

## The role of glial glutamate transporter in the baseline synaptic response and short-term synaptic plasticity of CA1 area of the hippocampus in male Wistar rat

Negin Saeedi<sup>1</sup>, Soomaayeh Heysieattalab<sup>2</sup>, Mahyar Janahmadi<sup>1</sup>, Narges Hosseinmardi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Cognitive Neuroscience, School of Psychology, Tabriz University, Tabriz, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 10 Sep 2022

Accepted: 29 Oct 2022

ePublished: 13 Dec 2022

#### Keywords:

- Field potential Recording
- Glial cells
- Short term synaptic Plasticity
- Hippocampus

### Abstract

**Background.** Glial cells release different gliotransmitters and respond to neurotransmitters released from neurons. These cells, especially astrocytes, having various transporters, play an essential role in synaptic space homeostasis and synaptic plasticity. In this study, the role of hippocampal glial glutamate transporter (EAAT2) in baseline synaptic response and short-term synaptic plasticity were investigated.

**Methods.** In this experimental study, ceftriaxone, EAAT2 activator (0.5mmol/0.5µl), was microinjected intrahippocampally to activate hippocampal glial glutamate transporter in male Wistar rats. Baseline synaptic response and short-term synaptic plasticity were evaluated by field potential recording. fEPSP was recorded from CA1 following Schaffer collaterals stimulation. After Input/Output curve construction, short-term synaptic plasticity was induced by paired-pulse stimulations.

**Results.** Activation of EAAT2 by ceftriaxone microinjection in CA1 did not affect the baseline synaptic response ( $P>0.05$ , Two Way ANOVA). There was no significant difference in Paired Pulse Index at 20, 80 and 200 ms inter-pulse interval between the ceftriaxone treated and control group ( $P>0.05$ , Two Way ANOVA).

**Conclusion.** The results suggest that hippocampal glial glutamate transporter activation does not affect baseline synaptic response and short-term synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus.

**Practical Implications.** Given the role of glial cells in regulating the nervous system's excitability and synaptic plasticity, correcting these nervous system features by manipulating glial cells can help treat or prevent neurological disease. The role of glial cells in the homeostasis of glutamate in the synaptic space of the hippocampus was evaluated in this study. This was performed through the stimulation of its uptake, on the basic synaptic activity and short-term synaptic plasticity.

**How to cite this article:** Saeedi N, Heysieattalab S, Janahmadi M, Hosseinmardi N. The role of glial glutamate transporter in the baseline synaptic response and short-term synaptic plasticity of CA1 area of the hippocampus in male Wistar rat. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2022;44(5):380-389. doi: 10.34172/mj.2022.044. Persian.

\*Corresponding author; Email: nargeshosseinmardi@gmail.com

© 2022 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

## Extended Abstract

### Background

The multiple roles of glial cells in synaptic plasticity have been identified in recent years. Astrocytes affect the function of neurons through the release and uptake of gliotransmitters and neurotransmitters, respectively. One of the crucial functions of these cells is to regulate the concentration of glutamate in the synaptic space. Astrocytes play this role through glutamate transporters, including GLT-1 and GLAST. GLT-1 constitutes 80% of hippocampal glutamate transporters and removes 90% of extracellular glutamate. Considering the importance of glutamate in synaptic plasticity and the role of GLT-1 in regulating the concentration of this neurotransmitter's concentration, we investigated the role of GLT-1 on basic synaptic response and short-term synaptic plasticity in the hippocampus.

### Methods

Male Wistar rats (200-250 g) were used in this research. To inject ceftriaxone (activator of glutamate transporter of glial cells) in the CA1 area of the hippocampus, one week before the beginning of the experiments, after anesthetizing with a combination of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), the animal was placed in a stereotaxic. The injection site was marked in the CA1 region (anterior-posterior of bregma: -3.48, laterality:  $\pm 2.2$ , depth: 2.5), and the guide cannula with a length of 10 mm was fixed on the skull. To inject the drug, a No. 27 needle was cut to a certain length. Then, the needle was connected to the polyethylene tube connected to the 1 microliter Hamilton syringe. 0.5  $\mu$ l of ceftriaxone solution (0.5 mM) was injected bilaterally for nine days. On the tenth day, electrophysiological tests were performed. The number of groups evaluated in this study are 2 groups, including:

- 1- The group that received ceftriaxone bilaterally inside the hippocampus (n=6).
- 2- The group that received saline inside the hippocampus (n=6).

The in vivo field potential recording was used to investigate the basic synaptic response and

short-term synaptic plasticity. Schaffer collateral was stimulated, and the responses were recorded from the stratum radiatum. After finding a suitable place and stabilizing the synaptic response, the (I/O) curve was obtained for each animal. To investigate short-term synaptic plasticity, paired-pulse stimulations consisting of two square pulses with time intervals of 20, 80, and 200 milliseconds were applied with a frequency of 0.1 Hz. The average of 6 responses was used for analysis, and the slope of the field excitatory postsynaptic potential was determined from the average of the field potentials recorded from the striatum-radiatum region. The normality of the data was checked with the Graph pad Prism software, using normal (Gaussian) distribution and the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk methods, and the data distribution was reported as normal in both methods. Two way ANOVA test was used to compare the means.  $P < 0.05$  was considered a significant level in all statistical calculations. The results are shown as Mean  $\pm$  SD.

