

VILNIAUS UNIVERSITETAS

ROKAS BUIŠAS

NUGAROS SMEGENŲ MOTONEURONŲ PERDAVIMO FUNKCIJA IR
JOS MODIFIKAVIMAS

Daktaro disertacija
Biomedicinos mokslai, biofizika (02 B)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2008 – 2012 metais Vilniaus universitete

Mokslinis vadovas:

Doc. dr. Aidas Alaburda (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai,
biofizika – 02 B)

TURINYS

SANTRUMPOS	6
1. ĮVADAS.....	7
1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai	10
1.2. Darbo mokslinis naujumas ir praktinė nauda.....	11
1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai	12
2. LITERATŪROS APŽVALGA	13
2.1. Nugaros smegenų neuronų parametrai.....	13
2.1.1. Morfolginiai nugaros smegenų neuronų parametrai.....	14
2.1.2. Elektrofiziologiniai nugaros smegenų neuronų parametrai.....	15
2.1.2.1. Neuronų membranos ramybės potencialas	15
2.1.2.2. Neuronų membranos įėjimo varža, laiko ir ilgio konstantos	15
2.1.2.3. Reobazė ir slenkstinis membranos potencialas.....	17
2.1.2.4. Neuronų veikimo potencialai	18
2.1.2.5. Neuronų pėdsekiniai potencialai ir refrakteriškumas	19
2.1.2.6. Motoneuronų veikimo potencialų dažnio adaptacija	21
2.1.2.7. Srovės – dažnio transformacija motoneuronuose	24
2.1.2.8. Nugaros smegenų neuronų perdavimo funkcija	25
2.1.2.9. Perdavimo funkcijos modifikavimo mechanizmai	28
2.2. Joninės srovės motoneuronų membranoje	30
2.2.1. Na ⁺ srovės	31
2.2.2. K ⁺ srovės.....	32
2.2.3. M tipo joninė srovė	33
2.2.4. Ca ²⁺ srovės.....	34
2.3. Nuolatinės įtekančios joninės srovės motoneuronuose.....	36
2.3.1. L tipo Ca ²⁺ srovės	37
2.3.2. Nuolatinė Na ⁺ srovė.....	38
2.3.3. Plato potencialai.....	39
2.4. Motoneurono savybių moduliacija.....	40
3. METODIKA	44

3.1. Tyrimo objektas.....	44
3.2. Nugaros smegenų preparavimas ir pjūvių paruošimas	44
3.3. Elektrinių potencialų registracija	45
3.4. Dinaminis srovės fiksavimo metodas.....	47
3.5. Perdavimo funkcijos vertinimo metodika	48
3.6. Motoneurono membranos jėjimo laidumo ir slenkstinio potencialo matavimai	50
3.7. Eksperimentų protokolas.....	51
3.8. Naudotos medžiagos ir tirpalai.....	52
3.9. Naudotos kompiuterinės programos ir statistiniai metodai.....	53
4. REZULTATAI.....	54
4.1. Motoneuronų perdavimo funkcijos priklausomybė nuo srovės stimulo tipo ir veikimo potencialų dažnio adaptacijos.....	54
4.1.1. Reobazės ir veikimo potencialų slenksčio priklausomybė nuo srovės stimulo tipo	54
4.1.2. Perdavimo funkcijos priklausomybės nuo veikimo potencialų dažnio adaptacijos tyrimas taikant stačiakampius srovės stimulus	55
4.1.3. Perdavimo funkcijos tyrimas taikant trikampus srovės stimulus	59
4.1.4. Trikampio srovės stimulo kilimo greičio įtaka perdavimo funkcijos statumui.....	61
4.2. Membranos laidumo padidėjimo įtaka perdavimo funkcijos vertei.....	65
4.3. Nuolatinės Na ⁺ srovės įtaka perdavimo funkcijos vertei	69
4.3.1. Stacionarios nuolatinės Na ⁺ srovės voltamperinės charakteristikos	70
4.3.2. Nuolatinės Na ⁺ srovės reikšmė nugaros smegenų motoneuronų sužadinamumui	73
5. REZULTATŲ APTARIMAS.....	75
5.1. Srovės stimulo formos įtaka motoneuronų perdavimo funkcijos vertinimui	75
5.2. Trikampių srovės stimulų kilimo greičio ir adaptacijos įtaka motoneuronų perdavimo funkcijos vertinimui	76

5.3. Padidėjusio membranos laidumo įtaka motoneuronų sužadynamumui ir perdavimo funkcijai.....	78
5.4. Nuolatinės Na ⁺ srovės įtaka motoneuronų sužadynamumui ir perdavimo funkcijai.....	79
6. IŠVADOS	81
7. LITERATŪROS SĄRAŠAS	82
8. PUBLIKACIJOS	97
9. PADĖKA	99
10. GYVENIMO APRAŠYMAS.....	100

SANTRUMPOS

5-HT - serotoninas

ACh - acetilcholinas

AMPA - amino-3-hidroksi-5-metilisoksazolepropioninė rūgštis

f-I - veikimo potencialų dažnio ir srovės priklausomybė (perdavimo funkcija)

GABA - gama amino sviesto rūgštis

GABA_A - gama amino sviesto rūgšties jonotropinis receptorius

IN - interneuronai

I_{NaP} - įtekanti nuolatinė Na⁺ jonų srovė

I_{NaT} - įtekanti trumpalaikė Na⁺ Na jonų srovė

I-V - voltamperinė neurono charakteristika

mAChR - muskarininis (metabotropinis) acetilcholino receptorius

mGluR - metabotropinis glutamato receptorius

MN - motoneuronai

nAChR - nikotininis (jonotropinis) acetilcholino receptorius

NMDA - N-metil-D-aspartatas

PIC – nuolatinė įtekanti joninė srovė

r_{in} - membranos įėjimo varža

RP - ramybės potencialas

TEA - tetraetilamonis

TTX - tetradotoksinas

VP - veikimo potencialas

1. ĮVADAS

Nugaros smegenų neuroninis tinklas valdo gyvūnų galūnių raumenis. Motoneuronai (MN) – tai nugaros smegenų neuronai, kurie tiesiogiai aktyvuoja raumenis. Kaip ir kituose neuronuose, MN įėjimo transformacija į išėjimą charakterizuojama perdavimo funkcija. MN perdavimo funkcija parodo, kaip neurono sinapsinis įėjimas yra konvertuojamas į MN išėjimo signalą - tam tikro dažnio veikimo potencialų (VP) sekas ir šių MN valdomų raumenų susitraukimus. Didelis perdavimo funkcijos statusas leidžia išvystyti didelę raumens susitraukimo jėgą, o mažas – įgalina tikslų raumenų valdymą.

Motorinių vienetų aktyvumo tipai (veikimo potencialų generavimo tipai) yra skirtingi esant greitiems ir lėtiems raumenų susitraukimams. Toninis žemo dažnio VP sekų generavimas stebimas esant lėtiems valingiems raumenų susitraukimams. Fazinis didelio dažnio VP sekų generavimas būdingas greitiems raumenų susitraukimams (Desmedt ir Godaux, 1977a,b; Duchateau ir Enoka, 2011). Remiantis ankstyvaisiais motorinių vienetų ir jų atsakų tyrimais, motoriniai vienetai buvo skirstomi į fazinius ir toninius (Granit et al., 1956, 1957; Tokizane ir Shimazu, 1964). Šie procesai susiję su VP adaptacija MN (Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995, 1997). Esant membranos potencialo depoliarizacijai MN vyksta VP dažnio adaptacija, kuomet pradinis didelio dažnio VP generavimas lėtėja eksponentiškai iki žemesnio, bet pastovaus VP dažnio (Granit et al., 1963a; Kernell ir Monster, 1982; Kernell, 1965; Sawczuk et al., 1995, 1997). VP adaptacija įtakoja ne tik VP dažnį, bet ir MN perdavimo funkciją (Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995). Iš literatūros žinoma, kad dėl VP adaptacijos mažėja MN perdavimo funkcijos vertė žiurkės (Granit et al., 1963a; Sawczuk et al., 1995), katės (apžvelgta Kernell, 2006) bei vėžlio nugaros smegenų MN (Hounsgaard et al., 1988b). MN perdavimo funkciją savo tyrime mes suskirstėme į tris tipus: pradinę, ankstyvąją ir stacionarią.

Taigi MN perdavimo funkcija nėra pastovus parametras ir gali būti įtakojamas įvairių fiziologinių procesų. Elektrinių signalų apdorojimas MN yra

įtakojamas ne tik VP adaptacijos (Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995), bet ir kitų netiesinių fiziologinių veiksnių: pėdsekinės depoliarizacijos, nuolatinų įtekančių joninių srovių, neuroninio tinklo aktyvumo. Joninių membranų laidumų pokyčiai sąlygoja pėdsekinę hiperpoliarizaciją (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965; Vervaeke et al., 2006; Vogalis et al., 2003). Sinapsinio signalo apdorojimą įtakoja nuolatinės įtekančios joninės srovės (Heckman et al., 2008; apžvelgta Rekling et al., 2000; Schwindt, 1973). MN veiklą gali įtakoti nugaros smegenų neuroninio tinklo aktyvumo lygis. Jis sąlygoja metabotropinių MN membranų receptorių, kurie selektyvūs neuromediatoriams: glutamatui (Svirskis ir Hounsgaard, 1998), serotoninui (5-HT) (Heckman et al., 2003; Hounsgaard et al., 1988a; Hultborn et al., 2004; Perrier ir Hounsgaard, 2003; Perrier et al., 2003; Perrier ir Cotel, 2008), acetilcholinui (Sharp et al., 1993) (Alaburda et al., 2002a; Miles et al., 2007) ar dopaminui (Clemens ir Hochman, 2004) aktyvavimą. Taip neuroninio tinklo aktyvumas gali įtakoti MN perdavimo funkcijos vertę pritaikant organizmo poreikiams (Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Hounsgaard ir Mintz, 1988; Hultborn et al., 2004; Kernell, 1965; Lee ir Heckman, 2001; Powers ir Binder, 2001).

Eksperimentiškai MN perdavimo funkcijos vertė nustatoma tiriant MN veikimo potencialų dažnio priklausomybę nuo įleidžiamos į ląstelę srovės dydžio. Šią priklausomybę atspindi kreivė (tiesė), kuri apibūdinama tam tikru statumu (polinkio kampu) (Kernell, 1965; Granit et al., 1963a). MN elektrinė stimuliacija gali būti vykdoma stačiakampiais (Granit et al., 1963a; Ito ir Oshima, 1965) arba tam tikro srovės kilimo greičio trikampaiais (Bennett et al., 2001b; Button et al., 2006; Lee ir Heckman, 1998; Hounsgaard et al., 1984, 1988a) srovės stimulais.

Perdavimo funkcijos vertinimui naudojant stačiakampius impulsus tą patį neuroną reikia stimuliuoti kelių ar keliolikos skirtingų amplitudžių srovės stimulų. Trikampio stimulo atveju MN aktyvuojami skirtingos amplitudės stimulais. Tačiau trikampio stimulo atveju veikimo potencialų dažnio adaptacijos įtaka prie skirtingų srovių veikimo potencialų dažniams gali būti

skirtinga. Nėra žinoma ar skiriasi to paties neurono perdavimo funkcijos įvertintos skirtingais metodais

Didelė judesių įvairovė nulemia, kad specifinės MN fiziologinės savybės bei įvairūs fiziologiniai procesai gali skirtingai įtakoti skirtingus perdavimo funkcijų tipus. Veikiant neuroniniam tinklui MN aktyvuojama labai daug sinapsinių įėjimų, dėl ko padidėja MN membranos laidumas (Alaburda et al., 2005; Berg et al., 2007). Nėra žinoma, ar šis veiksnys įtakoja MN perdavimo funkcijos vertę.

MN aktyvumui svarbios yra ir nuolatinės įtekančios joninės srovės. Viena tokių srovių yra nuolatinė įtekanti Na^+ srovė. Problema, kad šios srovės poveikis skirtingų gyvūnų MN nėra vienareikšmis. Pavyzdžiui, nuolatinė Na^+ srovė ne tik didina MN sužadynamumo lygį (Kuo et al., 2006; Lee ir Heckman, 2001; Li ir Bennett, 2003) ir sustiprina sinapsinius MN įėjimus (Manuel et al., 2007), bet tai pat gali sumažinti pradinę MN perdavimo funkcijos vertę, kai tuo pat metu stacionariai MN perdavimo funkcijos vertei tai neturi įtakos. Detalesni tyrimai reikalingi tam, kad tiksliai įvertinti neuronų perdavimo funkcijų modifikavimo mechanizmus ir jų funkcijas.

1.1. Darbo tikslas ir uždaviniai

Disertacijos darbo tikslas: įvertinti vėžlio nugaros smegenų motoneuronų perdavimo funkcijos ypatybes bei iširti jos galimą modifikavimą.

Šiuo tikslu buvo iškelti tokie uždaviniai:

1. Įvertinti ir palyginti nugaros smegenų motoneuronų perdavimo funkcijos ypatybes naudojant trikampus ir stačiakampius srovės stimulus;
2. Iširti trikampo srovės stimulo kilimo greičio įtaką motoneuronų perdavimo funkcijos vertei;
3. Nustatyti kaip padidėjęs membranos laidumas įtakoja motoneuronų perdavimo funkciją;
4. Iširti nuolatinės Na^+ srovės įtaką motoneuronų perdavimo funkcijai.

1.2. Darbo mokslinis naujumas ir praktinė nauda

Mokslinis naujumas:

Pirmą kartą:

- palygintos vėžlio nugaros smegenų motoneuronų perdavimo funkcijos įvertintos taikant stačiakampių ir trikampių srovės stimulų elektrinį neuronų sužadimą;
- eksperimentiškai įvertinta padidėjusio vėžlio nugaros smegenų motoneurono membranos laidumo įtaka perdavimo funkcijai;
- eksperimentiškai parodyta nuolatinės Na^+ srovės įtaka vėžlio nugaros smegenų motoneuronų perdavimo funkcijai.

Praktinė nauda:

Remiantis gautais rezultatais pasiūlyta, kad išsamiems neuronų perdavimo funkcijų tyrimams turėtų būti taikomi stačiakampiai srovės stimulai, nes jie leidžia nustatyti ne tik stacionarią, bet ir pradines bei ankstyvasias perdavimo funkcijų vertes.

1.3. Ginamieji disertacijos teiginiai

1. Motoneuronų perdavimo funkcijos vertės, stimuliuojant ląsteles trikampaiais srovės stimulais, sutampa su stacionaria perdavimo funkcijos verte gauta stimuliuojant neuronus stačiakampiais srovės stimulais;
2. Stačiakampiais, bet ne trikampaiais srovės stimulais galima vertinti pradinę ir ankstyvąją motoneurono perdavimo funkcijų vertes;
3. Membranos laidumo padidėjimas nekeičia motoneurono perdavimo funkcijos statumo;
4. Nuolatinė Na^+ srovė padidina motoneuronų sužadynamumą, mažina pradinę ir ankstyvąją perdavimo funkcijų vertes, tačiau neįtakoja stacionarios perdavimo funkcijos.

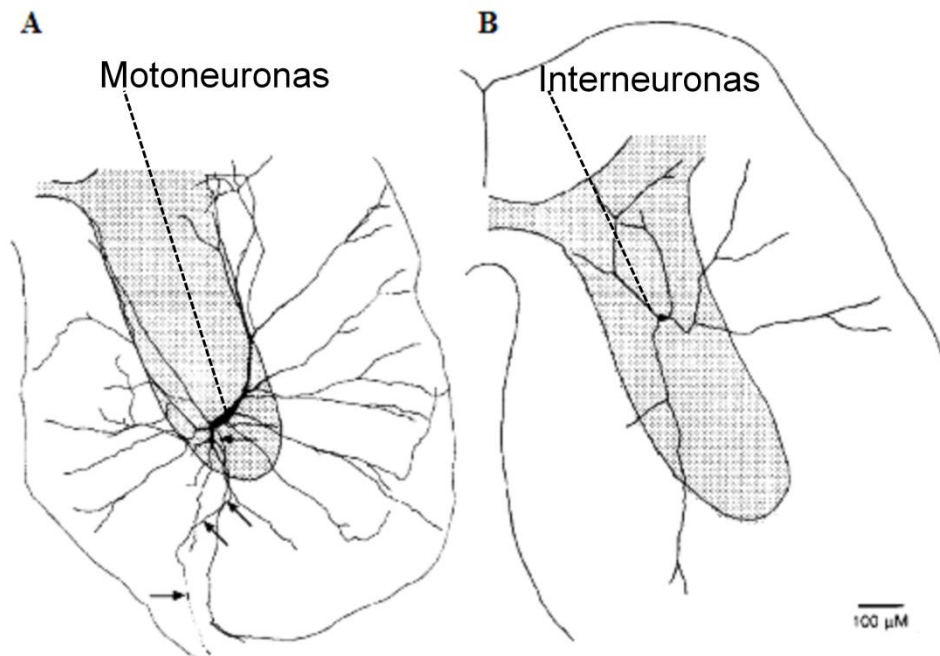
2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. Nugaros smegenų neuronų parametrai

Nugaros smegenų MN buvo vieni pirmųjų CNS tirtų neuronų naudojant viduląstelinę potencialų registravimo metodiką (Brock et al., 1952; Eccles, 1957). Šiuo metu tiriami žiurkių (Harvey et al., 2006a,c; Li ir Bennett, 2003; Li et al., 2004; Moritz et al., 2007; Powers ir Binder, 2003), pelių (Carlin et al., 2000; Jiang ir Heckman, 2006; Kuo et al., 2005, 2006), kačių (Enriquez et al., 2012; Jones ir Lee, 2006; Manuel et al., 2007), vėžlių (Alaburda et al., 2002a, b, 2005, 2010; Alaburda ir Hounsgaard, 2003; Berg ir Hounsgaard, 2009; Hornby et al., 2002a,b; Simon et al., 2003; Guzulaitis et al., 2012) bei žmonių motoneuronai (Collins et al., 2001; Gorassini et al., 2004). Nugaros smegenų motoneuronai yra didelės nervinės ląstelės, turinčios didelius kūnus, tankų dendritinį medį ir ilgus aksonus (Hounsgaard et al., 1988b; McDonagh et al., 1998, 1999). Nugaros smegenų motoneuronų aiški ir funkcinė paskirtis – tiesioginis griaučių raumenų valdymas. Jie gauna informaciją iš daugelio CNS neuronų (konvergencija) ir per nervo – raumens sinapses valdo raumenines skaidulas, suformuodami motorinius vienetus. Motoneuronuose gradualūs sinapsiniai potencialai, susidarantys sinapsiniuose kontaktuose, sąlygoja tam tikro dažnio veikimo potencialų sekas. Šių sekų dažnis, VP generavimo tipas, trukmė apsprendžia specifinį raumenų valdymo modelį, kuris realizuojamas lokaliame neuroniniame tinkle nugaros smegenyse. Šio tinklo, kurio sudėtinė dalis yra atskiri MN, veikla sąlygoja koordinuotą ir dinamišką kūno judesių valdymą.

2.1.1. Morfolginiai nugaros smegenų neuronų parametrai

Vėžlio nugaros smegenų ventraliniuose raguose dominuoja dviejų tipų neuronai: motoneuronai (MN) (Pav. 2.1.A) ir interneuronai (IN) (Pav. 2.1.B). Vėžlio nugaros smegenų MN ir IN pagrindiniai morfolginiai parametrai: neurono kūno (somos) diametras (20-54 μm), somos paviršiaus bendras plotas (299-2045 μm^2), somos bendras tūris (2,3-45 μm^3), bendras dendritų ilgis (1,5-16*10³ μm) (McDonagh et al., 1999). Lyginat šias dvi neuronų grupes galima paminėti, kad MN turi kelis kartus didesnę dendritinę medį nei IN: terminalinių dendritų skaičius MN apie 42±3,4, o IN 13±2,2. Bendras visų dendritų ilgis MN 11±0,8*10³ μm , o IN 4,2±2,2 *10³ μm atitinkamai. MN turi ženkliai didesnę kūną (somą) nei IN: MN somos tūris 20±3,3*10⁴ μm^3 , o IN tik 8±2,0*10⁴ μm^3 , bendras somos paviršiaus plotas kelis kart didesnis MN nei IN: MN 1234±140 μm^2 , IN 644±106 μm^2 , somos diametras MN 42±2,8 μm , IN 30±2,3 μm (McDonagh et al., 1999).



Pav. 2.1. Vėžlio nugaros smegenų ventralinių ragų pjūviai. Matomi: motoneuronas (A) ir interneuronas (B); rodyklės (A) rodo motoneurono aksonus (adaptuota iš McDonagh et al., 1999).

2.1.2. Elektrofiziologiniai nugaros smegenų neuronų parametrai

Pagrindiniai elektrofiziologiniai nugaros smegenų neuronų (bendrai MN ir IN) parametrai yra ramybės potencialo vertė (nuo -57 iki -83 mV), membranos įėjimo varža (nuo 2,5 iki 344 MΩ), membranos laiko konstanta (apie 2,6 ms), reobazė (apie 0,05 nA), pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmė (nuo 72 iki 426 ms), pėdsekinės hiperpolarizacijos pusėjimo (laikas nuo pėdsekinės hiperpolarizacijos pradžios iki šis procesas pasiekia 50 % maksimalios amplitudės) trukmė (nuo 11 iki 212 ms), perdavimo funkcijos (f-I) kreivės statumas (nuo 3,4 iki 235 Hz/nA) (McDonagh et al., 1999).

2.1.2.1. Neuronų membranos ramybės potencialas

Vėžlių MN ramybės potencialas kinta nuo -60 iki -80 mV (Hounsgaard et al., 1988b; McDonagh et al., 1998) (vidutinis RP lygus $-67 \pm 5,6$ mV) ir yra artimas IN ramybės potencialo vertei, kuri kinta nuo -58 iki -79 mV (Hounsgaard ir Kjaerulff, 1992; McDonagh et al., 1998) (vidutinis RP lygus $-69 \pm 6,9$ mV).

