

І.В.Лушнікова

## Морфологічна пластичність клітин зони СА1 гіпокампа *in vitro* в умовах короткотривалої аноксії–гіпоглікемії та подальшої реоксигенації

*Одним з факторів, що модулюють нейрональну пластичність є кількість кисню та глюкози. Їх коливання здатні індукувати uszkodження клітин, яке залежить від ступеня і тривалості дії. Експериментальні дослідження показали, що короткий період аноксії–гіпоглікемії призводить до відстрочених деструктивних змін, первинні причини яких можуть бути виявлені та простежені на клітинному і молекулярному рівні. Це супроводжується і певними морфологічними перебудовами. Наша робота націлена на виявлення первинних пластичних змін нейронів, збудливих синапсів і глії зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа після короткотривалої киснево-глюкозної депривації (КГД). Оцінювали зміни морфологічної пластичності нервових клітин зони СА1 протягом першої години після 10 хв КГД за такими показниками: життєздатність і ступінь конденсації нейронів, кількість простих (макулярних) і складних (перфорованих) асиметричних синапсів та їх об'єм, товщина постсинаптичної щільності (ПСЩ), загальна кількість везикул і щільність активного і резервного пулів у синапсах обох типів; об'єм глії, що прилягає до асиметричних СА1-синапсів. Показано, що КГД не викликає суттєвих змін життєздатності і конденсації нейронів, а також кількості і об'єму синапсів. Проте виявлені деякі первинні перебудови у синапсах (збільшення товщини ПСЩ, зменшення загальної кількості везикул і щільності везикул активного і резервного пулів), а також значне збільшення об'єму глії, що прилягає до синапсів. Можна передбачати, що структурні зміни, які проявляються протягом першої години після КГД, можуть спричинити функціональні порушення та подальший розвиток uszkodження тканини. Значне підвищення активності глії може свідчити про здатність цих клітин модулювати функції нейронів.*

*Ключові слова:* культура гіпокампальних зрізів, аноксія–гіпоглікемія, морфологічна пластичність.

### ВСТУП

Пластичність є невід'ємною властивістю нервових клітин, що виражається у здатності до функціональних і морфологічних перебудов. Суттєвими факторами, що визначають активність і життєздатність клітин є вміст кисню та глюкози, а нестача або надмір цих необхідних складових клітинного метаболізму впливає на функціонування та пластичність нервових клітин. Залежно від діапазону та тривалості киснево-глюкозних коливань, наслідки можуть мати фізіологічний або патологічний характер. У дослідах з моделювання ішемічного uszkodження *in vitro* та *in vivo*

було показано, що навіть короткотривала депривація з подальшою реоксигенацією призводять до значних, але відстрочених ефектів патологічного характеру, а довготривала – викликає загибель нейронів [9–11]. Ці деструктивні зміни мають у своїй основі певні первинні молекулярні механізми, які призводять до uszkodження нервових клітин за умов тривалої нестачі кисню та глюкози. Будь-які внутрішньо- та позаклітинні зміни середовища у нервовій системі впливають насамперед на синаптичну пластичність нейронів. У гіпокампі короткий період аноксії–гіпоглікемії індукує тривале посилення викликаних елект-

© І.В.Лушнікова

ричних відповідей у ділянці CA1, тобто довготривалу потенціацію синаптичної передачі [9, 12, 14] і це корелює з динамічними пластичними змінами у морфології синапсів та клітин загалом [16, 17, 18]. Довготривала потенціація супроводжується значним вивільненням глутамату, активацією глутаматних рецепторів та інтенсивним входом  $\text{Ca}^{2+}$  у клітини [7, 18], що у разі пролонгованої дії призводить до гіперзбудження. Для розуміння первинних механізмів численних мозкових порушень вивчення морфофункціональних змін нервових клітин за патологічних умов, зокрема при нестачі кисню та глюкози, представляє великий інтерес.

Мета нашої роботи – з'ясувати особливості морфологічних змін нейронів та глії зони CA1 гіпокампа, яка найбільш чутлива до нестачі кисню та глюкози, після короткострокової аноксії–гіпоглікемії та подальшої нормоксичної реоксигенації.

