

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი  
ქიმიური ბიოლოგიის ინსტიტუტი

თამარ ლორთქიფანიძე

ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების  
განვითარების დინამიკა, მათი როლი პურკინიეს უჯრედების  
დენდრიტული ხის ჩამოყალიბებასა და სინაპტოგენეზში

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი

დისერტაცია

ხელმძღვანელი: პროფესორი ბმდ რ. სოლომონია  
ასოცირებული პროფესორი ბმდ ა. დუნაევსკი

2010

## შემოკლებები

**LTP** - ხანგრძლივი პოტენციაცია

**LTD** - ხანგრძლივი დეპრესია

**TNF** - სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორი

**CNS** - ცენტრალური ნერვული სისტემა

**GLAST** - გლუტამატ-ასპარტატ ტრანსპორტერი

**GFAP** - გლიური ფიბრილარული მჭავე ცილა

**ATP** - ადენოზინტრიფოსფორმჟავა

**GFP** - მწვანე ფლუორესცენტული ცილა

**RFP** - წითელი ფლუორესცენტული ცილა

**dn-Rac1** - დომინანტ ნეგატიური Rac1

**PBS** - ფოსფატური ბუფერის ხსნარი

**NGS** – ნორმალური თხის შრატი

**HRP** – პირმუშხას პეროქსიდაზა

**DAB** – დიამინობენზიდინი

**AMPA** –  $\alpha$ -ამინო-3-ჰიდროქსი-5-მეთილ-4-იზოქსაზოლ-პროპინის მჟავა

**NMDA** – N- მეთილ- D-ასპარტატი

**GluR** – გლუტამატის რეცეპტორების სუბერთეული

**ACSF** – ხელოვნური თავზურგტვინის სითხე

**PTP $\zeta$ /RPTP $\beta$**  –თიროზინფოსფატაზა

**mTor**- ძუძუმწოვრებში რამფამიციინის მოქმედების სამიზნე ცილა

**TSC** - ტუბეროზული სკლეროზის კომპლექსი

# შინაარსი

თავი I. შესავალი .....	5
თავი II. ლიტერატურის მიმოხილვა .....	8
2.1. გლიური უჯრედების ტიპები , ფუნქციები და მათი კავშირი სინაფსებთან .....	8
2.2. გლია, როგორც ნეირონული სტრუქტურის მარეგულირებელი .....	12
2.3. სიგნალის გადაცემა გლიასა და ნეირონს შორის .....	15
2.4. ნათხემი .....	19
2.5. ნათხემის განვითარება .....	23
2.6. პურკინიეს უჯრედები .....	26
თავი III. მასალა და მეთოდები .....	29
3.1. ცხოველები .....	29
3.2. ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების მომზადება და უჯრედების მონიშვნა .....	29
3.3. ცოცხალი ანათლები .....	29
3.4. ადენოვირუსის შექმნა .....	29
3.5. ინტაქტურ ცხოველებში ბერგმან გლიის მონიშვნა ვირუსის საშუალებით .....	30
3.6. დროის გარკვეულ მონაკვეთში ცოცხალი ანათლების გადაღება და მიღებული გამოსახულებების ანალიზი .....	30
3.7. ნივთიერებებით ზემოქმედება .....	30
3.8. იმუნოციტოქიმია .....	31
3.9. ელექტრონული მიკროსკოპია .....	31
3.10. გლიური მორჩების მორფოლოგიის ანალიზი .....	32
3.10.1. გლიური მორჩების განლაგების სიმჭიდროვე .....	32
3.10.2. ლატერალური მორჩების ზედაპირის ფართობის ინდექსი .....	33
3.10.3. გლიური მორჩების მორფოლოგიური დახასიათება .....	33
3.11. გლიური შემოგარსვის განსაზღვრა .....	34
3.11.1. სინათლის მიკროსკოპული ანალიზი .....	34

3.11.2. ულტრასტრუქტურული ანალიზი .....	35
3.12. გლიური უჯრედების მორჩების დინამიკის განსაზღვრა .....	35
3.13. სინაფსების რიცხვის განსაზღვრა .....	36
3.14. სინაფსების რაოდენობის ულტრასტრუქტურული ანალიზი .....	37
3.15. სტატისტიკური ანალიზი .....	37
<b>თავი IV. მიღებული შედეგები .....</b>	<b>38</b>
4.1. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების განვითარება ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში .....	38
4.2. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული დაბოლოებანი კავშირს ამყარებენ ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებთან .....	41
4.3. პურკინიეს უჯრედები ვერტიკალურად იზრდებიან ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩებთან მჭიდრო კავშირის არსებობის შემთხვევაში .....	45
4.4. პურკინიეს დენდრიტები არაშემთხვევითად ამყარებენ კავშირებს ბერგმანის გლიურ მორჩებთან .....	46
4.5. ბერგმანის გლიური უჯრედებისა და მათი მორჩების მონიშვნა და იდენტიფიკაცია .....	52
4.6. ბერგმანის გლიური მორჩების განვითარების დინამიკა და მათი ძვრადობა	56
4.7. მექანიზმები, რომლებიც არეგულირებენ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების ძვრადობას .....	63
4.8. Rac1 და RhoG-ს როლი გლიური მორჩების სიგრძის რეგულირებაში .....	64
4.9. გლიის მიერ სინაფსების შემოგარსვის პროცესის განვითარება სინაპტოგენეზის პერიოდში .....	68
4.10. გლიის მორჩების სიგრძის შემცირება იწვევს მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვის შემცირებას .....	74
4.11. ბერგმან გლიის შემომგარსველი როლი სინაფსების ჩამოყალიბებასა და მათ სტაბილიზაციაში .....	77
<b>თავი V. შედეგების ანალიზი და დასკვნები .....</b>	<b>87</b>
<b>ლიტერატურა .....</b>	<b>103</b>

## თავი I . შესავალი

მიუხედავად იმისა, რომ ნერვულ სისტემაში უჯრედების 50% გლიურ უჯრედებს უკავიათ, მათი ფუნქცია ნერვულ სისტემაში ჯერ კიდევ არ არის სრულად აღწერილი. მრავალი წლის განმავლობაში მეცნიერებს მიაჩნდათ, რომ გლიური უჯრედები აქტიურ მონაწილეობას არ იღებენ ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში მიმდინარე მნიშვნელოვან პროცესებში. გლიას განიხილავდნენ, როგორც მხოლოდ ნეირონების საყრდენ, დამხმარე ელემენტს. ცნობილი იყო, რომ გლიური უჯრედების ნაწილი ასრულებდა გამწმენდ ფუნქციას, ნაწილი მონაწილეობდა აქსონების მიელინიზაციაში და ნაწილი ასტროგლიის სახით იკავებდა უჯრედშორის სივრცეს, რითაც განაპირობებდა ნეირონების ოპტიმალურ ფუნქციონირებას.

ბოლო ათწლეულის გამოკვლევებმა გამოავლინა გლიის უმნიშვნელოვანესი როლი ცენტრალური ნერვული სისტემის ნორმალური ფუნქციონირებისათვის. მკვლევართა ინტერესი ნეირონ-გლიურ სისტემაში განისაზღვრება ამ სისტემის ორგანიზაციითა და თვითრეგულირებით, რაც გამოწვეულია თითოეული ამ კომპონენტის წინაშე არსებული ამოცანით ნორმასა და ექსტრემალურ პირობებში. ამ ტანდემში თითოეული პარტნიორის როლი ძალიან მნიშვნელოვანია.

ზოგიერთი გლიური უჯრედის ძირითადი ფუნქცია ნეირონების საყრდენია. სხვები არეგულირებენ ტვინის შიდა გარემოს, კერძოდ, თხევად არეს ნეირონებსა და სინაფსების ირგვლივ, ახდენენ ნეირონების ნიტრიფიცირებას. და თუ ადრე მიაჩნდათ, რომ მხოლოდ ნეირონები ასრულებენ სპეციფიკურ ფუნქციებს ცნს-ში, დღესდღეობით დადგენილია, რომ გლიასაც მნიშვნელოვანი წვლილი შეაქვს ტვინის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში. მაგალითად, ნეიროგლიას უნარი აქვს ნეირონების დაცვის, “ასუფთავებს“ რა უჯრედშორის არეს კალიუმის იონების სიჭარბისაგან. კალიუმის იონებით გამოწვეული დეპოლარიზაცია იწვევს გლიურ უჯრედებში ფერმენტების აქტივაციას, რის შედეგადაც ხდება ნეირონებში მეტაბოლიზმის შესანარჩუნებლად აუცილებელი ნივთიერების გამომუშავება. გლიის უჯრედების მიერ კალიუმის იონების აკუმულირების უნარი დაკავშირებულია მის კიდევ ერთ ფუნქციასთან - მედიატორის და სხვა ძლიერმოქმედი აგენტების გაძევების პროცესებთან, რომლებიც გამოიყოფა ნეირონული აქტივობის დროს. ამის გარდა, გლიის უჯრედები მონაწილეობს ზოგიერთი რეგულატორის წინამორბედის

სინთეზში, რომლებიც შემდეგ გადაეცემა ნეირონებს. ამის მაგალითად გამოდგება მთელი რიგი ნეიროტროფინების სინთეზი, აგრეთვე ზრდის ფაქტორის, რომელიც მონაწილეობს მოტონეირონების ტროფიკასა და რეპარაციაში. ექსპერიმენტული მონაცემებით ცნობილია, რომ ნათხეშში გლიური უჯრედები მონაწილეობენ სინაფსურ ტრანსმისიაში (Gomes et al., 2001; Fields and Stevens-Graham, 2002; Hatton G.I., 2002; Hanisch and Kettenmann, 2007; და სხვ.).

ფაქტები ადასტურებს, რომ მთელი ცხოვრების განმავლობაში ნეირონსა და გლიას შორის არის აქტიური დიალოგი. გლია გავლენას ახდენს სინაფსების წარმოქმნაზე და ჩართულია პროცესებში, თუ რომელი ნერვული კავშირები ძლიერდება ან სუსტდება დროთა განმავლობაში. გლიური უჯრედები ურთიერთობენ ერთმანეთთანაც, რითაც გავლენას ახდენენ მთლიანი ტვინის მოქმედებაზე (Allen and Barres, 2009).

ათწლეულების განმავლობაში მეცნიერები ვარაუდობდნენ, რომ სიგნალების ერთადერთი გადამცემი თავის ტვინსა და ნერვული სისტემის სხვა განყოფილებებში არის მხოლოდ - ნეირონები. გლიის უჯრედებს მხოლოდ მოკრძალებული დამხმარე ელემენტის როლი მიეკუთვნებოდა. თანამედროვე ლიტერატურული მონაცემები კი აჩვენებენ, რომ გლიის უჯრედები ინფორმაციას ცვლიან როგორც ნეირონებთან, ასევე ერთმანეთს შორისაც. გლიურ უჯრედებს აქვთ უნარი სიგნალები შეცვალონ სინაფსური კონტაქტების დონეზე და გავლენა მოახდინონ სინაფსების წარმოქმნაზეც. აღსანიშნავია ბოლო წლებში დადგენილი ასტროციტების მიერ სიგნალების თავისებური გადაცემის და აქტიობის პოტენციალის წარმოქმნის უნარი. გლიურ უჯრედებს მნიშვნელოვანი წვლილი შეაქვთ ტვინის ელექტროგენეზში. ნეირონების ჰიპერაქტივობა ბლოკირდება გლიური უჯრედების შემაკავებელი გავლენით. ამგვარად, გლიას შეუძლია გადამყვები როლი შეარულოს დასწავლისა და მეხსიერების პროცესებში (Pfrieger, 2002; Christopherson et al., 2005).

გლია მნიშვნელოვანია ნერვული სისტემის განვითარებაში, სინაფსურ პლასტიურობასა და სინაპტოგენეზის პროცესებში. ბოლო წლების კვლევები, რომელიც ჰიპოკამპის უჯრედებზე იქნა ჩატარებული, მიუთითებენ გლიური უჯრედების როლზე ადრეულ ემბრიოგენეზში, ცდებით ნაჩვენები იქნა გლიის მონაწილეობა დენდრიტების ზრდის მოდიფიცირებაში (Volterra and Steinhäuser, 2004).

გლია მონაწილეობს ნეირონების აღდგენის რეგულაციაში დაზიანების შემდეგ. ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში გლია თრგუნავს აღდგენის პროცესს. ასტროციტები პროლიფერირდებიან, წარმოქმნიან ნაწიბურს და სპეციფიურ მოლეკულებს, რომლებიც აინჰიბირებენ დაზიანებული ან გაწყვეტილი აქსონის ხელახალ ზრდას. პერიფერიულ ნერვულ სისტემაში კი გლია, ცნობილი შვანის უჯრედების სახელით, ხელს უწყობს აღდგენას. აქსონური დაზიანების შემთხვევაში შვანის უჯრედები უბრუნდებიან ადრეული განვითარების მდგომარეობას, რათა ხელი შეუწყონ აქსონების განახლებულ ზრდას (Barres, 2008).

ამგვარად გლია არ არის მხოლოდ “წებო“ ნერვულ სისტემაში, როგორც ეს სახელით გამოიხატება, არამედ ისინი წარმოადგენენ ნეირონების პარტნიორებს. თუმცა, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ნეირო-გლიური პარტნიორობის მექანიზმები ჯერ კიდევ სრულად არ არის შესწავლილი. ჩემს მიერ წარმოდგენილ ნაშრომში შევეცადეთ გაგვეჩვენოთ ზოგიერთი ასპექტი ნეირონულ-გლიურ ურთიერთობებში, კერძოდ, ბერგმანის გლიური უჯრედებისა (ნათხემის ძირითადი ასტროციტალური უჯრედები) და პურკინიეს უჯრედების ურთიერთობები (ნათხემის ძირითადი ნეირონები) მორფოლოგიურ და მოლეკულურ დონეზე.

ჩვენი ამოცანა იყო, შეგვესწავლა ნათხემში ბერგმანის გლიური უჯრედების როლი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული ხის ჩამოყალიბებაში, თვით ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების განვითარების დინამიკა და ბოლოს, დაგვედგინა თუ რა როლს თამაშობს ბერგმანის გლია სინაპტოგენეზში.

## თავი II. ლიტერატურის მიმოხილვა

### 2.1. გლიური უჯრედების ტიპები, ფუნქციები და მათი კავშირი სინაფსებთან

არსებობს მრავალი სახის გლიური უჯრედი, მაგრამ ტრადიციულად გლიური უჯრედები შეიძლება დაიყოს 2 ძირითად ჯგუფად - მაკრო და მიკროგლიად. მიკროგლიას განიხილავენ, როგორც იმუნური სისტემის ნაწილს, რადგან მიუხედავად მათი არსებობისა ტვინში, ისინი წარმოიქმნებიან მეზოდერმიდან და შეიცავენ ბევრ იმუნოლოგიურ მარკერს (Vilhardt, 2005).

მაკროგლია წარმოიქმნება ექტოდერმისაგან, ისევე როგორც დანარჩენი სხვა ნეირონული ქსოვილები. მაკროგლიის ძირითადი წარმომადგენლები არიან ასტროციტები და ოლიგოდენდროციტები.

ასტროგლია დიდი რაოდენობით არის ცნს-ში და თამაშობს ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს როლს ჰემატოენცეფალური ბარიერის წარმოქმნაში. ანუ ხელს უშლის არასასურველი მოლეკულების გადასვლას სისხლიდან ტვინის ქსოვილში (Kim JH, 2006). მაკროგლიის მეორე წარმომადგენელია - ოლიგოდენდროგლია.

ცნს-ში ოლიგოდენდროციტები და პერიფერიულში - შვანის უჯრედები ახდენენ აქსონების მიელინიზაციას, რითაც ხელს უწყობენ სიგნალის სწრაფ გადაცემას აქსონის გასწვრივ. რადიალური გლია, რომელიც მაკროგლიის კიდევ ერთი წარმომადგენელია, დიდ როლს თამაშობს უჯრედების მიგრაციის პროცესში (Rakic, 1971; Hatten et al., 1984; Edmondson and Hatten, 1987).

როგორც ცნობილია, სინაფსი წარმოადგენს ინფორმაციის გადაცემის უმნიშვნელოვანეს წყაროს, რომელიც არეგულირებს სიგნალის გადაცემას ერთი უჯრედიდან მეორეზე, რითაც უზრუნველყოფს ტვინის ნორმალურ ფუნქციონირებას. ტვინში არსებული ასეულობით მექანიზმი თავის მხრივ არეგულირებს სინაფსების ფუნქციონირებას, ხოლო სინაფსური აქტივობა ძირითადად დამოკიდებულია ნერვული სიგნალის სიძლიერეზე. ბოლო ათწლეულების კვლევებმა გამოავლინა ახალი ობიექტები, რომლებიც აქტიურ როლს თამაშობენ ნერვული ინფორმაციის გატარებაში, სინაფსებისა და ნეირონების რეგულაციაში და თავადაც აწარმოებენ ინფორმაციის გადაცემას. ასეთ ობიექტებს



წარმოადგენენ გლიური უჯრედები (Walz, 1989; Pfrieger and Barres, 1997; Christopherson et al., 2005).

ასტროგლიის მორფოლოგია და განლაგება ხელს უწყობს მას, რომ დიდი როლი ითამაშოს ტვინის ფუნქციონირებაში. თუმცა სხვადასხვა ტიპის ასტროგლია მორფოლოგიურად განსხვავდება ერთმანეთისაგან. ზრდასრულ ტვინში თითქმის ყველა ასტროციტს გააჩნია ვერტიკალურად მიმართული ერთი ან რამოდენიმე რადიალური მორჩი და მათგან გამომავალი წვრილი ლატერალური გვერდითი განშტოებები. დეტალურმა მორფოლოგიურმა გამოკვლევებმა ცხადყო, რომ გლიური უჯრედები და ნეირონები მჭიდროდ არიან ერთმანეთთან დაკავშირებული. ასტროგლიას იმდენად მჭიდრო კონტაქტი აქვს სინაფსთან, რომ ტერმინიც კი იქნა შემოტანილი ალფონსო არაკოეს მიერ (Arraque et al., 1999b) “სამნაწილიანი სინაფსი”, სადაც გლია განიხილება, როგორც სინაფსის მესამე წევრი. უჯრედული და მოლეკულური მახასიათებლები, რომლებიც წარმართავენ სიგნალის გადაცემას ასტროციტებსა და ნეირონებს შორის და ამავდროულად წარმოადგენენ სინაფსების ფუნქციურ ელემენტებს, საფუძველს იძლევა იმისათვის, რომ ჩამოყალიბებულიყო ე.წ. “სამნაწილიანი სინაფსის” კონცეფცია. ეს კონცეფცია ეყრდნობა იმ მონაცემებს, რომ ასტროციტებს ნეირონული აქტივობის დროს ნეიროტრანსმიტერების გამოთავისუფლებაზე შეუძლიათ რეაგირება და თავის მხრივ უნარი შესწევთ ნეიროაქტიური ნივთიერებების - გლიოტრანსმიტერების გამოყოფის, რომლებიც გავლენას ახდენენ ნეირონების აგზნებადობასა და სინაფსურ გადაცემაზე. ანუ ასტროციტები წარმოადგენენ სინაფსების სრულფასოვან ელემენტებს, რომლებიც აქტიურად არიან ჩაბმულნი სინაფსების ფუნქციონირებაში (Araque et al., 1999; Perea and Araque, 2010).

ჰიპოკამპში სინაფსების დაახლოებით 57%, ხოლო ნეოკორტექსში - 29% გარშემოხვეულია გლიური უჯრედების გვერდითი განშტოებებით. აღსანიშნავია, რომ ნათხემში თითქმის ყველა ამაგზნებელი სინაფსი, რომლებიც წარმოიქმნება პურკინიეს უჯრედსა და აქსონებს შორის, მთლიანად გარშემორტყმულია გლიური ლატერალური მორჩებით (Spacek, 1985; Groshe et al., 1999). მიუხედავად მრავალი გამოკვლევებისა, რომლებიც ჩატარებულია ნეირონებსა და გლიურ უჯრედებს შორის

არსებულ კავშირებზე, ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე გარკვეული, თუ რა როლს თამაშობენ გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩები სინაპტოგენეზის პროცესში. გლიის აქტიური როლი სინაფსის ფორმირებასა და მისი ფუნქციონირების გაძლიერებაში დადგენილი იყო ადრეული ექსპერიმენტების საფუძველზე. პრესინაფსურ ასტროგლიას გააჩნია მნიშვნელოვანი ფუნქციები. ისინი უზრუნველყოფენ უჯრედმორისი გარემოს შექმნას ისეთი მექანიზმების საშუალებით, როგორცაა  $\text{Na}^+$ -ის იონების და გლუტამატის გამოთავისუფლება სინაფსებიდან, რითაც საშუალებას აძლევენ უჯრედს ადადგინოს თავისი ფუნქცია აქტივობის პოტენციალის შემდეგ და მოემზადოს შემდეგი ინფორმაციის მისაღებად. გარდა ამისა, ასტროგლია შემოსაზღვრავს ცალკეულ სინაფსებს, რითაც ხელს უშლის ნეიროტრანსმიტერების გამოსვლას სინაფსიდან და სხვა პოსტსინაფსური კავშირის გაღიზიანებას. ასტროციტები წარმოადგენენ სინაფსების შემადგენელ ელემენტებს, რომლებისთვისაც დამახასიათებელია როგორც სტრუქტურული, ასევე ფუნქციური მოდიფიკაციები (Theodosia et al., 2008) ასტროციტების სტრუქტურულმა ცვლილებებმა შესაძლებელია მნიშვნელოვნად შეცვალონ სინაფსების ფუნქცია, რადგანაც ისინი გავლენას ახდენენ ექსტრასინაფსური რეცეპტორების აქტივაციაზე და ნეიროტრანსმიტერების შთანთქმაზე სინაფსური ნაპრალიდან (Theodosia et al., 2008). გარდა ამისა, ჰიალურონან/ბრევიკანი, რომელიც ნაწილობრივ სინთეზირდება ასტროციტების მიერ და ვლინდება ცენტრალური ნერვული სისტემის განვითარების ბოლო ეტაპებზე, ახდენს ნეირონების ზედაპირის კომპარტმენტალიზაციას (გამოყოფას) და ზღუდავს ნეიროტრანსმიტერული რეცეპტორების მობილურობას, რაც თავის მხრივ გავლენას ახდენს სინაფსურ პლასტიურობაზე (Faissner et al., 2010).

მღრღნელების ბადურის განგლიის უჯრედების კულტურაში ამაგზნებელი სინაფსების აქტივობა უფრო მაღალია ასტროციტებით გამდიდრებულ გარემოში, ვიდრე მათი არარსებობის დროს (Pfieger and Barres, 1997). სხვა ექსპერიმენტებშიც იქნა ნაჩვენები, რომ უჯრედოვან კულტურაში სინაფსების რაოდენობა იზრდება, თუ ასტროციტების რიცხვი მატულობს. ეს მოსაზრება ეთანხმება იმ მონაცემებს, რომ სინაპტოგენეზი დაკავშირებულია გლიური უჯრედების წარმოშობასთან, ან მათ დიფერენციაციასთან ტვინის მრავალ უბანში (Uillian et al., 2001). არტიმ და კოლეგებმა მსგავსი კორელაცია აღნიშნეს ადამიანის ნეირონების კულტურაშიც

(Hartly et al., 1999). თუმცა ასაბუთებენ იმასაც, რომ გლიური უჯრედების მოქმედების შინაარსი დამოკიდებულია თვით ნეირონების ტიპებზე. მაგ. ჰიპოკამპური და ნათხემის ნეირონები კულტურაში ჩვეულებრივ წარმოქმნიან სინაფსებს გლიის არარსებობის შემთხვევაშიც (Steinmetz et al., 2006).

მაგრამ გლიური უჯრედების არსებობისას სინაფსების რიცხვის მატება არ განაპირობებს სინაფსების აქტივობის მომატებას. გამოკვლევებმა ცხადყო, რომ გლიური უჯრედების არსებობა მნიშვნელოვანია არა მხოლოდ ახალი სინაფსების ფორმირებისა და ნორმალური ფუნქციონირებისთვის, არამედ შემდგომში ამ სინაფსების სტაბილიზაციისთვისაც, რადგან მას მერე, რაც გლიით გაჯერებულ უჯრედოვან კულტურას მოაცილეს ასტროციტული გარემო, შეწყდა ახალი სინაფსების წარმოქმნა. ქრისტოფერსონის და მისი კოლეგების მიერ იდენტიფიცირებული იქნა თრომბოსპოდი, ასტროციტების მიერ გამოყოფილი მოლეკულა, რომელიც აკონტროლებს სინაპტოგენეზს (Christopfer et al., 2005) გლიურ უჯრედსა და ნეირონს შორის უშუალო კონტაქტის არარსებობის შემთხვევაშიც კი და ხელს უწყობს სინაფსების რაოდენობის ზრდას სხვა მოლეკულები, როგორც არიან ინტეგრინები, საჭიროებენ უშუალო კონტაქტს ნეირონსა და გლიას შორის და მოქმედებენ პროტეინ კინაზა C გზის საშუალებით. (Hama et al; 2004). ეს უჯრედებიც ზრდიან სინაფსურ აქტივობას, თუმცა, არაფერია ცნობილი იმის შესახებ, ზრდიან თუ არა ისინი სინაფსების რაოდენობასაც. ასეთ მოლეკულებს მიეკუთვნება ქოლესტეროლი, რომელიც მოქმედებს აპოლიპოპროტეინ E-ს და ასტროგლიის მიერ გამოშვებული გლუტამატის საშუალებით (Araque et al., 1998; Fiacco and McCarthy, 2004)

მრავალი მეცნიერული ნაშრომის საფუძველზე დადგინდა, რომ გლიური უჯრედის მიერ სინთეზირებული ამინომჟავა D-სერინი ხანგრძლივი მოქმედებისაა და მონაწილეობას იღებს ხანგრძლივი პოტენციალის წარმოქმნაში (Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006). D-სერინი მოქმედებს როგორც თანა-აგონისტი NMDA გლუტამატ რეცეპტორებთან ერთად. მეცნიერები D-სერინს განიხილავენ, როგორც NMDA რეცეპტორების ენდოგენურ თანალიგანდს ტვინის ბევრ უბანში, მაგ: ჰიპოკამპში, ქერქსა და ჰიპოთალამუსში; რადგან, სწორედ ამ უბნებში NMDA რეცეპტორებსა და D-სერინს შორის არის მჭიდრო ურთერთკავშირი (Johnson and Ascher, 1987; Scolari et al., 2007). ჰიპოკამპურ კულტურაში ხანგრძლივი პოტენციალის (LTP) წარმო-

ქმნისთვის საჭიროა ასტროციტალური D-სერინი (Yang et al., 2003). იქ, სადაც D-სერინის ნაკლები რაოდენობაა, ადგილი აქვს NMDA რეცეპტორების აქტივაციის შესუსტებას, რაც თავის მხრივ აფერხებს ხანგრძლივი პოტენციალის წარმოქმნას (Panatier et al., 2006).

გლიურ უჯრედებს აგრეთვე შეუძლიათ გავლენა იქონიონ სინაფსურ პლასტიურობის ერთ-ერთ ფორმაზე სიმსივნის ნეკროზული ფაქტორის (TNF- $\alpha$ ) გამოყოფით. სინაფსური პლასტიურობის ამ ფორმას ჰომეოსტაზური სინაფსური სკალირება ეწოდება, და წარმოადგენს მექანიზმს რომლის საშუალებითაც ხდება უჯრედზე არსებული ყველა სინაფსის უნიფორმული მისადაგება უჯრედის ელექტრული აქტივობის გრძელვადიანი ცვლილებებისადმი. ამ მექანიზმის გარეშე ნეირონული ანსამბლები არასტაბილურები იქნებოდნენ. ნაჩვენებია, რომ ამ დროს ადგილი აქვს ასტროციტარული TNF- $\alpha$ -ს გამოყოფას, რომელიც ზრდის  $\alpha$ -ამინო-5-მეთილ-4-იზოქსაზოლპროპიონური მჟავის (AMPA) ქვეტიპის გლუტამატის რეცეპტორების რაოდენობას, რომლებიც ნეირონების მემბრანებზე ექსპრესირდებიან (Beattie et al., 2002; Stellwagen and Malenka, 2006).

## 2.2. გლია, როგორც ნეირონული სტრუქტურის მარეგულირებელი

გლიას შეუძლია არეგულიროს ნეირონების ფორმირება, ანუ შეაფერხოს ან პირიქით, ხელი შეუწყოს მათ ზრდა-განვითარებას. არსებობენ ე.წ. “რეაქტიული ასტროციტები”, რომლებიც წარმოქმნიან საკმაოდ მჭიდრო კედელს ნეირონების ირგვლივ მათი დიფერენციაციის პროცესში და ამით ისინი აფერხებენ ნეირონების ზრდას (Steindler et al., 1989; Powell et al., 1997). ამავე დროს, გლიური უჯრედები თავის მხრივ განიცდიან მოდიფიცირებას აფერენტული ნეირონებიდან წამოსული სიგნალების ზემოქმედებით.

ასტროგლია აგრეთვე ახდენს ცნს-ში აქსონების ზრდის ინჰიბირებას ტვინის სხვადასხვა დაზიანების შემთხვევაში (Hatten et al., 1991; Shearer et al., 2003). განვითარების სტადიაში ყოფნის დროს კი - ასტროგლიას შეიძლება ჰქონდეს საწინააღმდეგო მოქმედების უნარი, ანუ ხელი შეუწყოს აქსონების ზრდას (Neugebauer et al., 1988; Dreyer et al., 1995). ასტროგლიური უჯრედების დიფერენცირების სხვადასხვა დონე განაპირობებს, თუ როგორ გავლენას იქონიებს გლია ნეირონებზე, ნაკლებად

დიფერენცირებული გლიური უჯრედები მეტწილად ხელს უწყობენ ნეირონების ზრდას (Wang et al., 1994).

გლია მიმართულებას აძლევს ნეირონების ზრდას GLAST-ის (გლუტამატ-ასპარტატის მჟავის ტრანსპორტერი) აქტივაციის გზით. ესენი გლუტამატის ტრანსპორტერებია, რომლებიც ექსპრესირდებიან გლიური უჯრედების, კერძოდ, ასტროციტების მორჩებზე (Yamada et al., 2000). ტანაკას და თანაავტორების შრომებმა ცხადყო, რომ ნათხემში პურკინიეს უჯრედები იღებენ საკმაოდ არასპეციფიურ ფორმას GLAST-ის აქტიური ინჰიბირების შემდეგ. ნათხემის მოლეკულურ შრეში პურკინიეს უჯრედები GLAST-ის ინჰიბირების შემთხვევაში არ წარმოქმნიან ისეთ მოწესრიგებულ დენდრიტულ დატოტიანებას, რითაც ხასიათდებიან ნორმალურ პირობებში. კერძოდ, GLAST-ის ინჰიბირებისას ნათხემის მოლეკულურ შრეში პურკინიეს უჯრედები ავლენენ უჩვეულო მორფოლოგიას (Tanaka et al., 2003). საინტერესოა, რომ ამ დროს დენდრიტების სიგრძე არ იცვლება, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ პრობლემა მდგომარეობს არა დენდრიტების ზრდაში, არამედ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ზრდის სწორი მიმართულების მიცემაში და ამ უჯრედებისათვის დამახასიათებელი კარგად დატოტიანებული დენდრიტული ხის წარმოქმნაში. ამ შრომის გაგრძელებას წარმოადგენს სწორედ ჩვენს მიერ ჩატარებული ცდები: კერძოდ, თუ როგორ კავშირში იმყოფება პურკინიეს უჯრედების ზრდა და ზრდის მიმართულება ბერგმანის გლიური უჯრედებთან (იხ. თავი “შედეგები“).

როგორც ცნობილია, დენდრიტების პატარა ზომის გამონაზარდების - ქაცვების მორფოლოგია მეტ-ნაკლებად რეგულირდება გლიური უჯრედებით. ამაგზნებელი სინაფსების პოსტსინაფსურ მხარეს უმეტესად სწორედ ეს ქაცვები წარმოადგენენ. გლიური უჯრედების მასიგნალირებელი მოლეკულების ერთ-ერთ ჯგუფი, რომელიც სავარაუდოდ მონაწილეობას ღებულობს ქაცვების მორფოლოგიის განვითარებაში, არის Eph-რეცეპტორები, თიროზინ კინაზები და მათი ლიგანდური ეფრინები. ჰიპოკამპში, ნეირონული მემბრანის ეფრინ A4 -სა და გლიური მემბრანის ეფრინ-A3-ს შორის ურთიერთკავშირის ბლოკირებას მივყავართ ქაცვების სრულ დეზორგანიზაციამდე: მათი გადანაწილების და სიგრძის მკვეთრ არევამდე (Murai et al., 2003; Martines and Soriano, 2005; Nishida and Okabe, 2007) ანუ ირღვევა ქაცვების დენდრიტებზე გადანაწილების სიხშირე და სიგრძე, ხოლო ეფრინ A4-ის აქტივაცია

კი იწვევს ქაცვების რეტრაქციას (Murai et al., 2003). ეს მონაცემები მიუთითებენ ასტროციტების მნიშვნელოვან როლზე ქაცვების ფორმირებასა და მათი არსებობის შენარჩუნებაში. ეს იდეა კიდევ უფრო მყარდება ქაცვების სიმჭიდროვისა და გლიის მორფოლოგიის კორელაციის შესწავლის შემთხვევაში. ქაცვების სიმჭიდროვის შემცირება არის ერთ-ერთი დამახასიათებელი სიმპტომი ადამიანის დაავადებებისა, რომლებიც ხასიათდებიან გლიური უჯრედების ჰიპერტროფიით. გარდა ამისა, ზოგიერთი სახის მკურნალობა, რაც იწვევს ქაცვების რაოდენობის ზრდას, ხშირად იწვევს ასტროციტალური გამონაზარდების რეტრაქციას (Woolley and Mc Ewen, 1944; Klintsova et al., 1995; Thomson, 2003).

ასტროგლია საპასუხო რეაქციას იძლევა ჰორმონალურ ცვლილებებზე ტვინის სხვადასხვა უბანში (ჰიპოთალამური ბირთვები). ამავდროულად, გლიურ უჯრედებს ჰორმონალური მექანიზმებით შეუძლიათ არეგულირონ ქაცვები (Zimmermann, 1982; Mong et al., 1999). ჰიპოთალამუსის ერთ-ერთ უბანში ასტროციტების მორფოლოგიური კომპლექსურობის ზრდა, რაც ჰორმონალურად არის ინდუცირებული, იწვევს ქაცვების რაოდენობის შემცირებას. ჰიპოთალამუსის ზოგიერთ ნეირონზე ესტრადიოლის ან პროსტაგლანდინ-E2-ის მოქმედებას, რაც იწვევს იქ მდებარე ასტროციტების მიერ გლუტამატის გამოყოფას (Nicol et al., 1992), მივყავართ დენდრიტული ქაცვების სიმკვრივის გაზრდამდე (Amateau and McCarthy, 2002). მიუხედავად იმისა, რომ ზემოთ ჩამოთვლილი ექსპერიმენტები ამტკიცებენ ასტროციტების მნიშვნელოვან როლს ქაცვების რეგულირებაში, ჯერ კიდევ არ არის ცნობილი, ამ პროცესში მონაწილეობას იღებს ყველა ასტროციტი, თუ მხოლოდ გარკვეული ტიპი ამ უჯრედებისა.

რადგანაც ასტროგლიას შესწევს უნარი მონაწილეობა მიიღოს ნეირონებისა და სინაფსების რეგულაციაში, გასაკვირი არ იქნება, თუ მას სხვა კიდევ უფრო ნატიფი ფუნქციების შესრულებაც შეეძლება. მაგალითად ისეთი, როგორცაა ინფორმაციულ პროცესებში მონაწილეობა, რასაც ნეირონული დონიდან მივყავართ ქცევამდე.

რადგანაც გლიური უჯრედები გარს ეკვრიან სინაფსებს და მჭიდრო კავშირში იმყოფებიან ნეირონებთან, ზოგიერთი მონაცემი მიუთითებს იმ ფაქტზე, რომ ისინი ასრულებენ ნეირონული აქტივაციის მასინქრონიზებელ ფუნქციას. მათ შეუძლიათ ერთმანეთთან დააკავშირონ 2-დან 12 ნეირონამდე (Angulo et al., 2004; Fellin et al.,

2004; Volterra and Meldolesi, 2005). გლიამ, როგორც ნეირონების დამაკავშირებელმა საშუალებამ და აგრეთვე მისმა უნარმა - ცვალოს AMPA ( $\alpha$ -ამინო-3-ჰიდროქსი-5-მეთილ-4-იზოქსაზოლ პროპიონის მჟავა) ტიპის გლუტამატური რეცეპტორების ექსპრესია, საშუალება მისცა მეცნიერებს გამოეკვლიათ მისი როლი ნეირონების აგზნების პროცესში, კერძოდ, მოტონეირონებში (Van Damme et al., 2007). ეს კი, თავის მხრივ შეიძლება დაკავშირებული იყოს ეპილეფსიასთან ან სხვა დაავადებებთან, რომლებშიც ადგილი აქვს ნეირონების გადაჭარბებულ აგზნებადობას.

ნეირონებზე ასტროგლიის გავლენა ვლინდება ქცევით პროცესებშიც. როგორც ლიტერატურიდან არის ცნობილი, ასტროციტარული წარმოშობის ნელა გავრცელებადი  $Ca^{2+}$  იონური ტალღები მოდულირებას ახდენენ ნეირონების ფუნქციაზე. ხოლო ასტროციტარული  $Ca^{2+}$  იონური ცვლილებები გავლენას ახდენენ ნეირონულ და ქცევით ფენოტიპებზე. ტრანსგენური თაგვები, რომლების ჰიპოკამპში შეყვანილი იყო ასტროციტარული  $Ca^{2+}$  შემაკავშირებელი ცილა S100 $\beta$  (Donato, 1999), სუსტად პასუხობდნენ მაღალი სიხშირის (100 Hz) სტიმულაციებს. ჰიპოკამპის დაქვეითებულ ნეიროფიზიოლოგიას თან ერთვოდა ჰიპოკამპ-დამოკიდებული დასწავლის გაუარესება. კერძოდ, ეს ტრანსგენური თაგვები მორისის ავზის ტესტის გავლის დროს ავლენდნენ დაქვეითებულ სივრცობრივ ორიენტაციას, რაც არ იყო განპირობებული მოტორული დისფუნქციით, შესუსტებული მხედველობით ან მოტივაციით (Gerlai et al., 1995). დასწავლის პროცესში გაუარესება განპირობებული იყო ასტროციტარული  $Ca^{2+}$  ცვლილებებით ანუ გლიური უჯრედები აქტიურად არიან ჩართული ტვინის საინფორმაციო პროცესებში

### 2.3. სიგნალის გადაცემა გლიასა და ნეირონს შორის

იმისათვის, რომ გლია ჩართული იყოს ნეირონულ პროცესებსა და ინფორმაციის გადაცემაში, მას უნდა შეეძლოს ნერვული აქტივობის განსაზღვრა და პასუხის გაცემა. ამისათვის ასტროგლიას გააჩნია მრავალი მემბრანული რეცეპტორი.

ასტროგლიის უმრავლესობა შეიცავს გლუტამატ რეცეპტორებს, რომლებიც მოიცავენ მეტაბოტროპულ და იონოტროპულ AMPA რეცეპტორებს (Sontheimer et al., 1988), კანერ და NMDA (N-მეთილ-D-ასპარტატულ) რეცეპტორებს (Sanchez-Gomez and Matute, 1999; Schipke et al., 2001).

გლიური AMPA რეცეპტორები განსხვავდება მრავალი ნეირონალური AMPA რეცეპტორებისგან იმით, რომ ისინი არასოდეს შეიცავენ GluR2 სუბერთეულებს, რაც მათ განვლადს ხდის  $Ca^{2+}$  იონებისათვის (Burnashev et al., 1992). აგრეთვე, გლიური NMDA რეცეპტორები განსხვავდებიან ნეირონული NMDA რეცეპტორებისაგან. შესაძლებელია, რომ რადგან გლიური NMDA რეცეპტორები შეიცავენ დიდი რაოდენობით NR3 სუბერთეულებს, გლიურ NMDA რეცეპტორებს გააჩნიათ მაგნიუმის შეკავშირების სუსტი უნარი ანუ არ იბლოკებიან მაგნიუმით და შეუძლიათ იფუნქციონირონ უფრო დაბალი მემბრანული პოტენციალის შემთხვევაშიც, ვიდრე ნეირონალური NMDA რეცეპტორები (Verkhatsky and Kirchhoff, 2007).

გლიური მემბრანის რეცეპტორებს ასევე მიეკუთვნებიან GABA-ს (გამა-ამინოჰერბოს მჟავა) (Kang et al., 1998), ნორეპინეფრინების (Kulik et al., 1999), აცეტილქოლინების და ჰისტამინების (Shelton and McCarthy, 2000) რეცეპტორები. ამ რეცეპტორების არსებობა გლიური უჯრედების მემბრანაზე საშუალებას აძლევს მათ რეაგირება მოახდინონ ჭარბ ექსტრასინაფსურ ნეიროტრანსმიტერებზე (Porter and McCarthy, 1996).

გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ზოგიერთი ასტროგლიური უჯრედი, ისეთი როგორცაა NG2 - პოზიტიური უჯრედები და ნათხემში მოთავსებული ბერგმანის გლიური უჯრედები, უშუალოდ ნეირონებთან ამყარებენ სინაფსურ კავშირებს (Matsui and Jahr, 2003; Lin and Bergles, 2004; Lin and et al., 2005; Ziskin et al., 2007). NG2 უჯრედები აღმოჩენილია თავის ტვინის როგორც თეთრ, ასევე რუხ ნივთიერებაში. ისინი მსგავსნი არიან ასტროგლიური უჯრედებისა, რადგან გააჩნიათ მათი მსგავსი მორფოლოგია და შეიცავენ ასტროგლიისათვის დამახასიათებელ მარკერებს. მაგრამ, ასტროგლიისაგან განსხვავებით, NG2+ უჯრედები შეიცავენ გაცილებით მცირე რაოდენობით GFAP ცილებს (გლიური ფილამენტური მჟავე პროტეინი), მათ არ გააჩნიათ ლატერალური მორჩები და გარს არ ეკვრიან სინაფსებს (Lin and Bergles, 2002; Beierlein and Regehr, 2005). ზრდასრული ბერგმანის გლიური უჯრედები (BG) ავლენენ მეტ საერთო თვისებებს ასტროციტებთან, ვიდრე NG2+ უჯრედები, ისინი გარს ეკვრიან სინაფსებს, რომლებიც წარმოიქმნებიან პურკინიეს უჯრედების დენდრიტულ ქაცვებსა და აფერენტულ აქსონებს შორის, შეიცავენ დიდი რაოდენობით GFAP ცილებს და გააჩნიათ ლატერალური მორჩები. ეს უჯრედები აღმოჩენილია თეთრ და რუხ ნივთიერებაში, როგორც ჩამოყალიბებულ, ასევე



განვითარების სტადიაზე მყოფ ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში. ადრე მათ მიიჩნევდნენ ოლიგოდენდროციტების წინამორბედ უჯრედებად. ბოლო დროის გამოკვლევებმა, სადაც გამოყენებული იყო ტრანსგენური თაგვები, გამოავლინა, რომ NG2+ უჯრედებისაგან წარმოიქმნებიან ოლიგოდენდროციტები, პროტოპლაზმური ასტროციტები და ზოგიერთ შემთხვევაში ნეირონები (Trotter et al., 2010).