### Results

The effect of activating the glutamate transporter of glial cells on the baseline synaptic response in the stratum radiatum of the hippocampus:

The slope of the excitatory postsynaptic potential was measured in five different stimulation intensities to draw the input/output curve. The lowest intensity that triggers the response was the threshold intensity, and the intensity that causes the maximum response is called 5T. Three intensities were defined between the minimum and maximum intensity so that the response becomes two, three, and four times the threshold response. Table 1 compares the mean stimulation intensity of T, 2T, 3T, 4T, and 5T for the group receiving ceftriaxone and the control group, which did not show a significant difference ( $P > 0.05$ , Table 1). As shown in Figure 1, glutamate transporter activation of hippocampal glial cells did not affect the basal synaptic response ( $P > 0.05$ ). The effect of glutamate transporter activation of

glial cells on short-term synaptic plasticity in the stratum radiatum region of the hippocampus: in order to investigate the effect of activating the glutamate transporter of glial cells on short-term synaptic plasticity, this is a suitable way to evaluate the excitability of the hippocampal circuits. Figure 2 shows the results related to short-term synaptic plasticity. GLT-1 activation in animals that received ceftriaxone did not affect paired-pulse index compared to the control group ( $P>0.05$ ).

### **Conclusion**

In this study, activation of the glutamate transporter of hippocampal glial cells (GLT-1), did not change the basic synaptic activity and even paired pulse index in this area. Despite the increased glutamate transporter activity of glial cells and increased glutamate uptake, the decrease in concentration has been compensated by other regulatory factors, including by glial cells themselves or neurons.

## نقش ترانسپورتر گلوتاماتی نوع ۱ (EAAT۲) سلول‌های گلیا در پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA۱ هیپوکمپ در موش صحرایی نر نژاد ویستار

نگین سعیدی<sup>۱\*</sup>، سمیه حیثیت‌طلب<sup>۲</sup>، مهیار جان‌احمدی<sup>۱</sup>، نرگس حسین‌مردی<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup>گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup>گروه اعصاب علوم شناختی، دانشکده روانشناسی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

### چکیده

**زمینه.** سلول‌های گلیا، گلیوترانسمیترهای مختلفی رها می‌کنند و نیز به میانجی‌های عصبی آزاد شده توسط نورون‌ها پاسخ می‌دهند. سلول‌های گلیا به خصوص آستروسیت‌ها با داشتن ترانسپورترهای گوناگون، نقش مهمی در هومئوستاز فضای سیناپسی و شکل‌پذیری سیناپسی ایفا می‌کنند. در این مطالعه به بررسی نقش ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا (Excitatory amino acid transporter 2) هیپوکمپ یا EAAT۲ بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت پرداخته شده است.

**روش کار.** این مطالعه از نوع تجربی است. جهت فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای هیپوکمپ، ۵/۵ میکرولیتر از محلول ۵/۵ میلی‌مولار سفتریاکسون، فعال‌کننده این ترانسپورتر، به صورت دو طرفه در داخل هیپوکمپ موش صحرایی نر نژاد ویستار تزریق شد. پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت با تکنیک ثبت پتانسیل میدانی بررسی شد. مسیر شاخه جانبی شافر تحریک و پتانسیل میدانی پس سیناپسی تحریکی (field excitatory postsynaptic potential) از CA۱ ثبت شد. پس از تهیه نمودار Input/output، از تحریکات زوج پالس (Paired pulse) برای القای شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد.

**یافته‌ها.** فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای هیپوکمپ توسط ریز تزریق سفتریاکسون در ناحیه CA۱، پاسخ سیناپسی پایه را متاثر نکرد (Two Way ANOVA,  $P>0/05$ ). فعال کردن این سلول‌ها تغییر معنی‌داری در شاخص زوج پالس در فاصله بین پالسی ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی‌ثانیه ایجاد نکرد (Two Way ANOVA,  $P>0/05$ ). **نتیجه‌گیری.** فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا هیپوکمپ بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA۱ هیپوکمپ تاثیری نداشت.

**پیامدهای عملی.** با توجه به نقش سلول‌های گلیا در تنظیم تحریک‌پذیری سیستم عصبی و همچنین شکل‌پذیری سیناپسی، یافتن راهکارهایی جهت تصحیح این ویژگی‌های سیستم عصبی با دست‌کاری سلول‌های گلیا می‌تواند در درمان یا پیشگیری از بیماری‌های سیستم عصبی کمک‌کننده باشد. در این مطالعه به بررسی نقش سلول‌های گلیا در هومئوستاز نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات در فضای سیناپسی هیپوکمپ، از طریق تحریک برداشت آن، بر فعالیت سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت پرداخته شد.

### اطلاعات مقاله

#### سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۸  
پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۷  
انتشار برخط: ۱۴۰۱/۰۹/۲۲

#### کلید واژه‌ها:

- ثبت پتانسیل میدانی
- سلول‌های گلیا
- شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت
- هیپوکمپ

### مقدمه

حضور دارند و ضمن ارتباط نزدیک با نورون پیش‌سیناپسی و پس‌سیناپسی و تشکیل سیناپس سه‌جزئی در تنظیم انتقال سیناپسی و شکل‌پذیری سیناپسی نقش دارند.<sup>۱،۲،۳</sup> فراوان‌ترین نوع سلول‌های گلیا آستروسیت‌ها هستند که بر عملکرد نورون‌ها از طریق رهایش گلیوترانسمیترها و یا بازجذب نوروترانسمیترها اثر دارند.<sup>۴</sup> گیرنده‌های مختلفی از جمله گیرنده‌های یونوتروپیک و متابوتروپیک گلوتامات و گیرنده‌های اپیوئیدی بر روی غشای

