

The Role of Glial Cells in Baseline Synaptic Response and Short Term Synaptic Plasticity of CA1 Area of the Hippocampus

Azadeh Elahi-Mahani¹,
Narges Hosseinmardi²,
Mahyar Janahmadi³,
Fatemehsadat Seyedaghamiri¹,
Mehdi Hooshmandi¹

¹ MSc in Physiology, Neurophysiology Research Centre, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received September 14, 2015 Accepted December 30, 2015)

Abstract

Background and purpose: Glial cells seem to play role in synaptic plasticity because they have the ability to release trophic factors and gliotransmitters and respond to neurotransmitters. They also play important role in synaptic space homeostasis. In this study, the role of hippocampal glial cells in baseline synaptic response and short term synaptic plasticity were investigated.

Materials and methods: In this experimental study, flourocitrate, glia inhibitor (1nmol/0.5µl), was microinjected intrahippocampally for inhibition of hippocampal glial cells. 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: Inhibition of glial cells by flourocitrate microinjection in CA1 did not have any effect on baseline synaptic response ($P>0.05$). Flourocitrate increased paired pulse index (PPI, control: $62.80\% \pm 5.48$; flourocitrate treated: $87.19\% \pm 12.11$) at 20 ms inter pulse interval ($P<0.05$). But it did not affect PPI at 80 and 200 ms IPI ($P>0.05$).

Conclusion: The results suggest that hippocampal glial cells functions did not influence the baseline synaptic response but affected short term synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus.

Keywords: hippocampus, Gglial cells, synaptic plasticity

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(135): 51-61 (Persian).

نقش سلول های گلایا در پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1 هیپوکمپ

آزاده الهی ماهانی^۱
نرگس حسین مردی^۲
مهیار جان احمدی^۳
فاطمه سادات سیدآقامیری^۱
مهدی هوشمند^۱

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به توانایی سلول های گلایا در آزادسازی فاکتورهای تغذیه ای و گلیوترانسمیتر و نیز پاسخ دهی به میانجی های عصبی آزاد شده توسط نورون ها و نقش آن ها در هموستاز فضای سیناپسی، به نظر می رسد این سلول ها در شکل پذیری سیناپسی نقش دارند. در این مطالعه به بررسی نقش سلول های گلایای هیپوکمپ در پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت این ناحیه پرداختیم.

مواد و روش ها: این مطالعه از نوع تجربی می باشد. جهت مهار سلول های گلایای هیپوکمپ، فلوئوروسیترات، مهارکننده این سلول ها، ($1\text{nmol}/0.5\mu\text{l}$) به صورت دو طرفه در داخل هیپوکمپ پستی تزریق شد. پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت با تکنیک ثبت پتانسیل میدانی بررسی گردید. مسیر Schaffer Collateral تحریک و fEPSP از CA1 ثبت شد. پس از تهیه نمودار Input/output، از تحریکات زوج پالس (Paired pulse) برای القای شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد.

یافته ها: مهار سلول های گلایای توسط ریز تزریق فلوئوروسیترات در ناحیه CA1، پاسخ سیناپسی پایه را متأثر نکرد ($p > 0.05$). مهار این سلول ها سبب افزایش معنی دار شاخص زوج پالس (کنترل: $62/80 \pm 5/48$ درصد، دریافت کننده فلوئوروسیترات: $87/19 \pm 12/11$ درصد) در فاصله بین پالسی ۲۰ میلی ثانیه گردید ($p < 0.05$). اما بر این شاخص در فواصل بین پالسی ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه تأثیری نداشت ($p > 0.05$).

استنتاج: نتایج پیشنهاد می کند عملکرد سلول های گلایای هیپوکمپ بر پاسخ سیناپسی پایه اثری ندارد، اما شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت در ناحیه CA1 هیپوکمپ را متأثر می کند.

واژه های کلیدی: هیپوکمپ، سلول های گلایا، شکل پذیری سیناپسی

مقدمه

پس از معرفی سلول های گلایا در سال ۱۸۵۸ توسط رادولف ویرشو، این سلول ها تنها به عنوان بافت همبند در نظر گرفته می شدند. اما بعدها مشخص شد این سلول ها، که تعدادشان چندین برابر نورون هاست (۷۰ درصد از

مؤلف مسئول: نرگس حسین مردی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی E-mail: nargeshosseinmardi@yahoo.com

۱. کارشناسی ارشد فیزیولوژی، مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۷/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۰/۹

سلول‌های سیستم عصبی مرکزی)، دارای اعمال متعدد دیگری می‌باشند (۲،۱). بعضی از سلول‌های گلیا اساساً در جهت حمایت و پشتیبانی فیزیکی از نورون‌ها عمل می‌کنند. برخی دیگر در هومئوستاز محیط داخلی مغز به خصوص مایع احاطه کننده نورون‌ها و سیناپس‌ها و نیز تغذیه نورون‌ها نقش دارند. در طول جنین‌زایی، سلول‌های گلیا، مهاجرت نورون‌ها و رشد آکسون و دندریت‌ها را هدایت می‌کنند (۴،۳). علاوه بر این، گزارش‌های متعددی در مورد توانایی سلول‌های گلیا در پاسخ و ارسال سیگنال به نورون‌ها و سیناپس‌ها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی وجود دارد (۱).

