

თავის ტვინის ინტეგრაციული მოქმედების დარღვევათა ბაზისური მექანიზმების კვლევა

მაია დათუნაშვილი

*სადისერტაციო ნაშრომი წარდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებებისა და საინჟინრო ფაკულტეტზე სიცოცხლის
შემსწავლელ მეცნიერებათა დოქტორის აკადემიური ხარისხის მინიჭების
მოთხოვნების შესაბამისად*

სიცოცხლის შემსწავლელ მეცნიერებათა სადოქტორო პროგრამა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ნიკოლოზ ონიანი, ასოც. პროფ., ზმდ
თანახელმძღვანელი: Thomas Budde, პროფ., ზმდ

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი
თბილისი, 2016

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სადისერტაციო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და არ შეიცავს სხვა ავტორების მიერ აქამდე გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც ნაშრომში არ არის მოხსენიებული ან ციტირებული სათანადო წესების შესაბამისად.

მაია დათუნაშვილი

22.07.2016

აბსტრაქტი

შესავალი: სხვადასხვა ქცევითი მდგომარეობის დროს თალამუსში წარმოქმნება განსხვავებული რიტმული აქტივობა. ამაში გადამწყვეტ როლს თალამოკორტიკალური (თკ) ნეირონების უჯრედშიდა და უჯრედგარე მახასიათებლები თამაშობს. ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი, ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული არხები (ჰცნ) აკონტროლებენ უჯრედული და ნეირონული წრედების მოქმედებას. ჰცნ არხების მოდულირება ხდება სხვადასხვა ცილებითა და უჯრედული მესენჯერებით. ჰორმონები და ნეიროტრანსმიტერები, რომლებიც იწვევენ ციკლური ნუკლეოტიდების უჯრედშიდა დონის გაზრდას ანაცვლებენ ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი (ჰა) დენის აქტივაციის პოტენციალს დადებითი მიმართულებით და აჩქარებენ დენის კინეტიკას. აზოტის ოქსიდი (აო) იწვევს გუანიდილ ციკლაზას (გც) ხსნადი ფორმის გააქტივებას და ციკლური გუანოზინმონოფოსფატის (ც-გმფ) უჯრედშიდა დონის გაზრდას. მოცემულ სადისერტაციო ნაშრომში შევისწავლეთ ც-გმფ-ის როლი თალამური ჰცნ არხების ფუნქციაში და აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სასიგნალო გზის მნიშვნელობა თალამოკორტიკალური სისტემის რეგულაციაში.

საკვლევი ობიექტები და მეთოდები: აო/გც2^{-/-} და C57BL/6J იქნა გამოყენებული როგორც საექსპერომენტო და საკონტროლო ცხოველები. ჰა დენის ბუნება შესწავლილი იქნა პოტენციალის ფიქსირების მეთოდით და თკ ნეირონების აქტიური და პასიური მახასიათებლების განსაზღვრა მოხერხდა დენის ფიქსირების მეთოდის გამოყენებით. *in vitro* ადგილობრივი ველის პოტენციალისა და *in vivo* ელექტროფიზიოლოგიის მეშვეობით შესწავლილი იქნა სინაფსური გადაცემები.

შედეგები: საკონტროლო თაგვებთან შედარებით აო/გც2^{-/-} ცხოველებს აღენიშნათ უფრო მეტად ჰიპერპოლარიზებული ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალი. ორივე ჯგუფში 1, 10 და 100 მიკ. მოლური 8-Bromo-cGMP უჯრედშიდა შეყვანამ გამოიწვია დოზა-დამოკიდებული მანერით ჰა დენის აქტივაციის მრუდის დეპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით გადანაცვლება. ც-გმფ-ის ყველა კონცენტრაციის მიმართ აო/გც2^{-/-} ცხოველებმა აჩვენეს გაზრდილი მგრძნობელობა. 8-Bromo-cAMP იგივე კონცენტრაციების ინექციას ასევე მოჰყვა აქტივაციის პოტენციალის ძლიერი

გადანაცვლება დადებითი მიმართულებით აო/გც2^{-/-}ცხოველებში, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით. გუანიდილ და ადენიდილ ციკლაზების ინჰიბიტორებმა (ODQ და SQ22536) გამოიწვიეს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის ნეგატიური მიმართულებით შებრუნება, ნოკაუტირებულ ცხოველებთან შედარებით. გც2-ს გენეტიკურ წაშლას მოჰყვა მაჰიპეპოლარიზებული დენის შეყვანით გამოწვეული პოტენციალის ჩაზნექვის ამპლიტუდისა და მადეპოლარიზებული დენის საპასუხოდ აღმოცენებული მოქმედების პოტენციალების რაოდენობის შემცირება აო/გც2^{-/-}ცხოველებში, საკონტროლო თავგებთან შედარებით. 10 მიკ. მოლური 8-Bromo-cGMP შეყვანამ საკონტროლო ცხოველებში გამოიწვია უჯრედის აგზნებადობის გაზრდა. ნოკაუტირებულ ცხოველებს აღენიშნათ სინაფსური რიტმული აფეთქებითი განმუხტვების შემცირებული რაოდენობა კონტროლთან შედარებით. აქტიური ღვიძილისა (აღ) და პარადოქსული ძილის (პძ) დროს აო/გც2^{-/-}ცხოველების ელექტროენცეფალოგრამაზე (ეეგ) დომინირებდა ნელი დელტა ოსცილაციები.

დასკვნები: ც-გმფ ჰცნ არხების ძლიერი მოდულატორია. ც-გმფ-ის ბაზალური დონის შემცირება იწვევს ჰცნ არხების პოტენციალ-დამოკიდებულებაში ცვლილებას და ანაცვლებს ჰა დენის აქტივაციის მრუდს ნეგატიური პოტენციალის მიმართულებით. გც2-ის გენეტიკურ წაშლას მოჰყვება თვ უჯრედების მახასიათებლების ცვლილება. აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ არხების სასიგალო გზის დისფუნქცია იწვევს თალამოკორტიკალურ დისრითმიას.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: თალამუსი, ჰცნ არხები, ჰა დენი, გც2, ც-გმფ, თალამოკორტიკალური ოსცილაციები.

Abstract

Introduction. The thalamus has ability to generate rhythmic activities related to different behavioral states. Intrinsic and extrinsic properties of thalamocortical (TC) cells are critical for generation of thalamocortical oscillations. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels control the single cell and network activities. Different interacting proteins and cellular messengers modulate the properties of HCN channels. Hormones and neurotransmitters that elevate levels of intracellular cyclic nucleotides facilitate hyperpolarization-activated inward cationic current (I_h) by shifting the potential of half maximal activation ($V_{1/2}$) values to more positive values and by accelerating the activation kinetics. Nitric oxide (NO) activates soluble forms of guanylyl cyclases (sGC) and increases the level of cGMP. In the present study we tried to characterize the role of cGMP in the regulation of thalamic HCN channels and to analyze the impact of NO/GC2/cGMP/HCN pathway in controlling thalamocortical network activities.

Materials and methods: NO-GC2^{-/-} and C57BL /6J were used as experimental and control groups, respectively. The properties of I_h current was studied under the voltage clamp conditions and passive and active properties of TC neurons were defined using the current clamp method. *In vitro* local field potential recordings and *in vivo* electrophysiology were used to study network activities.

Results: I_h in NO-GC2^{-/-} mice showed more hyperpolarized $V_{1/2}$ compared to WT. In both genotypes intracellular application of 1, 10 and 100 μ M of 8-Bromo-cGMP dose-dependently shifted the activation curve of I_h to depolarized potentials. NO-GC2^{-/-} animals showed increased sensitivity to all different concentrations of cGMP, compared to WT. The same concentrations of 1, 10 and 100 μ M of 8-Bromo-cAMP also induced statistically larger positive shift in NO-GC2^{-/-}, compared to control animals. Extracellular administration of the sGC and adenylyl cyclase (AC) inhibitor ODQ and SQ22536, respectively, caused significant hyperpolarization in the voltage dependency of I_h in WT, compared to KO animals. Genetic deletion of GC2 decreased the voltage sag amplitude and number of action potentials in response to depolarizing current steps in NO-GC2^{-/-}, compared to control mice. This finding

was in agreement with the effect of application of 10 μ M 8-Bromo-cGMP in WT mice where firing rates were increased. KO animals exhibited reduced number of rhythmic bursts compared to control mice in local field potential recordings *in vitro*. During active wakefulness (AW) and rapid-eye-movement (REM) sleep the electroencephalogram (EEG) of NO-GC2^{-/-} mice was dominated by slow delta oscillations.

Conclusions: cGMP is a potent modulator of thalamic HCN channels. Reduced basal levels of cGMP change the voltage-dependency of HCN channels and shift the activation curve of I_h current to more negative potentials. Deletion of GC2 alters the intrinsic properties of TC cells. Dysfunction of the NO/GC2/cGMP/HCN pathway causes thalamocortical dysrhythmia and slows down the cortical activities during AW and REM sleep.

Keywords: thalamus, HCN channels, I_h current, GC2, cGMP, thalamocortical oscillations.

მადლობა

მსურს მადლობა გადავუხადო სადისერტაციო ნაშრომში მონაწილე ყველა პიროვნებას. განსაკუთრებული მადლიერება მინდა გამოვხატო პროფ. მანანა ნემსაძისა და პროფ. ნიკოლოზ ონიანის მიმართ. მათი დახმარებით დაიწყო ჩემი სამეცნიერო მოღვაწეობა და ამ წლების განმავლობაში ყოველთვის ვგრძნობდი მათ მხარდაჭერას. უღრმესი მადლობა პროფ. ნატო დარჩიას, რომლის დახმარებითაც პირველად ვიგემე უცხო ქვეყანაში მუშაობის გემო. დიდ მადლობას ვუხდის ასევე გერმანული აკადემიის გაცვლით პროგრამას (DAAD) ახალგაზრდული სამეცნიერო კვლევითი სტიპენდიის მონიჭებისათვის, რომლის მეშვეობითაც შესრულდა ჩემი სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი მასალა. ჩემი უღმესი პატივისცემა და მადლიერება გერმანიის უნივერსიტეტის (*Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany*) პროფ. Thomas Budde-ს მიმართ, რომლისთვისაც არასოდეს იყო გასაკვირი უცხო ქვეყანაში ცხოვრებისა და მუშაობის პრობლემები. დიდი მადლობა მინდა გადავუხადო ქ-ნ მარიკა გოგიჩაძეს, ქ-ნ ნანა ნემსაძეს, ქ-ნ თამარ ბასიშვილს, ქ-ნ მარინე ელიოზიშვილს, ქ-ნ ლია მაისურაძეს, ქ-ნ ირმა გვილიას, კაწია ხაჩატუროვას გამოცდილების გაზიარებისა და ერთად გატარებული ულამაზესი წლებისათვის. ძალიან დიდი მადლობა ჩემს უახლოეს მეგობარს - Mehrnoush Zobeiri. ასევე უდიდესი მადლობა Manuela Cerina და Dilip Verma მეგობრობისა და დახმარებისათვის. უღრმესი მადლობა ჩემს უსაყვარლეს მეგობრებს: ნანა კუნელაურს, ლალი ბარიხაშვილს და მთელს ჩემს ოჯახს თანადგომისა და სიყვარულისათვის.

სარჩევი

სარჩევი	viii
სურათების ჩამონათვალი	x
გრაფიკების ჩამონათვალი	x
ტაბულების ჩამონათვალი	xii
აბრევიატურის ჩამონათვალი	xii
შესავალი.....	1
სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა	5
თავი 1. თალამუსი	5
1.1 თალამოკორტიკალური სისტემა	7
თავი 2. აო /გც2/ც-გმფ სასიგნალო გზა	9
2.1 გუანიდილ ციკლაზა და მისი ექსპრესია ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში.....	11
2.2 ციკლური გუანოზინ მონოფოსფატის ეფექტორი მოლეკულები: ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული კათიონური არხები	14
2.2.1 ჰცნ არხების ექსპრესია ქსოვილებში.....	18
2.2.2 ჰცნ არხების ფიზიოლოგიური როლი ნეირონებში.....	18
თავი. 3 ოსცილაციები	19
3.1 თითისტარების წარმოქმნა.....	20
3.2 დელტა ტალღების წარმოქმნა	22
თავი.4 აზოტის ოქსიდის მონაწილეობა ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში	24
მეთოდოლოგია	28
თავი 1. გამოყენებული მასალა	28

1.1	საექსპერიმენტო ცხოველები	28
1.2	ექსპერიმენტში გამოყენებული ქიმიური ნივთიერებები.....	28
	თავი 2. გამოყენებული მეთოდები	29
2.1.	<i>in vitro</i> ელექტროფიზიოლოგია.....	29
2.1.1	ანატლების მომზადება	29
2.1.2	<i>patch-clamp</i> ტექნიკა	29
2.1.3	ექსპერიმენტის პროცედურა.....	30
2.1.4	პოტენციალის ფიქსაციის მეთოდი	31
2.1.5	დენის ფიქსაციის მეთოდი	32
2.1.6	თალამუსის ველის პოტენციალის <i>in vitro</i> აღრიცხვის მეთოდი..	33
2.1.7	ელექტროდების ჩანერგვის სტერეოტაქსული მეთოდი და <i>in vivo</i> ელექტროფიზიოლოგია.....	33
2.1.8	იმუნოჰისტოქიმიური შედეგების მეთოდი.....	34
2.1.9	მიღებული შედეგების სტატისტიკური დამუშავება	34
	მიღებული შედეგები	36
	თავი. 1 ც-ამფ და ც-გმფ-ის როლის დადგენა თალამური ჰცნ არხების რეგულაციაში.....	36
1.1	აო/გც/ცგმფ სასიგნალო გზის როლი თვ უჯრედების ჰცნ არხებისმოქმედების რეგულაციაში.....	36
1.2	თვ ნეირონების მოდულაცია ცამფ-ით.....	43
	თავი. 2 ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილება იწვევს აო-გც ^{2/-} თავებში თვ ნეირონების აქტიური და პასიური მახასიათებლების ცვლილებას.....	47
2.1	ც-გმფ-ის უჯრედშიდა დონის გაზრდა იწვევს მოქმედების პოტენციალის რაოდენობის მომატებას.....	50
	თავი. 3 თალამუსში ჰცნ არხები აკონტროლებენ სინაფსურ გადაცემებს.....	51
	თავი. 4 აო/გც ^{2/-} /ც-ამფ/ჰცნ სასიგნალო გზის ფუნქციის დარღვევა იწვევს სხვადასხვა ქცევითი მდგომარეობის დროს ევგ აქტივობის ცვლილება	53
	შედეგების განხილვა.....	58
	დასკვნები	65
	დისერტაციის რეზიუმე ინგლისურ ენაზე	66

სურათების ჩამონათვალი:

სურ 1: სარელო თვ ნეირონების სამი განხვავებული ტიპი.....	6
სურ 2: ფლუორესცენციული მიკროსკოპის ქვეშ ნაჩვენები ინტერნეირონები ..	7
სურ 3:თალამოკორტიკალური სისტემის გამარტივებული სქემა.....	8
სურ 4: აზოტის ოქსიდის წარმოქმნისა და მოქმედების სქემური გამოსახულება..	10
სურ 5: გუანიდილ ციკლაზას შემადგენელი სუბერთეულები.....	12
სურ 6: აო-ის იზოფორმების სქემატური ილუსტრაცია და არსებული ნოკაუტირებული თაგვების ხაზები	13
სურ 7: ჰცნ არხების სტრუქტურის სქემატური გამოსახულება.....	17
სურ 8: ჰა დენის როლი თალამური ოსცილაციების წარმოქმნაში.....	23

გრაფიკების ჩამონათვალი:

გრაფიკი 1: თალამოკორტიკალურ უჯრედებში გც2-ს პოსტსინაფსური მდებარეობა უკავია.....	36
გრაფიკი 2: ჰა დენის ჩაწერა ხდება პოტენციალის ფიქსირების მეთოდით.....	37
გრაფიკი 3: გუანიდილ ციკლაზას ციტოპლაზმური ფორმა არეგულირებს თალამუსის სარელო უჯრედებში ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი დენის პოტენციალ - დამოკიდებულებას	38
გრაფიკი 4: გუანიდილ ციკლაზა არეგულირებს თალამოკორტიკალურ ნეირონებში ჰა დენის აქტივაციის კინეტიკას.....	39
გრაფიკი 5: თალამოკორტიკალური ნეირონების ჰა დენის აქტივაციის მოდულირება ც-გმფ-ით.....	40

გრაფიკი 6 : ციტოპლაზმური გუანილილ ციკლაზას სელექტიური ინჰიბიტორი ODQ ცვლის სარელო უჯრედების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალს.....	42
გრაფიკი 7: ODQ არ ცვლის α -გ γ ^{2/-} თაგვების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალს.	42
გრაფიკი 8: ც-ამფ ჰენ არხების პოტენციური მოდულატორია.....	43
გრაფიკი 9: ადენილილ ციკლაზას ინჰიბიტორი SQ22,536 გავლენას ახდენს ჰა დენის აქტივაციაზე საკონტროლო ცხოველებში.....	45
გრაფიკი 10: SQ22536 მცირედ ცვლის α -გ γ ^{2/-} თაგვების თვ უჯრედების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალს.....	45
გრაფიკი 11: შეჯამებული სქემა: ციკლური ნუკლეოტიდების ინჰიბირება იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის მრუდის გადანაცვლებას ნეგატიური პოტენციალის მიმართულებით.....	46
გრაფიკი 12: ციკლური ნუკლეოტიდების გავლენა ჰენ არხების მოქმედებაზე შეზღუდულია.....	47
გრაფიკი 13: უჯრედის პასიური მახასიათებლები.....	48
გრაფიკი 14: გ γ ² უკმარისობა ცვლის უჯრედის მემბრანის აქტიურ მახასიათებლებს.....	49
გრაფიკი 15: ც-გმფ დენის ფიქსირების პირობებში იწვევს საკონტროლო ცხოველების თვ უჯრედების მახასიათებლების ცვლილებას.....	50
გრაფიკი 16: ც-გმფ უჯრედშიდა დოზის გაზრდას მოჰყვება მოქმედების პოტენციალების რაოდენობის მომატება	51
გრაფიკი 17: გ γ ² -ის უკმარისობა ცვლის სინაფსურ გადაცემებს თალამუსში.....	52
გრაფიკი 18: საკონტროლო და α -გ γ ^{2/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ად-ის პირობებში.....	54
გრაფიკი 19: საკონტროლო და α -გ γ ^{2/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ზნმ-ის პირობებში.....	55
გრაფიკი 20: საკონტროლო და α -გ γ ^{2/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ღნმ-ის პირობებში.....	56
გრაფიკი 21: საკონტროლო და α -გ γ ^{2/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი პა ძილის პირობებში.....	57

ტაბულების ჩამონათვალი:

ტაბულა 1: ც-გმფ იწვევს ჰა დენის აქტივაციის დროის კონსტანტის დოზა-დამოკიდებულ ცვლილებას 41

ტაბულა 2: ც-ამფ დოზა დამოკიდებული მანერით ცვლის ჰა დენის აქტივაციის კინეტიკის სწრაფ (1) და ნელ (2) კომპონენტებს 44

აბრევიატურის ჩამონათვალი:

დღგბ - დორსალური ლატერალური გენიკულური ბირთვი

თკ - თალამოკორტიკალური ნეირონები

რბ - რეტიკულური ბირთვი

კთ - კორტიკოთალამური ნეირონები

აო - აზოტის ოქსიდი

ც-ამფ - ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატი

ც-გმფ - ციკლური გუანოზინ მონოფოსფატი

ფდე - ფოსფოდიესთერაზა

პკ - პროტეინ კინაზა

ცნდ - ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული არხები

ჰცნ - ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი, ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული არხები

ჰა დენი - ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი დენი

ცნდდ - ციკლური ნუკლეოტიდების დამაკავშირებელი დომენი

ცნს - ცენტრალური ნერვული სისტემა

აც - ადენიდილ ციკლაზა

გც - გუანიდილ ციკლაზა

აო - აზოტის ოქსიდი

აოს - აზოტის ოქსიდის სინთეზა

ნ-აოს - ნეირონული აზოტის ოქსიდის სინთეზა

ე-აოს - ენდოთელური აზოტის ოქსიდის სინთეზა

ი-აოს - ინდუციბელური აზოტის ოქსიდის სინთეზა

აო-გც1 - აზოტის ოქსიდის რეცეპტორი გუანილილ ციკლაზა 1

აო-გც2 - აზოტის ოქსიდის რეცეპტორი გუანილილ ციკლაზა 2

აო-გც2^{-/-} - გც2 ნოკაუტირებული თაგვების ხაზი

PSD 95 - პოსტსინაფსური სიმჭიდროვის ცილა 95

ვბ - ვენტრობაზალური ბირთვი

NMDA რეცეპტორები - გლუტამატის იონოტროპული რეცეპტორი

აღ - აქტიური ღვიძილი

პმ - პარადოქსული ძილი

ზნმ - ზერელე წელი ძილი

ღნმ - ღრმა წელი ძილი

შესავალი

თალამოკორტიკალური სისტემა გადამწყვეტ როლს თამაშობს მთელ რიგ ფიზიოლოგიურ თუ პათოფიზიოლოგიურ პროცესებში, როგორიცაა ძილ-ღვიძილის ციკლი და ეპილეფსია. ამ სისტემის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ნაწილი - თალამუსი სენსორული ინფორმაციის კარიჰქეს წარმოადგენს. მისი საშუალებით პერიფერიიდან მომავალი სენსორული ინფორმაცია ცერებრალურ ქერქს გადაეცემა. თალამუსი მრავალ ბირთვს აერთიანებს. თვითოეული ბირთვი განსხვავებული სენსორული ინფორმაციის გატარებას ემსახურება (Jones, 1998;Guillery et al. 2001; Sherman & Guillery 2002). მოცემული სადისერტაციო ნაშრომი თალამუსის დორსალური ლატერალური გენიკულური (დღგბ) ბირთვის თალამოკორტიკალური (თკ) სარელეო ნეირონების ელექტროფიზიოლოგიური ბუნების შესწავლას ემსახურებოდა. დღგბ ატარებს მხედველობით ინფორმაციას რეტინიდან მხედველობის ქერქის მიმართულებით. გარდა ამისა, ტვინის ღეროდან, ჰიპოთალამუსიდან, ჰიპოკამპიდან, ბაზალური წინა ტვინიდან, ქერქიდან მომავალი ბოჭკოები დასაბამს აძლევს დღგბ-ში კომპლექსური კავშირების ჩამოყალიბებას (Liu et al., 1995). ისევე როგორც თალამუსის სხვა ბირთვები, დღგბ ცერებრალურ ქერქთან ერთად მონაწილეობს ძილ-ღვიძილის ციკლთან დაკავშირებული სხვადასხვა ოსცილაციების წარმოქმნაში. ამ რიტმების საფუძველს თკ უჯრედების უნიკალური უჯრედშიდა ბუნება განაპირობებს. სხვადასხვა ქცევითი მდგომარეობის დროს თკ ნეირონები აჩვენებენ განმუხტვის ორ პატერნს. ღვიძილის დროს ეს ნეირონები დეპოლარიზებულია და ძირითადად ტონური, განმეორებითი სპაიკებით განიმუხტება, ხოლო ძილის დროს აღინიშნება ფეთქებადი განმუხტვები (Steriade & Mulle, 1985). თკ უჯრედების ეს უნიკალური თვისება სხვადასხვა არხების არსებობითაა განპირობებული. ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს არხს ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი, ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული (ჰცნ) არხები წარმოადგენს (Biel et al., 2009). ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში (ცნს) ჰცნ არხები ოთხი იზოფორმითაა წარმოდგენილი: ჰცნ 1-4. ისინი პოტენციალ-დამოკიდებული არხებია და მემბრანის ჰიპერპოლარიზაცია ამ არხების გახსნის

აუცილებელ პირობას წარმოადგენს. ჰცნ არხები შერეული კათიონური არხებია, რომელთა აქტივაციასაც თან ახლავს ნატრიუმისა და კალიუმის იონების უჯრედში შესვლა, ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი დენის (ჰა) აღმოცენება და უჯრედის დეპოლარიზაცია. ისინი მონაწილეობენ უჯრედის აგზნებადობისა და მემბრანული პოტენციალის სტაბილიზაციაში და არეგულირებენ როგორც უჯრედულ აქტივობას, ასევე ნეირონული კავშირების მუშაობას. ისევე როგორც სხვა არხების შემთხვევაში, ჰცნ არხების აქტივაცია რეგულირდება მრავალი მოლეკულური ფაქტორით. ციკლურ ნუკლეოტიდებს ამ შემთხვევაში გადამწყვეტი როლი ეკისრებათ (DiFrancesco, Mangoni, Milano, & Generali, 1994). ნეიროტრანსმიტერები, რომლებიც იწვევენ უჯრედშიდა ციკლური ნუკლეოტიდების დონის გაზრდას, აადვილებენ ჰცნ არხების გახსნას. ეს უჯრედშიდა მოლეკულები ამყარებენ ქიმიურ კავშირს ჰცნ არხების C-ტერმინალთან არსებულ ციკლური ნუკლეოტიდების დამაკავშირებელ ავტოინჰიბიტორულ დომენტთან (CNBD) და ახდენენ შემაკავებელი გავლენის მოხსნას (Craven & Zagotta, 2006). ციკლური ნუკლეოტიდებით ხდება ჰცნ არხების აქტივაციის პოტენციალის დადებითი მიმართულებით გადანაცვლება. ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატის (ც-ამფ) როლი ჰცნ არხების რეგულაციაში ფართოდ არის შესწავლილი. რამოდენიმე კვლევის თანახმად, ციკლური გუანოზინ მონოფოსფატი (ც-გმფ) ასევე უნდა წარმოადგენდეს ჰცნ არხების მოდულატორს. ც-გმფ-ის უჯრედშიდა დონის გაზრდა ხდება აზოტის ოქსიდის (აო) გუანიდილ ციკლაზაზე (გც) მოქმედების საპასუხოდ. აო არატრადიციული რეტროგრადული ნეიროტრანსმიტერია. მისი როლის შესწავლა სინაფსურ პლასტიკურობაში და ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში უკვე ათწლეულებს ითვლის, მაგრამ ამ პროცესების მექანიზმის დეტალური შესწავლა დღემდე ვერ მოხერხდა, რაც აო-ის არამდგრადი ბუნებით არის განპირობებული. აო-ის წარმოქმნა ხდება აზოტის ოქსიდის სინთეტაზას (აოს) მიერ. ნეირონებში აო-ის ძირითად წყაროს ნეირონული აზოტის ოქსიდის სინთეტაზა (ნ-აოს) წარმოადგენს. აო წარმოქმნისთანავე თავისუფლად კვეთს პლაზმურ მემბრანას და უკავშირდება აზოტის ოქსიდის რეცეპტორებს, რომელსაც ამ შემთხვევაში გც წარმოადგენს. გც უჯრედში ორი ფორმითაა წარმოდგენილი: პლაზმურ მემბრანასთან დაკავშირებული და ციტოპლაზმური (Friebe & Koesling, 2009). აო უკავშირდება მხოლოდ რკინა-შემცველ

ციტოპლაზმურ ფორმას, რომელიც მოქმედებს როგორც აო-ის რეცეპტორი. გც-ს ციტოპლაზმური ფორმა თავის მხრივ ორი იზოფორმით გვხვდება: გც1 და გც2. ცნს ეს იზოფორმები თანაბარი რაოდენობითაა წარმოდგენილი. გც-ს გააქტივებას მოჰყვება გუანოზინ ტრიფოსფატის ც-გმფ-ად გარდაქმნა, რომელიც თავის მხრივ იწვევს ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული არხების (ცნდ), მათ შორის ჰცნ არხების აქტივაციას, ასევე ც-გმფ-დამოკიდებული ფოსფორდიესთერაზებისა (ფდე) და ც-გმფ-დამოკიდებული პროტეინკინაზების (პკ)-ის გააქტივებას (Mullershausen et al., 2001). Pape (1990) აჩვენა, რომ აო იწვევდა დღგბ-ის თვ ნეირონების დეპოლარიზაციას ჰა დენის აქტივაციაში ცვლილების შეტანის გზით. მაგრამ ამ გზის დეტალური შესწავლა იმ დროისათვის ვერ მოხერხდა. დისერტაციის მიზანი სწორედ ამ ამოცანის გადაწყვეტას ემსახურებოდა. 2006 წელს Mergia (Ruhr-Universität Bochum, Germany)-ს ჯგუფის მიერ გამოყვანილ იქნა გც2-ს ნოკაუტირებული თაგვების (აო-გც2^{-/-}) ხაზი. ჰიპოკამპის პირამიდულ უჯრედებზე ჩატარებული ცდების თანახმად, მათ აჩვენეს, რომ გც2-ის წაშლამ გამოიწვია ჰა დენის მახასიათებლების ცვლილება. მოცემულ დისერტაციაში შევეცადეთ გაგვეჩვენა აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ არხების სასიგნალო გზის როლი როგორც თალამუსის ცალკეული ნეირონების, ასევე თალამოკორტიკალური სისტემის რეგულაციაში. ნაშრომში გამოყენებულ საექპერიმენტო აო-გც2^{-/-} ცხოველებს აღენიშნებოდათ ც-გმფ-ის ბაზალური დონის შემცირება და ამაზე დაყრდნობით შევეცადეთ პასუხი გაგვეცა შემდეგი კითხვებისათვის:

- რა როლი აკისრია ც-გმფ-ს თალამური ჰცნ არხების მოქმედების რეგულაციაში?
- რა გავლენას ახდენს უჯრედშიდა ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილება თვ უჯრედების პასიურ და აქტიურ მახასიათებლებზე?
- იცვლება თუ არა აო-გც2^{-/-} ცხოველებში უჯრედის მახასიათებლების ცვლილების საპასუხოდ თალამოკორტიკალური ოსცილატორული აქტივობა?