2.1.2.2. Neuronų membranos įėjimo varža, laiko ir ilgio konstantos

Neurono membranos įėjimo varžą nulemia keli veiksniai - morfologiniai ir fiziologiniai. Pirma, bendras membranos plotas sąlygoja tam tikrą joninių kanalų skaičių neurone. Dideli neuronai dažniausiai turi daugiau joninių kanalų nei maži neuronai. Pro kanalus tekančios joninės srovės didina bendrą neurono membranos laidumą. Membranos įėjimo varža gali kisti ir dėl skirtingų joninių kanalų laidumo. Didelis skaičius joninių kanalų membranoje dar nepadidina membranos laidumo (nesumažina varžos), jei tie kanalai yra uždaryti. Membranos įėjimo varža yra atvirkščiai proporcinga neurono membranos įėjimo laidumui. Neurono įėjimo varžos vertė labai svarbi sinapsinių signalų

integracijai. Vykstant sinapsinių signalų laikinei ir erdvinei sumacijai, kurią įtakoja membranos laiko ir ilgio konstantos, nedidelės pavienės sinapsinės srovės gali sumuotis ir padidinti membranos potencialą iki slenkstinio ir inicijuoti VP generavimą. Neuronuose, kurie turi didelę įėjimo varžą ir dažniausiai yra maži, net ir nedidelės sinapsinės srovės gali inicijuoti VP generavimą, tuo tarpu dideliuose ir mažą įėjimo varžą turinčiuose neuronuose mažos pavienės sinapsinės srovės negali sukelti VP.

Anot vienu tyrėjų, vėžlio MN membranos įėjimo varža gali siekti 18-55 M Ω (Hounsgaard et al., 1988b), anot kitų - 13 \pm 7,2 M Ω (McDonagh et al., 1998). Neatitikimas tarp įvertinimų gali būti dėl nedidelių imčių bei skirtingų naudotų elektrodų. Membranos laiko konstantos vertės gali būti 12-61 ms (Hounsgaard et al., 1988b), 10-29 ms (Svirskis et al., 2001), 13 \pm 8,0 ms (McDonagh et al., 1998). IN atveju membranos įėjimo varža gali kisti nuo 14 iki 171 M Ω (vidutiniškai 64 \pm 48 M Ω), o membranos laiko konstanta atitinkamai nuo 5,9 iki 41 ms (vidutiniškai 16 \pm 9,1 ms) (McDonagh et al., 1998). Vėžlio nugaros smegenų neuronų parametrai sulyginami su kitų gyvūnų: nėgės MN membranos įėjimo varža 14 \pm 13 M Ω , IN - 68 \pm 46 M Ω (Buchanan, 1993), katės MN membranos įėjimo varža 1-9 M Ω , IN - 8,6-10 M Ω (Burke et al., 1994; Heckman ir Binder, 1991; Hultborn ir Pierrot-Deseilligny, 1979), MN laiko konstantos vertė 5-10 ms (Zengel et al., 1985). Žiurkės MN membranos įėjimo varža 1,8-3,3 M Ω (Bakels ir Kernell, 1993). Pelės MN įėjimo varža 2,4 M Ω (Meehan et al., 2010).

Elektrotoninė ilgio konstanta vėžlio MN atveju lygi 550-850 μ m (Svirskis et al., 2001), katės MN atveju 260-710 μ m. Ilgio konstantos vertė gali priklausyti nuo potencialo sklidimo krypties: iš dendritų į somą (konstanta mažesnė) ir iš somos į dendritus (konstanta didesnė) (apžvelgta Rekling et al., 2000).

2.1.2.3. Reobazė ir slenkstinis membranos potencialas

Reobazė - tai minimali srovės stiprio vertė, kurios reikia sukelti bent vieną VP. Šis parametras labai susijęs su įėjimo varža, ramybės potencialu ir veikimo potencialo slenksčiu. Vėžlio MN reobazė kinta nuo 0,4 iki 5,3 nA (vidutiniškai $1,8 \pm 1,2$ nA), IN nuo 0,1 iki 1,4 nA (vidutiniškai $0,4 \pm 0,4$ nA). Taigi MN sužadinti sunkiau nei IN. MN depoliarizuojančios srovės vertė, kurios reikia inicijuoti toninį VP generavimą prastai yra didesnė nei reobazė sukianti pavienius VP. Srovės reikalingos toniniam MN aktyvumui ir reobazės santykis yra 1,5 (katės MN) ar 1,4 (žiurkės MN) (Granit et al., 1963a; apžvelgta Kernell, 2006). MN, kurie įnervuoja skirtingo tipo raumenines skaidulas, pasižymi skirtinga reobazės verte. Katės MN, kurie įnervuoja greitas raumenines skaidulas, reobazė siekia net 21 nA, o lėtas skaidulas valdančių MN reobazė 3-5 nA (Heckman ir Binder, 1991; Zengel et al., 1985). Žiurkės MN, kurie įnervuoja greitas raumenines skaidulas, reobazė 5,7 nA, o lėtas skaidulas valdančių MN 1,8 nA (Bakels ir Kernell, 1993). Nėgės MN reobazė apie 1-2,7 nA, o IN reobazės vertė 0,2-1 nA (Buchanan, 1993).

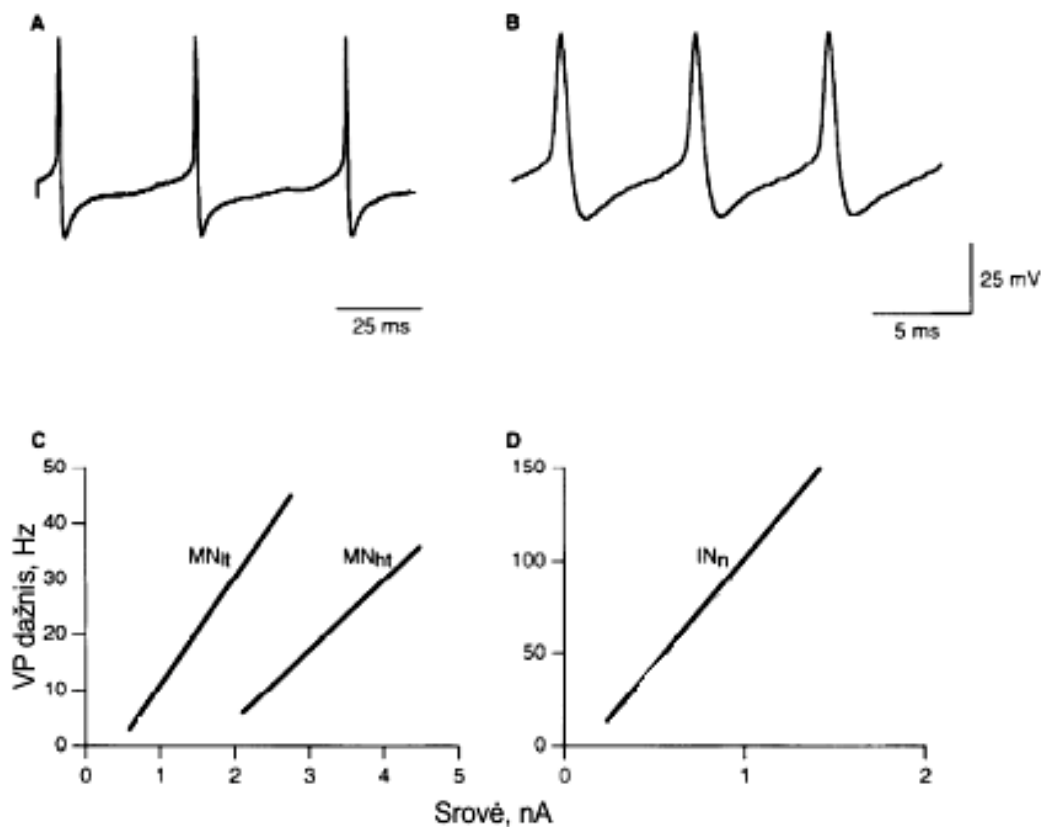
VP generuojamas tik tuo atveju, jei dėl žadinančių srovių membranos potencialo vertė pasiekia slenkstinę vertę. Iki sužadinimo membranos potencialo vertė kinta tiesiškai pagal Omo dėsnį. Pasiekus slenkstinį potencialą Omo dėsnis nebegalioja ir membranos potencialo kitimas tampa netiesinis. Slenkstinio membranos potencialo vertė apsprendžia neurono sužadinamumo lygį. Žemas slenkstis sąlygoja greitesnę neurono aktyvaciją, mažesnę reobazę. Slenkstis nėra pastovus parametras ir gali kisti priklausomai nuo neurono fiziologinės būsenos (Miles et al., 2005). Slenkstinė potencialo vertė pirmajam VP dažniausiai yra mažesnė nei tolesniems VP (Miles et al., 2005). Atsižvelgiant į tai, kad eksperimentiškai VP gali būti sukelti somos/dendritų zonoje arba aksono pradiniame segmente bei aksono gale, slenkstinis membranos potencialas yra skirtingas skirtingose neurono membranos srityse. Žemiausias slenkstinis membranos potencialas yra aksono karnelio ir aksono pradiniame segmente (MN atveju apie 10 mV teigiamiau ramybės potencialo

vertės), o didžiausias somos srityje (MN atveju apie 25 mV teigiamiau ramybės potencialo vertės) (Coombs et al., 1957a,b).

2.1.2.4. Neuronų veikimo potencialai

MN VP amplitudė prastai siekia 80–90 mV ir tuo pat metu dažniausiai vyksta MN membranos poliariškumo trumpalaikis pasikeitimas – įprastai neigiamas membranos potencialas tampa teigiamu: 20-30 mV (Hounsgaard et al., 1988b; apžvelgta Kernell, 2006). Šis procesas trunka 1-2 ms. Repoliarizacijos fazėje membranos potencialas vėl įgyja įprastinę neigiamą potencialo vertę. Dažnai neuronų (MN ir IN) repoliarizacijos fazėje vyksta pėdsekinė hiperpoliarizacija (Pav. 2.2.A.B)

MN veikimo potencialų amplitudė (43-96 mV) yra didesnė už IN amplitudę (23-72 mV). VP trukmė, kol amplitudė pasiekia 50 % maksimalios vertės, yra vienoda tiek MN, tiek ir IN (vidutiniškai 0,6 ms) (McDonagh et al., 1998). Panašius rezultatus aprašo ir kiti tyrėjai: vėžlio nugaros smegenų MN VP amplitudė (95-105 mV) (Hounsgaard et al., 1988b) yra didesnė už IN (nuo 63 ± 13 iki 65 ± 11 mV) (Hounsgaard ir Kjaerulff, 1992). Beje, MN esant nuolatinei stimuliacijai sugeneruoja 3-4 kartus mažiau VP nei IN (Gorman et al., 2005).

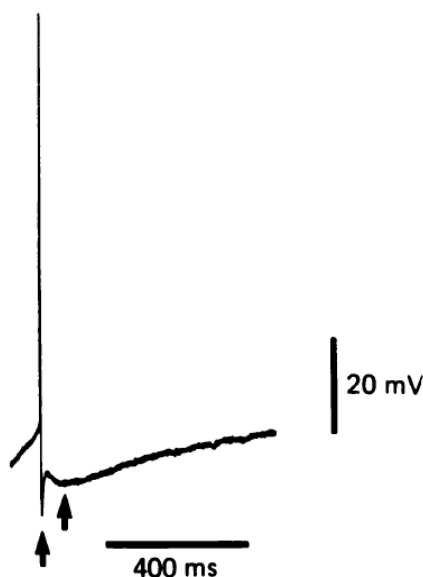


Pav. 2.2. Vėžlio nugaros smegenų neuronų veikimo potencialai ir perdavimo funkcijos *in vitro* gauti taikant viduląstelinį mikroelektrodinį potencialų registravimo metodą. (A) motoneuronų ir (B) interneuronų veikimo potencialai esant toniniam veikimo potencialų generavimui; motoneuronų (C) ir interneuronų (D) perdavimo funkcijos (dažnio-srovės priklausomybės kreivės); MN_{lt} - motoneuronai, kurie turi žemą slenkstinį membranos potencialą; MN_{ht} - motoneuronai, kurie turi aukštą slenkstinį membranos potencialą; IN_n - interneuronai, kurie spontaniškai negeneruoja veikimo potencialų; (C) ir (D) abscisių ašyse nurodyta srovė (nA), ordinačių ašyse - veikimo potencialų dažnis (Hz) (adaptuota iš McDonagh et al., 1999).

2.1.2.5. Neuronų pėdsekiniai potencialai ir refrakteriškumas

VP repoliarizacijos fazėje vyksta membranos potencialo grįžimas į ramybės būseną. Šis procesas pasižymi skirtingais membranos potencialo pokyčiais - stebimi pėdsekiniai potencialai (apžvelgta Kernell, 2006). Jie gali būti depoliarizuojantys arba hiperpolarizaujantys. MN somatodendritinis veikimo potencialas pasižymi pėdsekine depoliarizacija (apžvelgta Kernell, 2006; Granit et al., 1963b), kuri vėžlio MN atveju gali trukti 5-10 ms, o

amplitudė siekia apie 10 mV (apžvelgta Kernell, 2006). Pėdsekinę depoliarizaciją sąlygoja Ca^{2+} srovės, kurios teka pro žemo slenkstinio potencialo T tipo Ca^{2+} kanalus (Umemiya ir Berger, 1994) bei talpuminės membraninės srovės, kurios įtakoja šių potencialų formą ir laiko konstantą (Barrett ir Crill, 1980). Pėdsekinė depoliarizacija būdinga dendritiniam tinklui (Larkum et al., 1996). Po pėdsekinės depoliarizacijos (ji ne visada matoma), prasideda kitas procesas - pėdsekinė hiperpolarizacija (Eccles, 1957). Jos metu membranos potencialas trumpam tampa negiamesnis už ramybės potencialo vertę (Pav. 2.3). Pėdsekinė hiperpolarizacija MN gali būti skirstoma į greitą ir lėtą pagal proceso trukmę (Gorman et al., 2005) (Pav. 2.3). Ši neuronų savybė sąlygojama membranos potencialo ir K^+ kanalų laidumo (Hounsgaard et al., 1988b). IN atveju pėdsekinė hiperpolarizacija neišsiskiria į dvi fazes (Gorman et al., 2005). Pėdsekiniai potencialai MN stebimi tik somatodendritinėse srityse, jų neregistruojama pradiniam aksono segmente ar aksoniniuose VP (Coombs et al., 1955).



Pav. 2.3. Vėžlio nugaros smegenų motoneurono veikimo potencialas ir pėdsekinė hiperpolarizacija. Rodyklės rodo greitą ir lėtą pėdsekinės hiperpolarizacijos fazes; absčių ašyje nurodytas laikas (ms), ordinačių ašyje - membranos potencialas (mV) (adaptuota iš Hounsgaard et al., 1988b).

Vertinant vėžlio nugaros smegenų neuronų pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmę nustatyta, kad IN pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmė yra artima MN,

kurie įnervuoja greitas raumenines skaidulas, o MN, kurie valdo lėtas raumenines skaidulas, pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmė yra ilgesnė (McDonagh et al., 1998). Vėžlio MN pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmė kinta nuo 72 iki 356 ms (vidutiniškai 195 ± 66 ms), o IN nuo 123 iki 273 ms (vidutiniškai 185 ± 45 ms) (McDonagh et al., 1998). Greitoji fazė trunka apie 5-8 ms, o MN membrana hiperpolarizuojama apie 10 mV žemiau ramybės potencialo. Lėtoji pėdsekinės hiperpolarizacijos fazė gali trukti daugiau nei 500 ms (Hounsgaard et al., 1988b). Pėdsekinės hiperpolarizacijos amplitudė katės MN yra 2,8-4,9 mV (Zengel et al., 1985), žiurkės MN 2,1-3,7 mV (apžvelgta Kernell, 2006), vėžlio MN 1,5 mV (Perrier ir Delgado-Lezama, 2005). Katės MN pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmė 50-200 ms (Eccles, 1957; apžvelgta Kernell, 2006), pelės MN - 55 ms (Meehan et al., 2010), žiurkės MN - 59 ms (Bakels ir Kernell, 1993), žmogaus MN - 148 ms (Oda et al., 2007)

Reziumuojant morfologinius bei elektrofiziologinius neuronų parametrus (įėjimo varža, reobazės dydis, perdavimo funkcijos vertė) vėžlio nugaros smegenų neuronai yra labai panašūs į kitų gyvūnų nugaros smegenų neuronus: nėgės (Buchanan, 1993) ar katės (Heckman ir Binder, 1991; Burke et al., 1994; Hultborn ir Pierrot-Deseilligny, 1979).

2.1.2.6. Motoneuronų veikimo potencialų dažnio adaptacija

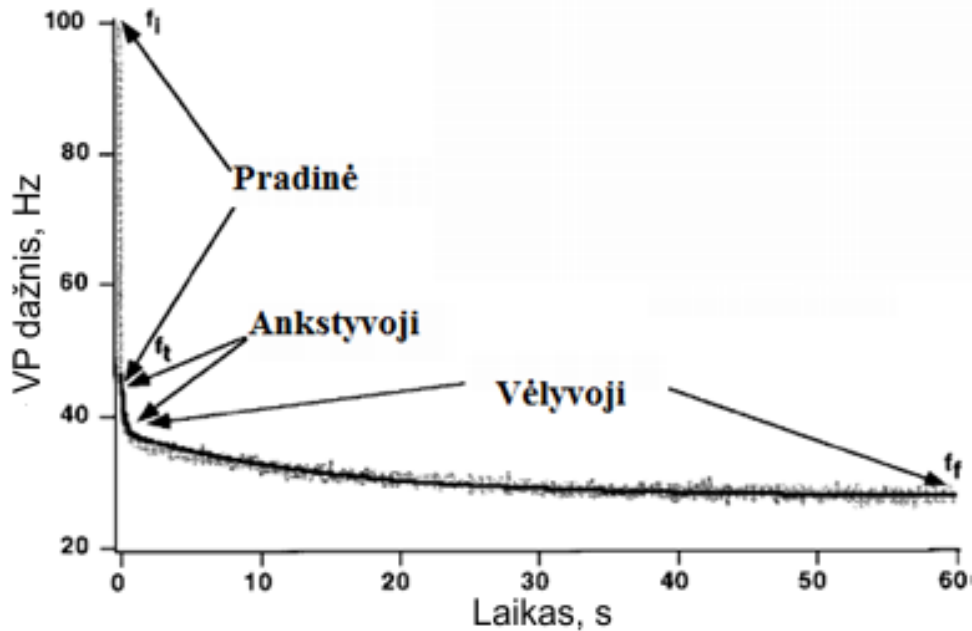
MN transformuoja sinapsines sroves (sinapsinius įėjimus) į tam tikro dažnio ir tipo VP sekas, kurios ir nulemia gyvūnų judesių (lokomocijų ir refleksų) įvairovę, jų valdymą ir kontrolę. Kiekvienas MN sukeltas VP sąlygoja raumeninės skaidulos, kurią tas MN įnervuoja, susitraukimą. Taigi MN VP dažnis, jo kitimas ir reguliacija yra labai svarbūs veiksniai judėjimo valdymui (apžvelgta Kernell, 2006).

Eksperimentiškai MN savybės tiriamos per registravimo elektrodą įleidžiant srovės impulsus. Kai MN stimuliuojamas pastovios amplitudės virš slenkstiniu srovės impulsu, generuojamos VP sekos dažnis nėra pastovus.

Srovės stimulo pradžioje VP dažnis būna didžiausias, o po to sparčiai mažėja iki stacionarios vertės (Kernell, 1965). Vyksta VP dažnio adaptacija (Pav. 2.4). Manoma, kad šis MN sužadinamumo lygio kitimas MN stimuliavimo metu yra labai svarbus raumenų susitraukimo jėgai, jos dinamikai, raumenų valdymui atliekant įvairius kūno judesius ir vienas iš energijos taupymo būdų (Binder et al., 2010). Veikimo potencialų adaptacija, priklausomai nuo neuronų tipo, skirstoma į 2 arba 3 fazes: 1) pradinė; 2) ankstyvoji (papildoma fazė); 3) vėlyvoji (Sawczuk et al., 1995, 1997; apžvelgta Kernell, 2006). Kartais stebima ir modifikuota pradinės adaptacijos forma – pavėluota pradinė adaptacija, kuomet VP dažnis pasiekia maksimalią vertę ne pirmame VP intervale, o tik po kelių VP. Šis efektas nėra dažnas. Vėžlio nugaros smegenyse šis reiškinys būdingas tik kai kuriems IN (Gorman et al., 2005), katės kai kuriuose neuronuose (Gustafsson et al., 1978; Baldissera et al., 1983; Hultborn et al., 1984). Pradinėje adaptacijos fazėje stebimas staigus MN VP dažnio mažėjimas (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965). Vėlyvosios adaptacijos fazėje MN VP dažnio vertė pakinta nežymiai (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965; Kernell ir Monster, 1982; Sawczuk et al., 1995). Manoma, kad skirtingos adaptacijos fazės turi skirtingą funkcinę prasmę, jas sąlygojantys mechanizmai yra skirtingi (Kernell, 1999).

Pradinė adaptacijos fazė būdinga pirmiesiems keliems arba tik pirmam VP intervalui. Vėlyvoji adaptacijos fazė pasireiškia esant ilgalaikiai stimuliacijai ir trunka nuo kelių sekundžių iki kelių minučių (Kernell, 1965; Kernell ir Monster, 1982). Pradinė adaptacijos fazėje VP dažnio kitimas geriausiai aprašomas tiesės lygtimi. Ankstyvoji ir vėlyvoji adaptacijos fazės geriausiai matematiškai aprašomos viena arba dviem eksponentės lygtimis (Pav. 2.4). Eksponentinio VP dažnio mažėjimo laiko konstantos vidutinė vertė ankstyvajai adaptacijos fazei buvo nustatyta 0,2 s, o vėlyvajai adaptacijos fazei - 22,6 s katės MN (apžvelgta Kernell, 2006). Žiurkių CNS MN atveju ankstyvosios adaptacijos fazės laiko konstanta 0,24 s, o vėlyvosios 23 s (Sawczuk et al., 1995). Vėžlio nugaros smegenų neuronų tyrimai parodė, kad MN ankstyvosios adaptacijos fazės laiko konstanta kaip ir IN atveju lygi 0,1-

0,2 s, o vėlyvosios fazės laiko konstanta skirtinga: MN pasižyminčių aukštu slenkstiniu potencialu vėlyvosios adaptacijos laiko konstanta apie 23 ± 21 s, žemo slenkstinio potencialo MN apie 18 ± 15 s, o IN, kurie nepasižymi spontaniniu aktyvumu laiko konstanta 21 ± 18 s, spontaninio aktyvumo IN apie 15 ± 9 s (Gorman et al., 2005).



Pav. 2.4. Neuronų veikimo potencialų dažnio adaptacija. Adaptacijos fazės: pradinė, ankstyvoji ir vėlyvoji; abscisių ašyse nurodytas laikas (s), ordinačių ašyse - veikimo potencialų dažnis (Hz) (adaptuota iš Sawczuk et al., 1997).

