza- eta oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Esaterako, Lunardi eta lankideek (2020) arratoiekin egindako ikerlanean ikusi dute oroimen malgutasuna CB₁ hartzailaren jardueraren arabera dela, eta CB₁ hartzailaren blokeoak oroimen emozionalaren ahaztea eragiten duela. Bestalde, Alzheimer gaixotasunaren animalia-ereduekin egindako ikerketa batean ikusi da CB₁ hartzaila adierazten ez duten saguek ikasketa- eta oroimen-urritasun handiagoak dituztela (Stumm et al., 2013). Horrez gain, Wang eta Han-ek (2020) frogatu dute neurona glutamatergikoen CB₁ hartzailaren seinaleztapenak parte hartzen duela kirolak eragindako ikasketaren eta oroimenaren hobekuntzan. Halaber, zenbait ikerketek frogatu dute astrozito-seinalizazioak oroimen-prozesuetan parte hartzen duela. Adibidez, astrozitoen CB₁ hartzailen delezioak identifikazio-oroimena kaltetzen duela ikusi da (Santello et al., 2019). Gainera, frogatu da marihuanak eragiten duen lan-oroimenaren galera astrogliako CB₁ hartzailaren aktibazioaren ondorioz gertatzen dela (Han et al., 2012). Hortaz, posiblea liteke astrozitoak, eta bereziki astrozitoen CB₁ hartzailak, ikerketa honetan ikusi den oroimen-espazialaren galeraren erantzuleak izatea. Hala ere, eKB sistemak ezagutzen duen eginkizun fisiologikoa ez dago oso argi oraindik. Izan ere, sistema neuromodulatzailea denez, ezagutzen parte hartzen duten garuneko eremuetan jarduera espezifiko eta lokalizatua izango du eta, beraz, mekanismo desberdinak aurkeztuko ditu.

Beste alde batetik, lan honetan ikusitako CB₁ hartzailen galera zelulen heriotza zitotoxikoarekin eta horrek dakarren gliosi erreaktiboarekin ere egon daiteke lotuta. Izan ere, CB₁ hartzailak glutamatoaren homeostasia kontrolatzen dute (Fernandez-Ruiz et al., 2015). Glutamatoa neurotransmisore kitzikatzailea da eta horren gehiegizko askapenak NMDA hartzailen bidezko kaltzio sarrera eragiten du. Horrek zelula barnean jauzi-zitotoxikoa aktibatzen du, azkenean zelulen heriotza eragiten duelarik. Aldi berean, glutamatoak, beste neurotransmisoreez gain, hipokanpoko astrozitoak aktibatzen ditu (Perea et al., 2009). Aktibazioak astrozito barruan kaltzio-igoera eragiten du, eta horrek hainbat molekula neuroaktiboen, glutamatoa edo D-serina adibidez, askapena eragiten du (gliotransmisioa).

Astrozitoen glutamato askapenak NMDA hartzaille postsinaptikoak aktibatzen ditu eta hipokanpoko neurona piramidalak kitzikatzen ditu, neurona-kitzikaberatasuna eta sinapsi-korrante kitzikatzailen maiztasuna emendatzen dituelarik. eKB sistemak, eta bereziki CB₁ hartzailleek, glutamatoaren gehiegizko askapenak dakarren zitotoxikotasunaren aurrean babes dezake. Izan ere, Marsicano eta lankideek (2003) ikusi zuten CB₁ hartzailerik adierazten ez zuten saguek (CB₁^{-/-}) epilepsia-krisi askoz larriagoak zituztela CB₁ hartzaillea adierazten zuten saguekin (CB₁^{+/+}) alderatuz.

Azken urteotan, kannabinoideetan oinarritutako epilepsiaren aurkako terapien inguruko ikerketa asko egin dira, eta ikusi da tratamendu eraginkorra izan daitekeela. Kannabidiola (CBD) da gehien ikertu den konposatu kannabinoideetako bat. Bere jardueramekanismoa oraindik ezezaguna bada ere, frogatu da epilepsiaren eta hanturaren aurkako efektuak dituela (Gaston eta Szaflarzki, 2018). Hainbat saiakuntza klinikoetan aztertu da dagoeneko eta, bereziki, umeei jasaten dituzten Dravet eta Lennox-Gastaut epilepsia-sindromeek ondo erantzun dute CBDaren aurrean. Gainera, orain dela gutxi, landarearen eratorria den CBD puruz osatutako soluzio orala (Epidiolex[®]) onartu dute AEBetan bi sindrome horiek tratatzeko (Fraguas-Sanchez eta Torres-Suarez, 2018).