მოცემული სადისერტაციო ნაშრომის თანახმად, აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ არხების სასიგნალო გზა გადამწყვეტ როლს თამაშობს თალამოკორტიკალურ სისტემაში. ც-გმფ თალამური ჰცნ არხების პოტენციური მოდულატორია. ც-გმფ-ის უჯრედშიდა დონის შემცირებას მოჰყვება თვ ნეირონების მოსვენების პოტენციალის ჰიპერპოლარიზაცია და უჯრედის აქტიური მახასიათებლების ცვლილება. ყოველივე

ეს კი თავის მხრივ ცვლის სინაფსურ გადაცემებს და იწვევს ელექტროენცეფალოგრამული (ეეგ) აქტივობის ცვლილებას.

სამეცნიერო ლიტერატურის მიმოხილვა

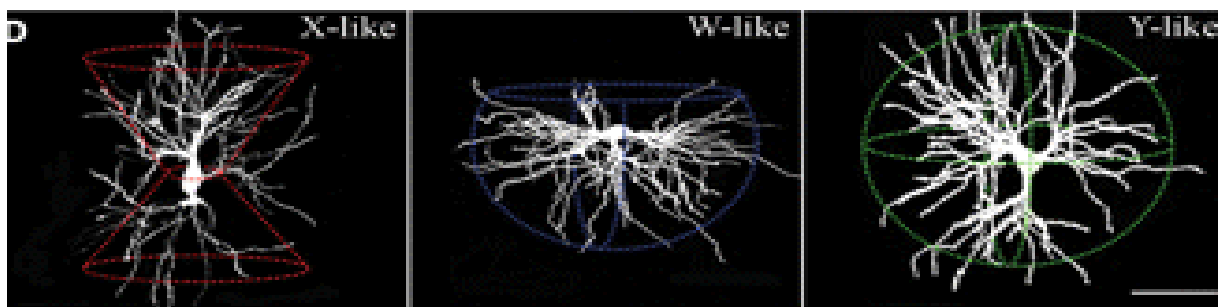
თავი 1. თალამუსი

თალამუსი დიენცეფალონის ყველაზე დიდი ნაწილია და ტვინის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ქვეგანაყოფს წარმოადგენს. მან ეს სახელი მიენიჭა პირველ საუკუნეში ბერძენი ანატომიის სწავლულის გალენის მიერ. თალამუსი ბერძნული სიტყვაა და ნიშნავს რომაული სახლის შიდა ოთახს, რაც მის უმნიშვნელოვანეს ფუნქციაზე მიუთითებს. იგი მდებარეობს ტვინის ცენტრალურ ნაწილში შუა ტვინსა და ცერებრალურ ქერქს შორის და იყოფა სამ ძირითად ნაწილად: წინა თალამუსი, მედიალური და ლატერალური თალამუსი. ეს ნაწილები გამოყოფილია ინტრალამინარული თეთრი ნივთიერებით. თალამუსის გავლით სენსორული ინფორმაცია პერიფერიიდან ქერქს გადაეცემა (Jones, 1998; (R. W. Guillery et al., 2001); Sherman & Guillery 2002). იგი მრავალი ბირთვის ერთობლიობას წარმოადგენს (20-30) და თვითოეული ბირთვი განსხვავებული სენსორული ინფორმაციის გატარებას ემსახურება. წარმოდგენილი ნაშრომი ლატერალური გენიკულური ბირთვის დორსალური ნაწილის (დღგბ) ელექტროფიზიოლოგიური თვისებების შესწავლას ემსახურება. დღგბ-ის მეშვეობით მხედველობითი ინფორმაცია რეტინიდან მხედველობის ქერქს გადასცემა. მაგრამ რეტინიდან წამოსული აქსონები დორსალური ლატერალური თალამუსის სინაფსების მხოლოდ 10% შეადგენს. დანარჩენი სინაფსების 90% იქმნება მხედველობის ქერქიდან, ტვინის ღეროდან, თალამუსის რეტიკულური ბირთვიდან და ლოკალური ინტერნეირონებიდან გამომავალი ბოჭკოებით. თალამუსში მიმართული ტვინის ღეროსა და შუა ტვინის აფერენტები მოიცავს პარაბრანხიალური უბნის ქოლინერგულ ნეირონებს, locus coeruleus ნორადრენერგულ ნეირონებს და დორსალური რაფეს ბირთვის სეროტონინერგულ ნეირონებს. კატების დორსალურ გენიკულურ ბირთვში შემავალი აფერენტების 90%-ს ქოლინერგული ბოჭკოები წარმოადგენს. ჰიპოთალამუსის ტუბერომამილარული ბირთვი თალამუსისაკენ ჰისტამინერგულ ბოჭკოებს გზავნის, მაშინ, როდესაც ბაზალური წინა ტვინიდან მომავალი გაბაერგული იმპულსები

სარელო უჯრედებზე არაპირდაპირი გზით, რეტიკულური ბირთვის აქტივაციით მოქმედებენ.

დღგბ-ის ნეირონული ელემენტები შეიძლება დაიყოს სამ კატეგორიად: პერიფერიიდან სარელო უჯრედებზე გავრცელებადი აფერენტები, სარელო თალამოკორტიკალური (თკ) უჯრედები, რომლებიც პროეცირდება ქერქში და ადგილობრივი ინტერნეირონები.

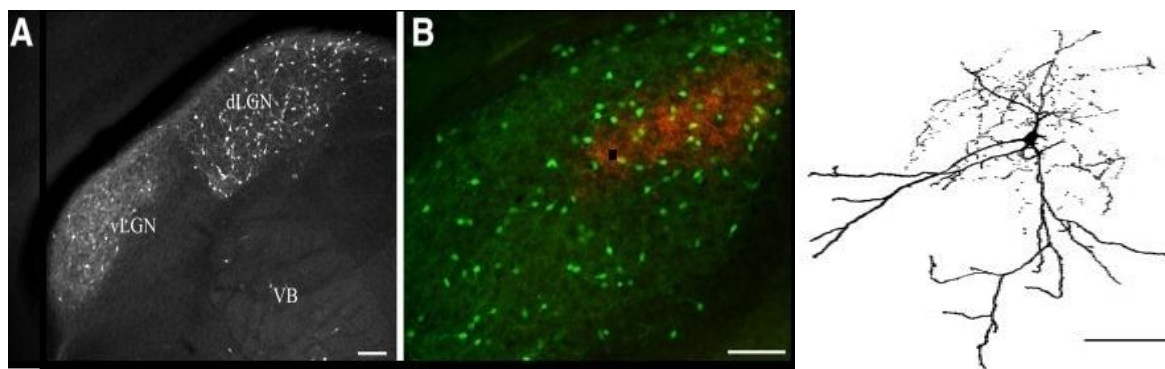
სარელო უჯრედები: დღგბ-ში მორფოლოგიის მიხედვით სამის ტიპის სარელო უჯრედს განარჩევენ: X უჯრედები, რომელთა დენდრიტებიც ზედა და ქვედა პოლუსებზეა განაწილებული, Y უჯრედები - მისი დენდრიტები შემოსაზღვრავენ უჯრედის სხეულს და W უჯრედები, რომლის დენდრიტებიც ერთ სივრცეშია მოთავსებული. მიუხედავად მორფოლოგიური სხვაობისა, სამივე ტიპის უჯრედი ხასიათდება მსგავსი ელექტრონული აქტივობით (სურ 1).



სურ. 1. სარელო თალამოკორტიკალური ნეირონების სამი განხვავებული ტიპი.

ელექტრონული მიკროსკოპით ნაჩვენები იქნა, რომ თალამუსის სარელო უჯრედები დაახლოებით 4000-5000 სინაფს იღებენ (Liu et al., 1995). დორსალური თალამუსი შეიცავს როგორც სიმეტრიულ (გაბაერგულ), ისე არასიმეტრიულ (გლუტამატერგულ) სინაფსებს.

ინტერნეირონები: მღნელების თალამუსში ინტერნეირონები მხოლოდ დორსალურ თალამუსსა და ძალიან მცირე რაოდენობით ვენტრობაზალურ ბირთვშია ნაპოვნი, მაშინ, როდესაც ადამიანისა და მაიმუნების ყველა ბირთვი შეიცავს ინტერნეირონებს. ეს უჯრედები მღნელების დღგბ-ის 20-25%-ს შეადგენს. ინტერნეირონები სარელო უჯრედებისაგან სხეულის მცირე ზომითა და წვრილი, გრძელი და ჩახლართული დენდრიტებით განსხვავდება (W. Guillery, n.d.; Sherman 2002) (სურ.2).



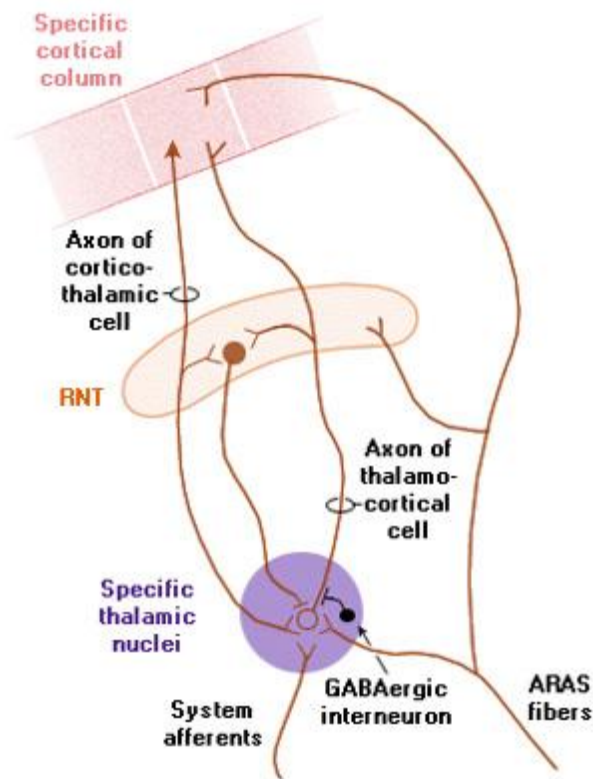
სურ. 2. ფლუორესცენციული მიკროსკოპის ქვეშ ნაჩვენები ინტერნეირონები.

ინტერნეირონები გამა-ამინო-ერბოს მჟავას (GABA) შემცველი უჯრედებია და მისი აქტივაცია თალამუსის სარელეო უჯრედების ინჰიბიციას განაპირობებს.

1.1 თალამოკორტიკალური სისტემა

ვინაიდან თალამოკორტიკალური სისტემა გადამწყვეტ როლს თამაშობს ისეთ უმნიშვნელოვანეს ფიზიოლოგიურ პროცესებში როგორცაა დასწავლა და მეხსიერება, ძილ-ღვიძილის ციკლთან დაკავშირებული სხვადასხვა ოსცილაციების წარმოქმნა, ამ სისტემის ანატომიის მოკლე მიმოხილვა აუცილებელია. სურ 3. ნაჩვენებია თალამოკორტიკალური წრის გამარტივებული სქემა. როგორც სურათი გვიჩვენებს, თალამოკორტიკალური სისტემის ძირითადი სამშენებლო მასალა მოიცავს: 1) ამაგზნებელ გლუტამატერგულ კორტიკოთალამურ (კთ) ნეირონებს, 2) ამაგზნებელ გლუტამატერგულ თვ სარელეო უჯრედებს და 3) რეტიკულური თალამური ბირთვის (რბ, RNT) გაბაერგულ ნეირონებს. თალამუსი და ქერქი რეციპროკულ ურთიერთდამოკიდებულებაშია. დორსალური თალამუსის სხვადასხვა სარელეო ბირთვი გადასცემს სენსორულ ინფორმაციას ქერქის შესაბამისი უბნის IV შრეს. ქერქი თავის მხრივ გზავნის ამაგზნებელ პროექციებს დორსალური თალამუსის კონკრეტული ბირთვისაკენ და ასევე რეტიკულური ბირთვის მიმართულებით. რბ-ის გაბაერგული ნეირონები ამაგზნებელ სინაფსებს იღებს ასევე თალამუსის სარელეო უჯრედებიდან. რბ ქმნის შემაკავებელ სინაფსებს თალამუსის სარელეო უჯრედებზე და მამასადამე, იწვევს მათ შეკავებას. უფრო მეტიც, რბ-ის უჯრედები ერთმანეთთან დაკავშირებულია და ქმნის რეციპროკულ ინჰიბიციას.

თალამოკორტიკალური სისტემის ეს სამი მახასიათებელი პასუხისმგებელია სხვადასხვა ტიპის თალამოკორტიკალური ოსცილაციების წარმოქმნაზე.



სურ. 3. თალამოკორტიკალური სისტემის გამარტივებული სქემა. თალამოკორტიკალური სისტემა წარმოდგენილია ურთიერთკავშირებული თალამუსის სარელეო უჯრედებით, რეტკულური ბირთვის ნეირონებითა და ცერებრალური ქერქის უჯრედებით.

თალამოკორტიკალური ნეირონების მუშაობა და ოსცილაციების წარმოქმნა დამოკიდებულია მთელი რიგი ნეიროტრანსმიტერების მოქმედებაზე. ტვინის ღეროდან მომავალი სეროტონინერგული და ქოლინერგული ბოჭკოები იწვევს თვ ნეირონების აქტივაციას, მაშინ, როდესაც მათი გავლენა რეტკულურ ნეირონებზე შემაკავებელია. დოფამინერგული ნეირონები აკავენს თალამოკორტიკალურ ნეირონებს პიდაპირი და არაპირდაპირი გზით - ინტერნეირონების აქტივაციის გაადვილებით. ტუბერომამილარული ბირთვიდან მომავალი ჰისტამინერგული ბოჭკოებით თვ ნეირონები განიცდის დეპოლარიზაციას. დღგბ იღებს აზოტის ოქსიდის (აო) უამრავ წყაროს ტვინის ღეროდან, ჰიპოკამპიდან, ბაზალური წინა ტვინიდან, რაც მიუთითებს არატრადიციული ნეიროტრანსმიტერის მნიშვნელოვან ფუნქციაზე ტვინის ამ უბანში.

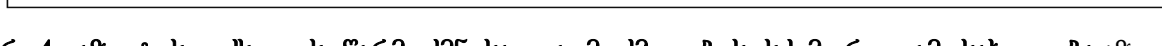
თავი 2. აო/გც/ც-გმფ სასიგნალო გზა

ეუკარიოტულ უჯრედებში აზოტის ოქსიდის სასიგნალო გზის არსებობა უკვე დაახლოებით ოცი წელია ცნობილი. მაგრამ რატომღაც აო-მა, როგორც სასიგნალო მოლეკულამ უფრო დიდი ყურადღება 1998 წლის შემდეგ მიიქცია, როდესაც R.F. Furchgott, L. J. Ignarro და F. Murad-ს მიენიჭათ ნობელის პრემია კარდიოვასკულარულ სისტემაში აო-ის როლის აღმოჩენისათვის.

აო წარმოიქმნება აო-ის სინთეტაზას (აოს) მიერ ამინომჟავა ლ-არგინინიდან. აო-ის სინთეტაზას სამი იზოფორმაა ცნობილი: ნეირონული (ნ-აოს), ენდოთელური (ე-აოს) და ინდუციბელური (ი-აოს). ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში სამივე იზოფორმაა წარმოდგენილი. ნანახი იქნა, რომ ნ-აოს მოთავსებულია სინაფსურ მემბრანაში გლუტამატის იონოტროპულ (NMDA) რეცეპტორებთან ერთად (Burette et al. 2002). NMDA რეცეპტორების აქტივაცია და კალციუმის იონების უჯრედში შესვლა იწვევს ამ ფერმენტის გააქტივებას. ენდოთელური აზოტის ოქსიდის სინთეტაზა გვხვდება სისხლძარღვების ენდოთელიუმში (Dimmeler et al., 1999). ამ იზოფორმის მიერ წარმოქმნილი აზოტის ოქსიდი არეგულირებს ცერებრალურ სისხლის მიმოქცევას (Umans, 1995). ფიზიოლოგიურ პირობებში მხოლოდ ნეირონული და ენდოთელური სინთეტაზა წარმოადგეს აო-ის წყაროს. ანთებითი პროცესები იწვევს ინდუციბელური სინთეტაზას აქტივაციას, რასაც მოჰყვება აო-ის მაღალი კონცენტრაციით წარმოქმნა, რაც შესაძლოა ტოქსიკური აღმოჩნდეს ტვინის უჯრედებისათვის.

აო-ის სასიგნალო გზა პირველად აღწერილ იქნა გულსა და სისხლძარღვებში 1986 წელს. ამ დროისათვის ეს მოლეკულა ცნობილი იყო როგორც endothelium derived factor (ERDF). აღნიშნული ფაქტორი იწვევდა ფერმენტ გუანიდილ ციკლაზას (გც) აქტივაციას (Murad, 1986). 1987 წელს Ignarro-ს ჯგუფმა აღმოაჩინა, რომ ეს ფაქტორი წარმოადგენდა აზოტის ოქსიდს და მისი წარმოქმნა დამოკიდებული იყო კალციუმის იონებზე. აო არაპოლარული მოლეკულაა, ამ მახასიათებლის მეშვეობით წამოქმნისთანავე იგი კვეთს თავისუფლად უჯრედის მემბრანას და უკავშირდება მის რეცეპტორს, რომელსაც ხსნადი გუანიდილ ციკლაზა (გც) წარმოადგენს. ამ რეცეპტორის აქტივაცია იწვევს 5'-გუანოზინ ტრიფოსფატის 3',5'-ც-გმფ-ად

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

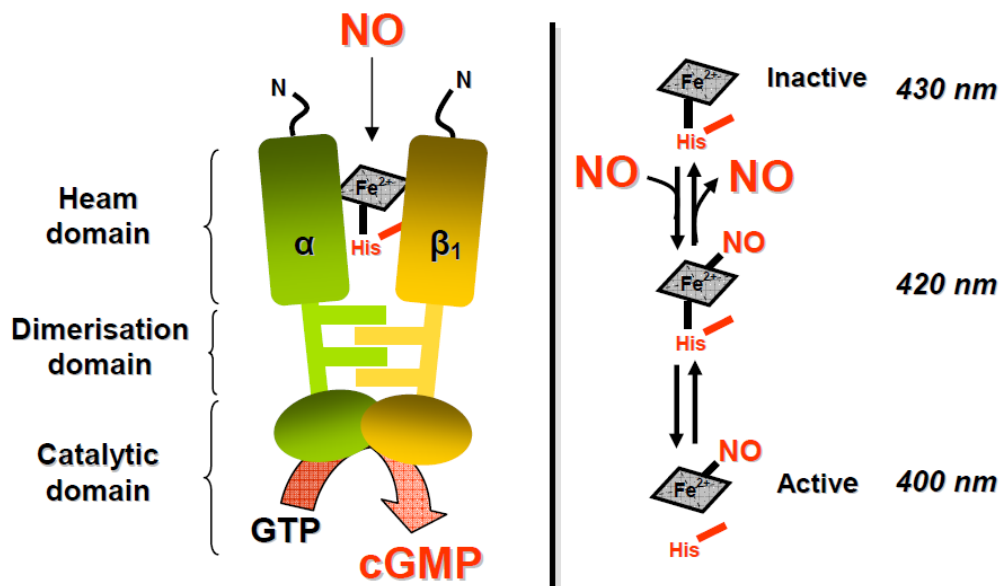


აო/ც-გმფ-ის სასიგნალო გზა მრავალი ფიზიოლოგიური პროცესის განხორციელებას ემსახურება სხეულის ყველა ორგანოში. ეს ფიზიოლოგიური პროცესებია: სისხლძარღვების გაფართოება (Murad, 1986), თრომბოციტების აგრეგაცია. ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში (ცნს) იგი მონაწილეობს სინაფსურ პლასტიკურობაში (Garthwaite & Garthwaite, 2016). ამ ასპექტში აო-ის სინთეზა და რეცეპტორები გადამწყვეტ როლს თამაშობს და ერთი-ერთი მათგანის ფუნქციის დარღვევასაც მოჰყვება სხვადასხვა დაავადებების, როგორცაა კარდიოვასკულარული ან ნეიროდეგენერაციული დარღვევების განვითარება (Hillier et al. 1996; Steinert et al. 2010). ბოლო წლებში ც-გმფ-ის სასიგნალო მექანიზმების დეტალურმა შესწავლამ დასაბამი მისცა ახალი წამლების განვითარებას. ამ წამლების მოქმედება მიმართულია ერექციის დისფუნქციის, ეპილეპტიკური კრუნჩხვებისა და ალცეიმერის დაავადების გაუმჯობესებისაკენ (Feil, Kemp-harper, & Stasch, 2006). მაგრამ რატომღაც აზოტის ოქსიდის რეცეპტორების როლი ტვინის ფიზიოლოგიური ფუნქციების განხორციელებაში ყურადღების მიღმა დარჩა. ამგვარად, ამ ნაშრომის მიზანს წარმოადგენდა ამ სასიგნალო სისტემის უჯრედული და მოლეკულური მექანიზმის შესწავლა და მისი როლის განსაზღვრა ნეირონული აქტივობის განხორციელებაში.

2.1 გუანდილ ციკლაზა და მისი ექსპრესია ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში

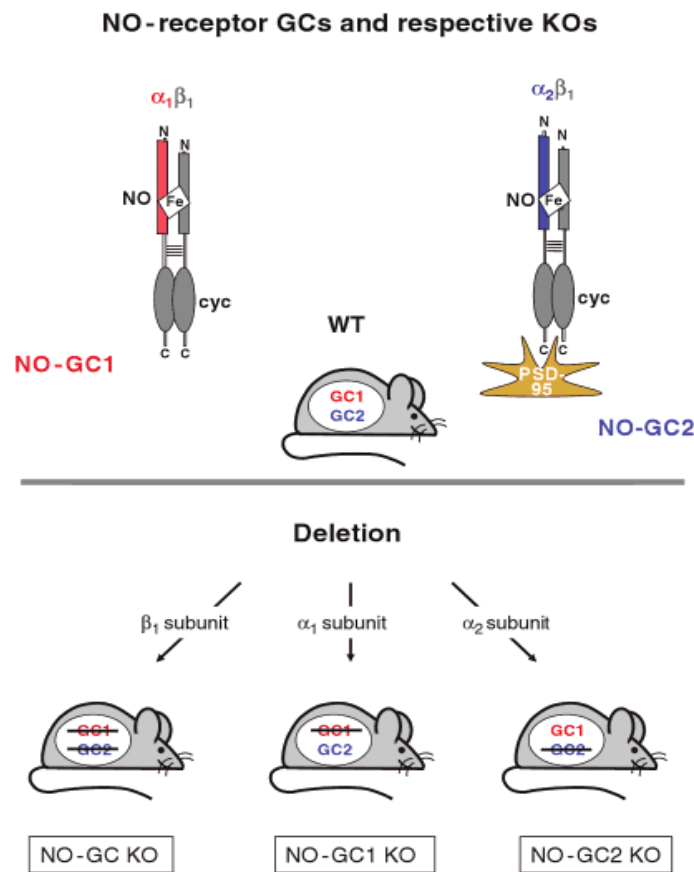
ციკლური ნუკლეოტიდების აღმოჩენის ისტორია იწყება 1950 წლიდან. პირველად აღმოჩენილ იქნა ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატი (ც-ამფ) და შემდომში გუანოზინ მონოფოსფატი (ც-გმფ) ადამიანის სხვადასხვა უჯრედებში. ამ დროისათვის ნანახი იქნა, რომ რომ ც-გმფ წარმოიქმნება უჯრედის მემბრანულ და ციტოზოლურ ფრაქციებში, რაც გც-ს ორი იზოფორმის არსებობაზე მიუთითებს (Chrisman et al., 1975). მაგრამ ამ ორი იზოფორმის იზოლაცია და დახასიათება ვერ მოხერხდა მანამ, სანამ მისი ენდოგენური აქტივატორის - აო-ს პოვნა მოხდებოდა. დღეს ცნობილია რომ გც გვხვდება ორი ფორმით: მემბრანასთან დაკავშირებული და ციტოპლაზმური - ხსნადი ფორმით. აო უკავშირდება მხოლოდ ხსნად ფორმას, რომელიც მოქმედებს როგორც აო-ს რეცეპტორი. ვინაიდან, ამ ნაშრომის მიზანს

ტვინში აო/გც/ც-გმფ სასიგნალო გზის შესწავლა წარმოადგენს, გც-ს ხსნადი ფორმის დეტალური აღწერა უფრო საზრინია. აო-ის რეცეპტორების გამოყოფა პირველად მოხერხდა ვირთაგვებისა და ხარის ფილტვის ქსოვილისგან (Gerzer, Bohme, Hofmann, & Schultz, 1981). გც რეცეპტორი შეიცავს C- კატალიზურ დომენს, დიმერიზაციის დომენს და N-რეგულატორულ დომენს (სურ.5). აზოტის ოქსიდის დაკავშირებას ესაჭიროება N-ნაწილის არსებობა, რადგან სწორედ ეს უბანი განაპირობებს ფერმენტის კატალიზურ თვისებებს. თვითოეული რეცეპტორი შეიცავს ორ განსხვავებულ სუბერთეულს: α და β სუბერთეულებს, რომელთა მოლეკულური წონაც შესაბამისად 73 და 70 კდალტონია. β სუბერთეული შეიცავს რკინის შემცველ N-ტერმინალ დომენს, რომელიც მოქმედებს როგორც აო-ის რეცეპტორი. რადგან გც ჰეტეროდიმერულ ფერმენტს წარმოადგენს, მხოლოდ ორივე სუბერთეულის არსებობა განაპირობებს მის ფერმენტულ ფუნქციას. α სუბერთეული ორი იზოფორმითაა წარმოდგენილი - $\alpha 1$ და $\alpha 2$. პერიფერიულ ნერვულ სისტემაში $\alpha 1$ უფრო დიდი რაოდენობით გვხვდება, მაგრამ ცნს-ში ორივე იზოფორმა თანაბარი რაოდენობითაა განაწილებული.



სურ 5. გუანილ ციკლაზას შემადგენელი სუბერთეულები. გუანილ ციკლაზა წარმოდგენილია ორი სუბერთეულით - α და $\beta 1$ სუბერთეულებით. $\beta 1$ სუბერთეული შეიცავს აზოტის ოქსიდის დამაკავშირებელ რკინის ატომს.

აზოტის ოქსიდის რეცეპტორები შემცველი იზოფორმებიდან გამომდინარე წოდებულია როგორც აო-გც1 და აო-გც2 (Friebe & Koesling, 2009). ორივე იზოფორმა ხასიათდება ერთნაირი კატალიზური მოქმედებით და აო-ს მიმართ მგრძნობელობით. აო-გც1 სრულიად ციტოზოლურია, ხოლო აო-გც2 ცნს-ში დაკავშირებულია პოსტსინაფსური სიმჭიდროვის ცილა 95-თან (PSD-95), რაც მის ნაწილობრივ მემბრანულ მდებარეობას განაპირობებს (Of et al., 2001). ამ იზოფორმების წყალობით შესაძლებელი გახდა ნოკაუტირებული თაგვების ორი ხაზის გამოყვანა.



სურ 6. აო-ს იზოფორმების სქემატური ილუსტრაცია და არსებული ნოკაუტების ხაზები. ციტოპლაზმური გუანიდილ ციკლაზას ორი იზოფორმის არსებობა სამი ნოკაუტირებული თაგვების ხაზის გამოყვანის საშუალებას იძლევა: β_1 სუბერთეულის წაშლა იწვევს გც-ს ორივე იზოფორმის ფერმენტული ფუნქციის დარღვევას. აო-გც1 და აო-გც2 თაგვებს შესაბამისად აკლიათ α_1 და α_2 სუბერთეულები.

ორივე იზოფორმის წაშლის მცდელობას ლეტალური შედეგი მოჰყვა. რადგან გც-ს როლი მხოლოდ ერთი ფიზიოლოგიური პროცესით არ შემოიფარგლება. მაგრამ ერთი იზოფორმით ნოკაუტირებული თაგვები სიცოცხლის ნორმალური წესით ხასიათდებიან. ცენტრალური სისტემის მიღმა იზოფორმები ახდენენ ფუნქციების კომპენსირებას, მაგრამ როგორც ჩანს ცნს-ში თვითოეულ იზოფორმას თავისი ფუნქცია აკისრია. Mergia-ს ჯგუფის მიერ ნანახი იქნა, რომ ჰიპოკამპში აო-გც1 პრესინაფსურ მემბრანაშია მოთავსებული და ჰიპოკამპის პირამიდულ უჯრედებში გლუტამატის გამოყოფაში იღებს მონაწილეობას (Neitz, Mergia, Eysel, Koesling, & Mittmann, 2011). აო-გც2 პოსტინაფსურ მემბრანაში გვხვდება და მისი დეფიციტი ჰიპოკამპის პირამიდულ უჯრედებში ამაგზნებელი პოსტინაფსური დენის ამპლიტუდის შემცირებას განაპირობებს (Neitz et al., 2014).

2.2. ციკლური გუანოზინ მონოფოსფატის ეფექტორი მოლეკულები: ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული იონური არხები

მას შემდეგ, რაც ც-გმფ დამტკიცებული იქნა როგორც უჯრედშიდა მეორადი მესენჯერი, ამან საშუალება მისცა მეცნიერთა მთელ ჯგუფს აეხსნათ სხვადასხვა ფიზიოლოგიური პროცესები. ც-გმფ-ს მრავალი უჯრედშიდა სამიზნე აქვს. მისი საშუალებით ხდება ფოსფოდიესთერაზების (ფდე) (Bender & Beavo 2006), ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული კათიონური არხების (ცნდა), მათ შორის ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი, ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული არხების (ჰცნ) (Biel et al. 2009) და ც-გმფ-დამოკიდებული პროტეინ კინაზების აქტივაცია (პკ) (Hofmann et al. 2006). მოცემულ სადისერტაციო ნაშრომში ჩვენ შევისწავლეთ თვ ნეირონების ჰცნ არხების ელექტროფიზიოლოგიური თვისებები საკონტროლო და გც2 დეფიციტურ საექსპერიმენტო ცხოველებში.

ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი, ციკლური ნუკლეოტიდებით დაჭიმვრული კათიონური არხები (ჰცნ) პირველად აღმოაჩინეს 1970-1980 წლებში sinoatrial node უჯრედებში (Halliwell & Adams 1982). მას შემდეგ ამ არხებმა მიიქცია

სამედიცინო დარგში მომუშავე მკვლევარებისა და ფიზიოლოგების ყურადღება. ჰცნ არხები უნიკალურია თავისი იონური გამტარებლობისა და პოტენციალ-დამოკიდებულების მიხედვით. ვინაიდან, ისინი პოტენციალ-დამოკიდებული არხებია, ჰიპერპოლარიზაცია მათი აქტივაციის აუცილებელი პირობაა. მაგრამ ისევე როგორც სხვა არხების შემთხვევაში, ჰცნ არხების მოდულირება ხდება უჯრედშიდა მოლეკულებით, ამ შემთხვევაში ციკლური ნუკლეოტიდებით (Difrancesco et al. 1994). ჰორმონები და ნეიროტრანსმიტერები, რომლებიც იწვევენ ციკლური ადენოზინ მონოფოსფატის (ც-ამფ) დონის გაზრდას, ააქტიურებენ ჰცნ არხებს ნახევრად აქტივირებადი მრუდის დადებითი პოტენციალისაკენ გადაწევით და მაშასადამე, იწვევენ არხების გაღების კინეტიკის გაზრდას. ციკლური ნუკლეოტიდების მაღალი კონცენტრაციის შემთხვევაში არხების გაღება ხდება უფრო სწრაფად და სრულყოფილად, ვიდრე დაბალი კონცენტრაციის დროს (Difrancesco et al. 1994). ეს უჯრედშიდა მოლეკულები ამყარებენ ქიმიურ კავშირს ჰცნ არხების C-ტერმინალური ნაწილის ციკლური ნუკლეოტიდების დამაკავშირებელ დომენტთან (CNBD). CNBD ჰცნ არხების ავტო-ინჰიბიტორულ დომენს წარმოადგენს და მაშასადამე, ამ შეკავების მოხსნას მოჰყვება არხების გახსნის გაადვილება. უჯრედის ტიპზე დამოკიდებულების მიხედვით აქტივაციის მრუდის გადანაცვლება ც-ამფ-ის ნაჯერი კონცენტრაციის შემთხვევაში 0-20 მკ-ია. რამოდენიმე კვლევის თანახმად, ჰა დენის მოქმედება ასევე რეგულირდება ც-გმფ-ით. მექანიზმი იგივეა, რაც ც-ამფ-ის შემთხვევაში, მაგრამ ჰცნ არხების მგრძნობელობა ც-ამფ-ის მიმართ 10-100-ჯერ უფრო მაღალია.

ჰცნ არხები შერეულ კათიონურ არხებს წარმოადგენს და ნორმალურ ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში ატარებს როგორც ნატრიუმის, ასევე კალიუმის იონებს. ჰიპერპოლარიზაცია იწვევს არხების გახსნას და უჯრედის შიგნით მიმართული ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი (ჰა) დენის აღმოცენებას. ყოველივე ამას მოჰყვება Na^+ და K^+ იონების უჯრედში შესვლა და მემბრანის დეპოლარიზაცია მოქმედების პოტენციალის წარმოქმნის ზღურბლამდე. ჰცნ არხები თითქმის არ ატარებს Li^+ -ის იონებს და ბლოკირდება Cs^+ -ის იონებით (Ludwig et al. 1998). დენის ამპლიტუდა და გასატარებელი იონების თანაფარდობა დამოკიდებულია უჯრედგარე K^+ -ის კონცენტრაციაზე. უჯრედგარე K^+ -ის

კონცენტრაციის მომატება იწვევს დენის ამპლიტუდის მნიშვნელოვან გაზრდას. მიუხედავად იმისა, რომ ჰცნ არხები არ ატარებს ანიონებს, იგი მგრძნობიარეა უჯრედგარე Cl^- იონების მიმართ. დიდი ხნის განმავლობაში ფიქრობდნენ, რომ ჰცნ არხები ატარებდა მხოლოდ მონოვალენტურ კათიონებს, მაგრამ ზოგიერთი კვლევის თანახმად, ამ არხების მეშვეობით ხდება მცირე რაოდენობით კალციუმის იონების გატარებაც (Yu et al. 2003).

სხვა პოტენციალ-დამოკიდებული დენებისაგან განსხვავებით ჰა დენი არ ხასიათდება ინაქტივაციით. ორი კინეტიკურად განსხვავებული კომპონენტი განირჩევა ამ დენის აქტიურობის დროს: მცირე ზომის მყისიერი დენი, რომელიც მთლიანად აქტიურდება რამოდენიმე მილიწამის განმავლობაში და ნელა განვითარებადი კომპონენტი, რომელიც აღწევს სტაბილურ მდგომარეობას ათეული მილიწამიდან რამოდენიმე წამის განმავლობაში. მაგრამ ჰა დენის გაზომვის დროს მყისიერი დენი ან ძალიან მცირეა, ან საერთოდ არ აღინიშნება. მაშინ, როდესაც არანაირი ექვი არ არის, რომ ნელი დენი კათიონების გატარებით აღიძვრება, მყისიერი დენის ბუნება გაურკვეველია. შესაძლოა ის წარმოადგენდეს გაჟონვად დენს, ან ჩანაწერის არტეფაქტს, რომელიც გამოწვეული უნდა იყოს ამავე არხში არსებული მეორე ფორის არსებობით ან ჰცნ არხთან დაკავშირებული სხვა არხების პოპულაციით (Proenza, 2001). ჰა დენის კინეტიკა განსხვავებულია. როგორც წესი იგი აქტიურდება საკმაოდ ნელა, დროის კონსტანტა მერყეობს რამოდენიმე ასეული მილიწამიდან წუთამდე. უჯრედის ტიპზე დამოკიდებულების მიხედვით აქტივაციის პოტენციალი მერყეობს -70 - 100 მვ-ის ფარგლებში.

ჰცნ არხები აღმოჩენილია ხერხემლიანებსა და ზოგიერთ უხერხემლოებში, მაგრამ მას არ შეიცავს სოკოები და პროკარიოტები. როგორც ფორის შემცველი სხვა არხები, ჰცნ არხებიც კომპლექსურია და ოთხი სუბერთეულით არის წარმოდგენილი, რომლებიც ფორის გარშემოა არანაირებული. თითოეული სუბერთეული შეიცავს ტრანსმემბრანულ, ციტოპლაზმურ N- და C-ტერმინალურ დომენს. ტრანსმემბრანული დომენი შედგება ექვსი α -helix სეგმენტისაგან (S1-S6) და ფორა წარმოიქმნება მეხუთე და მეექვსე სეგმენტებს შორის. ციტოპლაზმური C - ტერმინალი შეიცავს ციკლური ნუკლეოტიდის დამაკავშირებელ დომენს (CNBD) (Craven & Zagotta 2006)(სურ.7).

სხვა წევრებისაგან განსხვავებით ამ იზოფორმის აქტივაციის გაადვილება არ ხდება ციკლური ნუკლეოტიდებით, უფრო მეტიც, ზოგიერთი მკვლევარის მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ ეს მოლეკულები იწვევს არხის ინჰიბიციას (Mader et al. 2005).

2.2.1 არხების ექსპრესია ქსოვილებში

ჰცნ არხები ნაპოვნია მთელს ცნს-სა და გულის ქსოვილში. იზოფორმების ექსპრესია დამოკიდებულია ტვინის უბანზე და ასევე ცხოველის სახეობაზე. ჰცნ 1 ექსპრესირებულია ახალ ქერქში, ჰიპოკამპში, ცერებრალურ ქერქსა და ტვინის ღეროში. გარდა ამისა, იგი ზურგის ტვინშიც იქნა აღმოჩენილი (Milligan et al. 2006). ჰცნ 2 თავის ტვინის თითქმის ყველა რეგიონშია ნანახი, მაღალი ექსპრესიით გამოირჩევა თალამუსი და ტვინის ღერო (Notomi & Shigemoto 2004). ჰცნ 3 ცენტრალური ნერვული სისტემაში დაბალი დონითაა წარმოდგენილი. ყველაზე დიდი რაოდენობით გვხვდება ყნოსვის ბორცვებსა და ჰიპოთალამუსის ზოგიერთ ბირთვში (Moosmang et al. 1999). ჰცნ 4 მაღალი რაოდენობითაა ექსპრესირებული თავის ტვინის ზოგიერთ უბანში, მაგ: თალამუსის სხვადასხვა ბირთვებში და ყნოსვის ბორცვებში (Notomi & Shigemoto 2004).

2.2.2 ჰცნ არხების ფიზიოლოგიური როლი ნეირონებში

ჰცნ არხები ხასიათდება მთელი რიგი უნიკალური ბიოფიზიკური თვისებებით, რომელიც უმნიშვნელოვანესია უჯრედების ელექტრული პასუხებისა და აღგზნებადობის კონტროლისათვის. ეს არხები ნაწილობრივ გახსნილია მოსვენების მემბრანულ პოტენციალზე და მონაწილეობს მოსვენების პოტენციალის რეგულაციაში. არხი ფლობს ორ გადამწყვეტ თვისებას, მას შესწევს უნარი წინააღმდეგობა გაუწიოს როგორც დეპოლარიზაციას, ასევე ჰიპერპოლარიზაციას. ამგვარად, ამ დენს შეუძლია უჯრედში შემავალი როგორც შემაკავებელი, ასევე ამაღზნებელი სტიმულის შესუსტება და საბოლოოდ უჯრედის მემბრანული პოტენციალის სტაბილიზაცია (Bayliss et al. 1994; Mayer & Westbrook 1983). აქედან გამომდინარე, ჰა დენის არსებობის შემთხვევაში უჯრედში შემავალი ამაღზნებელი

თუ შემაკავებელი იმპულსი იწვევს მემბრანული პოტენციალის მცირე ცვლილებას, ვიდრე დენის არ არსებობის შემთხვევაში. მაშასადამე, ეს დენი იქცევა როგორც პოტენციალის მაფიქსირებელი, მადეპოლარიზებელი თუ მაჰიპერპოლარიზებელი სიგნალების საწინააღმდეგო მიმართულებით შებრუნებით.

ჰა დენის დახმარებით რეგულირდება მრავალი ფიზიოლოგიური პროცესი. იგი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს გულის ცემის გამოწვევასა და რეგულაციაში. გარდა ამისა, ჰა დენი მონაწილეობს ნეირონულ წრეებში რიტმული აქტივობების წარმოქმნაში (Dossi et al. 1992) და ისეთ ბაზისურ ნეირონულ პროცესებში, როგორიცაა: მემბრანული პოტენციალის განსაზღვრა (Day et al. 2005), დენდრიტული ინტეგრაცია (Magee & Cook 2000), სინაფსური გადაცემა (Beaumont & Zucker 2000) და რეტინადან წამოსული მხედველობითი ინფორმაციის რეგულირება (Demontis et al. 1999). ამ არხების ფუნქციის დარღვევას მოჰყვება სხვადასხვა დაავადებების განვითარება, როგორიცაა მუშა მეხსიერებისა და მოტორული დასწავლის გაუარესება, ეპილეფსიის ჩამოყალიბება, პერიფერიული ნეიროპათიკური ტკივილისა და ცენტრალური ნერვული სისტემის გარეთ კარდიოვასკულარული დაავადებების განვითარება. ჰცნ არხები ასევე არეგულირებენ სხვადასხვა ნელი ოსცილაციების, როგორიცაა დელტა, თეტა და თითისტარა ოსცილაციების მოქმედებას.

თავი 3. ოსცილაციები

ტვინის სხადასხვა უბანში რიტმული ოსცილაციები ნეირონული კავშირების ერთ-ერთ მახასიათებელს წარმოადგენს. ამ რიტმების წარმოქმნა დაკავშირებულია ნეირონების სინქრონულ აქტივაციასთან. სიხშირის მიხედვით განარჩევენ ოსცილაციების რამოდენიმე ტიპს: დელტა, თეტა, ალფა, ბეტა, გამა და სწრაფი რიფლ ოსცილაციები (Buzsaki, 2004). ტვინის რიტმების წარმოქმნაში, სინქრონიზაციასა თუ დესინქრონიზაციაში მონაწილე ნეირონები ძირითადად თავმოყრილია ცერებრალურ ქერქში, თალამუსსა და ტვინის ღეროს, უკანა ჰიპოთალამუსისა და ბაზალური წინა

ტვინის მოდულატორულ სისტემებში. ახალი ქერქისა და თალამუსის ნეირონების დიდი ნაწილი, რომელიც ჩართულია ტვინის რიტმების წარმოქმნაში, ურთიერთდაკავშირებულია. როგორც უკვე აღინიშნა, თალამოკორტიკალური სისტემის მნიშვნელოვან კომპონენტს თვ ნეირონები წარმოადგენს. თვ უჯრედების ელექტროფიზიოლოგიური თვისებები განპირობებულია მთელი რიგი დენების: დროებითი კალციუმის დენების (transient I_T), მაღალზღურბლოვანი კალციუმის დენების, ნატრიუმის მუდმივი დენებისა და კალიუმის სხვადასხვა დენების არსებობით. სწორედ ეს მახასიათებლები განაპირობებენ თალამური ოსცილაციების წარმოქმნასა და სინქრონიზაციას (Steriade & Mulle, 1985). ამაგზნებელი იმპულსის საპასუხოდ თალამუსის სარელეო უჯრედების ნეირონები ორი ტიპის განმუხტვის პატერნს აჩვენებს: ტონური და აფეთქებები (სურ. 8). ღვიძილისა და პარადოქსული ძილის დროს სარელეო უჯრედები დეპოლარიზებულია და შემომავალ სიგნალს ცალკეული ამაგზნებელი მოქმედების პოტენციალის წარმოქმნით პასუხობენ. მაშინ, როდესაც ძილის დროს ჰიპერპოლარიზებული სარელეო ნეირონები აფეთქებით განმუხტვას განიცდიან. განმუხტვის ეს ორი ფორმა მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენს ქერქისაკენ მიმავალ ონფორმაციაზე. ღვიძილის დროს სარელეო უჯრედების გარკვეული ნეირონები ასევე განიმუხტებიან აფეთქებებით, მაგრამ ამ ნეირონების რაოდენობა 1%-ზე ნაკლებია.

3.1 თითისტარები

თითისტარების წარმოქმნა ხდება ძილის ადრეულ სტადიაზე, როდესაც ელექტროენცეფალოგრამა მიისწრაფის სინქრონიზაციისაკენ. ეს ოსცილაციები 8-12 ჰც-ის ფარგლებში განიმუხტება და ხანგრძლივობა 1-2 წამს შეადგენს. თითისტარების წარმოქმნა ხდება თალამუსში, მაგრამ საბოლოო ფორმირება და სინქრონიზაცია ქერქის გავლენაზეა დამოკიდებული. თითისტარების თალამური წარმოშობის აღმოჩენა დაკავშირებულია მორისონისა და ბასეტის სახელთან (1945). მათ აჩვენეს, რომ დეკორტიკაციისა და ტვინის ღეროს ტრანსექციის შემდეგაც ხდებოდა ამ რიტმების გადარჩენა. სამაგიეროდ, რეტიკულური ბირთვის განცალკევება იწვევდა

დორსალურ თალამუსში თითისტარული აქტივობის გაუჩინარებას, რაც მიუთითებდა მის რეტიკულურ წარმოშობაზე (Steriade & Mulle 1985). რბ გაბაერგული ნეირონების თხელ ფირფიტას წარმოადგენს, რომელიც შემოსაზღვრავს როსტრალურ, ლატერალურ და ვენტრალურ თალამუსს (Jones 1998). ეს ბირთვი იღებს ნეირონულ კავშირებს თალამუსიდან, ტვინის ღეროს როსტრალური ნაწილიდან, ქერქიდან და ბაზალური წინა ტვინიდან. დორსალური თალამუსი, რომლის ნეირონებიც პროეცირდება ცერებრალურ ქერქში და თვითონ ქერქი, აძლიერებენ თითისტარულ ოსცილაციებს, მაშინ როდესაც, ტვინის ღეროსა და ბაზალური წინა ტვინის მოდულატორული სისტემების აქტივაციას მოჰყვება თითისტარების შეჩერება და ევგ აქტივაცია. რეტიკულური ბირთვიდან გამომავალი იმპულსები ვრცელდება დორსალურ თალამუსსა და როსტრალურ ტვინის ღეროში. მისი გავლენა ქერქზე არაპირდაპირი გზით, თვ ნეირონებზე გავლენით ხდება. რეტიკულური ბირთვის უჯრედები ერთმანეთთან დაკავშირებულია როგორც უჯრედის სხეულებით, ასევე დენდრიტებით, რომელთა ვეზიკულებიც გაბაერგულია (Williamson et al. 1994; Yen & Hendry 1985). დენდროდენდრიტული კავშირის დანიშნულება თითისტარული ოსცილაციების სინქრონიზაციას უნდა ემსახურებოდეს. იმუნოჰისტოქიმიური მონაცემების თანახმად, რეტიკულურ ბირთვში გვხვდება ასევე gap junctions, რომლის დანიშნულებაც ასევე ოსცილაციების გაძლიერება უნდა იყოს.

ისვე როგორც თვ ნეირონები, რბ-ის ნეირონებიც ქცევითი მდგომარეობის შესაბამისად შეიძლება განიმუხტოს ცალკეული სპაიკებითა და აფეთქებებით. რბ-ს ნეირონების როგორც სხეულები, ასევე დენდრიტები მდიდარია დაბალზღურბლოვანი კალციუმის არხებით, რაც აფეთქებითი განმუხტვების წარმოქმნის საფუძველს ქმნის. ძილის ადრეულ სტადიაზე რეტიკულური ბირთვი იწვევს რა 8-12ჰც სიხშირის აფეთქებებით განმუხტვას, იწვევს თვ ნეირონებზე 8-12 ჰც სიხშირის შემაკავებელი პოსტსინაფსური პოტენციალის წარმოქმნას. ამის საპასუხოდ თვ უჯრედები განიმუხტება 200-400 ჰც სიხშირის რებაუნდ აფეთქებებით და მოცემული გაძლიერებული ამაღზნებელ იმპულსები იწვევს რბ-ში თითისტარული ოსცილაციების გაძლიერებას. ამ აქტივობის წარმოქმნა თვ ნეირონებში მაშინ ხდება, როდესაც მემბრანული პოტენციალი ჰიპერპოლარიზებულია -60 -65 მვ-ის ფარგლებში, რაც დამახასიათებელია ძილის დროს ევგ სინქრონიზაციისათვის.

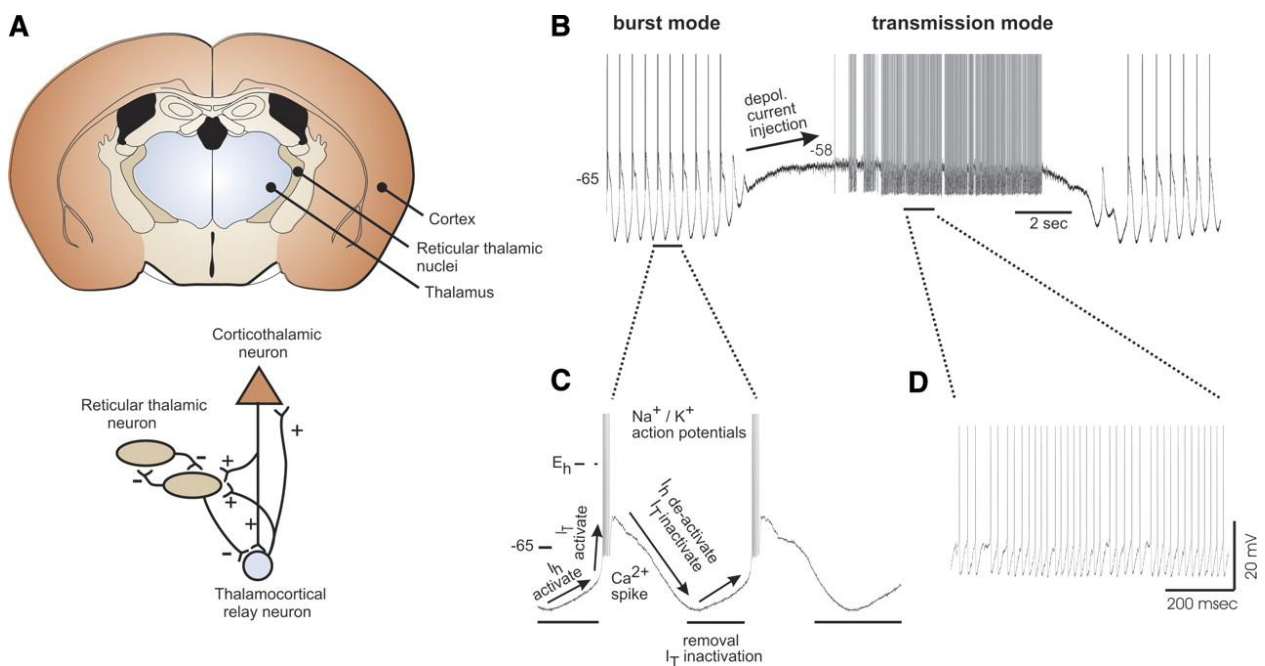
სიხშირის მიხედვით განარჩევენ თითისტარების ორ ტიპს. ეს დამოკიდებულია თვ ნეირონების ჰიპერპოლარიზაციის ხანგრძლივობაზე. ხანგრძლივი (150-200 მწ) ჰიპერპოლარიზაცია, რასაც ადგილი აქვს ბარბიტურატებით ანესთეზიის დროს და ასევე ღრმა ეგ სინქრონიზებული მდგომარეობის დროს, იწვევს 8 ჰც და უფრო ნაკლები სიხშირის თითისტარების წარმოქმნას. მაშინ როდესაც შედარებით ხანმოკლე ჰიპერპოლარიზაცია (70-100 მწ) დასაბამს აძლევს მაღალი სიხშირის (10-14 ჰც) თითისტარების წარმოქმნას. თალამუსის უჯრედების პოსტსინაფსური რეზონანსი აფეთქებები გადაეცემა ქერქს. მის გარეშე თალამური თითისტარები არ აისახებოდა ქერქის ეგ-ზე.

მაშინ როდესაც, თითისტარების დაწყებაში მონაწილეობს დაბალზღვრბლოვანი კალციუმისა და პოტენციალ-დამოკიდებული ნატრიუმის დენები, ერთ-ერთი ჰიპოთეზის თანახმად, ამ რიტმების დამთავრებაში გადამწყვეტი მნიშვნელობა ჰა დენს უნდა ჰქონდეს (Bal & McCormick 1996). ჰა დენის მუდმივ აქტივაციას მოჰყვება რეზონანსი კალციუმის აფეთქებით გამოწვეული უჯრედშიდა კალციუმის იონების დონის გაზრდა, რაც თავის მხრივ იწვევს კალციუმ დამოკიდებული ადენილილ ციკლაზას იზოფორმის აქტივაციას და ც-ამფ-ის მომატებას. ყოველივე ამას მოჰყვება ჰა დენის აქტივაცია და მისი მეშვეობით ნატრიუმის იონების უჯრედში შესვლის გაადვილება, ნეირონების დეპოლარიზაცია და თითისტარა ტალღების შეჩერება (Lüthi & McCormick 1999).

3.2 დელტა ტალღები.

ძილის გაღრმავებასთან ერთად ხდება თითისტარული აქტივობების გაუჩინარება და ეგ-ზე ჩნდება მაღალამპლიტუდიანი, ნელი სიხშირის დელტა (δ) ტალღები. ნელტალღოვანი ძილის დროს, როდესაც ქერქული აქტივობა სინქრონიზებულია (Steriade & Mulle 1985) და თვ ნეირონები ჰიპერპოლარიზებულ მდგომარეობაში, ქერქის გავლენა თვ და რბ-ის ნეირონებზე განხვავებულია. ქერქის ასეთი სინქრონიზაცია ან ელექტრონული სტიმული იწვევს რეტკულური ნეირონების აგზნებას და რიტმული აფეთქებების წარმოქმნას. ეს კი თავის მხრივ განაპირობებს თვ ნეირონებზე ხანგრძლივი ინჰიბიტორული პოსტსინაფსური

პოტენციალის აღმოცენებას. ნელტალღოვანი ძილის დროს რეტიკულური ნეირონები წარმოქმნიან ხანგრძლივ და მაღალსიხშიროვან აფეთქებებს, მაშინ როდესაც იგივე ნეირონები ღვიძილისა და პარადოქსული ძილის დროს განიმხტებიან ტონურად. ყოველივე ამას მოჰყვება ნელი ძილის დროს თვ ნეირონებზე ძლიერი ინჰიბიტორული პოსტსინაფსური პოტენციალის წარმოქმნა და δ გამოჩენა. δ ტალღების სიხშირე მერყეობს 1-4 ჰც-ის ფარგლებში. განარჩევენ ორი ტიპის δ აქტივობას: ერთი კატეგორია (<1 ჰც) წამოიქმნება ქერქში და ხელუხლებელი რჩება თალამექტომის დროს. მეორე ტიპის δ ჩნდება თალამუსში და დეკორტიკაციის შემდეგაც თალამუსის რეტიკულურ ბირთვში წარმოიქმნება და შუა ტვინის რეტიკულური ფორმაციის სტიმულაციით გამოწვეული ეგ აქტივობა იწვევს ამ ტალღების გაქრობას. ამ ტიპის δ ტალღის უჯრედული მექანიზმები საკმაოდ ღრმადაა შესწავლილი. მაშინ როდესაც თითისტარული ოსცილაციები უფრო სინაფსურ ხასიათს ატარებს, *in vitro* შრომების თანახმად (McCormick & Papet 1990), თვ ნეირონებში დელტა ოსცილაციების წარმოქმნა დაკავშირებულია ორი დენის - დროებითი კალციუმის და δ დენის ურთიერთთანამშრომლობასთან.



სურ 8. δ დენის როლი თალამური ოსცილაციების წარმოქმნაში. თვ ნეირონებში დელტა ტალღების წარმოქმნა დაკავშირებულია დაბალხერხლოვანი კალციუმის დენისა და δ

დენის ურთიერთკავშირთან. ჰიპერპოლარიზაცია განაპირობებს ჰა დენის აღმოცენებას, რასაც მოჰყვება ნეირონების დეპოლარიზაცია დაბალზღურბლოვანი კალციუმის დენების აქტივაციის ზღურბლამდე. კალციუმის დენი თავის მხრივ იწვევს მემბრანის შემდგომ დეპოლარიზაციას და მაღალსიხშიროვანი მოქმედების პოტენციალების წარმოქმნას. ამას მოჰყვება მემბრანის რეპოლარიზაცია, კალციუმის დენების ინაქტივაცია და ჰა დენის შემდგომი დეაქტივაცია.

8 ტალღების წარმოსაქმნელად მემბრანული პოტენციალი -65-70 მვ-ზე მეტად უნდა იყოს ჰიპერპოლარიზებული. მემბრანის ჰიპერპოლარიზაცია იწვევს ჰა დენის აღმოცენებას, რასაც თავის მხრივ მოჰყვება ნატრიუმის იონების უჯრედში შესვლა და მემბრანის დეპოლარიზაცია დაბალზღურბლოვანი კალციუმის არხების აქტივაციის ზღურბლამდე და მაღალსიხშიროვანი მოქმედების პოტენციალის შემცველი აფეთქებითი განმუხტვების წარმოქმნა (სურ. 8). ეს შემდგომი დეპოლარიზაცია განაპირობებს ჰა დენის დეაქტივაციას. რეპოლარიზაცია იწვევს მემბრანის ჰიპერპოლარიზაციას, ჰა დენის თავიდან აქტივაციას და ციკლის გამეორებას. თუ ნეირონების მაღალსიხშიროვანი სპაიკების შემცველი აფეთქებები იწვევენ ქერქის პირამიდული უჯრედების აღზნებას, რომელიც თავის მხრივ გზავნის გლუტამატერგულ იმპულსებს რბ-ის მიმართულებით და იწვევს რიტმული აფეთქებითი განმუხტვების გაძლიერებას და საბოლოოდ ევგ დელტა ტალღების ჩამოყალიბებას.

თავი 4. აზოტის მონაწილეობა ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში

აო-ის როლი სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ თუ პათოფიზიოლოგიურ პროცესებში კარგად არის შესწავლილი, მაგრამ მის მონაწილეობაზე ძილ-ღვიძილის ციკლის რეგულაციაში კონფლიქტური შედეგები არსებობს. თავისუფლად მოძრავ ვირთაგვებში ვოლტამეტრული მეთოდით აო-ის რაოდენობის განსაზღვრამ აჩვენა, რომ მისი დონე ქერქის ფრონტალურ ნაწილში ყველაზე მაღალია ღვიძილის დროს და მცირდება ნელი ძილისა (-6%) და პარადოქსული ძილის (-9%) დროს (Burette et al.

2002). იგივე შედეგები იქნა ნანახი ტვინის სხვა რეგიონებშიც: ნათხეშში, ტვინის ღეროში, ჰიპოთალამუსში, ჰიპოკამპსა და ვირთაგვის ტვინის ხვა უბნებში. თალამუსში აო-ს უჯრედგარე კონცენტრაცია მაღალია ღვიძლისა და პარადოქსული ძილის დროს და მნიშვნელოვნად მცირდება ნელი ძილის განმავლობაში. თალამური აო-ს დონის გაზრდა ხდება ლატეროდორსალური ტეგმენტუმის სტიმულაციით (Williams et al. 1997). საპირისპირო სურათი იქნა ნაჩვენები დორსალურ რაფეს ბირთვთან დაკავშირებით. ტვინის ამ ნაწილში აო-ს რაოდენობა იზრდება ნელი ძილის განმავლობაში, მისი დონის აწევა გრძელდება პარადოქსული ძილის დროს და დაბალია ღვიძლის განმავლობაში (Cle et al. 2004).