در سال‌های گذشته نقش مهم سلول‌های گلیا در انتقالات سیناپسی و ایجاد شکل‌پذیری سیناپسی مشخص شده است.<sup>۱</sup> به دلیل نقش‌های متعدد سلول‌های گلیا در نقل و انتقالات و نیز شکل‌پذیری سیناپسی، فرضیه سیناپس سه‌جزئی مطرح شد که بیان می‌کند انتقال اطلاعات در ساختار سیناپسی فقط مربوط به عملکرد نورون پیش‌سیناپسی و نورون پس‌سیناپسی نیست، بلکه سلول‌های گلیا از جمله آستروسیت‌ها نیز در فضای سیناپسی

\* نویسنده مسؤول: ایمیل: nargeshosseinmardi@gmail.com

پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.۱۴۰۰.۲۳۷ انجام شد. به منظور تزریق داروی سفتریاکسون (فعال کننده ترانسپورتر گلوتاماتی سلول های گلیا) (Sigma Aldrich, USA) در ناحیه CA1 هیپوکمپ یک هفته قبل از شروع آزمایش ها، پس از بیهوشی با ترکیب کتامین (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم)، حیوان در دستگاه استریوتاکسی (Stoelting, USA) قرار می گرفت. سپس پوست سر برداشته شده و نواحی برگما و لامبدا مشخص و مطابق با اطلس پاکسینوس و واتسون مختصات محل تزریق در ناحیه CA1 هیپوکمپ (قدامی-خلفی از برگما: ۳/۴۸-، لترالیتی: ۲/۲±، عمق: ۲/۵) دو طرفه علامت گذاری شده و با مته سوراخ می شد و کانول راهنما با طول ۱۰ میلی متر و قطر خارجی ۰/۶۵ میلی متر، یک میلی متر بالاتر از ناحیه CA1 با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندان پزشکی روی جمجمه ثابت می شد. به منظور تزریق دارو به داخل ناحیه CA1 یک سوزن تزریق شماره ۲۷ به طول مشخصی بریده می شد تا هنگامی که در کانول گذاشته می شود نوک آن حدود ۵/۵ میلی متر از سر کانول بیرون بیاید. سپس سوزن به لوله پلی اتیلن که به سرنگ همیلتون ۱ میکرولیتری وصل بود متصل می شد. ۵/۵ میکرولیتر از محلول سفتریاکسون (۵/۵ میلی مولار) حل شده در سالین به داخل سرنگ کشیده شده و بعد از خارج کردن درپوش کانول هایی که قبلاً در ناحیه CA1 هیپوکمپ کاشته شده بود، به صورت دوطرفه تزریق انجام می شد. تزریق به صورت آهسته و در مدت زمان ۱ دقیقه انجام می شد. جهت اطمینان از تزریق کامل دارو، سوزن تزریق به مدت ۱ دقیقه در محل باقی می ماند و بعد خارج می شد. سپس مجدداً درپوش کانول ها گذاشته و حیوان به قفس بازگردانده می شد و این تزریق ها به مدت ۹ روز ادامه می یافت. در گروه کنترل حیوانات ۵/۵ میکرولیتر از حلال سفتریاکسون (سالین) دریافت می کردند. در روز دهم آزمون های الکتروفیزیولوژی انجام می شد. تعداد گروه های مورد بررسی در این مطالعه ۲ گروه هستند که عبارتند از:

۱. گروهی که به منظور فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول های گلیای هیپوکمپ، سفتریاکسون به صورت دوطرفه در داخل هیپوکمپ دریافت می کردند (n=۶).
۲. گروهی که حلال سفتریاکسون یعنی سالین در داخل هیپوکمپ دریافت می کردند (n=۶).

در پایان هر آزمایش، حیوانات با CO<sub>2</sub> بیهوش می شوند و مغزها با استفاده از ویبرواسلایسر (Campden Instrument،

آستروسیت ها بیان می شود.<sup>۶</sup> آستروسیت ها موادی از قبیل Adenosine triphosphate (ATP)، D-سرین، گابا و گلوتامات رها می کنند.<sup>۶</sup> آنها در تشکیل و نگهداری سیناپس های گلوتاماترژیک دخیل هستند. یکی از اعمال مهم سلول های گلیا تنظیم غلظت گلوتامات و گابا در فضای سیناپسی است که می تواند بر انتقال سیناپسی و شکل پذیری سیناپسی اثر بگذارد. آستروسیت ها این نقش خود را به واسطه ترانسپورترهای متعددی از جمله ترانسپورتر گلوتاماتی و گابا که بر روی غشای آنها بیان شده است، ایفا می کنند.<sup>۷</sup> امروزه ۵ زیر گروه از ترانسپورترهای گلوتاماتی از جمله (EAAT۲، EAAT۳، EAAT۴، EAAT۵، GLAST، EAAC۱) شناسایی شده اند. EAAT۲ و GLAST به طور عمده در آستروسیت ها بیان می شوند، در حالیکه EAAC۱ و EAAT۴ عمدتاً در نورون ها هستند. EAAT۲ و GLAST نقش مهمی در تنظیم غلظت خارج سلولی گلوتامات در مغز دارند. در بین ترانسپورترهای گلوتاماتی مختلف، EAAT۲، ۸۰ درصد ترانسپورترهای گلوتاماتی هیپوکمپ را تشکیل می دهد و مسئول حذف ۹۰ درصد گلوتامات خارج سلولی است.<sup>۸</sup> با توجه به شکل پذیر بودن سلول های گلیا و حساس بودن آنها به فعالیت های عصبی و انتقالات سیناپسی این فرضیه مطرح می شود که سلول های گلیا یک نقش محوری در اشکال مختلف شکل پذیری داشته باشند.<sup>۹</sup> شواهد نشان می دهند که سلول های گلیا و نورون ها نباید به عنوان عناصر سلولی مستقل در سیستم عصبی در نظر گرفته شوند. بلکه هم نورون ها و هم سلول های گلیا متقابلاً در مسیرهای مربوط به پردازش اطلاعات و شکل پذیری سیناپسی درگیر هستند.<sup>۱۰</sup> با توجه به اهمیت گلوتامات در انتقال سیناپسی و شکل پذیری سیناپسی و نقش ترانسپورترهای گلوتاماتی گلیا در تنظیم غلظت این میانجی عصبی، در این مطالعه به بررسی نقش ترانسپورتر گلوتاماتی سلول های گلیا بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1 هیپوکمپ پرداختیم.