საინტერესოა გავარკვიოთ, თუ როგორ იქცევა ასტროგლია ნეირონული აქტივობის საპასუხოდ და რა გავლენას ახდენს იგი ნეირონების მორფოლოგიაზე. გლიურ უჯრედებს არ გააჩნიათ აქსონები სიგნალების გასატარებლად, მაგრამ ისინი სხვა გზებით ამყარებენ კავშირს გარშემომყოფ უჯრედებთან. გლია წარმოქმნის ხანგრძლივ უჯრედშიდა კალციუმის ტალღებს (Cornell-Bell et al., 1990; Verkhratsky et al., 1998), რაც გადაეცემა ერთი გლიური უჯრედიდან მეორეს “ნაპრაალური კონტაქტის” (gap-junction) საშუალებით. გლიურ უჯრედებს შეუძლიათ წარმოშვან კალციუმის ტალღები, როგორც ნეირონული აქტივობის საპასუხოდ, ასევე სპონტანურადაც (Beierlin and Regehr, 2006; Piet and Jahr, 2007). თუმცა, ამ სპონტანური ტალღების წარმოშობის ფუნქცია ჯერ არ არის ბოლომდე გარკვეული. ზოგიერთი მეცნიერი ვარაუდობს, რომ სპონტანური კალციუმის ტალღების წარმოქმნა დაკავშირებულია ასტროგლიის უნართან არეგულიროს ნეირიტების ზრდა (Kanemaru et al., 2007). უფრო ხანგრძლივი სიგნალის არსებობის შემთხვევაში, უჯრედშორისი Ca-ის რაოდენობის მომატებამ შეიძლება გამოიწვიოს გლიის მიერ მისი საკუთარი ნეიროტრანსმიტერების გამოთავისუფლება, როგორც არის ატფ (Cortina et al., 1998; Guthrie et al., 1999; Wang et al., 2000), D -სერინი (Snyder and Kim, 2000; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2003) და გლუტამატი (Angulo et al., 2004; Fellin et al., 2004; Fellin et al., 2006). გლიური Ca-ის რაოდენობა შეიძლება გაიზარდოს ლოკალურად, სინაფსური აქტივობის საპასუხოდ. კალციუმის იონების ასეთ ლოკალურ მატებას ადგილი აქვს იმ გლიური უჯრედების მორჩებში, რომლებიც გარს ეკვრიან აქტიურ სინაფსებს და წარმოქმნიან ე.წ. მიკროდომენებს, რომლებიც აკავშირებენ განსაზღვრულ ახლომდებარე სინაფსებს ერთმანეთთან (Grosche et al., 2002).

ისევე როგორც ნეირონულმა აქტივობამ შეიძლება გამოიწვიოს კალციუმის მომატება გლიურ უჯრედებში, თავის მხრივ გლიური უჯრედების კალციუმის სიგნალმა

შეიძლება პროვოცირება გაუკეთოს ნეირონულ აქტივაციას. როგორც უკვე აღვნიშნეთ, არსებობს ზოგიერთი მტკიცებულება იმის თაობაზე, რომ გლიური უჯრედები წარმოქმნიან “ნაპრალურ კავშირებს” ნეირონებთან (Pakhotin and Verkhatsky, 2005), რაც პოტენციურად საშუალებას აძლევს გლიურ უჯრედებს მოახდინონ ნეირონებში უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობის მოდულირება (Nedergaard, 1994). ამგვარად ექსპერიმენტულ მონაცემებზე დაყრდნობით  $Ca^{2+}$  სასიგნალო გზების მეშვეობით დამყარებული ურთიერთკავშირი ნეირონებსა და გლიურ უჯრედებს შორის მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მრავალი ისეთი ფიზიოლოგიური პროცესის კოორდინირებაში როგორცაა: სინაპტოგენეზი, სხვადასხვა უბნების სინქრონული მოქმედების აქტივაცია, მიკროცირკულაციის კონტროლი და სინაფსური ტრანსმისიის მოდულირება (Bellamy T., 2006).

იმის გამო, რომ ნეირონებსა და გლიურ უჯრედებს შორის არსებობს მაღალორგანიზებული კავშირები და გლიაში კალციუმის დონის აწევას ხშირად თან სდევს გლიური ნეიროტრანსმიტერების გამოთავისუფლება, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ გლია დიდ გავლენას ახდენს ნეირონული უჯრედების ქსელზე. თუმცა, გლიური კალციუმის გავლენა ნეირონულ სიგნალზე ჯერ კიდევ სადაო საკითხს წარმოადგენს. ფიაკოს და თანაავტორების მიერ ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ასტროციტების სელექციური სტიმულირება არ არის საკმარისი ნეირონული გლუტამატის გამოყოფისათვის (Fiacco et al., 2007).

ნეირონ-გლიურ ურთიერთობებში Notch სასიგნალო გზა თამაშობს ერთ-ერთ წამყვან მედიატორის როლს ცენტრალური ნერვული სისტემის ჩამოყალიბების დროს (Eiraku et al., 2005). DNER-I ტრანსმემბრანული ცილა, რომელიც სპეციფიკურად ექსპრესირდება პოსტმიტოზური ნეირონების სხეულებსა და დენდრიტებში, მოქმედებს როგორც DNER -ის ლიგანდი და ასრულებს მედიატორის როლს ნეირონ-გლიურ ურთიერთობებში ასტროციტოგენეზის დროს. პურკინიეს უჯრედებში DNER ცილის ექსპრესია სტიმულაციას უწევს ბერგმან გლიის მორფოლოგიის დიფერენციაციას, ანუ პურკინიეს უჯრედებში DNER ცილა მოქმედებს როგორც Notch-ის ლიგანდი და არეგულირებს ბერგმან გლიის მორფოგენეზის ნათხემის განვითარების დროს (Eiraku et al., 2005).

რადგანაც აქტიური გლიის როლი ნეირონულ ურთიერთობაში ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე გარკვეული, ჩვენ გადავწყვიტეთ სწორედ ამ კუთხით გვეწარმოებინა ჩვენი კვლევა. ჩემს ნაშრომში წარმოდგენილია ბერგმანის გლიური უჯრედების ურთიერთობა პურკინიეს უჯრედებთან, მისი როლი ამ ტიპის ნეირონების მორფოლოგიის ჩამოყალიბებაში, ბერგმანის გლიური უჯრედების განვითარების დინამიკა და მათი ლატერალური მორჩების როლი სინაპტოგენეზში.

## 2.4. ნათხემი

რადგანაც ჩვენს დისერტაციაში შესასწავლ მოდელად აღებული იყო ნათხემის ძირითადი ასტროციტები - ბერგმანის გლიური უჯრედები და ნათხემის ნეირონები - პურკინიეს უჯრედები, ჩვენ ქვემოთ მიმოვიხილავთ მათ თვისებებს.

ნათხემი არჩეული იყო როგორც მოდელი, რადგანაც აქ თითქმის თითოეული პურკინიეს უჯრედის ქაცვებზე წარმოქმნილი სინაფსი გარშემორტყმულია ბერგმანის გლიის ლატერალური მორჩით, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ გლიური უჯრედი წარმოადგენს სინაფსის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან კომპონენტს. გარდა ამისა, ნათხემი გამოირჩევა კარგად ორგანიზებული და კარგად შესწავლილი ფუნქციით.

რამონ კახალმა, პურკინიემ და გოლჯიმ პირველად აღწერეს ნათხემი მე-19 საუკუნის ბოლოს. ხოლო ეკლსმა უკვე მე-20 საუკუნეში დეტალურად შეისწავლა ნათხემის ფუნქციები (Andersen et al., 1963; Eccles et al., 1964; Eccles, 1967; Ito, 2002).

ზრდასრული ნათხემი შედგება 3 ძირითადი ნაწილისგან: ნათხემის ქერქი, თეთრი ნივთიერება და ნათხემის ბირთვი. აქსონები, რომლებიც გამოდიან და შედიან ნათხემის ქერქში წარმოქმნიან თეთრი ნივთიერების შრეს, რომელიც განლაგებულია ნათხემის ქერქის ქვეშ. ნათხემის ქერქი შედგება წილაკებისაგან და წარმოადგენს ნათხემის ზედაპირს. იგი შედგება 3 შრისაგან (პიას ზედაპირიდან ქვემოთ): მოლეკულური შრე, პურკინიეს უჯრედების შრე და გრანულარული შრე. პურკინიეს უჯრედები წარმოადგენენ ნათხემის ძირითად ნეირონებს. ისინი წარმოქმნიან მონოშრეს, ანუ მათი სხეულები ერთ დონეზეა განლაგებული თითოეულ წილაკში. ერთ-ერთი ყველაზე აღსანიშნავი თვისება PC (პურკინიეს უჯრედებისა) არის ის, რომ ისინი ბრტყელია, მაგრამ მათ კარგად აქვთ განვითარებული გვერდითი დენდრიტული ხე, სხეულიდან გამოდის ერთი დიდი დენდრიტი და შემდეგ იგი

იძლევა გვერდითა განშტოებებს და ამ დენდრიტების უმრავლესობა მიმართულია ზემოთ პიას ზედაპირისკენ მოლეკულური შრის გავლით. პურკინიეს დენდრიტები თავიანთ ქაცვებზე წარმოქმნიან უამრავ ამაგზნებელ სინაფსს.

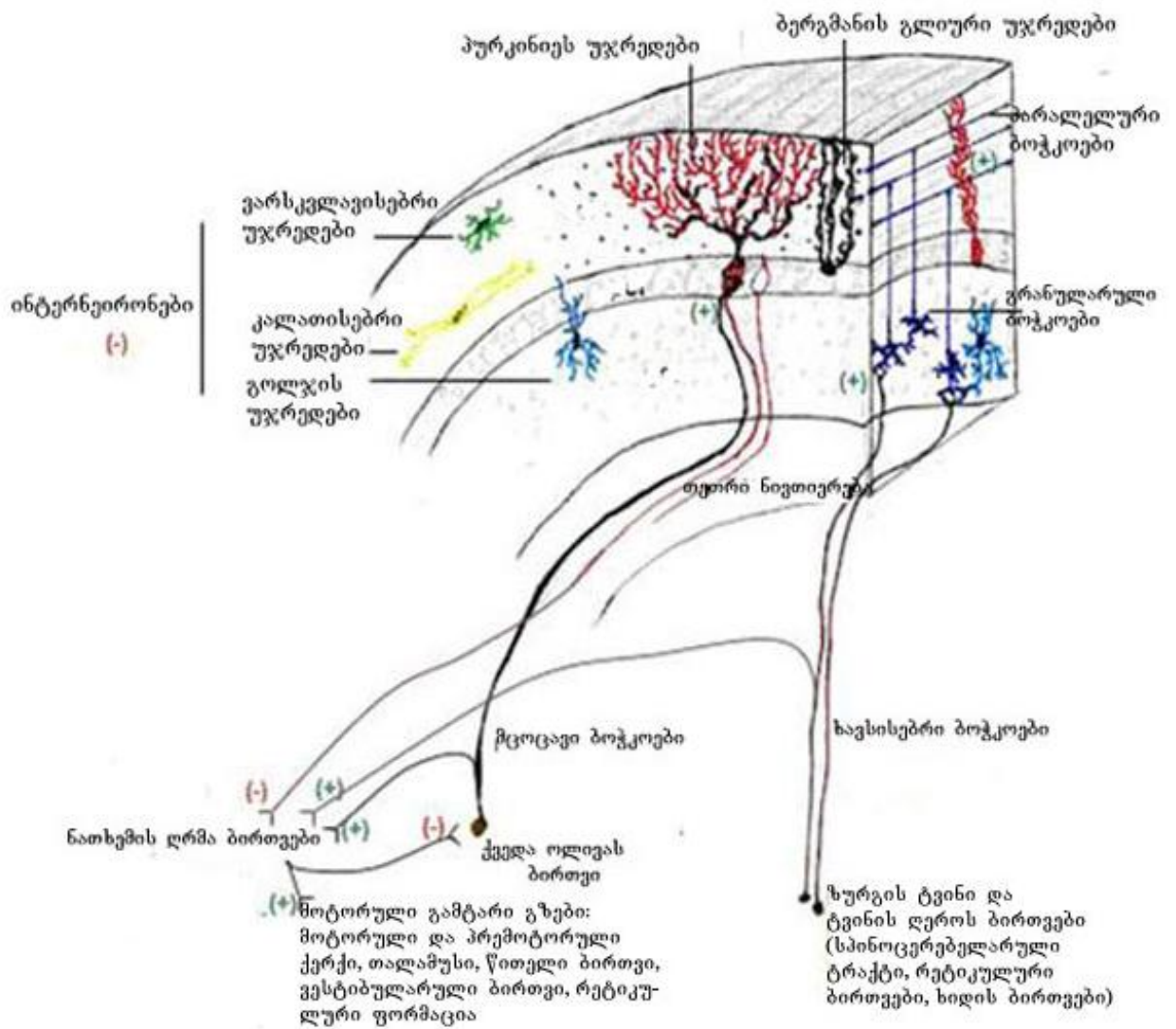
ნათხემის აგებულება თავისი შემავალი და გამომავალი გზებით განაპირობებს მის ფუნქციას. ნათხემში სიგნალი ძირითადად შემოდის ხავსისებრი და მცოცავი ბოჭკოებით (Ramon y Cajal, 1889, 1899; Palay and Chan-Dalay, 1974) (სურ. 1).

ხავსისებრი ბოჭკოების აქსონები მოემართებიან ქერქოვანი და ღეროვანი ტვინიდან (უმეტესად რეტიკულარული ფორმაცია და ხიდის ბირთვები). ისინი შემოდის ნათხემში თეთრი ნივთიერების შრეში და წარმოქმნიან სინაფსებს გრანულარულ უჯრედებზე. გრანულარული შრიდან გრანულარული უჯრედების აქსონები, ე.წ. პარალელური ბოჭკოები მიემართებიან მოლეკულურ შრეში, სადაც წარმოქმნიან ამაგზნებელ სინაფსებს პურკინიეს უჯრედების ქაცვებზე. ერთ პურკინიეს უჯრედს შეუძლია მიიღოს სიგნალი 150,000 სხვადასხვა პარალელური ბოჭკოდან. ამ ბოჭკოების აგზნება იწვევს მარტივი სპაიკების წარმოქმნას პურკინიეს უჯრედებზე.

ნათხემი აგრეთვე იღებს სიგნალს ქვედა ოლივარული ბირთვებიდან, რომლის ამაგზნებელი აქსონები მცოცავი ბოჭკოების სახით შედიან ნათხემში. ისევე როგორც ხავსისებრი ბოჭკოები, მცოცავი ბოჭკოებიც შედიან ნათხემის ქერქში თეთრი ნივთიერების შრის გავლით, მაგრამ სინაფსებს წარმოქმნიან უშუალოდ პურკინიეს უჯრედებზე. მცოცავი ბოჭკოები გარს ეკვრიან ნეირონის სომას და დენდრიტებს. ზრდასრულ ნათხემში თითოეული პურკინიეს უჯრედი უკავშირდება მხოლოდ ერთ მცოცავ ბოჭკოს. მცოცავი ბოჭკოები არ ამჟღავნებენ მაღალ სპონტანურ აქტივობას, მაგრამ როდესაც ხდება მათი აგზნება, ისინი წარმოქმნიან კომპლექსურ სპაიკებს პურკინიეს უჯრედებზე. შემომავალი სიგნალის ანატომიიდან გამომდინარე, მცოცავი ბოჭკოები მნიშვნელოვან გავლენას ახდენენ ერთეულ პურკინიეს უჯრედზე, მაშინ როდესაც პარალელური ბოჭკოებით შემოსული სიგნალი ვრცელდება ათასობით პურკინიეს უჯრედზე.

ნათხემში მაინჰიბირებელი ინტერნეირონები აწარმოებენ სიგნალების მოდულაციას პურკინიეს უჯრედებზე. ტვინის ამ უბანში ყველაზე უფრო კარგად შესწავლილი ინტერნეირონებია კალათისებრი, ვარსკვლავისებრი და გოლჯის უჯრედები. კალათისებრი და ვარსკვლავისებრი უჯრედები მოთავსებული არიან მოლეკულურ

შრეში. ისინი იღებენ იმპულსებს პარალელური ბოჭკოებისგან და წარმოქმნიან სინაფსებს პურკინიეს უჯრედებზე. კალათისებრ უჯრედებს გააჩნიათ გრძელი აქსონები და შეუძლიათ გაატარონ სიგნალები შორ მანძილებზე, ხოლო ვარსკვლავისებურ უჯრედებს კი გააჩნიათ მოკლე აქსონები, ანუ ისინი მონაწილეობენ მხოლოდ ლოკალური სიგნალების გადაცემაში. გოლჯის უჯრედების სხეულები განლაგებულია გრანულარულ შრეში.



სურ.1. ნათხემის საგიტალური ჭრილის სქემატური გამოსახულება მასში შემავალი და გამომავალი გამტარი გზებით. (+) აღნიშნავს ამაგზნებელ კავშირებს და (-) შემაკავებელ კავშირებს.

რადგანაც შემომავალი სიგნალების უმეტესობა ნათხემში თავს იყრის პურკინიეს უჯრედებზე, ნათხემიდან გამომავალი სიგნალი მიემართება ქვემოთ პურკინიეს უჯრედების აქსონების საშუალებით, გაივლის გრანულარული უჯრედების შრეს, თეთრი ნივთიერების შრეს და ჩადის ღრმად ნათხემის ბირთვებში.

ნათხემში მთავარ ასტროგლიურ უჯრედს წარმოადგენს ბერგმანის გლიური უჯრედები (BG) (Duran et al., 1975; Hatten et al., 1984; Lin et al., 2005). ეს უჯრედები განლაგებული არიან მოლეკულურ და პურკინიეს უჯრედების შრეში. პირველად მათი გრძელი რადიალური ბოჭკოები აღმოაჩინა ბერგმანმა ახალშობილი კატის ნათხემში 1857 წელს. შემდგომში გოლჯის მეთოდით შეღებვის აღმოჩენამ საშუალება მისცა მას ენახა ამ უჯრედების სხეულებიც. ბერგმანის უჯრედების სხეულები და მორჩებიც განლაგებულია პურკინიეს უჯრედების სხეულების და დენდრიტების გვერდით, ანუ ძალიან მჭიდროდ ერთმანეთთან. თითოეული პურკინიეს უჯრედი გარშემორტყმულია დაახლოებით 8 ბერგმანის გლიური უჯრედით (Reichenbach et al., 1995; Livet et al., 2007). ბერგმან გლიის როლი სიგნალების გადაცემაში ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე ცნობილი, თუმცაღა მათ შეიძლება მივაკუთვნოთ იგივე როლი, რაც სხვა ასტროგლიურ უჯრედებს. ბერგმანის გლიურ უჯრედებს გააჩნიათ ლატერალური გვერდითი გამონაზარდები, რომლებიც გარს ეკვრიან პურკინიეს უჯრედების ქაცვებზე წარმოქმნილ სინაფსებს. ამ გვერდითი გამონაზარდების შექმუხვან იწვევს პურკინიეს უჯრედების პოსტსინაფსური პასუხების ცვლილებებს და მცოცავი ბოჭკოების ინერვაციის შეცვლას (Iino et al., 2001)

ნათხემის მეშვეობით კონტროლირდება მრავალი მოტორული ფუნქცია-კოორდინაცია, კოგნიტიური ქცევები (Watanabe, 1984; Blazquez et al., 2003; Haines and Manto, 2007; Tach WT, 2007), ნათხემი მონაწილეობას იღებს მეტყველებაშიც (Gebhart et al., 2002; Frings et al., 2006).

მარმა და ალბუსმა პირველებმა გამოთქვეს ჰიპოთეზა, თუ როგორ არეგულირებს ნათხემი მოტორულ დასწავლას (Marr, 1969; Albus, 1971). მოგვიანებით, იტომ ექსპერიმენტალურად დაასაბუთა ეს ჰიპოთეზა. ხანგრძლივი დეპრესია (LTD) რომელიც სავარაუდოდ წარმოადგენს ნათხემის ძირითად მოლეკულურ მექანიზმს დასწავლის პროცესში, წარმოიქმნება მოლეკულურ შრეში, მაშინ როდესაც ხდება გრანულარული უჯრედებისა და მცოცავი ბოჭკოების თანააქტივაცია პურკინიეს

უჯრედებზე (Ito, 1989). ნათხემში, ჰიპოკამპისგან განსხვავებით, LTD – წარმოიქმნება ძლიერი სტიმულირების შედეგად. მცოცავ ბოჭკოებში სიგნალის გადაცემის გაზრდა და ამავდროულად პარალელურ ბოჭკოებში აგზნების შემცირება, უკავშირდება მოტორულ ადაპტაციას დასწავლის დროს (Gilbert and Thach, 1972). LTD ასუსტებს პარალელურ ბოჭკოებსა და პურკინიეს უჯრედებს შორის მყოფი სინაფსების სიძლიერეს, რაც შესაძლებელია არის მექანიზმი მცდარი სიგნალების წარმოშობით შეასწოროს მოტორული შეცდომები.

## 2.5. ნათხემის განვითარება

ტვინი ვითარდება ნერვული მილაკის როსტრალური ნაწილისგან, მისი კაუდალური ნაწილისგან კი წარმოიქმნება ნათხემი. ნერვული მილის ეს უბანი შემდგომში გარდაიქმნება რომბენცეფალონად ანუ უკანა ტვინად, რომლის როსტრალური ნაწილიდან ემბრიონალური განვითარების მე-9 დღეს წარმოიქმნება მეტენცეფალონი. მეტენცეფალონის დორსოლატერალურ კიდეები, რომელთაც რომბისებრი ბაგეებიანა ეწოდებათ, განაგრძობენ ზრდას მანამ, სანამ კიდეები არ შეერწყმიან ერთმანეთს და არ წარმოიქმნება ნათხემი (Hatten and Heintz, 1995; Sillitoe and Joyner, 2007). მეტენცეფალონის დანარჩენი ნაწილისაგან წარმოიქმნება ხიდი, და ნათხემსა და ხიდს შორის არსებული სითხით ამოვსებული მცირე ზომის სივრცე გარდაიქმნება მეოთხე პარაკუჭად (Bear et al., 2001)

ნათხემის ქერქის შესწავლა ჯერ კიდევ ჰესმა 1858 წელს და რამონ კახალმა 1879 წელს დაიწყო (Addison, 1911). ეს კვლევები ფოკუსირებული იყო ნათხემში აღმოჩენილ ორ ძირითად ნეირონულ ჯგუფზე - პურკინიეს უჯრედებსა და გრანულარულ უჯრედებზე. ბოლო დროის გამოკვლევებმა ნათელი მოჰფინეს ნათხემში ინტერნეირონებისა და გლიური უჯრედების ფორმირებასა და მიგრაციას.

პურკინიეს უჯრედების წინამორბედი უჯრედები თავგებში წარმოიქმნებიან ემბრიონული განვითარების მე-11-13 დღეს და პროლიფერირდებიან ვენტრიკულარულ ზონაში მე-4 პარაკუჭის მახლობლად (Mialle and Sidman, 1961). ემბრიონალური განვითარების მე-13 დღიდან თავგებში პურკინიეს უჯრედები იწყებენ მიგრაციას ნათხემის ფირფიტის მიმართულებით. პირველი პოსტნატალური კვირის ბოლოს პურკინიეს უჯრედების სხეულები აღწევენ თავიანთ საბოლოო

ადგილმდებარეობას და წარმოქმნიან მონოშრეს - პურკინიეს უჯრედების შრეს (Sanes et al., 2005).

გრანულარული უჯრედები წარმოიქმნებიან რომბოიდული ბაგეებიდან მე-4 პარკუჭის კიდის ახლოს. გრანულარული უჯრედების წინამორბედი უჯრედები მიგრირებენ ტანგენციალურად პურკინიეს უჯრედების გარშემო, რათა შემდგომში მოლეკულური შრის ზემოთ წარმოქმნან გარეთა გრანულარული შრე. უჯრედები განაგრძობენ აქტიურად დაყოფას გარეთა გრანულარულ შრეში და შემდეგ ბერგმან გლიის გასწვრივ მიგრირებენ მოლეკულური შრის გავლით შიდა გრანულარულ შრეში (Rakic, 1971; Hatten et al., 1984; Edmondson and Hatten, 1987). მიგრაციის დროს გრანულარული უჯრედების სხეულების აქსონები, ანუ პარალელური ბოჭკოები, განლაგებულნი არიან თავიანთი მიგრაციის ტრაექტორიის პერპენდიკულარულად (ორთოგონალურად პურკინიეს უჯრედების მიმართ), რის გამოც ამ აქსონებს აქვთ T-ს ფორმა. პურკინიეს და გრანულარული უჯრედები აქტიურად ურთიერთქმედებენ ერთმანეთთან განვითარების პერიოდში და ამავდროულად კავშირებს ამყარებენ ბერგმან გლიასთან. ბერგმან გლიის უჯრედები წარმოიქმნებიან ვენტრიკულარული ზონიდან. რადიალური გლიის მარკერი GLAST (გლუტამატ-ასპარტატ ტრანსპორტერი) აღმოჩენილია როგორც უჯრედის სხეულებში, ასევე რადიალურ ბოჭკოებში. ემბრიონალური განვითარების მე-13-14 დღეს რადიალური გლიის მარკერი - GLAST ნანახია როგორც უჯრედების სხეულებში, ასევე რადიალურ გამონაზარდებში, რომლებიც მიემართებიან პიას ზედაპირისაკენ. GLAST-ით მონიშვნა ნათელყოფს, რომ გლიის რადიალური გამონაზარდების დაბოლოებები კონტაქტირებენ პიასთან (Yamada and Watanabe, 2002). თავებში ბერგმან გლიის მიგრაცია ძირითადად იწყება ემბრიონული განვითარების მე-14, მე-15 დღეს, როდესაც გლიური უჯრედების სხეულები თანაბრად განლაგდებიან პურკინიეს უჯრედების სხეულების ირგვლივ. თუმცა ბერგმანის გლიური უჯრედების სხეულები იმკვიდრებენ თავიანთ ადგილს პურკინიეს უჯრედების შრეში პოსტნატალური განვითარების პირველივე კვირას, ისინი აგრძელებენ პროლიფერირებას პოსტნატალური განვითარების მეორე კვირის ბოლომდე. თავიანთი განვითარების პერიოდში ბერგმანის გლიური უჯრედები უკავშირდებიან პურკინიეს უჯრედებსა და გრანულარულ უჯრედებს და წარმოქმნიან საყრდენს ამ უჯრედების



მიგრაციისთვის. პოსტნატალური განვითარების პერიოდში, როდესაც პურკინიეს უჯრედები წარმოქმნიან სინაფსურ კონტაქტებს და გრანულარული უჯრედები განაგრძობენ მიგრაციას, ბერგმანის გლიური უჯრედები ხელს უწყობენ გრანულარული უჯრედების მიგრაციის მიმართულების განსაზღვრას და ამავდროულად, კონტაქტებს ამყარებენ პურკინიეს უჯრედებზე ახლადწარმოქმნილ სინაფსებთან (Yamada et al., 2000).

სინაპტოგენეზი მოლეკულურ შრეში იწყება პოსტნატალური განვითარების მეორე კვირის მე-7 დღიდან. ამ დროისთვის მიმდინარეობს პურკინიეს უჯრედების ზრდა და მათი დენდრიტული ხის ჩამოყალიბება. დენდრიტების ზრდასთან ერთად მათზე წარმოიქმნება დენდრიტული გამონაზარდები - ქაცვები. განვითარების ადრეულ სტადიაზე ქაცვები ძალიან მოძრავნი არიან. ისინი მოძრაობენ ლატერალურად, იზრდებიან სიგრძეში და აგრეთვე განიცდიან რეტრაქციას (Dunaevsky et al., 1999). საინტერესოა, რომ პრესინაფსური ტერმინალები არ ავლენენ ასეთი დონის მოძრაობის უნარს, ისინი თითქმის უმოძრაოდ არიან (Deng and Dunaevsky, 2005). ქაცვების დინამიური მოქმედება განისაზღვრება F-აქტინის პოლიმერიზაციით (Fischer et al., 1998) და სავარაუდოა, რომ იგი ხელს უწყობს უჯრედს მოძებნოს პრესინაფსური პარტნიორი, რადგანაც ქაცვების მობილურობა მნიშვნელოვნად მცირდება სინაპტოგენეზის ბოლოს (Ziv and Smith, 1996; Dunaevsky et al., 1999). როდესაც ქაცვი საბოლოოდ უკავშირდება პრესინაფსურ პარტნიორს, იგი ფაქტიურად უმოძრაო ხდება (Dunaevsky et al., 2001) აქტიური პრესინაფსური ტერმინალის არსებობის შემთხვევაშიც კი (Deng and Dunaevsky, 2005) ქაცვების დინამიურობის ასეთი შემცირება დღემდე აუხსნელია.

მოლეკულურ შრეში მხოლოდ პურკინიეს უჯრედები არ მონაწილეობენ სინაპტოგენეზში. პოსტნატალური განვითარების მეორე კვირიდან ბერგმანის გლიის ლატერალური ღერძიდან მცირე ზომის ლატერალური გამონაზარდები იწყებენ განვითარებას და ისინი აგრძელებენ ზრდას პოსტნატალური განვითარების მე-2 და მე-3 კვირის განმავლობაში. პოსტნატალური განვითარების 21-ე დღეს ბერგმანის გლიური უჯრედები რადიალური გლიიდან გარდაიქმნებიან წაგრძელებული ფორმის მქონე ასტროციტებად (Yamada and Watanabe, 2002). ბერგმანის გლიის მცირე ზომის ლატერალური გამონაზარდები გარს ეკვრიან სინაფსებს პოსტსინაფსური

ზონის მხრიდან და თითქმის მთლიანად ფარავენ მათ. ერთ-ერთ ყველაზე მნიშვნელოვან ფაქტს პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმანის გლიის ურთიერთობებს შორის, წარმოადგენს ის, რომ თითქმის ყველა სინაფსი პურკინიეს უჯრედების ქაცვებზე გარშემორტყმულია ბერგმანის გლიის ლატერალური გამონაზარდებით და ისინი ზრდასრულ ტვინში თითქმის მთლიანად ფარავენ სინაფსებს (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970; Spacek, 1985; Ventura and Harris, 1999).

## 2.6. პურკინიეს უჯრედები

ყოველ ნეირონს გააჩნია მისთვის დამახასიათებელი მორფოლოგია, რაც განაპირობებს მის ფუნქციას. არსებობს მთელი რიგი მტკიცებულებებისა, რომ უჯრედის მორფოლოგია რეგულირდება როგორც შინაგანი, ასევე გარეგანი ფაქტორებით (Voyvodic, 1989; Gao et al., 2000; Jan and Jan, 2000; Niell et al., 2004; Ye et al., 2004).

ზრდასრულ ნათხემში პურკინიეს უჯრედებს გააჩნიათ ერთი ძირითადი დენდრიტი, რომელიც მიმართულია პიას ზედაპირისკენ, ხოლო მისი გვერდითი განშტოებები კი განლაგებულია მოლეკულურ შრეში (Palay and Chan Palay, 1974). მოლეკულური შრის დონეზე პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები კონტაქტირებენ გრანულარული უჯრედების მრავალრიცხოვან აქსონებთან და წარმოქმნიან სინაფსებს. კერძოდ, ეს სინაფსები წარმოიქმნიან დენდრიტულ ქაცვებზე. თუმცა გრანულარული უჯრედების ტროფიკული როლი პურკინიეს დენდრიტების ზრდაზე კარგად არის შესწავლილი (Rakic, 1971; Sotelo, 1982; Morrison and Mason, 1998; Baptista et al., 1994), არაფერია ცნობილი იმის შესახებ, თუ რა როლს ასრულებენ გრანულარული უჯრედები პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული ზრდის მიმართულების მიცემაში. პურკინიეს უჯრედები დისოცირებულ კულტურაში (სადაც არ არის არცერთი გლიური უჯრედი) წარმოქმნიან კარგად განვითარებულ, დატოტვილ დენდრიტულ ხეს, მაგრამ კარგავენ თავიანთ პოლარობას და მათთვის დამახასიათებელი ფორმა არ არის შენარჩუნებული (Baptista et al., 1994), რაც საშუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ არსებობს რაღაც გარეგანი ფაქტორები, რომელიც განსაზღვრავს პურკინიეს უჯრედების ფორმას.

ბოლო წლების გამოკვლევებმა ცხადყო მჭიდრო კავშირი პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმანის გლიას შორის, კერძოდ ის, რომ ბერგმანის გლია არის მნიშვნელოვანი

ფაქტორი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების მორფოგენეზისთვის. კერძოდ, მულტიპოლარულ დენდრიტიდან უნიპოლარულ დენდრიტად ტრანსფორმირება ხორციელდება გლიური გლუტამატური ტრანსპორტიორის GLAST-ის საშუალებით (Tanaka et al., 2003). ამას გარდა, შესწავლილი იყო ურთიერთკავშირი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტულ დაბოლოებებსა და ბერგმანის გლიური უჯრედების გამონაზარდებს შორის. კვლევის საფუძველზე გამოითქვა ვარაუდი, რომ გლიური უჯრედების გვერდითი გამონაზარდები ახდენენ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ზრდის მოდულაციას პიას ზედაპირის მიმართულებით.

უახლესი მონაცემების თანახმად, ბერგმან გლია მნიშვნელოვნად აძლიერებს დენდრიტოგენეზის პროცესს ნათხემში. კერძოდ, ცდებში სადაც აღებული იყო პურკინიეს უჯრედოვანი კულტურა გლიის გარეშე, პურკინიეს უჯრედები ხასიათდებოდნენ ამაგზნებელი და შემაკავებელი სინაფსური აქტივობის დაბალი მაჩვენებლით. ხოლო ამ კულტურაზე გლიური უჯრედების დამატებამ გააუმჯობესა დენდრიტული ნეირიტების ზრდის და დატოტიანების პროცესი და გაზარდა სპონტანური ამაგზნებელი სინაფსური ნაკადის სიხშირე და სიდიდე. ამავე ავტორების მიერ დადგენილ იქნა, რომ პურკინიეს უჯრედების სინაფსური აქტივობის გასაუმჯობესებლად აუცილებელია გლიური უჯრედების ფიზიკური არსებობა მათ გვერდით. ანუ გლიური უჯრედები ხელს უწყობენ სინაპტოგენეზის პროცესს სპეციფიურ ნეირონულ უჯრედებში (Buard et al., 2010).

## სამუშაოს მიზანი

თავში “ლიტერატურის მიმოხილვა“ მოყვანილი მონაცემებიდან გამომდინარე ჩემი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა: 1. დამედგინა ბერგმანის გლიური უჯრედების როლი პურკინიეს უჯრედების მორფოლოგიის ჩამოყალიბებაში და 2. შემესწავლა თუ რა ფუნქციები აკისრია ბერგმანის გლიურ უჯრედებს ნათხემში სინაპტოგენეზის პროცესში. ამ მიზნის განსახორციელებლად დაგეგმილი იყო შემდეგი ამოცანები:

**ამოცანა 1.** შემესწავლა და დამედგინა ნათხემში პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმანის გლიურ უჯრედებს შორის არსებული კავშირები. კერძოდ, გამომეკვლია განსაზღვრავს და არის თუ არა ბერგმანის გლიური უჯრედები პურკინიეს უჯრედების მიმართულების მიმცემი, ანუ იყენებენ თუ არა პურკინიეს ნეირონები ბერგმანის გლიას, როგორც საყრდენ სუბსტრატს თავიანთი განვითარების პროცესში.

**ამოცანა 2.** დეტალურად შემესწავლა ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების ფუნქციები სინაპტოგენეზში პოსტნატალური განვითარების ადრეულ და გვიან სტადიებზე. კერძოდ, რა როლს ასრულებენ ბერგმანის გლიური გამონაზარდები სინაფსების სტაბილურობაზე და მათ რაოდენობაზე.

**ამოცანა 3.** რა გავლენას ახდენს გლიური უჯრედების ციტოჩონჩხის შეცვლა პურკინიეს უჯრედების მორფოლოგიასა და სინაპტოგენეზზე.

### თავი III. მასალა და მეთოდები

**3.1. ცხოველები.** ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო სამი ხაზის თავგები:

1. C57/BL-6 თავგები ჩარლზ რივერის ლაბორატორიებიდან. 2. FVB/N-TgN (GFAP-GFP) თავგები, სადაც ყველა ასტროგლიური უჯრედი მონიშნული იყო მწვანე ფლუორესცენტული ცილით (GFP). 3. Tg (PCP2-cre)137Gsat თავგები EGFP-ვექტორით მონიშნული პურკინიეს უჯრედებით.

ცხოველებზე ჩატარებულ ყველა ექსპერიმენტში დაცული იყო ბრაუნის უნივერსიტეტის (აშშ) ცხოველთა მოვლისა და დაცვის კომიტეტის მოთხოვნები.

**3.2. ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების მომზადება და უჯრედების მონიშვნა.**

P11-P12 ასაკის თავგები სედატირებულები იყვნენ ჰიპოთერმიის გამოყენებით, ხოლო P13-P25 ასაკის თავგების ანესთეზია ხდებოდა კეტამინ/დორმიტორით (70მგ/კგ 0.5მგ/კგ). დეკაპიტაციის შემდეგ ვილებდით ნათხემს და 300-350 მკმ-იანი ანათლები მზადდებოდა “McIlwain tissue chopper”-ზე ან ვიბრატომზე. შემდეგ ანათლები ირეცხებოდა CMF-PBS-ის ხსნარში და თავსდებოდა MF-Millipore მემბრანებზე საკვებ არეში, რომელიც შეიცავდა 10%-ან ცხენის შრატს და BME-ს, რის შემდეგაც 3-4 დღით ანათლების კულტივირება ხდებოდა 5%-ან CO<sub>2</sub> 37°C ინკუბატორში. ანათლების ტრანსფექცია (transfection) ხდებოდა 24სთ-ის შემდეგ ბიოლისტური ტყვიებით - ერთ მიკრონიანი ოქროს ნაწილაკებით, რომლებიც დაფარული იყო CMV-DsRed2 ან EGFP ვექტორებით. ანათლების დათვლიერება წარმოებდა 48-72 საათის შემდეგ.

**3.3. ცოცხალი ანათლები.** ვირალური ადენოვექტორის შეყვანიდან 48-72 საათის გასვლის შემდეგ ცოცხალი ანათლები მზადდებოდა ვიბრატომზე. ანათლები თავსდებოდა MF-Millipore მემბრანებზე და მათი ინკუბირება 20 წუთით ხდებოდა 37°C 5%-ან CO<sub>2</sub> ინკუბატორში, რის შემდეგაც ცოცხალი უჯრედების გადაღება წარმოებდა დროის განსაზღვრულ მონაკვეთში მულტიფოტონიან ლაზერულ მასკანირებელ მიკროსკოპში (Radiance,200,BioRad ,NikonE-600FN).

**3.4. ადენოვირუსის შექმნა.** ყველა ადენოვირუსი - Rac1, dn-Rac1,CMV-tdTomato და CMV-GluR2/tdTomato მოწოდებული იყო სანგ ოკ უნის მიერ ოჰაიოს უნივერსიტეტიდან. Rac1, dn-Rac1 და GluR2 კლონირებულები იყვნენ გადამტან ვექტორში

(pAdTrack-CMV). ეს პლაზმიდი რეკომბინირებული იყო ადენოვირუსის ძირითად პლაზმიდთან - pAdEasy-1-თან. ეს რეკომბინირებული პლაზმიდი შემდგომში შეყვანილი იყო 293 უჯრედებში, სადაც ხდებოდა ამ ვირუსის გამრავლება. ამის შემდეგ ხდებოდა ვირუსის გაწმენდა “Adeno-X Virus Mini Purification Kit ”-ის საშუალებით (Clontech, Mountain View, CA).

**3.5. ინტაქტურ ცხოველებში ბერგმან გლიის მონიშვნა ვირუსის საშუალებით:** P11-P12 და P23-P24 თაგვები ანესთეზიის შემდეგ მოთავსებულები იყვნენ სტერეოტაქსის აპარატში. ღრმა ანესთეზიის ქვეშ მათ თავის ქალაზე უკეთდებოდა მცირე ზომის ხვრელი ნათხემის ჭიის ადგილას. შუშის ელექტროდით, რომელიც შევსებული იყო ზემოთ ჩამოთვლილი ადენოვირუსული ვექტორებით, შევდიოდით ნათხემის ჭიაში 100-700 მკმ სიღრმეზე. პიკოშპრიცერის გამოყენებით ნათხემში შეგვყავდა ადენო-ვირუსი 0.2-0.4 მკლ-ის ოდენობით 15 წუთის განმავლობაში. ამის შემდეგ ჭრილობას ვკრავდით და ვაყოვნებდით 2-3 დღეს ვირუსის სრული ექპრესიისათვის.

**3.6. დროის გარკვეულ მონაკვეთში ცოცხალი ანათლების გადაღება და მიღებული გამოსახულებების ანალიზი.** ცოცხალი ანათლების გადაღება წარმოებდა მულტიფოტონიან ლაზერულ-მასკანირებელ მიკროსკოპზე (Radiance,200; BioRad; NikonE-600FN). მაღალი გარჩევადობისთვის ვიყენებდით წყლის ობიექტივს X60, NA.1. ანათალი, რომელიც მოთავსებული იყო MF-Millipore მემბრანებზე, თავსდებოდა მიკროსკოპის კამერაში, სადაც ხდებოდა ამ ანათლის პერფორირება ჟანგბადით გამდიდრებული ხელოვნური თავზურგტვინის (ACSF) სითხით 35-37°C ტემპერატურის შენარჩუნებით. უჯრედების გამოსახულების გადაღება ხდებოდა ყოველ 30 წამში 15-30 წთ-ის განმავლობაში. დიგიტალური გადაღება იყო 1-3-5 შერჩევითად (პიქსელის ზომა 0.08X0.08µm.) სკანირების თითოეულ მონაკვეთში ვიღებდით უჯრედის შრეობრივ გამოსახულებას 3-5-7 ფოკალურ სიბრტყეში. ამ სიბრტყეებს შორის მანძილი იყო 0.5µm. გარდა ამისა, ვახდენდით უფრო ვრცელ შრეობრივ Z განზომილებაში უჯრედის გადაღებას 5-10 µm სიღრმეზე, რათა მიგველო უჯრედის სრული სურათი.

**3.7. ნივთიერებებით ზემოქმედება.** სახამ ნივთიერებებით ვიმოქმედებდით, ჩვენ ნათხემის ანათლების კულტურას, აღებულს P11-P12 თაგვებიდან, ვათავსებდით

მულტიფოტონიან ლაზერულ მასკანირებელი მიკროსკოპის ქვეშ და ცოცხალი უჯრედების გადაღებას ვაწარმოებდით 15 წუთის განმავლობაში ზემოთ აღწერილი პირობების დაცვით. შემდეგ ხელოვნურ თავზურგტვინის სითხეს ვამატებდით სასურველ ნივთიერებას და კვლავ ვიღებდით იგივე უჯრედს ყოველ 30 წამში 30 წუთის განმავლობაში, რომელიც გადაღებული გვექონდა ნივთიერების მოქმედებამდე. ექსპერიმენტებისთვის გამოყენებული იყო შემდეგი ნივთიერებები: ციტოკალაზინ D (1  $\mu\text{g/ml}$ , რომელიც დამატებული იყო ACSF-ზე უჯრედის სკანირების დაწყებამდე 20 წუთით ადრე), კოფეინი (1-2 mM), PPADS(25 $\mu\text{M}$ ).

