

І.В.Лушнікова, І.Р.Ніконенко, О.Г.Ніконенко, Г.Г.Скібо

Просторовий розподіл везикул у синапсах зони СА1 гіпокампа в умовах викликаної довготривалої потенціації *in vitro*

Длительная активация возбуждающих глутаматергических синапсов вызывает изменения в их функционировании и ультраструктурной организации. В то время как вызванные стимуляцией изменения в постсинаптической части синаптического контакта изучены довольно детально, данных про динамику пространственного распределения синаптических везикул (СВ) в условиях активации синапса на данный момент недостаточно. Используя органотипическую культуру срезов гиппокампа как модельную систему и электронную микроскопию как метод исследований, мы проанализировали изменения количества и пространственного распределения везикул в синапсах зоны СА1 гиппокампа. Для активации синапсов были использованы два подхода: краткосрочная аноксия-гипогликемия, вызывающая так называемую аноксично-гипогликемическую долговременную потенцию (ДП) и высокочастотная стимуляция коллатералей Шафера, которая приводит к возникновению ДП вызванных постсинаптических потенциалов в синапсах зоны СА1. Наблюдения на протяжении часа после стимуляции (30 и 60 мин) показали, что активное функционирование синапсов как при первом, так и при втором варианте воздействия приводит к уменьшению общего количества СВ в пресинаптических терминалах, а также истощению пула везикул, готовых к экзоцитозу. Оба экспериментальных воздействия вызвали нарушения структуры пространственных кластеров СВ, которые были более выраженными после аноксично-гипогликемической ДП. Обсуждаются возможные механизмы и функциональные последствия этих явлений.

ВСТУП

Основним компонентом хімічного синапсу є наповнені нейромедіатором синаптичні везикули (СВ), які розташовані у пресинаптичній терміналі та під впливом певних сигналів вивільнюють свій вміст у синаптичну щілину. Функціональні характеристики пресинаптичної терміналі значною мірою залежать від кількості цих органел та їх готовності до вивільнення нейромедіатора. СВ можна умовно розділити на три взаємопов'язані пули залежно від їх відстані до активної зони синапсу та потенційної здатності до екзоцитозу. Пул, органели якого здатні до швидкого екзоцитозу, знаходиться найближче до активної зони синапсу,

за ним пул, що рециклює, і найвіддаленішим є резервний пул СВ [26]. Було показано, що у стимульованих синапсах везикули розташовані ближче до активної зони, ніж у нестимульованих [1]. Таким чином, просторовий розподіл СВ може бути важливим корелятом потенційної здатності цих органел до вивільнення нейромедіатора. Іншою важливою структурною характеристикою хімічного синапсу є формування кластеру СВ, особливо навколо активної зони. Везикули, що розташовані у серцевині кластеру, на його периферії або поза його межами, можуть мати різні функціональні якості, і цим може зумовлюватись їх здатність до транспорту у зону екзоцитозу [22].

© І.В.Лушнікова, І.Р.Ніконенко, О.Г.Ніконенко, Г.Г.Скібо

Тому аналіз просторового розподілу СВ може дати цінну інформацію про функціональний стан синапсу.

У цій роботі ми вивчали просторовий розподіл везикул у синапсах зони CA1 культивованих зрізів гіпокампа, у яких досить детально досліджено довготривалу потенціацію (ДП) викликаних постсинаптичних потенціалів. Вважається, що феномен ДП складає основу механізмів навчання та запам'ятовування [5, 15]. Водночас ДП є дуже чутливою до ішемії, яка викликає селективне та відкладене у часі ураження пірамідальних нейронів [8, 16]. Якщо ішемічний епізод у зоні CA1 триває недовго, він здатний викликати довготривалу постсинаптичну потенціацію, схожу на класичний варіант цього феномена [8, 12]. Недавніми дослідженнями було виявлено цілу низку подібностей у механізмах класичної та аноксично-гіпоглікемічної ДП, а також спільні тенденції у морфологічних модифікаціях постсинаптичного компартмента [8, 12, 14].

Мета цього дослідження – порівняльний аналіз змін просторового розподілу СВ при класичній та аноксично-гіпоглікемічній ДП протягом години після стимуляції.

МЕТОДИКА

Для приготування органотипових культур зрізів гіпокампа використовували 7-добових щурів. За допомогою автоматичного чопера («McIlwain», Англія) робили зрізи гіпокампа товщиною 350 мкм і розташовували їх на напівпроникних мембранах (Milipore), що знаходилися на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 % CO₂) та рідкого середовища (50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 25 % термічно-інактивованої кінської сироватки, рН 7,3) при 35°C. Середовище культивування змінювали на другу добу інкубації та далі двічі на тиждень. У таких умовах зрізи витримували протягом 10–13 діб перед проведенням експериментів [25].