## МЕТОДИКА

Об'єктом дослідження були культивовані зрізи гіпокампа шурів лінії Вістар, які на момент проведення експерименту (12–14 доба культивування) повністю відновлювали свою життєздатність, зберігаючи при цьому первісну типovu топографію клітинних шарів гіпокампа, а нейрони ділянки CA1 мали традиційну пірамідальну форму. За допомогою автоматичного чопера (McIlwain, Англія) робили зрізи гіпокампа шурів товщиною 350–400 мкм, які культивували на напівпрониклих мембранах, розташованих у 6-лункових планшетах на межі газового (суміш атмосферного повітря з 5 %  $\text{CO}_2$ ) та рідкого середовища (50 % MEM, 25 % збалансованого сольового розчину Хенкса, 25 % інактивованої кінської сироватки, рН 7,3) при 35°C. Середовище культивування змінювали на 2-гу добу інкубації, а на далі двічі на тиждень [22]. Після 12–14 діб стан культур стабілізувався та їх можна було брати в експеримент.

Для моделювання умов аноксії–гіпоглікемії використовували киснево-глюкозну депривацію (КГД) у спеціальній камері, де газове середовище містило 95 %  $\text{N}_2$  і 5 %  $\text{CO}_2$ , а рідке середовище – фізіологічний фосфатно-сольовий розчин (HBSS “Sigma”, США), NEPES – 12,5 ммоль/л, D-сахарози – 15 ммоль/л). Перед перенесенням у експериментальну камеру для депривації, культури тричі промивали середовищем без глюкози. Температуру підтримували на рівні 35°C. Тривалість КГД становила 10 хв, після чого зрізи двічі відмивали і повертали до нормальних умов культивування на одну годину (нормоксична реоксигенація).

Життєздатність культивованих зрізів оцінювали за допомогою вітального барвника трипанового синього [15], котрий додавали до культурального середовища у кінцевій концентрації 0,2 %. Після відмивання у фізіологічному розчині тканину фіксували 2,5%-м формальдегідом і підраховували кількість забарвлених клітин у зоні CA1 гіпокампальних зрізів, розташованих у межах прямокутної ділянки фіксованого розміру (збільшення у 100 крат). Відомо, що трипановий синій проходить через плазматичну мембрану клітин у разі її пошкодження та забарвлює компоненти цитоплазми у синій колір. Таким чином, кількість забарвлених клітин, обернено пропорційна життєздатності культур. Проаналізовано 20 полів зору на 10 зрізах у кожній групі (n=20). Результати представлено як кількість клітин на 1 мм<sup>2</sup>.

Для морфологічної оцінки культивовані зрізи, зафіксовані у суміші 2,5%-го формальдегіду та 2,5%-го глютаральдегіду, заключали у епоксидну смолу за загальноприйнятою методикою [6]. Напівтонкі зрізи (1–2 мкм) забарвлювали метиленовим синім. Пірамідальні клітини ділянки CA1 аналізували за допомогою світлового мікроскопа (“Zeiss Jena”, збільшення у 400 крат). Підраховували кількість конденсованих клітин на 100 нейронів кожного зрізу. Результати представлено як відсоток кон-

денсованих від загальної кількості клітин.

Серійні ультратонкі зрізи (50–60 нм) CA1-stratum radiatum зони, контрастовані ураніл-ацетатом і нітратом свинцю, аналізували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125 (Україна) з відеокамерою DX 2, КАРРА. Отримували серійні зображення асиметричних синапсів у цифровому вигляді (збільшення у 10000–20000 крат). На основі цих зображень реконструювали синапси з використанням програми Reconstruct, розробленої Fiala та співавт. [8]. Проводили кількісну оцінку синапсів та глії.

Аналізували такі показники:

кількість простих і складних (перфорованих) асиметричних синапсів (на двомірних випадкових зрізах, збільшення у 10000 крат, у таблиці представлено відсоткове співвідношення синапсів);

об'єм синапсів і глії навколо них (за допомогою тримірних реконструкцій синапсів, вибраних випадково, збільшення у 20000 крат, проаналізовано 30 простих і 20 складних синапсів у кожній експериментальній групі);

товщину постсинаптичної щільності (ПСЩ) у шипиках і щільність везикул у терміналях (на двомірних профілях синапсів з серійних реконструкції, де ПСЩ була максимально виражена).

Синаптичні везикули (СВ) і ПСЩ досліджували за допомогою програми LoClust [13] та UTHSCSA ImageTool версія 3 (Університет Техасу, США). Щільність СВ визначали як кількість везикул на 1  $\mu\text{m}^2$  перерізу терміналі. Везикули, центр яких був розташований на відстані не більше ніж 70 нм від активної зони, вважали активними (готові до вивільнення медіатора та рецикуючі). Везикули, розташовані на відстані понад 70 нм, вважали резервними.

Статистичний аналіз було здійснено з використанням програми Statistica. 5 («StatSoft» США). Цифрові результати представлені як середне  $\pm$  стандартна похибка середнього. Вибірки порівнювали, використовуючи критерій *t* Стьюдента.