**3.8. იმუნოციტოქიმია** P11- P14 და P24-P25 თაგვების პერფუზია ხდებოდა 4%-იანი პარაფორმალდეჰიდით. შემდგომი ფიქსაციისთვის ტვინს მთელი ღამით ვათავსებდით 4°C -ზე 4%-იან პარაფორმალდეჰიდში და შემდეგ გადაგვექონდა 30%-იან საქაროზაში (1-2 დღით). ამის შემდეგ ტვინის ქსოვილს ვათავსებდით OCT-ში და დაჭრამდე ვინახავდით -80°C-ზე. ტვინს ვჭრიდით 45 $\mu\text{m}$ -იან ანათლებად კრიოსტატზე (Leica). ანათლებს ვათავსებდით PBS-ში, შემდეგ გადაგვექონდა მახლოკირებელ ხსნარში (10% NGS და 0.1% Triton PBS-ში) 1 საათით ოთახის ტემპერატურის პირობებში. შემდეგ ანათლებს პირველად ვამატებდით ანტისხეულებს: s100 $\beta$  (Sigma, 1:250), კალბინდინი (SWANT, 1:400) და VGlutT1 (Chemicon, 1:500). პირველადი ანტისხეულების გამხსნელად გამოყენებული იყო 1%-იანი NGS და 0.1% Triton PBS ში. ანათლებს პირველადი ანტისხეულით ვტოვებდით მთელი ღამით 4°C-ზე. მეორე დღეს ანათლებს 3-ჯერ ვრეცხავდით PBS-ში, ვამატებდით მეორად ანტისხეულს (Alexa Fluor 488, 568, 594 an 647; Molecular Probes/Invitrogen, 1:500) და 1 საათი ვაჩერებდით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ანათლებს კვლავ 3-ჯერ ვრეცხავდით PBS-ში, ვათავსებდით სასაგნე მინებზე და ვვარავდით Vectashield-ის ფლუორესცენტული ჩამაყალიბებელი არით.

**3.9. ელექტრონული მიკროსკოპია:** P11-P12-P24 ასაკის თაგვებს უტარდებოდათ პერფუზია 2.5%-იანი გლუტარალდეჰიდისა და 2.5% პარაფორმალდეჰიდის ხსნარით. ნათხემის 75 მიკრონიან ანათლებს ვჭრიდით ვიბრატომზე. GFP ან TdTomato ადენოვირუსით მონიშნულ ანათლებს ზოგ შემთხვევაში ვათავსებდით მახლო-კირებელ ხსნარში 1 საათით (არასპეციფიური კავშირების დაბლოკვის მიზნით).

მაბლოკირებელი ხსნარი შეიცავდა 10%-იან NGS, 0.1%-იან TrionX-100 PBS-ში. ამის შემდეგ ანათლები გადაგვექონდა პირველადი ანტისხეულის ხსნარში - პოლიკლონალური ანტი-GFP ან RFP (Molecular Probes) და ვტოვებდით მთელი ღამით 4°C ტემპერატურაზე. მეორე დღეს ანათლები ირეცხებოდა 3-ჯერ PBS-ში და შემდეგ თავსდებოდა HRP მეორად ანტისხეულში 1 საათით ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ანათლებს ვამატებდით დიამინობენზიდინის (DAB, 0.15%), წყალბადის ზეჟანგისა და ტრის ბუფერის (Tris Buffer) ნარევის 2-3 წუთით მანამ, სანამ GFP-ით ან TdTomato-ით მონიშნული უჯრედები არ გახდებოდნენ ხილულნი მიკროსკოპში. შემდეგ ანათლებს ვაფიქსირებდით ოსმიუმში, ვახდენდით მათ დეჰიდრატაციას და ვაყალიბებდით ეპონში. ჩაყალიბების შემდეგ ულტრატომზე ვჭრიდით 10 მიკრონიან ანათლებს, ამათგან ვარჩევდით ჩვენთვის სასურველ ანათლებს (სადაც კარგად იყო მონიშნული საჭირო უბანი) და კვლავ ვჭრიდით ულტრათხელ ანათლებად 70-80ნმ. ანათლები იღებებოდა ურანილ აცეტატში და ტყვიის ციტრატში, რის შემდეგაც ხდებოდა მათი გადაღება ტრანსმისიულ ელექტრონულ მიკროსკოპზე (Phillips 410 TEM).

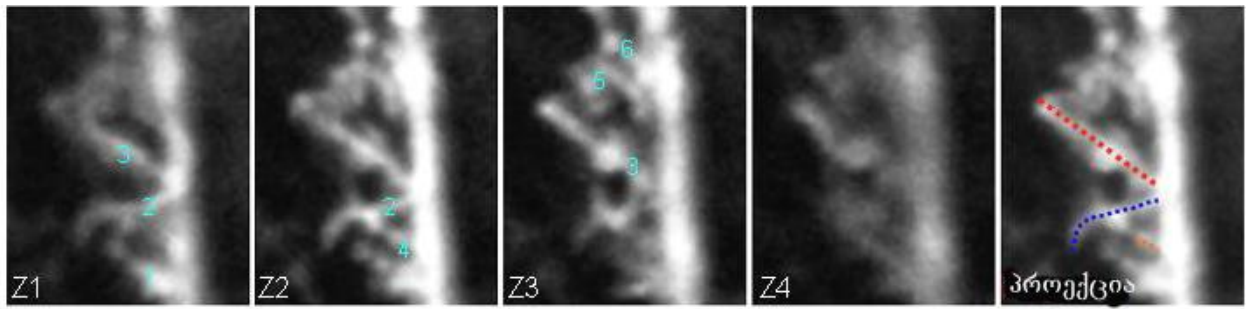
***3.10. გლიური მორჩების მორფოლოგიის ანალიზი.*** ამ ანალიზისათვის ჩვენ გავზომეთ 2-3 უჯრედი თითოეული ცხოველიდან, თითოეული შემთხვევისთვის აღებული იყო 5 ცხოველი. მონაცემების განხილვა და ანალიზი ხდებოდა macros -პროგრამით ImageJ და NIH/Scion Image. ყველა უჯრედის გამოსახულების ანალიზი ხდებოდა ისე, რომ არ იყო წინასწარ ცნობილი, თუ რომელი უჯრედის ანალიზს ვახდენდით: ნორმის თუ ექსპერიმენტის. გამოყენებული იყო შემდეგი მეთოდები:

***3.10.1. გლიური მორჩების განლაგების სიმჭიდროვე.*** ვითვლიდით ლატერალური გლიური მორჩების რაოდენობას გლიური რადიალური მორჩის 10µm-იან მონაკვეთზე. ლატერალური მორჩის სიგრძეს ვზომავდით მისი გამოსვლის ადგილიდან, გლიის რადიალური მორჩიდან მის წვერომდე (სურ.2). ყველა ეს გაზომვები ტარდებოდა უჯრედის 7 სხვადასხვა მხედველობის არეში, Z განზომილებაში მიღებული გამოსახულებების პროექციებზე თუ ლატერალური მორჩი იტოტებოდა, ვიღებდით ანათლებს მისი გამოსავალი წერტილიდან ლატერალური მორჩის ძირითადი განშტოების ბოლომდე. ჩვენ არ ვზომავდით ლატერალური მორჩების განშტოებებს.



3.10.2. ლატერალური მორჩების ზედაპირის ფართობის ინდექსი: ვიღებდით რა გლიური უჯრედის რადიალური მორჩის ინდივიდუალურ გამოსახულებას (7 სხვადასხვა მხედველობის არე Z განზომილებაში), ImageJ-ს საშუალებით ვაწარმოებდით პროექციული გამოსახულების მიღებას და შემდეგ ვახდენდით ამ სურათის ბინარიზებას. ყველა პიქსელი უჯრედის სომისა და რადიალური მორჩის შიგნით დიგიტალურად იყო წაშლილი, პიქსელები დარჩენილი იყო მხოლოდ ლატერალური მორჩებში. ზედაპირის ფართობის ინდექსი განისაზღვრებოდა შავი პიქსელების რაოდენობით. ეს მონაცემი საშუალებას გვაძლევდა დაგვედგინა იმ ზედაპირის სიდიდე, რომელსაც იკავებს ლატერალური გლიური მორჩი დასაწყისიდან ბოლომდე. ამ გაზომვებისათვის ვიყენებდით მხოლოდ ბიოლისტური ტყვიებით მონიშნულ უჯრედებს, რადგან ასეთი მონიშვნის დროს ინდივიდუალური უჯრედების იდენტიფიცირება გაცილებით უფრო ადვილია.

3.10.3 გლიური მორჩების მორფოლოგიური დახასიათება: გლიური მორჩები დაყოფილი იყო 4 ძირითად კატეგორიად: ნათურისმაგვარი, მათ გააჩნიათ დიდი დიამეტრის მომრგვალო ან ოვალური თავი, რომელიც რადიალურ მორჩთან მიმაგრებულია მოკლე ფეხით; მოკლე - მსხვილი მორჩი, რომლის სიგრძე დაახლოებით 2 მიკრონია; წვრილი მორჩები, რომლებიც წარმოადგენენ 2-დან 10 მიკრონამდე სიგრძის გამონაზარდებს და არ გააჩნიათ დატოტიანება; დატოტვილი მორჩები, რომელთაც გააჩნიათ მრავალი განშტოება, მაგრამ კარგად აქვთ გამოხატული ძირითადი მთავარი ღერძი.

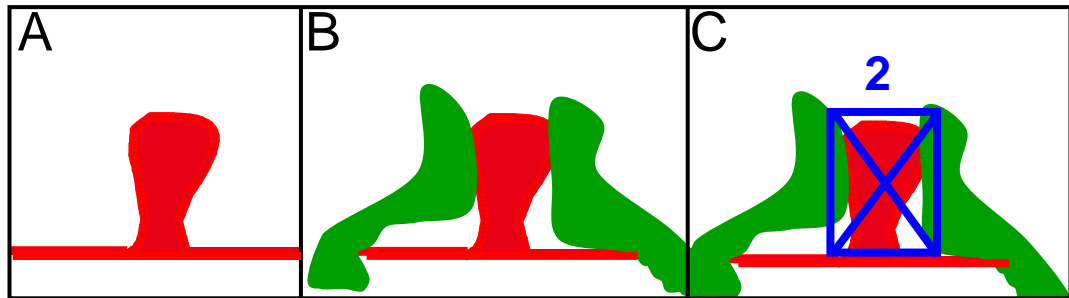


**სურ.2. გლიური მორჩების მორფოლოგიის გაზომვა.** გლიური მორჩების სიმჭიდროვის დასადგენად, 4 სხვადასხვა მხედველობის არეში (Z1-Z4) დათვლილი მორჩების რაოდენობა იყოფოდა მორჩის სიგრძეზე. ციფრებით აღნიშნულია ცალკეული მორჩები. ლატერალური მორჩის სიგრძე იზომებოდა სხვადასხვა მხედველობის არეში გადაღებული გამოსახულების პროექციებზე, მისი გამოსვლის ადგილიდან, გლიის რადიალური მორჩიდან, მის წვერომდე. პროექციის სურათზე ცისფერი წერტილებით გამოსახულია მე-2 მორჩის, წითლით მე-3 მორჩის და ნარინჯისფერით მე-4 მორჩის პროექციების სიგრძეები.

### **3.11. გლიური შემოგარსვის განსაზღვრა:**

**3.11.1. სინათლის მიკროსკოპული ანალიზი.** იმისათვის, რომ გაგვესაზღვრა გლიური უჯრედების შემოგარსვის სიდიდე, ჩვენ P12 და P24 ასაკის თაგვების ნათხემის ანათლები, რომლებშიც შეყვანილი იყო GFP, GFP-dn-Rac1, tdTomato, tdTomato-GluR2 ადენოვირუსი, შევღებეთ იმუნოციტოქიმიურად პურკინიეს უჯრედების მარკერით - კალბინდინით (SWANT, 1:400, 1:500). იდენტიფიცირება მოვახდინეთ კალბინდინით მონიშნული დენდრიტული ქაცვის, შემდეგ ქაცვი ჩავსვით ოთხკუთხედში, რომელიც თავის მხრივ იყოფოდა 4 ნაწილად (მეოთხედებად) და ვითვლიდით ქაცვის რამდენი მეოთხედი (სექტორი) იყო კონტაქტში ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩებთან (სურ.3). კალბინდინით მონიშნული დენდრიტული ქაცვები და GFP-ით ან tdTomato-ით მონიშნული ბერგმანის გლიური უჯრედები აღიქმებოდა როგორც მჭიდრო ურთიერთკავშირში მყოფნი, თუ ერთი და იგივე მხედველობის არეში: 1) მწვანე გლიურ პიქსელებსა და წითელ დენდრიტული ქაცვების პიქსელებს შორის არ იყო სხვა ფერის პიქსელები ან 2) მწვანე გლიურ პიქსელებსა და წითელ დენდრიტულ პიქსელებს შორის იყო გადაფარვა სულ მცირე ერთ მხედველობის არეში მაინც. რადგანაც ადენოვირუსის შეყვანის დროს უნდა ვიგულისხმოთ, რომ არ ხდება უკლებლივ ყველა გლიური უჯრედის მონიშვნა, ჩვენ ვაწარმოებდით მხოლოდ იმ

დენდრიტული ქაცვების ანალიზს, რომლებიც იმყოფებოდნენ GFP-ით მონიშნულ ბერგმანის გლიურ უჯრედებთან კონტაქტში.

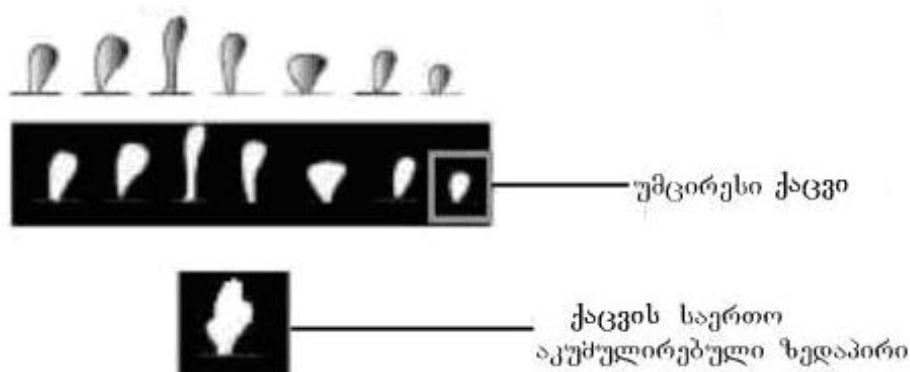


**სურ.3. გლიური შემოგარსვის გაზომვა.** გლიური შემოგარსვის გასაზომად კალბინდინით მონიშნული დენდრიტული ქაცვი (წითელი) ჩავსვით ოთხკუთხედში, რომელიც თავის მხრივ იყოფოდა მეოთხედებად (სექტორებად) და ვითვლიდით ბერგმანის გლიურ მორჩებთან (მწვანე) კონტაქტში მყოფ მეოთხედების რაოდენობას.

**3.11.2. ულტრასტრუქტურული ანალიზი:** P12 და P24 ასაკის თაგვების 80ნმ-იანი ანათლების ანალიზი ტარდებოდა 10400X გადიდებაზე გადაღებულ ელექტრონოგრაფებზე. ჩვენ ვზომავდით 2 მონაცემს: 1) დენდრიტული ქაცვის იმ ზედაპირის გარშემოწერილობას, რომელიც არ არის კონტაქტში პრესინაფსურ ტერმინალთან - S1 სიდიდე 2) დენდრიტული ქაცვის გარშემოწერილობა, რომელიც კონტაქტში იმყოფება გლიურ მორჩთან - S2 სიდიდე. ამ ორი სიდიდის შეფარდებით S2/S1 ვსაზღვრავდით გლიურ შემოგარსვას.

**3.12. გლიური უჯრედების მორჩების დინამიკის განსაზღვრა:** ქაცვებისა და გლიური მორჩების ძვრადობის დადგენა ხდებოდა “ძვრადობის ინდექსის” გამოანგარიშებით (Dunaevsky et al., 1999) (სურ.4). კერძოდ, ძვრადობის ინდექსი გამოხატავს ქაცვის, მორჩის მდებარეობის შეცვლას. თავდაპირველად, ჩვენ ვზომავდით ქაცვის, მორჩის ზედაპირის გარშემოწერილობას 7 სხვადასხვა მხედველობის არეში. შემდეგ ქაცვის, გლიური მორჩის საერთო აკუმულირებულ ზედაპირს ვაკლებდით უმცირესი ქაცვის, მორჩის ზედაპირის გარშემოწერილობას და მიღებულ სიდიდეს ვყოფდით ქაცვის, მორჩის საშუალო გარშემოწერილობაზე.

$$\text{ძვრადობის ინდექსი} = \frac{\text{ქაცვის საერთო აკუმულირებული ზედაპირი - უმცირესი ქაცვის ზედაპირი}}{\text{ქაცვის საშუალო ზედაპირი}}$$



სურ.4. დენდრიტული ქაცვის ან გლიური მორჩის ძვრადობის გამომანგარიშება.

**3.13. სინაფსების რიცხვის განსაზღვრა:** GFP, dn-Rac1/GFP, tdTomato, GluR2/tdTomato ადენოვირუსს შეყვანილი თავგების ფიქსირებული ტვინიდან გამზადებით ანათლებს ზემოთ აღწერილი მეთოდით. ანათლებს ვლუბავდით კალბინდინით (პურკინიეს უჯრედების ვიზუალიზაციისათვის) და VGlut1-ით (პრესინაფსის ვიზუალიზაციისათვის). უჯრედების გადაღებას ვაწარმოებდით Zeiss კონფოკალურ მიკროსკოპზე. Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) პროგრამის გამოყენებით მიღებულ გამოსახულებებს ვახარისხებდით ფერების მიხედვით (წითელი - პურკინიეს უჯრედები, მწვანე - ბერგმან გლია, ცისფერი - სინაფსური წერტილები) და შემდეგ თითოეული სურათი გადაგვყავდა შავ-თეთრ გამოსახულებში. VGlut1 სიგნალს ვატარებდით დაბალი განვლადობის ფილტრში. პროექცირებულ სურათზე, რომელიც შედგებოდა 9-11 თანამიმდევრული სხვადასხვა მხედველობის არეში (Z განზომილებაში) სკანირებული გამოსახულებისაგან, თითოეული მხედველობის არე ერთმანეთისაგან დაცილებული იყო  $4\mu\text{m}$ -ით, ჩვენ შევქმენით 2 ურთიერთარაგადამფარავი მხედველობითი ოთხკუთხედი ( $250 \times 350$  და  $250 \times 300$  პიქსელი, შესაბამისი მოცულობებით  $600-875\mu\text{m}^3$ ) და ვითვლიდით სინაფსური წერტილების რაოდენობას თითოეულ ოთხკუთხედში მხოლოდ იმ მხედველობით დონეზე, როდესაც იგი პირველად ჩნდებოდა. მოცულობის მიმართ მონაცემების ნორმალიზაციისათვის ჩვენ

ვყოფდით სინაფსური წერტილების რაოდენობას მხედველობითი არის მოცულობაზე, რომელშიც ეს წერტილები იყო დათვლილი.

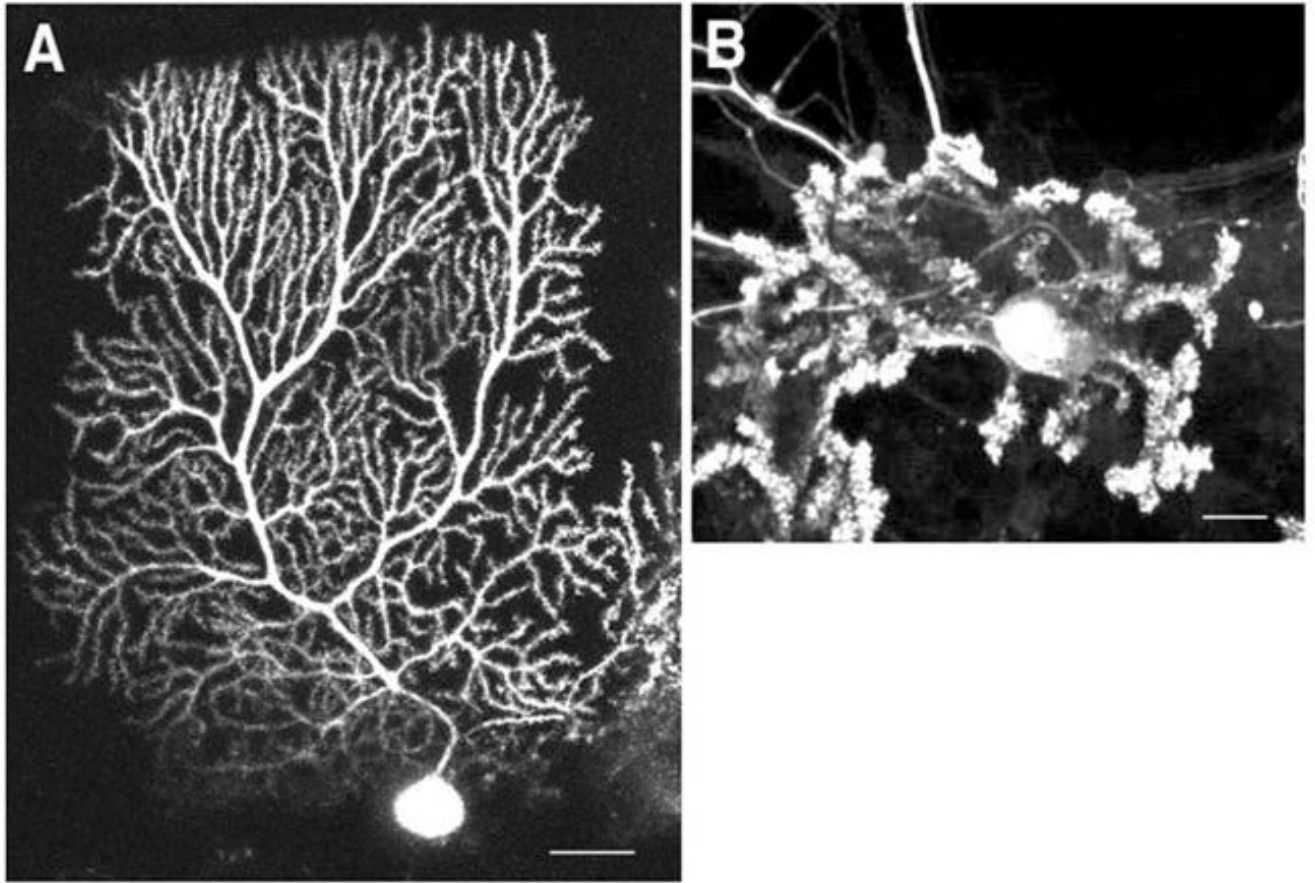
**3.14. სინაფსების რაოდენობის ულტრასტრუქტურული ანალიზი:** GFP, dn-Rac1/GFP, tdTomato, GluR2/tdTomato ადენოვირუსით მონიშნული თაგვების ნათხემიდან აღებული ანათლების ელექტრონოგრაფებზე ბერგმანის გლიური უჯრედების იდენტიფიკაცია ხდებოდა ელექტრონულად მკვრივი ნივთიერების არსებობით (პირშუშხას პეროქსიდაზას რეაქციის შედეგი). სინაფსების ამოცნობა ხდებოდა პოსტსინაფსური შემკვრივებისა და პრესინაფსურ ტერმინალში სინაფსური ვეზიკულების არსებობის საშუალებით. სინაფსების დათვლა წარმოებდა ერთიდა-იგივე გადიდების მქონე ელექტრონოგრაფებზე.

**3.15. სტატისტიკური ანალიზი:** სტატისტიკური დამუშავებისათვის გამოყენებული იყო SPSS კომპიუტერული პროგრამა. მონაცემები ნორმალური განაწილებით მუშავდებოდა T-ტესტით, მონაცემები არათანაბარი განაწილებით Wilcoxon-ის ტესტით და ყველა დანარჩენ შემთხვევაში ძირითადი ეფექტის გამოსავლენად: Mann-Whitney, Kruskal -Wallis და  $\chi^2$  ტესტები.

## თავი IV. მიღებული შედეგები

### 4.1. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების განვითარება ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში.

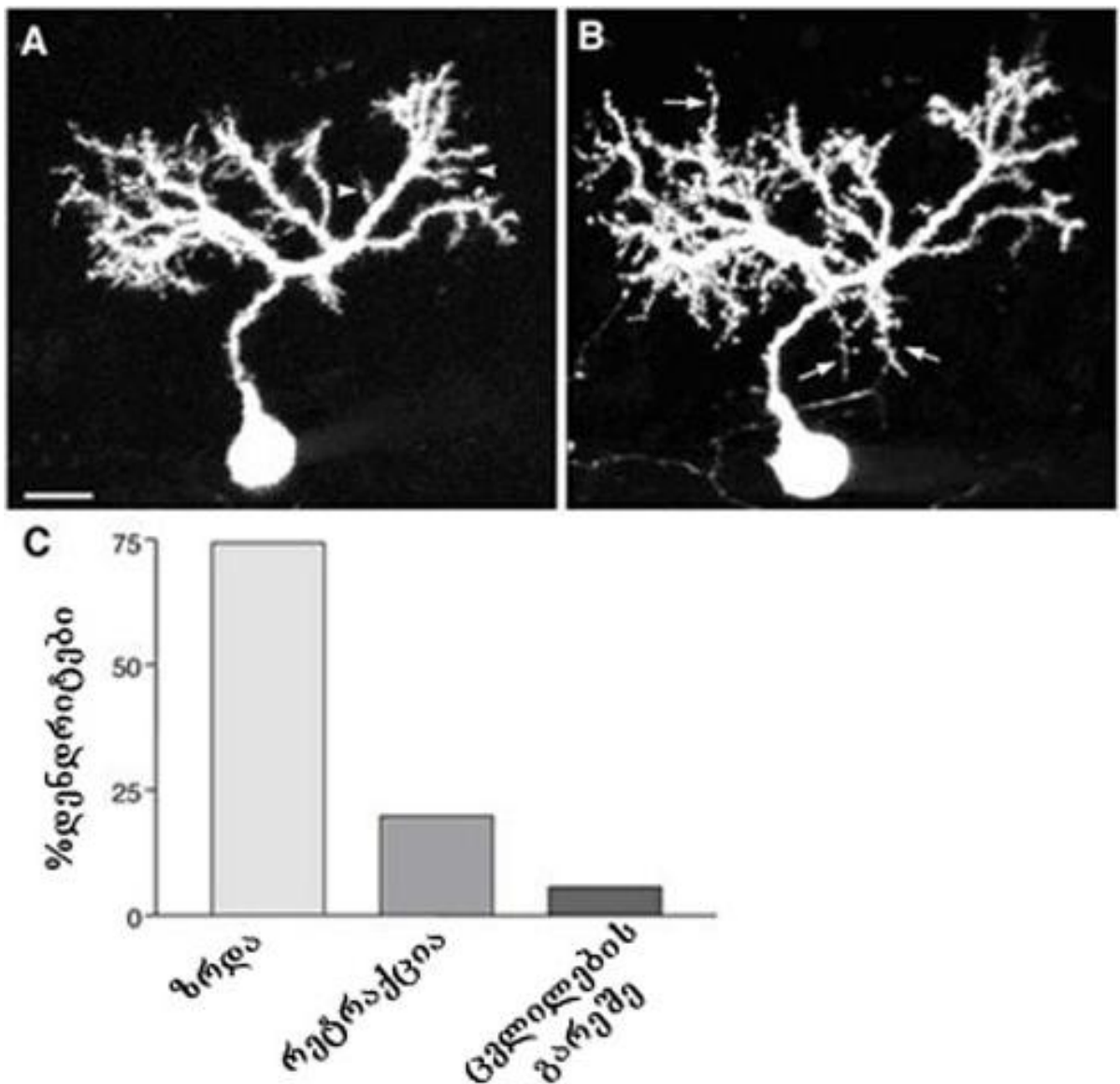
პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული ხის ჩამოყალიბების შესწავლა მოხდა ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში მრავალფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპის საშუალებით. ცნობილია, რომ ყველა ნეირონს გააჩნია მისთვის დამახასიათებელი დენდრიტული მორფოლოგია, რომელიც განაპირობებს ამ უჯრედების ფუნქციურ სპეციფიკას. არსებობს მტკიცებულებანი, რომ ამ დენდრიტულ მორფოლოგიას განაპირობებს როგორც უჯრედშიდა, ასევე უჯრედგარე სხვადასხვა ფაქტორები (Wong and Ghosh, 2002; Jan and Jan, 2003; Gruber et al., 2003; Niell et al., 2004; Ye et al., 2004). როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ზრდასრულ ნათხემში პურკინიეს უჯრედებს გააჩნიათ ერთი ძირითადი აპიკალური დენდრიტი, რომელიც მიმართულია პიას ზედაპირისაკენ და იტოტება მოლეკულურ შრეში. პურკინიეს უჯრედების შრეში ეს ნეირონები გარშემორტყმული არიან ბერგმანის გლიური უჯრედებით (ერთ პურკინიეს უჯრედზე მოდის 8-9 გლიური უჯრედი), რომელთა რადიალური მორჩებიც ბოლოვდებიან პიას ზედაპირთან. პურკინიეს უჯრედები ნათხემის შერეულ დისოცირებულ კულტურაში მართალია ივითარებენ მათთვის დამახასიათებელ დენდრიტულ ხეს, მაგრამ კარგავენ პოლარობას და ფორმას (Baptista et al., 1994) (სურ.5). რაც გვაფიქრებინებს, რომ არსებობს რაღაც უჯრედგარე ფაქტორები, რომლებიც განაპირობებენ პურკინიეს უჯრედების ფორმასა და მიმართულებას. ამ მიზნით შევისწავლეთ პურკინიეს უჯრედებისა და ბერგმან გლიის ურთიერთკავშირი პოსტნატალური განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფ ცხოველებში.



**სურ.5.** GFP-ით მონიშნული 20 დღის თაგვის პურკინიეს უჯრედი ნათხემის ორგანოტიპული ანათლის კულტურაში - (A), კალბინდინით შეღებილი 12 დღის თაგვის პურკინიეს უჯრედი ნათხემის შერეულ დისოცირებულ კულტურაში-(B). (მრავალ-ფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპი) მასშტაბი – 10 $\mu$ m

პოსტნატალური განვითარების 11-დღიან პურკინიეს უჯრედების, რომლებიც მონიშნულები იყვნენ DsRed2-ით, ცოცხალი უჯრედის გამოსახულებას ვაკვირდებოდით დროის გარკვეული მონაკვეთის განმავლობაში. პურკინიეს უჯრედის იდენტიფიცირებისა და გადაღებიდან 24 საათიანი ინტერვალის შემდეგ ვპოულობდით იგივე უჯრედს და განმეორებით ხდებოდა მისი გადაღება იგივე პარამეტრების გათვალისწინებით. შემდეგ ფოტოსურათზე არაშერჩევითად ვზომავდით დენდრიტებს. თითოეულ უჯრედიდან ვაწარმოებდით 3-12 დენდრიტის გაზომვას. სულ გავზომეთ 18 უჯრედი და 156 დენდრიტი. დენდრიტების სიგრძის რაოდენობრივმა ანალიზმა ცხადყო, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების დაახლოებით 74,4% იმატებს სიგრძეში, ხოლო 19,9% განიცდის რეტრაქციას კულტურაში ყოფნისას 24 საათის შემდეგ (სურ.6). დენდრიტების ზრდის საშუალო სიგრძეა  $2.1 \pm 0.2$  მკმ/დღეში, ხოლო რეტრაქცია -  $1.8 \pm 0.3$  მკმ/დღეში. დენდრიტების სიგრძის ცვლილების საშუალო

მაჩვენებელი კი იყო  $1.2 \pm 0.2$  მკმ/დღეში. ამრიგად, მიუხედავად იმისა, რომ დენდრიტებისათვის ჩამოყალიბების პროცესში დამახასიათებელია როგორც ზრდის მომატება, ასევე ზრდის კლებაც, მაინც საერთო ჯამში დენდრიტების სიგრძე მატულობს. ჩვენ გავზომეთ როგორც ვერტიკალურად აღმავალი, პიას ზედაპირისაკენ მიმართული დენდრიტები, ასევე ჰორიზონტალურად განლაგებული დენდრიტებიც. ორივე შემთხვევაში აღინიშნებოდა დენდრიტების სიგრძის მატება. ვერტიკალურად მიმართული დენდრიტების საშუალო სიგრძის მატება იყო 2.2მკმ/დღეში, ხოლო ჰორიზონტალურად განლაგებული დენდრიტების ზრდის მაჩვენებელი იყო 1.8 მკმ/დღეში.



სურ.6. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ზრდა ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში. P11 დღის DsRed2-ით მონიშნული P11 პურკინიეს უჯრედების გამოსახულება 2(A) და 3(B) დღე *in vitro* ყოფნის შემდეგ. ინდივიდუალური დენდრიტების ზრდა (ისრები B-

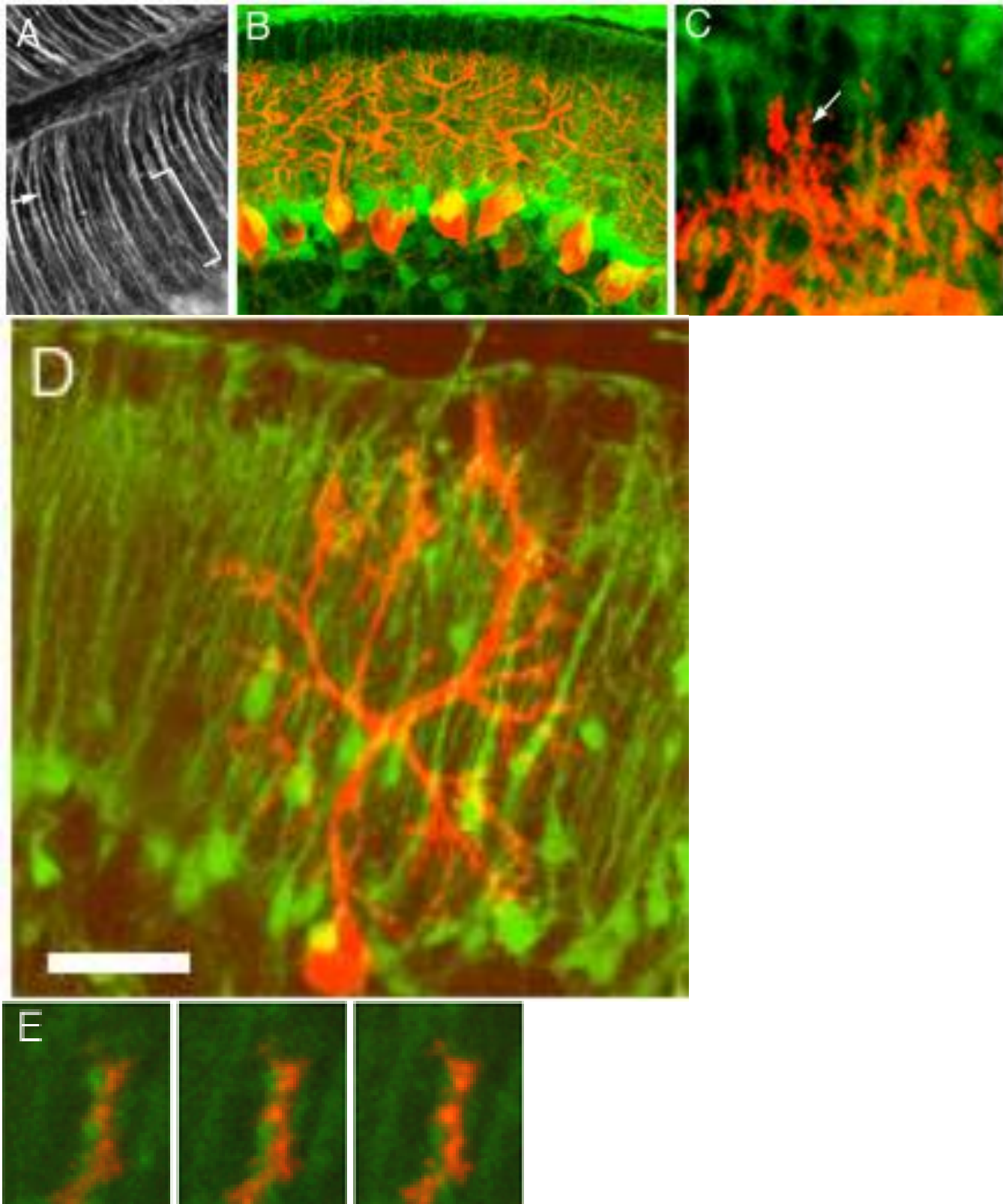


ში) და რეტრაქცია (ისრები A-ში). C - დენდრიტების რაოდენობის (პროცენტებში) გამომსახველი დიაგრამა, რომლებიც გაიზარდნენ სიგრძეში, განიცადეს რეტრაქცია ან არ შეუცვლიათ სიგრძე 24 სთ-ის განმავლობაში. მასშტაბი =15  $\mu\text{m}$

#### **4.2. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული დაბოლოებანი კავშირს ამყარებენ ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებთან**

ჩვენი კვლევის შემდგომ მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ურთერთკავშირი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებსა და ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებს შორის. ეს კვლევა ტარდებოდა GFP-GFAP თაგვებზე, სადაც ყველა ასტროციტში ექსპრესირდება GFP (მწვანე ფიბრილარული პროტეინი) GFAP პრომოუტერის (გლიურ-ფიბრილარული მჟავე პროტეინი) კონტროლის ქვეშ. ანუ ყველა ასტროციტი, მათ შორის ბერგმან გლია, თაგვების ტვინში მწვანედ იყო მონიშნული.

იმისათვის, რომ დაგვედგინა ურთერთკავშირი პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებს შორის, ჩვენ ნათხემის ანათლები შევღებეთ იმუნოციტოქიმიურად პურკინიეს უჯრედების მარკერით - კალბინდინ D-ს საშუალებით. ექსპერიმენტებმა გვიჩვენა, რომ გლიური უჯრედებისა და პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების განვითარება ნათხემის მოლეკულურ შრეში ერთდროულად ხდება. ამავდროულად ვნახეთ, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების დაბოლოებანი გადიან რა გარეთა მოლეკულურ შრეში, მჭიდრო კონტაქტებს ამყარებენ მათ პარალელურად განლაგებულ ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებთან (სურ.7).

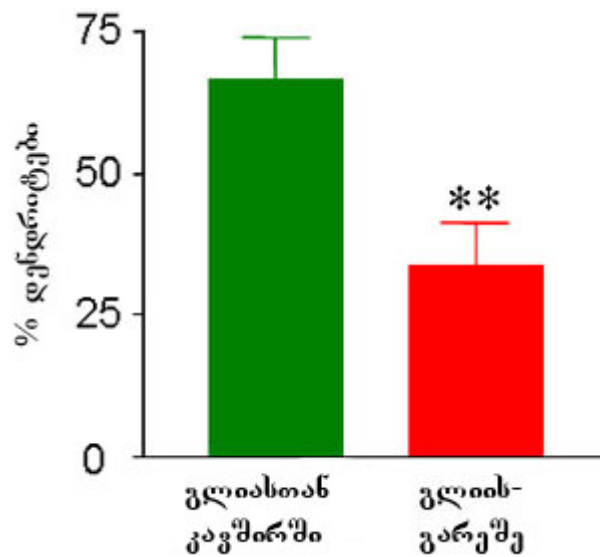
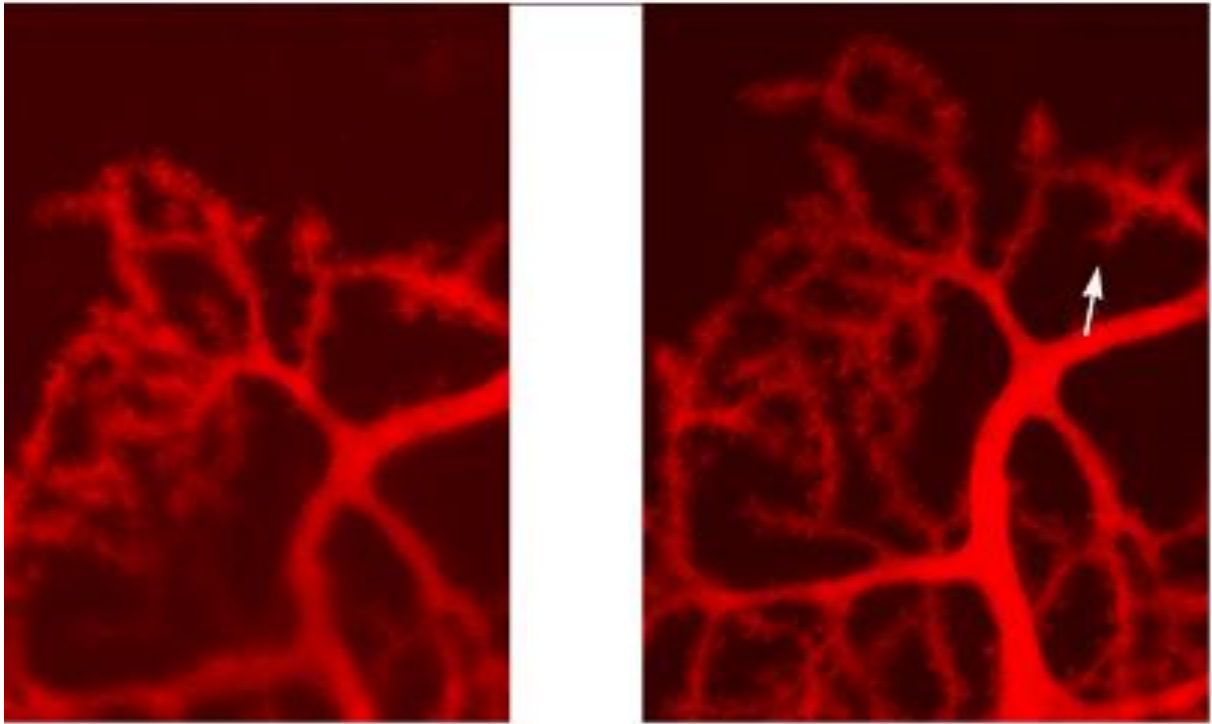


სურ.7. ურთიერთკავშირი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებსა და ბერგმანის გლიურ მორჩებს შორის. A - GFAP-GFP თავგების ნათხემის ანათალი, ბერგმანის გლიური უჯრედი - რადიალური მორჩი (ისარი), ლატერალური მორჩები (ფრჩხილები)

**B** - იმუნოციტოქიმიურად - კალბინდინით შეღებილი პურკინიეს უჯრედები და ბერგმან გლია. **C** - დიდ გადიდებაზე - იგივე კალბინდინით შეღებილი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები მჭიდრო კავშირს ამყარებენ ბერგმან გლიის რადიალურ მორჩებთან პიას ზედაპირთან ახლოს (ისარი) **D** - DsRed2-ით მონიშნული ინდივიდუალური პურკინიეს უჯრედი GFAP-GFP თავგების ნათხემის ორგანოტიპულ ანათალში. მჭიდრო კონტაქტი ზოგიერთ დენდრიტსა და ბერგმან გლიის რადიალურ მორჩს შორის მთელი მოლეკულური შრის გასწვრივ **E** - გამოხატული მჭიდრო კონტაქტი დენდრიტებსა და რადიალურ გლიურ მორჩებს შორის სხვადასხვა ფოკუსურ სიბრტყეში.