Taigi, adaptacija yra gradualus neurono atsakų mažėjimas esant pastoviai ląstelės stimuliacijai (Brodwick ir Junge, 1972; Holloway ir Poppele, 1984; Jones ir Thompson, 2001; Parker et al., 1996; Sanchez-Vives et al., 2000) (Pav. 2.6.A.B.D). Pagrindinis neuronų adaptacijos mechanizmas yra pėdsekinė hiperpolarizacija (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965). Taip pat adaptaciją sąlygoja M srovė (membranos potencialo valdoma, lėtai aktyvuojama K^+ srovė) ir Ca^{2+} sąlygojamos K^+ srovės piramidiniuose neuronuose (Madison ir Nicoll, 1984). Tačiau tai būdinga ne visiems neuronams. Pėdsekinė hiperpolarizacija neįtakoja adaptacijos pelių nugaros smegenų MN (Zeng et al., 2005). Adaptaciją šiuo atveju sąlygoja greitos kinetikos Na^+ kanalų

inaktyvacija. Tarakono mechanoreceptoriaus atveju (French, 1989), greitoji pradinė adaptacijos fazė yra sąlygota lėtos potencialų valdomų Na^+ kanalų inaktyvacijos, o vėlyvoji fazė – Na^+ - K^+ siurblio veiklos rezultatas (Powers et al., 1999).

Reziumuojant VP dažnio adaptacijos mechanizmus galima teigti, kad stuburiniuose gyvūnuose VP sekų generavimą MN sąlygoja Na^+ , K^+ , Ca^{2+} bei kompleksiniai Na^+ - K^+ laidumai, kuriu priskaičiuojama apie 20 (Hornby et al., 2002c; Li et al., 2004). Pradinė adaptacijos fazė siejama su: 1) membranos joninių laidumų pokyčiais, kurie sąlygoja pėdsekinę hiperpolarizaciją (Barrett et al., 1980; Kernell ir Sjöholm, 1973), 2) greita Na^+ kanalų inaktyvacija, kuri sąlygoja slenkstinio potencialo didėjimą (Schwindt ir Crill, 1982), 3) didesnė Na^+ kanalų inaktyvacija somoje ir pradiniame aksono segmente, kuri sąlygoja VP formos parametrų pokyčius (Powers et al., 1999).

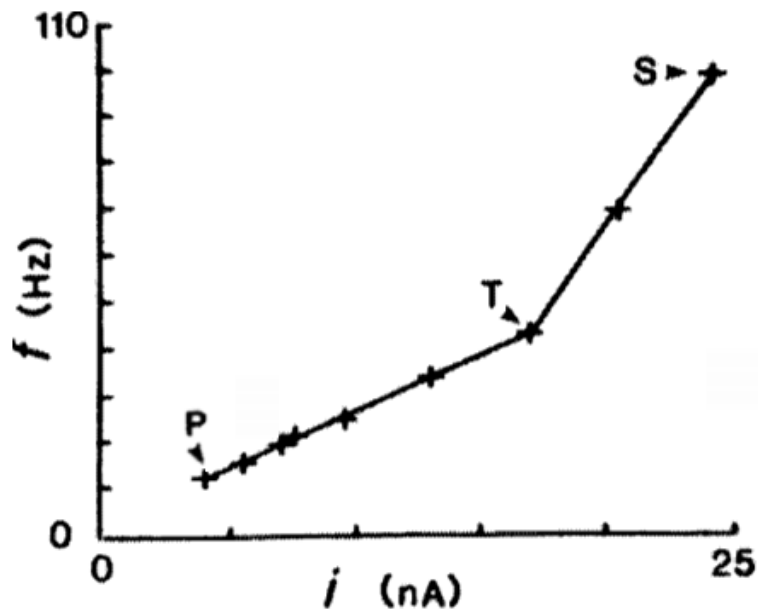
2.1.2.7. Srovės – dažnio transformacija motoneuronuose

Eksperimentiškai buvo įrodyta, kad MN gali keisti VP generavimo būdą iš toninio į fazinį kintant MN membranos potencialo vertei ir VP amplitudei, kai į MN įterpiamas mikroelektrodas ir atsiranda MN pažaida (Kernell, 1965, 2006). Taigi MN aktyvumas generuojant VP gali būti įtakojamas ir jo fiziologinės būklės. Kodėl MN, kuriems sukeliama pažaida (mikroelektrodo įvedimas į ląstelę), iš toninio aktyvumo pereina į fazinį kol kas nėra pilnai aišku. Kodėl tokios didelės ląstelės kaip MN yra tokie jautrūs tokio tipo pažaidoms tai pat nėra dar pilnai iširta ir kartu domina tyrinėtojus (apžvelgta Kernell, 2006).

Eksperimentiškai MN stimuliuojant pastovios amplitudės virš slenkstiniu srovės stimulu sukeliamas toninis MN VP generavimas. Didinant tokio stimulo amplitudę didėja ir VP dažnis. Tai vyksta tol, kol pasiekiami tokia stimulo srovės vertė, kai VP dažnis nebedidėja, o pradeda mažėti ir galiausiai VP generavimas nutrūksta (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965).

2.1.2.8. Nugaros smegenų neuronų perdavimo funkcija

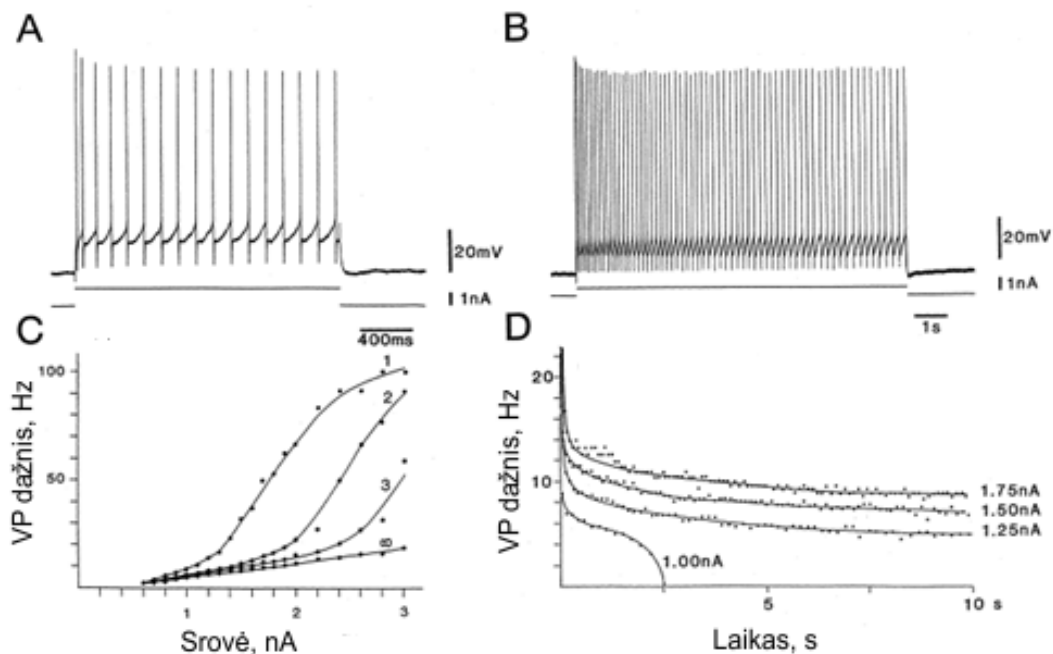
Motoneuronų (MN) perdavimo funkcija parodo, kaip sinapsinis įėjimas yra konvertuojamas į motoneurono išėjimo signalą - tam tikro dažnio VP sekas ir šių motoneuronų valdomų raumenų susitraukimus. Eksperimentiškai neuronų (MN ir IN) perdavimo funkcijos vertė nustatoma tiriant neuronų veikimo potencialų dažnio priklausomybę nuo įleidžiamos į ląstelę srovės dydžio. Tai atliekama taikant viduląstelinę potencialų registraciją ir stimuliuojant MN trikampaiais arba stačiakampaiais srovės stimulais (Bennett et al., 2001b; Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Lee ir Heckman, 1998, 2000; Granit et al., 1963a). Gauta dažnio-srovės priklausomybė matematiškai aprašoma viena ar keliomis tiesės lygtimis, o šių tiesių statumo koeficientas laikomas perdavimo funkcijos dydžiu. Kuo tiesė statesnė, tuo perdavimo funkcijos vertė didesnė. Neuronų perdavimo funkcijos vertė rodo MN aktyvumo dinamiką (apžvelgta Kernell, 2006).



Pav. 2.5. Motoneurono (katės) perdavimo funkcija. Čia: P-T – pirma perdavimo funkcijos fazė, T-S – antra fazė, T – perdavimo funkcijos lūžio taškas; abscisių ašyje nurodyta srovė (nA), ordinačių ašyje - veikimo potencialų dažnis (Hz) (adaptuota iš Kernell, 2006).

Pirmą kartą MN perdavimo funkcija buvo tirta žiurkės nugaros smegenų MN (Granit et al., 1963a; Kernell, 1965). MN perdavimo funkcija ne visame stimulo srovių intervale yra tiesinė ir todėl skirstoma į kelias fazes panašiai kaip ir VP dažnio adaptacija (Pav. 2.5). Srovės-dažnio priklausomybė dažnai vaizduojama kaip sigmoidė (Pav. 2.6.C). Sigmoidė dažnai skirstoma į 2 tiesines ir vieną netiesinę dalis, kurios skiriasi savo statumais ir mechanizmais.

Dažnio ir srovės priklausomybė (f-I) mažų srovių (artimų reobazei) diapazone, kuomet dar nėra pilnai įvykusi Na⁺ kanalų inaktyvacija, matematiškai aprašoma tiesės lygtimi su tam tikru statumo koeficientu. Tai pirmoji perdavimo funkcijos fazė. Stimulo srovei didėjant ir MN VP dažniui pasiekus apie 10-40 Hz įvyksta lūžis - f-I priklausomybės statusas staiga pakinta (Pav. 2.5). Nuo šio lūžio taško f-I priklausomybė aprašoma kita tiesės lygtimi su nauju statumo koeficientu - antroji fazė. II fazės f-I kreivės statusas būna didesnis nei I fazės kreivės. Antroji tiesinė aproksimacija galioja MN dažnių diapazone nuo 20 iki 100 Hz (katės MN). Toliau didinant stimulo srovę, VP dažnis įsisotina (III fazė).



Pav. 2.6. Motoneurono (vėžlio) veikimo potencialų dažnio adaptacija ir perdavimo funkcija. Motoneurono VP esant trumpiems (A) ir ilgesniems (B) elektriniams stimulams; (C) motoneuronų perdavimo funkcijos (skaičiuojant pirmam (1) (pirmas ir antras VP), antram (2) (antras ir trečias VP) ir trečiam

(3) (trečias ir ketvirtas VP) laiko intervalui tarp VP); (D) veikimo potencialų dažnio adaptacija, esant skirtingo dydžio srovės stimulams; (A) ir (B) abscisių ašyse nurodytas laikas atitinkamai (ms) ir (s), ordinačių ašyse - membranos potencialas (mV); (C) abscisių ašyje nurodyta srovė (nA), ordinačių ašyje - veikimo potencialų dažnis (Hz); (D) abscisių ašyje nurodytas laikas (s), ordinačių ašyje veikimo potencialų dažnis (Hz) (adaptuota iš Hounsgaard et al., 1988b).

MN dažnio-srovės priklausomybė (perdavimo funkcija) nėra pastovus parametras ir gali būti modifikuojamas įvairių fiziologinių procesų. Perdavimo funkcijos vertę stipriai įtakoja jau minėta veikimo potencialų adaptacija. Šiuo atveju perdavimo funkcijos pavidalą galima suskirstyti į tris tipus. Pradinė ir ankstyvoji perdavimo funkcijos, kurias labiausiai sąlygoja pradinė adaptacija. Stacionari perdavimo funkcija, kuri vertinama, kai vyksta vėlyvoji adaptacijos fazė. Pradinės MN perdavimo funkcijos vertė (pirmieji VP) stimuliuojant neuroną depoliarizuojančiomis srovėmis prastai yra didesnė nei stacionari jos vertė (VP dažnis pastovus). Pradinė, ankstyvoji ir stacionari MN perdavimo funkcijos yra skirtingos atsižvelgiant į galimą jų modifikavimą ir funkcinę paskirtį (apžvelgta Kernell, 2006).

Katės nugaros smegenų MN negali ilgai toniškai generuoti VP antrosios perdavimo funkcijos fazės metu. Kodėl taip nutinka dar nėra visiškai aišku. Svarbus klausimas yra kodėl MN perdavimo funkcija pradžioje būna tiesinė, o vėliau, prie didesniu srovės verčių tampa netiesinė (užsiriečia). Šis efektas būdingas tik tiems MN, kurie gali generuoti didelio dažnio VP (Kernell, 1965).

Esant didelėms stimulo srovėms MN VP dažnis nebedidėja, o vėliau pradeda mažėti, o galiausiai visiškai nuslopsta VP generavimas. Šis procesas yra grįžtamas: sumažėjus stimuliacijos intensyvumui, MN vėl pradeda generuoti VP toniškai (Granit et al., 1963a; apžvelgta Kernell, 2006).

Pradinė MN perdavimo funkcijos vertė žiurkės MN atitinkamai pirminėje fazėje 31 Hz/nA, o antrojoje fazėje - 77 Hz/nA (Moore ir Appenteng, 1990).

Stacionarios perdavimo funkcijos vertės dažniausiai turi tik pirmą tiesinę f-I kreivės fazę įvairiuose neuronuose: katės MN 1,1-4,5 Hz/nA (Jodkowski et al., 1988), IN atveju 15 Hz/nA (Hultborn ir Pierrot-Deseilligny, 1979), žiurkės MN 11 Hz/nA (Moore ir Appenteng, 1990), nėgės MN $4,0 \pm 1,9$ Hz/nA, IN atveju 17 ± 12 Hz/nA ir 38 ± 25 Hz/nA (Buchanan, 1993), vėžlio MN: $17 \pm 9,0$ Hz/nA (aukšto slenkstinio potencialo MN) ir $19 \pm 5,0$ Hz/nA (žemo slenkstinio potencialo), IN atveju 128 ± 26 Hz/nA (McDonagh et al., 1999), pelės MN 13 Hz/nA (Meehan et al., 2010).

2.1.2.9. Perdavimo funkcijos modifikavimo mechanizmai

Perdavimo funkcijos I fazė. Žinoma, kad pėdsekinė MN membranos hiperpolarizacija sąlygoja MN perdavimo funkcijos vertę (Vervaeke et al., 2006; Vogalis et al., 2003) ir nulemia VP dažnio adaptaciją (Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995, 1997). Ca^{2+} patekimas į ląstelę VP metu sukelia lėtą pėdsekinę hiperpolarizaciją, kuri sąlygoja adaptaciją ir perdavimo funkcijos vertę (Hounsgaard ir Mintz, 1988; Powers et al., 1999; apžvelgta Rekling et al., 2000).

MN generuojant VP minimaliu dažniu, laiko intervalai tarp VP yra artimi pėdsekinės hiperpolarizacijos trukmei. Tai rodo, kad MN aktyvumas priklauso nuo membranos refrakterinio periodo laiko konstantos, kurią sąlygoja pėdsekinė hiperpolarizacija. Pėdsekinė hiperpolarizacija mažina MN perdavimo funkcijos vertę. Perdavimo funkcijos vertė teoriškai gali didėti, jei pėdsekinės hiperpolarizacijos amplitudė mažėja, jos trukmė trumpėja, žemėja slenkstinis membranos potencialas (neigiamėja) ar K^+ pusiausvyrinis potencialas tampa neigiamesnis. Tai buvo patvirtinta ir eksperimentiškai (Hornby et al., 2002a; Hounsgaard et al., 1988a; Hounsgaard ir Kiehn, 1989; Hultborn et al., 2004). Padidėjęs membranos laidumas dėl pėdsekinės hiperpolarizacijos gali įtakoti ir pradinę veikimo potencialų adaptacijos fazę, kuri mažina MN perdavimo funkcijos vertę. Žinoma, kad pėdsekinės hiperpolarizacijos vertė po pirmo VP yra mažesnė nei po antrojo VP. Šis

reiškinys susidaro dėl nepilnos K^+ srovių laidumo aktyvavimo pirmojo VP metu, todėl antrojo VP metu pėdsekinės hiperpoliarizacijos joninė srovė aktyvuojama daug stipriau ir yra didesnė (vyksta pėdsekinės hiperpoliarizacijos sumavimasis). Pėdsekinės hiperpoliarizacijos savybė sumuotis sulig kiekvienu nauju VP gali paaiškinti adaptacijos procesus, o adaptacija įtakoja perdavimo funkcijos I ir II fazėse (apžvelgta Kernell, 2006). Pėdsekinė hiperpoliarizacija labiausiai įtakoja pirmųjų VP dažnio adaptaciją. Taigi, pėdsekinė hiperpoliarizacija yra svarbus veiksnys sąlygojantis MN minimalią toninio VP generavimo dažnio vertę bei perdavimo funkcijos I fazės vertę.

Perdavimo funkcijos II fazė. Vis dar diskutuojama, koks mechanizmas sąlygoja perdavimo funkcijos staigų lūžį pereinant iš I į II fazę didėjant stimulo srovei. Ca^{2+} srovės, kurios sąlygoja pavėlintą neurono membranos depoliarizaciją, gali prisidėti prie perdavimo funkcijos staigaus lūžio susidarymo. Žinoma, ir kiti mechanizmai gali turėti įtakos minėtiems procesams. MN generuoja VP didesniais dažniais (II perdavimo funkcijos fazė) padidėja nuolatinių įtekančių joninių srovių (PIC) įtaka perdavimo funkcijos vertei. Šios PIC kompensuoja ištekančias pėdsekinės hiperpoliarizacijos K^+ sroves, kurios dalyvauja membranos potencialo repoliarizacijoje. Mažesnio dažnio VP generavimo atveju (I perdavimo funkcijos fazė) atsiranda membranos potencialo osciliacijos (bistabilumai). Tai sąlygoja mažesnę PIC aktyvaciją (apžvelgta Kernell, 2006).

Taigi didesnė MN perdavimo funkcijos vertė (f-I kreivės statusas) antros perdavimo funkcijos fazės metu gali įvykti dėl PIC, kurios veikia kaip sinapsinių signalų stiprintuvas. Šį procesą sąlygoja lėta įtampos valdomų joninių kanalų inaktyvacija (Hultborn et al., 2004; Li et al., 2004). Membranos potencialo depoliarizacija įjungia PIC MN dendritiniame medyje, o šis procesas sustiprinamas aktyvuojant metabotropinius membranos receptorių. Sinapsinis MN aktyvavimas (dendritinėse sinapsėse) gali sąlygoti greitesnį MN perdavimo funkcijos f-I kreivės statumo kitimą antros fazės metu nei pirmojoje fazėje (Granit et al., 1966). Vis dėl to, nepaisant PIC įtakos MN perdavimo funkcijos vertei, kiti tyrėjai teigia, kad vien tik šių joninių srovių nepakanka

paaiškinti perdavimo funkcijos padidėjimą antrojoje fazėje. Teigiama, kad perdavimo funkcijos kreivės lūžis pereinant iš pirmos fazės į antrą fazę yra labiau sąlygotas VP dažnio nei membranos potencialo vertės (apžvelgta Kernell, 2006). PIC stokoja greitos kinetikos, kurios reikia greitam f-I lūžiui atsirasti. Vis dar mažai žinoma apie tai, kaip toli nugaros smegenų MN VP išplinta į dendritinę sritį (Larkum et al., 1996). Pagrindinis skirtumas tarp toniškai ir faziškai VP generuojančių MN antrojoje perdavimo funkcijos fazėje gali būti ir skirtingas VP sklidimas į dendritinį tinklą. Šiuo atveju VP sklidimą įtakoja pasyvosios dendritų membranos elektrinės savybės. Signalų perdavimo procesai dendrituose gali būti stiprinami žadinančių sinapsinių įėjimų MN dėka (apžvelgta Kernell, 2006).

2.2. Joninės srovės motoneuronų membranoje

MN VP sekų generavimas, kuris suformuoja ir kontroliuoja gyvūnų judėjimą priklauso nuo sinapsinių MN įėjimų (Berg et al., 2008; Granit et al., 1963b; apžvelgta Kernell, 2006) ir specifinių elektrofiziologinių MN savybių (Harvey et al., 2006c; Hounsgaard ir Mintz, 1988). Joniniai laidumai aktyvuojami arti slenkstinio membranos potencialo vertės yra labai svarbūs MN sinapsinių potencialų integracijai. Dinaminis neuronų, o ypač MN, sužadimumo reguliavimas labiausiai įtakojamas membranos potencialo valdomų joninių kanalų ir srovių (apžvelgta Rekling et al., 2000).

Neuronų membranoje dominuoja potencialo ir ligandų valdomi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} bei Cl^- kanalai, lokalizuoti neuronų dendrituose, aksonų ne mielinizuotoje dalyje, aksono kalnelyje ir somoje (apžvelgta Harris-Warrick, 2002; Kernell, 2006; apžvelgta Rekling et al., 2000).

2.2.1. Na⁺ srovės

Na⁺ kanalų atsidarymas sukelia įtekančią joninę srovę, kuri depoliarizuoja neurono membraną iki slenkstinio potencialo ir sąlygoja VP generavimą. Žinomi 9 potencialo valdomų Na⁺ kanalų tipai. Visi neuronai turi greitos inaktyvacijos Na⁺ kanalus (aktyvacijos/inaktyvacijos laiko konstanta ~ 1 ms) (apžvelgta Rekling et al., 2000). Na⁺ kanalams būdinga dviejų vartų sistema. Kanalo pirmieji vartai atsidaro greitai, membranos potencialo vertei pasiekus slenkstinį potencialą. Šie vartai užsidaro tik pasibaigus membranos depoliarizacijai, kai membranos potencialas grįžta į ramybės būseną. Antrieji vartai – tai inaktyvacijos mechanizmas. Ramybės būsenoje šie vartai yra atviri, o vykstant greitai membranos depoliarizacijai VP generavimo metu po 1 ms nuo VP pradžios užsidaro – inaktyvuojasi. Inaktyvacija baigiasi tik, kai membranos potencialas grįžta į ramybės būseną. Tai sąlygoja trumpą VP trukmę (apžvelgta Kernell, 2006).