Вірогідними вважали розбіжності при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мікроскопічний аналіз культур за нормальних умов показав їх високу життєздатність – кількість ушкоджених і конденсованих нейронів була незначною (забарвлених трипановим синім –  $1,7 \text{ од./мм}^2 \pm 0,4 \text{ од./мм}^2$ , що становить менше ніж 1 % загальної кількості клітин; конденсованих –  $2,1 \% \pm 1,5 \%$ ). На ультраструктурному рівні спостерігалася цілісність мембран і міжклітинних зв'язків.

У літературі є дані про те, що короткотривала депривація та подальша реоксигенація призводять до відстрочених морфологічних змін патологічного характеру. Ушкодження нейронів проявлялося після декількох годин реоксигенації та виражалося у конденсації ядер і цитоплазми, що є ознакою апоптозу, а також у набуханні частини клітин при порушенні цілісності мембрани – ознаки некрозу [5, 11]. У нашій роботі за допомогою вітального забарвлення трипановим синім і на основі мікроскопічного аналізу напівтонких зрізів культур гіпокампа було виявлено, що 10-хвилинна КГД і подальша реоксигенація протягом 60 хв не викликає суттєвого зниження життєздатності нейронів ділянки CA1, переважна більшість яких зберігає морфологію нормально функціонуючих клітин і тільки незначна їх кількість проявляли ознаки ушкодження мембрани –  $4,0 \text{ од./мм}^2 \pm 0,7 \text{ од./мм}^2$  близько 1 % та конденсації ядер і цитоплазми –  $10,5 \% \pm 6,6 \%$ . Однак при подальшому (до 4 год) культивуванні ступінь ушкодження посилюється, що проявляється у збільшенні конденсованих клітин до  $32,8 \% \pm 9,1 \%$  і забарвлених трипановим синім – до  $28,9 \text{ од./мм}^2 \pm 2,7 \text{ од./мм}^2$ . Таким чином, можна сказати, що за умов нашої моделі, у початковий (до 1 год) період після експериментального впливу, 10-хвилинна КГД не є надто руйнівною, але з часом ушкодження

розвивається, що може бути наслідком первинних морфофункціональних змін нейронів, пов'язаних, у тому числі з клітинною сигналізацією та синаптичною пластичністю. Враховуючи це, важливо було простежити можливі зміни морфологічних показників CA1 синапсів протягом першої години дослідження.

Віддалені деструктивні наслідки мають в своїй основі певні первинні реакції та механізми, що залучаються у відповідь на нестачу кисню і глюкози, зокрема цілий патобіохімічний каскад, пов'язаний з дефіцитом аденозинтрифосфату (АТФ), порушенням іонного обміну, значним вивільненням глутамату, накопиченням  $Ca^{2+}$  у клітинах, посиленням окисних процесів тощо [7, 18, 24]. Відбуваються певні зміни синаптичної пластичності та відповідні структурні перебудови. Для дослідження морфологічної пластичності важливими є об'ємні характеристики, вивчення яких пов'язане з появою можливості кількісного стереологічного аналізу

тримірних реконструкцій клітин, їх відростків і синапсів, використовуючи серійні електронно-мікроскопічні зображення. Основним предметом нашого дослідження були асиметричні збудливі синапси зони CA1-stratum radiatum гіпокампа. Як відомо, асиметричний синапс має дві складові, а саме пресинаптичну аксонну терміналь, де накопичуються везикули з нейромедіатором і постсинаптичний дендритний шипик з вираженою ПСЩ. Залежно від форми ПСЩ визначають прості або макулярні та складні або перфоровані синапси. На рис. 1 представлені фрагменти серійних зображень обох згаданих типів синапсів та їх тримірні реконструкції. Прості синапси характеризуються суцільною ПСЩ, складні – переривчастою. Jourdain та співавт. [9] показали, що в умовах аноксії–гіпоглікемії–реоксигенації шипики та терміналі нейронів зони CA1 гіпокампа можуть кількісно та якісно змінюватись. Авторами виявлено збільшення кількості перфорованих синапсів через 30 хв після 10-хвилинної КГД, що