მასშტაბი = 23 $\mu$ m (**A**); 21 $\mu$ m (**B**); 10 $\mu$ m (**C**; **E**); 30 $\mu$ m (**D**)

იმის დასადგენად, იმყოფებიან თუ არა პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები და ბერგმან გლიის მორჩები მჭიდრო ურთიერთკავშირში მხოლოდ გარეთა მოლეკულურ შრეში, ანუ ეს კავშირი ხორცილდება მხოლოდ დენდრიტული დაბოლოებების დონეზე თუ არა, ჩვენ მოვნიშნეთ პურკინიეს უჯრედები ანათლებში DsRed2 მარკერით (სურ.8). ამან საშუალება მოგვცა ვიზუალიზაცია მოგვეხდინა ერთეული პურკინიეს უჯრედის და გაგვიადვილა ურთიერთკავშირის შესწავლა დენდრიტებსა და გლიურ მორჩებს შორის. ცდებმა გვიჩვენა, რომ მჭიდრო ურთიერთკავშირს ადგილი აქვს არა მხოლოდ გარეთა მოლეკულურ შრეში პიას ზედაპირთან ახლოს (როგორც ამას ადრე ვარაუდობდნენ), არამედ თვით მოლეკულურ შრეშიც.



**სურ.8.** DsRed2-ით მონიშნული ინდივიდუალური პურკინის უჯრედი ნათხემის ანათლის კულტურაში, მე-2 (A) და მე-3 (B) დღეს *in vitro* დენდრიტის ზრდა (ისარი).

C - ვერტიკალურად მიმართული დენდრიტების ზრდის პროცენტული მაჩვენებელი. დენდრიტების 73,9% გაიზარდა ბერგმანის გლიურ მორჩებთან მჭიდრო კავშირში 36,4% გაიზარდა სიგრძეში გლიურ მორჩებთან კავშირის გარეშე. \*\* =  $p < 0,01$

#### 4.3. პურკინიეს უჯრედები ვერტიკალურად იზრდებიან ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩებთან მჭიდრო კავშირის არსებობის შემთხვევაში

ის ფაქტი, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული დაბოლოებანი მჭიდრო კავშირში არიან ბერგმან გლიის რადიალურ მორჩებთან, სამუალებას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ ეს უკანასკნელი წარმოადგენენ სტრუქტურულ სუბსტრატს, რომელსაც ეყრდნობა დენდრიტები და რომ სწორედ გლიის რადიალური მორჩები აძლევენ ზრდის პროცესში პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებს მიმართულებას. ამ ჰიპოთეზის დასადასტურებლად, ჩვენ ვაკვირდებოდით დენდრიტების ზრდას 24 საათიან ინტერვალში ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში.

ჩვენს მიერ გამოყოფილი იქნა ორი ძირითადი ტიპის კონტაქტი, რომელიც არსებობს დენდრიტებსა და ბერგმან გლიის მორჩებს შორის: 1. როდესაც დენდრიტი უშუალო კონტაქტში იმყოფება ბერგმანის მორჩთან მთელს სიგრძეზე (აპიკალური დენდრიტის განშტოებიდან ბოლომდე) (სურ.9 C,D) 2. კონტაქტი ნაწილობრივია, ანუ დენდრიტი მთლიანად (თავიდან ბოლომდე) არ ეყრდნობა გლიურ მორჩს (სურ.9 A,B). 79 ვერტიკალურად მიმართული დენდრიტებიდან 58 იმყოფებოდა მჭიდრო კონტაქტში გლიურ მორჩთან. მაგ. 5D სურათზე აღბეჭდილი დენდრიტი (ისარი) კონტაქტში იმყოფება მორჩთან მთელი მისი სიგრძის გასწვრივ (სხვადასხვა მხედველობით სიბრტყეში), ხოლო 5B სურათზე გამოსახული დენდრიტი (ისრის თავი) არ ეყრდნობა გლიურ მორჩს მთელი მისი სიგრძის გასწვრივ.

იმისათვის, რომ დაგვედგინა თუ რა როლი ეკისრება გლიურ მორჩს დენდრიტების ზრდის მაჩვენებელთან მიმართებაში, ჩვენ კვლავ გავზომეთ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების სიგრძის ცვლილება 24 საათიან ინტერვალში. ჩატარებული გაზომვების შემდეგ ვადგენდით, იმყოფებოდა თუ არა აღნიშნული დენდრიტი ბერგმანის გლიურ მორჩთან უშუალო კონტაქტში. უმეტეს შემთხვევაში დენდრიტების ზრდის მატებას ადგილი ჰქონდა მაშინ, როდესაც მათი წვეროები კონტაქტში იმყოფებოდნენ გლიურ რადიალურ მორჩებთან (73,9%; დენდრიტების რაოდენობა - 73, უჯრედების რაოდენობა - 14). სხვა ვერტიკალურად მიმართული დენდრიტების სიგრძე ან საერთოდ უცვლელი დარჩა, ან განიცადა რეტრაქცია. ამ მონაცემებმა გაამყარა ჩვენი ვარაუდი იმის თაობაზე, რომ ბერგმანის გლიური

უჯრედების რადიალური მორჩები ასრულებენ სუბსტრატის როლს პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებისათვის და ხელს უწყობენ მათ ვერტიკალურ ზრდას.

ჩვენ განვსაზღვრეთ დენდრიტების ზრდის და რეტრაქციის მაჩვენებელი სხვადასხვა შემთხვევაში: 1. დენდრიტი იმყოფება მჭიდრო კავშირში გლიის რადიალურ მორჩთან; 2. დენდრიტი არ იმყოფება კონტაქტში.

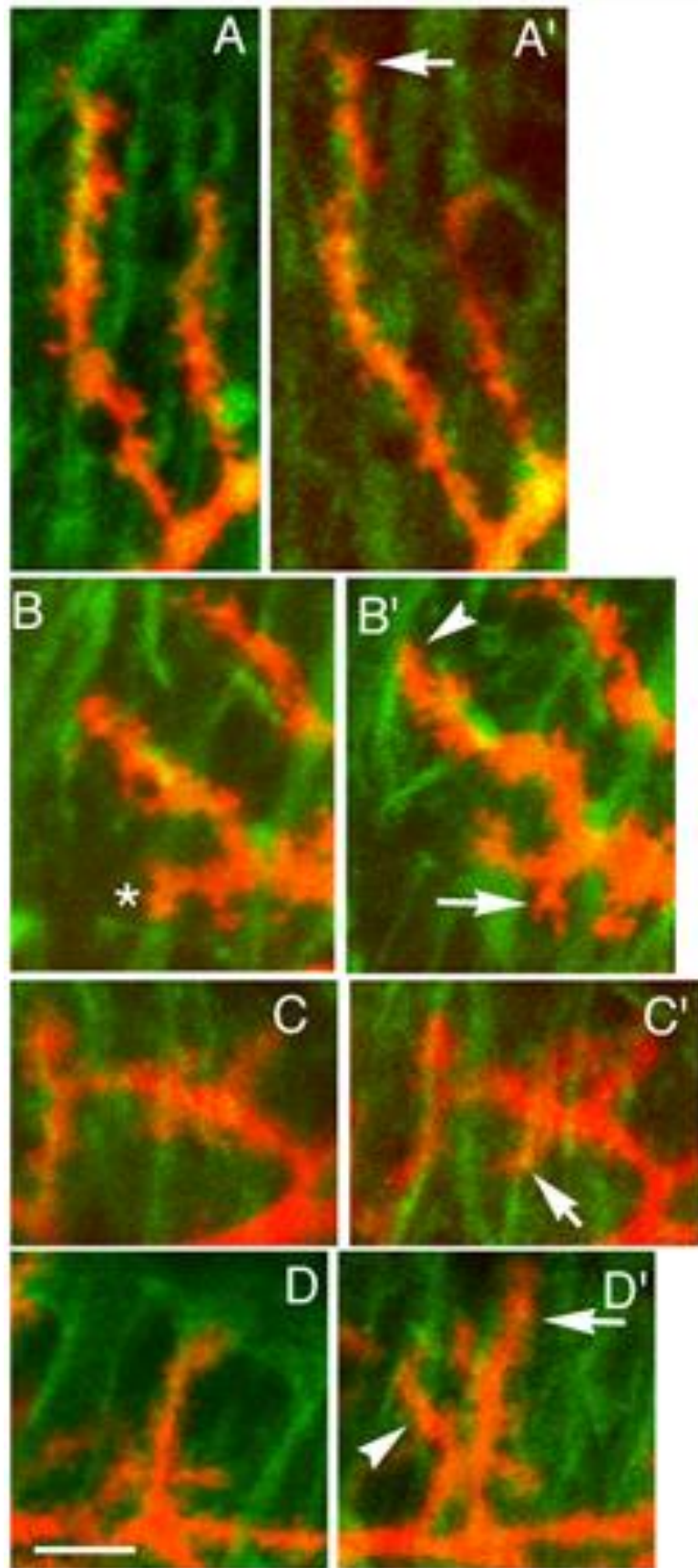
ამ გაზომვებმა გვიჩვენა, რომ დენდრიტის სიგრძის ზრდა არ არის დამოკიდებული მის კონტაქტზე გლიურ მორჩთან, ანუ კონტაქტში მყოფი დენდრიტების ზრდის საშუალო მაჩვენებელი იყო  $2.2 \pm 0.2$  მკმ/დღეში, ხოლო მეორე შემთხვევაში საშუალო მაჩვენებელი იყო  $2.4 \pm 0.6$  მკმ/დღეში. ამ მონაცემებიდან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ბერგმან გლიის რადიალური მორჩები წარმოადგენენ მიმზიდველ საყრდენ სუბსტრატს პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებისათვის, მაგრამ არ წარმოადგენენ მათი ზრდის განმსაზღვრელ ფაქტორს.

#### **4.4. პურკინიეს დენდრიტები არაშემთხვევითად ამყარებენ კავშირებს ბერგმანის გლიურ მორჩებთან**

ჩვენ აღვნიშნეთ, რომ პურკინიეს უჯრედების ვერტიკალურად მიმართული დენდრიტების უმრავლესობა მჭიდრო კავშირშია (ანუ ეყრდნობა) ბერგმან გლიის რადიალურ მორჩებთან. იმის დასადგენად, ეს კავშირი გამიზნულია თუ შემთხვევითი, გადავწყვიტეთ გაგვეზომა ანათლის ის ფართობი, რომელიც უკავია გლიურ უჯრედებს. თუ დენდრიტები გამიზნულად უკავშირდებიან გლიურ მორჩებს ზრდის დროს, მაშინ მათ საშუალება უნდა ჰქონდეთ ასეთი არჩევანის გაკეთების. ანუ ანათალზე გლიის მიერ დაკავებული ფართობი ნაკლები უნდა იყოს იმ ფართობზე, რომელშიც არ არიან გლიური უჯრედები. ჩვენ გავზომეთ ეს ფართობები და მივიღეთ, რომ მათი თანაფარდობა უდრის  $0.86 \pm 0.05$  (ანათალზე ფართობის ნახევარი რომ ყოფილიყო გლიური უჯრედებით დაკავებული, ეს თანაფარდობა ტოლი იქნებოდა 1-ის).

ის ფაქტი, რომ გლიურ უჯრედებს უკავიათ ანათლის საერთო ფართობის ნახევარზე ნაკლები და დაახლოებით სამი მეოთხედი დენდრიტებისა იზრდებიან ბერგმან გლიის ლატერალურ მორჩებთან მჭიდრო კავშირში, გვამღებს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ეს კავშირი არ არის შემთხვევითი. ანუ ბერგმანის გლიური

უჯრედები პურკინიეს უჯრედებისათვის წარმოადგენენ სუბსტრატს, რაც უზრუნველყოფს ამ ნეირონების დენდრიტების მიზანმიმართულ ვერტიკალურ ზრდას.



სურ.9. პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ზრდა ბერგმან გლიის რადიალურ მორჩებთან მჭიდრო კავშირში. გაზრდილი დენდრიტები, რომლებიც იყვნენ მჭიდრო კონტაქტში გლიის რადიალურ მორჩებთან (ისრები A',C',D'); დენდრიტები, რომლებიც იყვნენ მჭიდრო



კონტაქტში გლიის რადიალურ მორჩებთან და განიცადეს რეტრაქცია (ვარსკვლავი **B**); გაზრდილი დენდრიტები, რომლებიც არ იმყოფებოდნენ კონტაქტში რადიალურ გლიურ მორჩებთან (ისარი **B'**); დენდრიტები, რომლებიც იზრდებოდნენ ჰორიზონტალური მიმართულებით და შემდეგ გააგრძელეს ზრდა ვერტიკალურად გლიის რადიალურ მორჩებთან მჭიდრო კონტაქტში (ისრის თავები **B'** და **D'**) მასშტაბი: 10µm

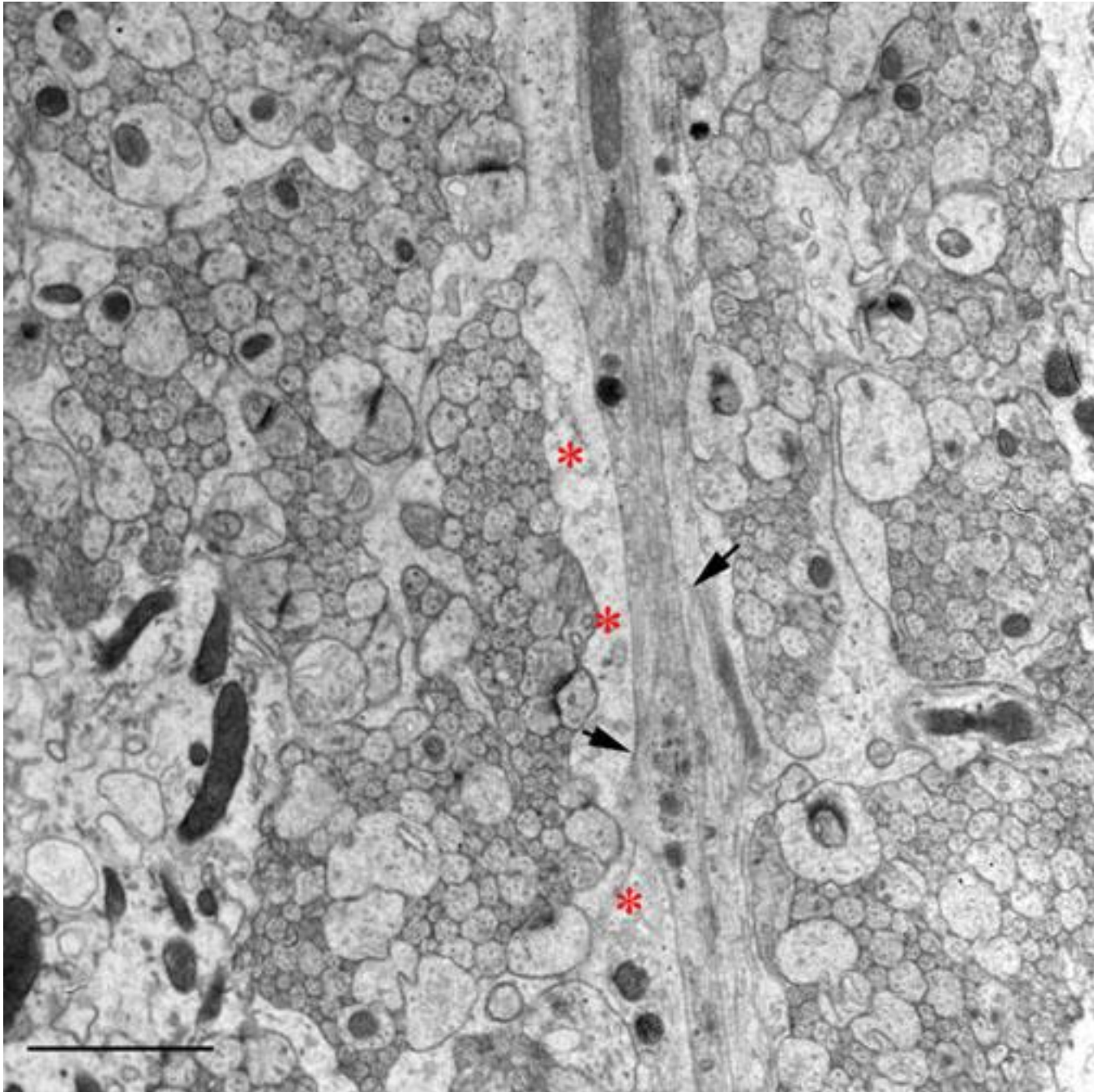
ზემოთ ჩამოთვლილ კვლევებში ჩვენ შევისწავლეთ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ზრდა ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში და ამ დენდრიტების კავშირი ბერგმანის გლიური უჯრედების რადიალურ გამონაზარდებთან. ჩატარებული ცდების საფუძველზე დავადგინეთ, რომ ნათხემში პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების ვერტიკალური ზრდა პიას ზედაპირისაკენ უმეტეს შემთხვევაში მიმდინარეობს ბერგმან გლიის რადიალურ გამონაზარდებთან მჭიდრო კავშირში. ამ ფაქტმა გაამყარა ის მოსაზრება, რომ ბერგმან გლიის რადიალური მორჩები წარმოადგენენ სტრუქტურულ სუბსტრატს პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებისათვის და ისინი განაპირობებენ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების მიმართულებას და მათთვის დამახასიათებელი სპეციფიური დენდრიტული ხის ჩამოყალიბებას.

ეს არის პირველი გამოკვლევა, სადაც აღწერილია პურკინიეს უჯრედების ზრდის მოდელი ცოცხალი ანათლების გამოყენებით. ჩვენ აღვნიშნეთ, რომ დენდრიტების სიგრძის მომატებასთან ერთად ადგილი აქვს მათ რეტრაქციას, რაც ემთხვევა სხვა სახის ნეირონებზე ჩატარებულ გამოკვლევებს (Wu et al, 1999; Niell et al, 2004).

ჩვენ ვნახეთ, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები იზრდებიან ვერტიკალურად და ჰორიზონტალურად როგორც პიას ზედაპირის მიმართულებით, ასევე მის საწინააღმდეგოდ. ეს მიუთითებს იმ ფაქტზე, რომ არ არსებობს ერთი რაიმე მამოძრავებელი ზრდის ფაქტორი, რასაც ადგილი აქვს ქერქის პირამიდული უჯრედების აპიკალურ დენდრიტებში, რომლებიც იზრდებიან Sema 3A უბნის მიმართულებით (Polleux et al; 2000).

საინტერესოა ის ფაქტი, რომ ვერტიკალური ზრდა დენდრიტებში უმეტესად მიმდინარეობს გლიურ რადიალურ მორჩებთან უშუალო კავშირში. გლიური მორჩების ამ როლზე ადრე გამოითქვა ვარაუდი იამადას მიერ (Yamada et al; 2000).

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა, სადაც შევძელით 24 საათიან ინტერვალში რამოდენიმეჯერ გადაგველო ერთიდაიგივე უჯრედი, დაადასტურა, რომ პურკინიეს უჯრედები ვერტიკალურად იზრდებიან სიგრძეში ბერგმანის გლიური უჯრედების რადიალურ მორჩებთან მჭიდრო კონტაქტის დროს (სურ.10), რაც თავის მხრივ ადასტურებს გლიური უჯრედების როლს პურკინიეს უჯრედების მორფოგენეზში.



სურ.10. P12 ასაკის თავის ნათხემის ანათლის ელექტრონოგრაფია. მოლეკულური შრე. პურკინიეს უჯრედის დენდრიტი (ისრები), ბერგმანის გლიური უჯრედის მორჩი (ვარსკვლავები). დენდრიტსა და გლიურ მორჩს შორის არის მჭიდრო კავშირი. მასშტაბი = 2  $\mu$ m

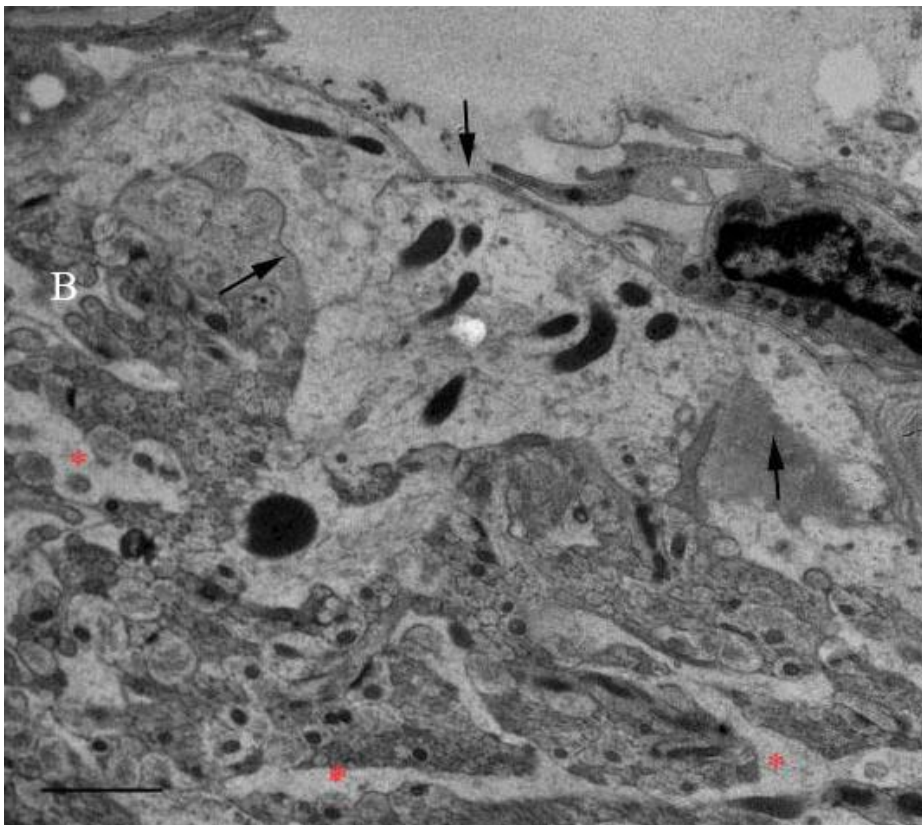
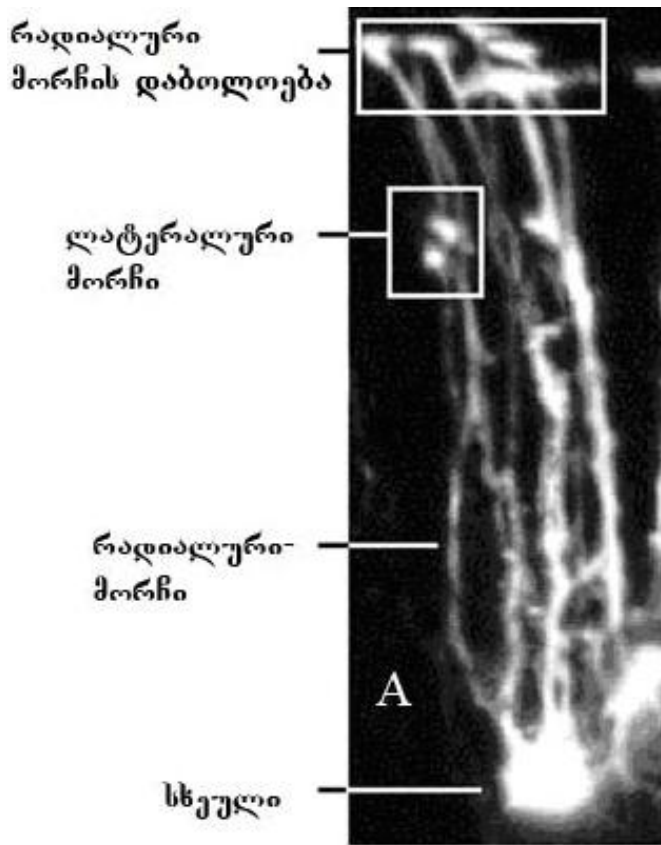
რასაკვირველია არსებობენ დენდრიტები, რომლებიც იზრდებიან სიგრძეში გლიურ უჯრედებთან კონტაქტის გარეშე. ასეთი დენდრიტების მიმართულების ტრაექტორია ძირითადად არის ჰორიზონტალური. ჩვენ დავადგინეთ, რომ დენდრიტული ხის ზრდის საერთო მაჩვენებელი არ არის დამოკიდებული გლიასა და დენდრიტს შორის არსებულ კონტაქტზე. ეს ამტკიცებს იმას, რომ გლია არ თამაშობს კონტაქტ-დამოკიდებული ზრდის ფაქტორის როლს ნეირონის დენდრიტებისათვის. თუმცა ის ფაქტი, რომ დენდრიტების უმრავლესობა იმყოფება გლიურ მორჩებთან მჭიდრო კავშირში, საფუძველს გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ გლიური უჯრედები განსაზღვრავენ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების მიმართულებას და აგრეთვე, წარმოადგენენ დენდრიტებისათვის საყრდენ სუბსტრატს.

მოლეკულური მედიატორების როლი გლიური უჯრედების რადიალურ მორჩებს შორის არ არის კარგად შესწავლილი. ცნობილია, რომ რეცეპტორული ტიპის ცილა - თიროზინფოსფატაზა (PTP $\zeta$ /RPTP $\beta$ ) აუცილებელია იმისათვის, რომ განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფი პურკინიეს უჯრედი მულტიპოლარული მორფოლოგიიდან გადავიდეს უნიპოლარული დენდრიტის სტადიაზე (Tanaka et al; 2003). ამ პროცესისათვის აუცილებელია GLAST - გლიური გლუტამატ ტრანსპორტერი, რომელიც დიდი რაოდენობით ექსპრესირდება ბერგმანის გლიურ უჯრედებში. ტანაკას და მისი კოლეგების მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტში GLAST - ის დაბლოკვის შემთხვევაში დენდრიტების ზრდა არ შეფერხებულა, თუმცა პურკინიეს უჯრედებისათვის დამახასიათებელი დენდრიტული ხის ჩამოყალიბებას ადგილი არ ჰქონდა. მათივე მოსაზრებით, არსებობს რაღაც სხვა ძალები, რომელთაც შეიძლება იქონიონ გავლენა გლია-ნეირონულ კავშირებზე. ასეთი შეიძლება იყვნენ ადჰეზიური მოლეკულები ან ინტეგრინები.

#### 4.5. ბერგმანის გლიური უჯრედებისა და მათი მორჩების მონიშვნა და იდენტიფიკაცია

ბოლო დროის გამოკვლევებმა ცხადყო, რომ გლია პასიური საყრდენი როლის გარდა მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სინაფსების ფუნქციონირებაში, მათ პლასტიურობაში, დენდრიტებისა და ქაცვების განვითარებაში. (Laming et al., 2000; Ullian et al., 2001; Amateau and McCarthy, 2002; Murai et al., 2003; Yang et al., 2003; Zhang et al., 2003; Lin and Bergles, 2004b; Christopherson et al., 2005; Ge et al., 2006; Takatsuru et al., 2006; Takayasu et al., 2006). თუმცა გლია-ნეირონულ ურთიერთობებში, ჯერ კიდევ ბევრი რამე შეუსწავლელი რჩება.

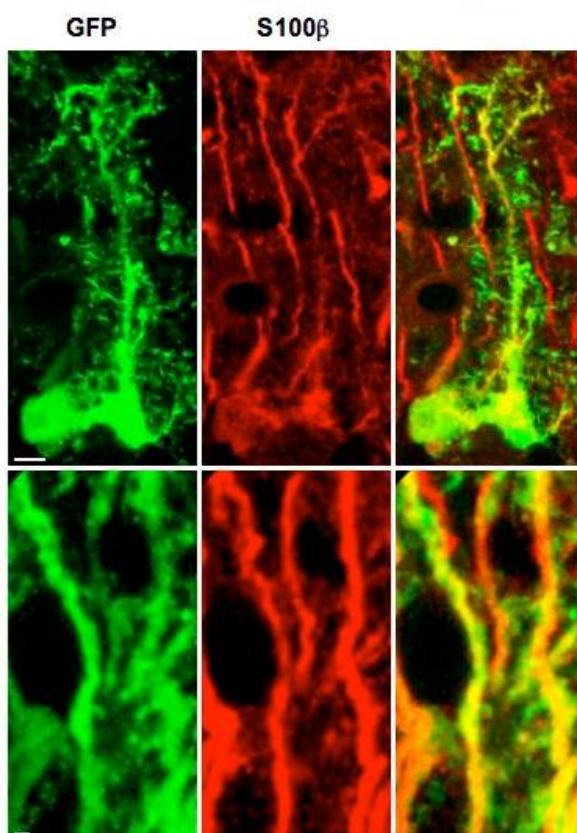
სწორედ იმ მიზნით, რომ გამოგვეკვლია გლიური უჯრედების დამატებითი ფუნქციები გლია-ნეირონულ ურთიერთობებში, შევისწავლეთ ნათხემში ბერგმანის გლიური უჯრედების განვითარების დინამიკა. კერძოდ, მათი რადიალური მორჩების განვითარება და ბერგმანის გლიური უჯრედების როლი ნათხემის სინაპტოგენეზში. ბერგმანის გლიური უჯრედების იდენტიფიკაცია ნათხემში საკმაოდ ადვილია მათთვის დამახასიათებელი მორფოლოგიისა და ორიენტაციის გამო (სურ.11 A).



სურ.11. A - P12 ასაკის თაგვის ბერგმანის გლიური უჯრედი ნათხემის ცოცხალ ანათალში. ქვემოთ კარგად ჩანს უჯრედის სხეული მისგან გამომავალი რადიალური მორჩებით, რომლებიც მიემართებიან პიას ზედაპირისაკენ და უკავშირდებიან მას ჰორიზონტალურად

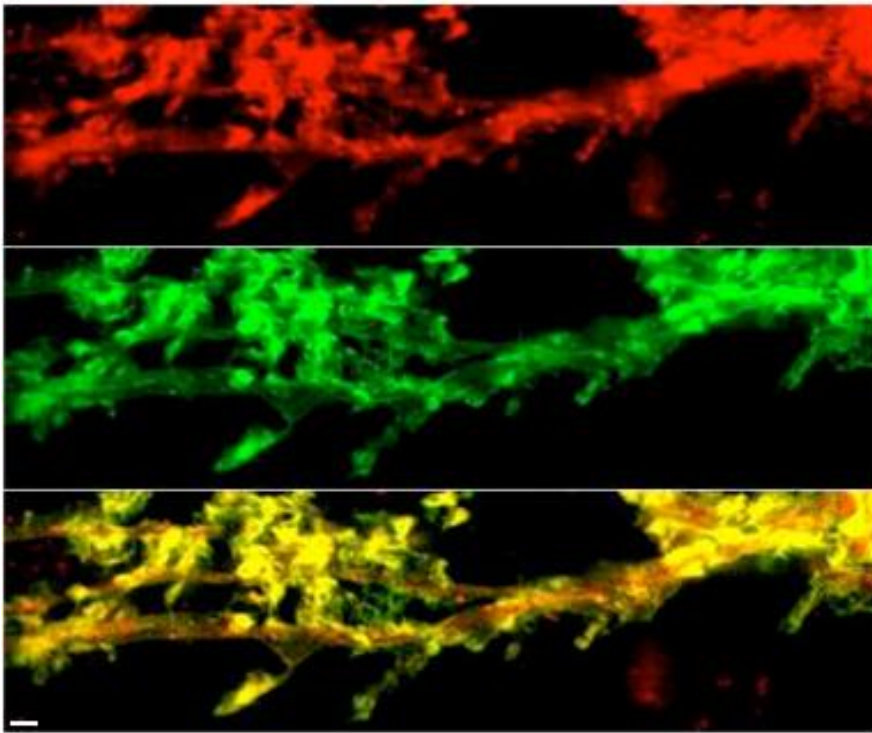
ოდნავ წაგრძელებული დაბოლოებით. რადიალურ მორჩებზე კარგად ჩანს მათგან გამოსული ლატერალური მორჩები; **B** -ბერგმან გლიის რადიალური მორჩის დაბოლოების (ისარი) ელექტრონოგრაფია, რომელიც ესაზღვრება პიას ზედაპირს, კარგად ჩანს გლიური მორჩები (ვარსკვლავები). მასშტაბი=2  $\mu\text{m}$

ჩვენ გამოვიყენეთ შემდეგი კრიტერიუმები ბერგმანის გლიური უჯრედების ვიზუალიზაციისთვის: 1. 3-6 მსხვილი რადიალური მორჩი, რომლებიც მიემართებიან მოლექულური შრის გავლით პიას ზედაპირისაკენ; 2. მცირე ზომის სხეული, განლაგებული პურკინიეს უჯრედების შრეში; 3. რადიალური მორჩების დაბოლოებანი, რომლებიც კონტაქტირებენ პიას ზედაპირთან; 4. მცირე ზომის ლატერალური მორჩები; 5. აქსონების არარსებობა. თუმცა, განვითარების ადრეულ სტადიაზე ბერგმან გლიის რადიალური მორჩები შედარებით გლუვია და მათგან გამომავალი ლატერალური მორჩების რიცხვი ძალზედ მცირეა, ჩვენ ბერგმან გლიის მორფოგენეზს ვიკვლევდით ისეთ ასაკში (P11-P23), როდესაც ლატერალური მორჩები კარგად არის შესამჩნევი გლიური მარკერით. s100 $\beta$  შეღებვამ დაადასტურა ჩვენს მიერ შერჩეული ბერგმანის გლიური უჯრედების მაიდენტიფიცირებელი კრიტერიუმები (სურ.12ა).



სურ.12ა. ბერგმანის გლიური უჯრედების იდენტიფიკაცია. იმუნოციტოქიმიურმა შეღებვამ დაადასტურა, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედი, რომლის იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ

მორფოლოგიური კრიტერიუმებით, ავლენს გლიური მარკერის S100 $\beta$  ექსპრესიას (მწვანე - GFP ადენოვირუსით მონიშნული, წითელი - S100 $\beta$ ). ზედა სურათი -გადიდება 1X, მასშტაბი = 5  $\mu$ m; ქვედა სურათი- გადიდება 3X, მასშტაბი= 1  $\mu$ m.

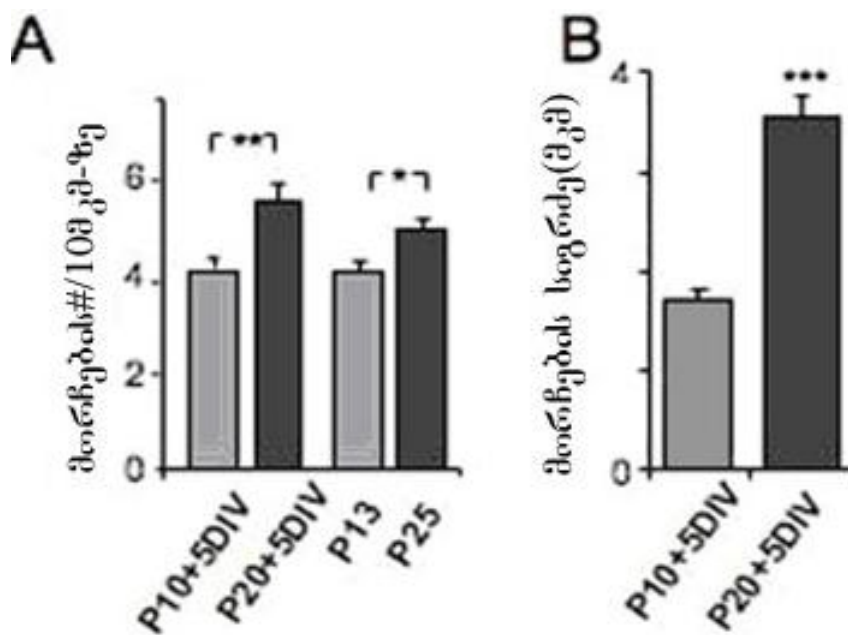


სურ.12ბ. ბერგმანის გლიური უჯრედის ლატერალური მორჩის სრული შეღებვა. P11+P7DIV *in vitro* უჯრედი ნათხემის ქსოვილოვანი კულტურიდან. წითელი - ადენოვირუსი - tdTomato, მწვანე - GFP მარკერი. გადიდება 7X, მასშტაბი 2  $\mu$ m.

რადგანაც ჩვენ ექსპერიმენტების უმეტეს ნაწილში ვიყენებდით ციტოპლაზმურ მწვანე ფლუორესცენტულ ცილას (GFP), საინტერესო იყო, თუ რამდენად სრულად იღებებოდა მცირე ციტოპლაზმიანი ლატერალური მორჩები. ამის შესამოწმებლად P11+7 DIV (7 დღე *in vitro*) ნათხემის ანათლების კულტურაში შეგვყავდა ციტოპლაზმური წითელი მარკერი tdTomato. ორივე შემთხვევაში ბერგმანის გლიური უჯრედები იღებებოდნენ ერთნაირად (სურ.12ბ) და უმცირესი ზომის ლატერალური მორჩებიც კი ადვილად ხილვადი იყო. ამის საფუძველზე დავადგინეთ, რომ ექსპერიმენტის მსვლელობაში მხოლოდ GFP-ის გამოყენება საკმარისი იყო.

#### 4.6. ბერგმანის გლიური მორჩების განვითარების დინამიკა და მათი ძვრადობა

ჩვენ შევისწავლეთ ბერგმან გლიის მორფოლოგია მისი განვითარების ორ სხვადასხვა საფეხურზე. კერძოდ, ადრეული და დასრულებული სინაპტოგენეზის პირობებში ანუ პოსტნატალური განვითარების 9-11 და 18-24 დღეების სტადიებზე (P9-P11 და P18-P24). ნათხემის ანათლების კულტურაში უჯრედების მონიშვნას ბიოლისტური ტყვიების მეშვეობით ვაწარმოებდით ანათლების დამზადებიდან 3 დღე *in vitro* (DIV) კულტურაში ყოფნის შემდეგ, მარკერის შეყვანიდან კიდევ 2 დღე ანათლები იმყოფებოდნენ ინკუბატორში (რათა მომხდარიყო მარკერის სრული ექსპრესია უჯრედებში). ამის შემდეგ, უკვე ცოცხალი უჯრედების გადაღებას ვაწარმოებდით 2-ფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპის საშუალებით. P18-P24 ცხოველების ბერგმან გლიის უჯრედების ლატერალური მორჩების რაოდენობა 25%-ით (17 რადიალური მორჩი P10 ასაკის თავის 12 უჯრედიდან, 17 რადიალური მორჩი P20 ასაკის თავის 9 უჯრედიდან,  $p=0.002$ ) აღემატებოდა ახალგაზრდა ცხოველების უჯრედების მორჩების სიმჭიდროვეს (სურ.13-A). ჩვენ გამოთვლებში არ აღვრიცხეთ ის მორჩები, რომლებიც გადიოდნენ გარეთა გრანულარულ და მოლეკულურ შრეებში ბერგმან გლიის რადიალური მორჩების დაბოლოებებთან, რადგანაც P10-დღიან ბერგმან გლიას არ გააჩნია ასეთი მორჩები (Rakic, 1971; Yamada et al., 2000).



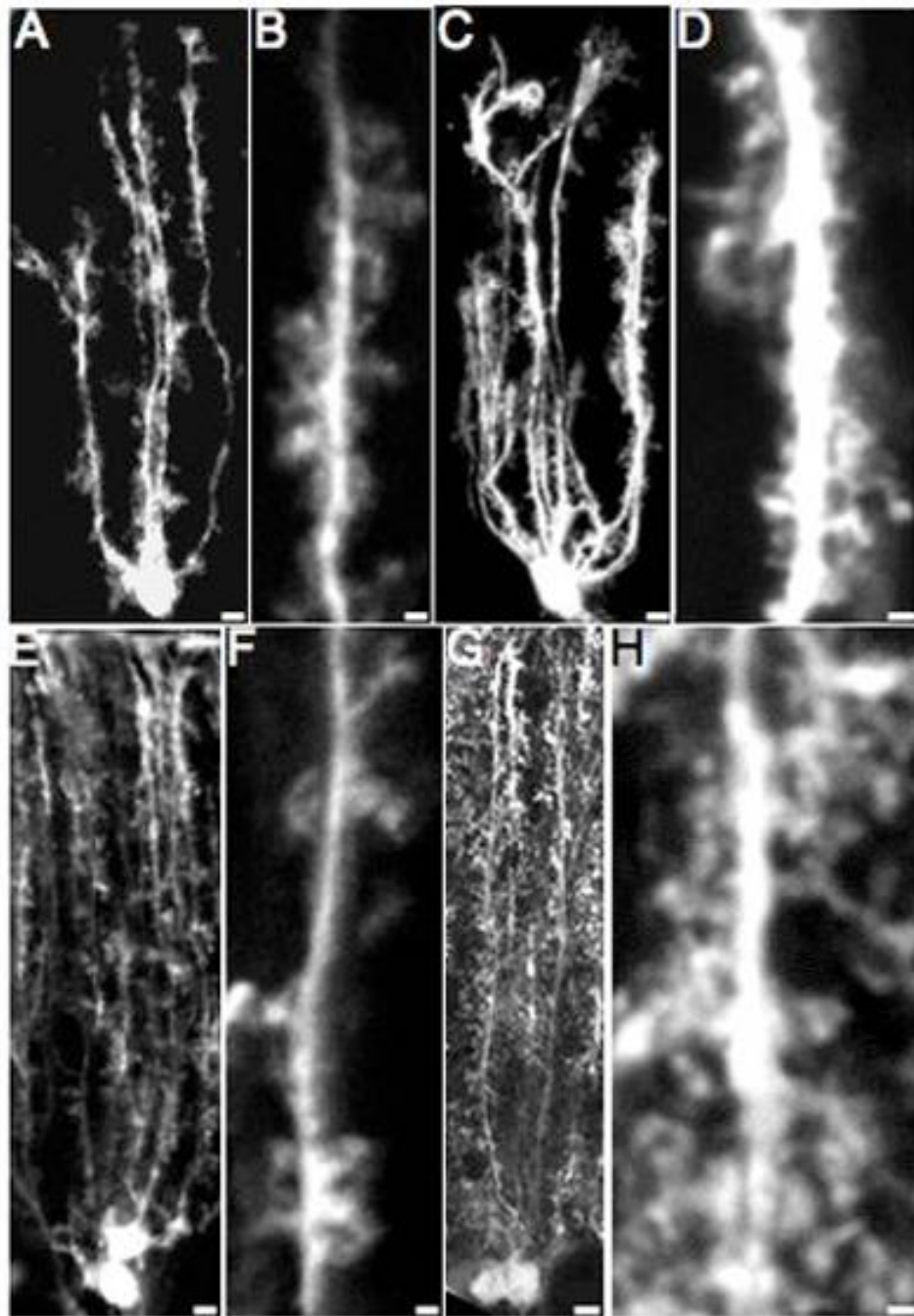
სურ. 13. ბერგმან გლიის მორჩების მორფოლოგიური განვითარება. A - ბერგმანის გლიური მორჩების რაოდენობა საგრძნობლად იზრდება ასაკის მატებასთან ერთად როგორც



ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში, ასევე ცოცხალ ანათლებში. **B** - გლიური მორჩების სიგრძის მატება ასაკთან ერთად ნათხემის ორგანოტიპულ ანათლებში. \* -  $p=0,014$ ; \*\* -  $p=0,002$ ; \*\*\* -  $p<0,0001$ ;

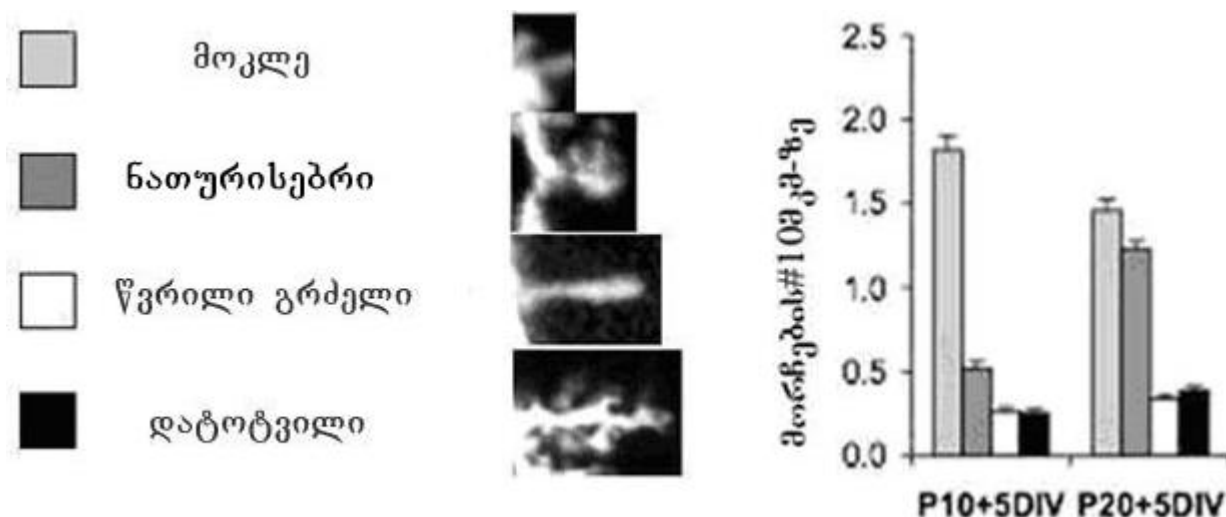
კულტურაში მყოფი უჯრედები (სურ.14 A,B,C,D) შეიძლება განსხვავდებოდნენ *in vivo* უჯრედებისა ან ცოცხალ (მწვავე) ანათლებში მყოფი უჯრედებისაგან (სურ.14 E,F,G,H). იმისთვის, რომ დაგვეტკიცებინა ბერგმან გლიის მორფოლოგიის ერთგვაროვნება ამ სხვადასხვა ტიპის ანათლებში, ჩვენ გამოვიყენეთ საექსპერიმენტო თავების ნათხემის *in vivo* მონიშვნა ადენოვირუსის საშუალებით, რომელიც შეიცავდა GFP ცილოვან მარკერს CMV პრომოუტერის კონტროლის ქვეშ. ადენოვირუსი ახდენს ბერგმან გლიის მონიშვნას მაშინ, როდესაც მისი შეყვანა ხდება ნათხემის მოლეკულურ შრეში (Iino et al., 2001).