Індукція аноксично-гіпоглікемічної ДП досягали тимчасовою – киснево-глюкозною депривацією [8, 10, 12]. Для цього культури протягом 10 хв витримували на сітці у камері, заповненій газоподібним азотом, під якою протікала штучна церебро-спінальна рідина такого складу (ммоль/л): NaCl – 124, KCl – 1,6, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,5, NaHCO₃ – 24, KH₂PO₄ – 1,2, аскорбінова кислота – 2, сахароза замість глюкози – 10 [12, 16, 19]. Надалі культури промивали нормальним середовищем для культивування та переносили у CO₂-інкубатор на 30 або 60 хв, після чого фіксували для електронної мікроскопії з використанням класичного методу насичування епоном з подальшою його полімеризацією [14]. Інтактні культури зрізів гіпокампа були використані як контроль.

Індукцію класичної ДП досягали високочастотним стимулюванням. Стимулювальний електрод, виготовлений із скручених ніхромових дротів, було розташовано у зоні CA3, а викликані потенціали реєстрували у зоні CA1. ДП було індуковано за допомогою стимулювання п'ятьма θ -розрядами з частотою 5 Гц, де кожен розряд складався з чотирьох імпульсів з частотою 100 Гц. Цей режим було застосовано двічі, з інтервалом 10 с, а також ще раз, за 5 хв до фіксації зрізів, з метою маркування активованих синапсів преципітатом кальцію. Надалі зрізи було зафіксовано для електронної мікроскопії через 5, 30 та 60 хв після індукції ДП з використанням методу преципітації кальцію [3]. Зрізи, фіксовані через 5 хв після стимулювання θ -розрядами, були використані як контроль.

Для оптичної мікроскопії напівтонкі зрізи (2 мкм) було забарвлено метиленовим синім. Для електронної мікроскопії тонкі зрізи (60 нм) було нарізано за допомогою ультрамікротома Ultracut-E («Reichert-Jung», Австрія) у середній частині апікальної арборизації (stratum radiatum) пірамідальних нейронів зони CA1 гіпокампа. Тонкі

зрізи збирали на вкриті формваровою плівкою бленди та забарвлювали ураніл-ацетатом і цитратом свинцю.

Препарати аналізували за допомогою електронних мікроскопів Philips CM10 або Tecnai G212 («FEI Company», Нідерланди), обладнаного цифрою камерою Mega View III («Soft Imaging Systems», Німеччина). Фотографії, зроблені за допомогою мікроскопа Philips CM10 із збільшенням у 11000–21000 разів було скановано у планшетному сканері (600 dpi та 256 напівтонів сірого кольору). Цифрові фотографії, отримані на мікроскопі Tecnai G212, було зроблено зі збільшенням у 23000 разів.

Синапси визначали за наявністю чіткого постсинаптичного ущільнення, навпроти якого знаходилося щонайменше 2–3 СВ. Для подальшого аналізу випадковим чином було відібрано синапси на шипиках вторинних дендритів пірамідальних нейронів. Було проаналізовано дві групи синапсів, класифікованих за конфігурацією постсинаптичного ущільнення (рис. 1, а, б). Прості, або макулярні, синапси мали суцільну його форму, перфоровані – переривчасту. Кожен синапс було ідентифіковано на декількох послідовних електронограмах, і для аналізу розподілу СВ було відібрано ті з них, на яких довжина постсинаптичного ущільнення