მონაცემების უმეტესობა მიუთითებს აო-ს დადებით როლზე ნელი ძილისა და პარადოქსული ძილის რეგულაციაში. აო-ს დონორების 3-morpholinopsydnonimine (SIN-1) და S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) ინტრაპერიტონეალური შეყვანა ვირთაგვებსა და კატებში ზრდის ნელ ძილსა და პარადოქსულ ძილში გატარებულ დროს (Ayers, 1996). სხვა მონაცემების თანახმად, პარადოქსული ძილის გახანგრძლივება ხორციელდება ნელი ძილის შემცირების პარალელურად (Burlet et al. 1999). ამავე დროს, აო-ის სინთეტაზას ინჰიბიტორების სისტემური (Dzolic et al. 1996), ინტრაცერებროვენტრიკულური (Ribeiro et al. 2000; Hars 1999) ინექცია ვირთაგვებში ამცირებს ძილს. აო-ის ლოკალური ინექცია დორსალურ რაფეს ბირთვში (Williamson et al. 1994; Monti & Monti 2001) და ბაზალურ წინა ტვინში (Monti 2004) ასევე იწვევს ძილის ხანგრძლივობის შემცირებას.

სხვა კვლევების თანახმად აო უნდა მონაწილეობდეს ღვიძლის გამოწვევაში. აო-ს დონორის ადმინისტრაცია იწვევს ქერქსა და თალამუსში ნეირონული აქტივობის გაზრდას (Cudeiro et al. (2000). ქერქში აო-ს უნარი აქვს ჩაახშოს ოსცილატორული განმუხტვა, მაშინ როდესაც, აოს-ს ანტაგონისტი პირიქით ამცირებს უჯრედების აგზნებადობას. ეს ურთიერთგამომრიცხავი შედეგები შეიძლება აიხსნას იმით, რომ აო ხასიათდება მოქმედების დიდი სპექტრით და უნარი აქვს ზეგავლენა მოახდინოს მრავალ ცილაზე. მეთოდოლოგიური განსხვავებები ყოველთვის გასათვალისწინებელია. როგორცაა მაგალითად, განსხვავებული წამლების გამოყენება, ინექციის განსხვავებული დრო (ნათელი და ბნელი პერიოდები). უმეტეს შრომებში გამოყენებულია არასელექტიური აოს

ინჰიბიტორული ინექციები, რომელიც გავლენას ახდენს როგორც ენდოთელური, ასევე ნეირონული აოს-ზე. ე-აოს სინთეტაზას ინჰიბირებამ შეიძლება იმოქმედოს ძილზე არაპირდაპირი გზით, სისხლის წნევის გაზრდით და შესაბამისად ცერებრალურ სისხლის მიმოქცევის მოდიფიცირებით. აოს სხვადასხვა იზოფორმები განსხვავებულ როლს თამაშობენ ძილის რეგულაციაში. მონაცემების თანახმად, ძილ-ღვიძილის სპონტანურ რეგულაციაში მონაწილეობს ნ-აოს, მაშინ, როდესაც, ძილის დეპრივაცია იწვევს ი-აოს აქტივაციას. საინტერესოა, რომ ძილის დეპრივაციით გამოწვეული გამოწვევადი აოს ექსპრესია რეგულირდება ტრანსკრიფციულ დონეზე და დაკავშირებულია ი-აოს როგორც მესენჯერული რნმ-ის, ასევე პროტეინული დონის გაზრდასთან. ი-აოს აქტივობა ხდება ძალიან სწრაფად, ძილის პირველივე საათის დეპრივაციის დროს, რასაც უნდა ჰქონდეს ნეიროდამცველობითი ფუნქცია. ნ-აოს ნოკაუტირებულ თაგვებს კონტროლთან შედარებით აღენიშნებათ ნაკლები პარადოქსული ძილი, მაშინ როდესაც, ი-აოს ნოკაუტ თაგვები ატარებენ მნიშვნელოვნად დიდ დროს პარადოქსულ ძილში კონტროლთან შედარებით (Chen et al. 2003). მაშასადამე, აოს-ს განსხვავებული იზოფორმების მეშვეობით წარმოქმნილი აო შესაძლოა მოქმედებდეს განსხვავებულად. შესაბამისად, აოს-ს ინჰიბიტორების გამოყენებას, იმისდა მიხედვით სელექტიურია თუ არასელექტიური შესაძლოა განსხვავებული შედეგი ჰქონდეს.

აო მონაწილეობს ძილის ჰომეოსტაზის რეგულაციაში. როგორც ცნობილია ადენოზინი წარმოადგენს ძილის ფაქტორს. მისი უჯრედგარე დონე იზრდება სპონტანური და იძულებითი ღვიძილის დროს. მონაცემების თანახმად, ადენოზინი მოქმედებს ა1 რეცეპტორზე, აკავებს ბაზალური წინა ტვინის ღვიძილის ხელშემწყობ ნეირონებს და აადვილებს ძილის დადგომას (Thakkar et al. 2003; Arrigoni et al. 2006). 12 საათზე ხანგრძლივი ძილის დეპრივაცია იწვევს აქტიური ა1 რეცეპტორების რაოდენობის გაზრდას ბაზალურ წინა ტვინსა და ქერქში. მრავალი მონაცემის თანახმად, ბაზალური წინა ტვინის ადენოზინის მოქმედება ა1 რეცეპტორებზე აადვილებს დელტა აქტივობას. ადენოზინი პოსტსინაფსური გზით აკავებს ქოლინერგულ ნეირონებს I_{Kir} დენის აქტივირების გზით და არაქოლინერგულ ნეირონებს I_{Ca} დენის შემცირებით (Arrigoni et al. 2006). სავარაუდოთ, ძილის

აღდგენითი პერიოდის დროს ადენოზინი ხელს უწყობს დელტა აქტივობას ქოლინერგული ტონის ინჰიბირების გზით და ამცირებს ქოლინერგულ შესავლებს ქერქსა და თალამუსში. თანამედროვე მონაცემების თანახმად, აო წარმოადგენს ჰომეოსტაზური კასკადის შემადგენელ ნაწილს (Kalinchuk et al. 2006). ძილის დეპრივაციისას ორმაგდება აო მეტაბოლიტების დონე ბაზალურ წინა ტვინში. ფარმაკოლოგიური შესწავლების თანახმად, აო მეტაბოლიტების დონის გაზრდაზე პასუხისმგებელია ი-აოს. მისი აქტივობა წინ უძღვის ადენოზინის დონის ზრდას და ი-აოს ინჰიბირება აფერხებს ძილის დეპრივაციით გამოწვეულ ადენოზინის დონის გაზრდას (Kalinchuk et al. 2006). ამ მონაცემების თანახმად, აზოტის ოქსიდის მეტაბოლიტების დონის გაზრდა თავდაპირველად ხდება ბაზალურ წინა ტვინში და შემდეგ ფრონტალურ ქერქში, რასაც თავის მხრივ მოჰყვება ადენოზინის უჯრედგარე დონის გაზრდა. ჯერ კიდევ გამოცანად რჩება თუ როგორ იწვევს აო ადენოზინის გამოყოფას. ერთი-ერთი შესაძლო მექანიზმი შეიძლება იყოს ადენოზინ კინაზას ინჰიბირება ან ატფ-ის ჰიდროლიზის გაზრდა. კვლევების თანახმად, ბაზალური წინა ტვინის ქოლინერგული ნეირონები განსაკუთრებით მგრძნობიარეა ნ-აოს-ს მიმართ და ისინი უნდა წარმოადგენდეს პირველ სამიზნეს ძილის დეპრივაციით გამოწვეულ ნ-აოს აქტივაციაზე და პასუხისმგებელნი უნდა იყვნენ ადენოზინის გამოყოფაზე.

მეთოდოლოგია

თავი 1. გამოყენებული მასალა

1.1 საექსპერიმენტო ცხოველები

ნაშრომში გამოყენებულია გუანილილ ციკლაზა2 (α -GC2^{-/-}) ნოკაუტირებული თაგვები (Ruhr-Universität Bochum, Germany ; Mergia et al., 2006). C57BL/6J თაგვების deleter EIIa-Cre თაგვებზე შეჯვარების შედეგად ალფა2 სუბერთეულის ეგზონი 4 ამოღებული იქნა (α 2+ / flox). იმისათვის, რომ წაეშალათ Cre recombinase გენი, ჰეტეროზიგოტი α -GC2^{-/-} ცხოველს კვლავ აჯვარებდნენ საკონტროლო ცხოველთან და საბოლოოდ ჰომოზიგოტ ნოკაუტთან. რადგან გუანილილ ციკლაზა მონაწილეობას იღებს მრავალ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურ პროცესში, ორივე იზოფორმით ნოკაუტირებული თაგვები ილუპებოდნენ დაბადებოდან 20 დღემდე, მაგრამ ერთი იზოფორმით ნოკაუტირებული თაგვები არ განსხვავდებიან საკონტროლო ცხოველებისგან.

1.2 ექსპერიმენტში გამოყენებული ქიმიური ნივთიერებები

წამალი	კონცენტრაცია	გამოყენება	საინკუბაციო დრო
8-bromo - cAMP (Sigma,Taufkirchen, Germany)	1, 10 და 100 მიკ/მოლური	უჯრედშიდა	> 10 წუთი
8-Bromo - cGMP (Sigma,Taufkirchen, Germany)	1, 10 და 100 მიკ/მოლური	უჯრედშიდა	> 10 წუთი
ODQ	10 მიკ/მოლური	უჯრედგარე	> 10 წუთი
SQ 22,536 (Sigma,Taufkirchen,G ermany)	200 მიკ/მოლური	უჯრედგარე	> 90 წუთი

თავი 2. გამოყენებული მეთოდები

2.1. *in vitro* ელექტროფიზიოლოგია

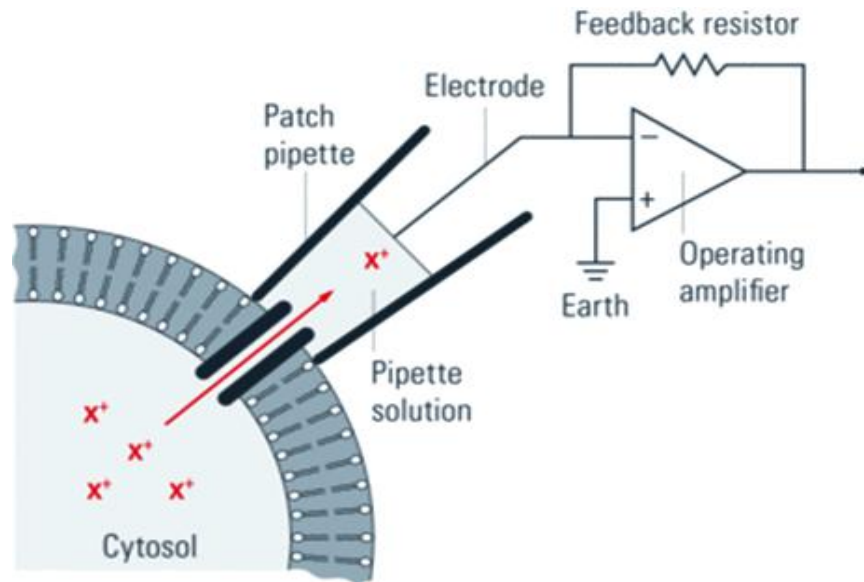
2.1.1 ანათლების მომზადება

ანათლების გამოყენებამ მეცნიერებს საშუალება მისცა შეესწავლათ სინაფსური გადაცემები და უჯრედის ელექტრული თვისებები (Yamamoto and McIlwain, 1966). მეთოდის უპირატესობა იმაში მდგომარეობს, რომ ანათალში ნეირონები რჩება ჯანმრთელი და ამასთანავე გარკვეული კავშირებიც ხელუხლებელი. ანათლების მოსამზადებლად ვირთაგვების ანესთეზია ხდებოდა იზოფლურანის მეშვეობით. თავის ქალაღან ამოღების შემდეგ ტვინი გადაიტანებოდა ყინულიან ხსნარში (შემადგენლობა (მლ): KCl , 2.5; NaH_2PO_4 , 1.25; $MgSO_4$, 10; $PIPES$, 20; $Glucose$, 10; $Saccharose$, 200; $CaCl_2$, 0.5; pH 7.35 with $NaOH$), რომლის ჟანგბადით გამდიდრებაც ხდებოდა წინასწარ 15 წუთის განმავლობაში. 250-300მიკმ-ის სისქის ანათლების მოსამზადებლად გამოიყენებოდა ვიბრატომი. ამის შემდეგ ქსოვილი გადაგვქონდა საინკუბაციო კამერაში, რომელიც ხელოვნურ ცერებროსპინალურ ხსნარს შეიცავდა ($NaCl$, 125; KCl , 2.5; NaH_2PO_4 , 1.25; $MgSO_4$, 2; $NaHCO_3$, 24; $Glucose$, 10; $CaCl_2$, 2. pH 7.35 რეგულირდებოდა ხსნარის კარბოგენით (95% ნახშირორჟანგი და 5% ჟანგბადი) გამდიდრებით. ხსნარი თბებოდა 30-32°C-მდე. ანათლების მომზადების შემდეგ ისინი ინახებოდა ოთახის ტემპერატურაზე. ექსპერიმენტი იწყებოდა ინკუბაციიდან 40 წუთის შემდეგ.

2.1.2 patch-clamp ტექნიკა

patch-clamp მეთოდის აღმოჩენა უკავშირდება საკმანისა და ნეჰელის სახელს, რომელთაც 1991 წელს მიენიჭათ ნობელის პრემია. ამ მეთოდის საშუალებით ხდება ელექტრონული მემბრანის თვისებების შესწავლა. პეჩ-კლამპის აპარატი შეიცავს ელექტრონულ მიკროსკოპს, რომელიც მოთავსებულია მაქსიმალურად სტაბილურ მაგიდაზე. მის შემადგენლობაში შედის ასევე ელექტრული პულსის წარმომქმნელი, გამაძლიერებელი, ოსცილოსკოპი და კომპიუტერი. მეთოდი ერთი მხრივ იძლევა პოტენციალის ფიქსირების საშუალებას და მემბრანული პოტენციალის მანიპულაციის გზით დენების აღრიცხვის შესაძლებლობას. მეორე მხრივ, შესაძლოა

ამ მეთოდით მოვახდინოთ გარკვეული რაოდენობის დენის ფიქსაცია და განსხვავებული რაოდენობის დენის შეყვანის შემთხვევაში პოტენციალის ცვლილების აღრიცხვა.



მოცემულ ექსპერიმენტებში ხდებოდა მთლიანი უჯრედის აღრიცხვის მეთოდის გამოყენება. რაც გულისხმობს ნეირონზე მცირე რაოდენობის წნევის მიყენებით უჯრედის მემბრანის გახსნას და მემბრანის გარშემო არსებული არხების აქტივობის აღრიცხვას.

2.1.3 ექსპერიმენტის პროცედურა

ჩაწერის დაწყებამდე ხდებოდა მიწის კაპილარების მომზადება და მისი წინასწარი დაჭიმვა პულერის მეშვეობით. კაპილარის (GC150TF-10; Clark Electromedical Instruments, Pangbourne, UK) წინააღობა მოცემული ექსპერიმენტის შემთხვევაში მერყეობდა 2.5-3 მეგაომის ფარგლებში. კაპილარში თავსდება აღრიცხველი ვერცხლის ელექტროდი, რომელიც დაფარულია ვერცხლის ქლორიდის ფენით. იგი თავის მხრივ დაკავშირებულია გამაძლიერებელთან (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). კაპილარის წვერის შევსება ხდება ელექტროლიტური ხსნარით. ვინაიდან ამ ხსნარს უჯრედის გახსნის შემდეგ უშუალო კავშირი აქვს უჯრედშიდა გარემოსთან, მას უნდა ჰქონდეს უჯრედშიდა იონების შესაბამისი შემადგენლობა (NaCl, 10; K-Gluconate, 88; K₃-Citrat, 20; HEPES, 10; BAPTA, 3;

Phosphocreatin, 15; MgCl₂, 1; CaCl₂, 0.5; Mg-ATP, 3; Na-GTP, 0.5; pH 7.25 with KOH; ოსმოლურობა 290-300 mOsmol/kg).

ანათალი თავსდება მიკროსკოპთან დაკავშირებულ აღმრიცხველ კამერაში, რომელშიც ცირკულირებს უჯრედგარე ხელოვნური ცერებროსპინალური სხნარი და მდიდრდება კარბოგენით ან ჟანგბადით, იმისდამიხედვით თუ რა შემადგენლობის უჯრედგარე სხნარს ვიყენებთ. ამავე კამერაშია მოთავსებული საკონტროლო ელექტროდი. დღგნ-ის იდენტიფიცირება ხდებოდა მიკროსკოპის მეშვეობით. ჩანაწერის კონტროლი ხდებოდა Pulsesoftware(HEKA Elektronik)-ის მეშვეობით.

2.1.4 პოტენციალის ფიქსირების მეთოდი

ვინაიდან ჰგნ არხები პოტენციალ დამოკიდებული არხებია, დენის აღრიცხვა ხდებოდა პოტენციალის ფიქსირების მეთოდით. ამ მეთოდის დროს აღრიცხველი სხნარი შეიცავდა: *NaCl, 120; KCl, 2.5; NaH₂PO₄, 1.25; HEPES, 30; MgSO₄, 2; CaCl₂, 2; dextrose, 10; pH 7.25*. სხნარს ამასთანავე ვამატებდით BaCl₂-ის 0,5 მოლურ სხნარს. ბარიუმის იონები იწვევს უჯრედის გარეთ მიმართულ კალიუმის დენების ბლოკირებას. pH 7.35 სტაბილიზდებოდა სხნარის ჟანგბადით გამდიდრებით.

ჰა დენის აღრიცხველი პროტოკოლი შეიცავს მაჰიპერპოლარიზებელ 10 საფეხურს. პოტენციალის ფიქსირება ხდებოდა -40 მვ-ზე, რომელიც ამ დენის შებრუნებად პოტენციალს წარმოადგენს (გრაფიკი.1.ა). ყოველი საფეხურის დროს მაჰიპერპოლარიზებელი დენი იწვევდა მემბრანული პოტენციალის 10 მვ-ით ნეგატიური პოტენციალის მიმართულებით შეცვლას. მაჰიპერპოლარიზებელი პულსის ხანგრძლივობა მცირდებოდა საფეხურების შესამაბისად, რათა შენარჩუნებულიყო სტაბილური ჩანაწერი (-40მვ-ზე 1500 მწ და -130მვ-ზე 3,5 მწ). დენის ანალიზი ხდებოდა თეილ დენით, რომელიც თავისუფალია უნებლიე დენისაგან. თეილ დენის საშუალო ამპლიტუდა ნორმალიზებას ვახდენდით შემდეგი ფორმულის გამოყენებით:

$$P(V)=(I-I_{min})/(I_{max}-I_{min}),$$

სადაც, I_{max} დენის ამპლიტუდაა -130 მვ პოტენციალზე და I_{min} დენის ამპლიტუდა - 40 მვ-ზე. და საბოლოოდ, დენის აქტივაცია ჩასმული იქნა ბოლცმანის ფორმულში:

$$p(V)=1/(1+\exp((V-V_h)/k)),$$

V_h დენის აქტივაციის პოტენციალის მაჩვენებელია. დენის სიხშირის განსასაზღვრავად, დენის ამპლიტუდის გაყოფა ხდება უჯრედის მემბრანის ტევადობაზე.

დენის აქტივაციის დროის კონსტანტის განსასაზღვრავად გამოიყენებოდა 2 მაჩვენებლიანიგანტოლება:

$$I_h(T) = A...^{(-+/T1)} + A...^{(-+/T2)}$$

2.1.5 დენის ფიქსირების მეთოდი

დენის ფიქსირების მეთოდით ხდება უჯრედული მემბრანის აქტიური და პასიური მახასიათებლების განსაზღვრა. ამ მეთოდის გამოყენების დროს ვიყენებით ხელოვნურ ცერებროსპინალურ სითხეს ყოველგვარი ინჰიბიტორების გარეშე.

დენის ფიქსირების მეთოდი შეიცავდა მაჰიპერპოლარიზებელ (-250 პა, იმისათვის რომ გამოგვეწვია 3ა დენის აქტივაცია) და მადეპოლარიზებელ (300 პა, იმისათვის რომ გამოგვეწვია მოქმედების პოტენციალი) 1000მწ-ის ხანგრძლივობის დენის საფეხურებს, 40 პა ინტერვალით. მემბრანული პოტენციალი განისაზღვრებოდა შეყვანილი დენის განულებით. შესავლის წინააღმდეგ უნარის გამოთვლა ხდებოდა -30პა დენის შეყვანისას, ომის კანონის გამოყენებით: $R_{in}=V/I$, სადაც R_{in} შესავლის წინააღმდეგ, I შეყვანილი დენი და V ამ დენით გამოწვეული მემბრანული პოტენციალის ცვლილება. მოქმედების პოტენციალის ზღურბლის განსაზღვრა ხდებოდა პირველი მოქმედების პოტენციალის გამოჩენისთანავე. პოტენციალის ჩაზნექვა (voltage sag) იზომებოდა მაქსიმალური ნეგატიური დენის შეყვანით გამოწვეული მემბრანული პოტენციალის ცვლილებით. უჯრედის ტევადობის განსასაზღვრავად გამოიყენებოდა შემდეგი ფორმულა: $C_s = \tau / R_{in}$, სადაც C_s უჯრედის ელექტრული ტევადობაა, τ მემბრანული პოტენციალის ცვლილების დროის კონსტანტა და R_{in} შესავლის წინააღმდეგ.

2.1.6 თალამუსის ველის პოტენციალის აღრიცხვის მეთოდი *in vitro*

იმის შესასწავლათ, თუ რა გავლენას ახდენს გც2 უკმარისობა თალამუსის სინაფსურ ფუნქციაზე *in vitro*, გამოვიყენეთ რეგულარული აფეთქებითი განმუხტვების ჩაწერის მეთოდი. ამისათვის 400 მიკმ-ის სისქის ჰორიზონტალური ანათლები, რომელიც შეიცავდა რბ და ვენტრალურ ბაზალურ ბირთვს (ვბ), მზადდებოდა 4-10 კვირის საკონტროლო და აო-გც2^{-/-} ცხოველებისაგან. ჩანაწერი მიმდინარეობდა ხელოვნურ ცერებროსპინალურ სითხეში 30-32 გრადუსზე. რიტმული აფეთქებითი აქტივობა გამოიწვეოდა internal capsule-ის საშუალებით რბ-ის სტიმულაციით და პასუხების აღრიცხვა ხდებოდა თალამუსის ვბ ბირთვიდან. სიგნალის გაძლიერება ხდებოდა MSE გამაძლიერებლით და ჩანაწერის კონტროლს ვახდენდით WinLTP, v1.01 software-ის მეშვეობით. შემდეგი პარამეტრები იქნა ანალიზისათვის გამოყენებული: რიტმული აფეთქებების რაოდენობა, აფეთქებების დაწყებისა და გაუჩინარების დრო, მოქმედების პოტენციალების რაოდენობა აფეთქებებში და აფეთქებების სიხშირე. მხოლოდ ის ის აფეთქებითი განმუხტვები, რომელთა ინტრააფეთქებითი ინტერვალი არ აღემატებოდა 500მწ-ს, ითვლებოდა როგორც რეგულარული განმუხტვები. ყოველი აფეთქებითი განმუხტვა შეცავდა სულ მცირე 3 მაღალსიხშიროვან სპაიკს. ამ ყველა პარამეტრის ანალიზი ხდებოდა სტიმულაციიდან 2-3 წამის შემდეგ.

2.1.7 ელექტროდების ჩანერგვის სტერეოტაქსული მეთოდი და *in vivo*

ელექტროფიზიოლოგია

აო/გც2/ცგმფ/ჰცნ სასიგნალო სისტემის როლის შესასწავლათ სხვადასხვა ქცევითი მდგომარეობაში, გამოვიყენეთ *in vivo* ელექტროფიზიოლოგია. ამისათვის 3-5 თვის როგორც საკონტროლო, ასევე აო-გც2^{-/-} ცხოველებში ხდებოდა ელექტროდების ჩანერგვა. ცხოველის ანესთეზია ხდებოდა 50მგ/კგ პენტობარბიტალისა და Carprofen (Rimadyl;მგ/კგ) ინტრაპერიტონიული გზით შეყვანით. ვერცხლის ელექტროდები ინერგებოდა მოტორულ, სომატოსენსორულ ქერქსა და თალამუსის ვენტრობაზალურ ბირთვში, ხოლო მიწა და საკონტროლო ელექტროდები თავსდებოდა ნათხემის მახლობლად. ელექტროენცეფალოგრამის (ეეგ) აღრიცხვა იწყებოდა ოპერაციიდან 7-10 დღის შემდეგ. ჩაწერის დროს ცხოველი

თავსდებოდა Plexiglas კამერაში (30x20x20სმ³), სადაც მას შეეძლო თავისუფლად გადაადგილება. ადგილობრივი ველის პოტენციალის (LTP) სიგნალის გაძლიერება ხდებოდა DPA-2F (Science products) გამაძლიერებლის მეშვეობით და გამოიყენებოდა დაბალი (13ც) და მაღალი (1003ც) სიხშირის ფილტრაცია. ცხოველის ქცევითი აქტივობის ჩაწერა ხდებოდა მოძრაობის დეტექტორის (PIR, RK2000DPC LuNAR PR Ceiling Mount, Rokonet RISCO Group S.A., Drogenbos, Belgium) მეშვეობით, რომელიც თავსდებოდა აღმრიცხველი კამერის თავზე. ანალიზისათვის გამოიყენებოდა ნათელი პერიოდის პირველი ორი საათი. Spike2 (version 7.08, Cambridge Electronic Design, UK) software-ის დახმარებით ხდებოდა ოთხი ქცევითი მდგომარეობის: აქტიური ღვიძილის, ზერელე, ღრმა და პარადოქსული ძილის 10 წამიანი 20 ეპოქის სპექტრალური ანალიზი.

2.1.8 იმუნოჰისტოქიმიური შედეგების მეთოდი

C57BL/6 თაგვების პერფუზია ხდებოდა 4%-იანი phosphate-buffered paraformaldehyde (PFA) ხსნარით. ქალაღან ამოღების შემდეგ თავის ტვინი ფიქსაციის მიზნით გადაიტანებოდა 4% PFA-ს შემცველ ხსნარში და 24სთ-ის შემდეგ კი სუკროზას შემცველ 30% phosphate-buffered saline (PBS)-ში. 48-72სთ-ის შემდეგ ვახდენდით 40მიკ.მ სისქის ანათლების მომზადებას. ანათლები თავსდებოდა 10წთ-ის განმავლობაში 3XPBS, 3% შემცველ Triton-X-PBS და შემდგომ კვლავ 3XPBS-ის ხსნარში. საბოლოოდ ანათლებს საინკუბაციოდ 48სთ-ის განმავლობაში ვინახავდით პირველადი ანტისხეულის Anti-Guanylyl Cyclase alpha 2 antibody (1:1500) (Abcam, ab42108, anti-mouse) შემცველ ხსნარში. პირველადი ანტისხეულის გამოყენების შემდეგ ანათლების გადატანა ხდებოდა მეორად ანტისხეულის შემცველ სითხეში (Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit-IgG (1:1500) და შემდეგ mounting medium (VECTASHIELD with DAPI, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA 64019). იმუნოშედეგების შესასწავლად გამოიყენებოდა კონფოკალური მიკროსკოპი.

2.1.9 სტატისტიკური დამუშავება

მიღებული შედეგები წარმოდგენილია როგორც საშუალო მნიშვნელობა±საშუალო სტანდარტული შეცდომა (Mean±SEM). ჰა დენის

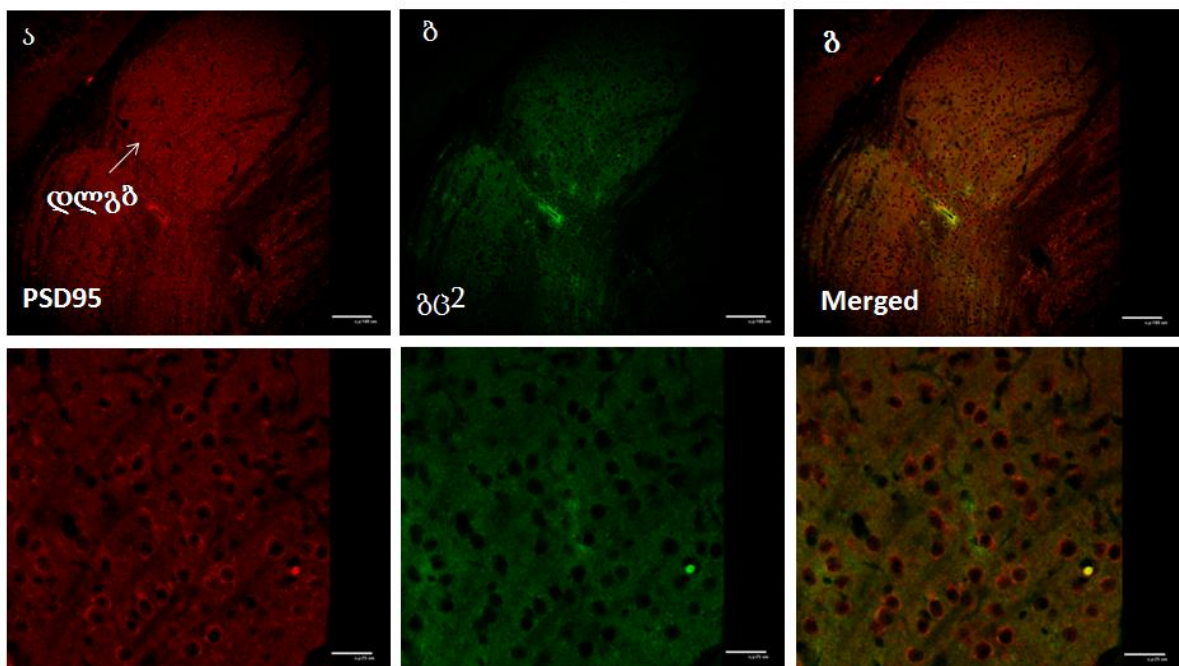
მახასიათებლების შედარებისას გამოიყენებოდა Student's t-tests. ც-ამფ და ც-გმფ-ის გავლენის დამუშავება ხდებოდა Multivariate Analysis of Variance ANOVA-ს დახმარებით. სპექტრალური ანალიზისათვის ვიყენებდით one-way ANOVA და Repeated Measures ANOVA (IBM SPSS22 Statistics software).