## روش کار

این مطالعه که از نوع تجربی است در سال ۱۴۰۰ در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. در این تحقیق از موش های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) استفاده شد که به تعداد ۴ عدد در هر قفس با یک برنامه ۱۲ ساعت روشنایی-تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام آزمایش ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق

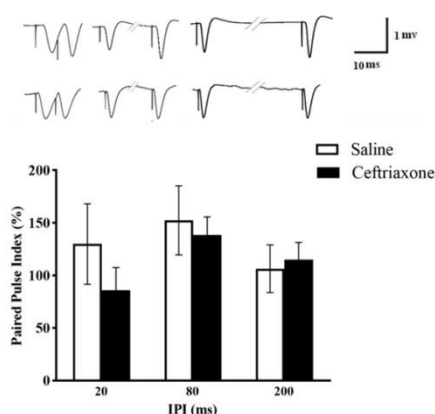
به منظور بررسی شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت از تحریک‌های زوج پالس متشکل از دو پالس مربعی با فواصل زمانی IPI: Inter (Pulse Interval) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی‌ثانیه که با تواتر ۱/ هرتز اعمال می‌شد، به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پاسخ‌ها بعد از تقویت (Gain=۱۰۰۰) توسط آمپلی فایر (WPI، آمریکا) و فیلتر شدن (باند عبور ۱ هرتز تا ده کیلوهرتز) با فرکانس ۱۰ کیلو هرتز نمونه برداری شده و در کامپیوتر ذخیره می‌شد و سپس تجزیه و تحلیل بر روی پاسخ‌های ذخیره شده صورت می‌گرفت. متوسط ۶ پاسخ برای آنالیز مورد استفاده قرار می‌گرفت و شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی از متوسط پتانسیل‌های میدانی ثبت شده از ناحیه استراتوم-رادیاتوم تعیین می‌شد. با کمک برنامه کامپیوتری آنالیز داده‌ها، شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی تعیین می‌شد و شاخص زوج پالس (PPI: Paired Pulse Index) به صورت درصد نسبت شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی دوم به شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی اول محاسبه می‌شد. نرمال بودن داده‌ها با نرم‌افزار گراف پد پریم، با استفاده از normal (Gaussian) distribution و با متد Kolmogorov-smirnov و همچنین shapiro-wilk بررسی شد که توزیع داده‌ها در هر دو متد نرمال گزارش شد. در این مطالعه به دلیل وجود بیش از یک متغیر مستقل و با در نظر گرفتن توزیع پارامتریک داده‌ها، جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Two Way ANOVA استفاده شد. در همه محاسبات آماری،  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نتایج به صورت Mean  $\pm$  SD نشان داده شده است.

### یافته‌ها

تحریک شاخه‌های جانبی شافر، پتانسیل‌های پس سیناپسی دسته جمعی را در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 برمی‌انگیخت. برای رسم منحنی Input/output، شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی در پنج شدت تحریک مختلف اندازه‌گیری می‌شد. کمترین شدتی که پاسخ را بر می‌انگیخت، شدت آستانه (T:Threshold) و شدتی که سبب تولید حداکثر پاسخ می‌شد را ۵T می‌نامیدیم. سه شدت ۲T، ۳T، ۴T به گونه‌ای بین شدت حداقل و حداکثر تعریف می‌شدند که پاسخ به ترتیب دو، سه و چهار برابر پاسخ آستانه شود. در جدول ۱، مقایسه میانگین شدت تحریک T، ۲T، ۳T، ۴T و ۵T برای گروه دریافت کننده سفتریاکسون و گروه کنترل مربوطه صورت گرفته است که تفاوت معنی‌داری نشان نداد ( $P > 0.05$ ) (جدول ۱). پاسخ‌های برانگیخته در شدت‌های بالای ۵T