Somoje lokalizuotų katės nugaros smegenų MN Na⁺ kanalų aktyvacijos ir inaktyvacijos laiko konstanta 0,1-1,3 ms (vidutiniškai 1 ms) (Barrett et al., 1980), žiurkės MN laiko konstanta 1-4 ms, aktyvacijos potencialas nuo -60 iki -20 mV, o atsistatymo po inaktyvacijos laiko konstanta apie 154 ms (Safronov ir Vogel, 1995).

Kita Na⁺ kanalų grupė yra ne inaktyvuojami Na⁺ kanalai. Jie atsidaro membranos potencialui esant iki slenkstiniame lygyje ir gali pagreitinti bei sustiprinti membranos depoliarizaciją iki slenkstinių verčių (apžvelgta Rekling et al., 2000). Taigi, MN greitos kinetikos ir greitos inaktyvacijos Na⁺ srovės (I_{NaT}) ir kanalai atsakingi už MN VP kilimo fazę, o ne inaktyvuojama (nuolatinė) Na⁺ srovė (I_{NaP}) prisideda prie toninio VP generavimo MN (apžvelgta Kernell, 2006).

Sudėtinga visapusiškai eksperimentiškai ištirti I_{NaP} įtaką MN aktyvumui ir VP generavimui. Žinomiausias Na⁺ kanalų blokatorius – TTX – blokuodamas Na⁺ kanalus eliminuoja ne tik I_{NaP} bet ir VP. Riluzolis, teigiama, yra I_{NaP} blokatorius (Urbani ir Belluzzi, 2000). Riluzolis slopina I_{NaP} priklausomai nuo

jo koncentracijos (Urbani ir Belluzzi, 2000). Tačiau jis tai pat slopina I_{NaT} bei su užvėlinimu aktyvuojamus (DR) K^+ kanalus (Ahn et al., 2005). Riluzolis tai pat sustiprina pėdsekinės hiperpolarizacijos joninę srovę (I_{AHP}), kuri gali būti įtakojama nuo Ca^{2+} priklausomų mažo laidumo SK tipo K^+ kanalų (Cao et al., 2002) ir slopina žadinančio tipo sinapsinių signalų perdavimą MN (Doble, 1996; Jehle et al., 2000).

2.2.2. K^+ srovės

K^+ kanalų veikla sąlygoja iki slenkstinius neurono membranos elektrinius procesus, įtakoja VP formą, VP generavimo ypatumus MN, jie svarbūs moduluojant MN sužadynamumą ir aktyvumą. K^+ aktyvacija sąlygoja MN membranos hiperpolarizaciją ir palaiko membranos ramybės potencialo vertę suformuodama joninių srovių pusiausvyrą tarp ištekančios iš neurono K^+ srovės ir įtekančios Na^+ srovės bei įvairių nuotėkio srovių (dažniausiai Cl^-) (apžvelgta Rekling et al., 2000). K^+ kanalų neurono membranoje yra įvairių tipų (apžvelgta Hille B., 2001). Pagrindinis K^+ kanalų blokatorius - TEA. Vieni K^+ jonų kanalai yra valdomi tiesiogiai membranos potencialo (K_V), o kiti valdomi Ca^{2+} arba Na^+ . Dar vieni K^+ kanalai aktyvuojami ciklinių nukleotidų, kurie keičia tokių kanalų dinamiką ir srovių amplitudę. Kai kuriems K^+ kanalams tai pat būdinga inaktyvacija. K^+ kanalų įvairovė siejama su neuronų elektrinių savybių įvairovės užtikrinimu. Stimuliuojant neuronus depolarizuojančiais srovės stimulais, membranos potencialo vertė priklauso nuo susidariusių joninių srovių sąveikos. Silpnos depolarizacijos atveju, pirmiausia aktyvuojami potencialo valdomi K^+ kanalai (K_{IR}), kurie lėtina depolarizaciją dėl ištekančios K^+ srovės. Šie kanalai atsakingi už membranos ramybės potencialo stabilizavimą ir palaikymą. Jei depolarizacija didesnė ir aktyvuojami įtampos valdomi Na^+ jonų kanalai, generuojamas VP. Membranos potencialui pasiekus teigiamą vertę, aktyvuojami lėtos kinetikos K_{DR} kanalai, kurie repolarizuoja membranos potencialą ir sąlygoja greitąją pėdsekinę hiperpolarizaciją. Šio tipo kanalų laidumas apie 10 pS, deaktyvacijos laikas

apie 60 ms (apžvelgta Rekling et al., 2000). VP metu į neuroną per Ca^{2+} jonų kanalus patenka Ca^{2+} . Ca^{2+} aktyvuoja specifinius K^+ kanalus: SK (mažo joninio laidumo) ir BK (didelio joninio laidumo) tipo, kurie sąlygoja pėdsekinę hiperpolarizaciją (apžvelgta Rekling et al., 2000; Hille B., 2001). Šie kanalai nevaldomi membranos potencialo. K_{BK} kanalų laidumas 80-240 pS, aktyvacijos laiko konstanta 2-3 ms, inaktyvacijos - 40 ms. K_{SK} kanalų laidumas 18 pS, kanalas atidarytas būna vidutiniškai 3,5 ms. Kita K^+ kanalų grupė, tai Na^+ valdomi kanalai - K_{Na} . Jie atsakingi už pėdsekinę hiperpolarizaciją (apžvelgta Rekling et al., 2000).

2.2.3. M tipo joninė srovė

Vienas iš MN sužadynamumo lygi įtakojančių mechanizmų yra M tipo joninė srovė. M srovės aktyvacija labiausiai įtakoja ankstyvąją adaptacijos fazę (Aiken et al., 1995). M srovė - tai membranos potencialo valdoma, lėtai aktyvuojama K^+ srovė. Toks pavadinimas šiai srovei buvo suteiktas dėl to, kad ji slopinama aktyvuojant muskarininius acetilcholino receptorių neuronų membranoje (Brown ir Adams, 1980). M srovė aktyvuojasi membranos potencialui esant artimam ramybės potencialui ir ne inaktyvuojasi esant nuolatiniams membranos depolarizacijai. Sutariama, kad dauguma M srovių yra sąlygotos KNCQ šeimos K^+ kanalų veiklos. Būtent šie kanalai gali generuoti jonines sroves, kurios artimiausios M srovei pagal savo charakteristikas: aktyvuoja membranos depolarizaciją, kinetika ir farmakologija (Wang et al., 1998; Schroeder et al., 2000).

M srovė pirmiausia buvo užregistruota pelės nugaros smegenų neuronuose (Nowak ir Macdonald, 1983). M srovės egzistavimas vėžlio nugaros smegenų motoneuronuose tai pat buvo patvirtintas eksperimentiškai (Alaburda et al., 2002a). Tyrimai su vėžlio nugaros smegenų MN parodė, kad M srovė veikia specifines vėžlio nugaros smegenų MN savybes: didina VP dažnio adaptaciją ir mažina MN stacionarios perdavimo funkcijos vertę (Alaburda et al., 2002a). Ši srovė aktyvuojasi lėtai ir yra valdoma membranos

potencialo vertės. M srovė pradeda aktyvuotis, kai membranos potencialas depoliarizuojasi nuo -60 mV ir deaktyvuojama MN membranos potencialui grįžtant į ramybės būseną (neigiamėjant). Deaktyvacijos laiko konstanta apie 80 ms, būdinga ir kitų stuburinių neuronams (Brown ir Adams, 1980). M srovė yra blokuojama XE991, kuris blokuoja KCNQ šeimos K jonų kanalus (Shapiro et al., 2000). M srovės amplitudė MN yra maža palyginti su sumine membranine srove. Reikia pažymėti, kad muskarinas vėžlio motoneuronuose ne tik slopina M srovę (Alaburda et al., 2002a), bet ir aktyvuoja nuolatinės įtekančias sroves MN sąlygotas L tipo Ca^{2+} kanalų (Delgado-Lezama et al., 1997; Svirskis ir Hounsgaard, 1998). Taigi muskarinas padidina MN sužadynamumo lygį veikdamas per skirtingus joninius laidumus. M srovė įsijungia esant iki slenkstiniam membranos potencialui, tai įgalina M srovę reguliuoti MN sužadynamumą. Normaliomis fiziologinėmis sąlygomis M srovė sumažina MN sužadynamumą ir taip gali apsaugoti organizmą nuo nevalingų atsitiktinių raumenų susitraukimų ir jų sąlygotų judesių, kurie atsiranda sergant tam tikromis ligomis (epilepsija) (Dedek et al., 2001). Parodyta, kad M srovė vėžlio MN didina MN VP dažnio adaptaciją esant toniniam VP generavimui dėl lėtos kinetikos ir sumažina MN stacionarios perdavimo funkcijos vertę apie 18 % (Alaburda et al., 2002a).

2.2.4. Ca^{2+} srovės

Įtampos valdomų Ca^{2+} kanalų neuronuose rasta 6 tipų (L, N, P, Q, R, T). Kanalai skirstomi į 2 grupes pagal aktyvavimo potencialo vertę. Pirma grupė yra žemo slenkstinio aktyvacijos potencialo (LVA) kanalai. Šiai grupei priskiriami T tipo kanalai. Kita grupė yra aukšto slenkstinio aktyvacijos potencialo (HVA) kanalai, kuriems priskiriami L, N, P, Q, R tipai. Minėtos grupės dar papildomai skirstomas į 3 pogrupius. Pirmam pogrupiui priskiriami 4 tipų L tipo Ca^{2+} kanalai: $Ca_{v1.1}$, $Ca_{v1.2}$, $Ca_{v1.3}$, $Ca_{v1.4}$ (apžvelgta Rekling et al., 2000). Minėti kanalai lokalizuoti neuronų dendrituose. Antras pogrupis – tai P, Q, N, R kanalai. N tipo Ca^{2+} kanalai randami sinapsėse, P ir Q – dendrituose. T

tipo Ca^{2+} kanalai randami dendrituose ir somoje ir sąlygoja fazinį VP generavimą MN (apžvelgta Rekling et al., 2000; Hille B., 2001). L tipo kanalų laidumas 28 pS, N tipo - 14 pS, P tipo - 20 pS, T tipo - 7 pS. L ir P tipo kanalai neturi inaktyvacijos, o T ir N tipo kanalai inaktyvuojasi (laiko konstantos atitinkamai 20 ir 58 ms (Umemiya ir Berger, 1994).

Skirtingų tipų Ca^{2+} kanalai pasižymi skirtinga kinetika ir aktyvavimo potencialo dydžiu. L tipo kanalai, kurie dominuoja vėžlio nugaros smegenų MN, turi aukštą aktyvacijos slenkstį ir ne inaktyvuojami. Šie Ca^{2+} kanalai sąlygoja neuronų bistabilumą (Hounsgaard ir Kiehn, 1985; apžvelgta Rekling et al., 2000).

Taigi, Ca^{2+} kanalų atsidarymas sąlygoja kelis skirtingus ir tarpusavyje konkuruojančius elektrofiziologinius procesus. Pirma, įtekanti Ca^{2+} srovė depoliarizuoja MN membraną ir padidina Ca^{2+} laidumą per membraną. Antra, kai kurių Ca^{2+} kanalų atsidarymas įtakoja ir kitų kanalų aktyvaciją (K^+ ir Na^+ kanalai). Trečia, įeinantys Ca^{2+} į ląstelę gali sąlygoti įvairius viduląstelinius procesus: fermentų aktyvumo reguliaciją, sinapsinį plastiškumą, membranos elektrinių savybių moduliaciją (apžvelgta Kernell, 2006; Rekling et al., 2000). HVA grupės Ca^{2+} kanalai sąlygoja pėdsekinę depoliarizaciją ir hiperpoliarizaciją bei plato potencialus. LVA grupės Ca^{2+} kanalai sąlygoja VP repoliarizaciją ir pėdsekinę depoliarizaciją (apžvelgta Rekling et al., 2000). L tipo Ca^{2+} jonų kanalai sąlygoja netiesinę sinapsinių MN įėjimo signalų konversiją į MN išėjimo signalus. Taip šie kanalai prisideda prie informacijos apdorojimo ir jos paskirstymo MN. L tipo Ca^{2+} jonų kanalai sąlygoja trumpalaikį funkcinį plastiškumą MN, kuris gali įtakoti motorinius atsakus. Šių kanalų sąlygoti plato potencialai prisideda prie raumenų aktyvavimo ir valdymo procesų. Metabotropinė L tipo Ca^{2+} jonų kanalų moduliacija prisideda prie sinapsinių signalų apdorojimo MN (Perrier et al., 2002).

2.3. Nuolatinės įtekančios joninės srovės motoneuronuose

Nuolatinės įtekančios joninės srovės (PIC) rastos įvairiuose neuronų tipuose ir pasižymi funkcijų įvairove. Dendritinėje neuronų srityje susidarančios PIC yra stipriausios, ypač nugaros smegenų neuronuose. PIC veikia kaip sinapsinių potencialų stiprintuvas (Heckman et al., 2008; Schwindt ir Crill, 1980a,b). Pirmąkart detaliai nuolatinė įtekanti joninė srovė MN *in vitro* buvo ištirta vėžlio nugaros smegenyse (Hounsgaard ir Kiehn, 1985). Buvo iširtas jos joninis susidarymo mechanizmas. Membranos įtampos fiksavimo metodas žinduolių nugaros smegenų MN *in vivo* patvirtino PIC srovių egzistavimą (Lee ir Heckman, 1999).

Ilgalaikės joninės srovės, aktyvuojamos įtampos valdomų joninių kanalų, stebimos esant iki slenkstinėms neuronų membranos potencialo vertėms. Šios srovės gali būti pakankamai stiprios, kad sukeltų MN savaiminę depoliarizaciją ir toninį VP generavimą (apžvelgta Kernell, 2006; Schwindt ir Crill, 1980a,b; Lee ir Heckman, 2001). Buvo pastebėta, kad esant pastovios amplitudės stimuliuojančioms iki slenkstinėms srovėms toninis VP generavimas MN nebūdavo inicijuojamas tol, kol neįsijungdavo PIC. Taigi, MN savybės toniškai generuoti VP nebuvimas gali būti sąlygotas susilpnėjusių ar visai nesančių PIC. Iki slenkstinės PIC gali būti svarbios sukuriant vietinius gradualius potencialus, kurie reikalingi membranos potencialą pakelti iki slenkstinio potencialo lygio pakankamai greitai, siekiant išvengti greitos Na⁺ kanalų inaktyvacijos (Heckman et al., 2008).

PIC sukelia dviejų tipų joniniai kanalai ir srovės: L-tipo Ca²⁺ kanalai (Ca_{v1.3}) (Delgado-Lezama et al., 1997; Hounsgaard ir Kjaerulff, 1992) ir Na⁺ kanalai (Li ir Bennett, 2003; Li et al., 2004; Powers ir Binder, 2001), kurie pasižymi lėta inaktyvacija. Ca²⁺ PIC ir Na⁺ PIC būdingas skirtingas veikimas.

Ca²⁺ PIC aktyvuojasi lėtai (laiko konstanta apie 50 ms), bet yra ilgalaikė (Bennett et al., 1998b; Heckman et al., 2008; Lee ir Heckman, 1998; Li ir Bennett, 2003; Li et al., 2004; Svirskis ir Hounsgaard, 1997). Ca²⁺ PIC tai pat sąlygoja MN "apšilimo" efektą, kuomet depoliarizuojančių stimulų sekos,

kartojamos tam tikru dažniu, sukelia vis didėjančios amplitudės PIC (Bennett et al., 1998a; Lee ir Heckman, 1998; Moritz et al., 2007; Svirskis ir Hounsgaard, 1997; Russo ir Hounsgaard, 1994, 1999). Laikinėmis charakteristikomis šis procesas panašus į sinapsinę facilitaciją.

Na^+ PIC aktyvuojasi greitai, tačiau pasižymi ir greitesne inaktyvacija (Harvey et al., 2006c; Kuo et al., 2006; Lee ir Heckman, 1999; Li ir Bennett, 2003). Na^+ PIC yra svarbi VP iniciavime esant toniniam VP generavimui (Harvey et al., 2006c; Kuo et al., 2006; Lee ir Heckman, 2001; Theiss et al., 2007).

MN membranos potencialo valdomos PIC pasižymi autoregeneracinėmis savybėmis. Šios srovės sumuojasi su sinapsinėmis srovėmis ir tokiu būdu gali stiprinti neuronų žadinimą. PIC srovės sąlygoja plato potencialus ir membranos potencialo bistabilumą (Hounsgaard ir Kiehn, 1985; Hounsgaard et al., 1988a; Hounsgaard ir Kjaerulff, 1992; Hultborn et al., 2004).

Yra nemažai tyrimų, kurie rodo, kad PIC sąlygojantys joniniai kanalai yra lokalizuoti distalinėse dendritų vietose. PIC lengviau aktyvuojamos MN sinapsiniuose įėjimuose, dendritiniame medyje nei MN somoje (Bennett et al., 1998b; Heckman et al., 2008; Lee ir Heckman, 2001).

2.3.1. L tipo Ca^{2+} srovės

L tipo Ca^{2+} kanalai priklauso membranos potencialo valdomų kanalų šeimai. Kanalas sudarytas iš 5 subvienetų, kurie formuoja porą. Vėžlio nugaros smegenų MN randami du tipai šių kanalų $\text{Ca}_{v1.2}$ ir $\text{Ca}_{v1.3}$ (Alaburda et al., 2002b; Perrier et al., 2002; Simon et al., 2003). Buvo manoma, kad L tipo Ca jonų kanalai atsidaro, kai membranos potencialas yra teigiamesnis nei -10 mV. Tačiau $\text{Ca}_{v1.3}$ kanalai atsidaro prie neigiamesnių membranos potencialų (apie -45 mV), $\text{Ca}_{v1.2}$ prie teigiamesnių potencialų (Koschak et al., 2001). L tipo kanalų aktyvacija yra sąlyginai lėta (apie 7 ms) (Mermelstein et al., 2000). Dėl šios priežasties L tipo kanalai labiausiai aktyvuojami esant nuolatinei arba tam tikro dažnio kartotinai membranos depoliarizacijai. Kanalų inaktyvacija tai pat

lėtos kinetikos. Šios minėtos L tipo Ca^{2+} kanalų savybės sąlygoja nuolatinės įtekančias jonines sroves (Perrier et al., 2002). $\text{Ca}_{v1.2}$ kanalai vėžlio nugaros smegenų MN lokalizuoti somos ir aksonų membranose, o $\text{Ca}_{v1.3}$ kanalų subvienetai randami somoje ir dendrituose. $\text{Ca}_{v1.3}$ kanalai lokalizuoti priešsinapsinėse MN srityse, o $\text{Ca}_{v1.2}$ ne (Simon et al., 2003). Toks šių kanalų pasiskirstymas MN membranoje sąlygoja, kad $\text{Ca}_{v1.3}$ kanalai labiausiai yra atsakingi už PIC ir plato potencialus vėžlio MN (Alaburda et al., 2002b; Perrier et al., 2002; Simon et al., 2003).

2.3.2. Nuolatinė Na^+ srovė

Viena iš iki slenkstinių sinapsinių srovių yra nuolatinė Na^+ srovė (I_{NaP}). Ši joninė srovė buvo pirmą kartą aptikta *Rana esculenta* neurono mielinizuoto aksono Ranvje sąsmaukose (Dubois ir Bergman, 1975). I_{NaP} aktyvuojama esant membranos potencialui apie 10 mV neigiamesniam nei trumpalaikė Na^+ srovė (I_{NaT}) ir yra mažesnė (Brown et al., 1994; Magistretti et al., 2006; Urbani ir Belluzzi, 2000). Nustatyta, kad I_{NaP} dydis siekia tik apie 1 % I_{NaT} (Crill, 1996; Urbani ir Belluzzi, 2000). Atsižvelgiant į didelį MN membranos laidumo pokytį veikiant I_{NaT} , absoliutus laidumo pokytis I_{NaP} atveju yra pakankamai didelis, kad sukeltų reikšmingą membranos depoliarizaciją iki slenkstiniame lygyje, kai bendras membranos laidumas yra nedidelis. I_{NaP} didina MN sužadynamumo lygį (Kuo et al., 2006; Lee ir Heckman, 2001; Li ir Bennett, 2003), dalyvauja lokomotorinių atsakų ritmo generavime (Zhong et al., 2007; Tazerart et al., 2008) ir sustiprina MN sinapsinius įėjimus (Manuel et al., 2007). I_{NaP} yra svarbi sinapsinių signalų integracijos procesuose. Ši joninė srovė gali būti modifikuojama neuromediatoriais: serotoninu ir norepinefrinu (Harvey et al., 2006b). Žinoma, kad padidėjęs MN sužadynamumo lygmuo dėl I_{NaP} poveikio (Kuo et al., 2006; Lee ir Heckman, 2001; Li ir Bennett, 2003) didina MN perdavimo funkciją didėjant VP dažniui (Kuo et al., 2006). Suaugusių žiurkių nugaros smegenų MN tyrimuose nebuvo pastebėta koreliacijos tarp MN f-I kreivės statumo (Dubois ir Bergman, 1975) ir I_{NaP}

dydžio (Harvey et al., 2006c). CA1 piramidiniuose neuronuose I_{NaP} sumažina neuronų perdavimo funkcijos vertę (Vervaeke et al., 2006).