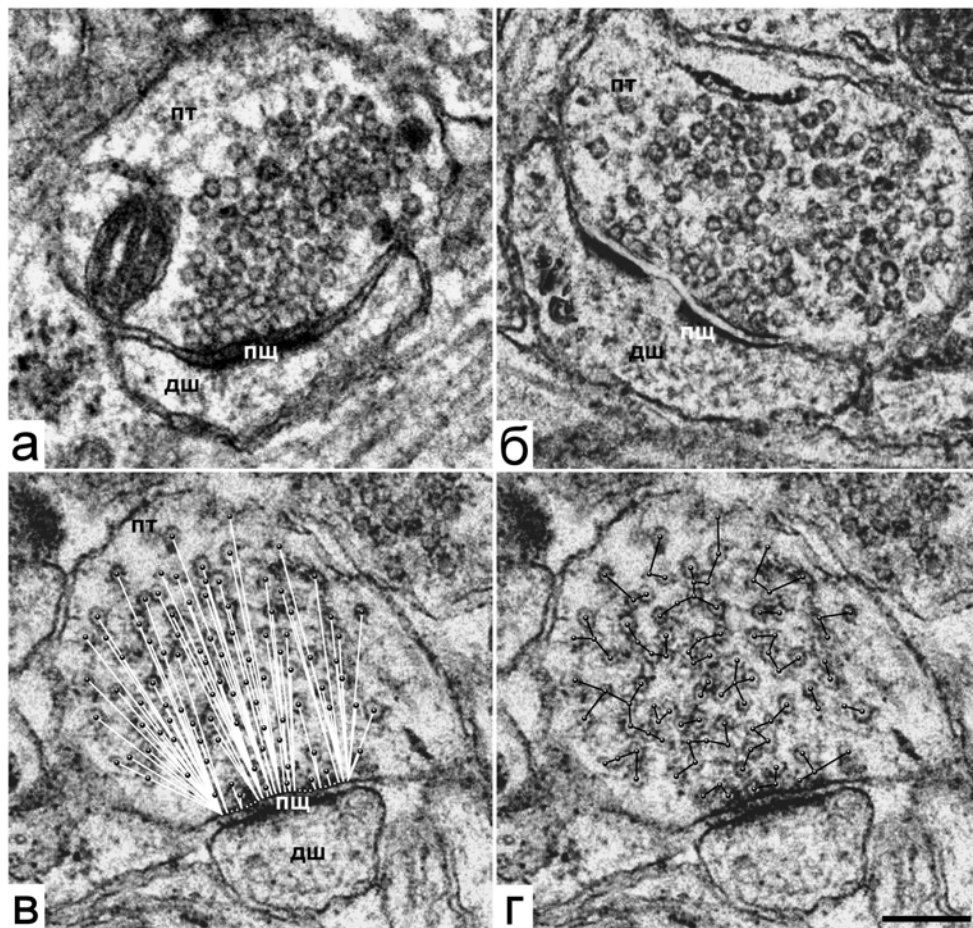


Рис.1. Електронограми синапсів радіального шару зони CA1 гіпокампа (а – простий, б – перфорований). Зображення, що ілюструють метод аналізу просторового розподілу синаптичних везикул (в – визначення відстані до активної зони синапсу, г – визначення відстані до найближчої везикули): дш – дендритний шипик, пт – пресинаптична терміналь, пш – постсинаптична щільність. Масштабна лінія становить 200 нм

була найбільшою. В експериментах з індукцією аноксично-гіпоглікемічної ДП було проаналізовано 148 синапсів, а з індукцією класичної ДП – 147 синапсів (відібраних за критерієм наявності кальцієвих преципітатів). У кожній з дослідних груп (контроль, 30 та 60 хв після киснево-глюкозної депривації або класичної ДП) було проаналізовано по 18–20 перфорованих та 30 простих синаптичних контактів.

З метою кількісного аналізу просторового розподілу СВ координати центрів профілів везикул і точок, що позначали профіль активної зони, визначали на цифрових мікрофотографіях за допомогою програми UTHSCSA ImageTool версія 3 (Університет Техасу, США). Файли з координатами об'єктів обробляли за допомогою комп'ютерної програми LoClust [18], яка для кожної везикули дає змогу визначати відстань до активної зони синапсу та до найближчої везикули (див. рис. 1, в, г). Щільність СВ визначали як кількість везикул на одиницю площі перерізу терміналі. Везикули, центр яких був розташований на відстані не більше ніж 25 нм від активної зони, вважали готовими до вивільнення медіатора. Статистичний аналіз було здійснено з використанням програми Statistica версія 5 («StatSoft» США). Результати представлено як середнє \pm стандартна похибка середнього. Вибірки порівнювали з використанням непараметричного двовибіркового тесту Колмогорова–Смірнова. Вірогідними вважали розбіжності при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз показав, що в умовах контролю щільність СВ була майже однаковою в обох досліджених типах синапсів, становила $190,3 \text{ од./мкм}^2 \pm 10,6 \text{ од./мкм}^2$ (тут і далі одиниця відповідає одній везикулі) у простих і $192,2 \text{ од./мкм}^2 \pm 13,2 \text{ од./мкм}^2$ – у перфорованих синапсах ($P > 0,05$). На відміну від цього, кількість СВ, готових до вивільнення, була суттєво вищою у перфо-

рованих – $9,5 \text{ од.} \pm 0,6 \text{ од.}$, ніж у простих синапсах – $6,9 \text{ од.} \pm 0,5 \text{ од.}$ ($P < 0,05$). Можливим поясненням таких відмінностей можуть бути більші сумарні розміри перфорованої активної зони.

Через 30 хв після киснево-глюкозної депривації щільність СВ у пресинаптичній терміналі знижувалась на 32 % (до $129 \text{ од./мкм}^2 \pm 7,4 \text{ од./мкм}^2$) у простих та на 27 % (до $145,2 \text{ од./мкм}^2 \pm 9,8 \text{ од./мкм}^2$) у перфорованих синапсах ($P < 0,001$). При цьому кількість везикул, готових до вивільнення, зменшувалась порівняно з контролем приблизно вдвічі: до $3,7 \text{ од.} \pm 0,3 \text{ од.}$ у простих та до $5,1 \text{ од.} \pm 0,4 \text{ од.}$ – у перфорованих синапсах. Середня відстань до активної зони зменшувалась на 7 % у простих та на 2,5 % у перфорованих синапсах (таблиця). Незважаючи на невеликий діапазон змін, відмінності між показниками були статистично вірогідними ($P < 0,001$).