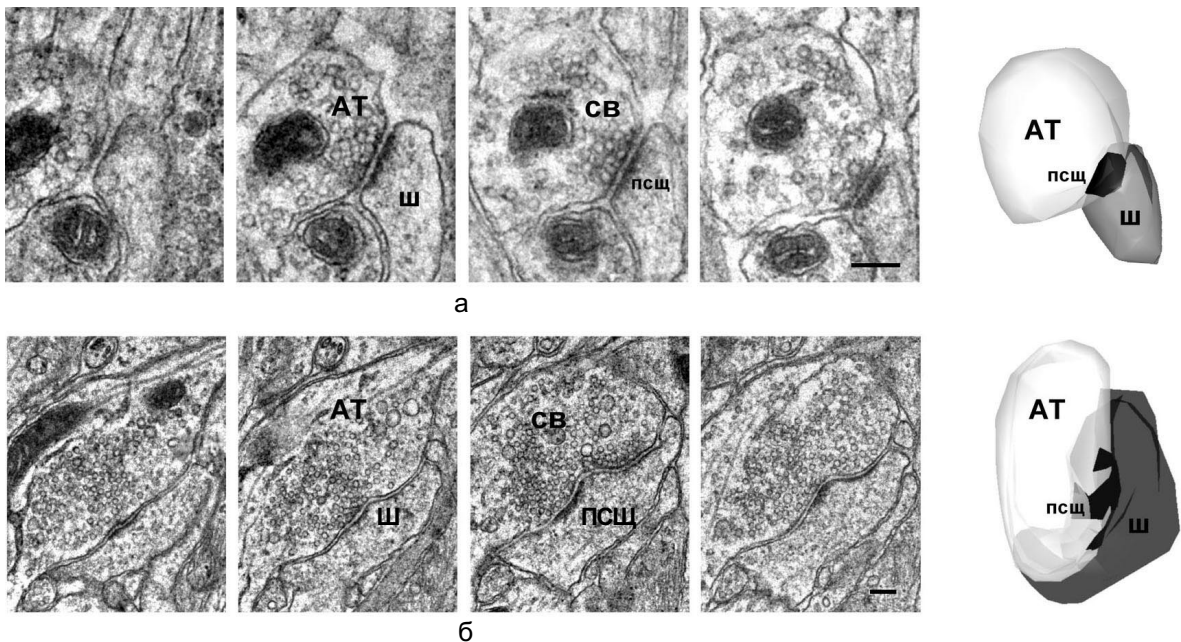


Рис. 1. Тривимірне зображення асиметричних синапсів CA1 зони культивованих зрізів гіпокампа з фрагментом серії їх електронно-мікроскопічних зображень: а – простий синапс з макулярною постсинаптичною щільністю, б – складний синапс з перфорованою постсинаптичною щільністю; АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, ПСЩ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули. Масштабна лінія – 100 нм

асоціюється з активацією нейронів. Упродовж наступних 2 год спостерігалася їх нормалізація та зменшення. За цих самих умов виявлені коливання числа шипиків на дендритах нейронів зони СА1. Ефекти були кальційзалежними та не проявлялися у разі внесення антагоністів глутаматних рецепторів. За умов нашого експерименту, морфометричний аналіз показав, що протягом 1 год після КГД значних змін кількості простих і перфорованих синапсів немає (таблиця). Слід відмітити, що суттєвих змін об'єму досліджуваних синаптичних контактів, оцінених через 30 та 60 хв після КГД за програмою Reconstruct, виявлено не було, що свідчить про достатню стійкість синапсів у цей термін дослідження. Значно збільшувалася товщина ПСЩ як через 30, так і через 60 хв у простих і у складних синапсах. Відомо, що ПСЩ формується внаслідок накопичення великої кількості сигнальних білків, через які у нейронах запускаються численні молекулярні процеси, що забезпечують нейрональні функції [7]. В наших експериментальних умовах істотно знижувалася кількість синаптичних везикул у терміналях, що певною мірою може свідчити про поступове виснаження цих структур. Розподіл везикул у терміналі мав певні закономірності, що й зумовило їх

поглиблений розгляд. У попередніх дослідженнях були показані суттєві морфологічні зміни у синапсах зони СА1 гіпокампа за аноксично-гіпоглікемічних умов [1], що проявлялися у зниженні кількості загального пулу везикул. Зміни мали односпрямований характер як у простих, так і у складних синапсах.

У терміналях постійно перерозподіляються везикули, тому розгляд динаміки структурних перебудов окремих кластерів СВ є важливим. Накопичені у терміналі везикули, як правило, умовно розділяють на три основні пули: готовий до вивільнення, який безпосередньо примикає до мембрани активної зони терміналі (1–2 % від усіх везикул); рецикуючий, який розташований переважно поблизу активної зони синапсу і поповнюється за рахунок зворотного захоплення медіатора або з резерву (10–20 %); резервний пул, який кластеризується на певній відстані від активної зони і не завжди буває задіяний у клітинну відповідь за нормальних фізіологічних умов (80–90 %) [19, 20]. Перші два описані пули характеризуються високою мобільністю відносно циркуляції всередині бутона та здатності до вивільнення медіатора, третій – являє собою більш статичне накопичення СВ. У нашому дослідженні