(USA, Sarasota FL, NVSLM1) مورد بررسی قرار می‌گیرند تا محل قرارگیری کانولا بررسی شود. داده‌های حیوانات با کانولای نامناسب در تجزیه و تحلیل آماری گنجانده نشده و با نمونه‌های جدید جایگزین شده است تا به اندازه نمونه استاندارد برسد. در این مطالعه از تکنیک ثبت پتانسیل میدانی درون تنی (in vivo field potential recording) برای بررسی پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد. مسیر شاخه جانبی شافر تحریک و از استراتوم رادیاتوم ناحیه CA1 ثبت گردید. پس از بیهوش کردن با یورتان به صورت داخل صفاقی (۱/۵ گرم/کیلوگرم)، حیوان به داخل استریوتاکس منتقل می‌شد. بر اساس اطلس پاکسینوس نقطه تحریک در مسیر جانبی شافر با مختصات (قدامی-خلفی از برگما: ۳/۱-، لترالیتی: ۳/۱±، عمق: ۳-۳/۵) و نقطه ثبت در ناحیه دندریتی (استراتوم رادیاتوم) CA1 با مختصات (قدامی-خلفی از برگما: ۲/۸-، لترالیتی: ۱/۸±، عمق: ۲/۵-۳/۵) علامت‌گذاری می‌شد. پس از سوراخ کردن، الکترودهای ثبت و تحریک در ناحیه مورد نظر کاشته می‌شد. با تحریک مسیر شاخه جانبی شافر، پتانسیل‌های برانگیخته میدانی از ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 ثبت می‌گردید. دستور تحریک پالس آزمون (Pulse Data Acquisition) (پرتو دانش، ایران) ارسال و بعد از گذشتن از ایزولاتور (WPI, USA)، توسط الکترو دو قطبی از جنس فولاد زنگ نزن به مسیر شافر کولترال اعمال می‌گردید. پس از پیدا کردن جای مناسب و تعیین دقیق محل تحریک و ثبت، تحریک‌ها حداقل به مدت ۲۰ دقیقه تا زمانی که پاسخ پایدار شود اعمال می‌شد. منظور از پایدار بودن پاسخ یعنی میزان تغییر شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (fEPSP) کمتر از ۱۰ درصد باشد. پس از پایدار شدن پاسخ سیناپسی، جهت محاسبه شدت جریان پالس آزمون، ابتدا رابطه (I/O, Input/Output) برای هر حیوان به دست می‌آمد. به این ترتیب که مسیر انشعابات جانبی شافر با شدت‌های ۶۰ تا ۳۰۰ میکروآمپر، تحریک و پاسخ برانگیخته میدانی ثبت می‌شد. به عبارت دیگر تحریک از حداقل شدتی که باعث برانگیختن پاسخ می‌شد تا زمانی که پاسخ به حداکثر میزان خود برسد به مسیر اعمال می‌شد. شدتی که حداکثر دامنه fEPSP را بر می‌انگیزد، به عنوان شدت حداکثر در نظر گرفته می‌شد. پس از رسم منحنی I/O از شدت تحریکی که باعث تولید ۵۰ درصد پاسخ حداکثر می‌شد به عنوان شدت پالس آزمون برای اعمال تحریک‌های زوج پالس استفاده می‌شد.

پاسخ سیناپسی پایه بین گروه ها نشان نداد. (Integer multiples of the ) IMT (threshold intensity) به معنی ضریب صحیحی از شدت تحریک آستانه است. Trace ها نمونه‌ای از ثبت می‌باشد. مقیاس اندازه‌گیری: ۱۰ms، ۱ mV. Two Way ANOVA،  $P > 0.05$ .



**شکل ۲.** شاخص زوج پالس (PPI). شاخص زوج پالس (PPI) در حیواناتی که سفتریاکسون در ناحیه CA1 دریافت کردند (Ceftriaxone, n=6) و گروه کنترل که سالین دریافت کردند (Saline, n=6)، در فواصل بین دو پالس (IPI) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی‌ثانیه. مهار ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای (GLT-1) هیپوکمپ تاثیر بر شاخص زوج پالس (PPI) نداشت. داده‌ها به صورت Mean±SD نشان داده شده‌اند. مقیاس اندازه‌گیری: ۱۰ms، ۱ mV. Two Way ANOVA،  $P > 0.05$ .

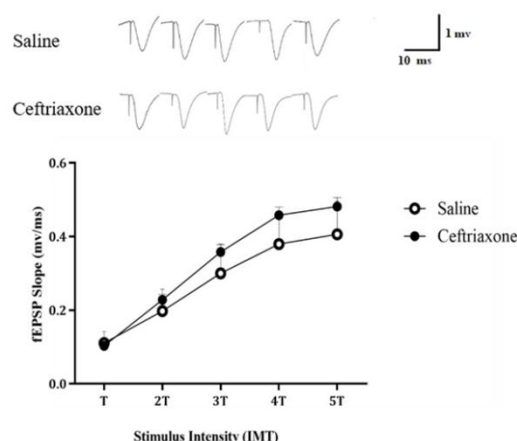
**جدول ۱.** میانگین شدت تحریک‌ها. شدت تحریک اعمال شده به شاخه‌های جانبی شافر جهت برانگیختن پاسخ‌های سیناپسی در لایه استریاتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ.  $I_{1T}$ : شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ آستانه.  $I_{2T}$ ،  $I_{3T}$ ،  $I_{4T}$ ،  $I_{5T}$ : شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ به میزان ۲، ۳، ۴ و ۵ برابر آستانه. داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شده‌اند.

گروه‌ها	$I_{1T}$ ( $\mu$ A)	$I_{2T}$ ( $\mu$ A)	$I_{3T}$ ( $\mu$ A)	$I_{4T}$ ( $\mu$ A)	$I_{5T}$ ( $\mu$ A)
سالین	۸۰±۱۳/۸۷	۱۱۱/۰۷±۲۵/۲۱	۱۴۹±۴۳/۷۸	۱۸۶±۵۱/۳۸	۲۳۰±۶۰/۸۷
سفتریاکسون	۸۷/۵±۲۳/۱۸	۱۱۵±۳۲/۰۹	۱۵۰±۴۲/۴۳	۱۹۶±۴۰/۸۳	۲۴۶±۴۶/۷۶