Через 60 хв після киснево-глюкозної депривації щільність СВ у пресинаптичних терміналях у порівнянні з контролем знижувалась на 45 % (до $104,3 \text{ од./мкм}^2 \pm 3,9 \text{ од./мкм}^2$) у простих та на 44 % (до $107,7 \text{ од./мкм}^2 \pm 7,6 \text{ од./мкм}^2$) у перфорованих синапсах. Кількість СВ у найближчому до активної зони пулі зменшувалась на 62 % щодо контролю (до $2,6 \text{ од.} \pm 0,2 \text{ од.}$) у простих та на 55 % (до $4,3 \text{ од.} \pm 0,4 \text{ од.}$) у перфорованих синапсах. При цьому середня відстань до активної зони синапсу збільшувалась приблизно на 13 % у простих та зменшувалась на 16 % у перфорованих синапсах (див. таблицю).

Короткотривала киснево-глюкозна депривація впливала також на взаємне розташування СВ. Середня відстань до найближчої везикули через 30 хв після такої депривації у порівнянні з контролем збільшувалося на 15 % у простих та на 12 % у перфорованих синапсах (див. таблицю). Через 60 хв цей показник продовжував збільшуватися. Підвищення становило майже 29 % у простих та 13 % у перфорованих синапсах. Точкові графіки, що

містять результати сумарної популяції органел для 30 простих синапсів, яскраво ілюструють описані вище зміни просторового розподілу СВ (рис. 2, І, а, б, в).

Загалом можна зазначити, що аноксично-гіпоглікемічна ДП викликає суттєве зменшення загальної кількості СВ у пресинаптичній терміналі, зменшення пулу, органели якого готові до вивільнення, та порушення структури їх просторових кластерів.

Зміни просторового розподілу СВ аналізували також після ДП, що була індукована за допомогою височастотного стимулювання. Контрольні пресинаптичні терміналі містили СВ, щільність яких становила 233,6 од./мкм² ± 13,7 од./мкм² у простих та 220,1 од./мкм² ± 12,5 од./мкм² у перфорованих синапсах. Середня кількість готових до вивільнення СВ була 5,4 од. ± 0,3 од. у простих та 7,9 од. ± 0,6 од. у перфорованих синапсах (P<0,05).

Через 30 хв після ДП щільність СВ знижувалася приблизно на 45 % у простих (до 133,0 од./мкм² ± 8,1 од./мкм²) та на 46

% (до 118,0 од./мкм² ± 8,4 од./мкм²) у перфорованих синапсах (P<0,001). При цьому особливих змін зазнавав пул, що був найближчим до пресинаптичної мембрани. Він зменшувався на 56 % (до 2,4 од. ± 0,2 од.) у простих та на 66 % (до 2,7 од. ± 0,4 од.) у перфорованих синапсах (P<0,001). При цьому середня відстань до найближчої везикули зменшувалася на 20 % у простих, але збільшувалася на 5 % у перфорованих синапсах (див. таблицю).

Через 60 хв щільність СВ зазнавала подальшого зменшення і була нижчою за контрольні значення на 46 % (125,1 од./мкм² ± 6,6 од./мкм²) у простих та на 53 % (104,4 од./мкм² ± 8,7 од./мкм²) у перфорованих синапсах (P<0,001). Кількість СВ у пулі, готовому до вивільнення, зменшувалася на 69 % від контрольного рівня (до 1,7 од. ± 0,1 од.) у простих та на 73 % (до 2,1 од. ± 0,3 од.) у перфорованих синапсах (P<0,001). Середня відстань до активної зони у простих синапсах у порівнянні з попереднім строком трохи збільшувалася, але

Зміни відстані (нм) просторового розподілу везикул у синапсах зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа щурів після індукції довготривалої потенціації

Схема досліджу	Відстань до активної зони		Відстань до найближчої везикули	
	Прості синапси	Перфоровані синапси	Прості синапси	Перфоровані синапси
Аноксично-гіпоглікемічна форма довготривалої потенціації				
контроль	225,3±4,7 (n=1569)	253,3±5,4 (n=1445)	38,5±0,4 (n=1569)	40,5±0,4 (n=1445)
через 30 хв	209,0±4,1* (n=1351)	246,9±4,1* (n=1495)	44,5±0,5* (n=1351)	45,4±0,5* (n=1495)
через 60 хв	253,7±5,3* (n=1089)	212,3±5,2* (n=902)	49,6±0,6* (n=1089)	45,8±0,7* (n=902)
Височастотна форма довготривалої потенціації				
контроль	217,9±4,7 (n=1432)	243,9±4,7 (n=1613)	37,7±0,4 (n=1432)	37,5±0,4 (n=1613)
через 30 хв	174,2±3,8* (n=1904)	255,2±4,9** (n=1116)	40,5±0,5* (n=904)	44,2±0,5* (n=1116)
через 60 хв	187,6±4,8* (n=748)	215,4±5,5** (n=695)	39,8±0,6* (n=748)	44,1±0,7* (n=695)

* P<0,001, ** P<0,01 у порівнянні з контролем.

все ж залишалася на 14 % нижчою. У перфорованих синапсах цей показник зазнавав подальшого істотного зниження, що сягало майже 12 % щодо контрольних значень.