**Зміни деяких морфологічних показників асиметричних синапсів зони СА1 культивованих зрізів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної депривації та подальшої реоксигенації**

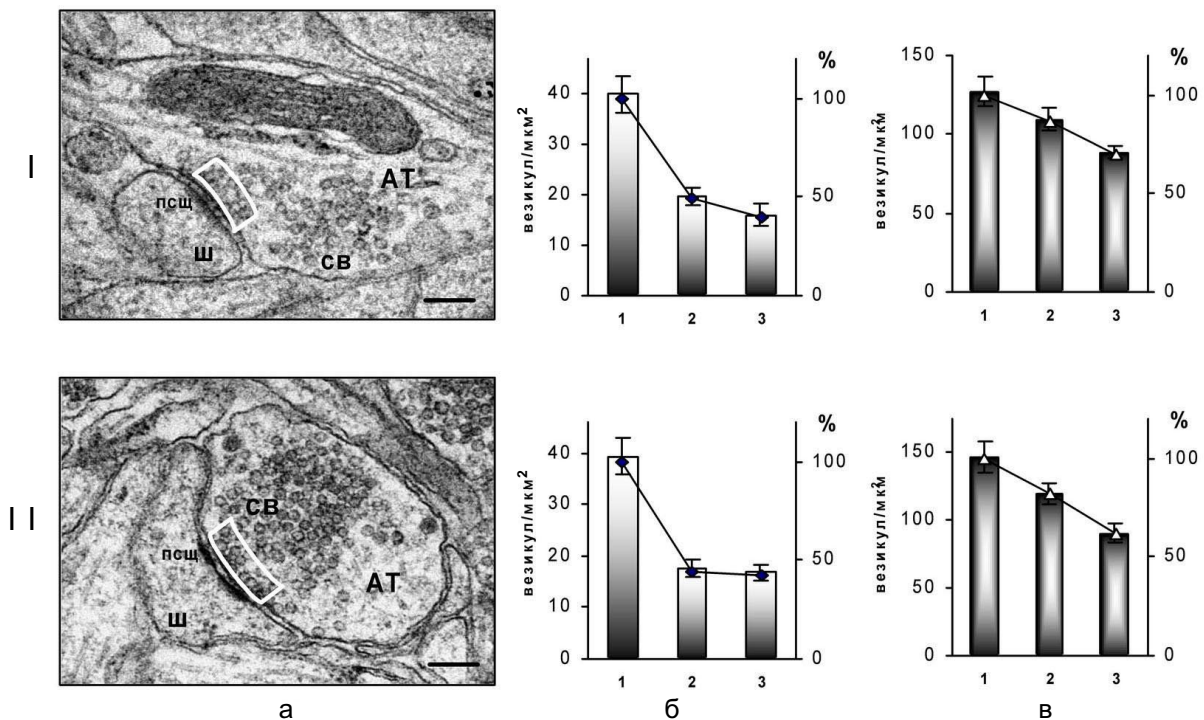
Схема досліджу	Відносна кількість синапсів, %	Об'єм синапсу, мкм <sup>3</sup>	Товщина постсинаптичної щільності, нм	Кількість везикул, %
Контроль				
прості синапси	85,3±4,0	0,12±0,01	29,1±1,0	100
складні синапси	14,7±1,1	0,26±0,03	28,6±1,3	100
Киснево-глюкозна депривація та реоксигенація протягом 30 хв				
прості синапси	-	0,13±0,01	40,4±1,0*	79,8
складні синапси		0,29±0,03	41,6±1,5*	88,7
Киснево-глюкозна депривація та реоксигенація протягом 60 хв				
прості синапси	86,5±4,6	0,13±0,01	41,4±0,9*	64,4
складні синапси	13,5±1,3	0,29±0,03	45,6±1,8*	53,5

\* P<0,05 у порівнянні з контролем

готовий до вивільнення і рецикуючий пули об'єднані в один активний. На рис. 2 представлені діаграми щільності СВ упродовж 1 год після КГД у простих і складних синапсах. Виявлено, що за 30 хв щільність активного пулу СВ значно знижується в обох типах синапсів. Надалі (через 60 хв) ці показники змінюються несуттєво. Тобто спочатку везикули активно вивільнювалися, після чого їх кількість у цій зоні підтримувалася на певному постійному рівні. Динаміка зменшення щільності СВ резервного пулу мала інший характер. Відбувалося рівномірне, більш повільне зниження цього показника за 60 хв дослідження. Зміни у простих і складних синапсах були подібними. Ці результати підтверджують високу мобільність СВ активного пулу і меншу – резервного. Крім того, вони свідчать про поступовий перехід везикул з