მიღებული შედეგები

თავი 1. ც-ამფ და ც-გმფ-ის როლის დადგენა თალამური ჰცნ არხების რეგულაციაში

1.1 აო/გც2/ც-გმფ სასიგნალო გზის როლი თალამური ჰცნ არხების მოქმედების რეგულაციაში

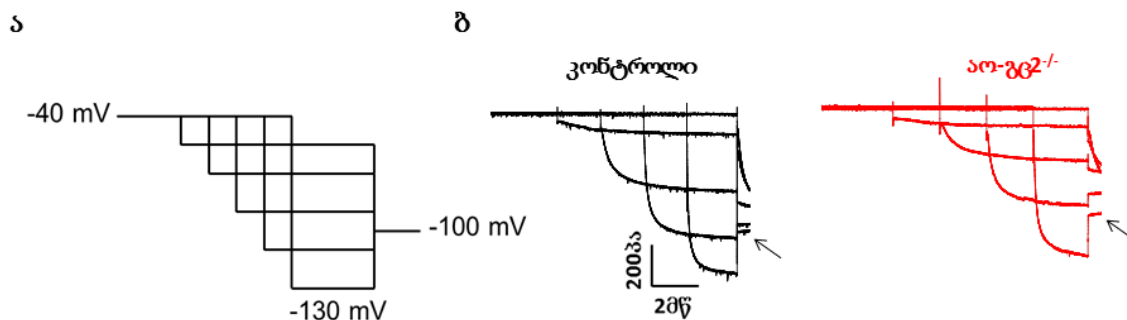
იმისათვის რომ შეგვესწავლა ც-გმფ-ის როლი თალამური ჰცნ არხების ფუნქციაში, ჰა დენის აღრიცხვა მოვახდინეთ დღგბ-ის თვ ნეირონების სხეულიდან. როგორც ცნობილია ცნს-ში გც2 მდებარეობს პოსტსინაფსურ მემბრანაში. თვ უჯრედებში გც2-ის ადგილმდებარეობის დასადგენად გამოვიყენეთ იმუნოჰისტოქიმიური შედეგების მეთოდი. პოსტსინაფსური მემბრანის იდენტიფიცირება მოვახდინეთ პოსტსინაფსური მემბრანის სიმჭიდროვის ცილის (PSD95) ანტისხეულის გამოყენებით (გრაფიკი. 1,ა). გც2-ის წინააღმდეგ გამოიყენებოდა Anti-Guanylyl Cyclase alpha 2 antibody (გრაფიკი. 1, ბ). მიღებული შედეგების თანახმად, გც2 მდებარეობს პოსტსინაფსურად თვ უჯრედებში (გრაფიკი. 1, გ).



გრაფიკი. 1. თალამოკორტიკალურ უჯრედებში გ_{ც2}-ს პოსტინაფსური მდებარეობა უკავია.

ა) PSD95 პოსტინაფსური მემბრანის მარკერი (წითელი ფერი); ბ) გ_{ც2} იზოფორმა მდებარეობს თვ უჯრედების სხეულის მემბრანაში (მწვანე ფერი); გ) გ_{ც2} დაკავშირებულია PSD95-თან პოსტინაფსურ მემბრანაში (ნარინჯისფერი).

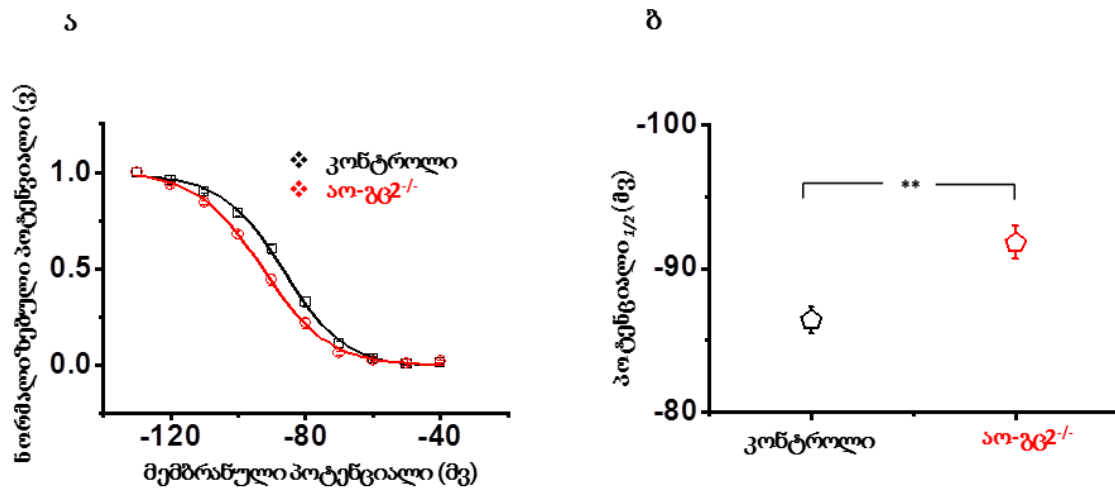
როგორც ზემოთ აღინიშნა, ჰცნ არხები პოტენციალ-დამოკიდებულ არხებს წარმოადგენს და მათი აქტივაცია ხდება უჯრედის მემბრანის ჰიპერპოლარიზაციის შესაბამისად. ყოველივე ამის გათვალისწინებით, ჰა დენის ჩასაწერად გამოიყენებოდა პოტენციალის ფიქსირების მეთოდი. როგორც პროტოკოლი გვიჩვენებს (გრაფიკი. 2, ა), აღმრიცხველი ელექტროდის საშუალებით მიწოდებული მაჰიპერპოლარიზებული დენი იწვევდა მემბრანული პოტენციალის -40-იდან -130მვ-მდე ცვლილებას, რასაც მოჰყვებოდა უჯრედის შიგნით მიმართული (ჰა) დენის აღმოცენება (გრაფიკი. 2,ბ). აღნიშნული დენი ხასიათდება ტიპური S ფორმის აქტივაციის მრუდით.



გრაფიკი. 2. ჰა დენის ჩაწერა ხდება პოტენციალის ფიქსირების მეთოდით. ა) ჰა დენის პროტოკოლი შეიცავს მაჰიპერპოლარიზებელ საფეხურებს 10მვ-ის ინტერვალით. ბ) საკონტროლო (შავი ფერი) და აო-გც^{2-/-} (წითელი ფერი) თავგების თალამოკორტიკალური ნეირონების ჰა დენის ჩანაწერები.

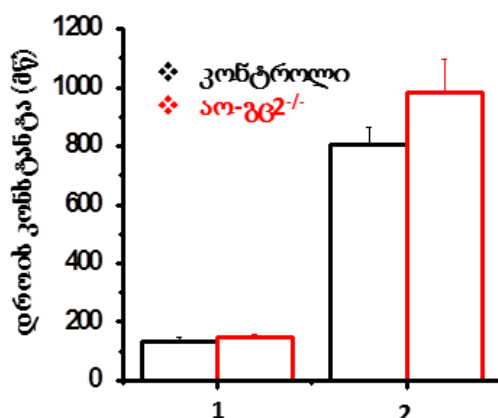
მიღებული შედეგების თანახმად, ციტოპლაზმური გუანიდილ ციკლაზას უკმარისობა და უჯრედშიდა გარემოში ც-გმფ-ის ბაზალური დონის შემცირება იწვევს თალამური ჰა დენის პოტენციალ-დამოკიდებულებაში ცვლილებას და აქტივაციის მრუდის გადანაცვლებას უფრო ნეგატიური პოტენციალის

მიმართულებით. რაც იმას ნიშნავს, რომ ც-გმფ-ის დაბალი დონის შემთხვევაში არხების გაღება ხდება უფრო მეტად ჰიპერპოლარიზებულ პოტენციალზე (-91.788 ± 0.9 მვ, $n=14$), საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით (-86.4125 ± 1.14 მვ, $n=11$, $p=0.002$) (გრაფიკი.3, ა,ბ).



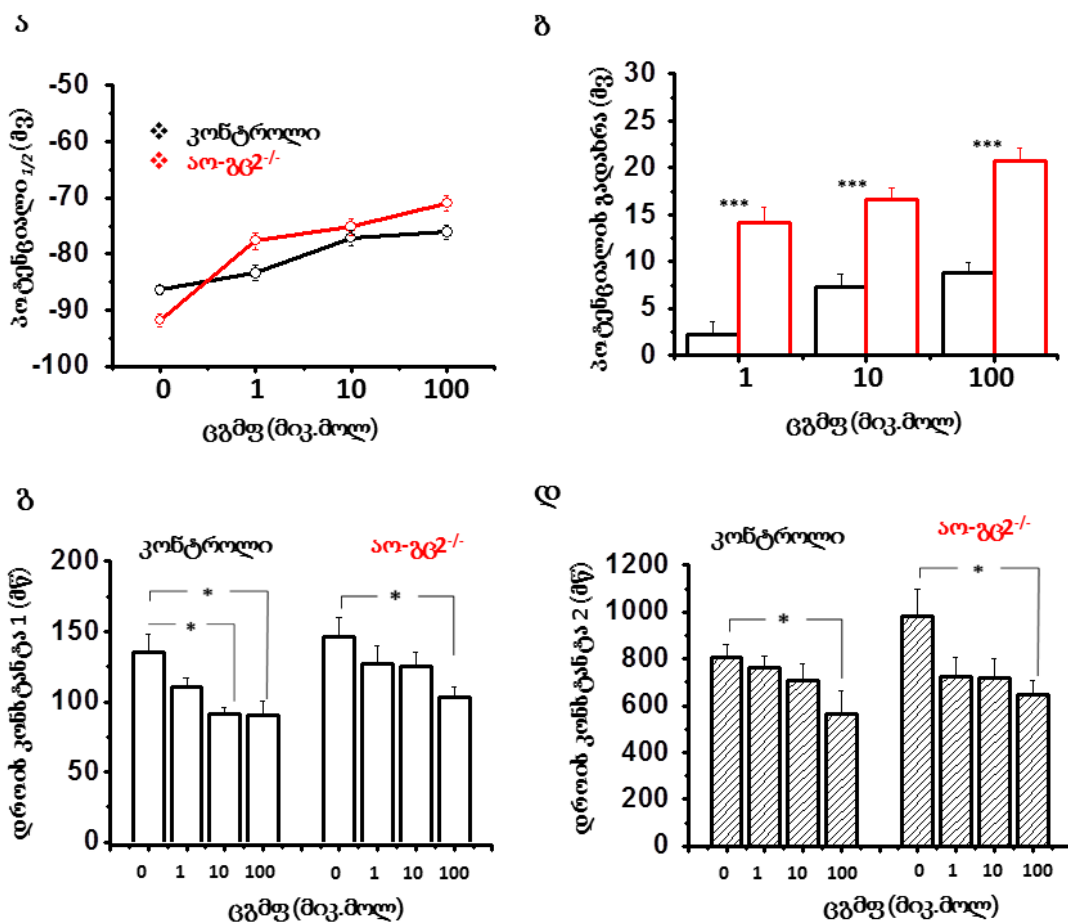
გრაფიკი. 3. გუანიდილ ციკლაზას ციტოპლაზმური ფორმა არეგულირებს თალამუსის სარელეო უჯრედებში ჰიპერპოლარიზაციით აქტივირებადი დენის პოტენციალ - დამოკიდებულებას. ა) ჰა დენის აქტივაციის ნორმალიზებული მრუდი; ბ) აო-გც^{2-/-} თაგვებში ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალი სტატისტიკურად სარწმუნოდ არის გადანაცვლებული უფრო ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით.

აქტივაციის მრუდის ცვლილება განპირობებულია ჰცნ არხების აქტივაციის დროის კონსტანტის ცვლილებით. გუანიდილ ციკლაზას უკმარისობა ანელებს არხების გახსნას. დროის კონსტანტა 1, რომელიც პასუხისმგებელია სწრაფი ჰცნ არხების (ჰცნ1) კინეტიკაზე თითქმის ხელუხლებელი რჩება ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილების შემდეგ (კონტროლი - 135 ± 12.7 მწ; აო-გც^{2-/-} - 146.357 ± 13.7 მწ, $p=0.558$). ციკლური ნუკლეოტიდები ძირითადად წარმოადგენენ ნელი არხების (ჰცნ2, ჰცნ4) აგონისტებს და შესაბამისად, ამ არხების გახსნაზე პასუხისმგებელი დროის კონსტანტა 2 იცვლება აო-გც^{2-/-} ცხოველებში (კონტროლი - 805.6 ± 56.9 მწ; აო-გც^{2-/-} - 981.29 ± 116.99 მწ, $p=0.228$) (გრაფიკი. 4).



გრაფიკი. 4. გუანიდილ ციკლაზა არეგულირებს თალამოკორტიკალურ ნეირონებში ჰა დენის აქტივაციის კინეტიკას. ჰა დენის აქტივაციის კინეტიკის სწრაფი (1) და ნელი (2) კომპონენტები.

იმისათვის, რომ შეგვესწავლა თვ ნეირონების ქცევა ც-გმფ-ის დონის გაზრდის საპასუხოდ, ც-გმფ-ის ანალოგის - 8-Bromo-cGMP-ის 1, 10 და 100მიკ.მოლ კონცენტრაციები იქნა გახსნილი უჯრედშიდა სითხეში. განსხვავებული კონცენტრაციები გამოიყენებოდა ც-გმფ-ის მოქმედების ზღურბლისა და გაჯერების დონის დასადგენად. α-CG2^{-/-} ცხოველების სარელეო უჯრედები ამჟღავნებს გაზრდილ მგრძნობელობას ც-გმფ-ის მიმართ ყველა კონცენტრაციის შემთხვევაში (1მიკ.მოლ -77.65 ± 1.5 მვ, $n=7$, $p=0.000$; 10მიკ.მოლ. -75.2 ± 1.4 მვ, $n=8$, $p=0.000$; 100მიკ.მოლ. -71.5 ± 1.4 მვ, $n=9$, $p=0.000$), საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით (1მიკ.მოლ -83.37 ± 1.6 მვ, $n=8$, $p=0.101$; 10მიკ.მოლ -77.18 ± 1.3 მვ, $n=10$, $p=0.000$; 100მიკ.მოლ -76.07 ± 1.1 მვ, $n=9$; $p=0.000$) (გრაფიკი. 5, ა)(p აჩვენებს სტატისტიკურ სხვაობას ფონსა და მოცემულ კონცენტრაციის შორის). პოტენციალის გადახრა ყველა კონცენტრაციის შემთხვევაში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მაღალი იყო α-CG2^{-/-} თაგვებში (გრაფიკი. 5, ბ).



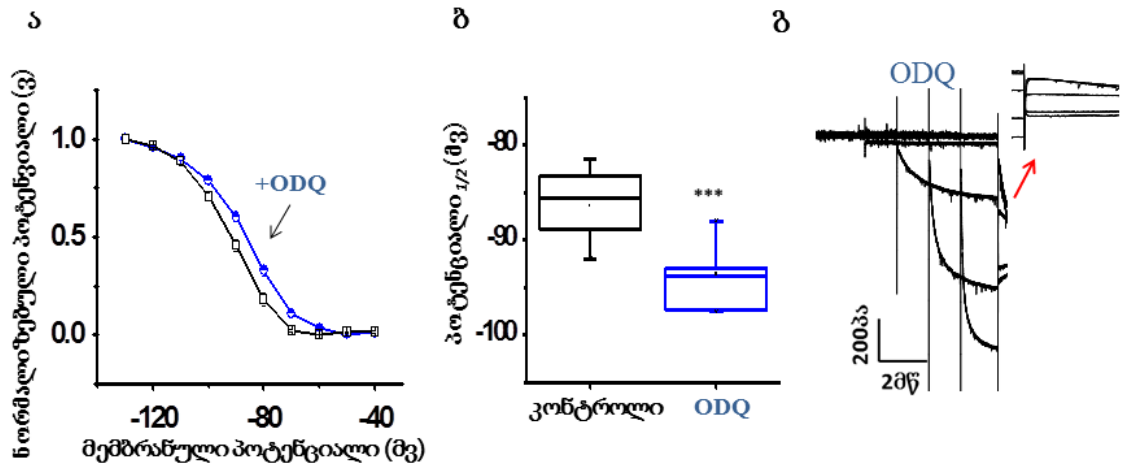
გრაფიკი. 5. თალამოკორტიკალური ნეირონების ჰა დენის აქტივაციის მოდულირება ც-გმფ-ით. ა) ც-გმფ დოზის შესაბამისად იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის უფრო დადებითი პოტენციალის მიმართულებით გადანაცვლებას ორივე ჯგუფის ცხოველებში; ბ) ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის გადახრა ცგმფ-ის სხადასხვა დოზის შემთხვევაში სტატისტიკურად მაღალია აუ-გც2^{-/-} თაგვებში (წითელი ფერი), საკონტროლო ცხოველებთან (შავი ფერი) შედარებით; გ,დ) ც-გმფ დოზა დამოკიდებული მანერით ცვლის ჰცნ არხების კინეტიკის სწრაფ (1) და ნელ (2) კომპონენტებს.

აქტივაციის პოტენციალის ცვლილებას თან ახლავს აქტივაციის დროის კონსტანტის ცვლილებაც, რომელიც ასევე დოზა-დამოკიდებული მანერით მცირდება (გრაფიკი. 5, გ,დ) (ტაბულა. 1).

ტაბულა 1. ცგმფ იწვევს ჰა დენის აქტივაციის დროის კონსტანტის დოზა-დამოკიდებულ ცვლილებას.

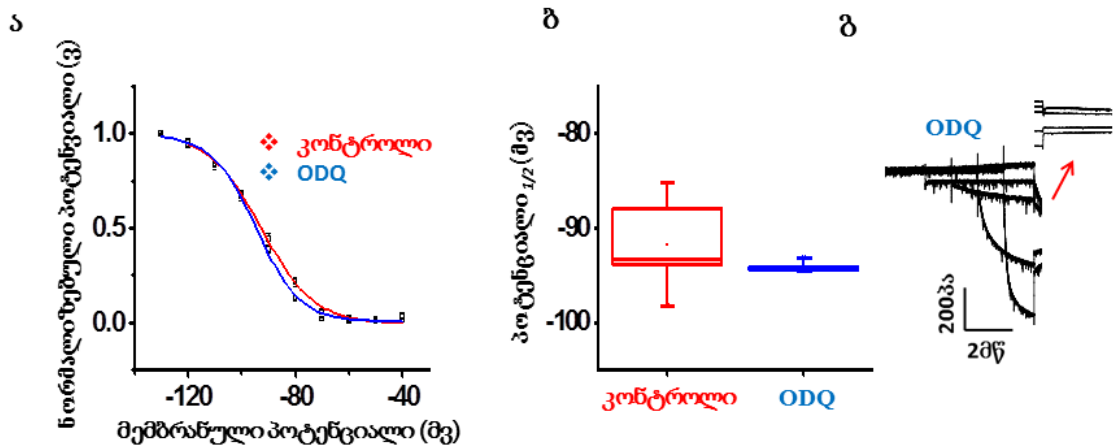
დროის კონსტანტა 1					
კონტროლი		<i>P</i>	<i>აო-გც2^{-/-}</i>		<i>P</i>
1მიკ.მოლ	110.196±19მწ	0.079	1მიკ.მოლ	127.095±12.47მწ	0.318
10მიკ.მოლ	91.282±15მწ	0.002	10მიკ.მოლ	125±10.29მწ	0.244
100მიკ.მოლ	90.656±9.69მწ	0.002	100მიკ.მოლ	103.15±7.23მწ	0.023
დროის კონსტანტა 2					
კონტროლი		<i>P</i>	<i>აო-გც2^{-/-}</i>		<i>P</i>
1მიკ.მოლ	764.44±49.89მწ	0.69	1მიკ.მოლ	726.36±78.6მწ	0.143
10მიკ.მოლ	705.044±72მწ	0.317	10მიკ.მოლ	720.64±82.87მწ	0.277
100მიკ.მოლ	563.16±100.68მწ	0.02	100მიკ.მოლ	647.8±60.4მწ	0.301

იმისათვის, რომ მიგვეჩვენა *აო-გც2^{-/-}* უჯრედებისათვის, ექსპერიმენტების შემდეგ სერიაში გამოვიყენეთ გუანიდილ ციკლაზას ინჰიბიტორი ODQ. ამისათვის, ვახდენდით ანათლების პრეინკუბაციას 10 წუთის განმავლობაში 10მიკ.მოლ ODQ-ს შემცველ ცერებროსპინალურ სითხეში. 10მიკ.მოლ ODQ სელექტიურად აინჰიბირებს ციტოპლაზმურ გუანიდილ ციკლაზას, მაშინ როდესაც, მაღალი კონცენტრაციები იწვევს რკინა შემცველი სხვა ცილების ინჰიბირებასაც. როგორც მოსალოდნელი იყო, საკონტროლო უჯრედებში ODQ-მ გამოიწვია ჰენ არხების აქტივაციის გადანაცვლება ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით, თითქმის იგივე პოტენციალზე, როგორც ნოკაუტირებულ საკონტროლო უჯრედების შემთხვევაში (-93.6 ± 1.3 მვ, $n=8$, $p=0.000$) (გრაფიკი. 6 ა,ბ,გ).



გრაფიკი. 6. ციტოპლაზმური გუანიდილ ციკლაზას სელექტიური ინჰიბიტორი ODQ ცვლის სარელეო უჯრედების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალს. ა) ჰა დენის აქტივაციის ნორმალიზებული მრუდი საკონტროლო (შავი ფერი) და ODQ-ს (ლურჯი ფერი) გამოყენების პირობებში; ბ) ODQ იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის უფრო ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალისაკენ გადანაცვლებას; გ) ჰა დენის ჩანაწერის მაგალითი ODQ-ს გამოყენების პირობებში.

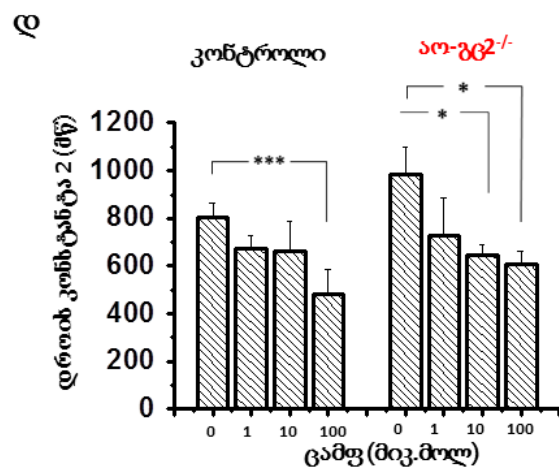
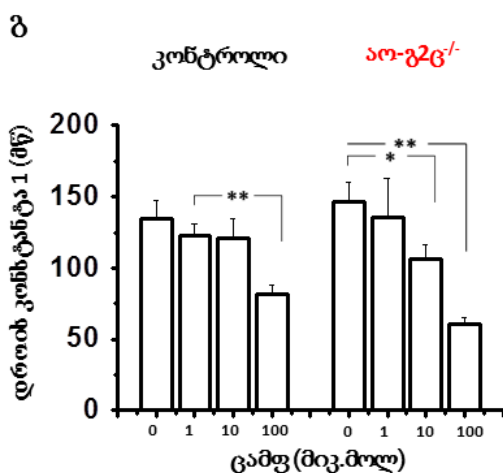
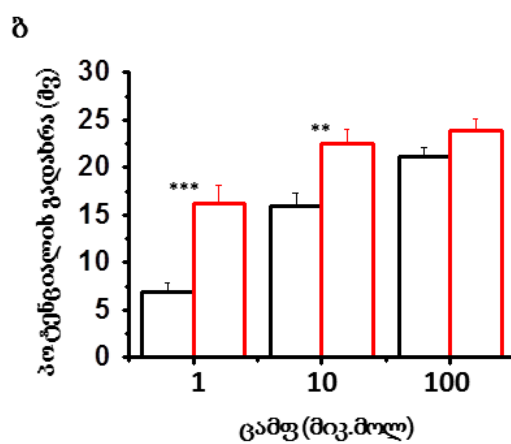
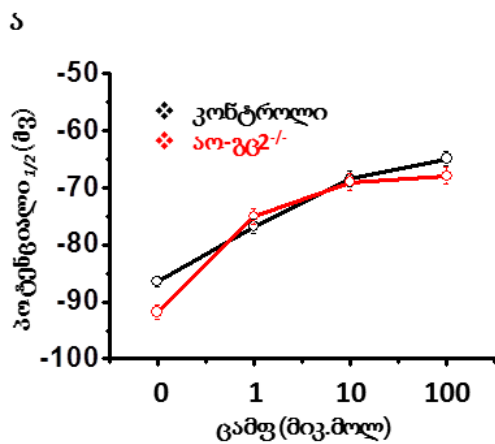
კონტროლისაგან განსხვავებით ODQ-მ გავლენა არ მოახდინა α -გ $\text{G}2^{-}$ თაგვების თვ უჯრედების ჰცნ არხების აქტივაციაზე (-94.5 ± 1.9 მვ, $n=5$, $p=0.254$) (გრაფიკი. 7, ა, ბ, გ).



გრაფიკი. 7. ODQ არ ცვლის α -გ $\text{G}2^{-}$ თაგვების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალს. ა) ჰა დენის აქტივაციის ნორმალიზებული მრუდი საკონტროლო (წითელი ფერი) და ODQ-ს (ლურჯი ფერი) გამოყენების პირობებში; ბ) ODQ იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის უფრო ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალისაკენ გადანაცვლებას; გ) ჰა დენის ჩანაწერის მაგალითი ODQ-ს გამოყენების პირობებში.

1.2 თალამოკორტიკალური ნეირონების მოდულაცია ც-ამფ-ით

ც-ამფ ჰიპერპოლარიზაციით აქცივირებადი არხების პოტენციური მოდულატორია. ისევე როგორც ც-გმფ-ის შემთხვევაში, ც-ამფ-ის ანალოგის - 8-Bromo-cAMP 1, 10 და 100მიკ.მოლ კონცენტრაციები იქნა მოთავსებული უჯრედშიდა სითხეში. ც-ამფ დოზა-დამოკიდებული მანერით გამოიწვია ჰა დენის აქტივაციის მრუდის დადებითი პოტენციალისაკენ გადანაცვლება ორივე ჯგუფის ცხოველებში. ც-ამფ-ის დაბალი კონცენტრაციები იწვევს ჰა დენის აქტივაციის მრუდის ძლიერ ცვლილებას ნოკაუტირებულ ცხოველებში (1მიკ. მოლ. - -75.01 ± 1.3 მვ, $n=8$; $p=0.000$; 10მიკ.მოლ. - -69.5 ± 1.46 მვ, $n=6$; $p=0.000$; 100მიკ.მოლ. - -67.9 ± 1.5 მვ, $n=6$; $p=0.000$), საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით (1მიკ.მოლ. ცამფ - -77.98 ± 1.07 მვ, $n=11$; $p=0.000$; 10მიკ.მოლ - -68.98 ± 1.15 მვ, $n=11$; $p=0.000$; -63.7 ± 0.99 მვ, $n=13$; $p=0.000$) (გრაფიკი. 8, ა). პოტენციალის გადახრა სტატისტიკურად მაღალია α -გც $2^{-/-}$ თაგვების შემთხვევაში (გრაფიკი. 8, ბ).



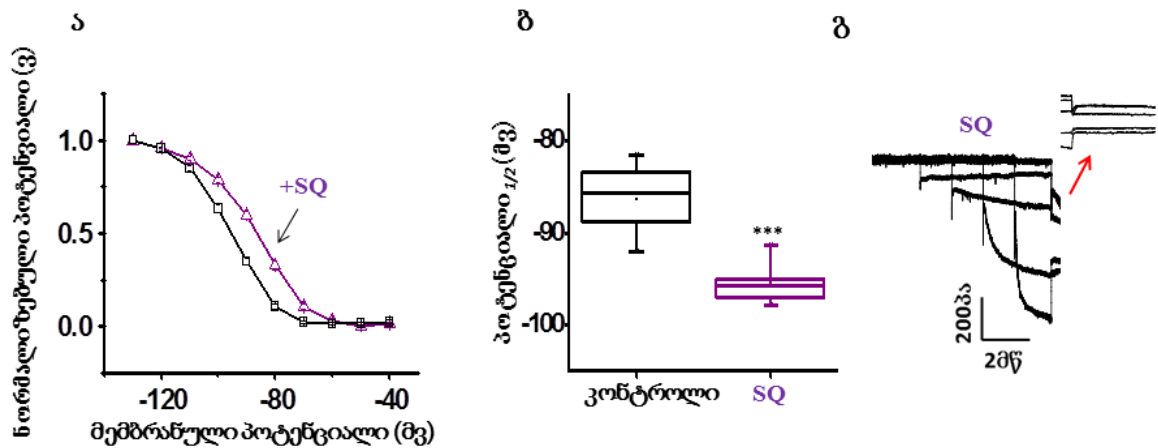
გრაფიკი. 8. ცამფ ჰცნ არხების პოტენციური მოდულატორია. ა) ც-ამფ დოზა-დამოკიდებული მანერით იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის უფრო დადებითი პოტენციალისაკენ გადანაცვლებას ორივე ჯგუფის ცხოველებში; ბ) პოტენციალის ცვლილება გაცილებით ძლიერია აო-გც^{2-/-} თაგვებში (წითელი ფერი) საკონტროლო ცხოველებთან (შავი ფერი) შედარებით; გ, დ) ც-ამფ ამცირებს ჰცნ არხების გახსნის კინეტიკის სწრაფ (1) და ნელ (2) კომპონენტებს.

ისევე როგორც ც-გმფ-ის შემთხვევაში, ც-ამფ გამოიწვია ჰცნ არხების დროის კონსტანტის დოზა დამოკიდებული ცვლილება (გრაფიკი. 8, გ,დ) (ტაბულა 2).

ტაბულა.2 ცამფ დოზა დამოკიდებული მანერით ცვლის ჰა დენის აქტივაციის კინეტიკის სწრაფ (1) და ნელ (2) კომპონენტებს.