ДП впливала також на взаємне розташування СВ. Середня відстань до найближчої везикули через 30 хв після ДП збільшувалася на 7 % у простих та на 18 % у перфорованих

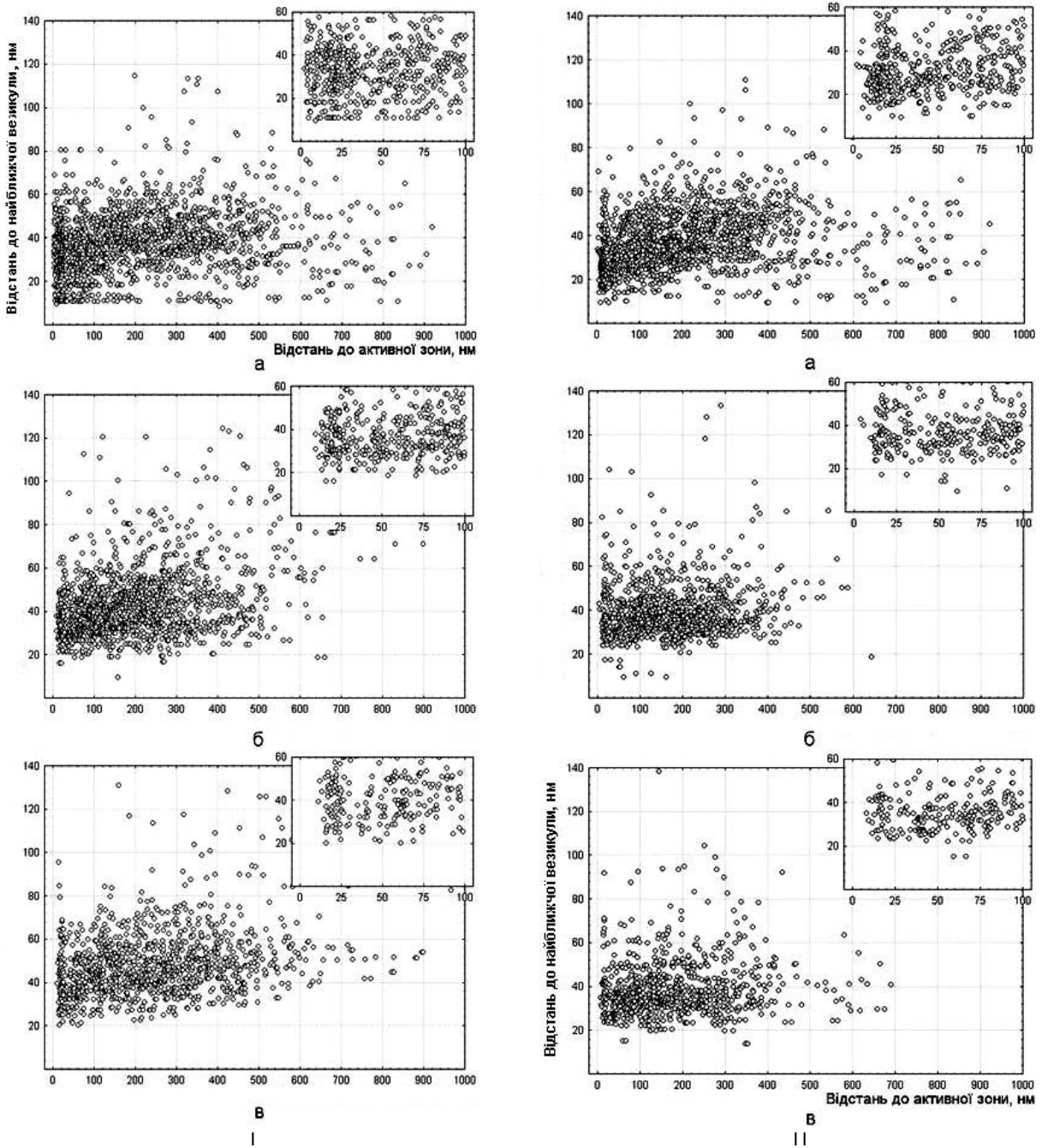


Рис.2. Точкові графіки, що ілюструють зміни відстані від синаптичної везикули до активної зони та до другої найближчої везикули у синапсах зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа щурів після індукції аноксично-гіпоглікемічної (I) та високочастотної (II) довготривалої потенціації (а – контроль, б – через 30 хв, в – через 60 хв після індукції)

синапсах (див. таблицю). Через 60 хв цей показник залишався практично незмінним і перевищував відповідні значення контролю приблизно на 6 % у простих та на 18 % у перфорованих синапсах ($P < 0,001$).

Таким чином можна сказати, що основні зміни просторового розподілу СВ, викликані ДП, зводяться до загального зменшення кількості органел у пресинаптичній терміналі, різкого зменшення пулу СВ, готових до вивільнення та порушення структури просторового кластеру органел, на яке вказують зміни відстані до найближчої везикули (рис. 2, II, а, б, в).

