

The Role of Astrocytic Cx43 in Baseline Synaptic Response and Short Term Synaptic Plasticity in CA1 Area of the Hippocampus

Mahgol Darvishmolla¹,
Negin Saeedi²,
Soomaayeh Heysieattalab³,
Narges Hosseinmardi⁴,
Mahyar Janahmadi⁵

¹ MSc Student in Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² PhD Student in Physiology, Neuroscience Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Division of Cognitive Neuroscience, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Professor, Department of Physiology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received November 23, 2021 ; Accepted May 8, 2021)

Abstract

Background and purpose: Astrocytic connexins (Cxs) play roles in ion diffusion to the extracellular milieu and in release of ATP and gliotransmitters including glutamate. Connexin 43 (Cx43) is one of the most abundant Cxs in brain tissue, especially in the hippocampus, so, we investigated its role on CA1 baseline synaptic response and short term synaptic plasticity.

Materials and methods: In this experimental study, bilateral intrahippocampal microinjection of TAT-Gap19, Cx43 blocker (1nmol/1μl) was performed for inhibition of hippocampal astrocytic connexin 43. Baseline synaptic response and short term synaptic plasticity were evaluated by field potential recording.

Results: According to two-way ANOVA, inhibition of hippocampal Cx43 did not have any effect on baseline synaptic response ($P>0.05$). TAT-Gap19 decreased paired pulse index (PPI) at 20 and 80 ms inter pulse intervals (IPI, Unpaired t-test, $P<0.05$), but it did not affect PPI at 200 ms IPI ($P>0.05$).

Conclusion: The results suggest that the function of hippocampal astrocytic Cx43 does not affect baseline synaptic response but affects short term synaptic plasticity in CA1 area of the hippocampus.

Keywords: hippocampus, astrocyte, connexin 43, short term synaptic plasticity, field potential recording

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(198): 169-179 (Persian).

* **Corresponding Author:** Narges Hosseinmardi- School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: nargeshosseinmardi@gmail.com)

نقش کانکسین آستروسیتی 43 (Cx43) در پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1 هیپوکمپ

مهگل درویش ملا¹

نگین سعیدی²

سمیه حیثیت طلب³

نرگس حسین مردی⁴

مهیاریان احمدی⁵

چکیده

سابقه و هدف: کانکسین های آستروسیتی در انتشار یون ها از آستروسیت ها به فضای خارج، رهایش ATP و گلیوترانسمیتر ها از جمله گلو تامات نقش دارند. کانکسین آستروسیتی 43 (Cx43) فراوان ترین کانکسین در بافت مغز، به خصوص هیپوکمپ است. این مطالعه با هدف بررسی نقش کانکسین آستروسیتی 43 (Cx43) در پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت ناحیه CA1 هیپوکمپ، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، جهت مهار Cx43 هیپوکمپ، TAT-Gap19، بلاک های کانال Cx43، (1nmol/1μl) به صورت دو طرفه در داخل هیپوکمپ پشتی تزریق شد. پاسخ سیناپسی پایه و شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت با تکنیک ثبت پتانسیل میدانی بررسی گردید.

یافته ها: بلاک Cx43 هیپوکمپ، پاسخ سیناپسی پایه را متأثر نکرد (Two Way ANOVA, $P > 0/05$). مهار این کانکسین سبب کاهش معنی دار شاخص زوج پالس در فواصل بین پالسی 20 و 80 میلی ثانیه شد (Unpaired t-test, $P < 0/05$)، اما بر این شاخص در فاصله بین پالسی 200 میلی ثانیه تأثیری نداشت (Unpaired t-test, $P > 0/05$).

استنتاج: نتایج حاکی از آن است که عملکرد کانکسین آستروسیتی 43 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، آستروسیت، کانکسین 43، شکل پذیری سیناپسی کوتاه مدت، ثبت پتانسیل میدانی

مقدمه

آستروسیت ها فراوان ترین نوع سلول های گلیا هستند که در هموستاز فضای سیناپسی نقش دارند (1-4). این سلول ها قادر به سنتز و رهایش گلو تامات و گابا می باشند (5-7). کانکسون های عملکردی در رهایش غیر