Tratamenduen inguruko ikerketa gehienek neuronetan jarri dute arreta. Astrozitoek prozesu horietan duten parte hartzea, ordea, garrantzitsua izan liteke. Hori dela eta, etorkizunean astrozitoen eta CB₁ hartzailen artean dagoen lotura aztertu behar da. Horrela, epilepsian duten eginkizuna ezagutu ahalko dugu, itu-terapeutiko berriak ezagutuko ditugularik, eta eragin ditzaketen kalteak tratatzeko medikamentu eraginkorragoak garatu ahalko ditugu.

Laburbilduz, master amaierako lan honetan lortutako emaitzen arabera ondoriozta dezakegu AKak eragindako krisi epileptiko larriek saguen oroimen espaziala eta habia egiteko gaitasuna kaltetzen dituztela saguetan. Era berean, argi mikroskopia mailan AK injektatu eta hilabete batera, krisi larriak jasan dituzten saguek hipokanpoaren CA1 eskualdean CB₁ hartzailaren adierazpen askoz txikiagoa erakutsi dute, BHK aldiz, gliosi erreaktiboa gertatu dela aditzera eman du. Ultraegitura mailako azterketak zehaztasunez erakutsi du krisi epileptiko larriak pairatu dituzten saguen molekula-geruzan, AK jaso eta hilabete batera, astrozitoek betetzen duten azalera eta proiektzioen tamaina handiagoa dela, aipatutako astrogliosiaren adierazle, eta astrozitoek adierazten duten CB₁ hartzaille kopurua handiagoa dela.

Oro har, master amaierako lan honetatik ondorioztatutako emaitzek krisi epileptikoen azpian egon daitezkeen aldaketa morfologikoak eta kannabinoide sisteman gertatzen diren aldaketetan sakondu dute, datu horiek baliagarriak izan daitezkeelarik etorkizunean kannabinoideetan oinarritutako tratamendu berriak diseinatzeko orduan. Horrez gainera, portaeran gertatzen diren aldaketen deskribapenak erakutsi du ikerketa honetan erabili diren portaera probak baliagarriak izan daitezkeela tratamendu baten aurrean animaliek erakusten dituzten onurak aztertzeko.

5. ESKER ONAK

Eskerrik asko Pedro Grandesen laborategiko kideei eskainitako laguntzagatik. Bereziki, Izaskun Elezgarairi Neurozientzien alorrean zein alor pertsonalean irakatsitako guztiagatik, izan duen pazientziagatik eta proiektu honekin jarraitzeko aukera eman izanagatik. Jon Egañari

esperimentu guztietan eskainitako laguntzagarriak, irakatsi didan guztiagarriak eta beti jarrera baikorra erakusteagarriak. Halaber, eskerrik asko Itziar Terradillosi, Edgar Soriari, Leire Lekunberriri, Itziar Bonillari, Maitane Serranori eta Amaia Mimenzari ikerlanean zehar sortu zaizkidan arazoei konponbidea aurkitzen lagundu izanagarriak eta emandako animo guztiengarriak. Azkenik, eskerrik asko Irantzu Ricori lana berrikusteagarriak, egindako iradokizunengarriak eta emandako animoengarriak.