## بحث

جهت بررسی سطح فعالیت نورون‌های هرمی ناحیه CA1 هیپوکمپ، پاسخ سیناپسی پایه را بررسی نمودیم. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا، پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه CA1 و همچنین شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت را تغییر نمی‌دهد. ثبت امواج مربوط به پتانسیل پس‌سیناپسی تحریکی میدانی در واقع برداشتی در مورد سیناپس‌های تحریکی و برآیند دیپلاریزاسیون‌های موضعی ایجاد شده در نورون‌ها را آشکار می‌کند که نشان‌دهنده کارایی سیناپس‌های تحریکی مسیرهای آوران است. سلول‌های گلیا به

اشباع بودند. بنابراین تعریف شدت تحریک به صورت درصدی از پاسخ حداکثر ممکن بود و شدت تحریکی که می‌توانست ۵۰ درصد پاسخ حداکثر را ایجاد کند، به عنوان پالس آزمون به کار می‌رفت. همانطور که در شکل ۱ مشخص شده است، فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای هیپوکمپ تاثیری بر پاسخ سیناپسی پایه نداشت. به طوری که پاسخ سیناپسی پایه در گروهی که در داخل هیپوکمپ سفتریاکسون دریافت کردند تفاوت معنی‌داری با پاسخ سیناپسی پایه در گروهی که در داخل هیپوکمپ حلال سفتریاکسون یعنی سالین دریافت کرده بودند نداشت ( $P > 0.05$ ، شکل ۱). به منظور بررسی اثر فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت از مدل تحریک زوج پالس استفاده کردیم، که راه مناسبی برای ارزیابی تحریک‌پذیری مدار هیپوکمپی است. میزان مهار گابائرتیک با واسطه گیرنده  $GABA_A$  بر روی نورون‌های هرمی ناحیه CA1 با استفاده از الگوی زوج پالس با فواصل بین پالسی (IPI) ۲۰ میلی‌ثانیه و میزان مهار گابائرتیک با واسطه گیرنده  $GABA_B$  با استفاده از الگوی زوج پالس با فاصله بین پالسی (IPI) ۲۰۰ میلی‌ثانیه‌ای بررسی شد. برای بررسی پاسخ‌های تسهیلی از IPI بین این دو حد یعنی ۸۰ میلی‌ثانیه استفاده شد. در شکل ۲ نتایج مربوط به شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت مشخص شده است. فعال کردن GLT-1 هیپوکمپ در حیواناتی که سفتریاکسون دریافت کردند در مقایسه با گروه کنترل تاثیری بر شاخص زوج پالس نداشت ( $P > 0.05$ ، شکل ۲).



**شکل ۱.** پاسخ سیناپسی پایه. پاسخ‌های سیناپسی پایه در ناحیه استریاتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ به دنبال تحریک شاخه‌های جانبی شافر. در منحنی Input/output شیب دریافت‌کننده سالین (Saline, n=6) و سفتریاکسون (Ceftriaxone, n=6) نشان داده شده است. داده‌ها به صورت Mean±SD است. آزمون آماری Two Way ANOVA تفاوت معنی داری در

ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا، پتانسیل پس سیناپسی تحریکی و مهاری هر دو تغییر کرده باشند. اما از آنجا که در ثبت پتانسیل میدانی در واقع برابند این فرایندها ثبت می‌شود و پاسخ دیده شده حاصل فعالیت‌های تحریکی و مهاری می‌باشد، تغییر معناداری در پاسخ سیناپسی پایه در سطح شبکه مشاهده نشده است. در این مطالعه جهت بررسی اثر فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای هیپوکمپ بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 از تحریکات زوج پالس استفاده شد. این الگوی تحریکی روش مناسبی جهت ارزیابی تحریک‌پذیری مدار هیپوکمپی است.<sup>۱۷</sup> تعدیل زوج پالس، ساده‌ترین نوع شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت است و به شکل تضعیف زوج پالس (PPD, Paired pulse depression) و تسهیل زوج پالس (PPF, Paired pulse facilitation) ظاهر می‌شود.<sup>۱۸</sup> در این پژوهش با وجود فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی که انتظار می‌رود سبب کاهش غلظت گلوتامات در فضای سیناپسی شود، شاهد تغییری در شاخص زوج پالس نبودیم. از آنجا که برداشت و رهائش گلوتامات علاوه بر سلول‌های گلیا توسط نورون‌ها نیز انجام می‌شود،<sup>۱۹</sup> شاید به دنبال برداشت گلوتامات از فضای سیناپسی، این کاهش غلظت توسط مسیرهای دیگر دخیل در تنظیم غلظت گلوتامات جبران شده باشد. به‌عنوان مثال، بین نورون‌ها و آستروسیت‌ها چرخه گلوتامات-گلوتامین وجود دارد.<sup>۲۰</sup> آزنیم گلوتامیناز در نورون و آستروسیت فعالیت دارد و گلوتامین را به گلوتامات تبدیل می‌کند. سوبسترای این آزنیم (گلوتامین) توسط آستروسیت در اختیار نورون قرار می‌گیرد.<sup>۲۱-۲۳</sup> شاید در مطالعه حاضر افزایش برداشت گلوتامات توسط آستروسیت‌ها، با فراهم کردن گلوتامین بیشتر برای نورون‌ها، منجر به تولید و رهائش بیشتر گلوتامات توسط نورون‌ها شده و تغییری در غلظت این ترکیب در فضای سیناپسی ایجاد نشده است. همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهند که ترانسپورتر گلوتاماتی به ویژه در نورون‌های تحریکی نیز وجود دارد.<sup>۲۴</sup> ۱۰-۵ درصد ترانسپورترهای گلوتاماتی هیپوکمپ در آکسون‌های گلوتاماتریک ناحیه CA۳ هیپوکمپ بیان می‌شوند. ترانسپورتر گلوتاماتی نورونی اجازه برداشت قابل توجه گلوتامات به واسطه انتهای عصبی هیپوکمپ را می‌دهد. همچنین مطالعات مختلف مشخص کرده‌اند که ترانسپورترهای گلوتاماتی در شرایطی از جمله کاهش غلظت گلوتامات می‌توانند به‌صورت معکوس عمل کنند و موجب رهائش گلوتامات شوند.<sup>۲۵</sup> شاید در این مطالعه نیز فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی و کاهش غلظت گلوتامات در فضای سیناپسی، سبب رهائش گلوتامات از این ترانسپورترها گردیده