فراوان‌ترین نوع سلول‌های گلیا، آستروسیت‌ها می‌باشند که بر عملکرد نورون‌ها از طریق ترشح و یا جذب فرستنده عصبی اثر دارند (۵). آن‌ها محیط شیمیایی بیرونی نورون‌ها را توسط برداشتن یون‌های اضافی، خصوصاً پتاسیم تنظیم می‌کنند (۱). این سلول‌ها با فراهم کردن انرژی برای نورون‌ها و سوبستراهای لازم برای تولید نوروترانسمیترها فعالانه به عملکرد مغز کمک می‌کنند (۶). این سلول‌ها گیرنده‌های مختلفی مانند گیرنده‌های یونوتروپیک و متابوتروپیک گلوتامات و ناقل‌هایی برای میانجی‌های عصبی مانند گلوتامات، گابا و گلیسین را بیان می‌کنند (۷). این سلول‌ها مواد فعال عصبی زیادی مانند ATP و D-سیرین ترشح می‌کنند (۸). آستروسیت‌ها در تشکیل و نگهداری سیناپس‌های گلوتاماترژیک دخیل هستند (۹). در منطقه CA1 هیپوکمپ پستانداران، تقریباً تمام سیناپس‌های مجاور، توسط سلول‌های گلیا و به ویژه آستروسیت‌ها تفکیک و احاطه شده اند، به طوری که به صورت شبکه سیناپسی سه جزئی (Tripartite Synapse) در نظر گرفته می‌شوند (۱۰). با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده شد که زوائد میکروگلیاها به طور مستقیم با عناصر سیناپسی، در ارتباط می‌باشد (۱۱). تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که سلول‌های گلیال هیپوکمپ در تنظیم غلظت میانجی‌های عصبی در شکاف سیناپسی، آزادسازی فاکتورهای مانند

ATP که عملکرد پیش سیناپسی را تنظیم می‌کنند و حتی در آزادسازی میانجی‌های عصبی شرکت می‌کنند (۱۲). بر اساس فرضیه تشکیل سیناپس سه جزئی، سلول‌های گلیا در تنظیم فعالیت شبکه عصبی دخیل هستند. اخیراً بسیاری از مطالعات، سلول‌های گلیا را به عنوان یک عنصر سوم در شکل‌پذیری دخیل می‌دانند (۱). در حقیقت هر سیناپس از سه جزء شامل پایانه پیش سیناپسی، پایانه پس سیناپسی و پایانه آستروسیتی تشکیل یافته است و از این طریق آستروسیت‌ها روی عملکرد سیناپس‌ها اثر مستقیم و فعال دارند (۱۳). به دلیل توانایی سلول‌های گلیا در آزادسازی فاکتورهای تروفیک (تغذیه‌ای) و گلیو ترانسمیتر، مطرح شده است که سلول‌های گلیال ممکن است به القا شکل‌پذیری سیناپسی طولانی مدت کمک کنند. شواهد نشان می‌دهد که D-سیرین می‌تواند در پاسخ به فعالیت‌های عصبی از آستروسیت‌ها آزاد شود. این آزادسازی برای ایجاد تقویت طولانی مدت (Long Term Potentiation-LTP) در هیپوکمپ لازم است. مطالعات بیش‌تر که در برش‌های هیپوکمپ انجام شده، نشان می‌دهد که آستروسیت‌ها فعالانه در القای LTP با تولید D-سیرین درگیر هستند (۱۴،۱۵). D-سیرین، آگونیست برای جایگاه اتصال گلیسین در رسپتور NMDA می‌باشد که با افزایش فعال‌سازی گیرنده‌های NMDA، القاء LTP را در محیط کشت سلول‌های گلیا و برش‌های هیپوکمپ ممکن می‌سازد (۱۵). هم‌چنین دیده شده است که سلول‌های آستروسیت در راه‌اندازی سیگنالینگ داخل سلولی که منجر به تغییرات پلاستیسیته در سیستم عصبی مرکزی می‌شود، نقش دارند (۱۶). اما مطالعه‌ای در زمینه نقش این سلول‌ها در شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت انجام نشده است.

با توجه به شکل‌پذیر بودن سلول‌های گلیال و حساسیت آن‌ها به فعالیت‌های عصبی و انتقالات سیناپسی، این فرضیه مطرح می‌شود که سلول‌های گلیا یک نقش محوری در اشکال مختلف شکل‌پذیری داشته باشند. شواهد نشان می‌دهند که سلول‌های گلیا و نورون‌ها نباید

به عنوان عناصر سلولی مستقل در سیستم عصبی در نظر گرفته شوند. بلکه هم نورون‌ها و هم سلول‌های گلیا متقابلاً در مسیرهای مربوط به پردازش اطلاعات و شکل‌پذیری سیناپسی درگیر هستند (۱). به همین منظور در این مطالعه به بررسی نقش سلول‌های گلیا بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1 هیپوکمپ پرداختیم. شدت پاسخ‌دهی نورون‌های ناحیه CA1 هیپوکمپ به تحریکات اعمال شده به شاخه جانبی شافر در شرایط کنترل و زمانی که سلول‌های گلیای این ناحیه غیر فعال گردید، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. در این تحقیق از ۲۷ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۰۰-۲۵۰ گرم، تهیه شده از مرکز پرورش حیوان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) استفاده شد که به تعداد ۵ عدد در هر قفس با یک برنامه ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. تمام آزمایش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. به منظور تزریق داروی فلونوروسیترات (مهارکننده سلول‌های گلیا، سیگما، آمریکا) در ناحیه CA1 هیپوکمپ یک هفته قبل از شروع آزمایش‌ها، پس از بیهوشی با ترکیب کتامین (۷۵ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg)، حیوان در دستگاه استریوتاکی (استولتینگ، آمریکا) قرار می‌گرفت. سپس پوست سر برداشته شده و نواحی برگما و لامبدا مشخص و سپس مطابق با اطلس پاکسینوس واتسون مختصات محل تزریق در ناحیه CA1 هیپوکمپ ($AP = -3.48$, $ML = \pm 2.2$, $DV = 2.5$) از برگما (۱۷) دو طرفه علامت‌گذاری شده و با مته سوراخ می‌گردید و کانول راهنما با طول 10 mm و قطر خارجی 0.65mm، یک میلی‌متر بالاتر از ناحیه CA1 با استفاده از پیچ عینک و سیمان دندانپزشکی روی مجموعه ثابت می‌شد.