2.3.3. Plato potencialai

Nugaros smegenų MN savybė generuoti plato potencialus yra būdinga įvairiems stuburiniams gyvūnams (Kiehn ir Eken, 1998): vėžlio (Alaburda et al., 2002b; Perrier et al., 2002; Simon et al., 2003), katės (Bennett et al., 1998a; Hounsgaard et al., 1988a; Lee ir Heckman, 1998), pelės (Carlin et al., 2000), varlės (Perrier ir Hounsgaard, 2000) bei žmonių MN (Collins et al., 2001). Plato potencialas – tai ilgai (sekundžių eilės) trunkanti membranos depoliarizacija, stebima išjungus depoliarizuojantį stimulą. Ši depoliarizacija yra palaikoma vidinių neurosavybių. Plato potencialo kilmė siejama su membranos potencialo valdoma nuolatine įtekančia jonine srove (PIC), kuri aktyvuojama esant membranos potencialo depoliarizacijai (Schwindt ir Crill, 1977) ir palaikoma L tipo Ca^{2+} kanalų ($Ca_{v1.3}$) aktyvumo (Hounsgaard ir Mintz, 1988; Perrier ir Hounsgaard, 1999; Alaburda et al., 2002b; Simon et al., 2003). Taigi plato potencialams susiformuoti reikia nuolatinių įtekančių joninių srovių (Svirskis ir Hounsgaard, 1997), kurias sukuria Ca^{2+} judėdami per L tipo Ca^{2+} kanalus ir taip padidina MN membranos laidumą (Hounsgaard ir Kiehn, 1989). MN plato potencialai generuojami arti slenkstinės membranos potencialo vertės (10-30 mV membranos potencialo depoliarizacija) (Svirskis ir Hounsgaard, 1998). Plato potencialai aktyvuojasi lėtai ir po tam tikro užlaikymo, o MN membranos depoliarizacija sustiprina L tipo Ca^{2+} kanalų aktyvumą (Alaburda et al., 2002b). MN plato potencialai atsakingi už MN bistabilumą (Hounsgaard ir Kiehn, 1985; Hounsgaard ir Mintz, 1988). Dėl lėtos šių kanalų kinetikos ir inaktyvacijos nebuvimo, L tipo Ca^{2+} kanalai generuoja stabilias, membranos potencialo valdomas nuolatinės įtekančias Ca^{2+} sroves. Plato potencialus generuojantys MN gali būti dviejose stabiliose bet skirtingose funkcinio požiūriu būsenose. Plato potencialų slenkstis gali būti žemesnis už VP slenkstinę vertę, tuomet plato potencialai padidina membranos

depolarizaciją ir MN pereina į VP generavimo režimą. Plato potencialo slenkstinei vertei esant didesnei už VP slenkstį, plato potencialai prisideda prie MN VP dažnio modifikavimo proceso (Kiehn ir Eken, 1998). MN plato potencialai gali būti modifikuojami acetilcholino, glutamato ar serotonino neuromediatorių. Šie neuromediatoriai tiesiogiai aktyvuoja L tipo Ca^{2+} kanalus (Hounsgaard ir Kiehn, 1989; Svirskis ir Hounsgaard, 1998). Trumpalaikis viduląstelinės Ca^{2+} koncentracijos padidėjimas stiprina plato potencialus ir parodo, kad skirtingi neuromodulatoriai aktyvuojantys L tipo Ca^{2+} kanalus veikia per IP3 (Perrier et al., 2000). Membranos potencialo valdomos PIC MN gali būti maskuojamos ir slopinamos ištekantių joninių srovių. Kartais tik blokavus ištekantią joninę srovę, PIC gali inicijuoti plato potencialus (Hounsgaard ir Kiehn, 1985; Hounsgaard ir Mintz, 1988).

2.4. Motoneuronų savybių moduliacija

Motoneuronų sinapsiniai įėjimai yra veikiami priešsinapsinių neuronų išskiriamų neuromediatorių: amino rūgščių, aminių, peptidų, kurie sąveikauja su posinapsinėje MN membranoje esančiais jonotropiniais ir metabotropiniais receptoriais. Posinapsinėje membranoje yra gausu ligandų valdomų joninių kanalų, kurie aktyvuojami neuromediatoriumi prisijungus prie receptoriaus. Ligandų valdomų specifinių joninių kanalų atsidarymas sąlygoja tam tikras jonines sroves MN. Tas pats neuromediatorius gali turėti ir jungtis prie jonotropinių arba metabotropinių receptorių. Skirtingų tipų receptoriai net ir veikiant tam pačiam neuromediatoriumi, turės skirtingą poveikį MN specifinėms savybėms (apžvelgta Rekling et al., 2000).

Neuronai gali būti žadinami acetilcholino (ACh), serotonino (5-HT), norepinefrino, noradrenalino ar glutamato (glu) moduliacinio poveikio. Moduliacinis poveikis sustiprina MN atsakus, palengvina MN sužadimumą. Glutamatas jungiasi prie 3 tipų jonotropinių receptorių (GluR), kurie skirstomi pagal tai, kokios farmakologinės medžiagos gali prisijungti prie šių receptorių ir atidaryti joninius kanalus: AMPA ir Kainato receptoriai atidaro jonų kanalus

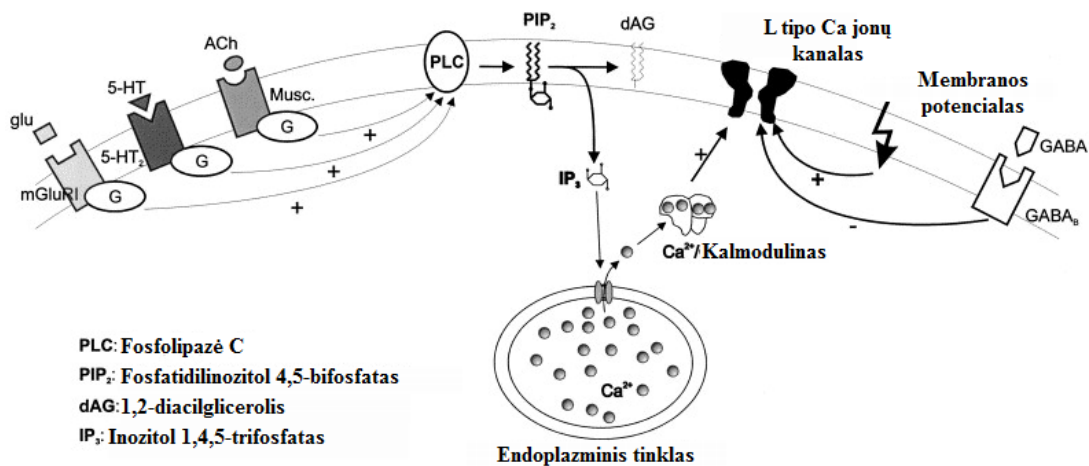
laidžius Na^+ ir K^+ , o NMDA receptoriai - Na^+ , K^+ ir Ca^{2+} . Glutamatas tai pat jungiasi ir prie metabotropinių mGluR receptorių. ACh jungiasi prie jonotropinių nikotinių receptorių (nAChR), kurie atidaro joninius kanalus laidžius Na^+ ir K^+ ir metabotropinių muskarininių receptorių (mAChR). Serotoninas jungiasi prie jonotropinių 5-HT₃ receptorių, kurie atidaro joninius kanalus laidžius Na^+ ir K^+ ir metabotropinių 5-HT_{1,2,4-7} receptorių.

MN slopinimas vyksta veikiant GABA ir glicino receptoriams. GABA_A jonotropiniai receptoriai atidaro Cl^- kanalus ir didina membranos laidumą. GABA_B metabotropiniai receptoriai lokalizuoti tiek priešsinapsinėse tiek ir posinapsinėse struktūrose. Priešsinapsinėje membranos dalyje GABA_B aktyvuoja K^+ sroves ir mažina Ca^{2+} sroves (apžvelgta Rekling et al., 2000).

Taigi, glutamato, serotonino ir acetilcholino jonotropiniai receptoriai laidūs Na^+ , todėl jų aktyvacija didina neuronų sužadynamumą. GABA ir glicino jonotropiniai receptoriai laidūs Cl^- , todėl jų aktyvavimas sąlygoja slopinimo efektus neurone (apžvelgta Rekling et al., 2000).

Moduliacinės sistemos sąlygoja neuronų savybių valdymą ir kontrolę, o tokių sistemų gausa ir įvairovė užtikrina platų neurono savybių moduliavimą. Įvairios MN moduliacinės sistemos neurono sužadynamumui valdyti naudoja bendrus efektorinius mechanizmus ir antrinius informacijos nešiklius (Rekling et al., 2000).

Moduliacinis poveikis vėžlio nugaros smegenų MN galimas per L tipo Ca^{2+} kanalų veiklos valdymą (Perrier et al., 2002, 2003; Perrier ir Hounsgaard, 2003; Hounsgaard ir Kiehn, 1985, 1989; Alaburda et al., 2002b; Alaburda ir Hounsgaard, 2003; apžvelgta Rekling et al., 2000; Guertin ir Hounsgaard, 1998) (Pav. 2.7). Šiuo atveju MN aktyvumą didina neuromediatoriai: acetilcholinas, serotoninas ir glutamatas. ACh jungiasi prie muskarininių metabotropinių acetilcholino receptorių (mAChR), serotoninas jungiasi prie metabotropinių 5HT₂ arba 5HT_{1A} receptorių, o glutamatas prie metabotropinių mGluR₁ receptorių.



Pav. 2.7. L tipo Ca²⁺ kanalų moduliavimo schema vėžlio nugaros smegenų motoneuronų membranoje. Čia: *G* - baltymai; *ACh* - acetilcholinas (*Musc.* - muskarininis receptorių); *glu* - glutamatas (*mGluR1* - receptorių); *5-HT* - serotoninas (*5-HT₂* - receptorių); *GABA* - Gama amino sviesto rūgštis (*GABA_B* - metabotropinis receptorių); +/- - žadinantis/slopinantis poveikis (adaptuota iš Perrier et al., 2002).

Metabotropinių receptorių atveju, specifinių receptorių aktyvinti G baltymai veikia fosfolipazę C (PLC) (per PIP₂), kuri sintetina IP₃ ir dAG. IP₃ jungiasi prie receptorių, kurie susiję su Ca²⁺ kanalais, lokalizuotais neurono endoplazminiame tinkle. Ca²⁺ judant iš endoplazminio tinklo saugyklų į citoplazmą, jis jungiasi su kalmodulinu. Ca²⁺-kalmodulino kompleksas aktyvuoja L tipo Ca²⁺ kanalus MN membranoje ir sąlygoja tokius MN atsakus kaip plato potencialai (Perrier ir Hounsgaard, 2003; Hounsgaard ir Kiehn, 1985, 1989; Alaburda et al., 2002b; apžvelgta Rekling et al., 2000; Perrier et al., 2002; Delgado-Lezama et al., 1997; Hounsgaard et al., 1984; Lee ir Heckman, 1998). Posinapsiniai efektai (plato potencialai) sąlygoti L tipo Ca²⁺ kanalų MN yra slopinami aktyvuojant metabotropinius GABA_B receptorių (Perrier et al., 2002). Endogeninis GABA sąlygoja toninio tipo joninę srovę, kuri didina membranos laidumą (Castro et al., 2011).

Serotoninas MN žinomas kaip žadinantis neuromediatorius, tačiau naujausi tyrimai rodo, kad jo poveikis MN sužadinumui priklauso nuo to, kokie receptoriai aktyvuojami. Metabotropiniai 5-HT₂ receptoriai sąlygoja MN sužadimumo padidėjimą ir sukelia plato potencialus veikdami L tipo Ca²⁺ kanalus (Hounsgaard ir Kiehn, 1989; Perrier ir Hounsgaard, 2003; Simon et al.,

2003) arba I_{NaP} (Harvey et al., 2006a). 5-HT sąlygoja membranos potencialo depoliarizaciją susijusią su membranos įėjimo varžos padidėjimu (Hsiao et al., 1997). Serotoninas didina MN sužadimumą slopindamas pėdsekine hiperpolarizaciją (Grunnet et al., 2004; Hounsgaard et al., 1988b; Hsiao et al., 1997) ir mažina slenkstinę membranos potencialo vertę potencialo valdomiems Na^+ kanalams, kurie inicijuoja VP generavimą (Fedirchuk ir Dai, 2004). Tačiau serotoninas gali veikti MN ir slopinančiai (Perrier ir Cotel, 2008). Plato potencialai generuojami aktyvuojant 5-HT₂ receptorius, kurie lokalizuoti somatodendritinėje MN dalyje, o slopinimo efektą sąlygoja 5-HT_{1A/7} receptoriai lokalizuoti vėžlio nugaros smegenų MN perisomatineje dalyje (Perrier ir Cotel, 2008). Tikslus 5-HT slopinimo efekto mechanizmas MN dar nėra pilnai iširtas.

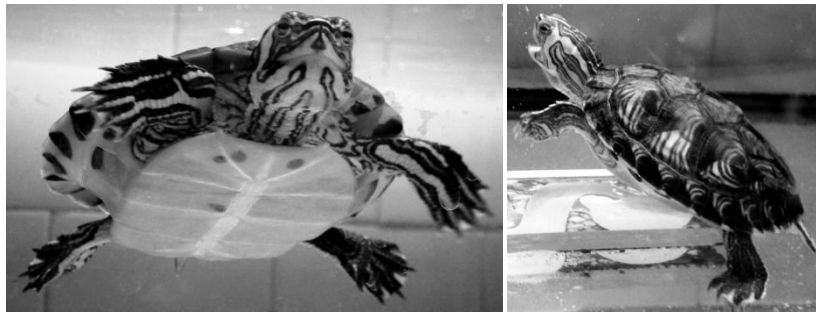
L tipo Ca^{2+} kanalai gali būti moduluojami ir jonotropinių NMDA receptorių. Tai sąlygoja MN membranos potencialo osciliacijas ir didina MN sužadimumo lygį (Guertin ir Hounsgaard, 1998).

Taigi, skirtingi neuromediatoriai veikia specifinius bei skirtingus receptorius, tačiau moduliacijos neurotransdukcinius kelias yra bendras (apžvelgta Rekling et al., 2000). Pirma, glutamato metabotropiniai ir 5-HT receptoriai veikia K^+ nuotėkio srovės arba katijoninę įtekančią srovę. Dėl mediatorių poveikio šioms srovėms, pakinta MN membranos ramybės potencialas ir įėjimo varža. Nuotėkio srovės sumažėjimas ir įtekančių srovių aktyvacija sąlygoja membranos depoliarizaciją. Antra, norepinefrino ir 5-HT moduliacinės sistemos veikia hiperpolarizacijos aktyvuojamą įtekančią nespecifinę katijoninę srovę ir didina MN sužadimumą. Trečia, Glutamato metabotropiniai ir 5-HT receptoriai moduluoja Ca^{2+} kanalus, o tai sąlygoja pėdsekine hiperpolarizaciją (I_{KCa}) ir membranos depoliarizaciją (plato potencialai). Tai įtakoja MN įėjimo ir išėjimo signalus (apžvelgta Rekling et al., 2000).

3. METODIKA

3.1. Tyrimo objektas

Eksperimentai atlikti naudojant raudonausius vandens vėžlius (*Chrysemys scripta elegans*, n=30). Vėžliai buvo laikomi Vilniaus universiteto, gamtos mokslų fakulteto vivariume, specialiuose akvariumuose su vandens filtravimo ir apšvietimo (dienos ir UV šviesa) sistema. Šildytuvų pagalba buvo palaikoma pastovi vandens temperatūra (apie +24⁰C). Vėžliai maitinti reguliariai (3 kartus per savaitę) specialiu vėžliams skirtu maistu. Tyrimams naudoti suaugę ir sveiki vėžliai (300 - 500 g).

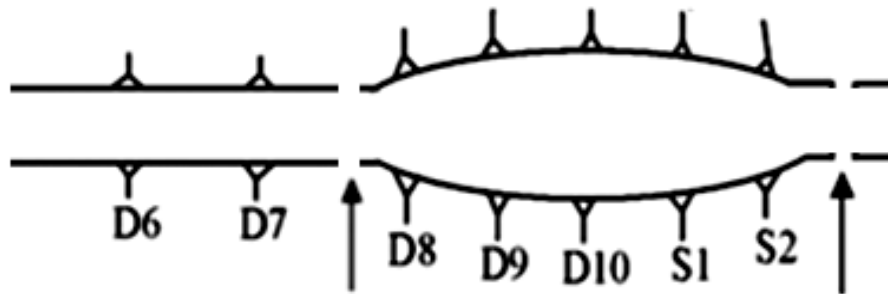


Pav. 3.1. Raudonausiai vandens vėžliai (*Chrysemys scripta elegans*).

3.2. Nugaros smegenų preparavimas ir pjūvių paruošimas

Visi eksperimentai ir gyvūnų paruošimas jiems buvo atlikti griežtai laikantis Lietuvos ir Europos sąjungos elgesio su laboratoriniais gyvūnais reikalavimų. Prieš eksperimentą tiriamasis vėžlys buvo dedamas į ledo vonelę ir laikomas joje 2 valandas iki operacijos. Tai sąlygodavo hipotermine anesteziją (Melby ir Altman, 1974). Eksperimentai atlikti kambario temperatūroje. Po dviejų valandų vėžlys pirmiausia būdavo dekapituojamas ir tuomet pradėdama nugaros smegenų operacija. Pirmiausia vėžlio kraujas būdavo pakeičiamas Ringerio tirpalu (joninė sudėtis (mM): 120 NaCl; 5 KCl; 15 NaHCO₃; 2 MgCl₂; 3 CaCl₂; 20 gliukozė; tirpalas prisotintas 98 % O₂ ir 2

% CO₂; pH 7,6) prijungus perfuzinę sistemą prie gyvūno širdies. Tuomet kartu su kauline vėžlio kiauto dalimi buvo išpreparuojami 5 nugaros smegenų segmentai (nuo D8 iki S2).



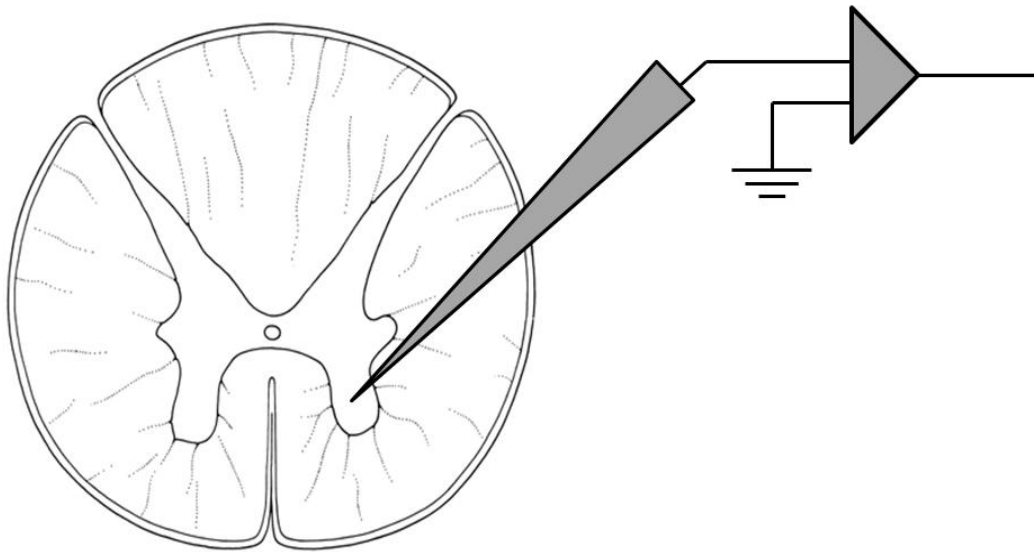
Pav. 3.2. Vėžlio nugaros smegenų segmentai (juosmeninis smegenų išplatėjimas). Rodyklės rodo tyrimams naudojamą smegenų sritį (D8 - S2).

Iš stuburo kanalo chirurginiu būdu išpreparuotos smegenys buvo patalpintos Ringerio tirpale (+5 °C). Specialia besisukančio disko pjaustykle nugaros smegenys buvo pjaustomos 2 mm storio riekelėmis. Pjaustymo metu smegenys buvo laikomos Ringerio tirpale. Smegenų pjūviai buvo laikomi Ringerio tirpale (+5 °C) šaldytuve.

3.3. Elektrinių potencialų registracija

Elektrinių signalų registracijos ir stimuliacijos metu nugaros smegenų pjūviai buvo patalpinti specialioje organinio stiklo vonelėje ir nuolatos perfuzuojami Ringerio tirpalu prisotintu deguonimi (98 % O₂ ir 2 % CO₂) kambario temperatūroje. Eksperimentams buvo naudoti mažo konuso kampo stikliniai viduląsteliniai mikroelektrodai, pagaminti iš stiklinių (borosilikatinis stiklas) plonasienių kapiliarų su mikrofilamentu (išorinis/vidinis diametras: 1,5/1,12 mm, TW150F-4, WPI) naudojant specializuotas elektrodų gamybos stakles (PULL 100, WPI). Pagamintos mikropipetės užpildytos elektrolito tirpalu turinčiu (0,9 M) C₃H₃KO₂ ir (0,1 M) KCl. Tokių mikroelektrodų

impedansas buvo apie 30 M Ω . Tas pats mikroelektrodas buvo naudojamas elektrinių signalų registravimui ir elektriniam stimuliavimui.



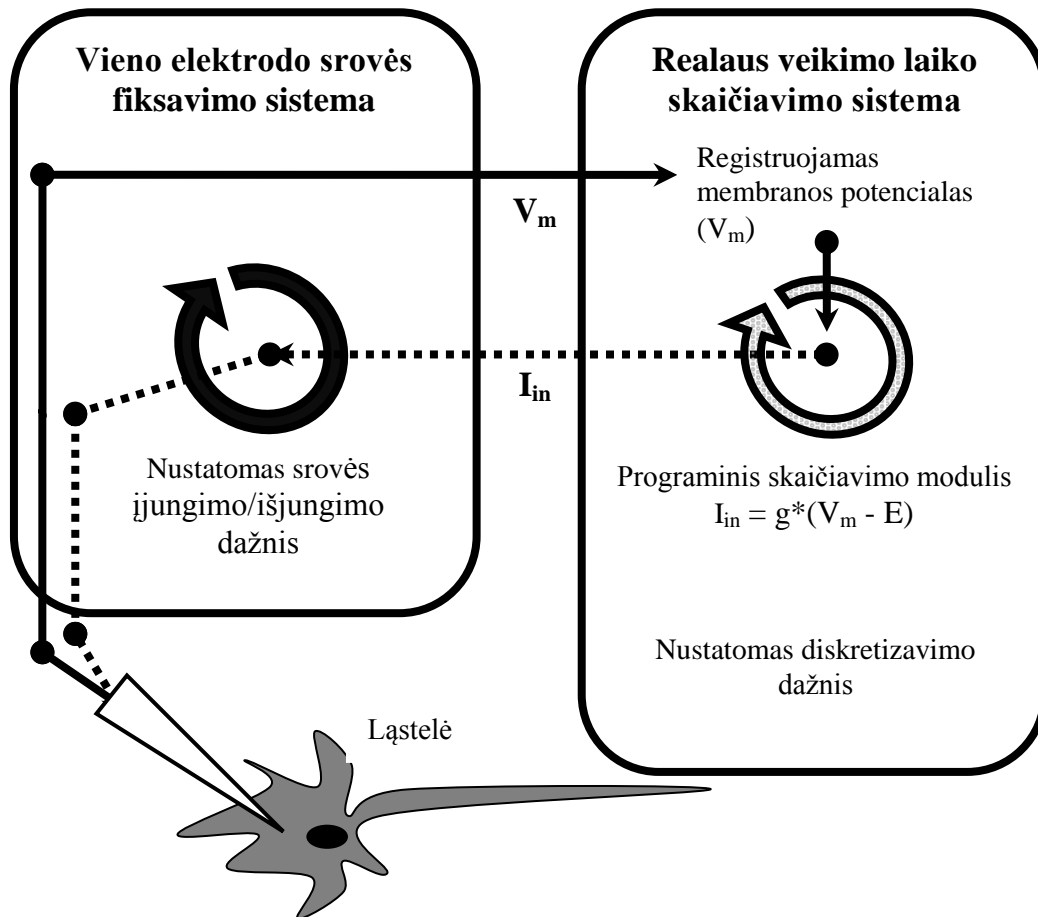
Pav. 3.3. Vėžlio nugaros smegenų motoneuronų viduląstelinio registravimo schema. Pavaizduotas nugaros smegenų pjūvis ir stiklinis mikroelektrodas su elektrinių signalų stiprintuvu.