خصوص آستروسیت‌ها با رهائش ترکیبات متعدد تحت عنوان گلیوترانسمیتر در انتقال سیناپسی نقش دارند. به‌عنوان مثال بوناسکو و همکاران با مطالعه بر روی برش‌های مغزی نشان دادند که رهائش خود به خودی گلوتامات از آستروسیت‌های هیپوکمپ که وابسته به نوسانات خود به خودی کلسیم داخل سلولی است، رهائش نوروترانسمیترها از نورون را تنظیم می‌نماید.<sup>۱۱</sup> در مطالعه حاضر با فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا شاهد تغییر معناداری در پاسخ سیناپسی پایه نبودیم. به عبارت دیگر اگرچه مطالعات نشان داده‌اند که رهائش گلوتامات از سلول‌های گلیا بر انتقال سیناپسی موثر بوده است، اما به نظر می‌رسد در شرایط فعالیت پایه، برداشت گلوتامات از فضای سیناپسی توسط این سلول‌ها نقشی در انتقال سیناپسی نداشته باشد. با توجه به نتیجه به دست آمده، ممکن است اثر افزایش بیان و فعالیت این ترانسپورتر به دنبال تجویز سفتریاکسون، از طریق یک حلقه فیدبک منفی تعدیل شده باشد. با افزایش بیان و یا فعالیت ترانسپورتر گلوتاماتی، انتظار می‌رود که میزان غلظت گلوتامات در شکاف سیناپسی کاهش یابد.<sup>۱۲</sup> کاهش غلظت گلوتامات به‌طور مستقیم می‌تواند سبب کاهش انتقال سیناپسی شود. با کاهش غلظت گلوتامات در فضای سیناپسی و عدم تاثیر بر گیرنده‌های متابوتروپیک، میزان رهائش گلوتامات از نورون‌ها افزایش می‌یابد. بنابراین با وجود افزایش برداشت گلوتامات توسط ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا، رهائش آن توسط نورون‌ها افزایش می‌یابد و این احتمال مطرح می‌شود که این دو پدیده ظاهراً یکدیگر را متعادل نموده و شاهد تغییر در پاسخ سیناپسی پایه نبودیم.<sup>۱۳، ۱۴</sup> علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که افزایش غلظت پتاسیم سبب کاهش عملکرد ترانسپورتر گلوتاماتی و افزایش غلظت گلوتامات در فضای سیناپسی می‌شود. در نتیجه تاثیر گلوتامات بر گیرنده‌های متابوتروپیک پایانه‌های پیش‌سیناپسی، میزان رهائش این نوروترانسمیتر از نورون پیش‌سیناپسی کاهش می‌یابد.<sup>۱۵</sup> در این مطالعه نیز تزریق ۹ روز سفتریاکسون در هیپوکمپ منجر به افزایش غلظت پتاسیم خارج سلولی می‌شود و از آنجایی که انتقال یک مولکول گلوتامات به داخل سلول با ورود سه یون سدیم و یک پروتون به داخل سلول و خروج یک یون پتاسیم از سلول همراهی می‌شود،<sup>۱۶</sup> می‌توان فرض کرد که این افزایش پتاسیم سبب کاهش عملکرد ترانسپورتر گلوتاماتی شده و به این ترتیب شاهد تغییری در فعالیت سیناپسی پایه نبودیم. مطالعه حاضر در شرایط *in vivo* انجام شد. در سطح شبکه عصبی CA1 هیپوکمپ، مدارهای تحریکی و مهاری وجود دارد. بنابراین این احتمال وجود دارد که با فعال کردن



### منابع مالی

این پروژه تحقیقاتی با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که در شورای پژوهشی دانشکده پزشکی شماره ۵۹۰ در تاریخ ۱۴۰۰/۰۳/۰۹ تصویب شده است، انجام شده است.

### دسترس‌پذیری داده‌ها

داده‌های ایجادشده در مطالعه فعلی در پایگاه [پژوهان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به نشانی pajoohan.sbm.ac.ir] موجود است.

### ملاحظات اخلاقی

این پروژه تحقیقاتی در کمیته اخلاق دانشکده پزشکی به شماره ۱۲۴ در تاریخ ۱۴۰۰/۰۴/۲۲ با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1400.237 به تصویب رسیده است.

### تعارض منافع

بدینوسیله پدیدآوران اعلام می‌کنند که این اثر حاصل یک پژوهش مستقل بوده و هیچگونه تضاد منافی با سازمان‌ها و اشخاص دیگر ندارد.

است. با توجه به وجود چرخه گلوتامات-گلوتامین بین آستروسیت‌ها و نورون‌ها، این احتمال مطرح است که گلوتامات برداشته شده توسط آستروسیت‌ها در اختیار نورون‌ها قرار گیرد، همچنین ترانسپورترهای گلوتاماتی بیان شده در غشای نورون‌ها نیز به دلیل کاهش غلظت گلوتامات فضای سیناپسی به صورت معکوس عمل کنند و موجب رهاپیش گلوتامات و جبران کاهش غلظت آن در فضای سیناپسی شوند.