به منظور تزریق دارو به داخل ناحیه CA1، یک سوزن تزریق شماره ۲۷ به طول مشخصی بریده می‌شد تا هنگامی که در کانول گذاشته می‌شود، نوک آن حدود ۰/۵ میلی‌متر از سر کانول بیرون بیاید. سپس سوزن به لوله پلی اتیلن که به سرنگ همیتون ۱ میکرولیتری وصل بود، متصل می‌گردید. $0.5 \mu l$ از محلول فلونوروسیترات (۱ nmol) حل شده در بافر فسفات سالین (Phosphate Buffered Saline -PBS) به داخل سرنگ کشیده شده (۱۸) و بعد از خارج کردن درپوش کانول‌هایی که قبلاً در ناحیه CA1 هیپوکمپ کاشته شده بود، به صورت دوطرفه تزریق می‌گردید. تزریق به صورت آهسته و در مدت زمان ۵ دقیقه انجام می‌شد. جهت اطمینان از تزریق کامل دارو، سوزن تزریق به مدت ۱ دقیقه در محل باقی می‌ماند و بعد خارج می‌شد. سپس مجدداً درپوش کانول‌ها گذاشته می‌شد و حیوان به قفس بازگردانده می‌شد و این تزریق‌ها به مدت ۹ روز ادامه می‌یافت. در گروه کنترل، $0.5 \mu l$ از حلال (بافر فسفات سالین) تزریق می‌شد. در روز دهم آزمون‌های الکتروفیزیولوژیک انجام می‌شد. تعداد گروه‌های مورد بررسی در این مطالعه ۳ گروه می‌باشد که عبارتند از: ۱- حیوانات دست نخورده که هیچ تیماری روی آن‌ها انجام نشده بود و فقط به منظور ثبت پتانسیل میدانی جراحی می‌شدند. ۲- گروهی که به منظور مهار سلول‌های گلیای هیپوکمپ، فلونوروسیترات را در داخل هیپوکمپ دریافت می‌کردند. ۳- گروهی که حلال فلونوروسیترات یعنی بافر فسفات سالین در داخل هیپوکمپ دریافت می‌کردند. تعداد حیوانات در هر گروه ۹ رأس می‌باشد. ۱- در این مطالعه از تکنیک ثبت پتانسیل میدانی *in vivo field potential recording* (in vivo) برای بررسی پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت استفاده شد. مسیر Schaffer Collateral تحریک و از stratum radiatum ناحیه CA1 ثبت گردید. پس از بیهوش کردن با یورتان داخل صفاقی (۱/۵ g/kg)، حیوان به داخل

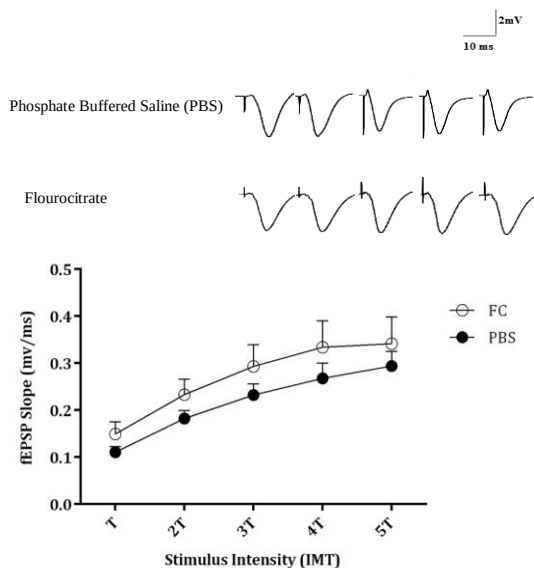
استریوتا کس منتقل می‌شد. بر اساس اطلس پاکسینوس، نقطه تحریک در مسیر جانبی شافر با مختصات ($AP = -3.1$, $ML = 3.1$, $DV = 3-3.5$) و نقطه ثبت در ناحیه دندریتی ($CA1$ (stratum radiatum) با مختصات ($AP = -2.8$, $ML = 1.8$, $DV = 2.5-3.5$) (برگما) علامت‌گذاری می‌شد (۱۷). پس از سوراخ کردن، الکترودهای ثبت و تحریک در ناحیه مورد نظر کاشته می‌شد. با تحریک مسیر انشعابات جانبی شافر، پتانسیل‌های برانگیخته میدانی از ناحیه استراتوم رادیاتوم $CA1$ ثبت می‌گردید. دستور تحریک پالس آزمون (Test Pulse)، موج مربعی مونوفازیک با مدت زمان ۲۰۰ میکروثانیه و تواتر ۰/۱ هرتز) بعد از تعریف در نرم‌افزار، به قسمت Data Acquisition (پرتو دانش، ایران) ارسال و بعد از گذشتن از ایزولاتور (WPI، آمریکا)، توسط الکتروود دو قطبی از جنس فولاد زنگ نزن به مسیر شافر کولترال اعمال می‌گردید. برای رسیدن به ثبت مطلوب و پایدار از ناحیه $CA1$ ، گاهی ضرورت داشت جای الکتروود تحریکی و ثبات چندین بار عوض شود تا بهترین نقاط تحریک و ثبت حاصل گردد. پس از پیدا کردن جای مناسب و تعیین دقیق محل تحریک و ثبت، تحریکات حداقل به مدت ۲۰ دقیقه تا زمانی که پاسخ پایدار شود، اعمال می‌شد. منظور از پایدار بودن پاسخ یعنی میزان تغییر شیب fEPSP کم‌تر از ۱۰ درصد باشد. پس از پایدار شدن پاسخ سیناپسی، جهت محاسبه شدت جریان پالس آزمون، ابتدا رابطه Input/Output (I/O) برای هر حیوان به دست می‌آمد. به این ترتیب که مسیر انشعابات جانبی شافر با شدت‌های ۱۰۰ تا ۱۲۰۰ میکروآمپر، تحریک و پاسخ برانگیخته میدانی ثبت می‌گردید. به عبارت دیگر تحریک از حداقل شدتی که باعث برانگیختن پاسخ می‌گردید تا زمانی که پاسخ به حداکثر میزان خود برسد به مسیر اعمال می‌گردید. 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 ۴۰-۵۰