У наших експериментах ДП викликали двома шляхами: створенням аноксії–гіпоглікемії або високочастотною стимуляцією. Виявлено, що під впливом киснево-глюкозної депривації загальна кількість СВ у пресинаптичній терміналі суттєво зменшувалася вже через 30 хв після індукції ДП, що узгоджується з даними попередніх досліджень [14]. Істотно зменшувалася також кількість «пришвартованих» СВ як у простих, так і у перфорованих синаптичних контактах. Це може свідчити про «виснаження» синапсу внаслідок інтенсивного вивільнення нейромедіатора. Через 60 хв після стимуляції таке спустошення було ще більш явним. Крім того, у синапсах обох типів спостерігали зміни у просторовому розподілі СВ, на що вказувало збільшення відстаней між сусідніми везикулами. Цікаво, що середня відстань до найближчої везикули була більшою у простих, ніж у перфорованих синапсах. Цей факт може свідчити про наявність функціональних відмінностей між синапсами обох типів. Слід зазначити, що виснаження синапсів може бути першою ланкою у ланцюзі довгострокових патологічних змін, що розвиваються після короткотривалої ішемії [14, 16].

Зменшення загальної кількості СВ у пресинаптичній терміналі та розмірів пулу органел, що готові до вивільнення, порушення структури просторового кластеру СВ, спостерігали також після індукції

класичної ДП. Зазначені зміни були подібними у простих і перфорованих синапсах і свідчили перш за все про їх функціональне виснаження. З іншого боку, були виявлені відмінності у тому, як аноксично-гіпоглікемічна та класична ДП впливають на кількість і просторовий розподіл СВ. Зокрема, зміни у кількості органел, що готові до вивільнення, були більш вираженими після класичної, ніж після аноксично-гіпоглікемічної ДП. В той же час, аноксично-гіпоглікемічна ДП істотніше порушувала структуру просторових кластерів, ніж це спостерігалось під впливом класичної ДП.

Механізми ДП є предметом дискусій. Існують дані, що підтримують гіпотезу про участь у цьому феномені як пре-, так і постсинаптичних компонентів синапсу. У головному мозку свавців виявлено дві форми ДП, що можуть складати основу клітинних механізмів навчання та пам'яті. Одна форма вимагає активації постсинаптичних НМДА-рецепторів, в той час як інша, яку називають ДП моховитих волокон, має принциповий пресинаптичний компонент. Експериментальні дані свідчать про те, що довготривале збільшення вивільнення нейромедіатора в процесі ДП моховитих волокон може реалізовуватися за допомогою уніфікованого механізму, що включає гуанозинтрифосфатзалежну взаємодію білків Rab3A та RIM1alpha в зоні контакту СВ та активної зони [4].

Вивчаючи синаптичну пластичність у культурах клітин гіпокампа, виявили, що короткі тетанічні стимули прискорюють обмін СВ. Індукцію цієї пресинаптичної потенціації блокують антагоністи постсинаптичних рецепторів глутамату, що вказує на можливість ретроградної передачі індукуючого сигналу [23].

У дистальних дендритних шипиках пірамідальних нейронів до та після індукції ДП спостерігали синаптично викликані кальцієві транзєнти. У більшості синапсів ДП була асоційована зі збільшенням вірогідності виникнення постсинаптичного

кальцієвого транзєнта у вїдповїдь на поодинокий стимул. Цї спостереження говорять про участь пресинаптичного компонента у формуваннї ранньої ДП у синапсах колатералей Шафера [6]. Всї цї данї свїдчать про важливу роль пресинаптичного компонента в індукції ДП.

СВ вважається морфологічним корелятом кванта нейромедіатора, що вивільнюється при надходженнї нервового імпульсу або спонтанній активації синапсу, хоча остаточних доказів цього твердження все ще бракує. У синапсах пірамідальних нейронів гіпокампа кількість і просторовий розподіл СВ корелюють з вірогідністю вивільнення нейромедіатора в процесі стимуляції синапсу [23]. Життєвий цикл СВ включає такі численні етапи, як транспорт і «пришвартування» цих органел до активної зони синапсу, злиття СВ з мембраною, що запускається іонами кальцію, ендоцитоз та утворення нових везикул [26]. Модифікація будь-якого з етапів циклу СВ може вплинути на здатність синапсу вїдповїдати на повторну стимуляцію, модельним аналогом якої є ДП.

Існують данї про те, що через 20 хв після індукції ДП у синапсах, сформованих колатералами Шафера у гіпокампі, значно збільшується кількість СВ, що контактують з мембраною активної зони, а також знаходяться біля неї. При цьому збільшується загальна щільність СВ і розміри дендритних шипиків [1]. Припускають також, що розміри активної зони синапсу є одним із факторів, що визначають вірогідність вивільнення нейромедіатора [24].