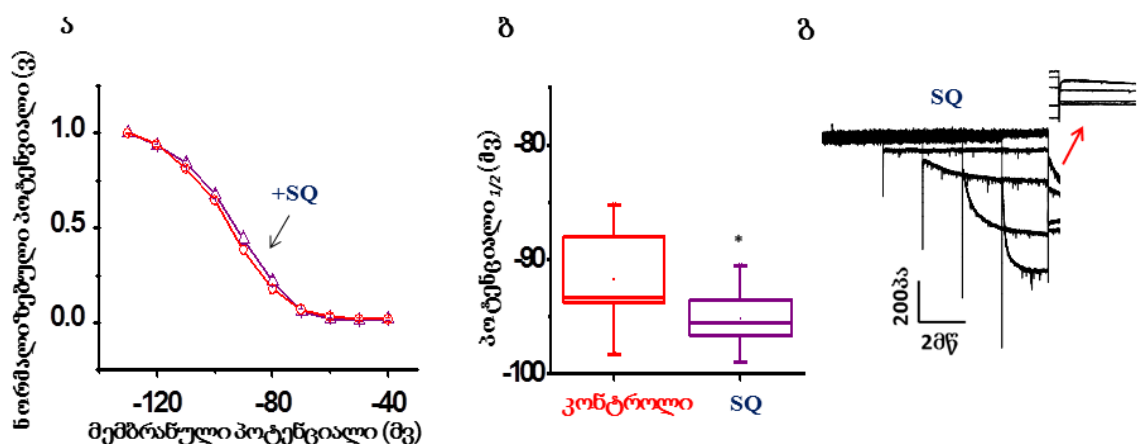
დროის კონსტანტა 1					
კონტროლი		P	აო-გც ^{2-/-}		P
1მიკ.მოლ	123.0±8.3მწ	0.872	1მიკ.მოლ	135.61±27მწ	0.636
10მიკ.მოლ	121.38±13.6მწ	0.207	10მიკ.მოლ	106.8±9.95მწ	0.076
100მიკ.მოლ	82.6±6.4მწ	0.457	100მიკ.მოლ	60.29±5.14მწ	0.002
დროის კონსტანტა 2					
კონტროლი		P	აო-გც ^{2-/-}		P
1მიკ.მოლ	671.5±58.9მწ	0.227	1მიკ.მოლ	727.23±160.33მწ	0.14
10მიკ.მოლ	660.56±124.75მწ	0.22	10მიკ.მოლ	648.6±42.37მწ	0.037
100მიკ.მოლ	480.1±104.02მწ	0.011	100მიკ.მოლ	607.98±52.67მწ	0.046

შემდგომში მოვახდინეთ ადენილილ ციკლაზას ინჰიბირება, რათა გვეჩვენებოდა შემცირებული ც-ამფ-ის დონის გავლენა ჰცნ არხების ფუნქციაზე. ამისათვის ანათლებს საინკუბაციოდ წინასწარ ვათავსებდით 1.5 საათის განმავლობაში SQ 22,536-ს შემცველ ხელოვნურ ცერებროსპინალურ სითხეში. საკონტროლო უჯრედებში ადენილილ ციკლაზას ინჰიბირებამ გამოიწვია ჰა დენის აქტივაციის შენელება და აქტივაციის მრუდის სტატისტიკურად სარწმუნოდ გადანაცვლება ჰიპერპოლარიზებული მიმართულებით (სურ. 9 ა,ბ,გ).



სურ. 9. ადენილილ ციკლაზას ინჰიბიტორი SQ22,536 გავლენას ახდენს Ca^{2+} დენის აქტივაციაზე საკონტროლო ცხოველებში. ა) Ca^{2+} დენის აქტივაციის ნორმალიზებული მრუდი საკონტროლო (შავი ფერი) და SQ -ს (იასამნისფერი) გამოყენების პირობებში; ბ) SQ ანაცვლებს Ca^{2+} დენის აქტივაციის პოტენციალს ნეგატიური მიმართულებით; გ) Ca^{2+} დენის ჩანაწერი SQ გამოყენების პირობებში.

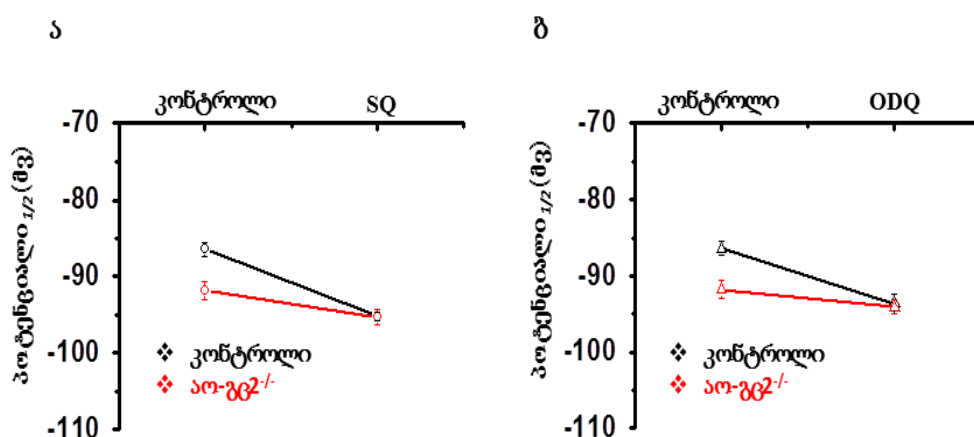
პოტენციალის გადახრა გაცილებით ძლიერი იყო საკონტროლო ცხოველებში (-95.5 ± 0.9 მვ, $n=11$; $p=0.000$), α_1 -გვ $2^{-/-}$ თაგვებთან შედარებით (-95.3 ± 0.98 მვ, $n=10$; $p=0.034$) (გრაფიკი. 10, ა,ბ,გ).



გრაფიკი. 10. SQ22536 მცირედ ცვლის α_1 -გვ $2^{-/-}$ თაგვების თვ უჯრედების Ca^{2+} დენის აქტივაციის პოტენციალს. ა) Ca^{2+} დენის აქტივაციის ნორმალიზებული მრუდი საკონტროლო (შავი ფერი) და SQ -ს (იასამნისფერი) გამოყენების პირობებში; ბ) SQ ცვლის Ca^{2+} დენის

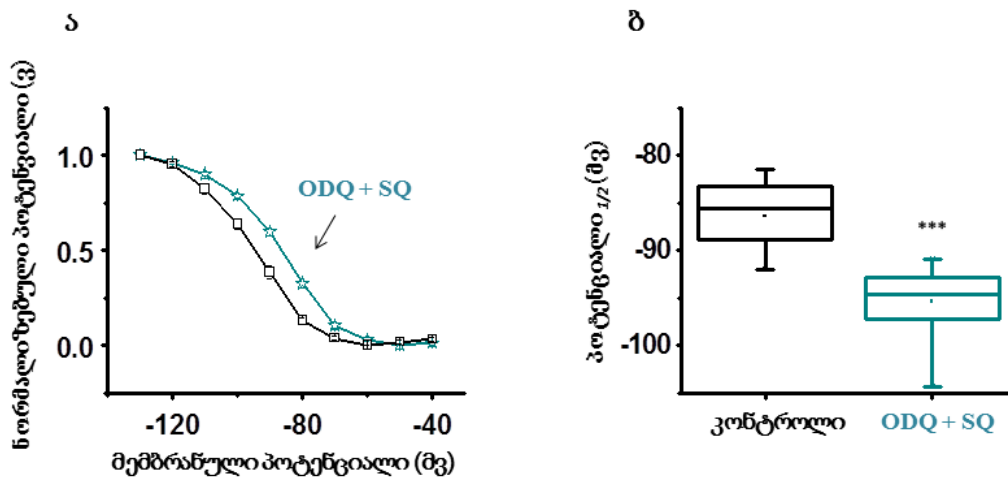
აქტივაციის პოტენციალს ნეგატიური მიმართულებით; გ) ჰა დენის ჩანაწერი SQ გამოყენების პირობებში.

მაშასადამე, ადენიდილ და გუანიდილ ციკლაზების ინჰიბიციას მოჰყვება ჰა დენის აქტივაციის გადანაცვლება უფრო ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით და ეფექტი გაცილებით მაღალია საკონტროლო ცხოველებში (გრაფიკი. 11, ა,ბ).



გრაფიკი. 11. შეჯამებული სქემა: ციკლური ნუკლეოტიდების ინჰიბირება იწვევს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის მრუდის გადანაცვლებას ნეგატიური პოტენციალის მიმართულებით. ა) SQ-ს გავლენა ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალზე საკონტროლო და აო-გვ^{2/-} თაგვებში; ბ) ODQ-ს მოქმედება საკონტროლო და აო-გვ^{2/-} თაგვების ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალზე.

იმისათვის რომ დაგვედგინა ციკლური ნუკლეოტიდების მოქმედების ზღვარი ჰცნ არხების აქტივაციის რეგულაციაში, მოვახდინეთ ადენიდილ და გუანიდილ ციკლაზების თანადროული ინჰიბირება საკონტროლო ცხოველებში. ციკლაზების ინჰიბიციამ გამოიწვია აქტივაციის მრუდის გადანაცვლება დაახლოებით SQ 22,536-ს მოქმედების საზღვრებში (-95.4 ± 1.2 , $n=12$; $p=0.000$).



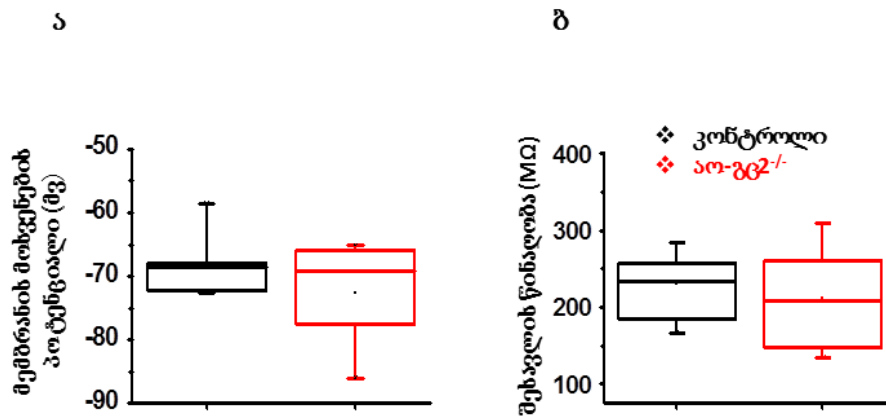
გრაფიკი. 12. ციკლური ნუკლეოტიდების გავლენა ჰგნ არხების მოქმედებაზე შეზღუდულია.

ა) ჰა დენის აქტივაციის მრუდის ნორმალიზებული სქემა საკონტროლო (შავი ფერი) და ადენდილ და გუანიდილ ციკლაზების (შაბიამნისფერი) გამოყენების პირობებში; ბ) ციკლაზების თანადროული ინჰიბირება განაპირობებს ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის ნეგატიური მიმართულებით გადანაცვლებას.

თავი 2. ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილება იწვევს α -გც $2^{-/-}$ თაგვებში თვ ნეირონების აქტიური და პასიური მახასიათებლების ცვლილებას

მიღებული შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ თალამური ჰგნ არხების მოქმედება კონტროლდება ციკლური ნუკლეოტიდებით. იმის შესასწავლად, აქვს თუ არა ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილებას თვ უჯრედების პასიურ და აქტიურ მახასიათებლებზე გავლენა, გამოვიყენეთ დენის ფიქსირების მეთოდი, რომლის დროსაც მემბრანის პოტენციალის ფიქსირება ხდებოდა მემბრანის მოსვენების პოტენციალზე და უარყოფითი და დადებითი დენის შეყვანა იწვევდა მემბრანული პოტენციალის ცვლილებას. მემბრანის მოსვენების პოტენციალის განსასაზღვრავად ვანულებდით შეყვანილ დენს და შესავლის წინააღობა გამოითვლებოდა -30პა დენის შეყვანით გამოწვეული მემბრანული პოტენციალის ცვლილების შესაბამისად.

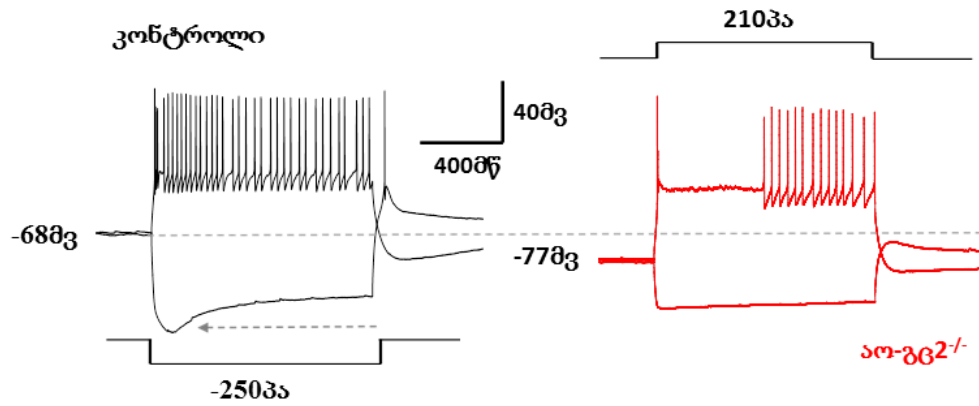
მიღებული შედეგების თანახმად, α -გ $\text{G}2^{-/-}$ -ის ნეირონები (-69.7 ± 1.3 , , $n=8$), საკონტროლო ცხოველის ნეირონებისაგან (-73 ± 1.6 , $n=7$; $p=0.134$, $n=10$) განსხვავებით ხასიათდებიან უფრო მეტად ჰიპერპოლარიზებული მოსვენების მემბრანული პოტენციალით (გრაფიკი. 13, ა), მაშინ როდესაც შესავლის წინაღობა უცვლელი რჩება (გრაფიკი. 13, ბ).



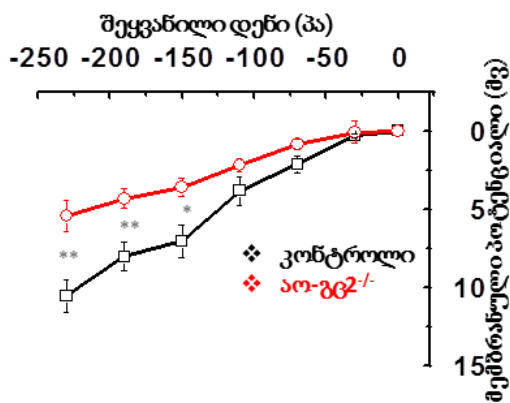
გრაფიკი. 13. უჯრედის პასიური მახასიათებლები. ა) გ $\text{G}2$ უკმარისობა იწვევს თალამუსის ნეირონების მემბრანული პოტენციალის ჰიპერპოლარიზაციას; ბ) უჯრედის შესავლის წინაღობა უცვლელი რჩება α -გ $\text{G}2^{-/-}$ თავებში.

მემბრანული პოტენციალის ცვლილება თავის მხრივ გავლენას ახდენს უჯრედის აგზნებადობაზე. ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში უარყოფითი დენის შეყვანა იწვევს უჯრედის ჰიპერპოლარიზაციას და ჰა დენის აქტივაციას, რასაც მოჰყვება ნატრიუმის იონების უჯრედში შესვლა და მემბრანის დეპოლარიზაცია, და ეს ყოველივე ჩანაწერზე აისახება როგორც პოტენციალის ჩაზნექვა (ისრის მიმართულება) (გრაფიკი. 14, ა).

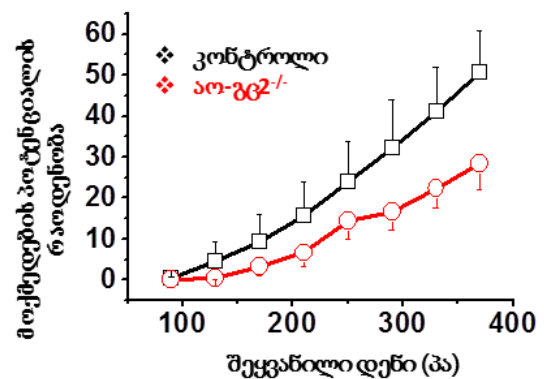
ა



ბ



გ

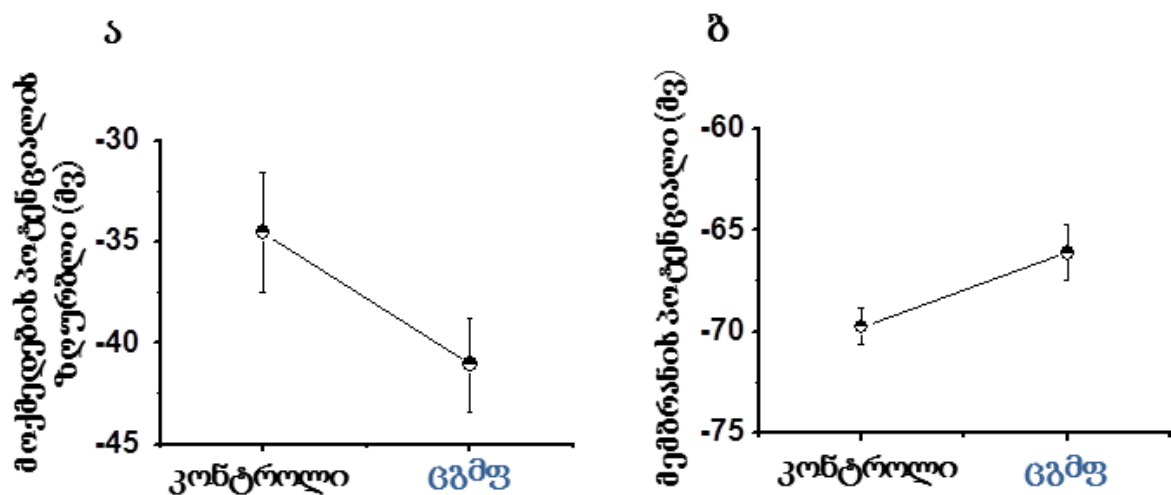


გრაფიკი. 14. გგ2 უკმარისობა ცვლის უჯრედის მემბრანის აქტიურ მახასიათებლებს. ა) ჩანაწერის მაგალითები უარყოფითი და დადებითი დენის შეყვანის დროს საკონტროლო (შავი ფერი) და აო-გგ2^{-/-} (წითელი ფერი) თავგების თვ უჯრედებში; ბ) პოტენციალის ჩაზნექვის ამპლიტუდა უარყოფითი დენის სხვადასხვა საფეხურის შეყვანის პირობებში; გ) მოქმედების პოტენციალის რაოდენობა იზრდება დადებითი დენის მომატებასთან ერთად.

მიღებული შედეგების თანახმად, ც-გმფ-ის ბაზალური დონის ცვლილება იწვევს პოტენციალის ჩაზნექვის ამპლიტუდის შემცირებას (გრაფიკი 14, ბ), რაც განპირობებული უნდა იყოს ჰგნ არხების პოტენციალ-დამოკიდებულების ცვლილებით. ყოველივე ამას მოჰყვება მოქმედების პოტენციალის რაოდენობის ცვლილებაც სხვადასხვა რაოდენობის დადებითი დენის შეყვანის საპასუხოდ (გრაფიკი 14,გ).

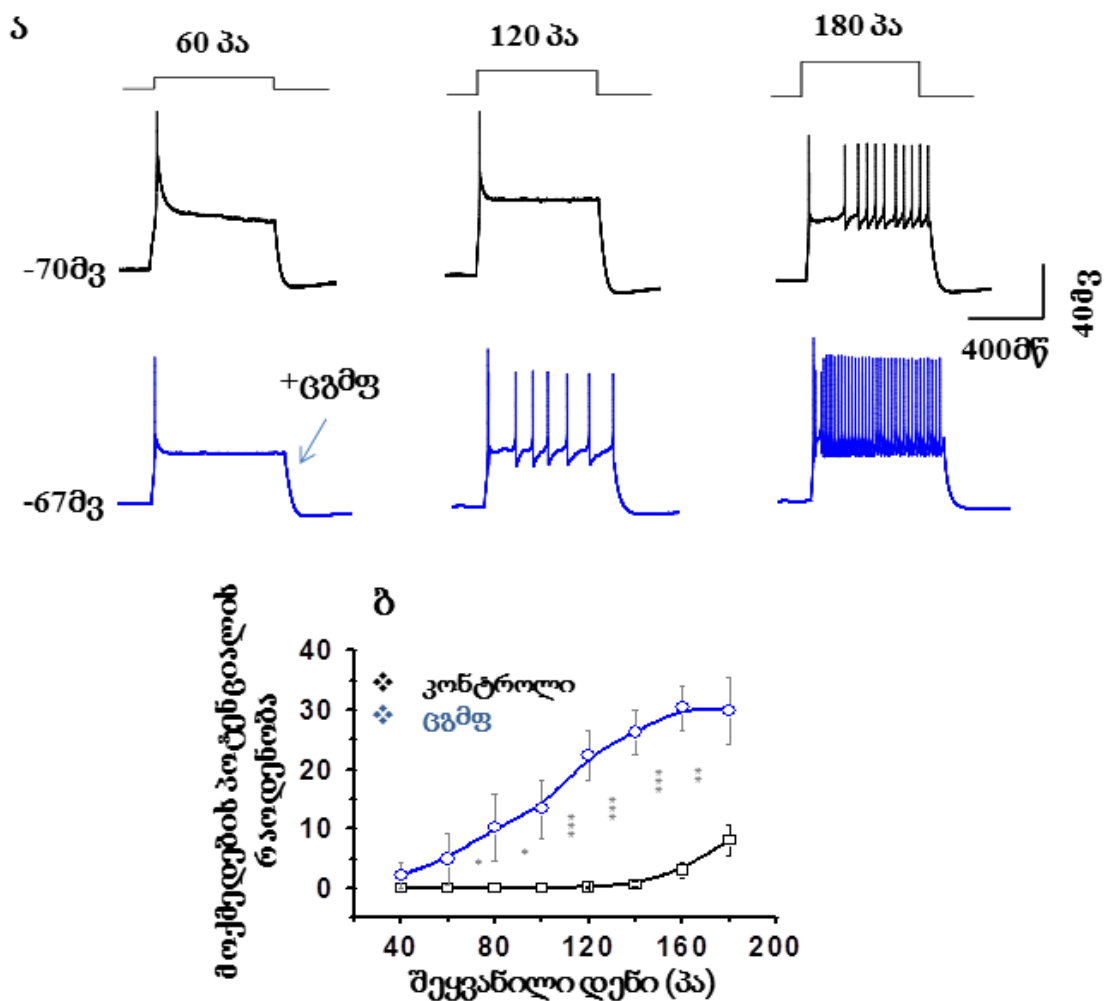
2.1. ც-გმფ-ის უჯრედშიდა დონის გაზრდა იწვევს მოქმედების პოტენციალების რაოდენობის მომატებას.

ექსპერიმენტის შემდგომ სერიაში შევისწავლეთ თალამუსის საკონტროლო სარელო უჯრედების ქცევა ც-გმფ-ის ბაზალური დონის გაზრდის საპასუხოდ. ამისათვის 10მიკმოლ ც-გმფ თავსდებოდა უჯრედშიდა სითხეში. როგორც მოსალოდნელი იყო, ც-გმფ-მა გამოიწვია მემბრანის მოსვენების პოტენციალის დეპოლარიზაცია (გრაფიკი. 15, ბ) და მოქმედების პოტენციალის აღმოცენების ზღურბლის შემცირება (გრაფიკი. 15, ა).



გრაფიკი. 15. ც-გმფ დენის ფიქსირების პირობებში იწვევს საკონტროლო ცხოველების თვ უჯრედების მახასიათებლების ცვლილებას. ა) ც-გმფ ამცირებს მოქმედების პოტენციალის აღმოცენების ზღურბლს; ბ) ც-გმფ იწვევს მემბრანის მოსვენების პოტენციალის დეპოლარიზაციას.

ყოველივე ამას მოჰყვა უჯრედის აგზნებადობის გაადვილება და მოქმედების პოტენციალის რაოდენობის გაზრდა დადებითი დენის შეყვანის საპასუხოდ (გრაფიკი. 16. ა,ბ).

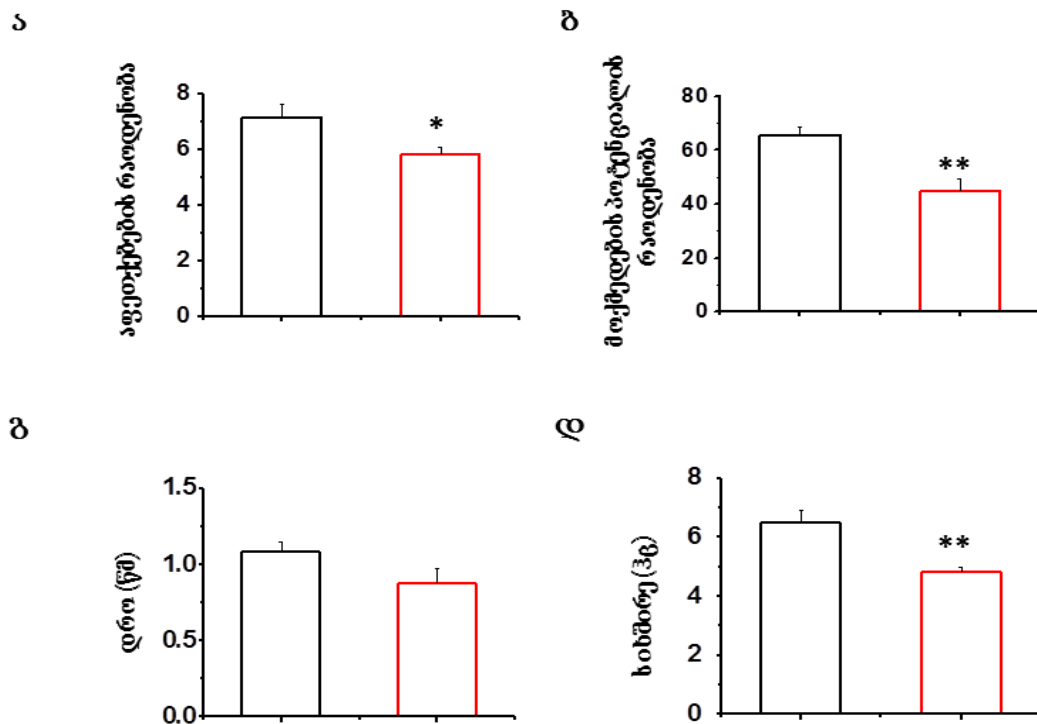


გრაფიკი. 16. ცგმფ უჯრედშიდა დოზის გაზრდასმოჰყვება მოქმედების პოტენციალის რაოდენობის მომატება. ა) სხვადასხვა ამპლიტუდის დადებითი დენის შეყვანა იწვევს უჯრედის აგზნებადობის გაზრდას; ბ) საკონტროლო უჯრედებში ც-გმფ იწვევს მოქმედების პოტენციალის რაოდენობის გაზრდას.

თავი 3. თალამუსში ჰცნ არხები აკონტროლებენ სინაფსურ გადაცემებს

აქვს თუ არა ცალკეული უჯრედების ქცევის ცვლილებას სინაფსურ კავშირებზე გავლენა? ამ კითხვაზე პასუხის გასაცემად გამოვიყენეთ *in vitro* ველის პოტენციალის აღრიცხვის მეთოდი. მოცემული მეთოდის თანახმად, ვახდენდით internal capsule-ის ელექტრულ სტიმულაციას, რომელიც თავის მხრივ იწვევდა რეტისკულური ბირთვის აქტივაციასა და ხანგრძლივლი ინჰიბიტორული პოსტსინაფსური პოტენციალის აღმოცენებას თუ უჯრედებზე, და ყოველივე ამას თუ

უჯრედები რეზუნდ აფეთქებების წარმოქმნით პასუხობდნენ. მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ რიტმული აფეთქებების რაოდენობა $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ თაგვებში სტატისტიკურად მცირდება (5.8 ± 0.3 , $n=10$) საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით (7.13 ± 0.5 , $n=8$; $p=0.03$) (გრაფიკი. 16. ა). ამავე დროს, მცირდება აფეთქებებში მოქმედების პოტენციალების რაოდენობაც (კონტროლი - 65.5 ± 2.9 , $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ - 44.9 ± 4.5 ; $p=0.002$) (გრაფიკი. 16. ბ), მაშინ, როდესაც აფეთქებების დაწყებისა და გაუჩინარების დრო არ განსხვავდებოდა თაგვების ამ ორ ჯგუფში (კონტროლი - 1.08 ± 0.06 მწ, $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ - 0.88 ± 0.09 მწ; $p=0.123$) (გრაფიკი. 16.გ). $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ თაგვებში (4.8 ± 0.23 გ) სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირდება ასევე რიტმული აფეთქებების სიხშირე, საკონტროლო ცხოველებთან (6.5 ± 0.43 გ; $p=0.001$) შედარებით.



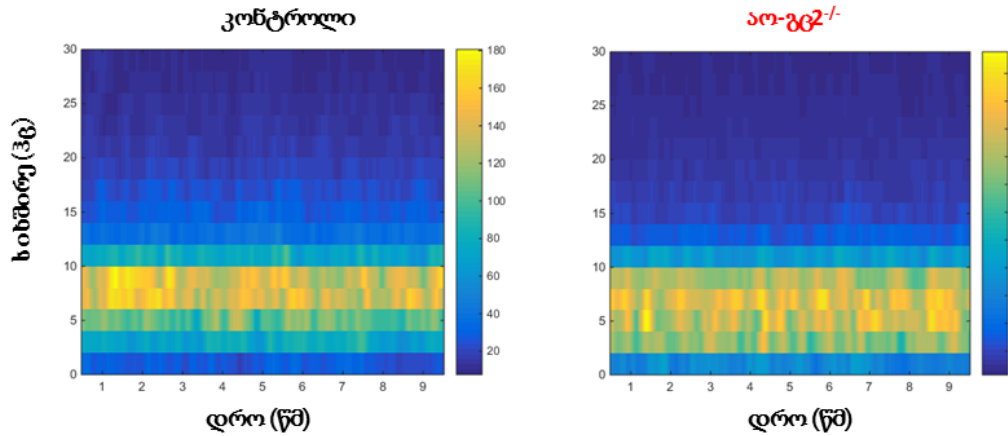
გრაფიკი. 17. გც2-ის უკმარისობა ცვლის სინაფსურ გადაცემებს თალამუსში. ა) რიტმული აფეთქებების რაოდენობა სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირდება $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ ცხოველებში საკონტროლო თაგვებთან შედარებით; ბ) გც2-ის უკმარისობა იწვევს აფეთქებებში მოქმედების პოტენციალების რაოდენობის შემცირებას; გ) რიტმული აფეთქებების დაწყებისა და დამთავრების დრო სტატისტიკურად არასარწმუნოდ შემცირებულია $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ თაგვებში; დ) რიტმული აფეთქებების სიხშირე სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირდება $\alpha\text{-}\text{გ}\text{ც}2^{-/-}$ ცხოველებში.