درصد پاسخ حداکثر می‌شد، به عنوان شدت پالس آزمون برای اعمال تحریک‌های زوج پالس استفاده می‌شد. به منظور بررسی شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت از تحریکات زوج پالس متشکل از دو پالس مربعی با فواصل زمانی (IPI: Inter Pulse Interval) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی‌ثانیه که با تواتر ۰/۱ هرتز اعمال می‌شد، به مدت ۱۰ دقیقه استفاده می‌شد. پاسخ‌ها بعد از تقویت (Gain=1000) توسط پره آمپلی فایر و آمپلی فایر (WPI، آمریکا) و فیلتر شدن (باند عبور ۱ هرتز تا ده کیلوهرتز) با فرکانس ۱۰ کیلوهرتز نمونه برداری شده و در کامپیوتر ذخیره می‌شد. تجزیه و تحلیل به صورت off-line بر روی پاسخ‌های ذخیره شده صورت می‌گرفت. متوسط ۶ پاسخ برای آنالیز بعدی مورد استفاده قرار می‌گرفت و شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی میدانی (fEPSP) از متوسط پتانسیل‌های میدانی ثبت شده از ناحیه stratum radiatum تعیین می‌شد. با کمک برنامه کامپیوتری آنالیز داده‌ها، شیب fEPSP تعیین می‌شد و شاخص زوج پالس (PPI: Paired Pulse Index) به صورت درصد شیب fEPSP دوم به شیب fEPSP اول ($\%fEPSP2/fEPSP1$) محاسبه می‌شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون ANOVA و Unpaired t-test استفاده شد. در همه محاسبات آماری، $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. نتایج به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده است.

یافته‌ها

اثر مهار سلول‌های گلیا بر پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم $CA1$ هیپوکمپ

تحریک شاخه‌های جانبی شافر، پتانسیل‌های پس سیناپسی دسته‌جمعی (fEPSP) را در ناحیه استراتوم رادیاتوم $CA1$ بر می‌انگیخت. با تحریکات ۰/۱ هرتز هیچ تقویتی ناشی از فرکانس تحریک صورت نمی‌گرفت. برای رسم منحنی Input/output، شیب پتانسیل پس سیناپسی تحریکی در پنج شدت تحریک مختلف



تصویر شماره ۱: پاسخ های سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ به دنبال تحریک شاخه های جانبی شافر. در منحنی Input/output شیب fEPSP در حیوانات دریافت کننده بافر فسفات سالین (PBS, n=9) و فلوروسیترات (Flourocitrate, n=9) نشان داده شده است. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ است. آزمون آماری ANOVA تفاوت معنی داری در پاسخ سیناپسی پایه بین گروه ها نشان نداد. (Integer multiples of the threshold intensity) به IMT معنی ضریب صحیحی از شدت تحریک آستانه است. Trace ها نمونه ای از ثبت می باشد. مقیاس اندازه گیری: ۱۰ms, ۲mV, ANOVA, $p > 0.05$

اثر مهار سلول های گلیا بر شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت
به منظور بررسی اثر مهار سلول های گلیا بر شکل پذیری کوتاه مدت، از مدل تحریک زوج پالس استفاده کردیم، که راه مناسبی برای ارزیابی تحریک پذیری مدار هیپوکمپی است. میزان مهار GABAergic با واسطه گیرنده GABA_A بر روی جسم سلولی نورون های هرمی ناحیه CA1 با استفاده از الگوی زوج پالس با فواصل بین پالسی (IPI) ۲۰ میلی ثانیه و میزان مهار GABAergic با واسطه گیرنده GABA_B با استفاده از الگوی زوج پالس با فاصله بین پالسی (IPI) ۲۰۰ میلی ثانیه ای بررسی گردید. برای بررسی پاسخ های تسهیلی از IPI بین این دو حد یعنی ۸۰ میلی ثانیه استفاده شد. در تمام گروه ها، متوسط PPI در فاصله ۲۰ میلی ثانیه کم تر از یک (PPD: Paired Pulse Depression) بود

اندازه گیری می شد. کم ترین شدتی که پاسخ را بر می انگیزت، شدت آستانه (T:Threshold) و شدتی که سبب تولید حداکثر پاسخ می شد، 5T می نامیدیم. سه شدت 2T، 3T، 4T به گونه ای بین شدت حداقل و حداکثر تعریف می شدند که پاسخ به ترتیب دو، سه و چهار برابر پاسخ آستانه گردد. مقایسه میانگین شدت تحریک 1T، 2T، 3T، 4T و 5T برای گروه دریافت کننده فلوروسیترات و گروه های کنترل مربوطه تفاوت معنی داری نشان نداد (Two way ANOVA, $p > 0.05$). پاسخ های برانگیخته در شدت های بالای 5T اشباع نشان می دادند. بنابراین تعریف شدت تحریک به صورت درصدی از پاسخ حداکثر ممکن بود و شدت تحریکی که می توانست ۵۰-۴۰ درصد پاسخ حداکثر را ایجاد کند، به عنوان پالس آزمون به کار می رفت. پاسخ سیناپسی پایه در گروهی که سلول های گلیای ناحیه CA1 آن ها با تزریق فلوروسیترات مهار شده بود، نسبت به گروه کنترل (گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین) تفاوت معنی داری نداشت ($p > 0.05$). (Two way ANOVA, تصویر شماره ۱). لازم به ذکر است که پاسخ سیناپسی پایه در گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین مشابه این پاسخ در حیوانات دست نخورده بود.