Viduląstelinis MN elektrinių potencialų registravimas ir MN elektrinis stimuliavimas buvo atliekamas taikant srovės fiksavimo metodą. Tam naudotas neuronų tyrimams skirtas biopotencialų stiprintuvas (Axoclamp-2B, Molecular Devices) ir eksperimento valdymo programinė įranga pCLAMP 10.2 (Molecular Devices). Tyrimams buvo pasirenkami MN pagal kelis elektrinių parametru kriterijus: ramybės potencialas buvo stabilus ir neigiamesnis už -50 mV, neuronai nepasižymėjo spontaniniu aktyvumu, o veikimo potencialų amplitudė buvo didesnė nei 70 mV (McDonagh et al., 1999). Analogas-kodas keitiklio signalo diskretizacijos dažnis 10 kHz, signalo kvantavimas 16 bitų (Digidata 1440A, Molecular Devices). Registruojami duomenys buvo įrašomi ir saugomi kompiuterio standžiajame diske tolimesnei analizei ir interpretacijai.

3.4. Dinaminis srovės fiksavimo metodas

Dinaminis srovės fiksavimas yra realaus laiko elektrofiziologinis metodas, skirtas eksperimentiškai valdyti tyrėjo pasirinktų neurono membranos joninių kanalų laidumus (aktyvuoti arba inaktyvuoti) naudojant viduląstelinį mikroelektrodinį potencialų registravimą. Dinaminio srovės fiksavimo metodo principas paremtas uždaros virtualios arba realios elektrinės grandinės sudarymu su grįžtamu ryšiu (Pav. 3.4). Pirmiausiai sukuriamas matematinis membranos kanalų ir jų laidumų modelis. Realiu laiku dinaminio srovės fiksavimo sistema registruoja neurono membranos potencialo vertę, pagal kurią apskaičiuojamas įleidžiamos į ląstelę srovės dydis. Eksperimentatorius nustato norimų tirti kanalų laidumų vertes, o membranos potencialo registravimo-neurono stimuliavimo sistema reguliuoja realiu laiku leidžiamos į ląstelę srovės dydį ir trukmę priklausomai nuo MN membranos potencialo ir reversijos potencialo skirtumo vertės.

Įtekančios nuolatinės Na^+ srovės (I_{NaP}) kompensavimui buvo taikytas minėtas dinaminis srovės fiksavimo metodas (Sharp et al., 1993). Kintamos amplitudės srovės stimulai buvo nustatomi realiu laiku vertinant neurono membranos potencialo vertę (membranos potencialo verčių diskretizavimo dažnis 5 kHz) ir taikant kompiuterinę programinę įrangą LabView (National Instruments). Ši programa, veikdama kartu su C++ kompiuterinio programavimo kalba parašytu programiniu moduliu, nustatydavo srovės stimulų vertes atsižvelgiant į membranos laidumų ir momentinio membranos potencialo vertes. Įleidžiamos į neuroną srovės vertė buvo priešinga I_{NaP} vertei iki slenkstiniame membranos potencialo lygmenyje. Atsižvelgiant į tai, kad buvo tiriama tik I_{NaP} įtaka nevykstant nuolatinei MN veikimo potencialų generacijai, buvo laikoma, kad I_{NaP} įsisotina pasiekus slenkstinę membranos potencialo vertę.



Pav. 3.4. Dinaminio srovės fiksavimo metodo principinė schema. Čia: V_m - realus neurono membranos potencialas; I_{in} - į ląstelę įleidžiama srovė, kurios vertė nustatoma programiniu būdu taikant matematinį modelį, kuriuo nustatomas membranos laidumas (g) ir norimas membranos potencialas (E).

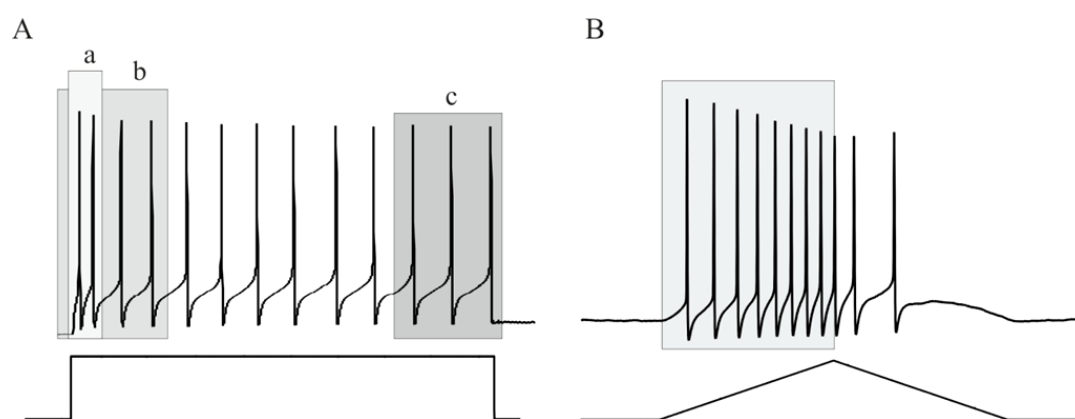
3.5. Perdavimo funkcijos vertinimo metodika

Perdavimo funkcijos statusas buvo vertintas iš eksperimentiškai gautos neurono srovės ir VP dažnio (f - I) priklausomybės. Pirmiausia buvo apskaičiuotas VP dažnis. Jis buvo vertinamas kaip atvirkštinė laiko tarp dviejų gretimų veikimo potencialų vertė. Srovės - dažnio priklausomybė buvo tirta MN nuolatinio VP generavimo metu, naudojant stačiakampius ir trikampus srovės stimulus. VP dažnis, kiekvieno neurono atsako į stimulą metu, buvo suskirstytas į tris diapazonus. Pirmasis dažnių diapazonas buvo vertintas kaip atvirkštinė laiko tarp pirmųjų dviejų VP funkcija (pradinis dažnis), antrasis -

pirmųjų keturių VP dažnių aritmetinis vidurkis (ankstyvasis dažnis) ir trečiasis (stacionarus dažnis) - paskutinio stimulo laiko ketvirčio (po 1,5 s nuo stimulo pateikimo pradžios, t.y. 0,5 s laiko intervalas) VP dažnių aritmetinis vidurkis (viso stimulo trukmė 2 s) (Pav. 3.5.A). VP dažnio ir srovės priklausomybė buvo tiriama visoms trimis VP dažnių grupėms. MN perdavimo funkcija buvo suskirstyta į tris tipus pagal aukščiau aprašytus VP dažnius: pradinė, ankstyvoji ir stacionari.

MN stimuliacijai naudojant trikampus srovės impulsus, VP dažnis buvo vertinamas tik kylančiojoje atsako dalyje (Pav. 3.5.B). VP dažnis skaičiuotas ankščiau minėtu būdu, tik neskirstant VP dažnio į diapazonus. Šiuo atveju buvo gauta viena bendra MN perdavimo funkcija. Tyrime buvo naudoti penkių kilimo greičių trikampiai srovės stimulai: 0,5; 1; 5; 10; 20 nA/s. Maksimali srovė (nuo 2 iki 5 nA) ir kilimo laikas (nuo 100 ms iki 10 s) buvo suderinamas priklausomai nuo norimo stimulo kilimo greičio.

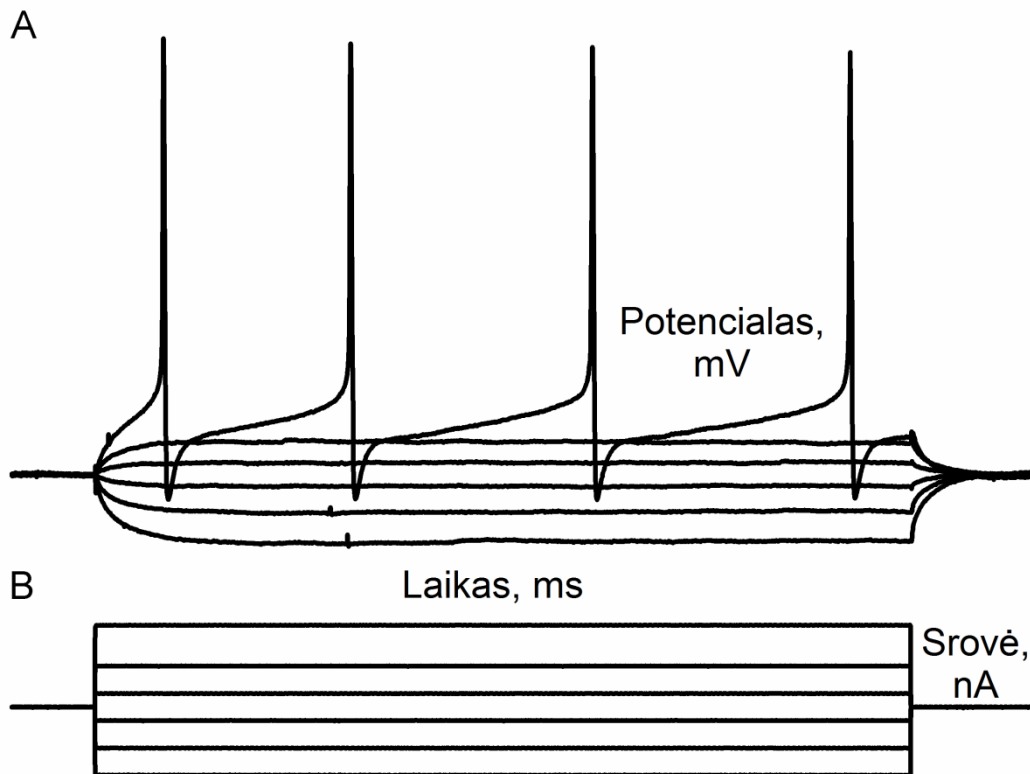
Ne visi tirti MN turėjo pirminę (I) (žiūrėti 2.1.2.8. skyrių „Nugaros smegenų neuronų perdavimo funkcija) f-I sritį, perdavimo funkcijos statusas buvo vertintas kaip antrinės (II), didžiausio polinkio srities statusas.



Pav. 3.5. Motoneurono veikimo potencialai ir jų dažnių vertinimo schema. (A) stačiakampiu srovės stimulu žadinto motoneurono veikimo potencialo grupės ir atitinkami jų dažnių diapazonai: a) pirmieji du veikimo potencialai ir jų dažnis; b) pirmi 4 veikimo potencialai ir jų dažnių vidurkis; c) stimulo paskutinės 0,5 s veikimo potencialų dažniai ir jų vidurkis; (B) trikampi srovės stimulu žadinto motoneurono veikimo potencialai kylančiojoje stimulo dalyje, kurie buvo naudoti perdavimo funkcijos vertinimui.

3.6. Motoneurono membranos įėjimo laidumo ir slenkstinio potencialo matavimai

Pirmiausia buvo įvertinta MN membranos įėjimo varža (r_{in}). Membranos įėjimo varža buvo apskaičiuojama pagal Omo dėsnį: $r_{in} = \Delta U/I$, kur ΔU - potencialų skirtumas tarp ramybės potencialo ir stacionarios iki slenkstinės membranos potencialo vertės, I – potencialų skirtumą sukėlusios srovės vertė. Stimuliuojant ląstelę naudoti mažos amplitudės (0,2-0,6 nA) srovės stimulai, sukeliantys ne didesnę nei 10 mV membranos potencialo pokytį (Pav. 3.6).



Pav. 3.6. Motoneurono elektriniai atsakai į skirtingos amplitudės stačiakampių srovės stimulų poveikį. (A) membranos potencialo atsakas į hiperpolarizuojančius ir depolarizuojančius srovės stimulus; virš slenkstinis stimulus sukelia veikimo potencialų seriją; (B) stačiakampiai srovės stimulai.

MN membranos įėjimo laidumas buvo apskaičiuotas kaip dydis atvirkščiai proporcingas MN membranos įėjimo varžai ($1/r_{in}$). Tai pat buvo įvertintas ir santykinis membranos laidumo pokytis palyginus MN membranos

įėjimo laidumo vertės kontrolinėmis ir farmakologijos (muskimolio) sąlygomis.

Vertinant slenkstinį membranos potencialą (kai generuojamas tik vienas VP) MN buvo stimuliuojami stačiakampiais ir trikampaiais srovės stimulais, o pati srovė reikalinga vienam pirmajam VP sugeneruoti buvo laikoma reobazine srove. Slenkstinis potencialas buvo nustatomas vertinant membranos potencialo kilimo greitį. Slenkstinio potencialo vertė buvo toks membranos potencialas, kai jo momentinis kilimo greitis buvo lygus arba didesnis už 20 V/s (Yu et al., 2008; Munoz ir Fuentealba, 2012).

3.7. Eksperimentų protokolas

1. Nugaros smegenų pjūviai patalpinami į matavimo vonelę su Ringerio tirpalu.
2. Mikroskopo ir mikromanipulatoriaus pagalba stiklinis mikroelektrodas nutaikomas statmenai smegenų pjūviui, ties pilvinių ragų sritimi. Mikroelektrodo galiukui patekus į tirpalą (bet dar nepalietus smegenų pjūvio) vykdoma matavimo sistemos kalibracija: patikrinama mikroelektrodo varža, elektrinio potencialo vertė nustatoma ties nuline verte, vertinamas elektrinių triukšmų lygis ir jų šalinimas.
3. Mikroelektrodas manipulatoriaus pagalba leidžiamas žemyn, pasiekia pjūvio paviršių ir vedamas gilyn (žingsnio dydis 10 μm) į smegenų pjūvį, kol aptinkamas motoneuronas.
4. MN indentifikavimas: MN yra lokalizuoti nugaros smegenų ventraliniuose raguose. Šios struktūros yra matomos mikroskopu ir jo pagalba mikroelektrodo galiuko padėtis nustatoma ties šia sritimi. MN atpažįstami ir elektrofiziologiniais metodais: stebimas potencialų skirtumo pokytis, potencialo kitimo laiko konstanta, VP generavimas, jo pobūdis, amplitudė bei forma. Pagal šiuos parametrus vertinama ar elektrodo galiukas pateko į MN.

5. Pradedamas MN elektrinių savybių tyrimas. Jei ilgesnį laiką (30-60 min) MN membranos ramybės potencialas yra pastovus ir pakankamai neigiamas (žiūrėti 3.3. skyrių "Elektrinių potencialų registracija"), atliekama MN elektrinė stimuliacija kontrolinėmis sąlygomis. Trumpais (200 ms) stačiakampiais srovės stimulais aktyvuojant MN, tiriama MN membranos įėjimo varžą, laiko konstanta, RP vertė, reobazė bei slenkstinis potencialas (Pav. 3.6)
6. Atlikus minėtą MN testavimą, MN stimuliuojama didėjančios amplitudės pavieniais virš slenkstiniais stačiakampiais srovės stimulais kas 20 s, kurių trukmė 2 s. Stimulo srovė didinama kas 0,2 nA, pradedant nuo reobazinės srovės iki 4-5 nA (priklausomai nuo MN įėjimo varžos). Po to daroma 2 minučių pertrauka. Praėjus šiam laikui, MN vėl žadinamas virš slenkstiniais trikampaiais, skirtingo kilimo greičio srovės stimulais. Tokie pat matavimai ir stimuliavimai MN buvo atlikti ir paveikus MN muskimoliu.
7. Tiriant I_{NaP} srovę MN buvo taikyti tik stačiakampiai srovės stimulai bei dinaminis srovės fiksavimo metodas (žiūrėti 3.4. skyrių "Dinaminis srovės fiksavimo metodas"). Naudota farmakologinė medžiaga - TTX.

3.8. Naudotos medžiagos ir tirpalai

Tirpalai:

- Ringerio tirpalas (joninė sudėtis (mM)): 120 NaCl; 5 KCl; 15 NaHCO₃; 2 MgCl₂; 3 CaCl₂; 20 C₆H₁₂O₆; tirpalas prisotintas 98 % O₂ ir 2 % CO₂; pH 7,6;
- Muskimolio tirpalas (2 μM): C₄H₆N₂O + Ringerio tirpalas;
- Tetradotoksino (TTX) tirpalas (1 μM): C₁₁H₁₇N₃O₈ + Ringerio tirpalas.

Medžiagos:

- Gliukozės monohidratas (C₆H₁₂O₆*H₂O; α-D(+); 99,5 %) (ROTH);
- Kalcio chloridas (CaCl₂; 95 %) (ROTH);

- Kalio acetatas ($C_2H_3KO_2$; 99 %) (SIGMA);
- Kalio chloridas (KCl; 99,5 %) (ROTH);
- Magnio chlorhidratas ($MgCl_2 \cdot H_2O$; 99 %) (ROTH);
- Muskimolio hidrobromidas ($C_4H_6N_2O_2 \cdot HBr$) (SIGMA);
- Natrio hidrokarbonatas ($NaHCO_3$; 99,5 %) (ROTH);
- Natriochloridas (NaCl; 99,5 %) (FLUKA);
- Tetradotoksinas (TTX) ($C_{11}H_{17}N_3O_8$) (ALOMONE LABS);

3.9. Naudotos kompiuterinės programos ir statistiniai metodai

Duomenų surinkimas ir analizė atlikta naudojant kompiuterines programas:

- pClamp (Molecular Devices Corporation).
- Excel (Microsoft Office Corporation);
- OriginPro (OriginLab Corporation);
- LabView (National Instruments Corporation)

Duomenų pasiskirstymo normalingumui įvertinti naudotas Shapiro-Wilk W testas. Duomenų skirtumų patikimumui įvertinti taikytas porinis Student t testas. Rezultatai pateikti kaip vidutinės vertės \pm standartinė paklaida (SE). Skirtumai tarp imčių ir lyginamų grupių buvo laikomi reikšmingais, jei $p < 0,05$. Reikšmingi skirtumai pažymėti *.

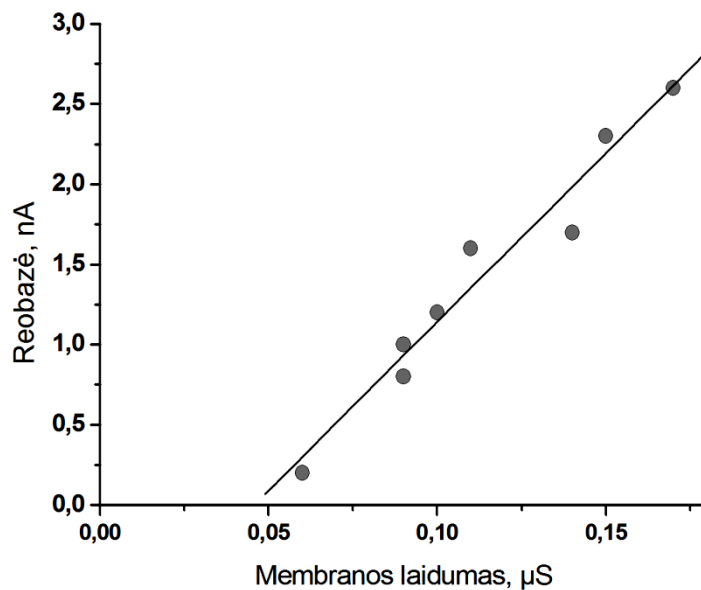
4. REZULTATAI

4.1. Motoneuronų perdavimo funkcijos priklausomybė nuo srovės stimulo tipo ir veikimo potencialų dažnio adaptacijos

4.1.1. Reobazės ir veikimo potencialų slenkščio priklausomybė nuo srovės stimulo tipo

Motoneurono atsakas priklauso nuo įleidžiamos srovės dydžio, todėl tyrimo metu stimuliavimui paprastai naudojami stačiakampiai srovės stimulai (Granit et al., 1963a). Kaip kurie tyrėjai vietoj didėjančios amplitudės stačiakampių srovės stimulų serijos naudoja trikampio pavidalo, kur srovės amplitudė tolygiai pasiekia dominančias vertes (Bennett et al., 2001b; Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Lee ir Heckman, 1998, 2000). Žinoma, kad MN atsakas į virš slenkstinį stačiakampį impulsą nėra pastovus – VP dažnis didžiausias stimulo pradžioje ir vėliau mažėja dėl adaptacijos. MN charakterizuojantys parametrai gali būti įtakojami srovės stimulo pavidalo.

Tyrėme, ar MN charakterizuojantys parametrai skiriasi naudojant trikampus ir stačiakampus srovės stimulus bei ar priklauso nuo trikampio stimulo kitimo greičio. Tirtų MN (n=9) membranos laidumas buvo $0,11 \pm 0,01$ μ S. Membranos slenkstinė srovė reikalinga VP generavimui (reobazė) stačiakampių stimulų atveju buvo $1,40 \pm 0,25$ nA. Buvo stebima stipri teigiama koreliacija ($R^2=0,97$) tarp reobazės vertės ir MN įėjimo laidumo (Pav. 4.1). Teigiama koreliacija tarp reobazės ir MN įėjimo laidumo parodyta katės MN (Gustafsson ir Pinter, 1984).

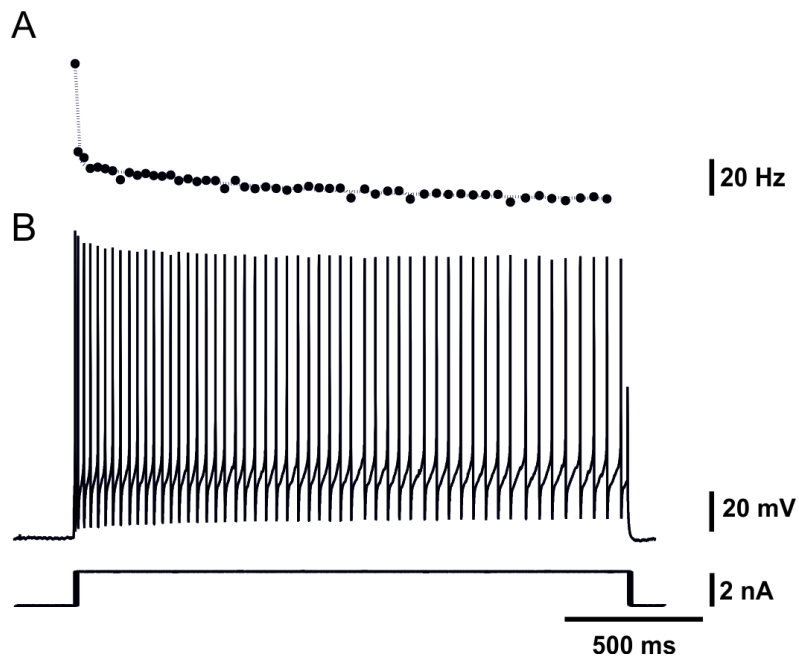


Pav. 4.1. Motoneuronų reobazės ir membranos laidumo priklausomybė. Stebima stipri teigiama koreliacija ($R^2=0,97$); ($n=9$).