وزیکولی گلو تامات نقش مهمی دارند (8). کانکسون که از شش کانکسین تشکیل شده است، فضای داخل سلولی را به فضای خارج سلولی متصل می کنند و در تعیین حجم فضای خارج سلولی و تنظیم قدرت سیناپسی و

E-mail: nargeshosseinmardi@gmail.com

مؤلف مسئول: نرگس حسین مردی - تهران: دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. دانشجوی دکتری تخصصی فیزیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

3. استادیار، گروه اعصاب علوم شناختی، دانشکده روانشناسی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

4. دانشیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

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

تاریخ دریافت: 1399/9/3 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/9/4 تاریخ تصویب: 1400/2/18

میانگین داده‌ها با آزمون Two Way ANOVA و Unpaired t-test مقایسه شدند. $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد و نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است.

یافته‌ها و بحث

اثر بلاک کانکسین آستروسیستی 43 (Cx43) بر پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ میانگین شدت تحریک I_T ، I_{2T} ، I_{3T} و I_{4T} در گروه دریافت‌کننده TAT-Gap19 با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$ Two way ANOVA) (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: شدت تحریک استفاده شده جهت برانگیختن پاسخ سیناپسی پایه در گروه دریافت‌کننده PBS و گروه دریافت‌کننده TAT-Gap19

گروه	$I_T (\mu A)$	$I_{2T} (\mu A)$	$I_{3T} (\mu A)$	$I_{4T} (\mu A)$	$I_{5T} (\mu A)$
PBS	$69/4 \pm 6/66$	$90/6 \pm 10/19$	$115/2 \pm 13/74$	$139/6 \pm 17/08$	$170 \pm 24/27$
TAT-Gap19	$93/85 \pm 7/81$	$114/23 \pm 8$	$135 \pm 8/09$	$161/15 \pm 9/71$	$184/62 \pm 11/47$

I_T : شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ آستانه. I_{2T} ، I_{3T} ، I_{4T} ، I_{5T} : شدت تحریک لازم برای برانگیختن پاسخ به میزان 2، 3، 4 و 5 برابر آستانه تفاوت معنی‌داری بین شدت‌های تحریک در دو گروه دیده نشد ($P > 0/05$ Two way ANOVA).

پاسخ سیناپسی پایه در گروهی که کانکسین آستروسیستی 43 ناحیه CA1 آن‌ها با تزریق TAT-Gap19 مهار شد که نسبت به گروه کنترل (دریافت‌کننده بافر فسفات سالین) تفاوت معنی‌داری نداشت ($P > 0/05$ Two way ANOVA) (تصویر شماره 1).

اثر بلاک کانکسین آستروسیستی 43 (Cx43) بر شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت بلاک کانکسین آستروسیستی 43 تأثیری بر شاخص زوج پالس در IPI 200 میلی ثانیه نداشت ($P > 0/05$).

شکل‌پذیری سیناپسی نقش دارند (10,9). از بین انواع کانکسین‌ها، Cx30 و Cx43 در آستروسیت‌ها توزیع بیش‌تری دارند (11). این کانکسین فعالیت سیناپس‌های گلوتاماتی در ناحیه CA1 هیپوکمپ را تنظیم نموده و از طریق رهایش گلوتامات و ATP باعث تغییر فعالیت سیناپس‌های تحریکی می‌شود (12). سهم عملکرد فیزیولوژیک کانکسین 43 آستروسیتی در وضعیت استراحت در انتقال سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه‌مدت مشخص نشده است. این مطالعه با مهار کانکسین 43 هیپوکمپ، و با هدف بررسی نقش آن بر پاسخ سیناپسی پایه و شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه‌مدت CA1 انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. 1 میکرولیتر از محلول TAT-Gap19 (1 nmol) حل شده در بافر فسفات سالین (PBS^1) به صورت دو طرفه در هیپوکمپ با مختصات ($DV=2/5$ ، $AP=-3/48$ ، $ML=2/2$) به مدت 9 روز تزریق گردید (13). در روز دهم ثبت پتانسیل میدانی *in vivo* (in vivo field potential recording) انجام شد. مسیر Schaffer Collateral با مختصات ($DV = 3-3/5$ ، $AP=-3/1$ ، $ML=3/1$) تحریک و از stratum radiatum ناحیه CA1 با مختصات ($DV = 2/5-3/5$ ، $ML=1/8$ ، $AP=-2/8$) ثبت گردید (14). پاسخ سیناپسی پایه با رسم منحنی Input/Output (I/O) بررسی شد. بررسی شکل‌پذیری سیناپسی کوتاه مدت با تحریکات زوج پالس با فواصل زمانی (Inter Pulse Interval: IPI) 20، 80 و 200 میلی ثانیه انجام شد. شیب fEPSP تعیین و شاخص زوج پالس (Paired Pulse Index: PPI) به صورت درصد شیب fEPSP دوم به شیب fEPSP اول ($\%fEPSP2/fEPSP1$) محاسبه شد.