резерву у активний стан. Враховуючи істотне зниження впродовж першої години після КГД загальної кількості СВ у синапсах обох типів (на 36 і 46 % відповідно, див. таблицю), можна казати про значний ступінь спустошення аксональних бутонів. Раніше у досліджах на культивованих нейронах гіпокампа [21] було показано поступове зниження швидкості вивільнення медіатора після короткотривалої КГД, що може бути пов'язано як з рухливістю везикул, так і здатністю мембрани реалізувати екзо- та ендоцитоз медіатора. Всі ці події мають суттєвий вплив на синаптичну пластичність і свідчать про певний ступінь виснаження синапсів в умовах короткотривалої аноксії–гіпоглікемії, що може бути причиною подальшого розвитку функціональних порушень у нейронах зони CA1.

Відомо, що велике значення в коорди-



контроль, 2, 3 – 30, 60 хв після 10 хв КГД відповідно) у простих (I) і складних (II) синапсах: а – електронোগрами синапсів (білим контуром відмічена зона активного пулу везикул – 70 нм від активної зони синапсу), б – діаграма, що ілюструє зміни щільності синапсів активного пулу везикул, в – діаграма резервного пулу; АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, ПСЦ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули. Масштабна лінія – 100 нм

нації функціонування нейронів та модулюванні синаптичної пластичності за нормальних і патологічних умов мають гліальні клітини [23, 25]. Показана значна активація гліальних клітин у гіпокампі при моделюванні глобальної ішемії мозку *in vivo*. Автори спостерігали збільшення як кількості астроцитів, так і площі їх відростків [3, 4]. Даних, щодо проявлення глії при короткотривалій аноксії–гіпоглікемії нині в літературі немає, тому важливо було з'ясувати як проявляють себе ці клітини в умовах нашого експерименту на культивованих зрізах. За допомогою тримірного реконструювання оцінювали об'єм гліальних відростків навколо синапсів, що були досліджені. Виявлене значне збільшення цього показника через 30 хв і ще більше через 60 хв після КГД. Тобто спостерігається суттєва активація гліальних клітин, що, очевидно, має за мету корекцію надмірного збудження нейронів за допомогою, наприклад, вилучення надлишку глутамату з позаклітинного середовища та стабілізацію стану нейронів (рис. 3). Таким чином, гліальні клітини ймовірно мають здатність до модуляції синаптичної пластичності та функціонального стану нейронів у аноксично-гіпоглікемічних умовах.

## ВИСНОВКИ

На моделі культивованих зрізів гіпокампа показано, що протягом першої години після короткотривалої КГД не відбувається суттєвих змін життєздатності та морфології тіл нейронів зони СА1. Морфометричний аналіз двомірних зображень і тривимірних реконструкцій асиметричних синапсів СА1-stratum radiatum зони гіпокампа виявив особливості первинних морфологічних змін у асиметричних синапсах нейронів і глії в умовах короткотривалої КГД і наступної нормоксичної реоксигенації. Показана динаміка зниження щільності СВ у простих і складних синапсах, що свідчить про певний ступінь їх виснаження в результаті аноксично-гіпоглікемічного впливу, що може бути причиною функціональних порушень і подальшого розвитку ушкодження нейронів зони СА1. Виявлена істотна активація глії, що може вказувати на здатність цих клітин до корекції функціонування нейронів за допомогою, зокрема, вилучення надлишку глутамату з позаклітинного середовища та сприяти стабілізації стану нейронів в умовах нестачі кисню та глюкози.