جدول شماره ۱: پاسخ سیناپسی پایه

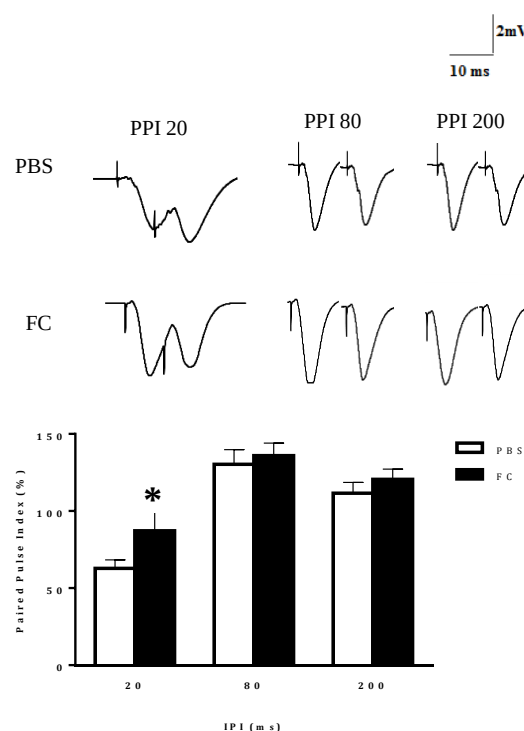
Groups	I _{1T} (μA)	I _{2T} (μA)	I _{3T} (μA)	I _{4T} (μA)	I _{5T} (μA)
PBS	۳۷/۶۹±۱۵/۱۶	۲۷/۱۵±۱۵/۵۹	۲۳/۰۸±۱۳/۱۳	۱۷/±۱۱/۵۵	۱۱۵/۳۸±۱۱/۵۳
Flourocitrate	۳۹/۳۸±۲۷/۲۶	۳۴/۲۱±۲۱/۴۵	۲۸۴/۶۲±۱۸/۰۳	۲۲۶/۱۵±۱۴/۲۱	۱۶۳/۸۵±۱۲/۵۹

اطلاعات نشان دهنده ی شدت تحریک استفاده شده جهت برانگیختن پاسخ سیناپسی پایه در لایه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ به دنبال تحریک شاخه های جانبی شافر در گروه دریافت کننده بافر فسفات سالین (PBS) به عنوان گروه کنترل و هم چنین در گروهی که فلوروسیترات در ناحیه CA1 دریافت کردند، می باشد. تفاوت معنی داری بین شدت های تحریک در دو گروه دیده نشد ($p > 0.05$). شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ آستانه. I_{1T}، I_{2T}، I_{3T}، I_{4T}، I_{5T}: شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ به میزان ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ برابر آستانه. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است.

CA1 هیپوکمپ را تغییر نداد، اما سبب افزایش شاخص زوج پالس در IPI ۲۰ میلی ثانیه می شود که به عنوان ساده ترین نوع شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت در نظر گرفته می شود. در این پژوهش به منظور مهار سلول های گلیا از فلونوروسیترات استفاده گردید. نشان داده شده است فلونوروسیترات با غلظت ۱ نانومول به طور انتخابی سلول های گلیا را به صورت برگشت پذیر مهار می کند. فلونوروسیترات ۴ ساعت بعد از تزریق به حداکثر اثر خود می رسد و پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، اثر این ماده از بین می رود. هم چنین نشان داده شده که تجویز دوز بالاتری از فلونوروسیترات (۲ نانومول) باعث تغییر ساختار نورونی خواهد شد (۱۸). به همین دلیل ما نیز در این پژوهش از غلظت ۱ نانومول فلونوروسیترات هر ۲۴ ساعت استفاده کردیم تا به طور انتخابی فقط سلول های گلیال تحت تاثیر قرار گرفته و مهار شوند. به منظور بررسی سطح فعالیت نورون های ناحیه CA1، پاسخ سیناپسی پایه را بررسی نمودیم. نتایج این مطالعه نشان داد مهار سلول های گلیا، افزایش اندک و غیر معنی داری در شیب fEPSP نسبت به گروه کنترل ایجاد کرد. ما در مطالعه خود پاسخ سیناپسی پایه را با استفاده از ثبت fEPSP از لایه استریاتوم رادیاتوم CA1، بررسی کردیم. ثبت امواج مربوط به fEPSP در مجموعه نورون ها در واقع برداشتی در مورد سیناپس های تحریکی و برآیند دپلاریزاسیون های موضعی ایجاد شده در نورون ها را آشکار می کند و نمادی از کارایی سیناپس های تحریکی مسیرهای آوران می باشد. در این مطالعه به منظور بررسی اثر مهار سلول های گلیا بر شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1، از تحریک زوج پالس استفاده شده است، که راه مناسبی برای ارزیابی تحریک پذیری مدار هیپوکمپی است. مشخص شده که سیستم GABAergic برای شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت اهمیت فراوانی دارد (۱۹).