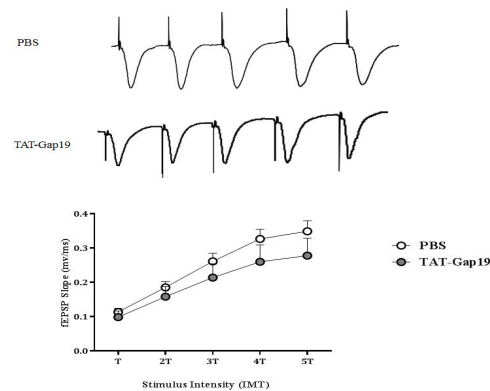
1. Phosphate Buffered Saline

نتایج نشان می‌دهد بلاک این کانکسین اگر چه پاسخ سیناپسی پایه در ناحیه CA1 هیپوکمپ را تغییر نداد اما سبب کاهش شاخص زوج پالس در 20 IPI و 80 میلی ثانیه شد. Gap19 یک نانوپپتید ساختگی با ساختار مشابه حلقه سیتوپلاسمی کانکسین 43 است که از اتصال حلقه سیتوپلاسمی کانکسین 43 به انتهای کربوکسیلیک آن جلوگیری کرده، به طور اختصاصی آن را مهار می‌کند و بر Gap junction ها اثر ندارد (15). TAT ترکیبی است که نفوذپذیری Gap19 را به داخل آستروسیت افزایش می‌دهد (13, 16, 17).

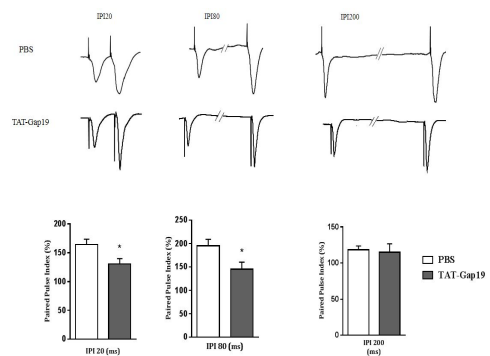
مهار کانکسین 43 آستروسیتی CA1 تغییری در پاسخ سیناپسی پایه ایجاد نکرد (11). غیرفعال کردن ژن کانکسین 43 در قشر بشکه‌ای (Barrel) نیز در ایجاد پاسخ سیناپسی پایه تغییری ایجاد نمی‌کند (18). شبکه عصبی CA1 هیپوکمپ، مدارهای تحریکی و مهاری دارد که در شرایط *in vivo* فعال هستند. محتمل است با مهار کانکسین 43، تغییری در فعالیت این مدارهای تحریکی و مهاری رخ داده باشد و از آن‌جا که در ثبت پتانسیل میدانی برآیند این فرایندها ثبت می‌شود، تغییر معنی‌داری در سطح شبکه مشاهده نشده است. اگرچه رهایش گلو تامات بر انتقالات سیناپسی مؤثر است، اما به نظر می‌رسد رهایش گلو تامات از طریق کانکسین 43 تحت تأثیر عوامل جبران‌کننده قرار می‌گیرد که باعث تعدیل تأثیرات آن در فضای سیناپسی می‌شود. کانکسین 30 نیز در تنظیم فضای سیناپسی نقش دارد (19). احتمال دارد فعالیت بیش‌تر کانکسین 30 در جهت حفظ حالت پایدار، کاهش رهایش گلو تامات ناشی از مهار کانکسین 43 را تا حدی جبران کرده باشد، در نتیجه تغییری در پاسخ سیناپسی پایه مشاهده نگردید.