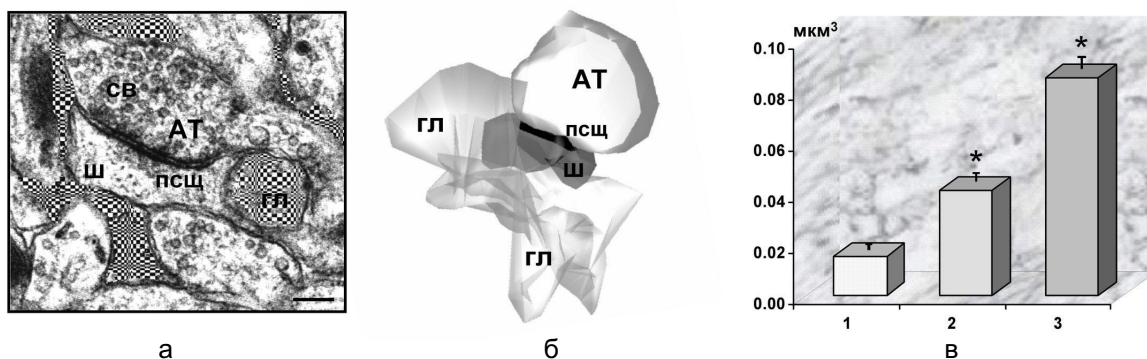


Рис. 3. Зміни об'єму глії навколо асиметричних синапсів СА1 зони культивованих зрізів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної депривації (КГД) і подальшої нормоксичної реоксигенації: а – електронорама синапсу та найближчого до нього простору (відмічені зони розташування гліальних відростків); б – тривимірне зображення асиметричного синапсу та глії, що прилягає до нього; в – діаграма, що ілюструє зміни об'єму глії (1 – контроль, 2, 3 – 30, 60 хв після 20 хв КГД відповідно); АТ – аксонна терміналь, Ш – дендритний шипик, ПСЦ – постсинаптична щільність, СВ – синаптичні везикули, ГЛ – глія. Масштабна лінія – 100 нм. \* $P < 0,05$  вірогідні зміни відносно контролю

И.В. Лушникова

## МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАСТИЧНОСТЬ КЛЕТОК СА1 ГИППОКАМПА IN VITRO В УСЛОВИЯХ КРАТКОСРОЧНОЙ АНОКСИИ–ГИПОГЛИКЕМИИ И ДАЛЬНЕЙШЕЙ РЕОКСИГЕНАЦИИ

Одним из факторов, модулирующих нейрональную пластичность является количество кислорода и глюкозы. Их колебания способны индуцировать повреждение клеток, зависящее от степени и длительности воздействия. Экспериментальные исследования показали, что краткий период аноксии-гипогликемии вызывает отсроченные во времени деструктивные изменения, изначальные причины которых могут быть обнаружены и прослежены на клеточном и молекулярном уровне. Это неизменно сопровождается определенными морфологическими перестройками. Данная работа направлена на выявление первичных пластических изменений нейронов, возбуждающих синапсов и глии зоны СА1 культивируемых срезов гиппокампа после кратко-временной кислород-глюкозной депривации (КГД). Оценивали изменения морфологической пластичности нервных клеток зоны СА1 в течение первого часа после 10 мин КГД по таким показателям: жизнеспособность и степень конденсации СА1-нейронов, количество простых (макулярных) и сложных (перфорированных) асимметричных синапсов и их объем; толщина постсинаптической плотности (ПСП), общее количество везикул и плотность активного и резервного пулов в синапсах обоих типов; объем глии, примыкающей к асимметричным СА1-синапсам. Показано, что КГД не вызывает существенных изменений жизнеспособности и конденсации нейронов, а также количества и объема синапсов. Однако, выявлены некоторые первичные перестройки в синапсах (увеличение толщины ПСП, уменьшение общего количества везикул, снижение плотности везикул активного и резервного пула) и значительное увеличение объема глии, примыкающей к синапсам. Можно предполагать что структурные изменения, проявившиеся в течение первого часа после КГД, могут стать причиной серьезных функциональных нарушений и дальнейшего развития повреждения ткани. Значительное повышение активности глии может свидетельствовать о способности этих клеток к модуляции функций нейронов.

Ключевые слова: культура гиппокампальных срезов, аноксия–гипогликемия, морфологическая пластичность.

I.V.Lushnikova

## MORPHOLOGICAL PLASTICITY OF HIPPOCAMPAL CA1 NEURONS IN VITRO AFTER SHORT-TERM ANOXIA/HYPOGLYCEMIA FOLLOWED BY REOXYGENATION

Oxygen and glucose are known to modulate the neuronal plasticity. Their fluctuations have ability to induce cell damage, the

degree of which is thought to depend on the intensity and duration of pathological events. Experimental investigations have shown that a short-term anoxia-hypoglycemia results in delayed cell destruction through multiple cellular and molecular mechanisms and these processes are accompanied by certain morphological alterations. The aim of the present study was to evaluate the neuronal, synaptic and glial plasticity in hippocampal CA1 area after short-term (10 min) oxygen-glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation during 1 h. The experiments were carried out on hippocampal slice cultures. We estimated the following parameters: viability and condensation of CA1 neurons, the number and volume of the simple and complex asymmetric synapses, postsynaptic density (PSD) thickness, total vesicle number and the state of vesicle pools, the glial volume contacted with CA1 synapses. It is revealed that 10 min OGD has no influence on cell viability and condensation but the synapse number and volume have the tendency for reduction. Though, we found some changes in synaptic remodeling (an increase in PSD thickness, a decrease in the total vesicle number and the density of the active and reserve vesicle pools) and significant increase of the glial volume contacted with CA1 synapses. Thus, it was assumed that the early structure changes could be the reason of the functional abnormality and tissue damage. Our data confirm also the glial ability to modulate the neuronal function.