6. BILIOGRAFIA

- Amlerova, J., Laczo, J., Vlcek, K., Javurkova, A., Andel, R., eta Marusic, P. (2013). Risk factors for spatial memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 26 (1), 57-60.
- Bach M.E., Hawkins R.D., Osman M., Kandel E.R., eta Mayford M. (1995): Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal ltp in the range of the θ frequency. *Cell*. 81: 905-915.
- Bénard, G., Massa, F., Puente, N., Lourenço, J., Bellocchio, L., Soria-Gómez, E., ... eta Hebert-Chatelain, E. (2012). Mitochondrial CB1 receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience*, 15 (4), 558.
- Botterill, J. J., Lu, Y. L., LaFrancois, J. J., Bernstein, H. L., Alcantara-Gonzalez, D., Jain, S., ... eta Scharfman, H. E. (2019). An excitatory and epileptogenic effect of dentate gyrus mossy cells in a mouse model of epilepsy. *Cell reports*, 29 (9), 2875-2889.
- Butler, C., Kapur, N., Zeman, A., Weller, R., eta Connelly, A. (2012). Epilepsy-related long-term amnesia: anatomical perspectives. *Neuropsychologia*, 50 (13), 2973-2980.
- Chauviere, L., Rafrafi, N., Thinus-Blanc, C., Bartolomei, F., Esclapez, M., eta Bernard, C. (2009). Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience*, 29 (17), 5402-5410.
- Citraro, R., Russo, E., Scicchitano, F., van Rijn, C. M., Cosco, D., Avagliano, C., ... eta De Sarro, G. (2013). Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*, 69, 115-126.
- Coiret, G., Ster, J., Grewe, B., Wendling, F., Helmchen, F., Gerber, U., eta Benquet, P. (2012). Neuron to astrocyte communication via cannabinoid receptors is necessary for sustained epileptiform activity in rat hippocampus. *PLoS One*, 7 (5).
- Deacon, R. M. (2006). Assessing nest building in mice. *Nature protocols*, 1 (3), 1117.
- Deng, W., Aimone, J. B., eta Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory?. *Nature reviews neuroscience*, 11 (5), 339-350.
- Engel Jr, J. (1996). Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research*, 26(1), 141-150.

- Engel Jr, J. (2001). Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned?. *The neuroscientist*, 7 (4), 340-352.
- Escartin, C., Guillemaud, O., eta Carrillo-de Sauvage, M. A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12), 2221-2247.
- Falcón-Moya, R., Sihra, T. S., eta Rodríguez-Moreno, A. (2018). Kainate receptors: Role in epilepsy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 217.
- Fernández-Ruiz, J., Moro, M. A., eta Martínez-Orgado, J. (2015). Cannabinoids in neurodegenerative disorders and stroke/brain trauma: from preclinical models to clinical applications. *Neurotherapeutics*, 12 (4), 793-806.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., ... eta Hesdorffer, D. C. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55 (4), 475-482.
- Fraguas-Sánchez, A. I., eta Torres-Suárez, A. I. (2018). Medical use of cannabinoids. *Drugs*, 78 (16), 1665-1703.
- Friedman, D., eta Devinsky, O. (2015). Cannabinoids in the treatment of epilepsy. *New England Journal of Medicine*, 373 (11), 1048-1058.
- Gaston, T. E., eta Szaflarski, J. P. (2018). Cannabis for the treatment of epilepsy: an update. *Current neurology and neuroscience reports*, 18 (11), 1-9.
- Guggenhuber, S., Monory, K., Lutz, B., eta Klugmann, M. (2010). AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitotoxicity. *PLoS one*, 5 (12), e15707.
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Puente, N., Elezgarai, I., Ruehle, S., Lutz, B., Reguero, L., ... eta Grandes, P. (2017). Anatomical characterization of the cannabinoid CB1 receptor in cell-type-specific mutant mouse rescue models. *Journal of Comparative Neurology*, 525 (2), 302-318.
- Gutiérrez-Rodríguez, A., Bonilla-Del Río, I., Puente, N., Gómez-Urquijo, S. M., Fontaine, C. J., Egaña-Huguet, J., ... eta Grandes, P. (2018). Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia*, 66 (7), 1417-1431.
- Han, J., Kesner, P., Metna-Laurent, M., Duan, T., Xu, L., Georges, F., ... eta Liu, Q. (2012). Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*, 148 (5), 1039-1050.
- Hebert-Chatelain, E., Desprez, T., Serrat, R., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Busquets-Garcia, A., ... eta Marsicano, G. (2016). A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*, 539 (7630), 555-559.
- Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139-146.