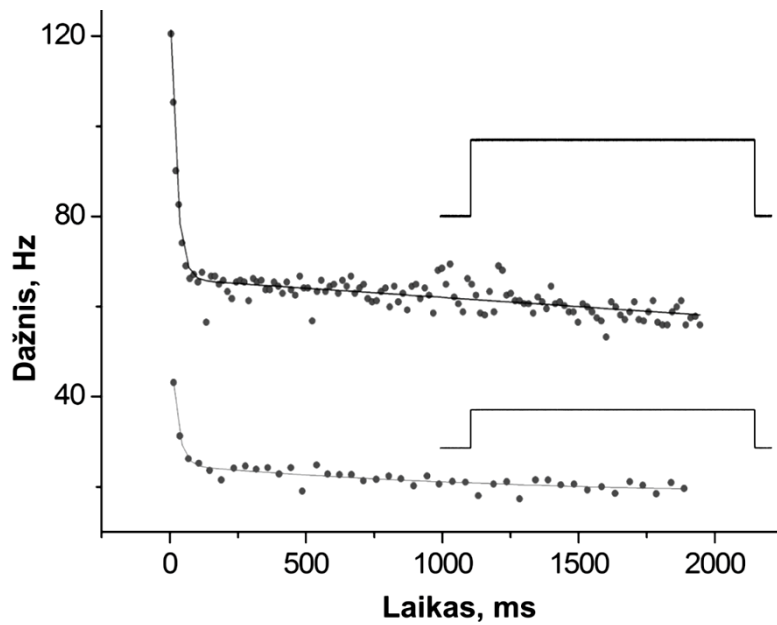
Nepastebėta patikimų statistinių skirtumų tarp slenkstinių srovių taikant stačiakampius ir lėtus (1 nA/s) trikampus srovės stimulus. Trikampio srovės stimulo kilimo greitis neturėjo reikšmingos įtakos slenkstinei membranos srovės vertei.

4.1.2. Perdavimo funkcijos priklausomybės nuo veikimo potencialų dažnio adaptacijos tyrimas taikant stačiakampius srovės stimulus

MN, stimuliuojant juos virš slenkstiniais stačiakampiais srovės stimulus, atsako VP seka su mažėjančiu VP dažniu (Pav. 4.2). VP dažnis mažėja dėl adaptacijos, žinomos daugumoje CNS neuronų (Gorman et al., 2005; Kernell, 1965; Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995, 1997). Kuo didesnis srovės stimulus, tuo stipresnė VP adaptacija (labiau nuo pradinio sumažėja dažnis) (Pav. 4.3). Didėjant stimulo amplitudei, skirtumas tarp pradinio ir stacionaraus VP dažnio didėja, nors stacionarus VP dažnis didėja stiprėjant stimuliacijai. Tyrėme, kaip dėl adaptacijos kinta veikimo potencialų dažnis stimuliuojant MN stačiakampiu 2,9 nA srovės stimulu.

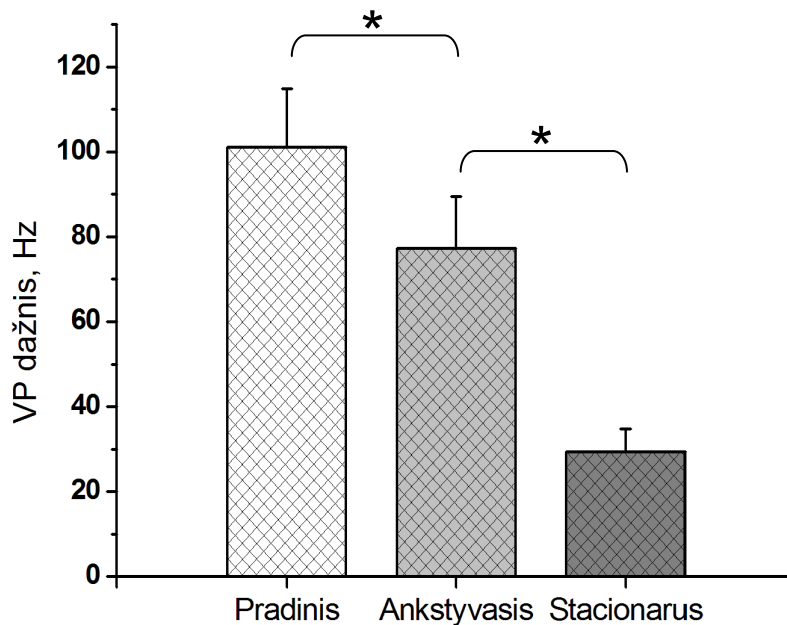


Pav. 4.2. Motoneurono atsakas į virš slenkstinį stačiakampį srovės stimulą. **(A)** motoneurono veikimo potencialų dažnio kitimas stimulo metu; **(B)** membranos potencialo kitimas (veikimo potencialai) stačiakampio srovės stimulo metu.



Pav. 4.3. Motoneurono veikimo potencialo dažnio adaptacija. Motoneurono atsakas į dviejų skirtingos amplitudės stačiakampių srovės stimulų poveikį.

Pradinis veikimo potencialų dažnis buvo ($101,1 \pm 13,8$ Hz) patikimai didesnis $24,7 \pm 2,9$ % ($n=9$) nei ankstyvasis ($77,2 \pm 12,3$ Hz) ir patikimai didesnis $71,2 \pm 3,2$ % nei stacionarus VP dažnis ($29,5 \pm 5,3$) (Pav. 4.4).

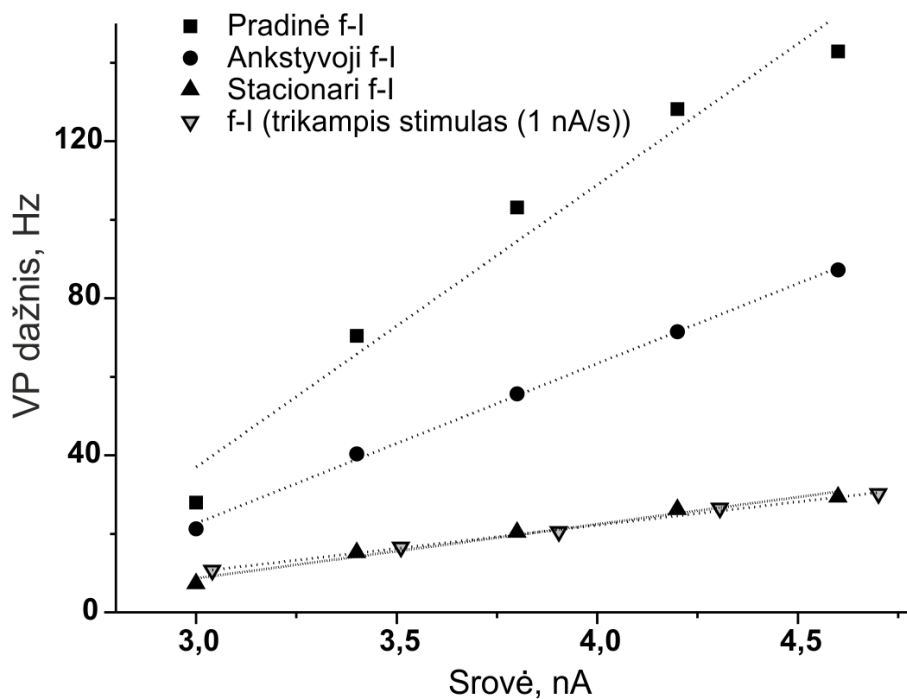


Pav. 4.4. Motoneuronų veikimo potencialų dažnių vidutinės vertės. Atitinkamai pradinis, ankstyvasis ir stacionarus dažniai; stačiakampio stimulo srovės amplitudė buvo $2,9$ nA; paveiksle reikšmingai patikimą skirtumą tarp skirtingų grupių (*) rodo Studento t -reikšmė ($p < 0,05$); $n=9$.

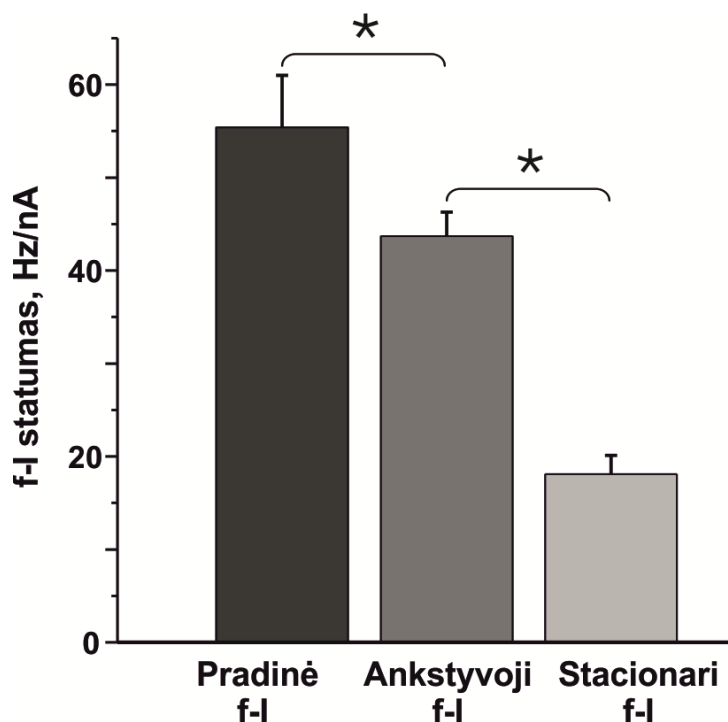
Siekiant nustatyti veikimo potencialų adaptacijos galimą įtaką MN perdavimo funkcijos vertei, buvo vertintas VP dažnio ir srovės priklausomybės ($f-I$) kreivės statusas esant skirtingoms adaptacijos fazėms (pradinė, ankstyvoji ir stacionarioji perdavimo funkcijos) (Pav. 4.5).

Gavome, kad MN pradinės perdavimo funkcijos vertė buvo $56,3 \pm 6,9$ Hz/nA, ankstyvosios perdavimo funkcijos – $43,0 \pm 2,8$ Hz/nA, o stacionariosios – $16,5 \pm 1,1$ Hz/nA ($n=9$) (Pav. 4.6). Pradinė perdavimo funkcija buvo patikimai didesnė $19,2 \pm 5,9$ % už ankstyvąją perdavimo funkciją ir $68,1 \pm 3,7$ % didesnė už stacionarią. Ankstyvosios perdavimo funkcijos vertė buvo patikimai didesnė $60,9 \pm 2,9$ % už stacionarią perdavimo funkciją. Šie rezultatai rodo, kad MN

perdavimo funkcijos vertė reikšmingai mažėja dėl veikimo potencialų adaptacijos.



Pav. 4.5. Motoneurono srovės-dažnio priklausomybė (perdavimo funkcija). Atitinkamai pradinė, ankstyvoji ir stacionari perdavimo funkcijos vertintos taikant stačiakampius srovės stimulus bei lėto kilimo greičio (1 nA/s) trikampus srovės stimulus.

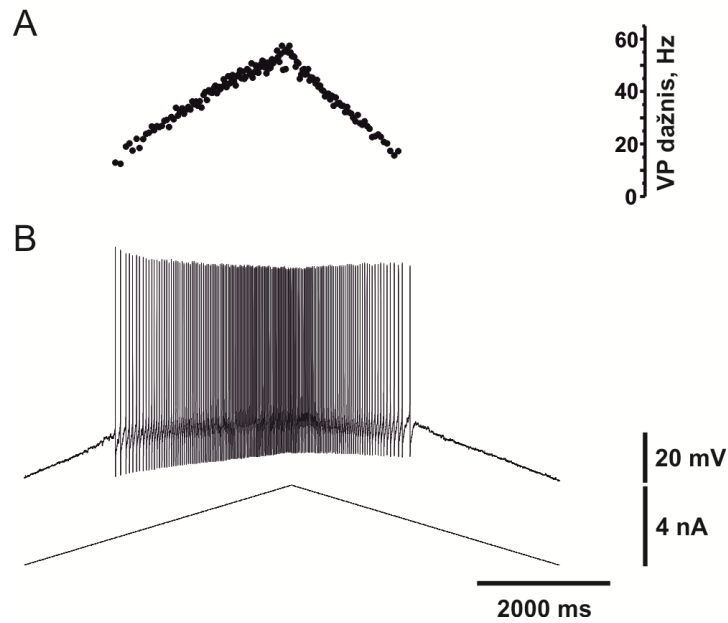


Pav. 4.6. Motoneuronų perdavimo funkcijų (f-I) vidutinės vertės. Pavaizduotos pradinė, ankstyvoji ir stacionarioji perdavimo funkcijos įvertintos stimuliuojant neuronus stačiakampiais stimulai; paveiksle reikšmingai patikimą skirtumą tarp skirtingų grupių (*) rodo Studento *t*-reikšmė ($p < 0,05$); $n=9$.

4.1.3. Perdavimo funkcijos tyrimas taikant trikampus srovės stimulus

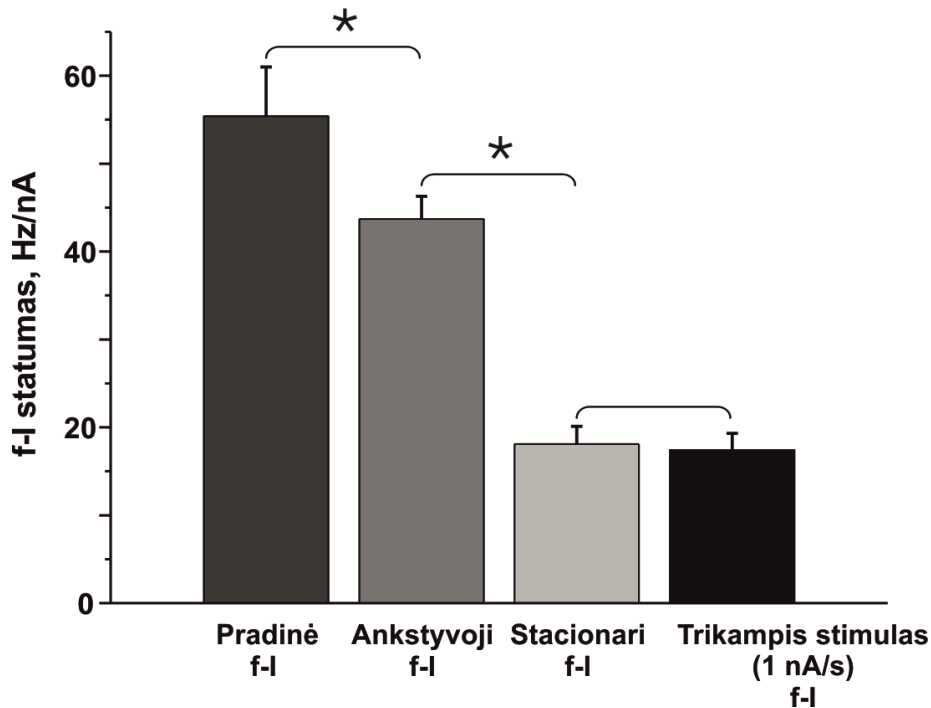
MN perdavimo funkciją galima vertinti ir naudojant trikampus srovės stimulus (Bennett et al., 2001b; Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Lee ir Heckman, 1998, 2000).

MN perdavimo funkcija vertinta žadinant neuronus trikampaiais srovės stimulai (Pav. 4.7). Buvo palygintos MN perdavimo funkcijų vertės įvertintos taikant stačiakampius ir trikampus (1 nA/s kilimo greičio) srovės impulsus (Pav. 4.5 ir 4.8). Perdavimo funkcijos vertė stimuliuojant MN 1 nA/s kilimo greičio trikampių srovės stimulu buvo $15,9 \pm 1,5$ Hz/nA ($n=9$) ir nesiskyrė nuo stacionarios perdavimo funkcijos ($16,5 \pm 1,1$ Hz/nA) įvertintos taikant stačiakampius srovės stimulus.



Pav. 4.7. Motoneurono atsakas į trikampį srovės stimulą. (A) veikimo potencialų dažnio kitimas stimulo metu; (B) membranos potencialo kitimas (veikimo potencialai) trikampio srovės stimulo metu.

Tačiau pradinė perdavimo funkcijos vertė buvo patikimai didesnė $68,1 \pm 4,9$ %, o ankstyvoji didesnė $62,2 \pm 3,8$ % už trikampiais stimulais (1 nA/s) stimuliuotų MN vertintą perdavimo funkciją ($n=9$) (Pav. 4.8). Šie rezultatai rodo, kad lėtais trikampiais srovės stimulais žadinant MN galima įvertinti tik stacionarią perdavimo funkciją, bet negalima nustatyti pradinės ir ankstyvosios perdavimo funkcijų kaip stačiakampių stimulų atveju.



Pav. 4.8. Motoneuronų perdavimo funkcijų (f-I) vidutinės vertės. Atitinkamai pradinė, ankstyvoji ir stacionarioji perdavimo funkcijos įvertintos stimuliuojant neuronus stačiakampiais ir lėtais trikampiais (1 nA/s) stimulis; pastaruoju atveju gauta viena bendra perdavimo funkcija; paveiksle reikšmingai patikimą skirtumą tarp skirtingų grupių (*) rodo Studento *t*-reikšmė ($p < 0,05$); $n=9$.

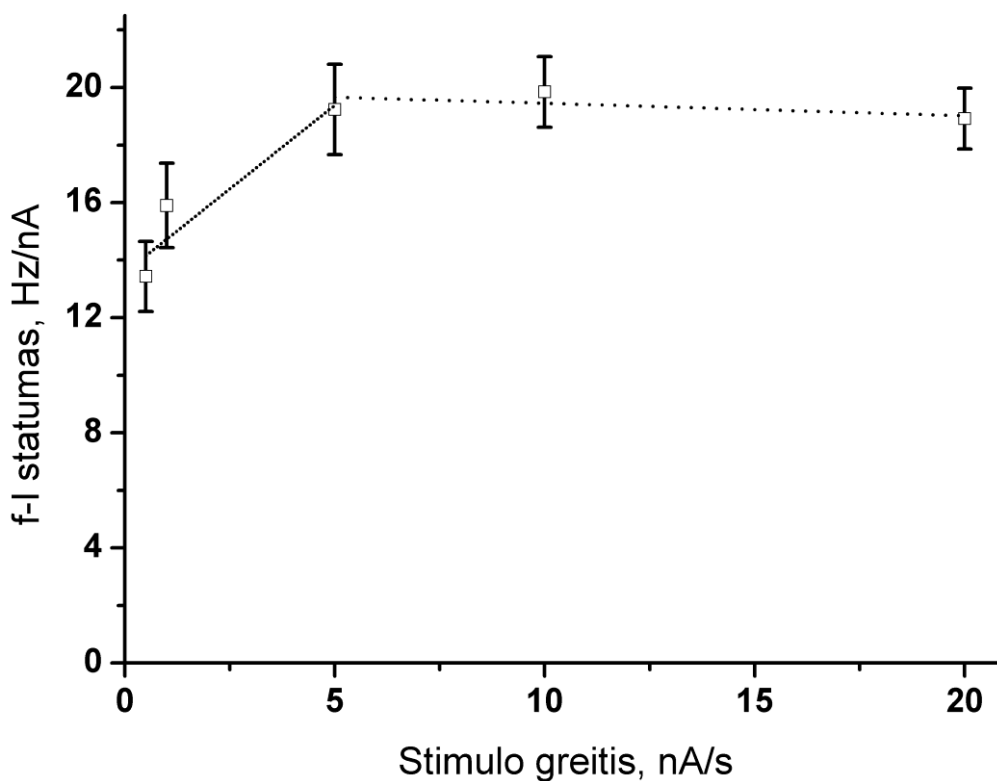
4.1.4. Trikampio srovės stimulo kilimo greičio įtaka perdavimo funkcijos statumui

Taigi, MN perdavimo funkcijos vertę galimai mažina veikimo potencialų adaptacija. Buvo tirta ar trikampių stimulų kilimo greitis gali įtakoti MN perdavimo funkcijos vertes.

Tiriant trikampių stimulų greičio galimą įtaką MN perdavimo funkcijai, buvo naudojami penkių kilimo greičių trikampiai srovės stimulai: 0,5; 1; 5; 10; 20 nA/s. Stimulų greičiai buvo pasirinkti nuo dažniausiai naudojamų lėtų iki labai greitų. Mažiausia perdavimo funkcijos vertė buvo $13,4 \pm 1,2$ Hz/nA taikant lėtą 0,5 nA/s kilimo greičio stimulą ($n=9$). Didžiausia perdavimo funkcijos vertė $19,8 \pm 1,2$ Hz/nA buvo registruota esant 10 nA/s stimului (Pav. 4.9). Esant kitiems stimulų greičiams: 1 nA/s stimulo greičiui f-I lygi $15,9 \pm 1,5$ Hz/nA, 5

nA/s stimulo greičiui f-I lygi $19,2 \pm 1,6$ Hz/nA, 20 nA/s stimulo greičiui f-I lygi $18,9 \pm 1,5$ Hz/nA.