Key words: hippocampal slice cultures, anoxia/hypoglycemia, morphological plasticity.

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

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лушнікова І.В., Никоненко І.Р., Никоненко О.Г., Скибо Г.Г. Просторовий розподіл везикул у синапсах зони СА1 гіпокампа в умовах викликаного довготривалої потенціації in vitro // Фізіол. журн. – 2008. – **54**, № 1. – С.35–44.
2. Лушнікова І.В. Функціональна активність нейронів гіпокампа в умовах короткотривалої киснево-глюкозної депривації in vitro // Там само. – № 6. – С.58–65.
3. Пивнева Т.А., Цупиков О.М., Пилипенко М.Н. та ін. Структурные изменения астроцитов в гиппокапе песчанки после экспериментальной ишемии мозга // Нейрофизиология. – 2005. – **37**, № 5/6. – С.410–415.
4. Скибо Г.Г., Коваленко Т.М., Осадченко І.О. та ін. Структурні зміни в гіпокампі при експериментальній ішемії мозку // Укр. неврол. журн. – 2006. – **1**, № 1. – С. 86–92.
5. Edinger A.L., Thompson C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy // Curr. Opin. Cell Biol. – 2004. – **16**, № 6. – P.663–669.
6. Fedoroff S., Richardson A. Protocols for neural cell culture. – Totowa, New Jersey: Humana Press. – 2001. – P. 13–27.
7. Ganeshina O., Berry R.W., Petralia R.S. et al. Differ-



- ences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – **468**, № 1. – P.86–95.
8. Harris K.M., Fiala J.C., Ostroff L. Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2003. – **358**, № 1432. – P. 745–748.
  9. Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S., Muller D. Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia // *J. Neurosci.* – 2002. – **22**, № 8. – P.3108–3116.
  10. 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.
  11. Lushnikova I.V., Voronin K.Y., Malyarevskyy P.Y., Skibo G.G. 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.
  12. Matsuzaki M., Honkura N., Ellis-Davies G.C., Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines // *Nature.* – 2004. – **429**, № 6993. – P. 761–766.
  13. 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.
  14. Nikonenko I., Jourdain P., Muller D. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis // *J. Neurosci.* – 2003. – **23**, № 24. – P. 8498–8505.
  15. Norberg J., Kristensen B.W., Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures // *Brain Res. Protoc.* – 1999. – **3**, № 3. – P. 278–290.
  16. Park M., Salgado J.M., Ostroff L. et al. Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes // *Neuron.* – 2006. – **52**, № 5. – P.817–830.
  17. Popov V.I., Davies H.A., Rogachevsky V.V. et al. Remodelling of synaptic morphology but unchanged synaptic density during late phase long-term potentiation (LTP): a serial section electron micrograph study in the dentate gyrus in the anaesthetised rat // *Neuroscience.* – 2004. – **128**, № 2. – P. 251–262.
  18. Pozzo Miller L.D., Petrozzino J.J., Mahanty N.K., Connor J.A. Optical imaging of cytosolic calcium, electrophysiology and ultrastructure in Pyramidal neurons of organotypic slice cultures from rat hippocampus // *NeuroImage.* – 1993. – **1**, № 1. – P. 109–120.
  19. Rizzoli S.O., Betz W.J. Synaptic vesicle pools // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – **6**, № 1. – P. 57–69.
  20. Schikorski T., Stevens C.F. Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations // *Nat. Neurosci.* – 2001. – **4**, № 4. – P. 391–395.
  21. Skibo G.G., Lushnikova I.V., Voronin K.Y. et al. A synthetic NCAM-derived peptide, FGL, protects hippocampal neurons from ischemic insult both in vitro and in vivo // *Eur. J. Neurosci.* – 2005. – **22**, № 7. – P.1589–1596.
  22. 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.
  23. Theodosis D.T., Poulain D.A., Oliet S.H. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions // *Physiol. Rev.* – 2008. – **88**, № 3. – P. 938–1008.
  24. Villa R.F., Gorini A., Hoyer S. ATPases of synaptic plasma membranes from hippocampus after ischemia and recovery during ageing // *Neurochem. Res.* – 2002. – **27**, № 9. – P. 861–870.
  25. Witcher M.R., Kirov S.A., Harris K.M. Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus // *Glia.* – 2007. – **55**, № 1. – P. 13–23.

*In-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ України, Київ*  
E-mail: li@biph.kiev.ua

*Матеріал надійшов до редакції 01.12.2008*