ცოცხალი ანათლების ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ ბერგმან გლიის მორჩების რაოდენობა ზრდასრულ ცხოველებში 22%-ით აღემატება განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფი ცხოველების იგივე მაჩვენებელს (სურ.13 A) P13 ცხოველების 14 უჯრედში გაზომილი იყო 21 მორჩი, P25 ცხოველების 10 უჯრედში გაზომილი იყო 16 მორჩი. განსხვავება იყო სტატისტიკურად სარწმუნო  $p=0.014$ . მორჩების სიმჭიდროვის მატებასთან ერთად ადგილი ჰქონდა მორჩების სიგრძის 50%-იან ზრდას (სურ.13 B)  $p<0.0001$ . P10 ცხოველებში - 6 უჯრედი,  $n =211$  (მორჩების რაოდენობა), P20 ცხოველებში - 6 უჯრედი,  $n =211$  (მორჩების რაოდენობა).



სურ.14. ბერგმანის გლიური უჯრედები ნათხემის ორგანოტიპულ და ცოცხალ ანათლებში სინაპტოგენეზის ადრეულ და გვიან სტადიებზე. A ; B - GFP ადენოვირუსით მონიშნული P10+5DIV ბერგმანის გლიური უჯრედები ორგანოტიპულ ანათლებში C;D - GFP ადენოვირუსით მონიშნული P20+5DIV უჯრედები ორგანოტიპულ ანათლებში E;F - GFP ადენოვირუსით მონიშნული P13 ასაკის თავგის ბერგმან გლიის უჯრედი ცოცხალ ანათალში G;H - GFP ადენოვირუსით მონიშნული P25 ასაკის თავგის ბერგმან გლიის უჯრედი ცოცხალ ანათალში. მასშტაბი: 1 $\mu$ m (A,C,E,G), 5  $\mu$ m (B,D,F,H)

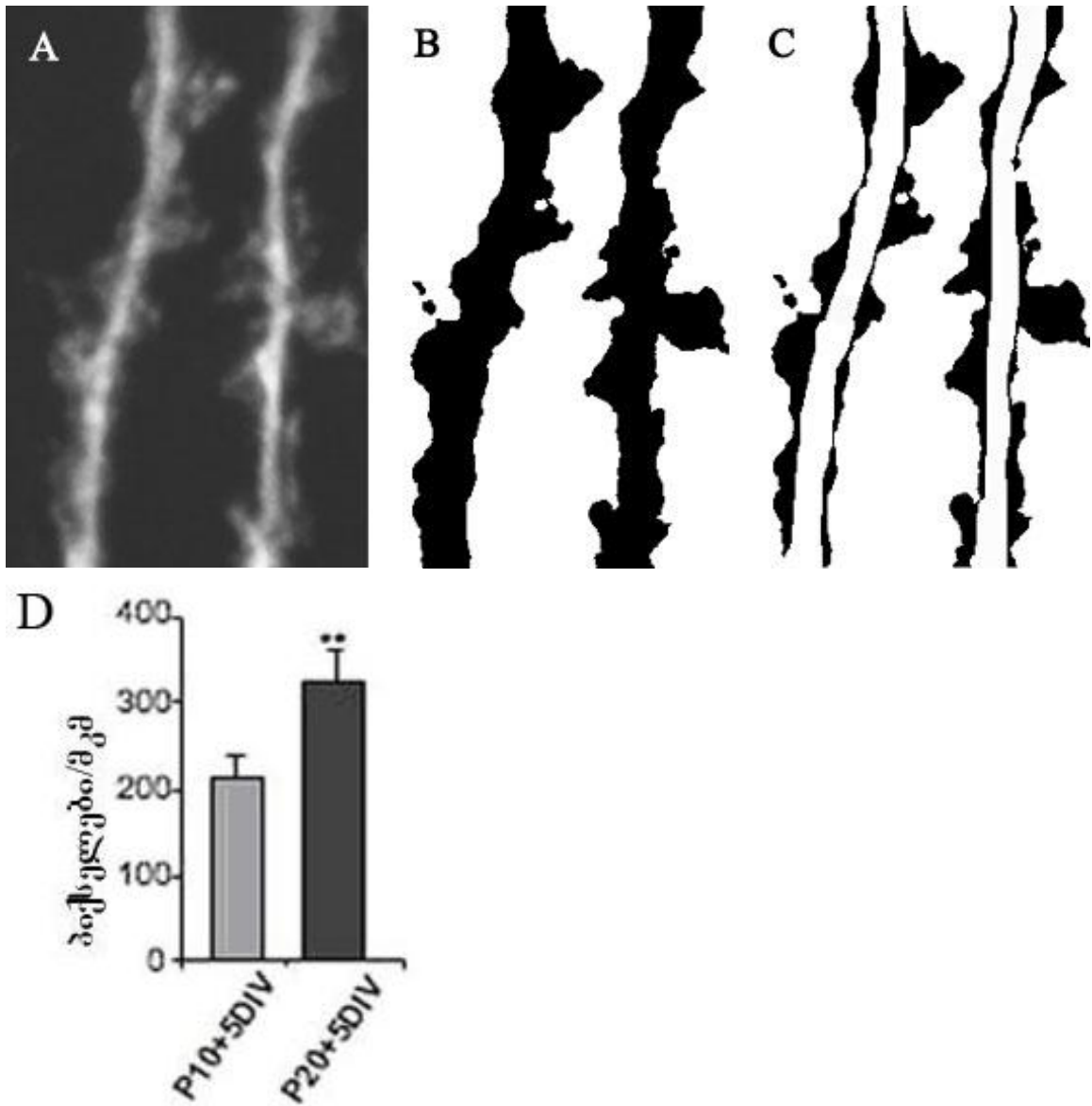
იმისათვის, რომ მიგველო უფრო ნათელი სურათი იმისა, თუ როგორ იცვლებიან ეს მორჩები ჩვენს მიერ არჩეულ დროის ინტერვალში, დავადგინეთ ყველაზე უფრო ხშირად შემჩნეული მორჩების ფორმები: მოკლე, ნათურისებრი, წვრილი გრძელი და დატოტვილი (სურ.15).



**სურ.15.** ოთხი ყველაზე უფრო გავრცელებული ფორმის ბერგმან გლიის ლატერალური მორჩის გამოსახულება (მრავალფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპი) და მათი რაოდენობრივი გადანაწილება P10+5DIV და P20+5DIV ნათების ანათლების კულტურაში

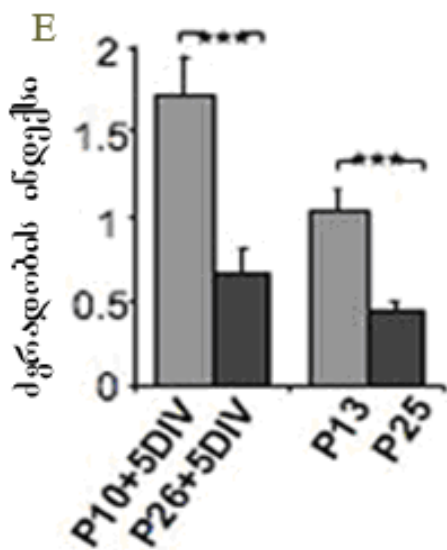
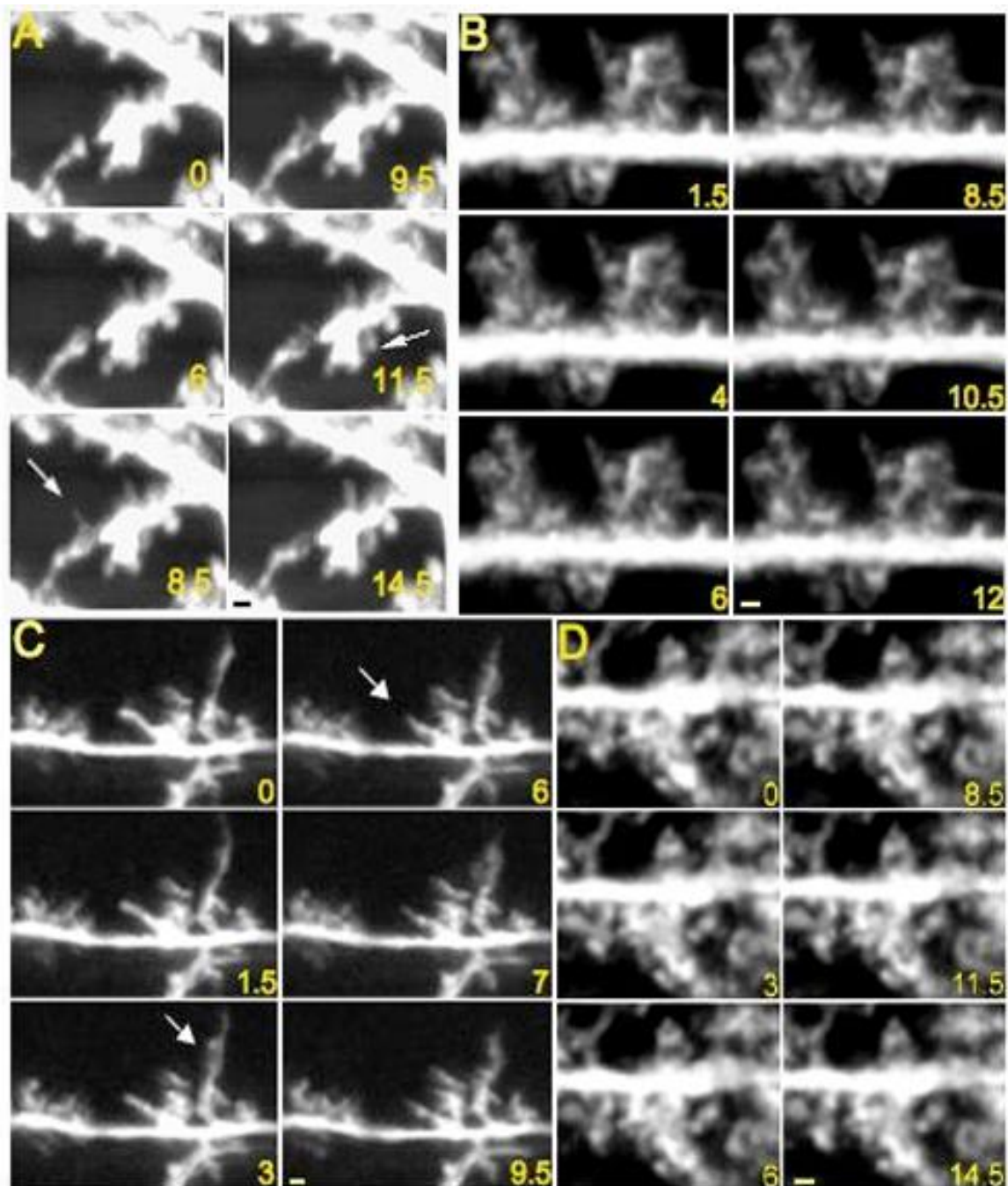
თუმცა ამ ფორმის მორჩებს ვხვდებით როგორც ზრდასრულ, ასევე განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფ ცხოველებში, ზრდასრულ თაგვებში ჭარბობდნენ ნათურისებრი და დატოტვილი მორჩები. რადგანაც ექსპერიმენტის მსვლელობისას გვხვდებოდნენ მორჩები, რომელთა ფორმები არ შეესაბამებოდა არცერთ ზემოთ-ჩამოთვლილ კრიტერიუმებს, ჩვენ ჩავატარეთ დამატებითი გაზომვები საკითხის უფრო კომპლექსური შესწავლისათვის. ჩვენ განვსაზღვრეთ ზედაპირის ინდექსი, ანუ გავზომეთ ყველა პიქსელი ანათლის სურათზე, რომელიც არ ეკუთვნოდა უჯრედის სხეულს და რადიალურ მორჩს (სურ.16). სხვა სიტყვებით, გავზომეთ მთლიანი ზედაპირი ანათლის იმ ნაწილისა, რომელიც დაკავებული ჰქონდა მხოლოდ ლატერალურ მორჩებს იმ მორჩების ჩათვლით, რომლებიც არ ეკუთვნოდნენ ფორმის მიხედვით ჩვენს მიერ შერჩეულ კლასიფიკაციას. ამ გამოთვლებმაც ცხადყო, რომ ასაკის მატებასთან ერთად მორჩების მიერ დაკავებული ზედაპირის ინდექსი გაიზარდა (სურ.16 D),  $p = 0.025$ . P10 ასაკის ცხოველებში: 11 უჯრედი, 31 რადიალური

მორჩი; P20 ასაკის ცხოველებში - 9 უჯრედი, 37 რადიალური მორჩი. ამგვარად, გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების რაოდენობისა და სიგრძის მნიშვნელოვანი ზრდა შეიმჩნევა ცხოველის პოსტნატალური განვითარების მე-2 და მე-3 კვირებში. ამ პერიოდში მიმდინარეობს ინტენსიური სინაპტოგენეზის პროცესიც.



**სურ.16. ზედაპირის ინდექსი.** A - ბიოლისტური ტყვიებით მონიშნული ინდივიდუალური ბერგმანის გლიური უჯრედების გამოსახულება მრავალფოტონიან ლაზერულ მიკროსკოპზე. B - ამავე უჯრედების ბინარიზებული გამოსახულება. C - უჯრედების ბინარიზებულ გამოსახულებას გამოკლებული რადიალური მორჩის მიერ დაკავებული პიქსელების რაოდენობა. დარჩენილი პიქსელების რაოდენობა გაყოფილი გაზომილი მორჩის სიგრძეზე გვაძლევს ზედაპირის ინდექსს. D - ზედაპირის ინდექსი მატულობს ასაკის მატებასთან ერთად. \*\* -  $p=0,025$

როგორც ზემოთ ჩატარებულმა ცდებმა ცხადყო, პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები და ქაცვები მჭიდრო კავშირში იმყოფებიან ბერგმან გლიის რადიალურ და ლატერალურ მორჩებთან. გამოკვლევების საფუძველზე ცნობილია, რომ პურკინიეს უჯრედების ქაცვები ძალზედ მოძრავი არიან განვითარების ადრეულ საფეხურზე, ხოლო მათი ძვრადობა შესამჩნევად იკლებს პოსტნატალური განვითარების გვიან საფეხურზე, რაც ემთხვევა სინაპტოგენეზის პროცესის სტაბილიზაციას (Dunaevsky et al, 1999). რადგანაც, ლიტერატურაში ნაკლებად მოიპოვება მონაცემები ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების დინამიურობაზე, შევისწავლეთ მორჩების ეს მახასიათებლები განვითარების პერიოდში და დავადგინეთ, რომ ამ დროს ბერგმანის გლიური უჯრედებისათვის დამახასიათებელია მორჩების ზრდა, რეტრაქცია და ტრანსფორმაცია. ჩვენ აგრეთვე შევისწავლეთ ბერგმან გლიის მორჩების ძვრადობის დინამიკა განვითარების პერიოდში. ამის განსასაზღვრავად გამოვიანგარიშეთ მორჩების ძვრადობის ინდექსი (Dunaevsky et al, 1999). აღმოჩნდა, რომ ბერგმან გლიის ლატერალური მორჩების ძვრადობის ინდექსი 63%-ით მცირდება პოსტნატალური განვითარების ბოლო კვირებში განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფი მორჩების ძვრადობის ინდექსთან შედარებით (სურ.17 E),  $p < 0.0001$ ; P10 ასაკის ცხოველი: 8 უჯრედი, 47 მორჩი; P20 ასაკის ცხოველი: 8 უჯრედი, 42 მორჩი. გლიური მორჩების დინამიკა ამ დრომდე აღწერილი იყო მხოლოდ ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში (Benediktsson et al., 2005; Haber et al., 2006; Nishida and Okabe, 2007). იმისათვის, რომ შეგვესწავლა გლიური უჯრედების მორჩების მოძრაობის დინამიკა ფიზიოლოგიურ მოდელში, გადავწყვიტეთ ამ უჯრედების მონიშვნა *in vivo* GFP (მწვანე ფლუორესცენტული ცილა) ადენოვირუსით. შემდეგ ცოცხალ ანათლებზე ვაწარმოეთ დაკვირვება გლიური მორჩების დინამიურობაზე. თუმცა, ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების ძვრადობა *in vivo* ცდის დროს უფრო ნაკლები იყო, ვიდრე ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში, ძვრადობასთან დაკავშირებული ცვლილებები განვითარების პერიოდში კვლავ შესამჩნევი იყო. პოსტნატალური განვითარების ადრეულ სტადიასთან შედარებით ლატერალური მორჩების ძვრადობის სიდიდე მცირდებოდა 57%-ით (სურ.17 E),  $p < 0.0001$ ; P13 ცხოველი - 8 უჯრედი, 37 მორჩი; P26 ცხოველი - 4 უჯრედი, 32 მორჩი.



სურ. 17. ბერგმანის გლიური უჯრედების ძვრადობის შემცირება განვითარების პროცესში. GFP-ით მონიშნული ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების მოძრაობის გამოსახულებები დროის გარკვეულ პერიოდში P10+5DIV (A) და P20+5DIV (B) ნათხემის ორგანოტიპული ანათლების კულტურაში. GFP ადენოვირუსით მონიშნული ბერგმანის P13(C) და P25(D) გლიური უჯრედების მორჩების მოძრაობის გამოსახულებები ცოცხალ ანათლებში.

ისრები მიუთითებენ მოძრავ მორჩებს, დრო აღრიცხულია წუთებში. მასშტაბი: 1  $\mu$ m. E. უჯრედის განვითარებასთან ერთად მორჩების ძვრადობა მცირდება როგორც ორგანოტიპულ, ასევე ცოცხალ ანათლებში. \*\*\* -  $p < 0,0001$

ამგვარად, ისევე როგორც პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული ქაცვები, ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩები არიან დინამიური და რეგულირებადი განვითარების პერიოდში.

#### **4.7. მექანიზმები, რომლებიც არეგულირებენ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების ძვრადობას**

ცნობილია, რომ აქტინის პოლიმერიზაცია ნეირონების დენდრიტებსა და ქაცვებში არეგულირებს უჯრედულ მორფოგენეზს და დინამიკურ პროცესებს (Fisher et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999; Hotulainen et al., 2009). იმისათვის, რომ დაგვედგინა არის თუ არა აქტინის პოლიმერიზაცია აუცილებელი ბერგმანის გლიური მორჩების ძვრადობისათვის, ჩვენ P10+5DIV ორგანოტიპული ანათლების კულტურაზე ვიმოქმედეთ 1 მკგ/მლ ციტოკალაზინ D28-ით, რომელიც წარმოადგენს აქტინის პოლიმერიზაციის ინჰიბიტორს. ციტოკალაზინ D28-ს მოქმედების შედეგად ბერგმან გლიის ძვრადობა საგრძნობლად შესუსტდა. აქედან გავაკეთეთ დასკვნა, რომ აქტინის პოლიმერიზაცია აუცილებელია გლიური მორჩების დინამიურობისათვის.

ბერგმანის გლიური უჯრედები საპასუხო რეაქციას იძლევიან ნეიროტრანსმიტერების გამოყოფაზე და დეპოლარიზაციაზე უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობის გაზრდით (Grosche et al., 1999). კალციუმმა შეიძლება შეაღწიოს უჯრედში გლიური უჯრედების მემბრანაზე არსებული რეცეპტორების საშუალებით, მაგალითად, როგორცაა P2 პურინერგული რეცეპტორები (Piet and Jahr, 2007); ან კიდევ მოხდეს უჯრედშიდა მარაგიდან  $Ca^{2+}$ -ის იონების გამონთავისუფლება. ჩვენ გვანტერესებდა, ახდენს თუ არა ეს პროცესები გავლენას ბერგმან გლიის მორჩების ძვრადობაზე. არც კალციუმის ქლორიდის დამატებამ და არც P2 პურინერგული რეცეპტორების ბლოკირებამ PPADS ტეტრანატრიუმის მარილით, მნიშვნელოვნად არ შეცვალა მორჩების ძვრადობა. თუმცა, ანათლებზე 2 მილიმოლარული კოფეინის დამატებამ შეასუსტა ეს პროცესი. აქედან გამომდინარე დავასკვნით, რომ ცალკე აღებული არც

ბერგმან გლიის დეპოლარიზაცია და არც კალციუმის იონების შესვლა P2 პურინერგული რეცეპტორების გავლით არ არეგულირებს მორჩების ძვრადობას, მაგრამ უჯრედშიდა კალციუმის გამოყოფა მნიშვნელოვნად ამცირებს მორჩების ძვრადობას.

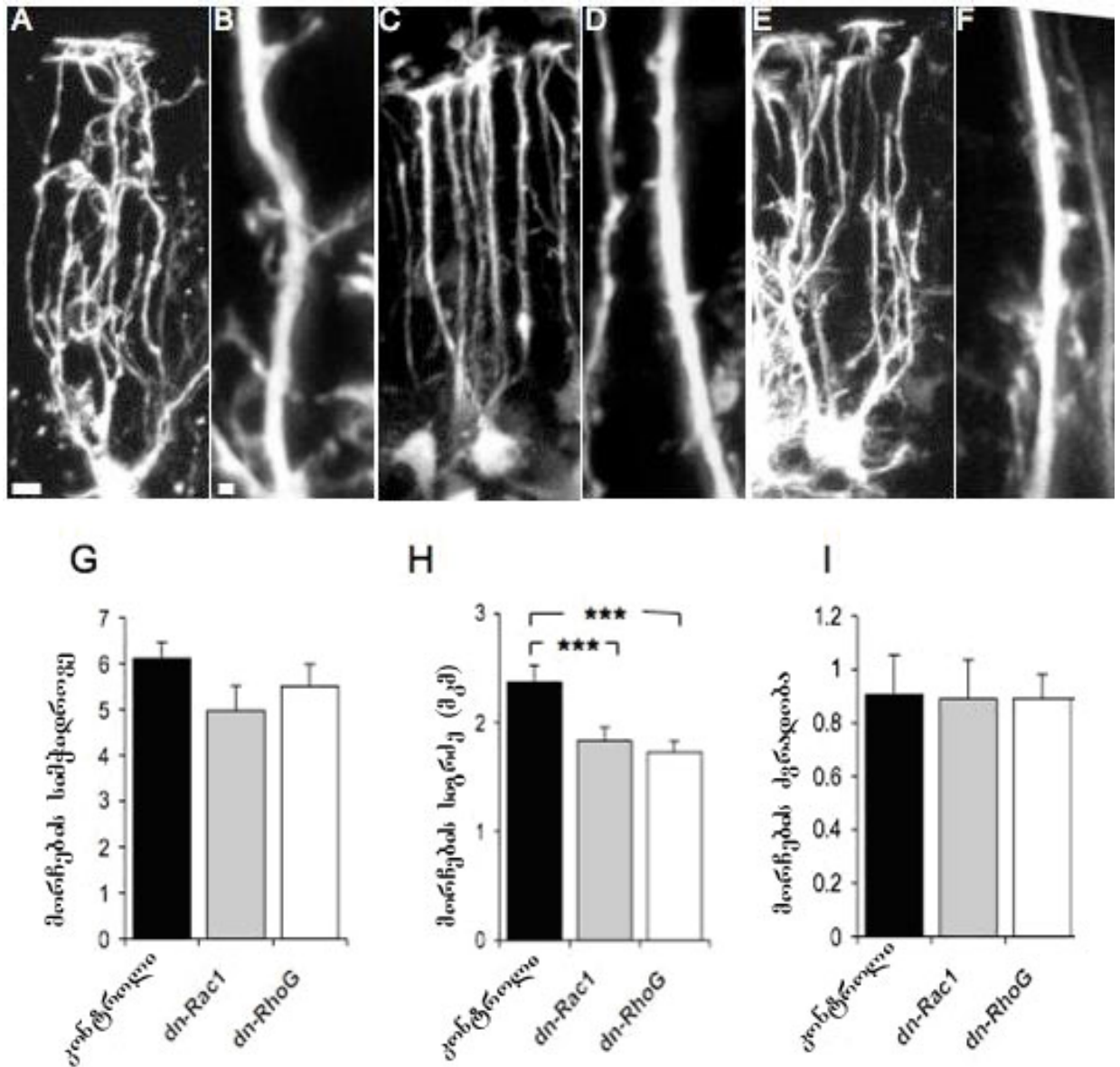
#### 4.8. Rac1 და RhoG-ს როლი გლიური მორჩების სიგრძის რეგულირებაში

ცნობილია, რომ GTP - ჰიდროლაზური ფერმენტების ჯგუფის წარმომადგენლები Rac1 და RhoG დიდ როლს თამაშობენ უჯრედული ციტოჩონჩხის აქტინის პოლიმერიზაციაში (Blangy A, 2000; Tashiro and Yuste, 2004; Nishida and Okabe, 2007). რადგანაც ნათხემის მოლეკულურ შრეში ადგილი აქვს ამ ორივე ცილის ექსპრესიას (O’Kane et al., 2003), ჩვენ დავინტერესდით მათი როლით ბერგმანის გლიური უჯრედების მორფოლოგიასა და ძვრადობის პროცესში. Rac1 და RhoG-ის დომინანტ ნეგატიური ფორმები ხელს უშლიან ენდოგენურ Rac1 და RhoG-ს გადავიდნენ თავიანთ აქტიურ ფორმაში. ამიტომ ჩვენ საექპერიმენტო P11-P12 ასაკის ცხოველებს ვირალური ვექტორის მონიშვნით შევუყვანეთ დომინანტ ნეგატიური Rac1/GFP და RhoG/GFP, ხოლო კონტროლად გამოვიყენეთ ცხოველები, რომელთაც ნათხემში შეყვანილი ჰქონდათ მხოლოდ GFP მარკერი. 48 საათის შემდეგ (რაც საკმარისია ამ ცილების ექსპრესიისათვის) ჩვენ ვაწარმოეთ ამ ცხოველებიდან აღებული ცოცხალი ანათლების დათვალიერება 2-ფოტონიან ლაზერულ მიკროსკოპზე.

ჰოპოკამპიდან მიღებული მონაცემებისგან განსხვავებით (Nishida and Okabe, 2007), ჩვენ ვერ ვიპოვეთ განსხვავება ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების ძვრადობაში დომინანტ ნეგატიური Rac1 და RhoG -ის შეყვანის შემდეგ კონტროლთან შედარებით (სურ.18),  $p = 0.6463$ ; ექსპერიმენტული ჯგუფი - dnRac1 -ით მონიშნული ცხოველი: 10 უჯრედი, 21 მორჩი; dnRhoG -ით მონიშნული ცხოველი: 7 უჯრედი, 22 მორჩი; საკონტროლო ჯგუფი - GFP-ით მონიშნული ცხოველი: 8 უჯრედი, 37 მორჩი. ცვლილებები არ აღირიცხა ქაცვების რაოდენობაშიც (სურ.18).  $p = 0.116$ , dnRac1 ცხოველებში - 21 უჯრედი, 32 მორჩი; dnRhoG ცხოველებში - 21 უჯრედი, 25 მორჩი; საკონტროლო ჯგუფი - 23 უჯრედი, 27 მორჩი. თუმცა ამ დომინანტ ნეგატიური ფორმების შეყვანამ მნიშვნელოვანი ცვლილებები მოგვცა თვით მორჩების სიგრძეებში. კერძოდ, ბერგმან გლიის ლატერალური მორჩების სიგრძე შემცირდა



23%-ით (სურ.18),  $p < 0.0001$ ; dnRac1 ცხოველებში -10 უჯრედი, 190 მორჩი; dnRhoG ცხოველებში - 17 უჯრედი, 286 მორჩი. ამრიგად, ჩვენ დავასკვნით, რომ Rac1 და RhoG თამაშობს მნიშვნელოვან როლს ბერგმანის გლიის მორფოგენეზში, მაგრამ არ იღებს მონაწილეობას მისი დინამიურობის რეგულირებაში.



**სურ.18.** P14 ასაკის თავის ბერგმანის გლიური უჯრედები (ორფოტონიანი ლაზერის მიკროსკოპი) ნათხემის ცოცხალ ანათლებში: (A,B) - GFP ადენოვირუსით მონიშნული, (C,D) - dn-Rac1/GFP-ით და (E,F) - dn-RhoG/GFP. გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩების სიმჭიდროვის ( $10 \mu\text{m}$  მანძილზე) (G), მორჩის სიგრძის (H) და მორჩების ძვრადობის (I) დიაგრამები. მხოლოდ გლიური უჯრედის ლატერალური მორჩების სიგრძემ განიცადა მნიშვნელოვანი ცვლილებები Rac1 და RhoG-ის აქტივობის ბლოკირების შედეგად.

მასშტაბი:  $1 \mu\text{m}$  (A, C, E);  $5 \mu\text{m}$  (B, D, F).  $p = 0.116$  (G); \*\*\* -  $p < 0.0001$  (H);  $p = 0.6463$  (I)

ჩვენს მიერ ბერგმანის გლიური უჯრედების განვითარების პერიოდში მორფოლოგიისა და დინამიკის შესწავლამ ცხადყო, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩები ყველაზე უფრო ინტენსიურად იზრდებიან პოსტნატალური განვითარების მე-2 და მე-3 კვირაში. ამ პერიოდში იცვლება მათი რიცხვი, სიგრძე და ფორმა. განვითარების უფრო ადრეულ სტადიაზე ჩვენ ვნახეთ უფრო დიდი რაოდენობით მსხვილი მოკლე და წვრილი მორჩები. განვითარების უფრო გვიან პერიოდში მორჩების სიგრძე გაიზარდა და მათი ფორმები უფრო კომპლექსური გახდა. გლიური მორჩების ასეთმა განსხვავებულმა ფორმებმა შეიძლება განაპირობონ მათი განსხვავებული ურთიერთობა სინაფსებთან. მაშინ როდესაც მოკლე მორჩებს შეუძლიათ კავშირი დაამყარონ ნაკლები რაოდენობის სინაფსებთან, უფრო გრძელ მორჩებს უნარი შესწევთ მოიცვან დიდი რაოდენობით სინაფსები და წარმოქმნან ელექტრულად იზოლირებული მიკროდომენები. მიკროდომენებს შეუძლიათ სინაფსების მცირე ჯგუფების სინქრონიზება მათი სხვა, გვერდზე მდებარე სინაფსებისაგან იზოლირებით და ამით პატარა ფუნქციური ერთეულების შექმნა (Groshe et al., 2002).

ჩვენს ყველა ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო როგორც ორგანოტიპული ანათლის კულტურა, ასევე ცოცხალი ანათალი. ორგანოტიპული ანათლების კულტურაზე ვაწარმოებდით ინდივიდუალური უჯრედების ბიოლისტურ მონიშვნას, ხოლო *in vivo* - ადენოვირუსით მონიშნული ცხოველებიდან ვიღებდით ცოცხალ ანათლებს, სადაც მონიშნული იყო არა ინდივიდუალური უჯრედები, არამედ უჯრედების დიდი ჯგუფები. თუმცა დენდრიტულ ქაცვებსა და გლიურ მორჩებში უმნიშვნელო ცვლილებები თავს იჩენს ანათლის დამზადებისთანავე, ყველა ეს ცვლილება შექცევადია და უჯრედები თავიანთ ნორმას უბრუნდებიან ანათლის დამზადებიდან 1-2 საათის შემდეგ. ჩვენი ექსპერიმენტების შედეგები როგორც ორგანოტიპული, ასევე ცოცხალი ანათლების შემთხვევაში სრულად ემთხვეოდა ერთმანეთს, რაც გამორიცხავდა რაიმე არტეფაქტის არსებობას ადენოვირუსით მონიშვნის შემთხვევაში.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ცდებმა ცხადყო, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების ძვრადობა რეგულირდება მათი მორფოლოგიის ჩამოყალიბების პარალელურად. ანუ მორჩები გაცილებით უფრო ძვრადი არიან განვითარების

ადრეულ საფეხურზე და მათი ძვრადობა საგრძნობლად იკლებს, როდესაც ისინი მორფოლოგიურად ჩამოყალიბებულნი არიან.

ბერგმან გლიის მორჩების დინამიურობა არ არის აქტივობაზე დამოკიდებული, რადგან ნეირონების აქტივობის გაზრდა ან პირიქით მათი მოქმედების ბლოკირება გლიაზე, არ ცვლის გლიური მორჩების ძვრადობას. ლოკალური დეპოლარიზაცია ზრდის უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობას ბერგმან გლიაში P2 პურინერგული რეცეპტორების აქტივაციის გზით (Piet end Jahr, 2007), რამაც თავის მხრივ გავლენა უნდა იქონიოს მორჩების ძვრადობაზე. მაგრამ ჩვენმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ამ რეცეპტორების ბლოკირება არ იწვევს ბერგმან გლიის მორჩების ძვრადობის ცვლილებებს. ასევე პურკინიეს უჯრედების ქაცვების ძვრადობა არ არის დამოკიდებული აქტივობაზე, რადგანაც ქაცვების ძვრადობა არ იცვლება არც მაღალი კალციუმის კონცენტრაციით და არც გლუტამატური რეცეპტორების ბლოკირებით (Dunaevsky et al., 1999). კოფეინის მოქმედება ამცირებს ბერგმანის გლიური უჯრედების ძვრადობას, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ უჯრედშიდა კალციუმის გამოთავისუფლება შესაძლებელია ახდენს ბერგმან გლიის მორჩების ძვრადობის სტაბილიზაციას. რადგანაც კოფეინი გავლენას ახდენს უჯრედის ფუნქციონირების სხვა ასპექტებზეც, მომავალში აუცილებელი იქნება დავადგინოთ, არის თუ არა უჯრედშიდა კალციუმის გამოთავისუფლება დომინანტური მექანიზმი, რისი საშუალებითაც კოფეინი ცვლის ბერგმანის გლიური უჯრედების ძვრადობას.

ჩვენ ვაჩვენეთ, რომ როგორც დენდრიტული ქაცვები (Fischer et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999) და ასევე ჰიპოკამპური ასტროციტები (Haber et al., 2006), ბერგმანის გლიური მორჩების ძვრადობაც დამოკიდებულია აქტინის ფილამენტების პოლიმერიზაციაზე. ბერგმანის გლიური უჯრედების შემცირებული ძვრადობა არ შეიძლება იყოს გამოწვეული მხოლოდ დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის შემცირებით, რადგან აქტინის პოლიმერიზაციის ბლოკირების შედეგად გლიური უჯრედების დინამიკა საგრძნობლად სუსტდება, მაგალითად, ახალი მორჩების წარმოქმნა ან არსებულის რეტრაქცია. ეს კი არ შეიძლება განპირობებული იყოს დენდრიტული ქაცვების ძვრადობით, ამიტომ ვვარაუდობთ, რომ მორჩების დინამიკის შეცვლა შეუძლია უჯრედშიდა აქტინის პოლიმერიზაციის შემცირებას. GTP - დამაკავშირებელი ცილების წამომადგენელი Rac1, რომელიც მონაწილეობას იღებს აქტინის

გადანაწილებაში, მოქმედებს აქტინ-დამოკიდებული დენდრიტული ქაცვების ძვრადობაზე (Tashiro and Yuste, 2004) და ჰიპოკამპური ასტროციტების მობილურობაზე (Nishida and Okabe, 2007). თუმცა ჩვენ ექსპერიმენტებში ენდოგენური Rac1 და RhoG ბლოკირებამ დომინანტ ნეგატიური Rac1 და RhoG-ით გავლენა არ იქონია მორჩების ძვრადობაზე, მაგრამ მნიშვნელოვნად შეამცირა მორჩების სიგრძე. აქედან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ არსებობს ორი განსხვავებული გზა: ერთი RhoG/Rac1-დამოკიდებული და მეორე ჯერჯერობით უცნობი რაიმე მარეგულირებელი ცილა, რომელიც აკონტროლებს ბერგმანის გლიურ უჯრედებში მორჩების ზრდისა და მათი დინამიურობის პროცესებს.

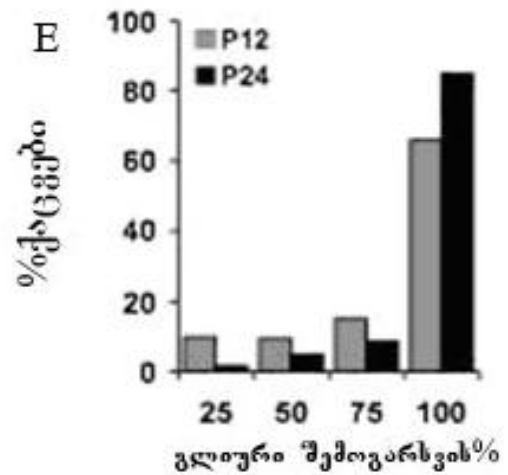
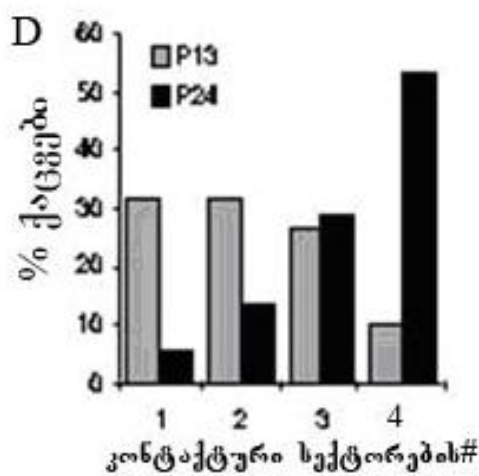
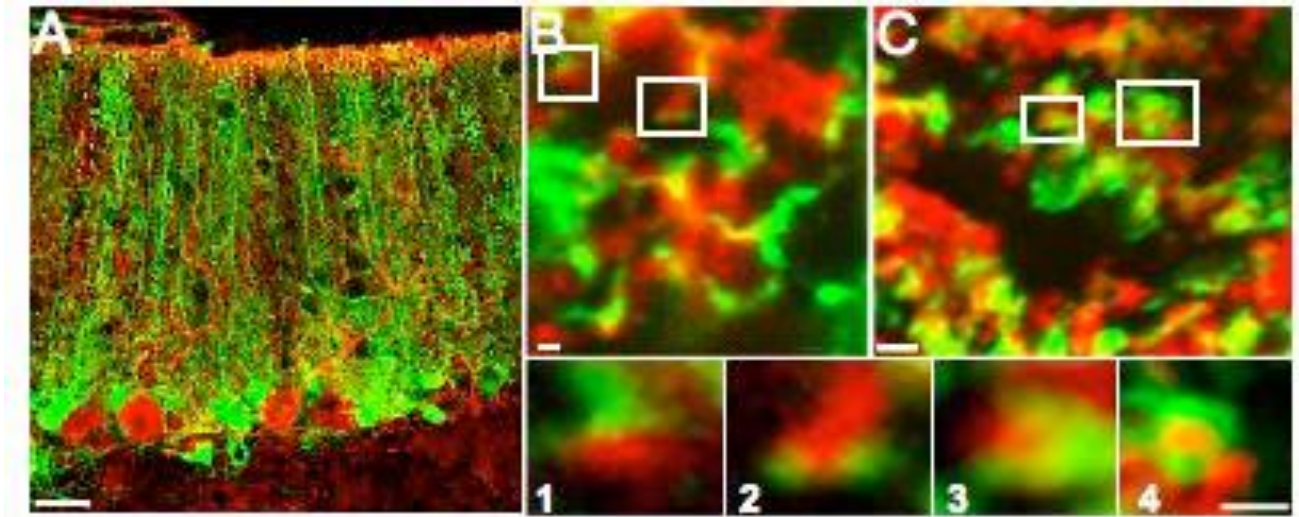
#### **4.9. გლიის მიერ სინაფსების შემოგარსვის პროცესის განვითარება სინაპტოგენეზის პერიოდში**

როგორც ლიტერატურული მონაცემებიდან არის ცნობილი, პოსტნატალური განვითარების მე-3 კვირის ბოლოს ნათხემის ყველა ამაგზნებელი სინაფსი შემოგარსულია ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალური მორჩებით (Spacek, 1985; Groche et al, 2002). მჭიდრო მორფოლოგიური კავშირი გლიურ მორჩებსა და სინაფსებს შორის უზრუნველყოფს ნეირონ-გლიურ ინტერაქციას სინაფსების დონეზე (Halassa et al., 2007). გლიით სინაფსის შემოგარსვის როლის განსაზღვრისადმი ინტერესი გაიზარდა მას შემდეგ, რაც დადგინდა, რომ თავვებს, რომელთა გლიური ცილის ექსპრესია შეცვლილია, დაქვეითებული აქვთ მეხსიერება (Gerlai et al., 1995; Shibuki et al., 1996). მიუხედავად ამ საკითხისადმი ინტერესისა, დღემდე კარგად არ არის შესწავლილი გლიის როლი, როგორც სინაფსების შემომგარსველი ერთეულებისა. სწორედ ამ მიზნით შევისწავლეთ ბერგმანის გლიური უჯრედების მიერ სინაფსების შემოგარსვის განვითარების მორფოლოგია და დინამიკა სინაპტოგენეზის პროცესში, თუ როგორ არის დაკავშირებული შემოგარსვის პროცესი თვით ბერგმან გლიის განვითარებასთან და რა გავლენას ახდენს სინაფსურ ელემენტებზე გლიის მიერ სინაფსების შემოგარსვის შემცირება.