مطالعاتی که در طی ۲۰ سال گذشته در زمینه نقش سلول های گلیا در سیستم عصبی انجام شده است،

و برای فواصل ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه، بزرگ تر از یک (PPF: Paired Pulse Facilitation) بود. مهار سلول های گلیا تأثیری بر شاخص زوج پالس در IPI ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه نداشت ($Unpaired\ t\text{-test}, p > 0.05$)، تصویر شماره ۲). اما در IPI ۲۰، ۲۰ میلی ثانیه افزایش معنی داری در گروه دریافت کننده فلونوروسیترات ($n=9$)، $12/11 \pm 87/19$ درصد) نسبت به گروه کنترل ($n=9$)، $5/48 \pm 62/80$ درصد) مشاهده گردید ($p < 0.05$)، $Unpaired\ t\text{-test}$ ، تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: شاخص زوج پالس (PPI) در فواصل بین دو پالس (IPI) ۲۰، ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه. مهار سلول های گلیا سبب افزایش معنی داری در شاخص زوج پالس (PPI) در IPI ۲۰ میلی ثانیه شد ولی تأثیری بر شاخص زوج پالس (PPI) در IPI ۸۰ و ۲۰۰ میلی ثانیه نداشت. داده ها به صورت $Mean \pm SEM$ نشان داده شده اند. Trace ها نمونه ای از ثبت می باشد. مقیاس اندازه گیری: ۱۰ms، ۲mV. $Unpaired\ t\text{-test}$ ، * $p < 0.05$.

بحث

نتایج این مطالعه نشان می دهد که مهار سلول های گلیای هیپوکمپ اگر چه پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه

مشخص نموده است که این سلول‌ها به خصوص آستروسیت‌ها، مشارکت کنندگان فعالی در انتقال سیناپسی هستند و فعالانه قدرت سیناپسی را تنظیم می‌نمایند. مشخص شده است این سلول‌ها با رهایش ترکیبات متعدد تحت عنوان گلیوترانسمیتر این نقش را ایفا می‌کنند. تمام این مطالعات در شرایط *in vitro* و بر روی برش‌های مغزی انجام شده است (۲۰). به عنوان مثال Bonansco و همکاران نشان دادند که رهایش خود به خودی گلوتامات از آستروسیت‌های هیپوکمپ که وابسته به نوسانات خود به خودی کلسیم داخل سلولی است، رهایش نوروترانسمیتر را تنظیم می‌نماید (۲۱). مطالعات دیگر نشان داده است سیگنالینگ کلسیم آستروسیتی، فرکانس EPSP و IPSP هر دو را افزایش می‌دهد، به طوری که در محیط کشت همزمان نورون‌ها و آستروسیت‌ها فرکانس EPSP و IPSP به میزان ۵۰-۲۰ درصد در اثر القای سیگنالینگ کلسیم در آستروسیت‌ها افزایش یافت (۲۲). با توجه به این که مطالعه حاضر در شرایط *in vivo* انجام شده است که در سطح شبکه عصبی CA1 هیپوکمپ، مدارهای تحریکی و مهارتی وجود دارد، این احتمال مطرح است که با مهار متابولیک سلول‌های گلیا هم EPSP و هم IPSP تغییر کرده است، اما چون در ثبت پتانسیل میدانی عملاً برآیند این فرآیندها ثبت می‌گردد، ما شاهد تغییر معنی‌داری در پاسخ سیناپسی پایه در سطح شبکه نبودیم. علاوه بر این مطالعات نشان داده است که تأثیر القای سیگنالینگ کلسیم (که در حقیقت به معنای القای فعالیت آستروسیت‌هاست) بر تغییر فعالیت نورون‌ها بسیار زودگذر است (کم‌تر از یک دقیقه). اکثر مطالعاتی که بر روی برش‌ها انجام شده است ماندگاری اثر فعالیت آستروسیت‌ها بر روی انتقال سیناپسی را در حد ده‌ها ثانیه گزارش نموده‌اند (۲۰). شاید یکی از دلایلی که در مطالعه حاضر، مهار سلول‌های گلیای هیپوکمپ تأثیری بر پاسخ سیناپسی پایه نداشت این باشد که حیوانات به طور مزمن فلوئوروسیترات دریافت نمودند و سپس ثبت

انجام گردید که شرایط با به کار بردن اثر حاد آن بر روی برش‌های مغزی بسیار متفاوت می‌باشد. با این وجود بسیاری از مطالعاتی که در شرایط *in vitro* هم انجام شده است، نتوانستند اثر مهار سلول‌های گلیا بر انتقال سیناپسی را اثبات نمایند که شاید به دلیل گذرا بودن و ماندگاری کوتاه این اثر باشد. نکته مهم‌تر این که مطالعات نشان داده‌اند فعالیت آستروسیت‌ها در هنگام تحریک شدید سیناپس‌ها بروز می‌نماید تا بتوانند نقش خود را در هومئوستاز ایفا نمایند (۲۰). بنابراین در سطح فعالیت پایه سیناپسی ممکن است عملکرد آستروسیت‌ها برجسته نباشد. در نتیجه با مهار آن‌ها تغییری در فعالیت سیناپسی پایه ایجاد نشده است. آستروسیت‌ها اجزای دینامیک سیگنالینگ مغزی هستند که می‌توانند ورودی‌های نورونی را حس کرده، جمع‌بندی نموده و از طریق سیگنالینگ کلسیمی پیچیده پاسخ دهند. سیگنالینگ کلسیم نشان‌دهنده تحریک‌پذیری این سلول‌ها می‌باشد (۲۳). در مطالعه حاضر مشخص گردید که مهار این سلول‌های موجب افزایش شاخص زوج پالس در فاصله بین پالسی ۲۰ میلی‌ثانیه گردید. تعدیل زوج پالس که ساده‌ترین نوع شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت می‌باشد، معمولاً در فواصل زمانی بین ده‌ها میلی‌ثانیه تا چندین ثانیه اتفاق می‌افتد و می‌تواند به شکل مهار زوج پالس (PPD) و یا مهار زوج پالس (PPF) ظاهر شود (۲۴). مشخص گردیده است که نورون‌های واسط GABAergic به عنوان پایه و اساس فیزیولوژیک ساز و کارهای مهارتی پس و پیش خورد در هیپوکمپ عمل می‌کنند (۱۰). به دلیل این که در پدیده PPD، تضعیف پاسخ به دومین تحریک از یک زوج پالس که با فاصله خاصی به دنبال هم می‌آیند، اندازه‌گیری می‌شود؛ این پدیده به عنوان یک فرآیند هومئوستاتیک در نظر گرفته می‌شود که سطح عمل سیستم مهارتی را در مدار هیپوکمپ منعکس می‌نماید (۲۵). مشخص شده است سلول‌های گلیا به خصوص آستروسیت‌ها به طرق مختلف شامل داشتن گیرنده‌های