Після індукції ДП у синапсах, що сформовані колатералами Шафера у зоні CA1 гіпокампа щурів, помітно зменшувалася відносна кількість СВ з депозитами кальцію. Такі зміни тривали не менше однієї години після індукції ДП, і їх не спостерігали у зрізах, ДП яких була блокована антагоністом НМДА-рецепторів 2-аміно-5-фосфовалератом. Цї данї підтверджують, що ДП може викликати довготривалі зміни

у балансі кальцію та зменшення кількості СВ внаслідок посиленого вивільнення нейромедіатора [17], що узгоджується з отриманими нами результатами.

Зміни просторового розподілу СВ та, вїдповїдно, їх готовності до вивільнення нейромедіатора можуть бути зумовлені модифікаціями численних білків, що задіяні у процесах життєвого циклу цих органел. У попередніх дослідженнях було показано, що рівень фосфорилування білків СВ змінюється у різних фізіологічних чи патологічних ситуаціях. Так, SNAP-25 (вїд англ. synaptosomal associated protein), який вїдіграє ключову роль у екзоцитозі СВ, фосфорилується після індукції ДП чи епілептоформної активності [7]. Показано, що SNAP-25 бере участь у механізмах формування пам'яті [9], інший білок СВ, синапсин – у регуляції кругооберту СВ через дисоціацію–реасоціацію з органелами залежно від рівня фосфорилування. Після ішемії були вїдмічені зміни у фосфорилуванні синапсину I, що іммобілізує СВ на актинових філаментах або на мембрані активної зони [2, 13]. Іншою родиною білків СВ є синаптотагміни, які беруть участь у процесах екзоцитозу та вивільнення нейромедіатора, викликаних деполяризацією та іонами кальцію. Рівень експресії синаптотагміну IV у гіпокампі значно підвищувався [27], а кількість білка *mint1* зменшувалася [20] після короткотривалої церебральної ішемії. *Mint1* та *mint2* беруть участь у транспортуванні СВ до активної зони, а також мембранних білків до постсинаптичного ущільнення.

Дефіцит ще двох важливих білків СВ, синаптофізину та синаптогірину, значно послаблює коротко- та довготривалу синаптичну пластичність, незважаючи на те, що цї білки безпосередньої не впливають на вивільнення нейромедіатора [11]. Отримані також данї про регулювальну роль BDNF (вїд англ. brain-derived neurotrophic factor) у високочастотній передачі сигналу через

полегшення мобілізації та/чи «пришвартування» СВ, можливо, завдяки регуляції розподілу специфічних синаптичних білків [21].

Наведені дані свідчать про те, що реактивна спроможність синапсу значною мірою визначається низкою складних біохімічних і структурних перебудов, що лежать в основі циклу пересування СВ. Логічно припустити, що значна складність координації цього циклу у часі та просторі визначає його високу чутливість до фізіологічних та патологічних впливів. Зміни характеристик циклу СВ можуть закладати основу для подальших пластичних перетворень нейрональних мереж.

Згідно з нашими результатами, аноксично-гіпоглікемічна та класична високочастотна ДП призводять до зменшення загальної кількості СВ у пресинаптичних терміналях, зниження їх щільності, а також виснаження пулу органел, готових до екзоцитозу. Зміни мають односпрямований характер в обох варіантах індукції ДП як для простих, так і для перфорованих синапсів. Ці дані можуть свідчити про подібність механізмів, які забезпечують відповідні реакції. Показано, що в умовах аноксично-гіпоглікемічної ДП зміни структури просторових кластерів везикул були більше вираженими, ніж при високочастотній ДП, і відбувалися активніше у простих синапсах.

Отримані результати розширюють уявлення про ультраструктурні зміни в умовах активного функціонування синапсів.

I.V.Lushnikova, I.R.Nikonenko, A.G.Nikonenko, G.G.Skibo

SPATIAL DISTRIBUTION OF SYNAPTIC VESICLES IN CA1 HIPPOCAMPAL SYNAPSES AFTER BRIEF ANOXIA-HYPOGLYCEMIA AND TETANIC LONG-TERM POTENTIATION

Prolonged activation of excitatory glutamatergic synapses causes modifications in their functioning and ultrastructural organization. While postsynaptic activity-induced changes have been relatively well studied, the data on spatial dynamics of synaptic vesicles (SV) under conditions of synaptic activation are still lacking. Using organotypic hippocampal slice cultures

as a model system and electron microscopy as a technique, we analyzed changes in SV numbers and their spatial distribution in spine synapses of hippocampal CA1 area. Two approaches were used to activate synapses: a protocol of brief oxygen-glucose deprivation known to induce so-called anoxia-hypoglycemic long-term potentiation (LTP), as well as high frequency stimulation of Schaffer collaterals inducing LTP of evoked postsynaptic potentials in CA1 synapses. Observations during the first hour after stimulation (30 and 60 min time-points) have shown that in both cases active functioning of synapses led to decrease in the total SV number as well as to depletion of the readily releasable SV pool. Both experimental protocols caused a decrease in spatial clustering of SV which was more pronounced after anoxia-hypoglycemic LTP. Possible mechanisms and functional consequences of these phenomena are discussed.