გლიური უჯრედები შემოგარსავენ სინაფსებს მთელს ტვინში: ჰიპოკამპში, ქერქში, ნათხემში (Spacek, 1985; Groshe et al., 1999; Ventura and Harris, 1999). იმის დასადგენად, თუ როგორ კორელაციაში იმყოფება გლიის მორჩების განვითარება მის მიერ

სინაფსების შემოგარსვის პროცესთან ნათხემში, ჩვენ კონფოკალური მიკროსკოპის საშუალებით ვაკვირდებოდით პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმან გლიას განვითარების ადრეულ და გვიან ეტაპებზე. ბერგმან გლიის *in vivo* GFP ადენოვირუსით მონიშვნის შემდეგ P12-14 და P24-25 ცხოველების ანათლები შევღებეთ პურკინიეს უჯრედების მარკერით - კალბინდინით, რათა ადვილი ყოფილიყო ამ ორი ტიპის უჯრედების ვიზუალიზაცია (სურ.19 A). ამის შემდეგ ვახდენდით ამ უჯრედების გადაღებას კონფოკალური მიკროსკოპით. ახალგაზრდა ცხოველებში პურკინიეს უჯრედების ქაცვების უმრავლესობა კონტაქტში იმყოფებოდა ბერგმან გლიის მორჩებთან მხოლოდ ერთი ან ორი მხრიდან, მაშინ როდესაც უფრო ასაკოვან ცხოველებში ქაცვები უმეტესად მთლიანად გარშემორტყმული იყვნენ გლიური მორჩებით.

იმისათვის, რომ დაგვეანგარიშებინა გლიური მორჩების მიერ ქაცვების შემოგარსვის სიდიდე, ჩვენ თითოეული ქაცვი დავყავით ფართობის მეოთხედებად და ვითვლიდით, თუ რამდენი მეოთხედი (სექტორი) იყო კონტაქტში ბერგმან გლიის მორჩთან. P24 ასაკის თაგვებში ბერგმანის გლიური უჯრედები უფრო სრულად შემოგარსავენ დენდრიტულ ქაცვებს, ვიდრე ამას ადგილი აქვს P13 თაგვებში; ანუ უჯრედების მორფოლოგიურ განვითარებასთან ერთად გლიური შემოგარსვაც იზრდება (სურ.19 D),  $p < 0.0001$ ; P13 ასაკის 4 ცხოველი, 232 მორჩი; P24 - 4 ცხოველი, 313 მორჩი.



სურ.19. ბერგმან გლიის მიერ დენდრიტული ქაცვების შემოგარსვის ზრდა განვითარების პროცესში. (A) იმუნოციტოქიმიურად - კალბინდინით შეღებილი პურკინიეს უჯრედები (წითელი) ნათხემის ცოცხალ ანათლებში GFP-ადენოვირუსით მონიშნულ თაგვებში. ქაცვების გლიური შემოგარსვა იზრდება P13 (B) - P24 (C) ინტერვალში. დიდი გადიდების B და C გამოსახულება ქვემოთ შესატყვისი ციფრებით გამოხატავს თუ წითელი ქაცვის რამდენი სექტორი (1-4) იმყოფება მწვანე გლიურ მორჩთან კონტაქტში.

D - ამ მონაცემების დიაგრამა;  $p < 0,0001$

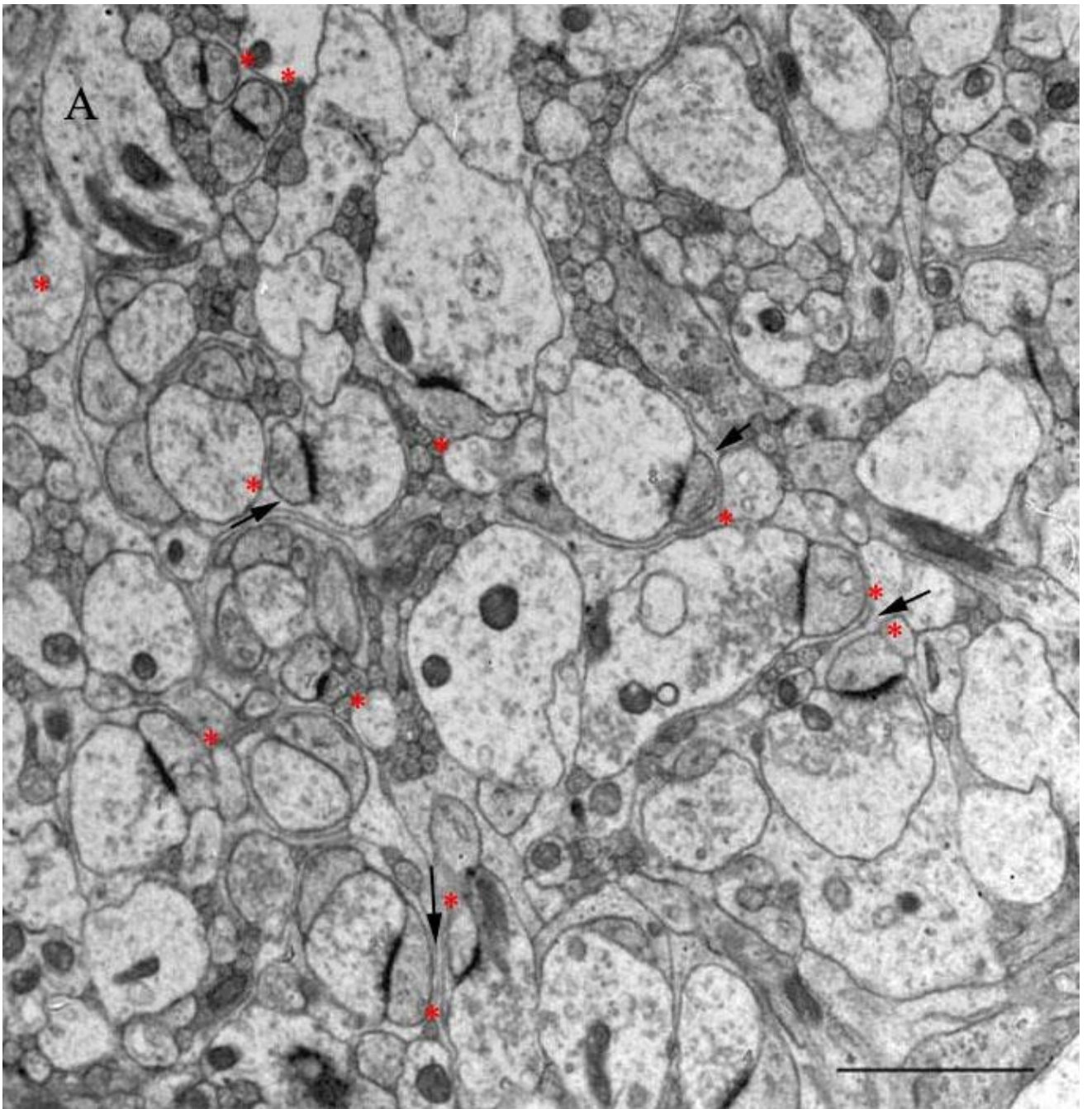
E - P13 და P24 ასაკის თაგვებში ელექტრონოგრაფებზე აღრიცხული შემოგარსვა;  $p < 0,0001$

მასშტაბი: 20 $\mu$ m (A), 1  $\mu$ m (B), 4.2  $\mu$ m(C) ; B და C დიდი გადიდებისათვის - 1  $\mu$ m

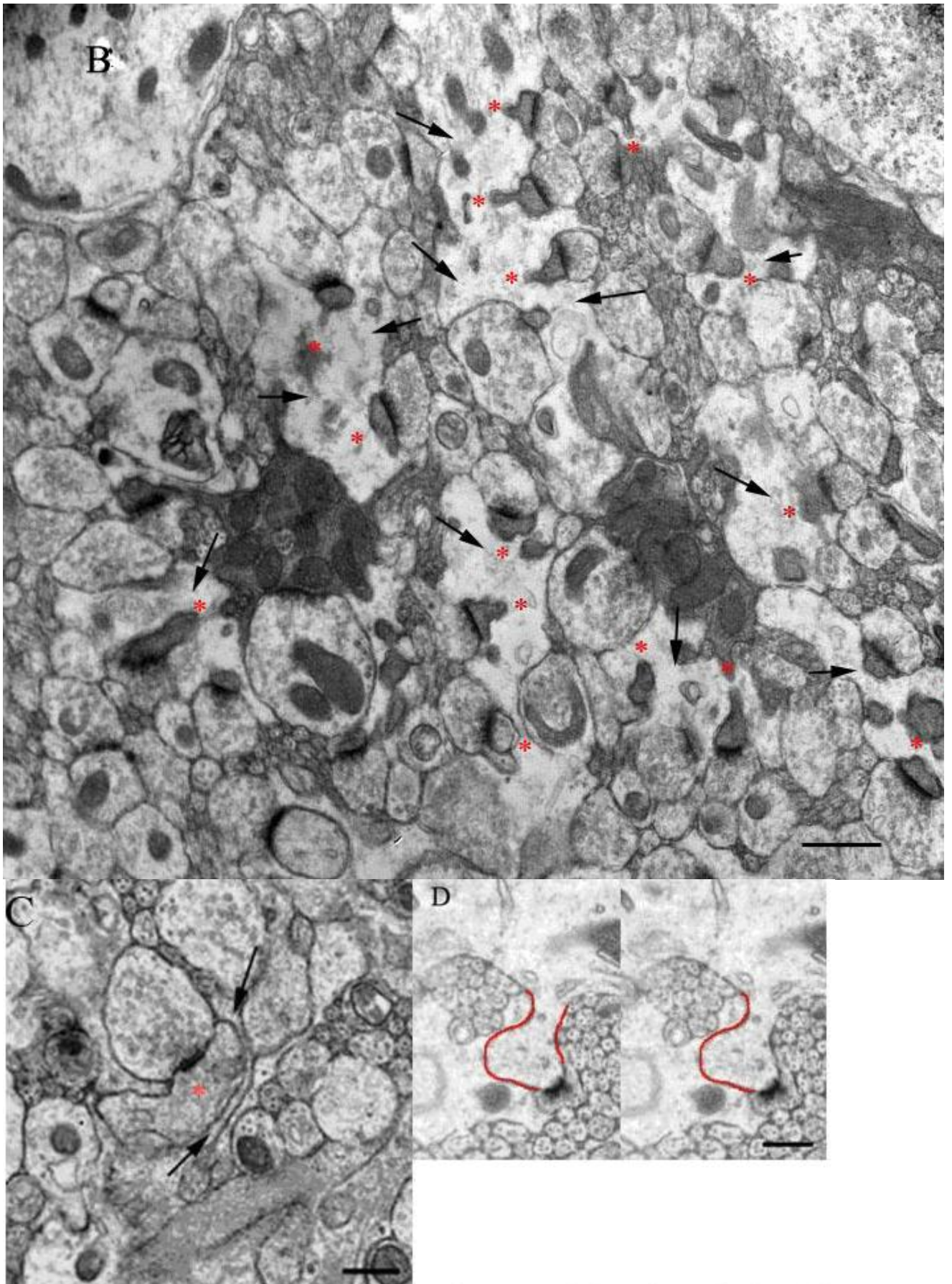
ახალგაზრდა თაგვებში გლიურ მორჩებსა და ქაცვებს შორის კონტაქტი უფრო ნაკლებია, ხოლო უფრო ასაკოვან თაგვებში გლიური მორჩები უფრო სრულად შემოგარსავენ ქაცვებს. რაც მიუთითებს იმ ფაქტზე, რომ განვითარების უფრო გვიან საფეხურზე გლიის შემომგარსველი როლი იზრდება. თავის მხრივ, ეს პროცესი

ემთხვევა განვითარების იმ პერიოდს, როდესაც იზრდება გლიური მორჩების რიცხვი, სიგრძე და მათი ფორმები უფრო კომპლექსური ხდება.

ამავდროულად, ჩვენ დავუშვით შესაძლებლობა იმისა, რომ ზოგიერთ გლიურ მორჩში არ შეაღწია ადენოვირუსმა, რის გამოც არ მოხდა მისი მონიშვნა და ვიზუალიზაცია. ასეთ შემთხვევაში ჩვენი მხედველობის არიდან გამორჩენილი იქნებოდნენ ის ქაცვები, რომლებიც კონტაქტში იყვნენ მოუნიშნავ გლიურ მორჩებთან. ამ შეცდომის თავიდან ასაცილებლად, ჩვენ იგივე ანალიზი ჩავატარეთ ელექტრონული მიკროსკოპიის დონეზე, სადაც ქაცვებსა და გლიურ მორჩებს შორის კონტაქტი არ იყო დამოკიდებული ვირუსით მონიშვნაზე. ჩვენ სინაფსების იდენტიფიკაციას ვახდენდით პოსტსინაფსური შემკვრივების საშუალებით. ელექტრონოგრაფიაზე გლიური მორჩები ნაკლებად შეიცავენ სხვადასხვა ორგანელებს, ამიტომ ისინი უფრო მკრთალად გამოიყურებიან, ვიდრე პურკინიეს უჯრედების ქაცვები (სურ.20). გლიური მორჩების მიერ პურკინიეს უჯრედების ქაცვების შემოგარსვის სიდიდეს ვზომავდით შემდეგი 2 გაზომილი სიდიდით: **S1**-მთელი ქაცვის პერიმეტრი იმ ადგილის გამოკლებით, სადაც იგი კონტაქტშია პრესინაფსურ ელემენტთან; **S2**-ქაცვის ის პერიმეტრი, რომელიც კონტაქტშია გლიურ უჯრედთან. შემოგარსვის პროპორციას ვადგენდით ფარდობით **S2/S1** (სურ.20 D) ამით ჩვენ ვითვლიდით შემოგარსვის პროცენტულ სიდიდეს. ჩვენ ეს პროცენტული მაჩვენებელი დავყავით ოთხ შუალედად: 0-25% შემოგარსვა, 25-50% შემოგარსვა, 50-75% შემოგარსვა, 75-100% შემოგარსვა. ელექტრონოგრაფიაზე ვნახეთ, რომ გლიური უჯრედების მიერ დენდრიტული ქაცვების შემოგარსვა იზრდება ასაკთან ერთად, კერძოდ, სრული შემოგარსვა (75-100%) გაცილებით მეტია P24 თაგვებში ვიდრე P12 თაგვებში (სურ.19 E),  $p < 0.0001$ ; P12 ასაკის თაგვები - 21 მხედველობის არე (ელექტრონოგრაფია), 274 ქაცვი; P24 ასაკის თაგვები - 32 მხედველობის არე, 560 ქაცვი.







სურ.20. ბერგმანის გლიური უჯრედების მიერ ნათხეშში დენდრიტული ქაცვების შემოგარსვის ელექტრონოგრამები. მოლეკულური შრე; A - P12 ასაკის თაგვის და B - P24

ასაკის თავის ნათხემის ანათლები (ვარსკვლავებით მითითებულია პურკინის დენდრიტული ქაცვები, ისრებით - ბერგმანის გლია). P24 ასაკის თავებში გლიური უჯრედებით დენდრიტული ქაცვების სრული შემოგარსვა მნიშვნელოვნად გაზრდილია. C - P24 თავის დიდი გადიდების ელექტრონოგრამა (ვარსკვლავი - დენდრიტული ქაცვი, ისარი - ბერგმანის გლია) D - გლიური შემოგარსვის განსასაზღვრად აღებული 2 პარამეტრის გამოსახულება. მასშტაბი: A- 2  $\mu$ m; B- 500nm; C,D- 2  $\mu$ m.

ჩვენს მიერ კონფოკალური და ელექტრონული მიკროსკოპით ჩატარებული გამოთვლების შედეგები დაემთხვა ერთმანეთს. ანუ განვითარების გვიან პერიოდში მყოფ ცხოველებში ბერგმანის გლიური მორჩების მიერ სინაფსების შემოგარსვის პროცენტული მაჩვენებელი იზრდება (სურ.19 D,E).

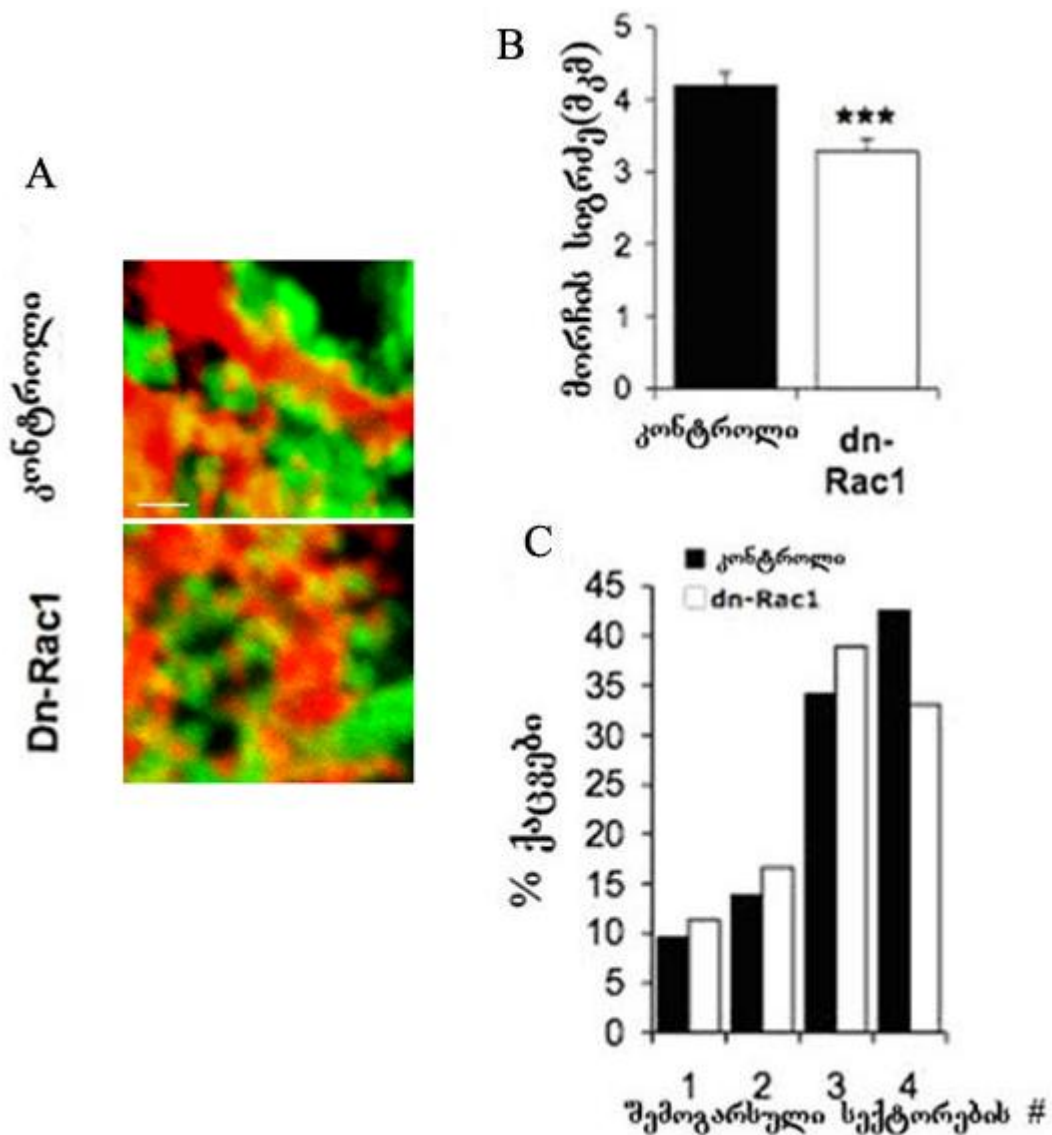
#### **4.10. გლიის მორჩების სიგრძის შემცირება იწვევს მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვის შემცირებას**

საინტერესოა, არის თუ არა განვითარების პერიოდში გლიური მორჩების სიგრძის მომატება მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვის სიდიდის გაზრდასთან დაკავშირებული? ჩვენს წინა ცდებში ვაჩვენეთ, რომ ახალგაზრდა ცხოველებში Rac1-ის ბლოკირება დომინანტ ნეგატიური Rac1-ით იწვევს ბერგმან გლიის მორჩების სიგრძის შემცირებას და გადავწყვიტეთ, სწორედ ეს მოვლენა გამოგვეყენებინა იმისათვის, რომ დაგვედგინა კორელაცია გლიური მორჩების სიგრძესა და მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვის სიდიდეებს შორის. თავდაპირველად შევამოწმეთ იწვევს თუ არა დომინანტ ნეგატიური Rac1-ის შეყვანა ზრდასრულ თავებში იგივე მოვლენას ანუ ბერგმან გლიის მორჩების სიგრძის შემცირებას. ამ მიზნით P23 ასაკის თავების ნათხემში შევიყვანეთ GFP-dn-Rac1 ადენოვირუსი, ხოლო კონტროლად გამოვიყენეთ იგივე ასაკის თავები, რომელთაც შეყვანილი ჰქონდათ მხოლოდ GFP ადენოვირუსი (სურ.21 A) გლიური მორჩებით სინაფსების შემოგარსვის ხარისხის გასაზომად ანათლები შევღებეთ იმუნოციტოქიმიურად კალბინდინით. ცდების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ ექსპერიმენტულ ცხოველებში გლიური მორჩების სიგრძე შემცირდა 22%-ით კონტროლთან შედარებით (სურ.21 B).  $p=0.001$  საკონტროლო ჯგუფი - 7 ცხოველი, 119 მორჩი; ექსპერიმენტული ჯგუფი - 5 ცხოველი, 137 მორჩი. გარდა ამისა, dn-Rac1 ექსპერიმენტულ ჯგუფში გლიის მიერ დენდრიტული ქაცვების

შემოგარსვის პროცენტული მაჩვენებელი ნაკლებია კონტროლთან შედარებით. ანუ dn-Rac1 ექსპრესირებულ თაგვებში 75-100%-იანი დენდრიტების ქაცვების შემოგარსვა 10%-ით ნაკლებია კონტროლთან შედარებით (სურ.21 C).  $p=0.002$ ; 7 ცხოველი საკონტროლო ჯგუფიდან, 774 ქაცვი; 5 ცხოველი ექსპერიმენტული ჯგუფიდან, 792 ქაცვი.

მონაცემების ანალიზმა გვიჩვენა, რომ საკონტროლო თაგვებში იმ სინაფსების რიცხვი, რომლებიც მთლიანად იყვნენ შემოსაზღვრული გლიური მორჩებით 10%-ით აღემატებოდა იგივე მაჩვენებელს ექსპერიმენტულ ცხოველებში.

ამრიგად, ბერგმან გლიის მორჩების სიგრძე ზრდა-განვითარების პროცესში დაკავშირებულია მათ მიერ პურკინიეს უჯრედებზე არსებული სინაფსების შემოგარსვის სიდიდესთან.



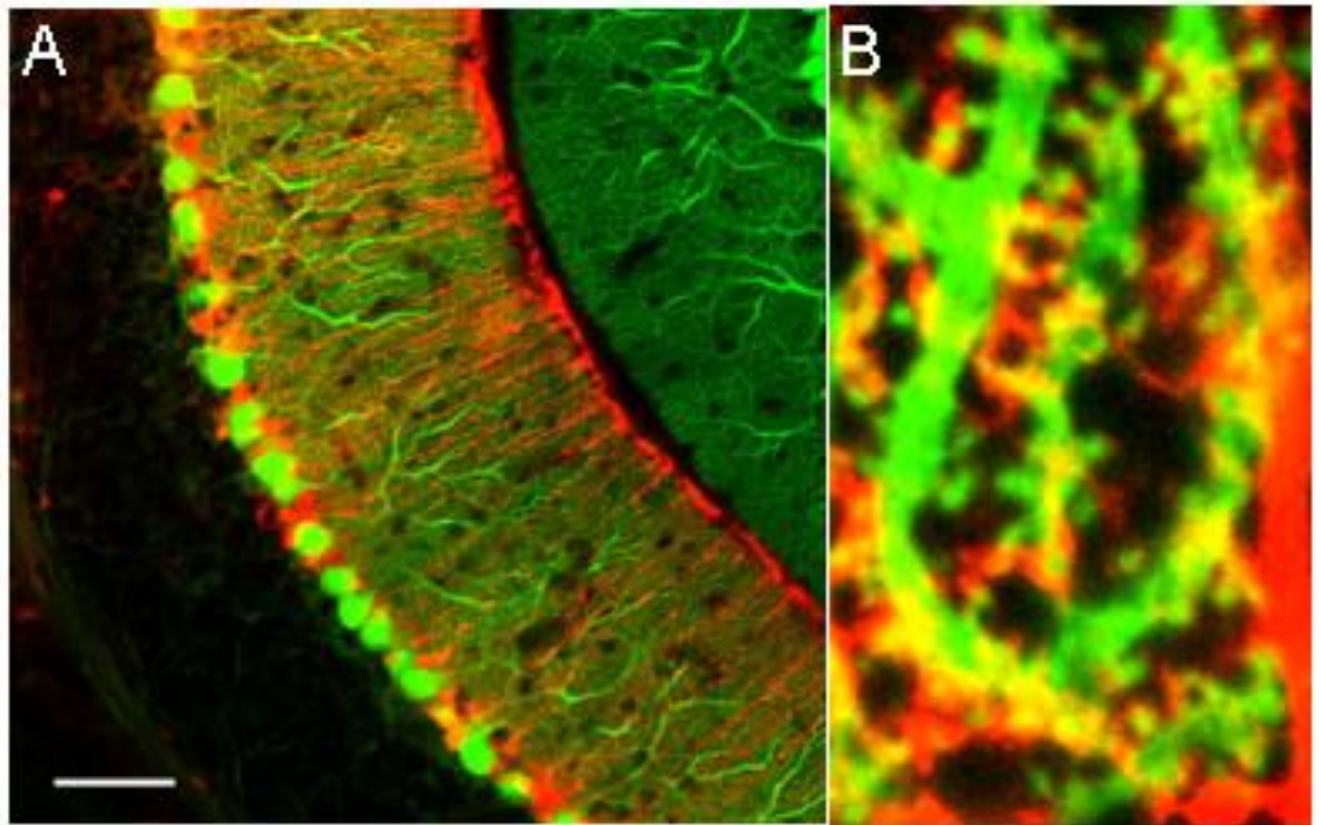
სურ.21. P24 ასაკის თაგვებში შემცირებული გლიური მორჩების სიგრძე დენდრიტული ქაცვების შემცირებულ გლიურ შემოგარსვასთან არის კორელაციაში. A - GFP (ზედა) და dnRac1/GFP (ქვედა) ადენოვირუს-შეყვანილი და კალბინდინით შეღებილი ნათხემის ანათლები. პურკინიეს უჯრედები (წითელი), ბერგმანის გლიური უჯრედები (მწვანე). dnRac1 მოქმედების შედეგად დამოკლებული (B) ბერგმან გლიის მორჩები ნაკლები სიდიდით შემოსაზღვრავენ დენდრიტულ ქაცვებს. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი კლება აღინიშნება სრულ შემოგარსვაში (C). მასშტაბი: 1μm. (A); \*\*\*- p=0,001 (B); p =0.002(C)

#### 4.11. ბერგმან გლიის შემომგარსველი როლი სინაფსების ჩამოყალიბებასა და მათ სტაბილიზაციაში

ჩვენ ზემოთაღწერილ ცდებში ვაჩვენეთ, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებზე სინაფსების შემოგარსვა ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩებით დასრულებულია სინაპტოგენეზის პროცესის ბოლოსათვის. იმისათვის, რომ გაგვესაზღვრა თუ რა ფუნქცია აკისრია გლიური უჯრედების შემომგარსველ ფაქტორს სინაფსების ჩამოყალიბებასა და მათ სტაბილიზაციაში, გადავწყვიტეთ შეგვემცირებინა შემოგარსვის სიდიდე სინაპტოგენეზის გვიან სტადიაზე. ამისთვის გამოვიყენეთ ზემოთ ნახსენები dn-Rac1 და ბერგმან გლიის AMPA რეცეპტორის GluR2 სუბერთეული, რომლის ექსპრესია ბერგმანის გლიაში იწვევს მორჩების შეჭმუხვნას (რეტრაქციას) (ნორმაში ბერგმანის გლიური უჯრედების AMPA რეცეპტორებს არ გააჩნიათ GluR2 სუბერთეული).

პირველ რიგში გვინტერესებდა, ახდენს თუ არა გლიის შემომგარსველი ფუნქცია გავლენას დენდრიტული ქაცვების ძვრადობაზე. როგორც აღვნიშნეთ, დენდრიტული ქაცვები ძალზედ მოძრავნი არიან სინაპტოგენეზის ადრეულ სტადიაზე, ხოლო სინაპტოგენეზის დასრულების მომენტისათვის დენდრიტული ქაცვების ძვრადობა საკმაოდ შემცირებულია (Dunaevsky et al., 1999). ეს შემცირებული ძვრადობა არ არის განპირობებული სინაფსური კონტაქტებით, რადგან ნათხემში პრესინაფსურ პარტნიორთან კონტაქტის შემდეგ დენდრიტული ქაცვი სინაფსების ჩამოყალიბების შემდეგაც ინარჩუნებს ძვრადობის იგივე სიხშირეს (Dunaevsky et al., 2001; Hirrlinger J, 2004; Deng and Dunaevsky, 2005). სხვა სურათია ჰიპოკამპში, სადაც პირამიდული უჯრედების ქაცვები ნაკლებად დინამიურები ხდებიან მას შემდეგ, რაც მათზე ხდება სინაფსების ფორმირება (Korkotian and Segal, 2001). ერთი შესამჩნევი განსახვავება ჰიპოკამპურ და ნათხემის სინაფსებს შორის არის ის, რომ ნათხემში სინაპტოგენეზის დასრულებისთვის სინაფსების უმეტესობა მთლიანად არის შემოგარსული ბერგმან გლიის მორჩებით, ხოლო ჰიპოკამპში შემოგარსვა ნაწილობრივია.

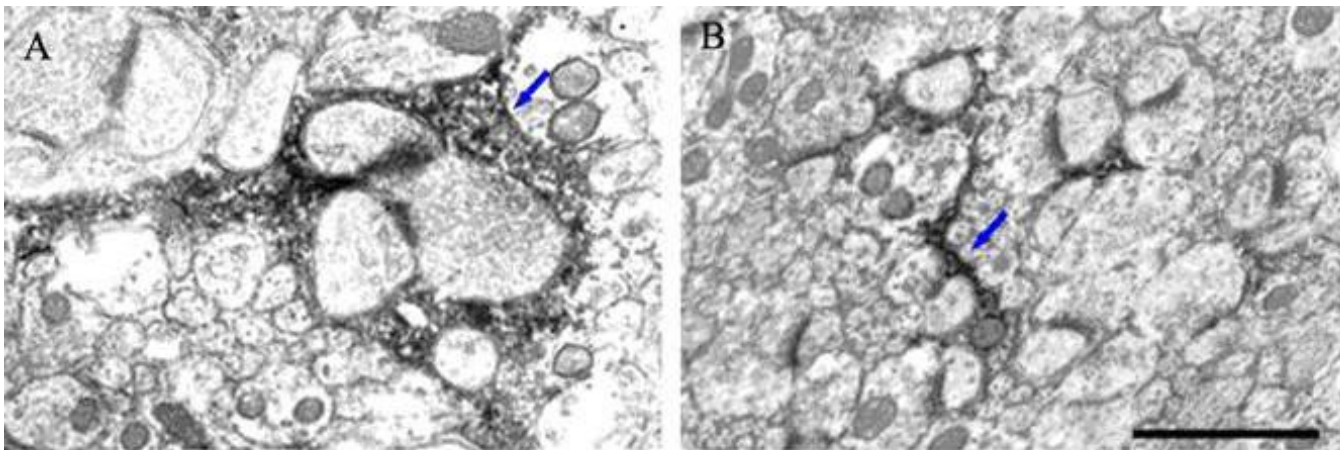
რადგანაც ბერგმან გლიის მორჩების სიგრძის ზრდა და მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვის მომატება ემთხვევა პურკინიეს უჯრედების დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის შემცირებას, დაგვინტერესა, შევძლებდით თუ არა დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის მომატებას იმით, რომ შევამცირებდით ბერგმან გლიის მიერ ქაცვების შემოგარსვის მაჩვენებელს.



სურ.22. A - tdTomato ადენოვირუსით ტრანსდუცირებული P24 ასაკის PCP2 თაგვების ნათხემის ორგანოტიპული ანათალი (მრავალფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპი). ბერგმანის გლიური უჯრედები მონიშნულია წითლად, პურკინიეს უჯრედები მწვანედ. B - ურთერთკავშირი ბერგმანის გლიურ უჯრედებსა (წითელი) და პურკინიეს დენდრიტულ ქაცვებს (მწვანე) შორის. მასშტაბი: 250 $\mu$ m (A) და 4  $\mu$ m (B)

ამ ექსპერიმენტებისათვის ჩვენ გამოვიყენეთ P24 ასაკის ტრანსგენული თაგვები PCP2, რომლებშიც ადგილი აქვს GFP-ის ექსპრესიას პურკინიეს უჯრედების ცილა 2(PCP2) პრომოუტერის კონტროლის ქვეშ. ამ თაგვებში ნათხემის პურკინიეს უჯრედები ფლუორესცენტული მწვანე მარკერით არიან მონიშნულები, ხოლო ბერგმანის გლიური უჯრედების ვიზუალიზაციისათვის PCP2 თაგვებში შევიყვანეთ წითელი ფლუორესცენტული მარკერი tdTomato ადენოვირუსის საშუალებით (Shaner N, 2004) (სურ.22 A,B). საექსპერიმენტო ცხოველებში კი შევიყვანეთ ადენოვირუსი GluR2/tdTomato, რასაც უნდა გამოეწვია ბერგმანის გლიური მორჩების რეტრაქცია. პირველ რიგში დავრწმუნდით, რომ AMPA რეცეპტორების GluR2 სუბერთეულის ექსპრესია მართლაც იწვევს მორჩების შეჭმუხვნას. ამის შემდეგ, სინაფსების შესწავლას ვაწარმოებდით ელექტრონული მიკროსკოპის ელექტრონოგრაფიებზე.

ელექტრონულ მიკროსკოპზე ადენოვირუსით მონიშნული უბნის იდენტიფიკაციას ვახდენდით ანათლების იმუნოციტოქიმიური შედეგით (წითელი ფლუორესცენტული ცილა (RFP)-პირველადი ანტისხეული, პირმუშხას პეროქსიდაზა (HRP)-მეორადი ანტისხეული), რაც ელექტრონოგრაფიაზე გვაძლევს ელექტრონულად მკვრივი ნივთიერების გამოსახულებას (სურ.23 A,B). იმისათვის, რომ დაგვედინა გლიის შემოგარსვის სიდიდე, ვაწარმოებდით იგივე გაზომვებს, როგორსაც Rac1-ის დროს: S1 ქაცვის ის პერიმეტრი, რომელიც კონტაქტში არ არის პრესინაფსურ ტერმინალთან, S2- ქაცვის პერიმეტრი (სურ.23 C), რომელიც შემოგარსულია გლიური მორჩით ელექტრონოგრამებზე. ჩვენ ვნახეთ, რომ იმ თავგებში, რომელთაც შეყვანილი ჰქონდათ GluR2/tomato ვირუსი, გლიური მორჩებით სინაფსების შემოგარსვის სიდიდე საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით შემცირებული იყო 20%-ით (სურ. 24 A),  $p < 0,0001$ ; საკონტროლო ჯგუფი - 4 ცხოველი, 606 სინაფსი; ექსპერიმენტული ჯგუფი - 3 ცხოველი, 408 სინაფსი.

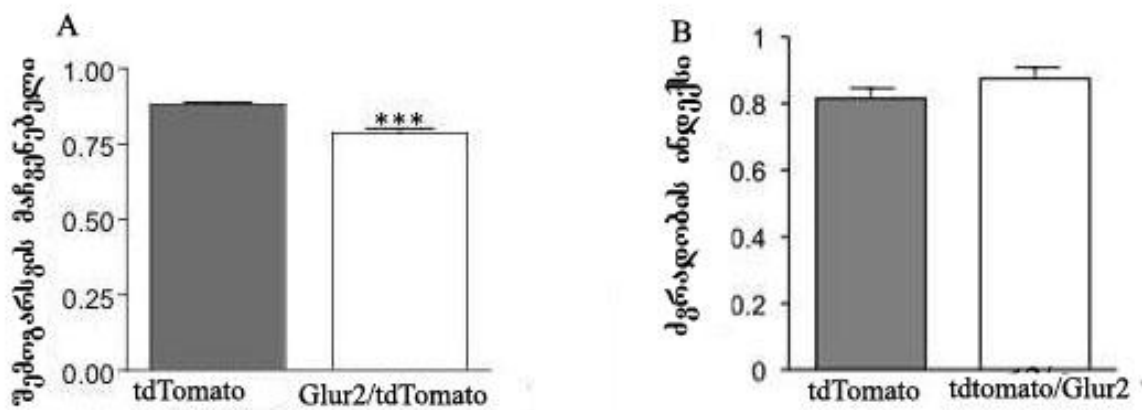


სურ.23. GluR2- ის ექსპრესია ბერგმანის გლიურ უჯრედებში იწვევს დენდრიტული ქაცვების გლიური შემოგარსვის შემცირებას. A -tdTomato და B - tdTomato/GluR2-ით ინდუცირებული

P24 ასაკის თაგვის ნათხემის ანათლის ელექტრონოგრაფია. გლიური უჯრედების იდენტიფიკაცია შესაძლებელია ელექტრონულად მკვრივი HRP-ის საშუალებით. GluR2-ის ექსპრესიის შედეგად სინაფსების შემოგარსვა მნიშვნელოვნად შემცირებულია (B). C - გლიური შემოგარსვის (S1/S2) გამოსაანგარიშებელი კომპონენტების სქემატური გამოსახულება. მასშტაბი: 1µm

ბერგმანის გლიურ უჯრედებში GluR2/tdTomato-ს ექსპრესიის შედეგად გლიური შემოგარსვის მაჩვენებლის დაკლება გაცილებით უფრო დიდი იყო, ვიდრე ამას ადგილი ჰქონდა Rac1-ის შეყვანის შემდეგ, ხოლო ეს მონაცემი ემთხვევა იმ შედეგებს, რომლებიც მივიღეთ ზემოთ აღწერილი P10 ასაკის თაგვებში გლიის შემომგარსველი სიდიდის განსაზღვრის დროს. ასეთი მტკიცებულების შემდეგ უკვე შეგვეძლო შეგვემოწმებინა, თუ რა გავლენას ახდენდა ბერგმან გლიის მორჩების შემომგარსველი სიდიდის შემცირება პურკინიეს დენდრიტული ქაცვების ძვრადობაზე. ჩვენ ვახდენდით ადნოვირუს tdTomato და GluR2/tdTomato - შეყვანილ P24 ასაკის PCP2 თაგვებიდან ცოცხალი ანათლების დათვალიერებას მრავალფოტონიანი ლაზერული მიკროსკოპის საშუალებით. კერძოდ, ვაწარმოებდით პურკინიეს უჯრედების გადაღებას დროის გარკვეულ მონაკვეთში ანათლის იმ უბანში, სადაც მაქსიმალურად იყო ექსპრესირებული tdTomato -ით მონიშნული ბერგმანის გლიური უჯრედები. შემდეგ ქაცვების ძვრადობას ვადგენდით ძვრადობის ინდექსის გამოანგარიშებით. შედეგებმა გვიჩვენა, რომ პურკინიეს ქაცვების ძვრადობის ინდექსი GluR2/tdTomato-ით მონიშნულ თაგვებში მნიშვნელოვნად არ განსხვავდებოდა ამავე მაჩვენებლისაგან საკონტროლო თაგვებში (სურ.24 B).  $p=0.154$ ; საკონტროლო ჯგუფი - 7 ცხოველი, 84 ქაცვი; ექსპერიმენტული ჯგუფი - 5 ცხოველი, 73 ქაცვი. ანუ ბერგმან გლიის მორჩებით ქაცვების სრული შემოგარსვა არ განაპირობებს პურკინიეს უჯრედების ქაცვების შემცირებულ ძვრადობას სინაპტოგენეზის პროცესის ბოლოს.



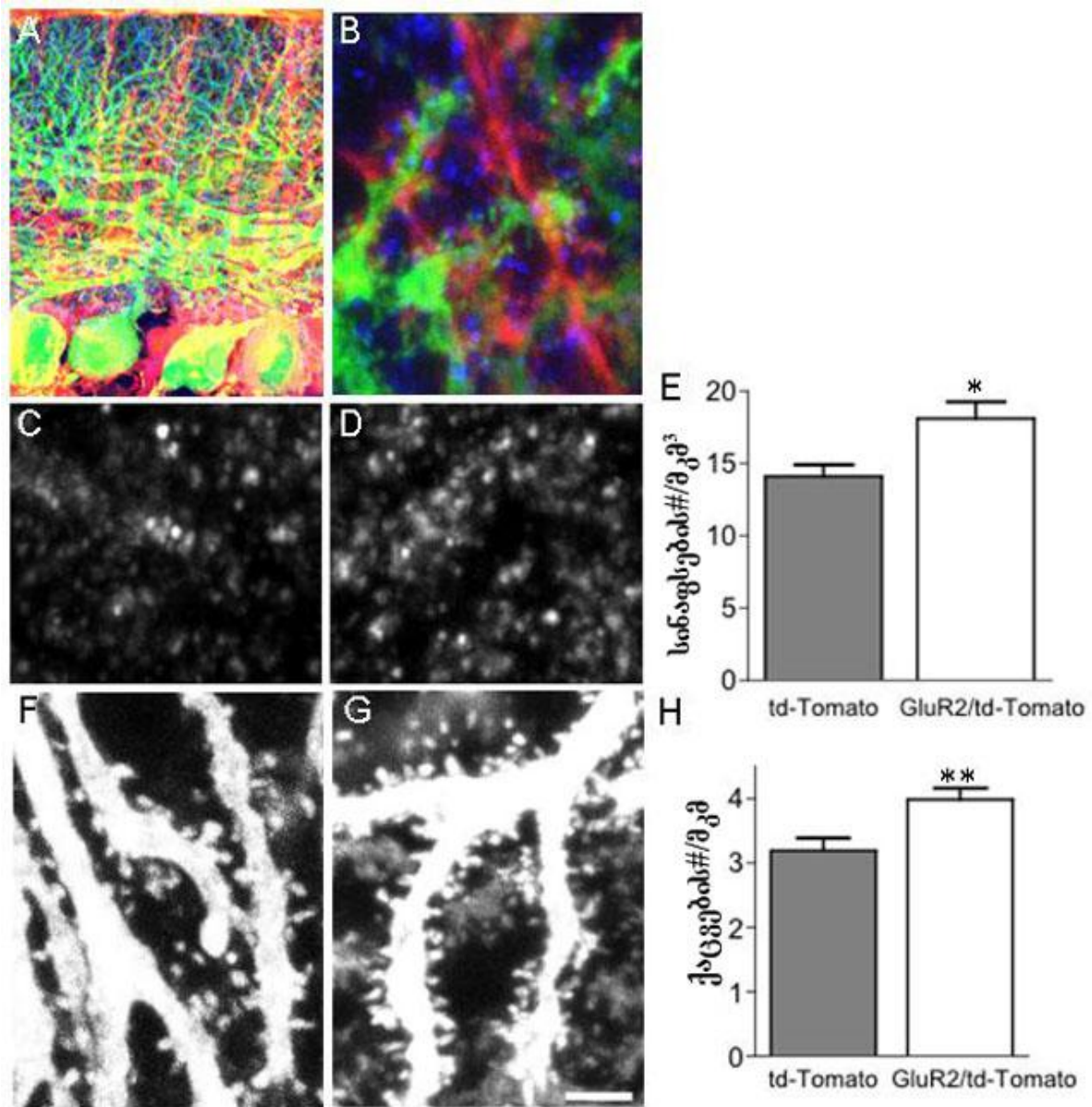


სურ.24. P24 ასაკის, tdTomato და GluR2/tdTomato ინდუცირებული თაგვების ნათხეშში ბერგმანის გლიური მორჩების შემოგარსვის მაჩვენებელი (A) და მორჩების ძვრადობა (B). სინაფსების გლიური მორჩებით შემოგარსვა მცირდება 20%-ით GluR2/ tdTomato ექსპრესირებულ თაგვებში, ხოლო ძვრადობის ინდექსი კი არ იცვლება. \*\*\* -  $p < 0,0001$  (A);  $p = 0.154$  (B).