گابا و نیز ناقلین آن با سیستم مهاري گاباژژیک تعامل دارند (۲۶). این اثر تنظیمی آستروگلیاها می تواند مستقیماً به واسطه رهایش گلیوترانسمیترهای مهاري باشد که شامل ATP فعال کننده گیرنده آدنوزینی A1، کانایونیوید فعال کننده گیرنده های کانایونیویدی CB1 (۲۷)، گابای فعال کننده گیرنده های GABA_A و GABA_B (۲۸) باشد. مشخص شده است که تمام این مسیرها سبب کاهش رهایش گلوتمات می گردد. بنابراین شاید در این مطالعه با مهار آستروگلیاها و حذف اثر آن ها در تولید گابا، شاهد کاهش مهار بودیم که به صورت افزایش شاخص زوج پالس خود را نشان داده است. علاوه بر این، تعامل پیچیده ای بین نورون های تحریکی، مهاري و آستروگلیاها در ارتباطات سیناپسی شافر به CA1 وجود دارد. Serrano و همکاران نشان داده اند که در اثر تحریک تتانیک مسیر شافر کولترال و رهایش گلوتمات، اینترنورون های گاباژژیک از طریق عملکرد گیرنده های NMDA فعال می شوند. گابا رها شده از این نورون ها بر گیرنده های GABA_B موجود بر روی سلول های گلیا عمل کرده و منجر به رهایش گلیوترانسمیتر ATP می شود که پس از شکسته شدن به آدنوزین از طریق اتصال به گیرنده A1 آدنوزین در پایانه های شافر سبب مهار پیش سیناپسی رهایش نوروترانسمیتر می گردد (۲۹). بنابراین می توان انتظار داشت که با حذف عملکرد آستروگلیاها شاهد افزایش شاخص زوج پالس باشیم. علاوه بر این سلول های گلیا با دارا بودن GAT3، هم چون نورون ها نقش مهمی در تنظیم غلظت خارج سلولی گابا دارند و با مهار آن ها بخشی از توان مهاري حاکم بر ارتباطات سیناپسی کاهش می یابد. اگرچه لازم به ذکر است که این عمل سلول های گلیا در سطح فعالیت پایه فیزیولوژیک، کم تر از زمانی است که فعالیت سیناپتیکی تحریک شده باشد. Shigetomi و همکاران نشان داده اند که کارایی سیناپس های مهاري در هیپوکمپ به طور دقیق توسط بیان GAT3 آستروسیتی تنظیم می گردد. به طوری که کاهش بیان GAT3، سبب افزایش غلظت خارج سلولی

گابا می شود که از طریق کاهش حساسیت گیرنده های GABA_A منجر به کاهش فرایند مهاري در سطح شبکه می شود (۳۰). با توجه به این که در مطالعه حاضر، تغییر معنی دار در شاخص زوج پالس در فاصله بین پالسی ۲۰ و نه در فاصله بین پالسی ۲۰۰ افزایش یافته است و با توجه به این که کاهش پاسخ به پالس دوم در مقایسه با پالس اول در فاصله بین پالسی ۲۰ به عملکرد گیرنده های GABA_A و کاهش پاسخ به پالس دوم در مقایسه با پالس اول در فاصله بین پالسی ۲۰۰ به عملکرد گیرنده های GABA_B نسبت داده می شود (۲۵، ۱۰)، منطقی است که شاهد افزایش بیش تر شاخص زوج پالس در فاصله بین پالسی ۲۰ باشیم.

در این مطالعه شاهد تغییری در PPF در فواصل بین پالسی ۸۰ میلی ثانیه نبودیم. سازوکار پیش سیناپسی PPF در ارتباطات سیناپسی مختلف از جمله هیپوکمپ نشان داده شده است. در حقیقت بزرگ تر بودن پاسخ دوم در اثر تسهیل رهایش پیک عصبی است (۳۱). بنابراین به نظر می رسد افزایش غلظت کلسیم در پایانه پیش سیناپسی در اثر تحریک دوم نسبت به این افزایش در اثر تحریک اول توسط فعالیت یا عدم فعالیت آستروسیت ها متأثر نمی گردد.