O.O.Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Applegate M.D., Kerr D.S., Landfield P.W. Redistribution of synaptic vesicles during long term potentiation in the hippocampus // *Brain. Res.* – 1987. – **401**, №2. – P.401–406.
2. Bolay H., Gursoy-Ozdemir Y., Sara Y. et al. Persistent defect in transmitter release and synapsin phosphorylation in cerebral cortex after transient moderate ischemic injury // *Stroke.* – 2002. – **33**, №5. – P.1369–1375.
3. Buchs P.A., Stoppini L., Parducz A. et al. A new cytochemical method for the ultrastructural localization of calcium in the central nervous system // *J.Neurosci.Methods.* – 1994. – **54**, №1. – P.83–93.
4. Castillo P.E., Schoch S., Schmitz F. et al. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation // *Nature.* – 2002. – **415**, №6869. – P.327–330.
5. Dobrunz L.E., Stevens C.F. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses // *Neuron.* – 1997. – **18**, №6. – P.995–1008.
6. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. et al. Optical quantal analysis reveals a presynaptic component of LTP at hippocampal Schaffer-associational synapses // *Ibid.* – 2003. – **38**, №5. – P.797–804.
7. Genoud S., Pralong W., Riederer B.M. et al. Activity-dependent phosphorylation of SNAP-25 in hippocampal organotypic cultures // *J.Neurochem.* – 1999. – **72**, №. – P.1699–1706.
8. Hammond C., Crepel V., Gozlan H. et al. Anoxic LTP sheds light on the multiple facets of NMDA receptors // *Trends Neurosci.* – 1994. – **17**, №11. – P.497–503.
9. Hou Q., Gao X., Zhang X. et al. SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation // *Eur.J.Neurosci.* – 2004. – **20**, №6. – P.1593–1603.
10. Hsu K.S., Huang C.C. Characterization of the anoxia-induced long-term synaptic potentiation in area CA1 of the rat hippocampus // *Brit.J.Pharmacol.* – 1997. – **122**, №4. – P.671–681.

11. Janz R., Sьdhof T.C., Hammer R.E. et al. Essential roles in synaptic plasticity for synaptogyrin I and synaptophysin I // *Neuron*. – 1999. – **24**, №3. – P.687–700.
12. Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S. et al. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia // *J.Neurosci.* – 2002. – **22**, №8. – P.3108–3116.
13. Jung Y.J., Park S.J., Park J.S. et al. Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin // *Brain Res.* – 2004. – **996**, №1. P.47–54.
14. Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A. et al. Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses // *Hippocampus*. – 2006. – **16**, №10. – P.814–825.
15. Lisman J., Raghavachari S. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses // *Sci.STKE*. – 2006. – **356**, re11.
16. Lushnikova I.V., Voronin K., Malyarevskyy P.Y. et al. Morphological and functional changes in rat hippocampal slice cultures after short-term oxygen-glucose deprivation // *J.Cell Mol.Med.* – 2004. – **8**, №2. – P.241–248.
17. Meshul C.K., Hopkins W.F. Presynaptic ultrastructural correlates of long-term potentiation in the CA1 subfield of the hippocampus // *Brain Res.* – 1990. – **514**, №2. – P.310–319.
18. Nikonenko A.G., Skibo G.G. Technique to quantify local clustering of synaptic vesicles using single section data // *Microsc.Res.Tech.* – 2004. – **65**, №6. – P.287–291.
19. Nikonenko I., Bancila M., Bloc A. et al. Inhibition of T-type calcium channels protects neurons from delayed ischemia-induced damage // *Mol.Pharmacol.* – 2005. – **68**, №1. – P.84–89.
20. Nishimura H., Matsuyama T., Obata K. et al. Changes in mint1, a novel synaptic protein, after transient global ischemia in mouse hippocampus // *J.Cereb.Blood Flow.Metab.* – 2000. – **20**, №10. – P.1437–1445.
21. Pozzo-Miller L.D., Gottschalk W., Zhang L. et al. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice // *J.Neurosci.* – 1999. – **19**, №12. – P.4972–4983.
22. Rizzoli S.O., Betz W.J. The structural organization of the readily releasable pool of synaptic vesicles // *Science*. – 2004. – **303**, №5666. – P.2037–2039.
23. Ryan T.A., Ziv N.E., Smith S.J. Potentiation of evoked vesicle turnover at individually resolved synaptic boutons // *Neuron*. – 1996. – **17**, №1. – P.125–134.
24. Schikorski T., Stevens C.F. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses // *J.Neurosci.* – 1997. – **17**, №15. – P.5858–5867.
25. Stoppini L., Buchs P.A., Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue // *J.Neurosci.Methods*. – 1991. – **37**, №2. – P.173–182.
26. Sudhof T.C. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions // *Nature*. – 1995. – **375**, № 6533. – P.645–653.
27. Yokota N., Uchijima M., Nishizawa S. et al. Identification of differentially expressed genes in rat hippocampus after transient global cerebral ischemia using subtractive cDNA cloning based on polymerase chain reaction // *Stroke*. – 2001. – **32**, №1. – P.168–174.