თუ ბერგმან გლიის შემომგარსველი როლი ან ამ გლიური უჯრედების AMPA  $Ca^{2+}$  განვლადობა გავლენას ახდენს სინაფსების ფორმირებაზე ან მათ სტაბილიზაციაზე, მაშინ GluR2-ის ექსპრესიის შედეგად უნდა შეიცვალოს სინაფსების რაოდენობა. ამის გამოსარკვევად ჩვენ ექსპერიმენტული და საკონტროლო თაგვების ნათხეშის ანათლები შევღებეთ იმუნოციტოქიმიურად - კალბინდინით და პრესინაფსური მარკერით Vglut1-ით (სურ.25 A,B), რის შემდეგაც დავითვალეთ ქაცვებისა და სინაფსების (სინაფსური წერტილების) (სურ.25. C,D) რაოდენობა.

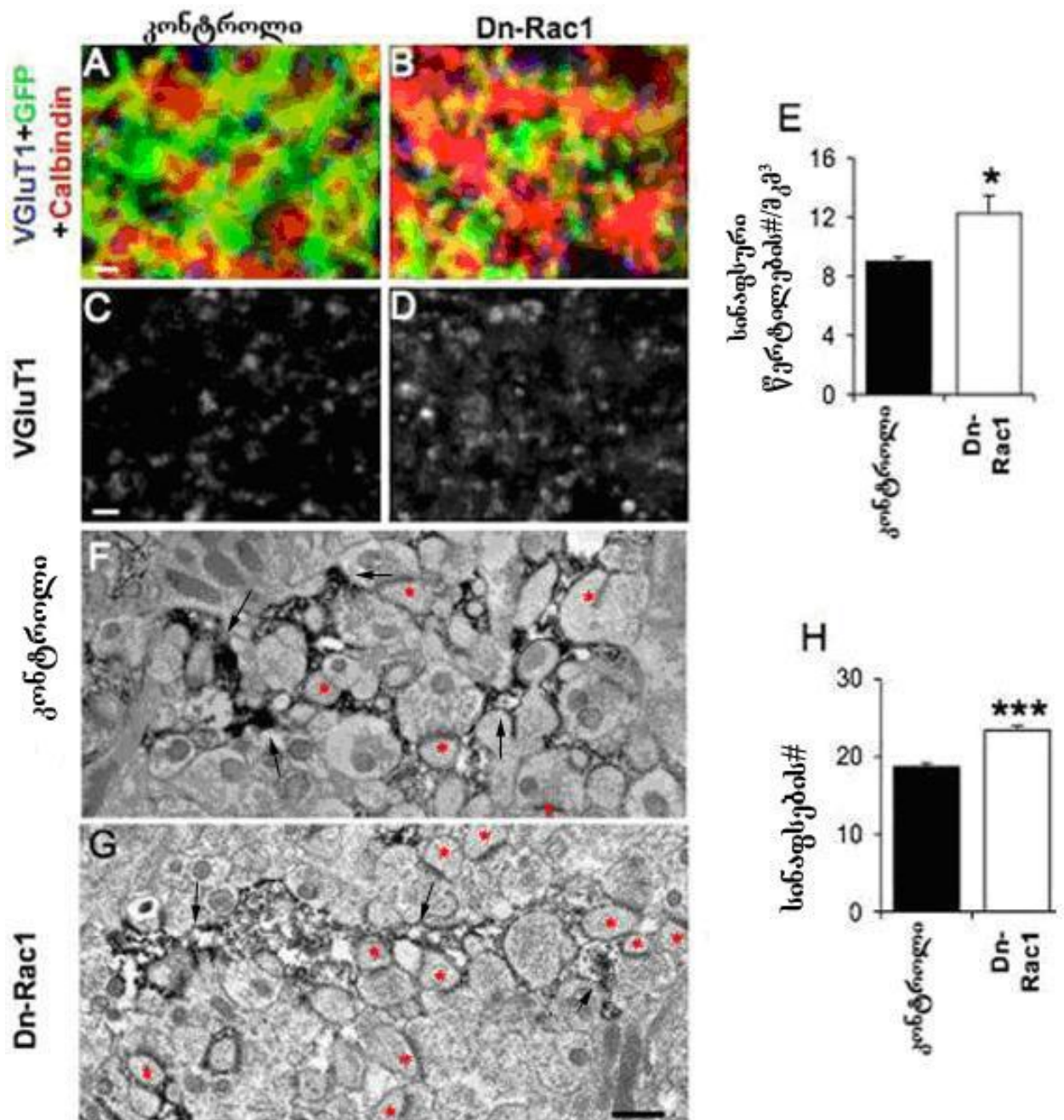
ცდების შედეგებით დადგინდა, რომ საექსპერიმენტო თაგვებში, რომელთა ნათხეშში შეყვანილი იყო GluR2/tdTomato, სინაფსების რიცხვი გაიზარდა 28%-ით კონტროლთან შედარებით (სურ.25 E),  $p = 0.013$ ; 6 tdTomato -მონიშნული თაგვი და 6 tdTomato-GluR2 - თაგვი. ანათლების იგივე უბნებში დავითვალეთ პურკინიეს უჯრედების ქაცვების რაოდენობა (სურ.25 F,G) და ვნახეთ, რომ ქაცვების რიცხვი ექსპერიმენტულ ჯგუფში გაიზარდა 24%-ით (სურ.25 H),  $p = 0.004$ ; 4 tdTomato მონიშნული თაგვი და 5 tdTomato-GluR2 - თაგვი. აქედან გამომდინარე შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ იმ შემთხვევაში თუ გლიური მორჩი მთლიანად არ ფარავს დენდრიტულ ქაცვს, ხდება ახლი სინაფსის უფრო ადვილად წარმოქმნა ან არ ხდება ძველის გამოხშორვა.

ამრიგად, ბერგმანის გლიურ უჯრედებში AMPA რეცეპტორების GluR2-ის სუბერთეულის ექსპრესიის შედეგად, რაც გლიური მორჩის შეჭმუხვნას იწვევს, ადგილი აქვს სინაფსების რაოდენობრივ მატებას, ხოლო ქაცვების ძვრადობა უცვლელი რჩება. აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ რომ, ნათხემში სინაფსების სრული შემოგარსვა ბერგმანის გლიური მორჩებით არ არის მნიშვნელოვანი დენდრიტული ქაცვების ძვრადობისათვის, თუმცა სრული შემოგარსვა შესაძლებელია ახდენდეს შემდგომი სინაპტოგენეზის ინჰიბირებას ან ხელს უშლიდეს არსებული სინაფსების გამოხშირვას. ამიტომ დენდრიტული ქაცვების შემოგარსვა გლიური მორჩებით, რომლებიც შეიცავენ  $Ca^{2+}$  გამტარ AMPA რეცეპტორებს, სავარაუდოთ მოქმედებს სინაფსების რიცხვის სტაბილიზაციაზე. ამასთანავე, არსებობს სხვა რაღაც ფაქტორები, რომლებიც უზრუნველყოფენ დენდრიტული ქაცვების უმოძრაობას. ჯერ კიდევ აუხსნელი რჩება საკითხი იმის თაობაზე, რომ ჩვენს მიერ დადგენილი სინაფსების რაოდენობის მატება არის ფიზიკური ურთიერთკავშირის შედეგი გლიასა და სინაფსს შორის, ანუ გლიური მორჩი იკავებს დენდრიტული ქაცვის იმ ნაწილს, რომელიც მორჩის მოცილების შემდგომ თავისუფლდება და ქაცვს უჩნდება შესაძლებლობა იმ ადგილას დაამყაროს ახალი სინაფსური კავშირი, თუ ეს არის  $Ca^{2+}$  ნაკადის ეფექტი AMPA რეცეპტორების გავლით, რომელთაც არ გააჩნიათ GluR2 სუბერთეული.



სურ.25. ბერგმანის გლიურ უჯრედებში GluR2-ის ექსპრესიის შედეგად მიღებული შემცირებული შემოგარსვა იწვევს ქაცვების რიცხვის მატებას. PCP2 ტრანსგენური თავგების ნათხემის ანათლები კონფოკალურ მიკროსკოპზე: ბერგმანის გლიური უჯრედები (წითელი), რომლებშიც ექსპრესირებულია tdTomato/GluR2, პურკინიეს უჯრედები (მწვანე), პესინაფსური მარკერით VgluT1-ით მონიშნული სინაფსები (ცისფერი), **A** - მცირე გადიდება, **B** - დიდი გადიდება. VgluT1-ით მონიშნული სინაფსური წერტილების იდენტიფიცირება tdTomato -ინდუცირებულ თავგებში (**C**) და tdTomato/GluR2 ადენოვირუსით მონიშნულ თავგებში (**D**). GluR2-ის მოქმედებით შემცირებულმა გლიურმა შემოგარსვამ გამოიწვია სინაფსების რიცხვის გაზრდა (**E**), \* $p=0,013$ . დენდრიტული ქაცვების რაოდენობა დათვლილი იყო tdTomato (**F**) და tdTomato/GluR2 (**G**) ადენოვირუს შეყვანილ ცხოველებში. GluR2-ის მოქმედებით შემცირებულმა გლიურმა შემოგარსვამ გამოიწვია დენდრიტული ქაცვების რიცხვის გაზრდა (**H**), \*\* $p=0,004$ . მასშტაბი: 40 $\mu$ m-**A**, 6  $\mu$ m-**B** და **D**, 5  $\mu$ m -**F** და **G**.

როგორც ჩვენს მიერ ზემოთ ჩატარებული ცდებიდან ჩანს, ბერგმანის გლიურ უჯრედებში დომინანტ ნეგატიური Rac1-ის ექსპრესიის შედეგად ამ უჯრედების მორჩები განიცდიან რეტრაქციას ანუ იგივე მოვლენას აქვს ადგილი, რასაც Glur2-ის შემთხვევაში. ამიტომ გადავწყვიტეთ ჩვენი მონაცემების გადასამოწმებლად (რაც მიღებული იყო Glur2-ის იმპლიცირებით) იგივე ცდები ჩავატარებინა თავებში dnRac1-ის შეყვანით, კერძოდ, გვენახა სინაფსების რაოდენობა და დენდრიტული ქაცვების ძვრადობა. ამისათვის GFP და dnRac1/GFP ადენოვირუსით მონიშნული ცხოველებიდან აღებული ანათლები იმუნოციტოქიმიურად შევღებეთ კალბინდინით (პურკინიეს უჯრედების ვიზუალიზაციისათვის) და პრესინაფსური მარკერით Vglut1-ით (სურ.26 A,B). კონფოკალურ მიკროსკოპზე ვითვლიდით სინაფსურ წერტილებს (სურ.26 C,D). იგივე გამოთვლები ჩავატარეთ ელექტრონული მიკროსკოპის დონეზე (სურ.26 F,G). დათვლის შემდეგ აღმოჩნდა, რომ Vglut1-ით მონიშნული სინაფსების რაოდენობა 27%-ით მეტი იყო ექსპერიმენტულ ჯგუფში (dnRac1) კონტროლთან შედარებით.  $p = 0.014$ ; 4 საკონტროლო ცხოველი (GFP), 5251 სინაფსური წერტილი. 3 ექსპერიმენტული ცხოველი (dnRac1/GFP), 7664 სინაფსური წერტილი (სურ.26 E). ელექტრონოგრაფებზე გაკეთებული გამოთვლებით სინაფსების რიცხვი გაიზარდა 25%-ით dnRac1/GFP თავებში, იმ თავებთან შედარებით, რომელთაც შეყვანილი ჰქონდათ მხოლოდ GFP ადენოვირუსი (სურ.26 H),  $p < 0.001$ ; 99 მხედველობის არე, 3 ცხოველი თითოეული შემთხვევისათვის, ხოლო ქაცვების რაოდენობა გაიზარდა 23%-ით. ამრიგად, ჩვენი მონაცემები სინაფსებისა და დენდრიტული ქაცვების რაოდენობაზე ორივე საექსპერიმენტო ჯგუფში ერთმანეთს დაემთხვა.



სურ.26. dn-Rac1-ის ექსპრესიის შედეგად შემცირებული გლიური შემოგარსვა იწვევს სინაფსების რიცხვის მატებას P24 ასაკის თაგვებში. GFP-(A) და dn-Rac1/GFP-(B) ადენოვირუს ინდუცირებული თაგვების ნათხემის ანათლების გამოსახულებები კონფოკალურ მიკროსკოპზე. ბერგმან გლია (GFP (A) და dn-Rac1/GFP (B)) - მწვანე, პურკინიეს უჯრედის მარკერით (კალბინდინი) მონიშნული პურკინიეს უჯრედები (A;B) -წითელი, პრესინაფსური მარკერით (Vglut1) მონიშნული სინაფსები (A;B) -ცისფერი. A და B-ში Vglut1-ით მონიშნული სინაფსები გადაყვანილია შავ-თეთრ გამოსახულებაზე (სინაფსური წერტილები) - C და D. გლიური შემოგარსვის დაკლება იწვევს მოცულობით ერთეულში სინაფსური წერტილების გაზრდას -E, \* -  $p = 0.014$  .F და G -ნათხემის მოლეკულური შრის ელექტრონოგრაფები. F-

კონტროლი (GFP ადენოვირუს ინდუცირებული თაგვები), **G** - dn-Rac1/GFP ინდუცირებული თაგვები. ბერგმან გლიის (ისრები) იდენტიფიკაცია ადვილია ელექტრონულად მკვრივი (HRP რეაქცია) მასალის არსებობის გამო. სინაფსების (წითელი ვარსკვლავები) რიცხვი საგრძნობლად არის გაზრდილი **G**-ში. სინაფსების რიცხვის საერთო მატება dn-Rac1/GFP ინდუცირებულ თაგვებში - **H**, \*\*\* -  $p < 0,001$ . მასშტაბი: (**A, B, C, D**)=1 $\mu$ m; (**F, G**)=0.5  $\mu$ m

## თავი V. შედეგების ანალიზი და დასკვნები

ჩემს მიერ წარმოდგენილ ნაშრომში, სადაც შესწავლილი იყო ნეირონულ-გლიური ურთიერთობები ნათხეშში, კერძოდ, ურთიერთკავშირი პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმანის გლიურ უჯრედებს შორის, ვაჩვენე, რომ პურკინიეს უჯრედების დენდრიტები განვითარების პერიოდში იზრდებიან სიგრძეში, როგორც ვერტიკალური, ასევე ჰორიზონტალური მიმართულებით. ამ პერიოდში პურკინიეს უჯრედების დენდრიტების უმრავლესობა იმყოფება მჭიდრო კავშირში ბერგმანის გლიური უჯრედების ლატერალურ მორჩებთან და ეს კავშირი არ შემოიფარგლება მხოლოდ დენდრიტული დაბოლოებების დონეზე, როგორც ეს ადრე იყო ნავარაუდები. ერთ-ერთ ყველაზე საინტერესო აღმოჩენას ამ ურთიერთობებში წარმოადგენს ის ფაქტი, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედები მართალია არ წარმოადგენენ პურკინიეს უჯრედებისათვის ზრდის მასტიმულირებელ ფაქტორს, მაგრამ ისინი ასრულებენ საყრდენი სუბსტრატის როლს ვერტიკალურად მზარდი პურკინიეს უჯრედების დენდრიტებისათვის, რითაც განაპირობებენ ამ ნეირონების სწორ ორიენტაციას ანუ მონაწილეობენ პურკინიეს უჯრედების მორფოგენეზში.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ცდებმა გამოავლინა, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედები იზრდებიან სიგრძეში, მათი მორფოლოგია რთულდება და მორჩების ძვრადობა მცირდება სინაპტოგენეზის განვითარების პერიოდში. ჩვენ აგრეთვე შევისწავლეთ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების მიერ სინაფსების შემოგარსვის მექანიზმი. დავადგინეთ, რომ განვითარების პერიოდში მორჩების სიგრძის მომატება ემთხვევა მათ მიერ პურკინიეს უჯრედების ქაცვების შემოგარსვის ზრდას ანუ ექსპანსიის პროცესი საშუალებას აძლევს ბერგმანის უჯრედებს სრულად შემოგარსონ თითოეული სინაფსი. ელექტრონული მიკროსკოპისა და კონფოკალური მიკროსკოპის საშუალებით დავადგინეთ, რომ სინაპტოგენეზის გვიანდელ სტადიაზე თითქმის ყველა სინაფსი შემოგარსულია ბერგმან გლიით. დომინანტ-ნეგატიური Rac1-ის და AMPA რეცეპტორის Glur2 სუბერთეულის (რომელიც იწვევს ბერგმან გლიის მორჩების სიგრძის შემცირებას) შეყვანის შემდეგ ნათხეშში სინაფსების უმეტესობა მხოლოდ ნაწილობრივ იყო შემოგარსული გლიით, მაშინ როდესაც იგივე ასაკის ცხოველების ნათხეშში სინაფსების უმრავლესობა სრულად არის შემოგარსული ბერგმან გლიის მორჩებით. ანუ ბერგმან გლიის მორჩების ნორმალური

ზრდა აუცილებელია სინაფსების შემოგარსვისათვის. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით შეიძლება დავასკვნათ, რომ Rac1 და AMPA რეცეპტორების მიერ  $Ca^{2+}$ -ის გამტარიანობა მონაწილეობას იღებს არა მხოლოდ გლიური მორჩების ზრდაში, არამედ არეგულირებს კიდევ ამ მორჩების მდგომარეობის შენარჩუნებას სინაფსების ირგვლივ. აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ Rac1 და AMPA რეცეპტორები მოქმედებენ ერთიდაიგივე მექანიზმით და ახდენენ აქტინის რეგულირებას გლიურ უჯრედებში. ასეთი მოქმედების ერთ-ერთი წარმომადგენელი შესაძლებელია იყოს mTor ცილოვანი გამტარი გზა, რომელიც დიდ როლს თამაშობს ისეთ მულტისისტემურ გენეტიკურ დაავადებში, როგორცაა ტუბეროზული სკლეროზის კომპლექსი TSC (tuberous sclerosis complex) (Bourgeron, 2009) და რომელიც მონაწილეობს დენდრიტული ქაცვების რაოდენობრივ რეგულაციაში. ასტროციტებში mTor ცილას შეუძლია რეგულირება გაუკეთოს აქტინის პოლიმერიზაციას Rac1-ზე დამოკიდებული მექანიზმის საშუალებით (Sandsmark et al., 2007). უახლესი მონაცემების თანახმად, mTor ცილის ფოსფორილების რეგულირება შესაძლებელია ბერგმანის გლიური უჯრედების კულტურაში გლუტამატის საშუალებით, ოღონდ ეს დამოკიდებულია გლუტამატისა და  $Ca^{2+}$ -ის იონების რაოდენობაზე (Zepeda et al., 2009; Ishiuchi et al., 2001).

ჩვენს ექსპერიმენტებში აღწერილი ბერგმან გლიის მორჩების შემცირებული ძვრადობა, მორჩების გაზრდილი კომპლექსურობა და მათ მიერ სინაფსების შემოგარსვა დროში ემთხვევა სინაპტოგენეზის დასრულებას ნათხემში, საიდანაც შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ ბერგმან გლია მონაწილეობას იღებს დენდრიტული ქაცვებისა და სინაპტოგენეზის რეგულაციის პროცესში. მიუხედავად იმისა, რომ ნათხემში დენდრიტული ქაცვები მობილურია განვითარების პროცესში, ქაცვები უმოდრო არ ხდებიან მას მერეც, რაც ისინი კონტაქტს ამყარებენ პრესინაფსურ ელემენტებთან (Dunaevsky et al., 2001; Deng and Dunaevsky, 2006), რაც ეწინააღმდეგება ჰიპოკამპიდან მიღებულ მონაცემებს (Korkotian and Segal, 2001). ჩამოყალიბებული ნათხემისგან განსხვავებით, სადაც თითქმის ყველა სინაფსი გარშემორტყმულია ბერგმან გლიით, ზრდასრულ ჰიპოკამპში მხოლოდ სინაფსების ნახევარი არის შემოგარსული გლიით, ისიც შემოგარსვის სხვადასხვა სიდიდით (Peters and Kaiserman-Abramof, 1970; Spacek, 1985; Fiala and Harris, 2001). რადგანაც ნათხემში



არსებობს კორელაცია დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის შემცირებასა და ბერგმან გლიის მორჩების შემომგარსველი როლის გაზრდას შორის, წამოვყენეთ ჰიპოთეზა, რომ სინაპტოგენეზის დასრულებისათვის ნათხემში გლიის შემომგარსველი ფუნქციის გაზრდა შესაძლებელია იწვევს დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის შემცირებას. მაგრამ ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტების საფუძველზე ჩვენი ჰიპოთეზა არ გამართლდა ანუ გლიის შემომგარსველი ფუნქციის შესუსტებამ არ გამოიწვია ქაცვების ძვრადობის შემცირება, აქედან გამომდინარე, ეს უკანასკნელი არ ახორციელებს ქაცვების დინამიკას ნათხემში. მიუხედავად იმისა, რომ ლიტერატურულ წყაროებში კარგად არის აღწერილი ქაცვების ძვრადობის მექანიზმი სინაფსური კონტაქტების წარმოქმნისათვის (Ziv and Smith, 1996; Dunaevsky et al., 1999), ჩვენს მიერ ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენეს, რომ შემცირებული გლიური შემოგარსვა მართალია არ ახდენს გავლენას ძვრადობაზე, მაგრამ იგი დაკავშირებულია სინაფსების რაოდენობასთან, ანუ შემოგარსვის შემცირება იწვევს სინაფსების რიცხვის გაზრდას. ჩვენ ვვარაუდობთ, რომ შესაძლებელია ნათხემში ბერგმანის გლიური უჯრედების მიერ სინაპტოგენეზის დასრულებისათვის სინაფსების სრული შემოგარსვა აინჰიბირებს სინაპტოგენეზის შემდგომი განვითარების პროცესს. ამგვარად, გლიური შემოგარსვა მონაწილეობს სინაფსების რიცხვის სტაბილიზაციაში. მაგრამ არსებობს სხვა ფაქტორები, შესაძლებელია, თვით ქაცვების რაიმე შინაგანი ფაქტორები, რომლებიც განაპირობებენ ქაცვების შემცირებულ ძვრადობას. თუმცა ამ მოვლენის გასარკვევად, თუ რატომ ცვლის გლიური შემოგარსვის შემცირება სინაფსების რაოდენობას და არანაირ გავლენას არ ახდენს ქაცვების ძვრადობაზე, სხვა სახის ექსპერიმენტებია ჩასატარებელი. შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ქაცვების ძვრადობა იზრდება მყისიერად, როგორც კი ადგილი აქვს გლიური მორჩების რეტრაქციას მანამ, სანამ ჩვენ ვიწყებთ ანათლების დათვალიერებას მიკროსკოპის საშუალებით და იმ 2-3 დღის განმავლობაში, რაც საჭიროა მარკერის სრული ექსპრესიისათვის ეს ძვრადობა უბრუნდება თავის ნორმალურ რიტმს. აგრეთვე შესაძლებელია, რომ განვითარების ამ ეტაპზე (პოსტნატალური განვითარების მე-3 მე-4 კვირა) ქაცვების ძვრადობა არ არის ისეთი პრინციპული მახასიათებელი სინაფსების წარმოქმნისათვის, როგორც ეს არის განვითარების ადრეულ სტადიაზე. სინაპტოგენეზის დაწყებისათვის მაშინ, როდესაც

მათი პოტენციური საკონტაქტო მხარე იმყოფება მოშორებით, ქაცვებს შესაძლებელია ესაჭიროებათ გამოავლინონ მაღალი ძვრადობის პოტენციალი, რათა მოახდინონ კონტაქტის ლოკალიზება. ხოლო უკვე სინაპტოგენეზის პროცესის დასრულებისთვის, როდესაც ყველა საკონტაქტო მხარე სრულად არის ფორმირებული, ქაცვებს აღარ სჭირდებათ დიდი ძალისხმევა იმისათვის, რომ მონახონ ეს საკონტაქტო მხარეები. აგრეთვე შესაძლებელია, რომ ის კონტაქტი, რომელიც დარჩენილი იყო გლიასა და დენდრიტულ ქაცვებს შორის GluR2 და Rac1-ის ექსპრესიის შემთხვევაში, საკმარისი იყო ქაცვების სტაბილიზაციისათვის. სავარაუდოა, რომ ამ შემთხვევაში ადგილი აქვს Eph -ეფრინების ურთიერთქმედებას, რაც გამოვლინდა ჰიპოკამპში დენდრიტული ქაცვების ფორმებისა და რაოდენობის ცვლილებაში (Murai et al., 2003; Nestor et al., 2007; Nishida and Okabe, 2007). თუმცა არსებობს განსხვავება გლიური შემოგარსვის სიდიდეში ნათხემსა და ჰიპოკამპს შორის, თუ ნათხემშიც აღმოჩენილი იქნება ჰიპოკამპის მსგავსი Eph -ეფრინული ურთიერთქმედება ეს იქნება სწორედ ის მექანიზმი რომელიც მოახდენს ახალი სინაფსების ინჰიბირებას მას შემდეგ რაც გლიური მორჩი სრულად შემოგარსავს სინაფსს (Penzes et al., 2003; Tolia et al., 2007). იმ ფაქტმა, რომ შემცირებული გლიური შემოგარსვა ზრდის სინაფსების რიცხვს და გავლენას არ ახდენს დენდრიტული ქაცვების ძვრადობაზე, შესაძლებელია წარმოქმნას მოსაზრება ახალი სინაფსების წარმოქმნის შესახებ. რადგანაც სავარაუდოა, დენდრიტული ქაცვები არ არის აუცილებელი იყვნენ ძალზედ მოძრავნი იმისათვის, რომ წარმოქმნან სინაფსები. დასაშვებია, რომ ეს “ახალი“ სინაფსები არიან ძველი, სინაპტოგენეზის ადრეულ სტადიაზე გამქრალი სინაფსები და ამიტომ გლიური მორჩების ქაცვებიდან მოცილების შემდეგ კვლავ წარმოიქმნენ ამ ქაცვებზე. თუმცა ეს ფაქტი არ ნიშნავს, რომ სინაპტოგენეზი არ არის დასრულებული, რადგან მთავარი განმსაზღვრელი მაინც არის შემოგარსვის პროცესის დასრულება, რასაც უკვე ადგილი ჰქონდა რეტრაქციის დაწყებამდე. ჩვენს მოდელში გლიის მიერ შემოგარსვის სიდიდის შემცირებას შესაძლებელია გადაჰყავს უჯრედები ზრდადაუსრულებელ ფორმაში ანუ განვითარების ადრეულ სტადიაზე მყოფ პირობებში, რაც თავის მხრივ იწვევს ახალი სინაფსების წარმოქმნის პროცესს. ჩვენი მონაცემები ემთხვევა ინოს მიერ ჩატარებული ცდების შედეგებს, როდესაც ბერგმანის გლიურ უჯრედებში GluR2-ის სუბერთეულის ექსპრესიის შემდეგ ადგილი აქვს პურკინიეს უჯრედებზე მცოცავი

ბოჭკოების ინერვაციის გაზრდას (Iino et al., 2001). თუ ნამდვილად გლიის მიერ სინაფსების სრული შემოგარსვა არის სინაპტოგენეზის დასრულების დამადასტურებელი ფაქტორი, ბერგმან გლიის მორჩების განვითარების რეგულაციის და აქედან გამომდინარე, გლიური უჯრედების მიერ სინაფსების შემოგარსვის პროცესის შესწავლა ძალზედ მნიშვნელოვანი იქნება სინაპტოგენეზისა და სინაფსების პლასტიურობის მექანიზმების კვლევისათვის. გარდა ამისა, გლიის შემომგარსველი როლის შესწავლა მნიშვნელოვანი იქნება მრავალი დაავადების კვლევისათვის, რომლებიც ხასიათდებიან დისფუნქციური სინაფსების წარმოქმნით.

ტვინის ფუნქციონირებაში გლია-ნერონულ კომპლექსურ ურთიერთკავშირს უკავია მნიშვნელოვანი ადგილი. ჩემს მიერ წარმოდგენილ ნაშრომში შევეცადე გამეშუქებინა ამ კავშირის ზოგიერთი ასპექტი. კერძოდ, ნათხემში პურკინიეს უჯრედების მორფოლოგიის ჩამოყალიბებასა და ზრდაში ბერგმანის გლიური უჯრედების როლი, ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების მორფოლოგიური განვითარება დინამიკაში და მათი მნიშვნელობა სინაპტოგენეზში.

ჩვენმა ექსპერიმენტებმა წამოჭრა მრავალი ჯერ კიდევ გადაუჭრელი პრობლემა, რომელიც მომავალში საჭიროებს დეტალურ გამოკვლევას. პირველ რიგში, საინტერესო იქნება გლიური მორჩების ძვრადობის ბუნების შესწავლა. არის თუ არა გლიური მორჩების სწრაფი მოძრაობა განვითარების ადრეულ სტადიაზე გამოწვეული იმით, რომ ამ პერიოდში ხდება მორჩების ზრდა და მათი მორფოლოგიის მარტივიდან რთულისკენ განვითარება, თუ ეს პროცესი უფრო ანალოგიურია დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის, როდესაც ქაცვები განვითარების ადრეულ სტადიაზე უფრო მოძრავნი არიან, რადგან ამ პერიოდში ისინი ეძებენ თავიანთ პარტნიორებს სინაფსების წარმოსაქმნელად. ბერგმანის გლიური მორჩების ძვრადობის მკვეთრი შემცირება სინაპტოგენეზის დასრულებისათვის, როდესაც ქაცვების შემოგარსვა გლიური მორჩებით თითქმის დამთავრებულია, მიუთითებს იმ ფაქტზე, რომ მორჩების ძვრადობა მონაწილეობას იღებს ამ უკანასკნელთა მიერ სინაფსების შემოგარსვაში. თუმცა, Rac1-ის აქტივობის ინჰიბირებით ან AMPA რეცეპტორების განვლადობის შეცვლით მორჩების ძვრადობა არ შეიცვალა, ხოლო მათი სიგრძე კი საგრძნობლად შემცირდა. ამიტომ, საინტერესო იქნება თუ პურკინიეს უჯრედებსა და ბერგმანის გლიას შორის ურთიერთკავშირს დავაკვირდებით უფრო

ხანგრძლივი პერიოდის განმავლობაში, ამ ძვრადობის აღრიცხვა მოხდება 24სთ-იანი ინტერვალის განმავლობაში და შევძლებთ იმ პროცესის აღბეჭდვას, როდესაც ბერგმანის გლიური მორჩები შემოგარსავენ დენდრიტულ ქაცვებს. მეორე საშუალება, რითაც შესაძლებელი იქნება ძვრადობის როლის დადგენა გლიის შემომგარსველ ფუნქციაში, არის უჯრედებზე ძვრადობის მახლოკირებელი ნივთიერებებით მოქმედება. ამ შემთხვევაში საინტერესოა აქტინ-პოლიმერაზას ინჰიბიტორის - ციტოკალაზინ D-ს მოქმედება, თუმცა ეს უკანასკნელი შეყვანილი უნდა იყოს უშუალოდ ბერგმანის გლიურ უჯრედებში, რადგან ციტოკალაზინ-D დენდრიტული ქაცვების ძვრადობის ინჰიბირებასაც ახდენს. ჩვენს მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტებში ვნახეთ, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩების დინამიკა არ იცვლება ქიმიური დეპოლარიზაციით ან გლიური პურინერგული რეცეპტორების ბლოკირებით. შესაძლებელია, იგი დამოკიდებული იყოს უჯრედშიდა კალციუმის გამოყოფაზე. ამ მონაცემების მისაღებად ჩვენ გამოვიყენეთ კოფეინი, მაგრამ რადგანაც კოფეინი გავლენას ახდენს მრავალ უჯრედულ გამტარ გზაზე, უკეთესი იქნება მომავალში გამოყენებულ იქნას უფრო სპეციფიური ნივთიერება, რომელიც გამოიწვევს მხოლოდ გლიური შიდა კალციუმის გამოთავისუფლებას. ანალოგიური შედეგის მიღებისას ჩვენ დავრწმუნდებით, რომ კოფეინის მოქმედების შედეგად მიღებული შემცირებული ძვრადობა მართლაც გამოწვეულია უჯრედშიდა  $Ca^{2+}$  -ის იონების გამოთავისუფლებით. ჩვენ შემდგომში შეგვეძლება ბერგმანის გლიურ უჯრედებში გამოვიწვიოთ უჯრედშიდა Ca-ის გამოთავისუფლება, რამაც თავის მხრივ უნდა მოახდინოს ბერგმანის გლიური მორჩების ძვრადობის ბლოკირება, რის შედეგადაც შესაძლებელი გახდება დადგინდეს კორელაცია გლიური მორჩების ძვრადობასა და მათ შემომგარსველ ფუნქციას შორის.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ სინაპტოგენეზის პროცესის დასრულებისთვის თითქმის ყველა სინაფსის სრულად გარშემორტყმულია ბერგმან გლიის მორჩებით, ხოლო გლიის შემოგარსვის შემცირებამ გამოიწვია სინაფსების მომატება. აქედან გამომდინარე შეიძლება დავასკვნათ, რომ გლიის მიერ სინაფსების შემოგარსვა ან აინჰიბირებს ახალი სინაფსების წარმოქმნას, ან კიდევ სინაფსების გაქრობის რეგულირებას ახდენს. P21 ასაკის თაგვებში Vglut1 უმეტესად ექსპრესირდება პარალელურ ბოჭკოებში. ამრიგად, Vglut1-ის, როგორც

პრესინაფსური მარკერის გამოყენებით ყველა სინაფსი, რომელიც ჩვენ აღვრიცხეთ, იყო წარმოქმნილი პურკინიეს უჯრედებსა და პარალელურ ბოჭკოებს შორის. ლიტერატურული მონაცემებით კი ექსპერიმენტულად გამოწვეული გლიური მორჩების შექმუხვა იწვევს პურკინიეს უჯრედებზე მცოცავი ბოჭკოების გაზრდილ ინერვაციას. კერძოდ, თითოეულ პურკინიეს უჯრედზე 2-3 მცოცავი ბოჭკო ბოლოვდება ერთის მაგივრად (Iino et al., 2001). ამრიგად, შემცირებულმა გლიურმა შემოგარსვამ თითოეულ პურკინიეს უჯრედზე ამ ასაკში შეიძლება გამოიწვიოს ნორმასთან არაშესაბამისი რაოდენობის სინაფსების წარმოქმნა. ინოს ნაშრომში მრავალჯერადი ინერვაცია გამოწვეულია სინაფსების ელიმინაციის არარსებობით, მაშინ როდესაც ჩვენი გამოკვლევების მიხედვით, სინაფსების გაზრდილი რიცხვი შესაძლებელია შედეგი იყოს ან ახალი სინაფსების ფორმირების ან ძველი სინაფსების გამომხშორვის შეზღუდვის.

ჩვენს მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტებში, იმისათვის რომ დაგვედგინა გლიის შემომგარსველი როლი, გლიური მორჩების რეტრაქციის მისაღწევად გამოვიყენეთ რამოდენიმე მეთოდი: ერთ შემთხვევაში Rac1, რომელიც მოქმედებს ეფრინების გამტარი გზით და მეორე შემთხვევაში GluR2, რომელიც ამცირებს AMPA  $Ca^{2+}$  გამტარიანობას, რაც შემდგომში მოქმედებს ასტროციტარული D-სერინის გამოყოფაზე. დომინანტ-ნეგატიური Rac1-ის მოქმედების შემდეგ, რომელმაც გამოიწვია ბერგმანის გლიური მორჩების რეტრაქცია, ჩვენ გავზომეთ სინაფსების შემოგარსვა, რომელიც უმეტესად წარმოიქმნებოდა პურკინიეს უჯრედებსა და პარალელურ ბოჭკოებს შორის, ხოლო დენდრიტული ქაცვების დინამიკა კი გავზომეთ ბერგმან გლიაში GluR2-ის ექსპრესირების შემდეგ, რომლის დროსაც ნეირონებს ამაგზნებელი იმპულსები მოსდით როგორც პარალელური, ასევე მცოცავი ბოჭკოებიდან. თუ მომავალში შევძლებთ ზუსტად დავადგინოთ პრესინაფსში შემომავალი სიგნალის წყარო, ანუ ეს არის პარალელური თუ მცოცავი ბოჭკოდან წამოსული სიგნალი, მაშინ შესაძლებლობა მოგვეცემა ვიპოვოთ გლიური GluR2-ის დიფერენცირებული ეფექტი ქაცვების ძვრადობაზე. ამის გარკვევა ძალზედ მნიშვნელოვანი იქნება იმის დასადგენად, თუ რამდენად დიდ გავლენას ახდენს ბერგმანის გლია სინაფსების რიცხვზე და რამდენად სპეციფიურია ეს თითოეული სახის სინაფსისათვის.

## ნაშრომის სამეცნიერო მნიშვნელობა

გლიური უჯრედების მორფოლოგიისა და მათი შემომსაზღვრელი ფუნქციის მექანიზმების საფუძვლიანი შესწავლა მნიშვნელოვანი იქნება სინაფსური პლასტიურობისა და მეხსიერების კვლევისათვის. როგორც დავადვინეთ, გლიის მიერ სინაფსის მთლიანი შემოგარსვა ახდენს ან სინაფსების ფორმირების ინჰიბირებას ან კიდევ შეუძლებელს ხდის არსებული სინაფსების გამოხშირვას. ამრიგად, გლიური მორჩების მორფოლოგიის რეგულირების პროცესის გაგება განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი იქნება სინაფსური კავშირების ფორმირებისა და მათი გაქრობის მექანიზმების ასახსნელად. თუმცა გლიური უჯრედების ცვლილებების შესასწავლად, რომლებიც თავს იჩენენ დასწავლისა და მეხსიერების პროცესში, მეცნიერთა ძირითადი ყურადღება გამახვილებულია დენდრიტებისა და ქაცვების შესწავლაზე. ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ ბერგმანის გლიური უჯრედების მოცულობა მატულობს ნათხემის მოლეკულურ შრეში მოტორული დასწავლის დროს, თუმცა ეს მოცულობითი ცვლილება როგორ აისახება გლიის შემომგარსველ როლზე არ არის შესწავლილი (Anderson et al., 1994; Kleim et al., 2007). გლიის მონაწილეობა მოტორული დასწავლის პროცესში შესაძლებელია ხორციელდებოდეს გლიის მიერ ისეთი მოლეკულების გამოყოფით, როგორიც არის D-სერინის და TNF- $\alpha$  რადგანაც როგორც ცნობილია, ეს ნივთიერებები გავლენას ახდენენ LTP -ზე - ხანგრძლივ პოტენციაციაზე (Yang et al., 2003; Panatier et al., 2006; Stellwagen and Malenka, 2006). გლიის მიერ ამ მოლეკულების გამოყოფის მექანიზმის შესწავლა კიდევ ერთი წინ გადადგმული ნაბიჯი იქნება გლია-ნეირონული ინტერაქციების კვლევებში. გლიურ მემბრანასთან შეკავშირებული ზოგიერთი რეგულატორული მოლეკულები, როგორცაა, მაგ. ეფრინები, რომლებიც მოქმედებენ გლიის მორფოლოგიაზე, შესაძლებელია მოქმედებენ აგრეთვე რეცეპტორებისა და ლიგანდების ურთიერთქმედების მექანიზმზეც, რაც რა თქმა უნდა თავის მხრივ იმოქმედებს სინაფსურ პლასტიურობაზე.

გლიის შემომგარსველი ფუნქციის მოლეკულურ მექანიზმებში გარკვევა შემდგომში საშუალებას მოგვცემს ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თერაპიული მკურნალობის სრულყოფის.

მრავალი დავადება, რომელიც დაკავშირებულია ცენტრალური ნერვული სისტემის შესუსტებასა და ფუნქციურ მოშლასთან, პირველ რიგში ხასითდება სინაფსების მორფოლოგიისა და ფუნქციური დარღვევებით. გლიის როლი ზოგიერთი ასეთი ნეიროპათოლოგიების დროს უკვე აღწერილია ლიტერატურაში (Hirano and Llana, 2006). ცნობილია აგრეთვე, რომ რეაქციული ასტროგლიოზი, რომელიც ხასიათდება გლიის პროლიფერაციით და გლიის მორფოლოგიური ცვლილებებით, არის ტვინის დაზიანებაზე გლიის საპასუხო რეაქცია. ხოლო გლიის მორფოლოგიური ცვლილებები, როგორცაა, გლიური მორჩების მოცულობის ზრდა თავს იჩენს მრავალი ნეიროპათოლოგიური დაავადების დროს (Hirano and Dembitzer, 1973; Hirano and Llana, 2006). გლიური ფიბრილარული მქავური ცილის (GFAP) მომატებას ადგილი აქვს ასეთი მორფოლოგიური ცვლილებების დროს, რაც ასტროგლიოზის ერთ-ერთი მახასიათებელია.