در مطالعه انجام شده توسط Wang و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده گردید مهار سلول های گلیا توسط تزریق داخل بطن مغزی فلوئوروسیترات توانست امواج مغزی (EEG) ثبت شده در قشر پروفورتال و هیپوکمپ را تغییر دهد (۳۲). اما لازم به ذکر است نه تنها نوع تزریق داخل بطن مغزی فلوئوروسیترات در مطالعه آن ها با مطالعه حاضر (تزریق داخل هیپوکمپی) متفاوت است، بلکه دوزهای به کار رفته توسط Wang و همکاران بسیار بالاتر از دوز استفاده شده در این مطالعه می باشد. نتایج این مطالعه پیشنهاد می کند پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه CA1 هیپوکمپ توسط مهار سلول های گلیا این ناحیه متأثر نمی شود و علاوه بر این، تغییرات مشاهده شده در شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت (افزایش شاخص

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب ستاد توسعه علوم و فناوری های شناختی می باشد که بدین وسیله نویسندگان از مسئولین آن تشکر و سپاسگزاری می نمایند. هم چنین تقدیر و تشکر فراوان از استاد بزرگوار سرکار خانم دکتر معتمدی که امکان انجام تحقیق در مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی را فراهم نمودند.

زوج پالس) در ناحیه CA1 هیپوکمپ در حیواناتی که سلول های گلیای این ناحیه مهار شده بود، وابسته به نوع و مکانیسم های در گیر در این نوع شکل پذیری سیناپسی می باشد.

از محدودیت های این مطالعه می توان به نزدیک بودن محل تزریق به محل تحریک و ثبت الکتروفیزیولوژیک اشاره نمود که نیازمند دقت زیاد در جراحی هم در مرحله کاشت کانول راهنما و هم در مرحله ثبت می باشد.

References

1. Todd KJ, Serrano A, Lacaille JC, Robitaille R. Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 2006; 99(2): 75-83.
2. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho) physiology. *J Neurochem* 2012; 121(1): 4-27.
3. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia—more than just brain glue. *Nature* 2009; 457(7230): 675-677.
4. Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15(5): 542-548.
5. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 2003; 26(10): 523-530.
6. Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD. Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 151-174.
7. Hutchinson MR, Bland ST, Johnson KW, Rice KC, Maier SF, Watkins LR. Opioid-induced glial activation: mechanisms of activation and implications for opioid analgesia, dependence, and reward. *Scientific World Journal* 2007; 7: 98-111.
8. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron* 2008; 60(3): 430-440.
9. O Dowd BS, Gibbs ME, Sedman GL, Ng KT. Astrocytes implicated in the energizing of intermediate memory processes in neonate chicks. *Brain Res Cogn Brain Res* 1994; 2(2): 93-102.
10. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The hippocampus book*: Oxford University Press; 2006.
11. Torregrossa MM, Corlett PR, Taylor JR. Aberrant learning and memory in addiction. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96(4): 609-623.
12. Kuffler SW, Nicholls JG. The physiology of neuroglial cells. *Ergeb Physiol* 1966; 57(1): 1-90.
13. Vijayaraghavan S. Glial-neuronal interactions—implications for plasticity and drug addiction. *AAPS J* 2009; 11(1): 123-32.
14. Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15(5): 542-548.
15. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, et al. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through

- release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(25): 15194-15199.
16. Shepherd GM. The synaptic organization of the brain. 5th ed. Oxford University Press: New York; 2004.
 17. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition: Access Online via Elsevier; 2006.
 18. Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. Use of Fluorocitrate and Fluoroacetate in the Study of Brain Metabolism. *Glia* 1997; 21(1): 106-113.
 19. Zhang LH, Xu L, Xu TL. Glycine receptor activation regulates short-term plasticity in CA1 area of hippocampal slices of rats. *Cold Spring Harbor Perspec Biol* 2014; 7(3): 1-16.
 20. Haydon P, Nedergaard M. How Do Astrocytes Participate in Neural Plasticity? *Cold Spring Harbor Perspectives Biology* 2014; 7(3): a020438.
 21. Bonansco C, Couve A, Perea G, Ferradas CÁ, Roncagliolo M, Fuenzalida M. Glutamate released spontaneously from astrocytes sets the threshold for synaptic plasticity. *Eur J Neurosci* 2011; 33(8): 1483-1492.
 22. Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG. Calcium elevation in astrocytes causes an NMDA receptor dependent increase in the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; 18(17): 6822-6829.
 23. Sibille J, Zapata J, Teillon J, Rouach N. Astroglial calcium signaling displays short-term plasticity and adjusts synaptic efficacy. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 189.
 24. Kravchenko MO, Moskalyuk AO, Fedulova SA, Veselovsky NS. Calcium-dependent changes of paired-pulse modulation at single GABAergic synapses. *Neurosci Lett* 2006; 395(2): 133-137.
 25. Davies C, Davies S, Collingridge G. Paired-pulse depression of monosynaptic GABA-mediated inhibitory postsynaptic responses in rat hippocampus. *J Physiol* 1990; 424(1): 513-531.
 26. Yoon BE, Lee CJ. GABA as a rising gliotransmitter. *Front Neural Circuits* 2014; 141(8): 1-8.
 27. Navarrete M., Araque A. Endocannabinoids mediate neuron- astrocyte communication. *Neuron* 2008; 57(6): 883-893.
 28. Angulo MC, Le Meur K, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol* 2008; 86(3): 297-303.
 29. Serrano A, Haddjeri N, Lacaille JC, Robitaille R. GABAergic network activation of glial cells underlies hippocampal heterosynaptic depression. *J Neurosci* 2006; 26(20): 5370-5382.
 30. Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci* 2011; 15(1): 70-80.
 31. Santschi LA, Stanton PK. A paired-pulse facilitation analysis of long-term synaptic depression at excitatory synapses in rat hippocampal CA1 and CA3 regions. *Brain Res* 2003; 962(1-2): 78-91.
 32. Wang L, Li CC, Wang GW, Cai JX. The effects of centrally administered fluorocitrate via inhibiting glial cells on working memory in rats. *Sci China C Life Sci* 2009; 52(8): 701-709.