თავი 4. $\alpha/\gamma^2/\delta$ -გმფ/3ცნ სასიგნალო გზის ფუნქციის დარღვევა იწვევს სხვადასხვა ქცევითი მდგომარეობის დროს ევგ აქტივობის ცვლილებას

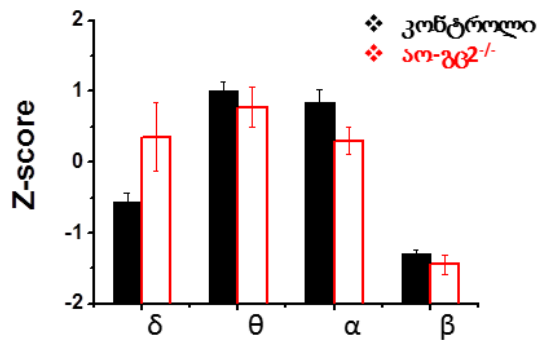
როგორც აღინიშნა, 3ა დენი მონაწილეობს როგორც თალამური უჯრედშიდა დელტა ტალღების, ასევე სინაფსური ხასიათის თითისტარა და დელტა ოსცილაციების წარმოქმნაში. ამგვარად, მოსალოდნელია რომ 3ა დენის ფუნქციის დარღვევამ თალამოკორტიკალურ სისტემაში გამოიწვიოს ამ ოსცილაციებში ცვლილებები. ამ თეორიის დასამტკიცებლად გამოვიყენეთ *in vivo* ელექტროფიზიოლოგია, ელექტროდების ჩანერგვის სტერეოტაქსული მეთოდი და ევგ ჩაწერა. ანალიზისათვის გამოიყენებოდა სომატოსენსორული ქერქის ევგ ჩანაწერი. სკორინგისათვის შევარჩიეთ დღის პერიოდის პირველი ორი საათი, იმის გათვალისწინებით, რომ დროის ამ მონაკვეთში ძილის მოთხოვნილება გაზრდილია. ოთხი ქცევითი მდგომარეობის: აქტიური ღვიძილის (აღ), ზერელე წელი ძილის (ზნძ), ღრმა წელი ძილისა (ღნძ) და პარადოქსული ძილის (პძ)-ის შერჩევას ვახდებდით ევგ მახასიათებლებისა (ამპლიტუდა და სიხშირე) და მოძრაობის დეტექტორის საშუალებით. თითოეული ქცევითი მდგომარეობის დროს ყოველ ცხოველში შევარჩიეთ 10 წამიანი 20 ეპოქა და მოვახდინეთ δ , θ , σ და β სიხშირის საშუალო მაჩვენებლების power spectral density (PSD) ანალიზი.

მიღებული შედეგების თანახმად, აღ-ის დროს $\alpha/\gamma^2/\delta$ თავგებში δ სიმძლავრის ტენდენცია მატულობს. აქტიური მოძრაობის პარალელურად ნოკაუტირებული თავგების ევგ აჩვენებს გაზრდილ δ აქტივობას ($\text{PSD } 0.36 \pm 0.5$, $n=4$), საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით (-0.55 ± 1.12 , $n=5$; $p=0.079$). θ სიმძლავრე არასაწყმუნოდ იცვლება (კონტროლი 1.01 ± 0.13 ; $\alpha/\gamma^2/\delta$ 0.78 ± 0.3 , $p=0.443$). საკონტროლო თავგებს აღენიშნებათ შედარებით მაღალი სიმძლავრის σ აქტივობა (0.83 ± 0.2) ნოკაუტირებულ თავგებთან შედარებით (0.3 ± 0.2 ; $p=0.089$). β ოსცილაციები თითქმის უცვლელი რჩება თავგების ამ ორ სახეობაში (კონტროლი - 1.3 ± 0.06 ; $\alpha/\gamma^2/\delta$ - 1.4 ± 0.14 ; $p=0.332$) (გრაფიკი. 18, ა,ბ,გ).

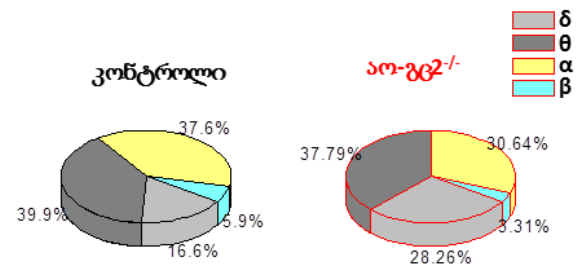
ა



ბ



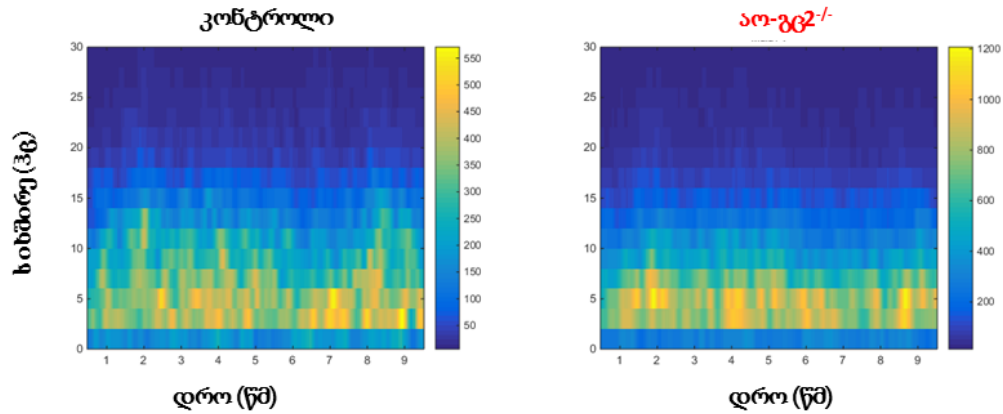
გ



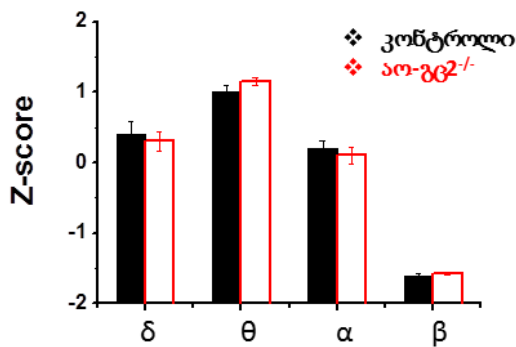
გრაფიკი. 18. საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ად-ის პირობებში. ა) კორტიკალური ოსცილატორული აქტივობის დრო-სიხშირის დამოკიდებულების სპექტროგრამა; ბ) სხვადასხვა სიხშირის ნორმალიზებული PSD (z-score) აქტივობა საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვებში; გ) სხვადასხვა სიხშირის აქტივობის პროცენტული თანაფარდობა.

ზნძ-ის დროს ნოკაუტირებულ ცხოველებში არასარწმუნოდ მცირდება δ სიმძლავრე (0.3 ± 0.14), საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით (0.39 ± 0.2 ; $p=0.733$). θ აქტივობა არასარწმუნოდ მომატებულია აო-გც^{2-/-} თაგვებში (1.15 ± 0.05) საკონტროლო თაგვებთან შედარებით (0.99 ± 0.107 ; $p=0.281$). ზნძ-ის დროს σ აქტივობა არასარწმუნოდ შემცირებულია აო-გც^{2-/-} თაგვებში (0.1 ± 0.123) საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით (0.21 ± 0.09 ; $p=0.516$). ასევე β აქტივობა თითქმის უცვლელი რჩება ორივე ჯგუფის ცხოველებში (აო-გც^{2-/-} 1.57 ± 0.02 ; კონტროლი - 1.61 ± 0.03 ; $p=0.423$) (გრაფიკი. 19, ა,ბ,გ).

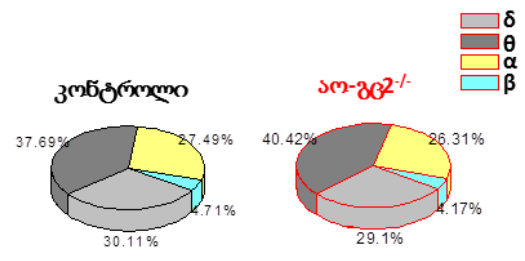
ა



ბ



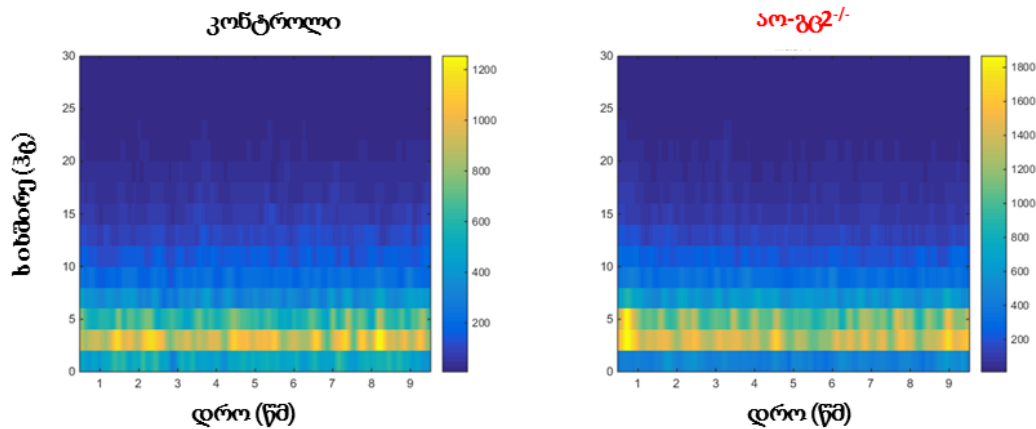
გ



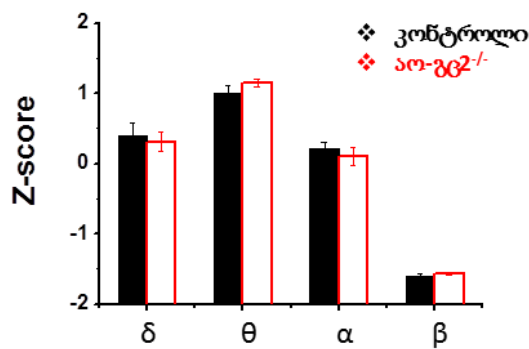
გრაფიკი. 19. საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ზნძ-ის პირობებში. ა) კორტიკალური ოსცილატორული აქტივობის დრო-სიხშირის დამოკიდებულების სპექტროგრამა; ბ) სხვადასხვა სიხშირის ნორმალიზებული PSD (z-score) აქტივობა საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვებში; გ) სხვადასხვა სიხშირის აქტივობის პროცენტული თანაფარდობა.

ღნძ-ის დროს ეეგ-ზე დომინირებს მაღალამპლიტუდიანი და ნელსიხშიროვანი ტალღები. ძილის ამ პერიოდის დროს δ აქტივობა სტატისტიკურად არ განსხვავდებოდა თაგვების ორივე სახეობაში (აო-გც^{2-/-} 0.89 ± 0.35 ; კონტროლი - 1.07 ± 0.26 ; $p=0.701$). θ აქტივობა არასარწმუნოდ მაღალია ღნძ-ის დროს ნოკაუტირებულ ცხოველებში (0.82 ± 0.27), კონტროლთან შედარებით (0.64 ± 0.18 ; $p=0.584$). ამ ცხოველებში შეიმჩნევა σ ტალღების შემცირების ტენდენცია (0.41 ± 0.12), საკონტროლო თაგვებთან შედარებით (0.32 ± 0.16 ; $p=0.663$), მაშინ, როდესაც β აქტივობა თითქმის უცვლელი რჩება (აო-გც^{2-/-} -1.3 ± 0.03 ; კონტროლი - 1.39 ± 0.09 ; $p=0.436$) (გრაფიკი. 20, ა,ბ,გ).

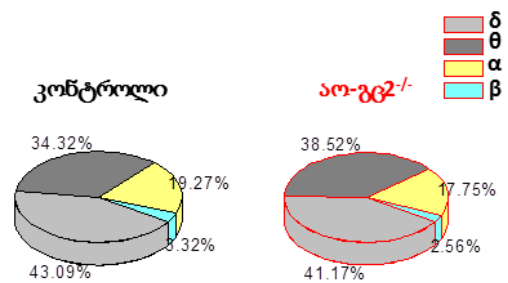
ა



ბ



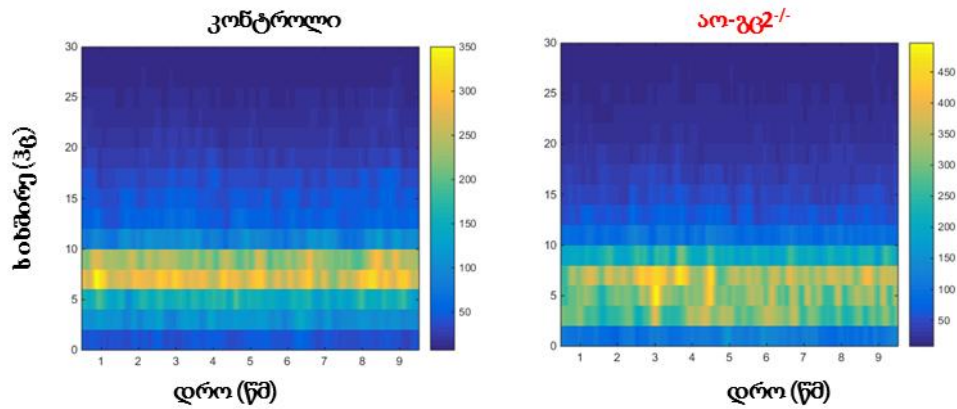
გ



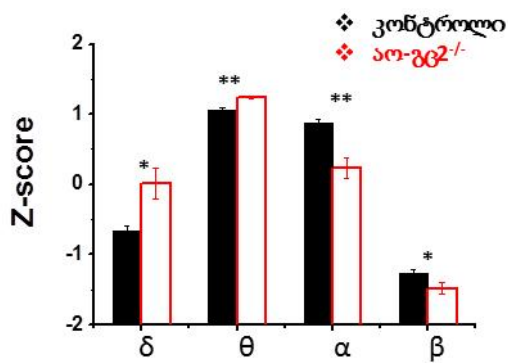
გრაფიკი. 20. საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი ღძმ-ის პირობებში. ა) კორტიკალური ოსცილატორული აქტივობის დრო-სიხშირის დამოკიდებულების სპექტროგრამა; ბ) სხვადასხვა სიხშირის ნორმალიზებული PSD (z-score) აქტივობა საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვებში; გ) სხვადასხვა სიხშირის აქტივობის პროცენტული თანაფარდობა.

სტატისტიკურად სარწმუნო ცვლილებები შეიმჩნევა δ აქტივობაში δ აქტივობაში δ -ის დროს (აო-გც^{2-/-} 0.01 ± 0.23 ; კონტროლი - 0.67 ± 0.07 ; $p=0.017$). ასევე ადგილი აქვს θ სიმჭიდროვის სტატისტიკურად სარწმუნოდ გაზრდას (აო-გც^{2-/-} 1.23 ± 0.02 ; კონტროლი - 1.06 ± 0.03 ; $p=0.004$). δ და θ აქტივობის გაზრდის პარალელურად აო-გც^{2-/-} ცხოველებს აღენიშნებათ შემცირებული σ ტალღების სიმძლავრე (აო-გც^{2-/-} 0.23 ± 0.14 ; კონტროლი - 0.88 ± 0.05 ; $p=0.002$) და β ბეტა აქტივობა (აო-გც^{2-/-} 1.48 ± 0.76 ; კონტროლი - 1.27 ± 0.05 ; $p=0.051$) (გრაფიკი. 21, ა,ბ,გ).

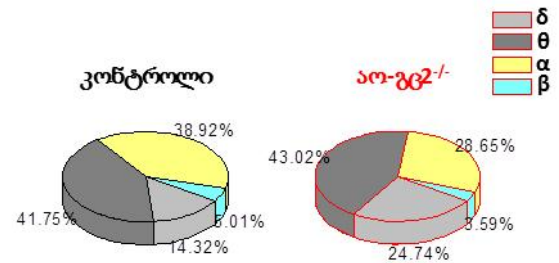
ა



ბ



გ



გრაფიკი. 21. საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვების სომატოსენსორული ქერქის სპექტრალური ანალიზი პა ძილის პირობებში. ა) კორტიკალური ოსცილატორული აქტივობის დრო-სიხშირის დამოკიდებულების სპექტროგრამა; ბ) სხვადასხვა სიხშირის ნორმალიზებული PSD (z-score) აქტივობა საკონტროლო და აო-გც^{2-/-} თაგვებში; გ) სხვადასხვა სიხშირის აქტივობის პროცენტული თანაფარდობა.

შედეგების განხილვა

ც-გმფ მონაწილეობს თალამური ჰცნ არხების მოქმედების რეგულაციაში

მიღებული შედეგების თანახმად, თალამური ჰცნ არხები განიცდის ძლიერ მოდულაციას ც-გმფ-ით. გუანიდილ ციკლაზას უკმარისობა იწვევს თვ უჯრედების ჰა დენის პოტენციალ-დამოკიდებულებაში ძლიერ ცვლილებებს და ანაცვლებს აქტივაციის მრუდს უფრო ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით. რაც იმას ნიშნავს, რომ *აო-გც2^{-/-}* თაგვების თვ უჯრედებში ჰცნ არხების გახსნა მიმდინარეობს უფრო ნელა საკონტროლო ცხოველების უჯრედებთან შედარებით. ც-გმფ-ის უჯრედშიდა შეყვანას მოჰყვება საპირისპირო შედეგი. საკონტროლო უჯრედებში გუანიდილ ციკლაზას ინჰიბიტორი ODQ იწვევს ჰა დენის ისეთივე ცვლილებას, როგორსაც ადგილი აქვს ნოკაუტირებული ცხოველების შემთხვევაში. როგორც ჩანს ც-გმფ არ მოქმედებს ჰა დენის ამპლიტუდაზე, იგი უცვლელი რჩება *აო-გც2^{-/-}* თაგვებში.

გუანიდილ ციკლაზას როლი ბაზალური ც-ამფ-ის რეგულაციაში

ც-ამფ ცნობილია როგორც ჰცნ არხების ძლიერი მოდულატორი ნერვულ და კარდიოვასკულარულ სისტემებში. ჩვენი შედეგების თანახმად, ც-ამფ-ის სხვადასხვა კონცენტრაცია თალამური ჰა დენის დოზა დამოკიდებულ დეპოლარიზაციას განაპირობებს. ეს ეფექტი გაცილებით მაღალია გც2 ნოკაუტირებულ ცხოველებში. ცნობილია, რომ ფიზიოლოგიურ პირობებში გუანიდილ ციკლაზას ც-ამფ-ის წარმოქმნის უნარიც გააჩნია (Beste, Stasch, Kaefer, & Seifert, 2011). ყოველივე ამის გათვალისწინებით, სავარაუდოა, რომ გც2-ის წაშლა იწვევდეს ც-ამფ-ის ბაზალური დონის შემცირებასაც. ამ ჰიპოთეზის სასიკეთოდ მეტყველებს ის ფაქტიც, რომ ადენიდილ ციკლაზას ინჰიბიციას მოჰყვება საკონტროლო უჯრედების ჰა დენის აქტივობის ძლიერი ჰიპერპოლარიზაცია, მაშინ, როდესაც უკვე ჰიპერპოლარიზებული ნოკაუტირებული უჯრედები გაცილებით სუსტი პასუხით ხასიათდებიან.

უჯრედის აგზნებადობის ცვლილება გც2-ს ნაკლებობის შემთხვევაში

როგორც შედეგები გვიჩვენებს, α -გც2^{-/-} თაგვების თვ უჯრედები ხასიათდებიან ჰიპერპოლარიზებული მოსვენების მემბრანული პოტენციალით, რაც ჰცნ არხების ფუნქციის დარღვევით უნდა იყოს განპირობებული. ფიზიოლოგიურ პირობებში უარყოფითი დენის შეყვანა განაპირობებს ჰა დენის აქტივაციას და მემბრანის დეპოლარიზაციას დაბალზღურბლოვანი კალციუმის არხების გააქტივების პოტენციალამდე, რაც თავის მხრივ იწვევს რებაუნდ აფეთქებების წარმოქმნას. α -გც2^{-/-} თაგვები ხასიათდებიან უფრო ჰიპერპოლარიზებული მემბრანის მოსვენების პოტენციალით და ამავდროულად ჰცნ არხების გახსნის კინეტიკაც შენელებულია. ყოველივე ამას მოჰყვება მაჰიპერპოლარიზებული დენის საპასუხოდ ჰცნ არხების შენელებული პასუხი, რაც ჩანაწერზე პოტენციალის ჩაზნექვის შემცირებული ამპლიტუდით აისახება. ვინაიდან, ჰა დენი პასუხისმგებელია დაბალზღურბლოვანი კალციუმის დენის აქტივაციაზე, მოცემულ გც2 ნოკაუტირებულ უჯრედებში მაჰიპერპოლარიზებული დენით მიღწეული მემბრანული პოტენციალი ვერ აღწევს დაბალზღურბლოვანი კალციუმის არხების აქტივაციის პოტენციალს და ამიტომ მოცემულ ცხოველებში რებაუნდ აფეთქებების გამოჩენის ალბათობა შემცირებულია საკონტროლო უჯრედებთან შედარებით.

მემბრანული პოტენციალის ცვლილებას ასევე მოჰყვება უჯრედის აგზნებადობის ცვლილებაც. დადებითი დენის შეყვანის საპასუხოდ α -გც2^{-/-} ცხოველების უჯრედები წარმოქმნიან ნაკლები რაოდენობის მოქმედების პოტენციალს, რაც შესაძლოა განპირობებული იყოს ნატრიუმის არხებში ცვლილების შეტანით. როგორც ცნობილია, α -ის დონორები ზრდის მუდმივ (persistent) ნატრიუმის დენს (Centonze et al., 2001). ამის დამადასტურებელია ის ფაქტი, რომ საკონტროლო უჯრედებში ც-გმფ-ის უჯრედშიდა შეყვანას მოჰყვება მემბრანის დეპოლარიზაცია, მოქმედების პოტენციალის ზღურბლის შემცირება და ტონური სპაიკების რაოდენობის მომატება. გც2-ის უკმარისობა არ იწვევს მემბრანის ელექტრული ტევადობისა და წინაღობის ცვლილებას.

აო/გც2/ც-გმფ/3ცნ არხების სასიგნალო გზის როლი თალამოკორტიკალური სისტემის რეგულაციაში.

თუ უჯრედების მახასიათებლების ცვლილება გავლენას ახდენს თალამუსის ველის პოტენციალზე. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად, *in vitro* რეტიკულური ბირთვის სტიმულაცია იწვევს აო-გც2⁻ თაგვების თუ უჯრედებზე შემცირებული რაოდენობის რებაუნდ აფეთქებების წარმოქმნას, საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით. ურთიერთდაკავშირებული ამალგზნებელი თუ და ინჰიბიტორული რეტიკულური ნეირონები არეგულებენ თალამუსში თითისტარა (7-14ჰც) ოსცილაციებს. გაბაერგული რეტიკულური ნეირონების აქტივაციას მოჰყვება თუ უჯრედებზე 7-14ჰც სიხშირის ინჰიბიტორული პოსტსინაფსური პოტენციალის წარმოქმნა, რაც იწვევს მაღალსიხშიროვანი (200-400ჰც) რებაუნდ სპაიკების გამოჩენას თუ უჯრედებზე (Steriade, 1988). თუ ნეირონები გაძლიერებულ ამალგზნებელ სიგნალს უგზავნის რეტიკულურ ნეირონებს და ყოველივე ეს დასაბამს აძლევს რიტმული აქტივობის ჩამოალიბებას. უჯრედის მახასიათებლებს ამ შემთხვევაში გადამწყვეტი როლი ეკისრება. მუდმივი ნატრიუმის დენები მონაწილეობს პოსტინჰიბიტორული რებაუნდ დეპორიზაციის წარმოქმნაში (Jahnsen & Llinas, 1984). ანესტეტიკების უჯრედშიდა შეყვანა, რომლებიც ახშობს ამ დენებს, იწვევს თალამოკორტიკალური ნეირონების ჰიპერპოლარიზაციას და რიტმული აფეთქებები თითისტარას სიხშირის დიაპაზონში უჩინარდება (Steriade & Mulle, 1985). ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად, ნოკაუტირებულ ცხოველებს უნდა აღენიშნებოდეთ მოცემული დენის ფუნქციის დარღვევები. შემდგომი კანდიდატი, რომელიც თითისტარა ოსცილაციების რეგულაციაში უნდა მონაწილეობდეს არის პოტენციალ დამოკიდებული დენები (Budde et al. 1992; McCormick & Wang 1991), შესაძლოა ჰა დენი. აო/გც2⁻ ცხოველებს აღენიშნებათ რებაუნდ აფეთქებების შემცირებული რაოდენობა როგორც უჯრედულ, ასევე სინაფსურ დონეზე. რაც იმას ნიშნავს, რომ შემცირებული ამალგზნებელი პასუხი რეტიკულური ნეირონების მიმართულებით უნდა ასუსტებდეს რიტმულ აქტივობას.

ჰა დენის როლი ოსცილაციების რეგულაციაში

რიტმული ოსცილაციები ტვინის სხვადასხვა ნაწილში ნეირონული კავშირების მახასიათებელია. ოსცილაციები ნეირონების სინქრონული აქტივობის საპასუხოდ წარმოიქმნება და ნეირონულ წრედებში ინფორმაციის გადაცემის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს. ცნობილია, რომ ჰცნ არხები მონაწილეობს დენდრიტულ ინტეგრაციაში, პროცესში, რომელიც პასუხისმგებელია უჯრედებში სიგნალის გავრცელებაზე. აქედან გამომდინარე, ამ არხების ფუნქციის დარღვევას შესაძლოა მოჰყვეს ოსცილაციებში ცვლილებები. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად, აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სასიგნალო სისტემა გადამწყვეტ როლს თამაშობს თალამოკორტიკალური ოსცილაციების ჩამოყალიბებაში. ალ-ის და პა ძილის დროს აო-გც2^{+/+} ცხოველებში ეეგ სურათი ძლიერად იყო შეცვლილი. მაშინ, როდესაც ეეგ მახასიათებლები ზნმ და ღნმ დროს სტატისტიკურად სარწმუნოდ არ განსხვავდებოდა. ალ-ის დროს აო-გც2^{+/+} ცხოველებს აღენიშნებოდათ ეეგ და ქცევითი მახასიათებლების დესინქრონიზაცია. აქტიური მოძრაობის პარალელურად აო-გც2^{+/+} თაგვების ეეგ აჩვენებდა გაზრდილ დელტა სიმძლავრეს.

აო-ის ძილ-ღვიძილის ციკლში მონაწილეობის შესწავლა უკვე ათეულ წელს ითვლის, მაგრამ მისი ზუსტი როლის დადგენა ამ კომპლექსურ ქცევაში ვერ მოხერხდა. ეს შეიძლება აიხსნას მოლეკულის უჩვეულო თვისებით. აო-ს შეუძლია თავისუფლად გადაკვეთოს ბიოლოგიური მემბრანა და გავლენა მოახდინოს ნეირონების დიდ პოპულაციაზე. ნაჩვენებია, რომ აო აადვილებს როგორც ამაღზნებელ, ასევე შემაკავებელ სინაფსურ გადაცემებს (Ohkuma et al., 1998; Yu and Eldred, 2005). მიუხედავად იმისა, რომ ტვინის სხვადასხვა რეგიონში აო-ის მიერ გამოწვეული შედეგები განსხვავებულია, თალამუსში მისი ძირითადი როლი ამაღზნებელი ფუნქციით შემოიფარგლება. თალამუსში აო-ის უჯრედგარე დონე მატულობს ღვიძილისა და პა ძილის დროს და მნიშვნელოვნად მცირდება წელი ძილის განმავლობაში (Burlet, 1997).