გლიის მორფოლოგიური ცვლილებები და მომატებული GFAP აღწერილია ისეთ დაავადებებში, როგორცაა ეპილეფსია (Khurgel and Ivy, 1996; Oberheim, 2008), ალცჰაიმერის დაავადება (Vesce et al., 2007) და აუტიზმი, რომელშიც GFAP განსაკუთრებით მკვეთრად არის მომატებული ბერგმანის გლიურ უჯრედებში (Vargas et al., 2005). ასტროგლიოზის დროს გლიური უჯრედების ფორმის შეცვლამ შესაძლებელია იმოქმედოს როგორც გლიის, ასევე მის მიერ შემოგარსული სინაფსის ფუნქციაზეც. ბოლო დროის გამოკვლევებმა აგრეთვე აჩვენეს, რომ გლია არა მარტო მონაწილეობას იღებს კრუნჩხვებში, არამედ შესაძლებელია თვით იყოს კრუნჩხვების გამომწვევი ფაქტორი. კერძოდ, ასტროციტული კალციუმის მომატებამ გამოიწვიოს ნერვული აქტივობის სინქრონიზაცია (Tian et al., 2005). ცნობილია, რომ ასტროგლიოზის დროს ასტროციტები გამოყოფენ სიმსივნურ-ნეკროზული ფაქტორის მოლეკულებს -TNF- $\alpha$ , რომლებიც ზრდიან სინაფსების წარმოქმნის პროცესს ახალგაზრდა თაგვებში და ზრდიან სინაფსურ ეფექტურობას (Bezzi et al., 2001). ასტროგლიოზის დროს ასტროციტები ჭარბად გამოყოფენ TNF- $\alpha$  და გლუტამატს, რაც განპირობებულია აქტივირებული მიკროგლიური უჯრედების არსებობით, ეს კი თავის მხრივ იწვევს არა სინაფსების ჭარბ წარმოქმნას, არამედ ნეირონების დაზიანებას NMDA და AMPA რეცეპტორების ჰიპერაქტივაციის ხარჯზე (Bezzi et al., 2001). ასეთივე მოვლენას შესაძლებელია ადგილი ჰქონდეს ალცჰაიმერის

დაავადების დროს (Rossi et al., 2005). ამასთან ერთად, ალცჰაიმერით დაავადებულ პაციენტებს აქვთ მომატებული სერინრაცემაზა (ფერმენტის აქტიური ფორმა) და ამილოიდ- $\beta$ -პეპტიდი, რაც ასტიმულირებს D-სერინის გამოყოფას (Wu et al., 2004). აგრეთვე ცნობილია, რომ მომატებული რაოდენობის ამილოიდ- $\beta$ -პეპტიდი ამცირებს დენდრიტული ქაცვებისა და სინაფსების რიცხვს ჰიპოკამპალურ კულტურაში (Shrestha et al., 2006).

კიდევ ერთი საინტერესო ცვლილება, რასაც ადგილი აქვს ეპილეფსიური კრუნჩხვების დროს არის ის, რომ ასტროციტების მორჩები სცილდებიან იმ საზღვრებს, რომლებშიც ისინი იმყოფებიან ნორმალურ პირობებში (Oberheim, 2008). ქერქისა და ჰიპოკამპის ასტროციტები იკავებენ ერთმანეთის არაგადამფარავ განსხვავებულ დომენებს (Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007). ეპილეფსიური კრუნჩხვების დროს ქერქში ადგილი აქვს საზღვრების მოშლას, რადგანაც ასტროციტების მორჩები სცდებიან მათ მიერ ნორმაში დაკავებულ არეალს და აგზავნიან თავიანთ მორჩებს ირგვლივ მდებარე დომენებში. ხდება მორჩების ურთიერთგადაფარვა, რაც თავის მხრივ იწვევს ნეირონების ცვლილებებს: აპიკალური დენდრიტების ჰიპერტროფიას და დენდრიტული ქაცვების რაოდენობის ზრდას (Oberheim et al., 2008). ეს არ არის დამახასიათებელი ყველა ფორმის გლიოზისათვის, მაგრამ სპეციფიკურია კრუნჩხვითი აქტივობის დროს. საინტერესოა, რომ გლიური სტრუქტურის ასეთ რეორგანიზაციას თან ახლავს დენდრიტების რიცხვის შემცირება. ის დენდრიტები კი რომლებიც შენარჩუნდება, არიან გაცილებით უფრო წვრილები და აქვთ მნიშვნელოვნად ნაკლები ქაცვების რაოდენობა. რეორგანიზებული ასტროციტების მიერ დაკავებული ზონის ფარგლებს გარეთ კი დენდრიტული ქაცვების რიცხვი იზრდება. ჯერ კიდევ გაურკვეველი რჩება საკითხი - არის თუ არა დენდრიტებში გამომჟღავნებული ცვლილებები განპირობებული გლიური უჯრედების მორფოლოგიური ცვლილებებით.

კიდევ ერთხელ უნდა აღინიშნოს, რომ უკეთესი თერაპიული მკურნალობის დასადგენად შესაძლებელია დიდი როლი შეასრულოს ამ დაავადებების კვლევებში გლიისა და გლიური სტრუქტურების როლის დადგენამ.



### გამოვიტანეთ შემდეგი დასკვნები:

1. ბერგმან გლია მონაწილეობას იღებს განვითარების პერიოდში პურკინის უჯრედების მორფოლოგიის ჩამოყალიბებაში, კერძოდ, გლიური უჯრედები მიმართულებას აძლევენ პურკინის უჯრედების დენდრიტებს;
2. ბერგმანის გლიური უჯრედების მორჩები განვითარების პერიოდში იზრდებიან სიგრძეში, მათი რიცხვი იმატებს, მათი მორფოლოგია უფრო კომპლექსური ხდება და მორჩების ძვრადობა იკლებს სინაპტოგენეზის დასრულებისათვის;
3. ამავე პერიოდში ბერგმანის გლიური მორჩების მიერ სინაფსების შემოსაზღვრის სიდიდე იზრდება და სინაპტოგენეზის დასრულებისათვის უმეტესობა სინაფსებისა სრულად არის შემოსაზღვრული გლიური მორჩებით;
4. ბერგმანის გლიური მორჩების რეტრაქცია დასრულებული სინაპტოგენეზის დროს იწვევს მათ მიერ სინაფსებისა და დენდრიტული ქაცვების შემოსაზღვრის შემცირებას, რასაც თან ახლავს სინაფსების რაოდენობის გაზრდა, ხოლო დენდრიტული ქაცვების ძვრადობა უცვლელი რჩება.

## Summary

Although glial cells make up more than 50% of the cells in the nervous system, their importance in brain function is only now becoming clear. The passive, supporting roles of glia have been recognized for a long time, but over the last few decades scientists have begun to illuminate far more active roles for glia in the brain. Recognition of the importance of glial cells in nervous system functioning is increasing, specifically regarding the modulation of neural activity. Astrocyte-neuron interactions are of special interest because this glia cell type has intimate and dynamic associations with all parts of neurons, i.e., somata, dendrites, axons, and terminals (Hatten et al., 1984). Activation of certain receptors on astrocytes produces morphological changes that result in new contacts between neurons, along with physiological and functional changes brought about by the new contacts. Also recent studies increasingly implicate astrocytes *in vivo* as participants in activity-dependent structural and functional synaptic changes throughout the nervous system (Ullian et al., 2001). The morphology and location of astroglia places them in an ideal setting for more active involvement in brain functioning. Detailed morphological studies reveal neurons and glia to be more intimately connected at synaptic junctions between neurons than previously imagined. Astroglia often have such intimate physical contact with synapses, a term that traditionally only refers to the pre- and post-synaptic neurons, that Alfonso Araque and colleagues introduced the concept of the “tripartite synapse,” including glia as the third partner at the synapse (Araque et al., 1999).

One of the very important findings of last decade was that Glia also guide the direction of neurite growth, potentially through activity of GLAST, the glutamate transporter expressed on glial processes (Yamada et al., 2000). A study by Tanaka et al. found that inhibiting GLAST activity in the molecular layer of the cerebellum produces bizarre morphologies of developing Purkinje cells (Tanaka et al., 2003). Interestingly, the lengths of the dendrites did not change, indicating the problem was not with dendritic growth, but with the direction of the growth needed to produce the Purkinje cells usual elaborate dendritic morphology.

Supporting all data mentioned above we decided to study the role of Bergmann glia, the principle astroglial cells in the cerebellum, in the morphological development of Purkinje cells, examine the expansion of the BG processes over the period of synaptogenesis, discuss characteristics of BG processes as they grow, and identify potential molecular pathways that regulate these characteristics and finally, look at the role of ensheathment in synaptic formation.

Bergmann glia are cerebellar astrocytes whose radial process span the entire molecular layer (Ramon y Cajal, 1911). Early in development, the smooth radial glia fibers play an important role in guiding the migration of granule cells (Rakic, 1971; Gregory et al., 1988; Hatten and Mason, 1990). In the adult brain, numerous Bergmann glia side processes make intimate connections with Purkinje cell dendritic spines and the presynaptic terminals (Altman 1972; Grosche et al., 2002).

Using dynamic imaging (two-photon laser microscope), we first analyzed how the Purkinje cell dendritic tree expands, and then related the growth patterns to the radial glial cells, viewed in the same preparations. We hypothesize that radial processes of Bergmann glia provide a scaffold for the directed vertical growth of Purkinje cell dendrites. To test this, we performed two-photon time-lapse microscopy of Purkinje cell dendrites in cerebellar slice

cultures from transgenic mice expressing GFP in astrocytes under the CMV-GFAP promoter. To determine how Purkinje cell dendrites develop, we first analyzed the pattern of growth of Purkinje cell dendrites in cerebellar slice cultures where all PC were transfected by biolistic particle-mediated delivery (Bio-Rad hand-held gene gun) with 1  $\mu\text{m}$  gold particles coated with CMV-DsRed2 vector.

Quantitative analysis of dendritic length demonstrated that 74.4% of dendrites grow while 19.9% retracted and 7.6% staid unchanged. The average rate of dendritic elongation and retraction was  $2.1 \pm 0.2$  and  $1.8 \pm 0.3$   $\mu\text{m}/\text{day}$ , respectively (mean  $\pm$  SEM). The average net change of individual dendrites was an increase of  $1.2 \pm 0.2$   $\mu\text{m}/\text{day}$ .

We next examined the relationship between Purkinje cell dendrites and Bergmann glia shafts. For this purpose we immunostained cerebellar slices from GFAP-GFP mice with a Purkinje cell marker Calbindin D28 and demonstrated that the development of glial cells occurs in concert with the development of Purkinje cell dendrites. To determine whether dendrites and glial radial processes associate with each other, and whether these associations are limited to the tips in the external granular layer, we transfected cerebellar slices from GFAP-GFP mice with CMV-DsRed2 construct. We report that the close interactions (putative contacts) between dendritic tips and glial processes were found throughout the molecular layer and were not confined to the pial surface, as previously suggested (Yamada et al., 2000)

The close association between dendritic tips and Bergmann fibers suggests that the Bergmann glia processes could provide structural substrates for the directional growth of the PC dendrites. To test this, we measured the growth of dendrites over 24 h in culture and analyzed the relationship of dendrites with the glial processes. We found several different interactions between dendritic segments and glial processes. In some cases dendritic segments appeared to be in close contact with a glial process throughout their length, while in others such contact was not continuous. Out of 79 vertically arrayed imaged dendrites, 58 were scored to be in putative contact with a glial radial process. In most cases in which a dendrite was scored to be in contact with a glial process the contact was evident in multiple focal planes.

We measured the change in dendrite length over 24 h and then scored each dendrite whether its tip was in contact with a glial radial process. In most cases, a dendrite increased in length while the growing tip was in close apposition with a glial process (73.9%, n= 73 dendrites, 14 cells). The rest of the vertically arrayed dendrites that were in contact with glial radial process either did not change in length or retracted. These data support the proposal that the radial processes provide a substrate that promotes the vertical growth of Purkinje cell dendrites.

Glial cells do not provide contact mediated trophic support for dendritic growth. We have determined the rate of growth and retraction of the dendrites arrayed vertically that were either in contact or not with glial radial processes. The rate of growth was not different when the dendrite growth was in association vs. not in association with a glial radial process. ( $2.2 \pm 0.2$  and  $2.4 \pm 0.6$   $\mu\text{m}/\text{day}$  for growth on glia and off glia, respectively, mean  $\pm$  SEM). These data suggest that glia process might be attractive to dendrites so that they spend more time in association with the radial processes but do not provide dendrite growth promoting cues.

In this part of present study, we have examined the pattern of growth of Purkinje cell dendrites in organotypic slice cultures from postnatal cerebellum and have related the growth of dendrites to their interactions with Bergmann glial radial shafts. We demonstrated that vertical growth of Purkinje cell dendrites occurs preferentially while in contact with glial radial shafts. This finding supports and confirms the proposal that radial glial processes provide a structural substrate for the directional growth of Purkinje cell dendrites, thus influencing the shape of the dendritic tree.

The next goal of our study was to determine how BG process expansion occurs over synaptogenesis, and examine the dynamic nature of the processes as they grow. Using two-photon laser scanning microscopy of cerebellar slices, we find that during this period, the length, density, and complexity of the BG processes increase. Time-lapse imaging reveals that like Purkinje cell (PC) dendritic spines, BG processes are highly motile early in synaptogenesis, but motility wanes in older cells. This motility is dependent on actin polymerization and intracellular calcium levels. However, the cytoskeletal regulators Rac1 and RhoG are not involved in regulating BG process dynamics or density, although they maintain process length. We find extensive BG process growth during the second and third postnatal weeks, with changes in process density, length and complexity. Early in synaptogenesis, we see many stubby and thin processes, similar to the rod-like processes prevalent in the younger mice studied by Yamada et al. (2000). As synaptogenesis draws to a close, we see an increase in longer and more reticular processes. These morphological changes over development could enable the glial processes to more fully cover each synapse. We have also shown that, like dendritic spines (Fischer et al., 1998; Dunaevsky et al., 1999) and hippocampal astrocytes (Haber et al., 2006), BG process motility is controlled by actin filament polymerization. Rac1, a small GTPase commonly associated with actin rearrangement, is involved in actin-dependent dendritic spine motility (Tashiro and Yuste, 2004) and hippocampal astrocyte motility (Nishida and Okabe, 2007). In contrast, expression of dominant-negative forms of Rac1 or RhoG in BG resulted in as many motile processes as in controls. We did find a role for Rac1 in BG morphogenesis, since blocking Rac1 decreases process length. Consistent with evidence that RhoG maybe be acting via a Rac1 pathway (Blangy et al., 2000), we found that blocking RhoG activity also decreases length without affecting their motility. Our studies raise the possibility that two distinct pathways, one RhoG/Rac1-dependent and one utilizing a still-unknown regulator protein, could control process length and dynamics, respectively, in BG processes.

Glial cells ensheath synapses in the hippocampus, cortex and cerebellum (Grosche et al., 1999; Ventura and Harris, 1999). To ask how BG process development relates to synaptic ensheathment, we imaged the PC and BG together early and late in synaptogenesis using multi-channel confocal imaging and performed a similar ensheathment analysis on ultrastructural level. On electronographic images we found the labeled areas by immunostaining sections with an antibody to red fluorescent protein (RFP) with an anti-horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody and then measured the ratio of spine perimeter not touching the presynaptic element to spine perimeter contacted by a glial process. For confocal imaging we stained sections with dense GFP-labeled BG from P12-14 and P24-25 mice with the PC-marker calbindin, then on the obtained images divided individual PC spines into quadrants and scored how many quadrants were in contact with glial process, thus quantifying the level of BG process coverage for each spine. We found out

that BG from older mice covered the spines more completely than those from younger mice thus indicating a developmental increase in ensheathment. Similar results were obtained from ultrastructural analysis. These findings demonstrate that increases in glial process number, length and complexity over development correlates temporally with increased ensheathment of synapses.

Next step in our investigation was to determine mechanisms regulating BG morphology and process motility. Small GTPases such as Rac1 and RhoG have been implicated in rearrangement of actin cytoskeleton in cellular processes including dendritic spines (Nishida and Okabe, 2007; Tashiro and Yuste, 2004). We introduced dn-Rac1/GFP, dn-RhoG/GFP, or GFP alone *in vitro* into BG of mice and 2 days later imaged the GFP-labeled BG in acute slices. We did not observe a difference between the motility of the processes expressing either dn-Rac1 or RhoG. In addition, neither dn-Rac1 nor dn-RhoG expression altered the density of BG processes. However, expression of either dn-Rac1 or dn-RhoG significantly decreased the length of processes. Thus, Rac-1 and Rho-G (which can act through the Rac-1 pathway) regulate the morphogenesis but not the dynamics of BG processes. The same results were obtained after misexpression of the GluR2 subunit in BG, rendering the normally Ca<sup>2+</sup> permeable BG AMPAR impermeable to Ca<sup>2+</sup>.

To link the outgrowth of glial process with synapse ensheathment, we analyzed spine ensheathment in animals injected with dn-Rac1/GFP, and GluR2/tdTomato adenovirus and found out that dn-Rac1 and GluR2 expressing BG ensheathed dendritic spines to a lesser degree than control ones (experiments were performed using as light level so electron microscopy and then analysis was performed as mentioned above)

To examine the role of ensheathment at the synapse, we used dn-Rac1 and GluR2 to decrease the level of ensheathment, and then counted the subsequent number of synapses. We immunostained cerebellar sections from GFP, dn-Rac1/GFP and GluR2/tdTomato adenovirus injected mice with calbindin and the presynaptic marker VGluT1 and counted presynaptic puncta in each case. We found 27% more VGluT1 puncta in sections with BG expressing dn-Rac1, and 28.6% increase in VGluT1 puncta in sections with BG misexpressing GluR2. Since we only counted presynaptic terminals, we next performed a similar analysis on ultrastructural level. In agreement with the light level analysis we counted 25% more synapses in dn-Rac1 expressing animals, and 27,4% in GluR2/tdTomato adenovirus injected animals. Taken together, these experiments show that there are more presynaptic terminals and full synapses present when the glial sheath does not fully surround the spine. The fact that decreasing ensheathment levels near the end of synaptogenesis results in a higher number of synapses than controls can allow us to suggest that, in the cerebellum, complete synaptic coverage by glia may serve as a cap of synaptogenesis. In this model, reducing ensheathment would either revert the cells to a less mature state that supports formation of new synapses or reduces synaptic pruning.

Based on our present study we made following conclusions:

1. During the period of development, vertical growth of Purkinje cell dendrites in the cerebellum occurs preferentially while in contact with Bergmann glia radial processes. Thus Bergmann glia radial processes provide a structural substrate for the directional growth of Purkinje cell dendrites and so influence the shape of the dendritic tree.

2. During the period of synaptogenesis the length, density and complexity of the BG processes increase. BG processes are highly motile early in synaptogenesis, but motility wanes in older cells.
3. During this period the ensheathment is increased and by the end of synaptogenesis nearly all synapses in the cerebellum are fully ensheathed by Bergmann glia processes. So complete synaptic coverage by glia may be regarded as a cap of synaptogenesis.
4. Retraction of BG processes when the process of synaptogenesis is completed causes the reduction in synapse and PC dendritic spine ensheathment. Decreased ensheathment correlates with an increase in synapse number but motility of PC dendritic spines are unaltered.

## ლიტერატურა:

1. **Addison W** (1911) The development of the purkinje cells and the cortical layers in the cerebellum of the albino rat. *J Comp Neurol* 21:459-487.
2. **Albus J** (1971) A theory of cerebellar function. *Math Biosci*:25-61.
3. **Allen NJ, Barres BA.** (2009). Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* 457(7230):675-7
4. **Altman J.** (1972) Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. *J Comp Neurol* 145:399-464
5. **Amateau SK, McCarthy MM** (2002) Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. *J Neuroendocrinol* 14:904-910.
6. **Andersen P, Eccles J, Voorhoeve PE** (1963) Inhibitory Synapses On Somas Of Purkinje Cells In The Cerebellum. *Nature* 199:655-656.
7. **Anderson BJ, Li X, Alcantara AA, Isaacs KR, Black JE, Greenough WT** (1994) Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise. *Glia* 11:73-80.
8. **Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E** (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
9. **Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG** (1998) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 10:2129-2142.
10. **Araque A, Sanzgiri RP, Parpura V, Haydon PG** (1999a) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol* 77:699-706.
11. **Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG** (1999b) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
12. **Babtista CA, HattenME,Blazeski R, Mason CA.** (1994) Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells in vitro. *Neuron* 12:243-260
13. **Barres B.** (2008) The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron* 60:430-440

14. **Bear MF, Connors BW, Paradiso MA** (2001) Neuroscience: exploring the brain, 2<sup>nd</sup> Edition. Baltimore, Md.: Lippincott Williams & Wilkins.
15. **Beattie EC, Stellwagen D, Morishita W, Bresnahan JC, Ha BK, Von Zastrow M, Beattie MS, Malenka RC** (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science* 295:2282-2285.
16. **Beierlein M, Regehr WG** (2005) Conventional synapses for unconventional cells. *Neuron* 46:694-696.
17. **Beierlein M, Regehr WG** (2006) Brief bursts of parallel fiber activity trigger calcium signals in Bergmann glia. *J Neurosci* 26:6958-6967.
18. **Bellamy T.C** (2006) Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia. *The Cerebellum*. 2006; 5: 116–126
19. **Benediktsson AM, Schachtele SJ, Green SH, Dailey ME** (2005) Ballistic labeling and dynamic imaging of astrocytes in organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci Methods* 141:41-53.
20. **Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, Vescovi A, Bagetta G, Kollias G, Meldolesi J, Volterra A** (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4:702-710.
21. **Blangy A, Vignal E, Schmidt S, Debant A, Gauthier-Rouviere C, Fort P** (2000) TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* 113 (Pt 4):729-739.
22. **Blazquez PM, Hirata Y, Heiney SA, Green AM, Highstein SM** (2003) Cerebellar signatures of vestibulo-ocular reflex motor learning. *J Neurosci* 23:9742-9751.
23. **Buard I, Steinmets C, Claudepierre T, and Pferieger F** (2010) Glial Cells Promote Dendrite Formation and the Reception of Synaptic Input in Purkinje Cells from Postnatal Mice. *Glia* 58:538–545
24. **Bourgeron T.** (2009) A synaptic trek to autism. *Curr Opin Neurobiol.* Apr;19(2):231-34.



25. **Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992)** Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8:189-198.
26. **Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002)** Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
27. **Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005)** Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421-433.
28. **Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990)** Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
29. **Cotrina ML, Lin JH, Nedergaard M (1998)** Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *J Neurosci* 18:8794-8804.
30. **Deng J, Dunaevsky A (2005)** Dynamics of dendritic spines and their afferent terminals: spines are more motile than presynaptic boutons. *Dev Biol* 277:366-377.
31. **Donato R (1999)** Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EFhand type. *Biochim Biophys Acta* 1450:191-231.
32. **Dreyer EB, Leifer D, Heng JE, McConnell JE, Gorla M, Levin LA, Barnstable CJ, Lipton SA (1995)** An astrocytic binding site for neuronal Thy-1 and its effect on neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11195-11199.
33. **Dunaevsky A, Blazeski R, Yuste R, Mason C (2001)** Spine motility with synaptic contact. *Nat Neurosci* 4:685-686.
34. **Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999)** Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13438-13443.
35. **Duran H, Ferrandez L, Sierra G, Ramon y Cajal S, Duran M, Stern LL (1975)** [A case of juxta-cortical chondroma (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 113:1100-1102.
36. **Eccles J, Llinas R, Sasaki K (1964)** Excitation of Cerebellar Purkinje Cells by the Climbing Fibres. *Nature* 203:245-246.

37. **Eccles JC** (1967) Circuits in the cerebellar control of movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 58:336-343.
38. **Edmondson JC, Hatten ME** (1987) Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study. *J Neurosci* 7:1928-1934.
39. **Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, Kengaku M.** (2005) DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nat Neurosci.* Jul;8(7):873-80.
40. **Faissner A, Pyka M, Geissler M, Sobik T, Frischknecht R, Gundelfinger ED, Seidenbecher C.** (2010) Contributions of astrocytes to synapse formation and maturation - Potential functions of the perisynaptic extracellular matrix. *Brain Res Rev.*63(1-2):26-38
41. **Fellin T, Pozzan T, Carmignoto G** (2006) Purinergic receptors mediate two distinct glutamate release pathways in hippocampal astrocytes. *J Biol Chem* 281:4274-4284.
42. **Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G** (2004) Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors. *Neuron* 43:729-743.
43. **Fiacco TA, McCarthy KD** (2004) Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 24:722-732.
44. **Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravicz J, Casper KB, Dong X, Chen J, McCarthy KD** (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron* 54:611-626.
45. **Fiala JC, Harris KM** (2001) Extending unbiased stereology of brain ultrastructure to three-dimensional volumes. *J Am Med Inform Assoc* 8:1-16.
46. **Fiala JC, Kirov SA, Feinberg MD, Petrak LJ, George P, Goddard CA, Harris KM** (2003) Timing of neuronal and glial ultrastructure disruption during brain slice preparation and recovery in vitro. *J Comp Neurol* 465:90-103.
47. **Fields RD, Stevens-Graham B.**(2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298(5593):556-62

48. **Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A** (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
49. **Fischer M, Kaech S, Wagner U, Brinkhaus H, Matus A** (2000) Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nat Neurosci* 3:887-894.
50. **Frings M, Dimitrova A, Schorn CF, Elles HG, Hein-Kropp C, Gizewski ER, Diener HC, Timmann D** (2006) Cerebellar involvement in verb generation: an fMRI study. *Neurosci Lett* 409:19-23.
51. **Gao FB, Kohwi M, Brenman JE, Jan LY, Jan YN.** (2000) Control of dendritic field formation in *Drosophila*: the roles of flamingo and competition between homologous neurons. *Neuron* 28:91-101
52. **Ge WP, Yang XJ, Zhang Z, Wang HK, Shen W, Deng QD, Duan S** (2006) Long-term potentiation of neuron-glia synapses mediated by Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors. *Science* 312:1533-1537.
53. **Gebhart AL, Petersen SE, Thach WT** (2002) Role of the posterolateral cerebellum in language. *Ann NY Acad Sci* 978:318-333.
54. **Gerlai R, Wojtowicz JM, Marks A, Roder J** (1995) Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem* 2:26-39.
55. **Gilbert PF, Thach WT** (1977) Purkinje cell activity during motor learning. *Brain Res* 128:309-328.
56. **Gomes FC, Spohr TC, Martinez R, Moura Neto V.**(2001). Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34(5):611-20
57. **Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A** (2002) Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res* 68:138-149.
58. **Grosche J, Matyash V, Moller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H** (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci* 2:139-143.

59. **Grueber WB, Ye B, Moore AW, Jan YN.** (2003) dendrites of distinct classes of *Drosophila* sensory neurons show different capacities for homotypic repulsion. *Curr Biol* 13:138-149
60. **Guthrie PB, Knappenberger J, Segal M, Bennett MV, Charles AC, Kater SB** (1999) ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19:520-528.
61. **Haber M, Zhou L, Murai KK** (2006) Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* 26:8881-8891.
62. **Haines DE, Manto MU** (2007) Clinical symptoms of cerebellar disease and their interpretation. *Cerebellum* 6:360-374.
63. **Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG** (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci* 27:6473-6477.
64. **Hama H, Hara C, Yamaguchi K, Miyawaki A** (2004) PKC signaling mediates global enhancement of excitatory synaptogenesis in neurons triggered by local contact with astrocytes. *Neuron* 41:405-415.
65. **Hanisch UK, Kettenmann H** (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
66. **Harrington AW, Kim JY, Yoon SO** (2002) Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci* 22:156-166.
67. **Hartley RS, Margulis M, Fishman PS, Lee VM, Tang CM** (1999) Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. *J Comp Neurol* 407:1-10.
68. **Hatten ME, Heintz N** (1995) Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 18:385-408.
69. **Hatten ME, Liem RK, Mason CA** (1984) Two forms of cerebellar glial cells interact differently with neurons in vitro. *J Cell Biol* 98:193-204.
70. **Hatten ME, Liem RK, Shelanski ML, Mason CA** (1991) Astroglia in CNS injury. *Glia* 4:233-243.
71. **Hatton GI**, (2002) Glial-Neuronal interactions in the mammalian brain. *Advan Physiol Educ*, 26:225-237

72. **He TC, Zhou S, Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B** (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:2509-2514.
73. **Hirano A, Dembitzer HM** (1973) Cerebellar alterations in the weaver mouse. *J Cell Biol* 56:478-486.
74. **Hirano A, Llana J** (2006) Fine structure of neuronal and glial processes in neuropathology. *Neuropathology* 26:1-7.
75. **Hirrlinger J, Hulsmann S, Kirchhoff F** (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci* 20:2235-2239.
76. **Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P.** Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis *J Cell Biol.* 2009 Apr 20;185(2):323-39.
77. **Iino M, Goto K, Kakegawa W, Okado H, Sudo M, Ishiuchi S, Miwa A, Takayasu Y, Saito I, Tsuzuki K, Ozawa S** (2001) Glia-synapse interaction through  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science* 292:926-929.
78. **Ishiuchi S, Tsuzuki K, Yamada N, Okado H, Miwa A, Kuromi H, Yokoo H, Nakazato Y, Sasaki T, Ozawa S** (2001) Extension of glial processes by activation of  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptor channels. *Neuroreport* 12:745-748.
79. **Ito M** (1989) Long-term depression. *Annu Rev Neurosci* 12:85-102.
80. **Ito M** (2002) Historical review of the significance of the cerebellum and the role of Purkinje cells in motor learning. *Ann NY Acad Sci* 978:273-288.
81. **Jan YN, Jan LY.** (2003) The control of dendritic development. *Neuron* 40:229-242
82. **Johnson JW, Ascher P** (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529-531.
83. **Kanemaru K, Okubo Y, Hirose K, Iino M** (2007) Regulation of neurite growth by spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillations in astrocytes. *J Neurosci* 27:8957-8966.
84. **Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M** (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1:683-692.
85. **Khurgel M, Ivy GO** (1996) Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis. *Epilepsy Res* 26:163-175.

86. **Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW** (2006) Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol* 39:339-345.
87. **Kleim JA, Markham JA, Vij K, Freese JL, Ballard DH, Greenough WT** (2007) Motor learning induces astrocytic hypertrophy in the cerebellar cortex. *Behav Brain Res* 178:244-249.
88. **Klintsova A, Levy WB, Desmond NL** (1995) Astrocytic volume fluctuates in the hippocampal CA1 region across the estrous cycle. *Brain Res* 690:269-274.
89. **Korkotian E, Segal M** (2001) Regulation of dendritic spine motility in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 21:6115-6124.
90. **Kulik A, Haentzsch A, Luckermann M, Reichelt W, Ballanyi K** (1999) Neuron-glia signaling via alpha (1) adrenoceptor-mediated Ca (2+) release in Bergmann glial cells in situ. *J Neurosci* 19:8401-8408.
91. **Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B, Ng K** (2000) Neuronal-glia interactions and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 24:295-340.
92. **Lin SC, Bergles DE** (2002) Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 31:537-549.
93. **Lin SC, Bergles DE** (2004a) Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 47:290-298.
94. **Lin SC, Bergles DE** (2004b) Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat Neurosci* 7:24-32.
95. **Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE** (2005) Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46:773-785.
96. **Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW** (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450:56-62.
97. **Marr D** (1969) A theory of cerebellar cortex. *J Physiol* 202:437-470.

98. **Martinez A, Soriano E** (2005) Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Rev* 49:211-226
99. **Matsui K, Jahr CE** (2003) Ectopic release of synaptic vesicles. *Neuron* 40:1173- 1183.
100. **Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW** (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
101. **McKinney RA, Capogna M, Durr R, Gahwiler BH, Thompson SM** (1999) Miniature synaptic events maintain dendritic spines via AMPA receptor activation. *Nat Neurosci* 2:44-49.
102. **Miale IL, Sidman RL** (1961) An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol* 4:277-296.
103. **Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M** (2003) Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 17:2563-2572.
104. **Mong JA, Glaser E, McCarthy MM** (1999) Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in a regionally specific manner. *J Neurosci* 19:1464-1472.
105. **Morrison ME, Mason CA.** (1998) Granule neuron regulation of Purkinje cell development: striking a balance between neurotrophin and glutamate signaling *J. Neurosci* 18:3563–3573
106. **Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB** (2003) Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci* 6:153-160.
107. **Nedergaard M** (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 263:1768-1771.
108. **Nestor MW, Mok LP, Tulapurkar ME, Thompson SM** (2007) Plasticity of neuron-glial interactions mediated by astrocytic EphARs. *J Neurosci* 27:12817-12828.

109. **Neugebauer KM, Tomaselli KJ, Lilien J, Reichardt LF** (1988) N-cadherin, NCAM, and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J Cell Biol* 107:1177-1187.
110. **Nicol GD, Klingberg DK, Vasko MR** (1992) Prostaglandin E2 increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. *J. Neurosci* 12:1917-1927.
111. **Niell CM, Meyer MP, Smith SJ.** (2004) In vivo imaging of synapse formation on a growing dendritic arbor. *Nat Neurosci* 7:254-260
112. **Nishida H, Okabe S** (2007) Direct astrocytic contacts regulate local maturation of dendritic spines. *J Neurosci* 27:331-340.
113. **O'Kane EM, Stone TW, Morris BJ** (2003) Distribution of Rho family GTPases in the adult rat hippocampus and cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* 114:1-8.
114. **Oberheim N, Tian G, Han X, Peng W, Takano T, Ransom B, and Nedergaard M** (2008) Loss of Astrocytic Domain Organization in the Epileptic Brain. *J Neurosci* 28:3264-3276.
115. **Ogata K, Kosaka T.** (2002) Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience* 113(1):221-33.
116. **Pakhotin P, Verkhratsky A** (2005) Electrical synapses between Bergmann glial cells and Purkinje neurones in rat cerebellar slices. *Mol Cell Neurosci* 28:79-84.
117. **Palay SL, Chan-Palay V** (1974) *The Cerebellar Cortex: Cytology and Organization.* New York: Springer-Verlag.
118. **Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH** (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
119. **Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE, Huganir RL** (2003) Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 37:263-274.
120. **Perea G, Araque A.** (2010) Glia modulates synaptic transmission. *Brain Research Reviews* 63:93-102



121. **Peters A, Kaiserman-Abramof IR** (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127:321-355.
122. **Pfriegeer FW, Barres BA** (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277:1684-1687.
123. **Pfriegeer FW.** (2002) Role of glia in synapse development. *Current Opinion in neurobiology* 12:486-490
124. **Piet R, Jahr CE** (2007) Glutamatergic and purinergic receptor-mediated calcium transients in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 27:4027-4035.
125. **Polleux F, Morrow T, Ghosh A.** (2000) Semaphorin 3A is chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404:567-573
126. **Porter JT, McCarthy KD** (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073-5081.
127. **Powell EM, Meiners S, DiProspero NA, Geller HM** (1997) Mechanisms of astrocyte-directed neurite guidance. *Cell Tissue Res* 290:385-393.
128. **Rakic P** (1971) Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus. *J Comp Neurol* 141:283-312.
129. **Ramon y Cajal S** (1889) Sobre las fibras nerviosas de la capa granulosa del cerebelo. *Revista trimestral de Histologia Normal y Patologica* 3-4:107-118.
130. **Ramon y Cajal S** (1899) *Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados*. Tomo I.
131. **Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR** (1995) Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch* 36:509-517.
132. **Rossi D, Brambilla L, Valori CF, Crugnola A, Giaccone G, Capobianco R, Mangieri M, Kingston AE, Bloc A, Bezzi P, Volterra A** (2005) Defective tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent control of astrocyte glutamate release in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:42088-42096.
133. **Sanchez-Gomez MV, Matute C** (1999) AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol Dis* 6:475-485.

134. **Sandsmark DK, Zhang H, Hegedus B, Pelletier CL, Weber JD, Gutmann DH (2007)** Nucleophosmin mediates mammalian target of rapamycin-dependent actin cytoskeleton dynamics and proliferation in neurofibromin-deficient astrocytes. *Cancer Res* 67:4790-4799.
135. **Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2005)** Development of the nervous system, 2nd Edition. London: Academic.
136. **Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001)** Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *Faseb J* 15:1270-1272.
137. **Scolari MJ, Acosta GB (2007)** D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glia language. *Amino Acids* 33:563-574.
138. **Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004)** Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22:1567-1572.
139. **Shearer MC, Niclou SP, Brown D, Asher RA, Holtmaat AJ, Levine JM, Verhaagen J, Fawcett JW (2003)** The astrocyte/meningeal cell interface is a barrier to neurite outgrowth which can be overcome by manipulation of inhibitory molecules or axonal signalling pathways. *Mol Cell Neurosci* 24:913-925.
140. **Shelton MK, McCarthy KD (2000)** Hippocampal astrocytes exhibit Ca<sup>2+</sup>-elevating muscarinic cholinergic and histaminergic receptors in situ. *J Neurochem* 74:555-563.
141. **Shibuki K, Gomi H, Chen L, Bao S, Kim JJ, Wakatsuki H, Fujisaki T, Fujimoto K, Katoh A, Ikeda T, Chen C, Thompson RF, Itohara S (1996)** Deficient cerebellar long-term depression, impaired eyeblink conditioning, and normal motor coordination in GFAP mutant mice. *Neuron* 16:587-599.
142. **Shrestha BR, Vitolo OV, Joshi P, Lordkipanidze T, Shelanski M, Dunaevsky A (2006)** Amyloid beta peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci* 33:274-282.
143. **Sillitoe RV, Joyner AL (2007)** Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:549-577.

144. **Snyder SH, Kim PM** (2000) D-amino acids as putative neurotransmitters: focus on D-serine. *Neurochem Res* 25:553-560.
145. **Son Y.J., Thompson W** (1995) Schwann cell processes guide regeneration of peripheral axons. *Neuron* 14:125-132
146. **Sontheimer H, Kettenmann H, Backus KH, Schachner M** (1988) Glutamate opens Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> channels in cultured astrocytes. *Glia* 1:328-336.
147. **Sotelo C.** (1982) Synaptic remodeling in agranular cerebella. In: Palay SL, Chan-Palay V, editors. *The cerebellum-new vistas* New York:Springer-Verlag p.50-68
148. **Spacek J** (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. III. Glial sheath. *Anat Embryol (Berl)* 171:245-252.
149. **Steindler DA, Cooper NG, Faissner A, Schachner M** (1989) Boundaries defined by adhesion molecules during development of the cerebral cortex: the J1/tenascin glycoprotein in the mouse somatosensory cortical barrel field. *Dev Biol* 131:243-260.
150. **Steinmetz CC, Buard I, Claudepierre T, Nagler K, Pfrieder FW** (2006) Regional variations in the glial influence on synapse development in the mouse CNS. *J Physiol* 577:249-261.
151. **Stellwagen D, Malenka RC** (2006) Synaptic scaling mediated by glial TNF- $\alpha$ . *Nature* 440:1054-1059.
152. **Takatsuru Y, Takayasu Y, Iino M, Nikkuni O, Ueda Y, Tanaka K, Ozawa S** (2006) Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neurosci Res* 54:140-148.
153. **Takayasu Y, Iino M, Shimamoto K, Tanaka K, Ozawa S** (2006) Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber-Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. *J Neurosci* 26:6563-6572.
154. **Tanaka M, Maeda N, Noda M, Marunouchi T** (2003) A chondroitin sulfate proteoglycan PTPzeta /RPTPbeta regulates the morphogenesis of Purkinje cell dendrites in the developing cerebellum. *J Neurosci* 23:2804-2814.
155. **Tashiro A, Yuste R** (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 26:429-440.

156. **Thach WT** (2007) On the mechanism of cerebellar contributions to cognition. *Cerebellum* 6:163-167.
157. **Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH**. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev*. 2008 Jul;88(3):983-1008.
158. **Thompson SM** (2003) Ephrins keep dendritic spines in shape. *Nat Neurosci* 6:103-104.
159. **Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M** (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 11:973-981.
160. **Tolias KF, Bikoff JB, Kane CG, Tolias CS, Hu L, Greenberg ME** (2007) The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:7265-7270.
161. **Trotter J, Karram K, Nishiyama A**. (2010) NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Research Reviews* 63 :72 – 82
162. **Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA** (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.
163. **Van Damme P, Bogaert E, Dewil M, Hersmus N, Kiraly D, Scheveneels W, Bockx I, Braeken D, Verpoorten N, Verhoeven K, Timmerman V, Herijgers P, Callewaert G, Carmeliet P, Van Den Bosch L, Robberecht W** (2007) Astrocytes regulate GluR2 expression in motor neurons and their vulnerability to excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:14825-14830.
164. **Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA** (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57:67-81.
165. **Ventura R, Harris KM** (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
166. **Verkhatsky A, Kirchhoff F** (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13:28-37.
167. **Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H** (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.

168. **Vesce S, Rossi D, Brambilla L, Volterra A** (2007) Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation. *Int Rev Neurobiol* 82:57-71.
169. **Vilhardt F** (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *Int J Biochem Cell Biol* 37:17-21.
170. **Volterra A, Meldolesi J** (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
171. **Volterra A, Steinhäuser C** (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia* 47 (3): 249–57
172. **Voyvodic JT.** (1989) Peripheral target regulation of dendritic geometry in the rat superior cervical ganglion. *J Neurosci* 9:1997–2010.
173. **Walz W, Gimpl G, Ohlemeyer C, Kettenmann H** (1994) Extracellular ATP-induced currents in astrocytes: involvement of a cation channel. *J Neurosci Res* 38:12-18.
174. **Wang LC, Baird DH, Hatten ME, Mason CA** (1994) Astroglial differentiation is required for support of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14:3195-3207.
175. **Wang Z, Haydon PG, Yeung ES** (2000) Direct observation of calcium-independent intercellular ATP signaling in astrocytes. *Anal Chem* 72:2001-2007.
176. **Watanabe E** (1984) Neuronal events correlated with long-term adaptation of the horizontal vestibulo-ocular reflex in the primate flocculus. *Brain Res* 297:169-174.
177. **Wong RO, Ghosh A** (2002) Activity-dependent regulation of dendritic growth patterning. *Nat Rev Neurosci* 3:803-812
178. **Woolley CS, McEwen BS** (1994) Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl- D-aspartate receptor-dependent mechanism. *J Neurosci* 14:7680-7687.
179. **Wu GY, Zou DJ, Rajan I, Cline H** (1999) Dendritic dynamics in vivo change during neuronal maturation. *J. Neurosci* 19:4472-4483
180. **Wu SZ, Bodles AM, Porter MM, Griffin WS, Basile AS, Barger SW** (2004) Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid beta peptide. *J Neuroinflammation* 1:2.

181. **Yamada K, Watanabe M** (2002) Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 77:94-108.
182. **Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y, Watanabe M** (2000) Dynamic transformation of Bergmann glial fibers proceeds in correlation with dendritic outgrowth and synapse formation of cerebellar Purkinje cells. *J Comp Neurol* 418:106-120.
183. **Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, Poo M, Duan S** (2003) Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15194-15199.
184. **Ye B, Petritsch C, Clark IE, Gavis ER, Jan LY, Jan YN.** (2004) Nanos and Pumilio are essential for dendrite morphogenesis in *Drosophila* peripheral neurons. *Curr Biol* 14:314-321
185. **Zepeda RC, Barrera I, Castelan F, Suarez-Pozos E, Melgarejo Y, Gonzalez-Mejia E, Hernandez-Kelly LC, Lopez-Bayghen E, Aguilera J, Ortega A** (2009) Glutamate-dependent phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in Bergmann glial cells *Neurochem Int* 55:282-287.
186. **Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S** (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.
187. **Zhuo L, Sun B, Zhang CL, Fine A, Chiu SY, Messing A.** (1997) Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Dev Biol* 187:36-42.
188. **Zimmermann P.** (1982) Estrogen-dependent changes in the functional interrelationships among neurons, ependymal cells and glial cells of the arcuate nucleus. Cytometric studies in the female albino mouse. *Cell Tissue Res* 227:113-128.
189. **Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE** (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:321-330.
190. **Ziv NE, Smith SJ** (1996) Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17:91-102.