تحریک زوج پالس راه مناسبی جهت ارزیابی تحریک‌پذیری مدار هیپوکمپی است (3). تعدیل زوج پالس، ساده‌ترین نوع شکل‌پذیری کوتاه مدت است که بسته به فاصله زمانی بین دو تحریک به شکل PPD (Paired Pulse Depression) و PPF

(Unpaired t-test)، اما سبب کاهش معنی‌داری آن در 20 IPI ($n=11$, $130/6 \pm 9/2$ درصد) و 80 میلی ثانیه ($n=13$, $145/2 \pm 15/10$ درصد) نسبت به گروه کنترل ($n=22$, $163/6 \pm 8/9$ درصد) و ($n=24$, $185 \pm 11/80$ درصد) (Unpaired t-test, $P < 0/05$) (تصویر شماره 2).



تصویر شماره 1: پاسخ‌های سیناپسی پایه در ناحیه استراتوم رادیاتوم CA1 هیپوکمپ، بلاک کانکسین 43 تأثیری بر پاسخ سیناپسی پایه نداشت. شیب fEPSP در حیوانات کنترل (PBS $n=24$) و تیمار TAT-Gap19 ($n=13$) نشان داده شده است. آزمون آماری ANOVA تفاوت معنی‌داری در پاسخ سیناپسی پایه بین گروه‌ها نشان نداد. ضریب صحیحی از شدت تحریک آستانه است. Trace ها نمونه‌ای از ثبت می‌باشد. مقیاس اندازه گیری: 1mV, 10ms, $P > 0/05$.



تصویر شماره 2: شاخص زوج پالس (PPI) در فواصل بین دو پالس (IPI) 20، 80 و 200 میلی ثانیه مهار کانکسین 43 آستروسیتی سبب کاهش معنی‌داری در شاخص زوج پالس (PPI) در 20 IPI و 80 میلی ثانیه شد ولی تأثیری بر این شاخص در 200 IPI میلی ثانیه نداشت. Trace ها نمونه‌ای از ثبت می‌باشد. مقیاس اندازه گیری:

Unpaired t-test, $*P < 0/05$, 1mV, 10ms

شده از تحریک دوم، احتمال رهایش پیک عصبی را افزایش می‌دهد. هر تغییر که احتمال رهایش پیک عصبی را دگرگون نماید، باید بزرگی PPF را متأثر کند (25). به نظر می‌رسد که مهار کانکسین 43 از طریق کاهش رهایش پیک‌های عصبی از جمله گلو تامات شاخص زوج پالس را در IPI 80 میلی‌ثانیه کاهش داده است. از آنجایی که با افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی آستانه‌ی ولتاژی باز شدن کانکسین 43 کاهش می‌یابد، احتمال دارد نقش آن در رهایش گلو تامات برجسته‌تر شود (13). در نتیجه با بلاک آن، کاهش شاخص زوج پالس در IPI 80 میلی‌ثانیه مشاهده گردید. از آنجا که کانکسین 43 در رهایش گلیوترانسمیترهای مختلفی مانند گلو تامات و ATP نقش دارد، مهار آن می‌تواند موجب برهم خوردن تعادل غلظت این فاکتورها در فضای خارج سلولی شود و در نتیجه شکل پذیری سیناپسی را نیز متأثر کند.

سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران است که بدین وسیله نویسندگان از مسئولین آن تشکر می‌نمایند.