როგორც ცნობილია, ტვინის ღეროს აღმავალი სისტემა გადამწყვეტ როლს თამაშობს ძილ-ღვიძილის ციკლში (Moruzzi and Magoun, 1949, Jouvet 1962). ამ სისტემის აქტივაციას მოჰყვება თვ ნეირონების დეპოლარიაცია. სეროტონინი, ადრენალინი, აცეტილქოლინი და აო განაპირობებს თვ უჯრედებში ჰცნ არხების

პოტენციალ-დამოკიდებულების ცვლილებას (McCormic and Pape, 1990). სეროტონინი და ადრენალინი იწვევს უჯრედშიდა ც-ამფ-ის დონის მომატებას, მაშინ როდესაც, აცეტილქოლინი ზრდის ც-გმფ-ის კონცენტრაციას. ყოველივე ეს კი აადვილებს ჰა დენის აქტივობას. ჰა დენის პოტენციალის დეპოლარიზაცია ზრდის უჯრედული ოსცილაციების სიხშირეს. *in vivo* მონაცემების თანახმად, აო კო-ლოკალიზებულია რეტისულური ფორმაციის ქოლინერგულ ნეირონებთან და მასთან ერთად მონაწილეობს ღვიძილისა და ჰა ძილის გამოწვევაში (Williams, Steven R. Vincent, and Peter B. Reiner, 1997). მუსკარინული რეცეპტორების ანტაგონისტი Scopolamine მთლიანად ვერ ახშობს ტვინის ღეროს სტიმულაციით გამოწვეულ თვ ნეირონების აქტივაციას, მაშინ როდესაც სტიმულაციის ეფექტი მთლიანად ბათილდება აო და აცეტილქოლინის ინჰიბიტორის თანადროული გამოყენებისას (Sillito, 1983). ყოველივე ეს მიუთითებს აო-ის მნიშვნელოვან როლზე თვ ნეირონების დეპოლარიზაციის გამოწვევაში. თალამუსისა და ქერქისაკენ მიმავალი აღმავალი ქოლინერგული და გლუტამატერგული ნეირონები აქტიურია როგორც ღვიძილის, ასევე ჰა ძილის დროს. ტვინის ღეროს აღმავალი სისტემის ცვლილებას მოჰყვება ძილ-ღვიძილის ციკლისა და ერაუზალის ცვლილება. აო-გვ²⁺-ცხოველებში აო-ის გამოყოფა მიმდინარეობს შეუფერხებლად, მაგრამ გვ²⁺ რეცეპტორის უკმარისობა ამცირებს უჯრედში ბაზალური ც-გმფ-ის დონეს და ცვლის ჰგნ არხების გახსნის კინეტიკას. ჰა დენის პოტენციალ-დამოკიდებულებაში ცვლილებას მოჰყვება თვ ნეირონების აღზნებადობის ცვლილება და ეს ყოველივე იწვევს ქერქის მიმართულებით ინფორმაციის გადაცემის შეფერხებას, რასაც შესაძლოა მოჰყვეს ეგ სინქრონიზაცია.

ჰა ძილის დროს აო-გვ²⁺-ცხოველებში დელტა ოსცილაციებთან ერთად მნიშვნელოვნად იმატა თეტა აქტივობამ. თეტა ოსცილაციები (5-8ჰც) ჰიპოკამპური ფორმაციის მახასიათებელია. თავგებს, რომელთა წინა ტვინში მოახდინეს ჰგნ1 არხების წაშლა, აღენიშნათ თეტა ტალღებში ცვლილებები (Nolan et al., 2004), მაშინ, როდესაც დაბალ და მაღალსიხშიროვანი ოსცილაციები უცვლელი დარჩა. ამ ცხოველებში მნიშვნელოვნად იმატა თეტა რიტმებმა ბორბალზე სირბილის ტესტისა და ჰა ძილის დროს (Nolan et al., 2004). ამავე დროს, Mergia-ს (Neitz et al., 2011) ჯგუფის მიერ ნანახი იქნა, რომ აო-გვ²⁺-თავგების ჰიპოკამპში მნიშვნელოვნად

მცირდება ჰა დენის სიმჭიდროვე, რაც თანხმობაში მოდის ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებთან.

მაგრამ რა მექანიზმი უდევს ამ პროცესს საფუძვლად, უცნობია. როგორც ჩანს ჰენ1 არხები არ არის აუცილებელი ჰიპოკამპური თეტა რიტმების წარმოქმნაზე (Nolan et al., 2004), ამ მექანიზმში მონაწილე მეორე კანდიდატი შესაძლოა იყოს სეპტუმი, რომელიც გადამწყვეტ როლს თამაშობს თეტა ტალღების გენერაციაში და ამყარებს მჭიდრო კავშირს ჰიპოკამპთან. მაგრამ ტვინის ამ რეგიონში ჰა დენის შეკავებას პირიქით ჰიპოკამპური თეტა აქტივობის სიმძლავრის შემცირება მოჰყვა. კიდევ ერთი მიზეზი შეიძლება იყოს ჰიპოკამპური სინაფსური გადაცემების ფუნქციის დარღვევა. *აო-გვ2^{-/-}* თაგვების ჰიპოკამპში ნანახი იქნა NMDA რეცეპტორ-დამოკიდებული დენის ამპლიტუდის შემცირება, რაც თავის მხრივ იწვევს ხანგრძლივ პოტენციალში ცვლილებებს. ვინაიდან, ჰენ1 არხები მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დენდრიტულ ინტეგრაციაში, შესაძლოა მათი ფუნქციის დარღვევას მოჰყვეს გაძლიერებული პოსტსინაფსური პასუხი და ამან გამოიწვიოს თეტა ოსცილაციების ზომის გაზრდა.

დელტა და თეტა აქტივობის გაზრდის პარალელურად *აო-გვ2^{-/-}* ცხოველებს აღენიშნებათ შემცირებული ალფა აქტივობა თითისტარების განმუხტვის დიაპაზონში. ერთ-ერთი კვლევის თანახმად, ZD7288, რომელიც იწვევს ჰა დენის შემცირებას, ამცირებს უჯრედის განმუხტვის სიხშირეს და ზრდის განმუხტვების ხანგრძლივობას (Brian and Huguenard, 2001). ერთ-ერთი ჰიპოთეზის თანახმად, ჰა დენი უნდა მონაწილეობდეს თითისტარების დამთავრების პროცესში (Bal & McCormick, 1996). ჰა დენის მუდმივ აქტივაციას მოჰყვება რებაუნდ კალციუმის აფეთქებით გამოწვეული უჯრედშიდა კალციუმის იონების დონის გაზრდა, რაც თავის მხრივ იწვევს კალციუმ დამოკიდებული ადენიდილ ციკლაზას იზოფორმის აქტივაციას და ც-ამფ-ის მომატებას (Lüthi & McCormick, 1999). ყოველივე ამას მოჰყვება ჰა დენის მეშვეობით ნატრიუმის იონების უჯრედში შესვლის გაადვილება და ჰა დენის ასეთი გახანგრძლივებული აქტივაცია განაპრობებს თითისტარა ტალღების შეჩერებას. ნორადრენალინი და სეროტონინი ზრდის უჯრედშიდა ც-ამფ-ის დონეს, იწვევს ჰა დენის upregulation (D. A. McCormick & Bal, 1997) და შესაბამისად, თითისტარა ტალღების გაუჩინარებას. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად, *აო-გვ2^{-/-}* თაგვებში მცირდება 8-12ჰც სიხშირის სიმძლავრე ქცევის ყველა

მდგომარეობის დროს, რაც თითისტარა ოსცილაციების განმუხტვის სიხშირეს შეესაბამება. მოცემულ ნაშრომში ვერ მოხერხდა ამ ოსცილაციების მახასიათებლების შესწავლა. შესაძლოა ჰცნ არხების ფუნქციის დარღვევამ გამოიწვიოს თითისტარების ფორმის ცვლილება.

აღ-ის დროს ეგ-ზე დელტა ტალღების სიმძლავრის მომატება პათოლოგიურ მდგომარეობად არის მიჩნეული. ცნობილია, რომ ქერქული დელტა აქტივობა მატულობს თალამუსის, ჰიპოთალამუსისა და შუა ტვინის ტეგმენტუმის დაზიანების შედეგად (Gloor et al, 1977). მრავალი developmental დაავადება ასოცირებულია დელტა და თეტა აქტივობის გაზრდასთან. ამის ერთ-ერთი მაგალითია ბავშვებში ჰიპერაქტიული დაავადება (ADHD) და დაუნის სინდრომი. გაზრდილი დელტა აქტივობა აღინიშნება ასევე შემდეგი დაავადებების დროს: შიზოფრენია, დეპრესია, პარკისონისა და ალცეიმერის დაავადებები. მიღებული შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სასიგნალო გზა გადამწყვეტ როლს თამაშობს თალამორტიკალურ სისტემაში და ამ გზის ფუნქციის მოშლა განაპირობებს თალამორტიკალურ დისრითმიას.

დასკვნები

- ✓ ჩვენს მიერ მიღებული შედეგების თანახმად, თვ ნეირონებში გც2 მოთავსებულია პოსტსინაფსურ მემბრანაში;
- ✓ გც2-ის გენეტიკურ აბლაციას მოჰყვება თალამური ჰცნ არხების გახსნის კინეტიკის შენელება, ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალ-დამოკიდებულების ცვლილება და აქტივაციის მრუდის გადანაცვლება ჰიპერპოლარიზებული პოტენციალის მიმართულებით;
- ✓ ც-გმფ-ის უჯრედშიდა დონის ხელოვნურ გაზრდას თან ახლავს ჰა დენის აქტივაციის გაადვილება;
- ✓ ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალის დეპოლარიზაციას აქვს ასევე ადგილი ც-ამფ-ის უჯრედშიდა შეყვანის დროსაც;
- ✓ საპირისპირო შედეგი მიიღწევა ადენოზინ და გუანოზინ ციკლაზების ინჰიბიციის შედეგად. ამ შემთხვევაში ჰა დენის აქტივაციის პოტენციალი ინაცვლებს ჰიპერპოლარიზებული მიმართულებით;
- ✓ აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სასიგნალო გზის დარღვევა ცვლის თვ უჯრედების აქტიურ და პასიურ მახასიათებლებს. აო-გც2^{+/}-ცხოველებში მნიშვნელოვნად მცირდება მემბრანული პოტენციალი და მაჰიპერპოლარიზებული დენის შეყვანით გამოწვეული პოტენციალის ჩაზნექვის ამპლიტუდა. ამავე დროს ამ თავგებში აღინიშნება მოქმედების პოტენციალების რაოდენობის შემცირებაც;
- ✓ ც-გმფ-ის უჯრედშიდა შეყვანას მოჰყვება საკონტროლო ცხოველებში მოქმედების პოტენციალის ზღურბლის შემცირება და ტონური სპაიკების რაოდენობის გაზრდა;
- ✓ აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სისტემის ცვლილება გავლენას ახდენს ადგილობრივი ველის პოტენციალზე *in vitro*. ამ ცხოველებში სტატისტიკურად სარწმუნოდ მცირდება რბ-ის სტიმულაციით აღმოცენებული რებაუნდ აფეთქებების რაოდენობა;
- ✓ აო/გც2/ც-გმფ/ჰცნ სასიგნალო გზის დარღვევას მოჰყვება ევ სურათის ცვლილება ქცევის ყველა მდგომარეობის დროს, რაც იმას ნიშნავს რომ ჰცნ არხები შესაძლოა მონაწილეობდეს ძილის ჰომეოსტაზის რეგულაციაში.

Summary of the dissertation

The thalamocortical system plays a key role in regulation of many physiological and pathophysiological processes, including sleep-wakefulness cycle, sensory processing and absence epilepsy. The oscillatory activity is a major feature of the thalamocortical system (Bal, T. & McCormick, 1996). There are two different types of mechanisms mediating the rhythms generated in this system: the intrinsic mechanisms based on the interplay between specific intrinsic currents and the extrinsic or network mechanisms, which require the interaction of excitatory and inhibitory neurons within the neuronal population. The intrinsic properties of thalamic neurons allow them to function in two different modes, mainly related two behavioral states: a tonic discharge pattern during both EEG activated states (wakefulness and REM sleep), accompanied by enhanced and accurate synaptic transmission of incoming information from the outside world during the adaptive waking state; and a burst mode associated with depressed transfer function during EEG-synchronized sleep (Steriade et al., 1997).

The intrinsic properties of TC neurons are mediated mainly by a transient Ca^{2+} current (I_T) de-inactivated by hyperpolarization and underlying low-threshold-spikes (LTS) crowned by bursts of action potentials, hyperpolarization-activated inward current (I_h) and a persistent Na^+ current. These intrinsic properties are important for the generation and synchronization of thalamic oscillations (Linas and Jahnsen, 1982).

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) represent the molecular substrates of I_h . HCN2 and HCN4 are the major isoforms in thalamic cells. The current is characterized by slow activation kinetics and cyclic nucleotides facilitate its activity by shifting the voltage dependence of activation to more positive potentials. In the presence of the cyclic nucleotides the opening of the channels is faster and more complete. cAMP is a well-studied modulator of I_h current in the nervous and cardiovascular system (Tokimasa, Sugiyama, Akasu, & Muteki, 1990). For comparison rather little is known about the effects of the closely related messenger cGMP. The neuromodulator nitric oxide (NO) increases intracellular cGMP concentrations via the activation of soluble forms of guanylyl cyclases (sGC). sGC occurs in two different isoforms: GC1 and GC2. The two isoforms do not

differ with respect to catalytic activity (Mullershausen et al., 2001). In the central nervous system (CNS) GC1 is completely cytosolic and presynaptically located. The C-terminal peptide of the GC2 isoform has a PDZ domain which interacts with PSD-95 and determines the postsynaptic location of GC2 (Mullershausen et al., 2001). Since the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) of the thalamus receives abundant sources of nitric oxide synthesis (nNOS) (Bertini & Bentivoglio, 1997), we hypothesized that thalamic HCN channels could be also modulated by basal cGMP production. We proposed that in the thalamus changes in basal levels of cGMP could affect the voltage dependency and opening kinetics of HCN channels and may thereby change oscillatory activity in the thalamocortical system. To test this hypothesis, we combined *in vitro* voltage and current clamp methods, and *in vitro* and *in vivo* network oscillatory activity recordings. *NO-GC2^{-/-}* mice (Mergia et al., 2006) were used as an experimental animals and control experiments were done on C57BL/6J WT mice.

During the study we addressed the following questions:

1. What is the exact a role of cGMP in regulation of thalamic HCN channels?
2. How do the changes in basal level of cGMP affect the electrical properties of thalamic neurons?
3. How do the changes in single cell activity influence oscillatory activity in the thalamocortical system?

Results:

1. Our results showed that thalamic HCN channels are highly regulated by cGMP. Deletion of NO-GC2 changed the voltage dependency of I_h and shifted the activation curve to more hyperpolarized potentials. While intracellular administration of cGMP had opposite effect. Compared to WT mice, *NO-GC2^{-/-}* mice exhibited increased sensitivity with all tested concentrations of cGMP. In control animals application of ODQ shifted the activation curve of I_h to more negative potentials. Increased sensitivity was also observed in response to intracellular cAMP administration in *NO-GC2^{-/-}* mice. Extracellular

administration of SQ caused the smaller changes in voltage dependency of I_h in NO-GC2^{-/-} mice, compared to WT mice.

2. Under current clamp conditions knockout mice showed more hyperpolarized resting membrane potentials, compared to control animals. Sag amplitude was larger in WT neurons and occurrence of rebound burst in NO-GC2^{-/-} mice was almost three times less (38%), compared to WT, thereby indicating that decreased levels of intracellular cGMP alter intrinsic properties of TC neurons. Moreover, the number of action potentials (AP) induced by depolarizing current injection was decreased in NO-GC2^{-/-} mice while the intracellular infusion of cGMP increased the firing rate in WT. Passive membrane properties, such as membrane input resistance (R_{in}), membrane time constant (τ) and cell capacitance (C_s) were not significantly different between control and experimental animals.

3. *In vitro* local field potential recordings revealed significantly decreased regular burst activity and reduced number of AP within the bursts in NO-GC2^{-/-} mice compared to WT. According to our results, the NO/GC2/cGMP/HCN signaling pathway is crucial for both the frequency and robustness of network responses *in vivo*. The EEG of NO-GC2^{-/-} mice was strongly changed during active wakefulness (AW) and rapid eye movement (REM) sleep, while light slow-wave sleep (LSWS) and deep slow-wave sleep (DSWS) were not statistically different between two mouse lines. During AW experimental animals exhibited EEG and behavioral desynchronization. During AW and REM sleep the EEG of NO-GC2^{-/-} mice was shifted to more slow oscillations.

ბიბლიოგრაფია

- Altomare, C., Terragni, B., Brioschi, C., Milanesi, R., Pagliuca, C., Viscomi, C., ...
Difrancesco, D. (2003). Heteromeric HCN1 – HCN4 channels : a comparison with
native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node, 347–359.
<http://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.027698>
- Arrigoni, E., Chamberlin, N. L., & Saper, C. B. (2006). ADENOSINE INHIBITS BASAL
FOREBRAIN CHOLINERGIC AND NONCHOLINERGIC NEURONS IN VITRO, 140,
403–413. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.010>
- Bal, T., & McCormick, D. A. (1996). What Stops Synchronized Thalamocortical
Oscillations ?, 17, 297–308.
- Baruscotti, M., Bucchi, A., & T, D. D. (2005). Physiology and pharmacology of the cardiac
pacemaker (b funny Q) current, 107, 59–79.
<http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.01.005>
- Bayliss, A., Viana, F., Bellingham, M. C., & Berger, A. J. (1994). Characteristics and Postnatal
Development of a Hyperpolarization- Activated Inward Current in Rat Hypoglossal
Motoneurons In Vitro, 71(1).
- Beaumont, V., & Zucker, R. S. (2000). Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP
modulation of presynaptic I h channels, 133–141.
- Bender, A. T., & Beavo, J. A. (2006). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases : Molecular
Regulation to Clinical Use, 58(3), 488–520. <http://doi.org/10.1124/pr.58.3.5.488>
- Bertini, G., & Bentivoglio, M. (1997). Nitric Oxide Synthase in the Adult and Developing
Thalamus : Histochemical and Immunohistochemical Study in the Rat MATERIALS
AND METHODS, 105(February), 89–105.
- Beste, K. Y., Stasch, J., Kaefer, V., & Seifert, R. (2011). Evidence for two catalytic centers and
Mn 2 + as physiological cofactor of soluble guanylyl cyclase. *BMC Pharmacology*,
11(Suppl 1), P7. <http://doi.org/10.1186/1471-2210-11-S1-P7>
- Biel, M., Wahl-schott, C., Michalakakis, S., & Zong, X. (2009). Hyperpolarization-Activated
Cation Channels : From Genes to Function, 847–885.
<http://doi.org/10.1152/physrev.00029.2008>

- Budde, T., Mager, R., & Pape, H. (1992). Different Types of Potassium Outward Current in Relay Neurons Acutely Isolated from the Rat Lateral Geniculate Nucleus, *4*(April), 708–722.
- Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. H. W., & Valtschanoff, J. G. (2002). Synaptic Localization of Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylyl Cyclase in the Hippocampus, *22*(20), 8961–8970.
- Burlet, S., Leger, L., & Cespuglio, R. (1999). NITRIC OXIDE AND SLEEP IN THE RAT : A PUZZLING RELATIONSHIP, *92*(2), 627–639.
- Centonze, D., Pisani, A., Bonsi, P., Giacomini, P., Bernardi, G., Calabresi, P., ... Neuroscienze, D. (2001). Stimulation of Nitric Oxide – cGMP Pathway Excites Striatal Cholinergic Interneurons via Protein Kinase G Activation, *21*(4), 1393–1400.
- Chen, L., Majde, J. A., & Krueger, J. M. (2003). Spontaneous sleep in mice with targeted disruptions of neuronal or inducible nitric oxide synthase genes, *973*, 214–222.
- Cle, P., Sarda, N., Cespuglio, R., Gharib, A., & Inserm, U. (2004). Changes occurring in cortical NO release and brain NO-synthases during a paradoxical sleep deprivation and subsequent recovery in the rat, 848–856. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02529.x>
- Craven, K. B., & Zagotta, W. N. (2006). CNG AND HCN CHANNELS : Two Peas , One Pod, 375–401. <http://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.134728>
- Day, M., Carr, D. B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., & Surmeier, D. J. (2005). Dendritic Excitability of Mouse Frontal Cortex Pyramidal Neurons Is Shaped by the Interaction among HCN , Kir2 , and K leak Channels, *25*(38), 8776–8787. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2650-05.2005>
- Demontis, G. C., Longoni, B., Barcaro, U., Cervetto, L., Psichiatria, D., Biotechnologie, F., ... I- , P. (1999). Properties and functional roles of hyperpolarization-gated currents in guinea-pig retinal rods.
- Difrancesco, D., Mangoni, M., Milano, U., & Generali, B. (1994). (if) by, 473–482.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *399*(June), 601–605.

- Dossi, R. C., Nunez, A., & Steriade, M. (1992). Roberto curro dossi, angel nunez, 215–234.
- Dzoljic, M. R., Vries, R. De, & Leeuwen, R. Van. (1996). Sleep and nitric : oxide : effects of 7-nitro indazole , inhibitor of brain nitric oxide synthase, *718*, 145–150.
- Feil, R., Kemp-harper, B., & Stasch, J. P. (2006). Conference on cGMP Generators , Effectors and Therapeutic Implications, *7*(2), 1–5. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400627>
- Friebe, A., & Koesling, D. (2009). Nitric Oxide The function of NO-sensitive guanylyl cyclase : What we can learn from genetic mouse models. *Nitric Oxide*, *21*(3-4), 149–156. <http://doi.org/10.1016/j.niox.2009.07.004>
- Garthwaite, J., & Garthwaite, J. (2016). Garthwaite J Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission . *Eur J Neurosci* *27* : 2783- Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission, (May), 2783–2802. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x>
- Gerzer, R., Bohme, E., Hofmann, F., & Schultz, G. (1981). Pharmakologisches Insntut der Universitdt Heiddberg, Im Neuenheimer Feld 366, 6900 Heidelberg, FRG, *132*(1), 71–74.
- Guillery, R. W., Feig, S. L., & Lieshout, D. P. V. A. N. (2001). Connections of Higher Order Visual Relays in the Thalamus : A Study of Corticothalamic Pathways in Cats, *85*(February), 66–85.
- Guillery, W. (n.d.) (1966) A Study o f Golgi Preparations from the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus o f the Adult Cat ', 21-49.
- Halliwel, J. V., & Adams, P. R. (1982). Voltage-Clamp Analysis of Muscarinic Excitation in Hippocampal Neurons, *250*, 71–92.
- Hars, B. (1999). Endogenous nitric oxide in the rat pons promotes sleep, 209–219.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bredt, D. S., & Lim, W. A. (1996). Unexpected Modes of PDZ Domain Scaffolding Revealed by Structure of nNOS-Syntrophin Complex, *66071*(1995).
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., & Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion, 1–23. <http://doi.org/10.1152/physrev.00015.2005>.
- Ishii, T. M., Takano, M., & Ohmori, H. (2001). Determinants of activation kinetics in

- mammalian hyperpolarization-activated cation channels, *4*, 93–100.
- Ishii, T. M., Takano, M., Xie, L., Noma, A., & Ohmori, H. (1999). Molecular Characterization of the Hyperpolarization-activated Cation Channel in Rabbit Heart Sinoatrial Node *, *274*(18), 12835–12839.
- Jahnsen, B. Y. H., & Llinas, R. (1984). Electrophysiological properties of guinea-pig thalamic neurones:, 205–226.
- Jones, E. G. (1998). COMMENTARY VIEWPOINT : THE CORE AND MATRIX OF THALAMIC, *85*(2), 331–345.
- Kalinchuk, A. V, Lu, Y., Stenberg, D., & Rosenberg, P. A. (2006). Nitric oxide production in the basal forebrain is required for recovery sleep, (2), 483–498.
<http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04077.x>
- Kostin, A., Mcginty, D., Szymusiak, R., & Alam, M. N. (2012). MECHANISMS MEDIATING EFFECTS OF NITRIC OXIDE ON PERIFORNICAL LATERAL HYPOTHALAMIC NEURONS. *Neuroscience*, *220*, 179–190.
<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.014>
- Kostin, A., Mcginty, D., Szymusiak, R., & Alam, M. N. (2013). SLEEP-WAKE AND DIURNAL MODULATION OF NITRIC OXIDE IN THE PERIFORNICAL-LATERAL HYPOTHALAMIC AREA : REAL-TIME DETECTION IN FREELY BEHAVING RATS. *Neuroscience*, *254*(x), 275–284. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.022>
- Ludwig, A., Budde, T., Stieber, J., Moosmang, S., Wahl, C., Holthoff, K., ... Hofmann, F. (2003). Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2, *22*(2).
- Ludwig, A., Zong, X., Jeglitsch, M., Hofmann, F., & Biel, M. (1998). channels, *393*(June), 587–591.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F., & Biel, M. (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics, *18*(9), 2323–2329.
- Lüthi, A., & McCormick, D. A. (1999). Modulation of a pacemaker current through Ca²⁺-induced stimulation of cAMP production, *2*(7), 1–8.
- Mader, R., Michalakakis, S., Weidinger, M., Pfeifer, A., & Biel, M. (2005). The Murine HCN3

- Gene Encodes a Hyperpolarization-activated Cation Channel with Slow Kinetics and Unique Response to Cyclic Nucleotides *, *280*(29), 27056–27061.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M502696200>
- Magee, J. C., & Cook, E. P. (2000). Somatic EPSP amplitude is independent of synapse location in hippocampal pyramidal neurons, 895–903.
- Mayer, B. Y. M. L., & Westbrook, G. L. (1983). A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory, 19–45.
- Mccormick, B. Y. D. A., & Papet, H. (1990). of Neurophysiologie, Ruhr-Universitaet, Bochum, 291–318.
- Mccormick, B. Y. D. A., & Wang, Z. (1991). THALAMI, 235–255.
- Mccormick, D. A., & Bal, T. (1997). SLEEP AND AROUSAL : Thalamocortical Mechanisms, 185–215.
- Milligan, C. J., Edwards, I. J., & Deuchars, J. (2006). HCN1 ion channel immunoreactivity in spinal cord and medulla oblongata, *81*. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.019>
- Monti, J. M. (2004). Microinjection of the nitric oxide synthase inhibitor L -NAME into the lateral basal forebrain alters the sleep / wake cycle of the rat, *28*, 239–247.
<http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.10.001>
- Monti, J. M., & Monti, D. (2001). Increase of waking and reduction of NREM and REM sleep after nitric oxide synthase inhibition : prevention with GABA A or adenosine A 1 receptor agonists, *123*, 23–35.
- Moosmang, S., Biel, M., Hofmann, F., & Ludwig, A. (1999). Differential Distribution of Four Hyperpolarization-Activated Cation Channels in Mouse Brain, *380*(August), 975–980.
- Mullershausen, F., Russwurm, M., Thompson, W. J., Liu, L., Koesling, D., & Friebe, A. (2001). Rapid nitric oxide – induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme, (2000), 271–278. <http://doi.org/10.1083/jcb.200107001>
- Neitz, A., Mergia, E., Eysel, U. T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2011). Presynaptic nitric oxide/cGMP facilitates glutamate release via hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels in the hippocampus, *33*, 1611–1621.
<http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07654.x>

- Neitz, A., Mergia, E., Imbrosci, B., Petrasch-parwez, E., Eysel, U. T., Koesling, D., & Mittmann, T. (2014). Postsynaptic NO / cGMP Increases NMDA Receptor Currents via Hyperpolarization- Activated Cyclic Nucleotide-Gated Channels in the Hippocampus, (July), 1923–1936. <http://doi.org/10.1093/cercor/bht048>
- Nolan, M. F., Dudman, J. T., Buhl, D. L., Santoro, B., Gibbs, E., Vronskaya, S., ... Morozov, A. (2004). A Behavioral Role for Dendritic Integration : HCN1 Channels Constrain Spatial Memory and Plasticity at Inputs to Distal Dendrites of CA1 Pyramidal Neurons, *119*, 719–732.
- Notomi, T., & Shigemoto, R. (2004). Immunohistochemical Localization of I h Channel Subunits , HCN1 – 4 , in the, *276*(October 2003), 241–276. <http://doi.org/10.1002/cne.11039>
- Of, T., Nitric, T. H. E., Cyclase, O. G., Synaptic, T. O., Russwurm, M., Wittau, N., & Koesling, D. (2001). Guanylyl Cyclase / PSD-95 Interaction, *276*(48), 44647–44652. <http://doi.org/10.1074/jbc.M105587200>
- Ribeiro, A. N. A. C., Gilligan, J. G., Kapa, L., Cristina, A., Gilligan, J. G., Regulatory, P., ... Physiol, R. (2000). Systemic injection of a nitric oxide synthase inhibitor suppresses sleep responses to sleep deprivation in rats, (9), 1048–1056.
- Sherman, S. M. (2002). THE THALAMIC INTERNEURON, 133–144.
- Sherman, S. M., & Guillery, R. W. (2002). The role of the thalamus in the flow of information to the cortex, (November), 1695–1708. <http://doi.org/10.1098/rstb.2002.1161>
- Steinert, J. R., Chernova, T., & Forsythe, I. D. (2010). Nitric Oxide Signaling in Brain Function , Dysfunction , and Dementia. <http://doi.org/10.1177/1073858410366481>
- Steriade, M., & Mulle, C. (1985). Abolition of Spindle Oscillations in Thalamic Neurons Disconnected From Nucleus Reticularis Thalami, *54*(6).
- Stieber, J., Sto, G., Herrmann, S., Hassfurth, B., & Hofmann, F. (2005). Functional Expression of the Human HCN3 Channel * □, *280*(41), 34635–34643. <http://doi.org/10.1074/jbc.M502508200>
- Thakkar, M. M., Winston, S., & Mccarley, R. W. (2003). A 1 Receptor and Adenosinergic Homeostatic Regulation of Sleep-Wakefulness : Effects of Antisense to the A 1 Receptor

- in the Cholinergic Basal Forebrain, *23*(10), 4278–4287.
- Tokimasa, T., Sugiyama, K., Akasu, T., & Muteki, T. (1990). Volatile anaesthetics inhibit a cyclic AMP-dependent sodium-potassium current in cultured sensory neurones of bullfrog, *8*, 190–192.
- Umans, J. G. (1995). NITRIC OXIDE IN THE REGULATION OF BLOOD, *57*, 771-90.
- Williams, J. A., Vincent, S. R., & Reiner, P. B. (1997). Nitric Oxide Production in Rat Thalamus Changes with Behavioral State , Local Depolarization , and Brainstem Stimulation, *17*(1), 420–427.
- Williamson, A. M., Ohara, P. T., Ralston, D. D., Milroy, A. M., & I, H. J. R. (1994). Analysis of Gamma-Aminobutyric Acidergic Synaptic Contacts in the Thalamic Reticular Nucleus of the Monkey, *192*, 182–192.
- Yen, C. T., & Hendry, S. H. C. (1985). The Morphology of Physiologically.
- Yu, X., Duan, K., Shang, C., Yu, H., & Zhou, Z. (2003). Calcium influx through hyperpolarization-activated cation channels (I_h channels) contributes to activity-evoked neuronal secretion.