- Kalemenev, S. V., Zubareva, O. E., Frolova, E. V., Sizov, V. V., Lavrentyeva, V. V., Lukomskaya, N. Y., ... eta Magazanik, L. G. (2015, July). Impairment of exploratory behavior and spatial memory in adolescent rats in lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Doklady Biological Sciences* (Vol. 463, No. 1, pp. 175-177). Pleiades Publishing.
- Knierim, J. J. (2015). The hippocampus. *Current Biology*, 25 (23), R1116-R1121.
- Lévesque, M., eta Avoli, M. (2013). The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37 (10), 2887-2899.
- Lunardi, P., de Souza, L. W., Dos Santos, B., Popik, B., eta de Oliveira Alvares, L. (2020). Effect of the Endocannabinoid System in Memory Updating and Forgetting. *Neuroscience*, 444, 33-42.
- Lüttjohann A., Fabene P.F., eta van Luijtelaaar G. (2009): A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior*. 98 (5): 579-586.
- Lutz, B., Marsicano, G., Maldonado, R., eta Hillard, C. J. (2015). The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience*, 16 (12), 705-718.
- Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., ... eta Lutz, B. (2003). CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 302 (5642), 84-88.
- Monory, K., Polack, M., Remus, A., Lutz, B., eta Korte, M. (2015). Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35 (9), 3842-3850.
- Navarrete, M., eta Araque, A. (2008). Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*, 57 (6), 883-893.
- Nirwan, N., Vyas, P., eta Vohora, D. (2018). Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Reviews in the Neurosciences*, 29 (7), 757-770.
- Perea, G., Navarrete, M., eta Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*, 32 (8), 421-431.
- Puente, N., Bonilla-Del Río, I., Achicallende, S., Nahirney, P. C., eta Grandes, P. (2019). High-resolution immunoelectron microscopy techniques for revealing distinct subcellular type 1 cannabinoid receptor domains in brain. *Bio-protocol*, 9(2), e3145-e3145.
- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 32 (3), 281-294.
- Robin, L. M., da Cruz, J. F. O., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., ... eta Marsicano, G. (2018). Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory. *Neuron*, 98 (5), 935-944.

- Rosenberg, E. C., Tsien, R. W., Whalley, B. J., & Devinsky, O. (2015). Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics*, 12 (4), 747-768.
- Rosenberg, E. C., Patra, P. H., eta Whalley, B. J. (2017). Therapeutic effects of cannabinoids in animal models of seizures, epilepsy, epileptogenesis, and epilepsy-related neuroprotection. *Epilepsy & Behavior*, 70, 319-327.
- Rueda-Orozco P.E., Soria-Gomez E., Montes-Rodriguez C.J., Martínez-Vargas M., Galicia O., Navarro L., eta Prospero-García O. (2008): A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology*. 198: 565-576.
- Santello, M., Toni, N., eta Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature neuroscience*, 22 (2), 154-166.
- Sanz, P., eta Garcia-Gimeno, M. A. (2020). Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (11), 4096.
- Stumm, C., Hiebel, C., Hanstein, R., Purrio, M., Nagel, H., Conrad, A., ... eta Clement, A. B. (2013). Cannabinoid receptor 1 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease leads to enhanced cognitive impairment despite of a reduction in amyloid deposition. *Neurobiology of aging*, 34 (11), 2574-2584.
- Téllez-Zenteno, J. F., eta Hernández-Ronquillo, L. (2012). A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research and treatment*, 2012.
- Thom, M. (2014). Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40 (5), 520-543.
- Vinogradova L.V. eta van Rijn C.M. (2008): Anticonvulsive and antiepileptogenic effects of levetiracetam in the audiogenic-kindling model. *Epilepsia*. 49: 1160-8.
- Walker, M. C. (2015). Hippocampal sclerosis: causes and prevention. *Seminars in neurology* (Vol. 35, No. 03, pp. 193-200). Thieme Medical Publishers.
- Walker, M. C. (2018). Pathophysiology of status epilepticus. *Neuroscience letters*, 667, 84-91.
- Wang, H., eta Han, J. (2020). The endocannabinoid system regulates the moderate exercise-induced enhancement of learning and memory in mice. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 60 (2), 320-328.
- Wilkinson, H., Holdstock, J. S., Baker, G., Herbert, A., Clague, F., eta Downes, J. J. (2012). Long-term accelerated forgetting of verbal and non-verbal information in temporal lobe epilepsy. *Cortex*, 48 (3), 317-332.
- World Health Organization. (2019). *Epilepsy: a public health imperative: summary* (No. WHO/MSD/MER/19.2). World Health Organization.