References

- Allen NJ, Barres BA. Glia—more than just brain glue. *Nature* 2009; 457(7230): 675-677.
- Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2005; 15(5): 542-548.
- Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. *The hippocampus book*: Oxford university press; 2007.
- Kuffler S, Nicholls J. *The physiology of neuroglial cells*. *Ergeb Physiol* 1966; 57: 1-90.
- Márquez J, Campos-Sandoval JA, Peñalver A, Matés JM, Segura JA, Blanco E, et al. Glutamate and brain glutaminases in drug addiction. *Neurochemical Research* 2017; 42(3): 846-857.
- Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. Astrocytic control of biosynthesis and turnover of the neurotransmitters glutamate and GABA. *Front Endocrinol* 2013; 4: 102.
- Hackett JT, Ueda T. Glutamate Release. *Neurochem Res* 2015; 40(12): 2443-2460.
- Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 2008; 52(1-2): 142-154.
- Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. Connexin hemichannels in astrocytes: Role in CNS
- (Paired Pulse Facilitation) اتفاق می‌افتد. فواصل 10 و 20 میلی‌ثانیه برای بررسی وقایع مهاری گیرنده GABA_A مورد استفاده قرار می‌گیرد و فواصل طولانی‌تر (200 میلی‌ثانیه) با وقایع مهاری گیرنده GABA_B مرتبط است (20). مهار کانکسین 43 شاخص زوج پالس در IPI 20 میلی‌ثانیه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. کانکسین 43 علاوه بر رهایش گلو تامات نقش به‌سزایی در رهایش ATP دارد (9). ارتباط عملکردی GABA_A و گیرنده‌ی ATP (P2XR) نشان داده شده است (21). آگونیست گیرنده‌ی P2X، جریان‌های گابائژیک را در نورون‌های هرمی کاهش می‌دهد (22). ATP از طریق گیرنده P2X، باعث تحریک رهایش گلو تامات می‌شود که اثرات مهاری گابا را کاهش می‌دهد (23، 24). به‌نظر می‌رسد مهار کانکسین 43 از طریق کاهش رهایش ATP، فعالیت گیرنده‌های GABA_A را افزایش داده و در نتیجه‌ی جریان‌های مهاری افزایش یافته است که کاهش شاخص زوج پالس در فاصله 20 میلی‌ثانیه مشاهده گردید. TAT-Gap19، PPI را در IPI 80 میلی‌ثانیه نیز کاهش داد. بزرگ‌تر بودن پاسخ دوم نسبت به پاسخ اول در اثر تسهیل رهایش پیک عصبی است. یون کلسیم آزاد باقی مانده در پایانه‌ها در اثر تحریک اول با یون کلسیم وارد

- disorders. *Front Mol Neurosci* 2019; 12: 23.
10. Giaume C, Naus CC. Connexins, gap junctions, and glia. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling* 2013; 2(4): 133-142.
 11. Chever O, Pannasch U, Ezan P, Rouach N. Astroglial connexin 43 sustains glutamatergic synaptic efficacy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; 369(1654): 20130596.
 12. Mayorquin LC, Rodriguez AV, Sutachan J-J, Albarracín SL. Connexin-mediated functional and metabolic coupling between astrocytes and neurons. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 118.
 13. Walrave L, Vinken M, Albertini G, De Bundel D, Leybaert L, Smolders JJ. Inhibition of connexin43 hemichannels impairs spatial short-term memory without affecting spatial working memory. *Front Cell Neurosci* 2016; 10: 288.
 14. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th ed: Elsevier; 2006.
 15. Iyyathurai J, Dhondt C, Wang N, De Bock M, Himpens B, Retamal MA, et al. Peptides and peptide-derived molecules targeting the intracellular domains of Cx43: gap junctions versus hemichannels. *Neuropharmacology* 2013; 75: 491-505.
 16. Abudara V, Bechberger J, Freitas-Andrade M, De Bock M, Wang N, Bultynck G, et al. The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Front Cell Neurosci* 2014; 8: 306.
 17. Wang N, De Bock M, Decrock E, Bol M, Gadicherla A, Bultynck G, et al. Connexin targeting peptides as inhibitors of voltage- and intracellular Ca²⁺-triggered Cx43 hemichannel opening. *Neuropharmacology* 2013; 75: 506-516.
 18. Han Y, Yu Hx, Sun ML, Wang Y, Xi W, Yu Yq. Astrocyte restricted disruption of connexin 43 impairs neuronal plasticity in mouse barrel cortex. *Eur J Neurosci* 2014; 39(1): 35-45.
 19. Zhao Y, Xin Y, He Z, Hu W. Function of connexins in the interaction between glial and vascular cells in the central nervous system and related neurological diseases. *Neural Plasticity* 2018; 2018.
 20. 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.
 21. Liu J, Wang YT. Allosteric modulation of GABA A receptors by extracellular ATP. *Molecular Brain* 2014; 7(1): 1-11.
 22. Lalo U, Andrew J, Palygin O, Pankratov Y. Ca²⁺-dependent modulation of GABAA and NMDA receptors by extracellular ATP: implication for function of tripartite synapse. *Biochem Soc Trans* 2009; 37(pt 6): 1407-1411.
 23. Sivilotti L, Nistri A. GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 1991; 36(1): 35-92.
 24. Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R. Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 2001; 21(14): 4958-4968.
 25. 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.