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه با فعال کردن ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیای هیپوکمپ (EAAT۲) شاهد تغییری در فعالیت سیناپسی پایه و شاخص زوج پالس در این ناحیه نبودیم. احتمالاً با وجود افزایش فعالیت ترانسپورتر گلوتاماتی سلول‌های گلیا و افزایش برداشت گلوتامات، کاهش غلظت توسط سایر عوامل تنظیم‌کننده از جمله توسط خود سلول‌های گلیا و یا توسط نورون‌ها جبران شده است.

### قدردانی‌ها

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی سپاسگزار هستند.

### مشارکت پدیدآوران

نگین سعیدی: جمع‌آوری داده‌ها، تحلیل و تفسیر داده‌ها. سمیه حیثیت‌طلب: نقد و بررسی مقاله. مهیار جان‌احمدی: ایده‌پردازی. نرگس حسین‌مردی: ایده‌پردازی و طراحی اثر.

## References

- Miguel-Hidalgo JJ. The role of glial cells in drug abuse. *Current drug abuse reviews*. 2009;2(1):76-82. doi: 10.2174/1874473710902010076.
- Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences*. 2009;32(8):421-31. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.001.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(2):54-63. doi: 10.1016/j.molmed.2006.12.005.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*. 2010;119(1):7-35. doi: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- Jo D, Chapman CR, Light AR. Glial mechanisms of neuropathic pain and emerging interventions. *Korean J Pain*. 2009;22(1):1-15. doi: 10.3344/kjp.2009.22.1.1.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*. 1999;22(5):208-15. doi: 10.1016/s0166-2236(98)01349-6.
- Samardzic J, Jadzic D, Hencic B, Jancic J, Strac DS. Introductory Chapter: GABA/Glutamate Balance: A

- Key for Normal Brain Functioning. GABA And Glutamate-New Developments In Neurotransmission Research. 2018;1-9. doi: 10.5772/intechopen.74023.
8. Nakagawa T, SATOH M. Involvement of glial glutamate transporters in morphine dependence. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1025(1):383-8. doi: 10.1196/annals.1307.047.
  9. De Pittà M, Brunel N, Volterra A. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience*. 2016;323:43-61. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.001.
  10. Bernardinelli Y, Muller D, Nikonenko I. Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural plasticity*. 2014;2014:13. doi: 10.1155/2014/232105.
  11. Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CÁ, Roncagliolo M, Fuenzalida M. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *European Journal of Neuroscience*. 2011;33(8):1483-92. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07631.x.
  12. Rimmele TS, Rosenberg PA. GLT-1: the elusive presynaptic glutamate transporter. *Neurochemistry international*. 2016;98:19-28. doi: 10.1016/j.neuint.2016.04.010.
  13. Murphy-Royal C, Dupuis J, Groc L, Oliet SH. Astroglial glutamate transporters in the brain: regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(11):2140-51. doi: 10.1002/jnr.24029.
  14. Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE. Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *Journal of Neuroscience*. 2004;24(19):4551-9. doi: 10.1523/jneurosci.5217-03.2004.
  15. Rimmele TS, Rocher A-B, Wellbourne-Wood J, Chatton J-Y. Control of glutamate transport by extracellular potassium: basis for a negative feedback on synaptic transmission. *Cerebral Cortex*. 2017;27(6):3272-83. doi: 10.1093/cercor/bhx078.
  16. Haydon PG, Nedergaard M. How do astrocytes participate in neural plasticity? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(3):020438. doi: 10.1101/cshperspect.a020438.
  17. Elahi-Mahani A, Hosseinmardi N, Janahmadi M, Seyedaghamiri F, Hooshmandi M. The Role of Glial Cells in Baseline Synaptic Response and Short Term Synaptic Plasticity of CA1 Area of the Hippocampus. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2016;26(135):51-61. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.04.006.
  18. Kravchenko MO, Moskalyuk AO, Fedulova SA, Veselovsky NS. Calcium-dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses. *Neuroscience letters*. 2006;395(2):133-7. doi: 10.1016/j.neulet.2005.10.070.
  19. Rose CR, Felix L, Zeug A, Dietrich D, Reiner A, Henneberger C. Astroglial glutamate signaling and uptake in the hippocampus. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2018;10:451. doi: 10.3389/fnmol.2017.00451.
  20. Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:102. doi: 10.3389/fendo.2013.00102.
  21. Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, White HS. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry international*. 2012;61(4):546-58. doi: 10.1016/j.neuint.2012.02.013.
  22. Pardo B, Rodrigues TB, Contreras L, Garzon M, Llorente-Folch I, Kobayashi K, et al. Brain glutamine synthesis requires neuronal-born aspartate as amino donor for glial glutamate formation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2011;31(1):90-101. doi: 10.1038/jcbfm.2010.146.
  23. Clements JD, Lester R, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science*. 1992;258(5087):1498-501. doi: 10.1126/science.1359647.
  24. McNair LF, Andersen JV, Aldana BI, Hohnholt MC, Nissen JD, Sun Y, et al. Deletion of neuronal GLT-1 in mice reveals its role in synaptic glutamate homeostasis and mitochondrial function. *Journal of Neuroscience*. 2019;39(25):4847-63. doi: 10.1523/jneurosci.3015-19.2019.
  25. Valtcheva S, Venance L. Control of long-term plasticity by glutamate transporters. *Frontiers in synaptic neuroscience*. 2019;11:30. doi: 10.3389/fnsyn.2019.00010.