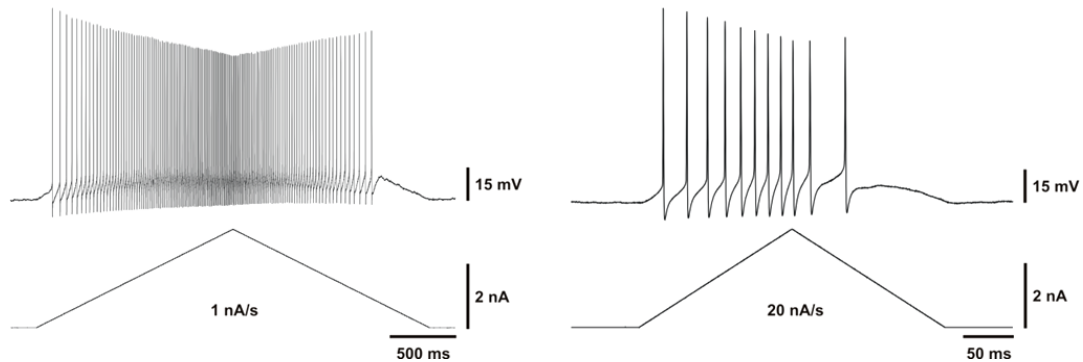
Nors stacionari MN perdavimo funkcijos vertė (taikant stačiakampius stimulus) buvo patikimai mažesnė $23,7 \pm 8,6$ % (n=9) už perdavimo funkcijos vertę taikant 10 nA/s kilimo greičio trikampus stimulus, tačiau pradinės perdavimo funkcijos vertė buvo patikimai didesnė net $60,9 \pm 4,8$ %, o ankstyvoji $52,9 \pm 3,3$ % už taikant trikampus stimulus įvertintą didžiausią perdavimo funkcijos vertę ($19,8 \pm 1,2$ Hz/nA).



Pav. 4.9. Motoneurono perdavimo funkcijų verčių priklausomybė nuo trikampio srovės stimulo kilimo greičio. Pradžioje perdavimo funkcijos vertė didėja kartu su greitėjančiu stimulo kilimo greičiu ($R^2=0,8$), o vėliau f-I vertės kitimas stabilizuojasi ($R^2=-0,1$); n=9.

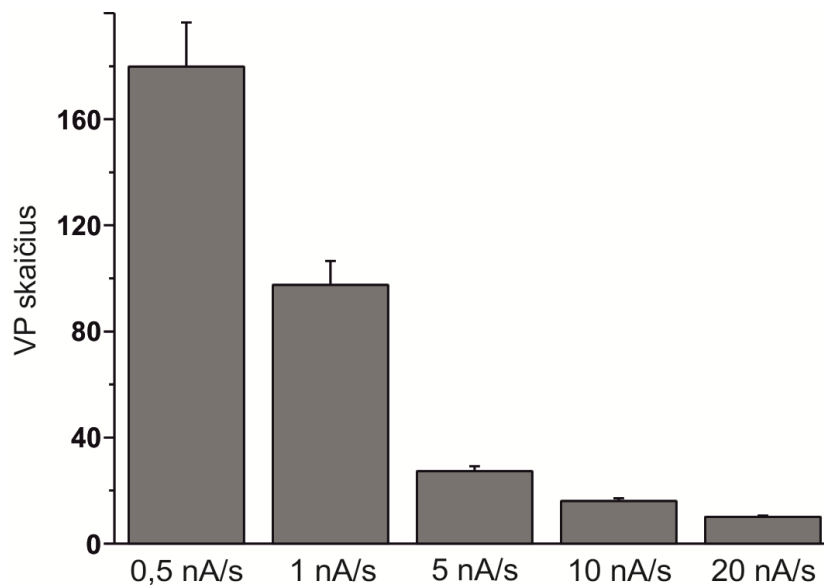
Stimuliuojant MN trikampaiais stimulus perdavimo funkcijos vertės patikimai didėjo greitėjant impulso kilimo greičiui stimulų grupėje nuo 0,5 iki 5 nA/s ($R^2=0,8$). Tačiau stimulų grupėje nuo 5 iki 20 nA/s patikimo perdavimo funkcijos didėjimo nepastebėta (Pav. 4.9). Matomas perdavimo funkcijos išsotinimas ($R^2=-0,1$). Minėti skirtumai tarp perdavimo funkcijos verčių, gautų

taikant skirtingų greičių trikampus stimulus galėtų būti sąlygoti VP dažnio adaptacijos. Skirtingo lygio adaptacija gali sąlygoti skirtingas perdavimo funkcijos vertes trikampių stimulių atveju ir didžiausia perdavimo funkcijos vertė gaunama taikant greitus stimulus.



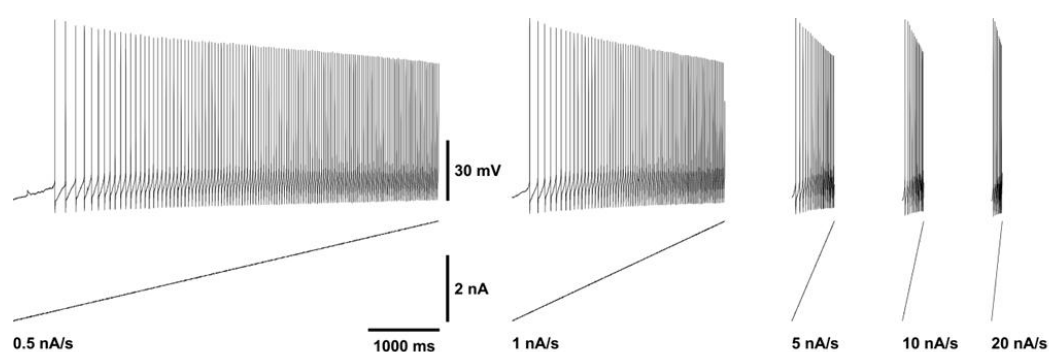
Pav. 4.10. Motoneurono membranos potencialo kitimas (veikimo potencialai) atsako į lėtą (1 nA/s) ir greitą (20 nA/s) trikampi srovės stimulus metu. Maksimali stimulo amplitudė vienoda abiem atvejais (3 nA); lėtesnis (ilgesnis) stimulus sukelia didesnio dažnio ir daugiau veikimo potencialų, nei greitas (trumpas) trikampis stimulus.

Skirtingų kilimo greičių trikampių stimulių metu MN generavo nevienodą VP skaičių (Pav. 4.10 ir 4.11).



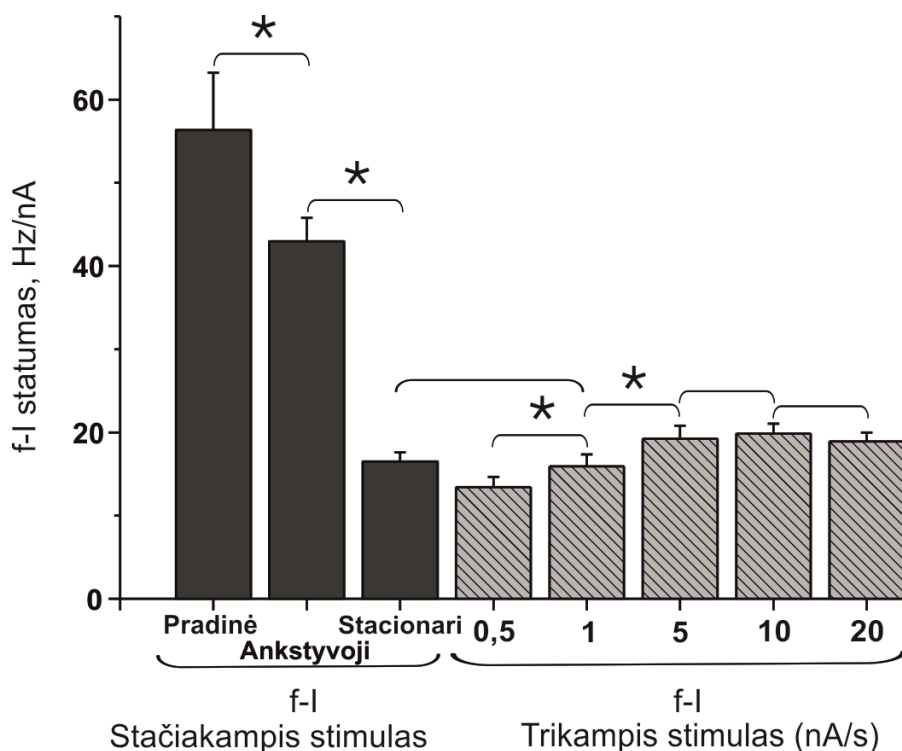
Pav. 4.11. Motoneurono veikimo potencialų skaičiaus priklausomybė nuo trikampo srovės stimulo kilimo greičio; n=9.

Stimuliuojant lėtai (1 nA/s) trikampaiais srovės stimulais sugeneruotų VP skaičius buvo reikšmingai didesnis, nei stimuliuojant greitai (20 nA/s) (Pav. 4.10). Buvo vertintas MN VP skaičius stimulų metu (tik stimulo kilimo fazėje) (Pav. 4.12). MN generuoja daugiau veikimo potencialų lėtesnių trikampių stimulų grupėje (nuo 0,5 iki 5 nA/s). Šie rezultatai rodo, kad kuo mažiau veikimo potencialų sugeneruojama MN stimuliacijos metu (esant greitiems stimulams), tuo VP dažnio adaptacijos įtaka perdavimo funkcijos vertei mažesnė.



Pav. 4.12. Motoneurono membranos potencialo kitimas (veikimo potencialai) atsakų į įvairaus kilimo greičio trikapius srovės stimulus metu.

Taigi, MN perdavimo funkcijos vertę gali mažinti adaptacija, o lėtai trikampaiais stimulais vertintų MN perdavimo funkcijų vertės patikimai nesiskyrė nuo stačiakampiais srovės stimulais gautų perdavimo funkcijos verčių vėlyvosios adaptacijos metu (Pav. 4.13).



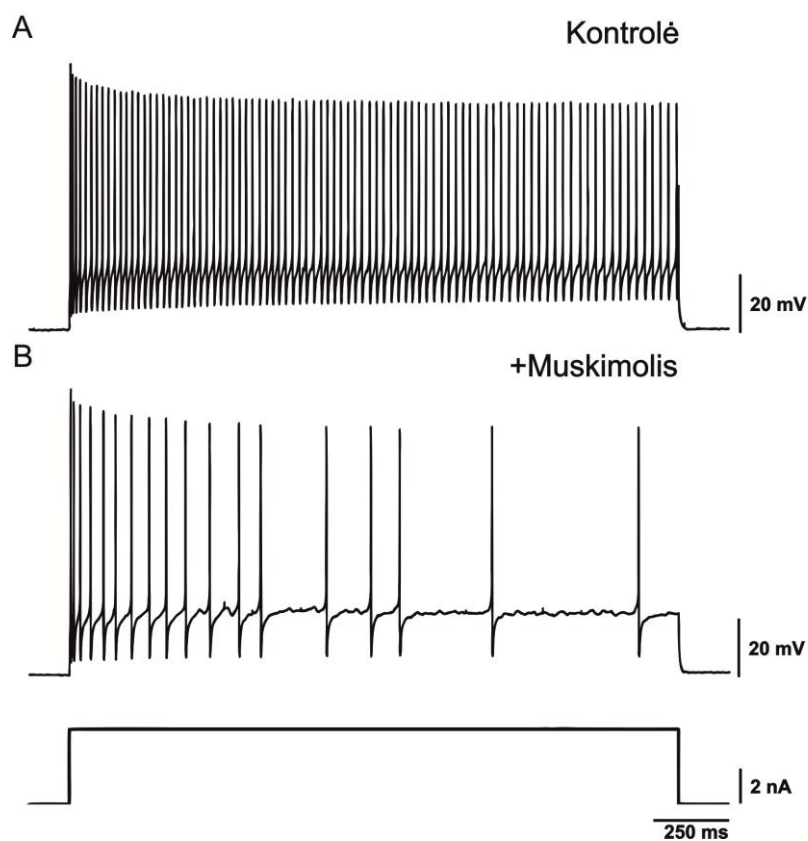
Pav. 4.13. Motoneuronų perdavimo funkcijų (f-I) vidutinės vertės gautos stimuliuojant neuronus stačiakampiais ir trikampaiais srovės stimulais. Paveiksle reikšmingai patikimą skirtumą tarp skirtingų grupių (*) rodo Studento *t*-reikšmė ($p < 0,05$); $n=9$.

4.2. Membranos laidumo padidėjimo įtaka perdavimo funkcijos vertei

Žinoma, kad nugaros smegenų fiziologiškai prasmingo (lokomocijos ir refleksai) neuroninio tinklo veikimo metu MN gauna labai intensyvių sinapsinį jėgumą iš kitų neuronų, dėl ko ženkliai padidėja MN membranos laidumas.

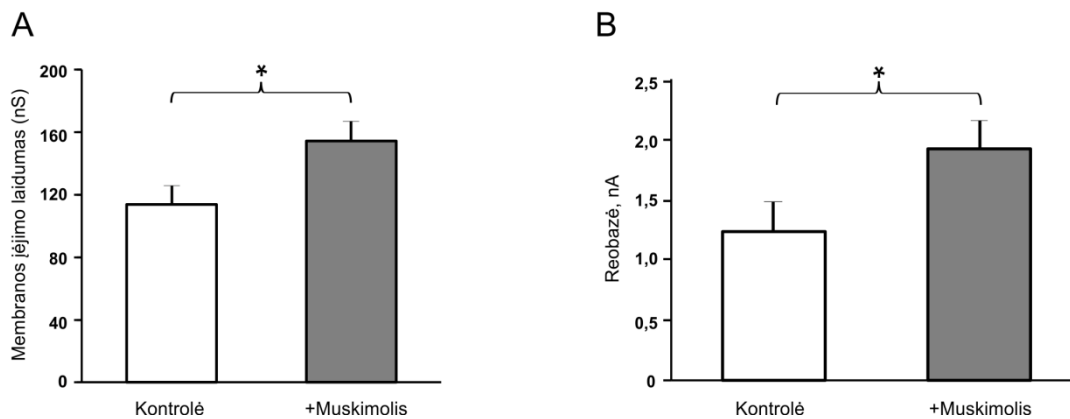
Mes MN membranos laidumą padidinome naudodami $GABA_A$ receptorių agonistą – muskimolį. Buvo nustatyta, kad muskimolis ($2 \mu M$) MN membranos laidumą padidino $38,6 \pm 4,9$ %. Membranos jėgumo laidumas kontrolinėmis sąlygomis buvo $113,7 \pm 36,3$ nS ($n=10$), o paveikus MN $2 \mu M$ muskimolio tirpalu membranos jėgumo laidumas tapo $154,3 \pm 12$ nS (Pav. 4.15.A).

Padidėjęs membranos laidumas sumažino MN sužadynamumą – stimuliuojant tokios pačios amplitudės srovės impulsu MN generavo mažesnių VP skaičių (Pav. 4.14.A.B).



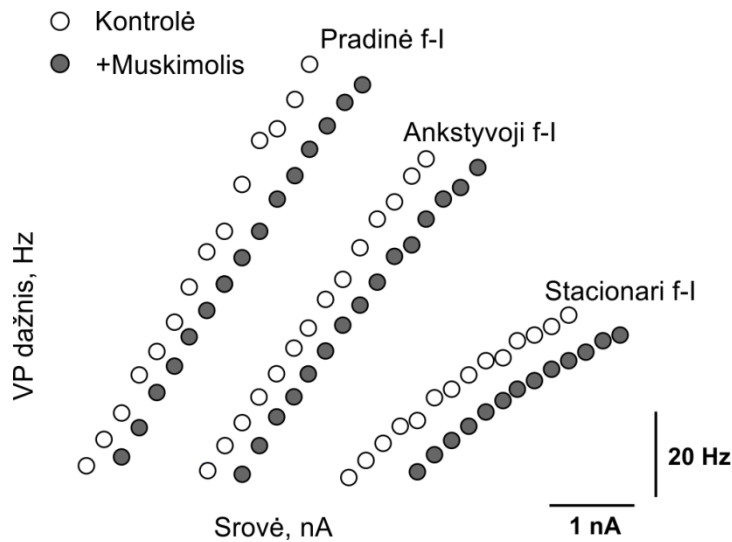
Pav. 4.14. Motoneurono sužadynamumo sumažėjimas dėl padidėjusio membranos laidumo. **(A)** neurono atsakas į stačiakampį srovės stimulą kontrolinėmis sąlygomis; **(B)** to paties neurono atsakas į tokį pat stačiakampį srovės stimulą farmakologijos poveikio sąlygomis; sumažėjo veikimo potencialų dažnis bei jų nuolatinio generavimo laikas.

MN reobazė kontrolėje buvo $1,2 \pm 0,2$ nA, o farmakologiškai padidinus laidumą reobazės vertė tapo $1,9 \pm 0,2$ nA ($n=10$) (Pav. 4.15.B). Lyginant kontrolines ir laidumo padidėjimo sąlygotas reobazės vertes matyti, kad padidėjęs MN membranos laidumas reikšmingai patikimai padidino reobazę $56,4 \pm 9,1$ %.

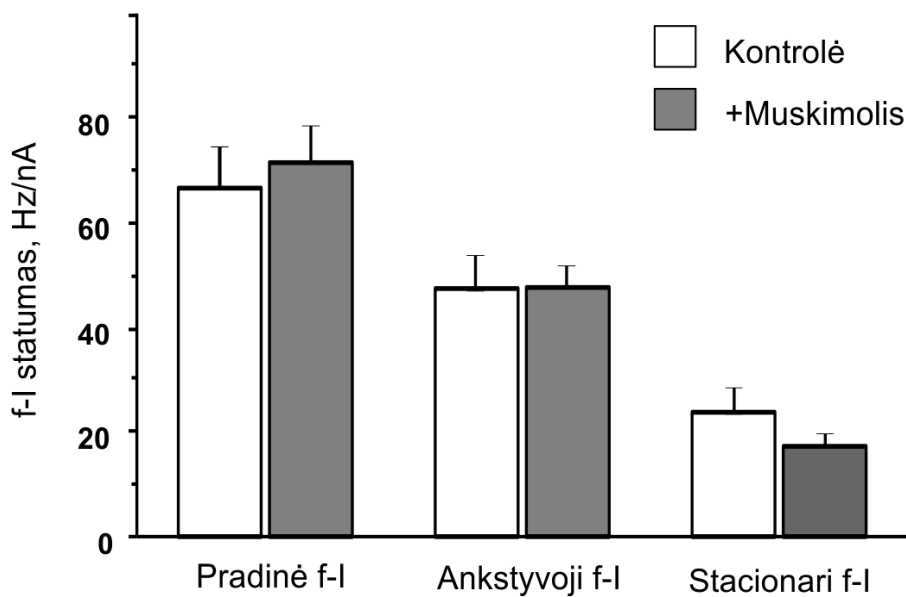


Pav. 4.15. (A) Motoneurono membranos įėjimo laidumas kontrolinėmis ir farmakologijos sąlygomis. Muskimolis padidino membranos įėjimo laidumą $38,6 \pm 4,9$ % (B) reobazės vertė kontrolinėmis ir farmakologijos sąlygomis; muskimolis padidino reobazę $56,4 \pm 9,1$ %; reikšmingai patikimą skirtumą tarp grupių (*) rodo Studento *t*-reikšmė ($p < 0,05$); $n = 10$.

Tirta MN membranos laidumo padidėjimo įtaka neurono perdavimo funkcijai. MN membranos laidumo padidėjimas sąlygojo perdavimo funkcijos poslinkį į dešinę - reobazės padidėjimą. Tai sąlygojo didesnių stimuliacinių srovių taikymą nei kontrolinėmis sąlygomis (Pav. 4.16). Kontrolėje MN pradinė perdavimo funkcijos reikšmė buvo $66,63 \pm 7,6$ Hz/nA ($n = 10$), ankstyvosios - $47,4 \pm 6,6$ Hz/nA, o stacionariosios - $23,4 \pm 4,9$ Hz/nA. Paveikus tuos pačius MN muskimolio tirpalu ir padidinus membranos laidumą $38,6 \pm 4,9$ % MN pradinės perdavimo funkcijos vertė buvo $71,5 \pm 6,7$ Hz/nA ($n = 10$), ankstyvosios - $47,6 \pm 4,0$ Hz/nA, o stacionariosios - $17,26 \pm 7,8$ Hz/nA (Pav. 4.17). Padidinus membranos laidumą muskimoliu pradinės, ankstyvosios ir stacionarios perdavimo funkcijos atveju jų statusas reikšmingai nepakito.



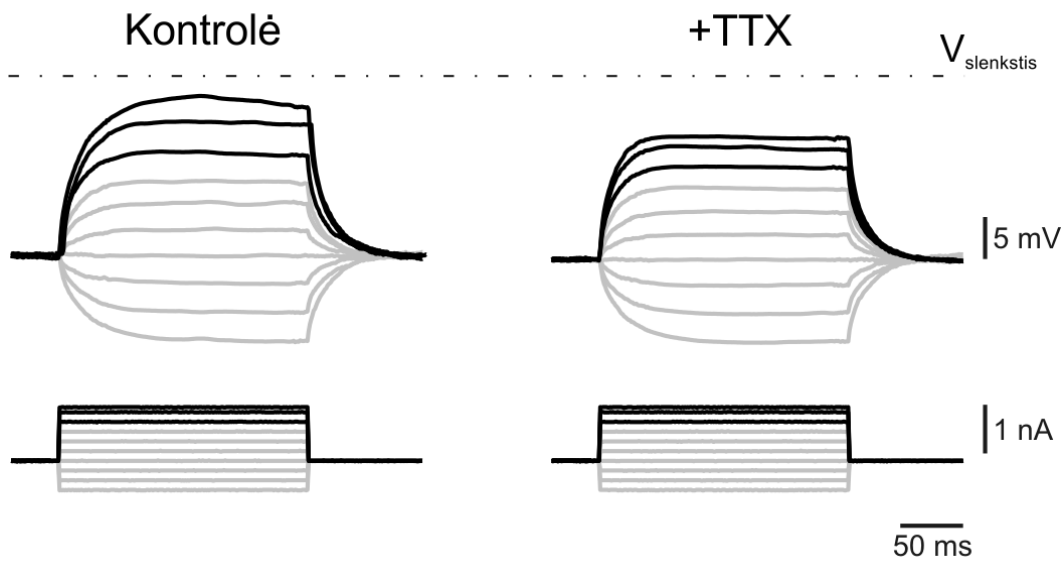
Pav. 4.16. Vieno motoneurono perdavimo funkcijos. Atitinkamai pradinė, ankstyvoji ir stacionari kontrolinėmis (juodi žymekliai) bei eksperimentiškai padidinto laidumo sąlygomis (pilki žymekliai); matomas perdavimo funkcijų poslinkis į dešinę, dėl reobazės padidėjimo.



Pav. 4.17 Motoneuronų perdavimo funkcijų vidutinės vertės. Atitinkamai pradinė, ankstyvoji ir stacionari kontrolinėmis bei eksperimentiškai padidinto laidumo sąlygomis; paveiksle reikšmingai patikimą skirtumą tarp grupių (*) rodo Studento t -reikšmė ($p < 0,05$); $n = 10$.

4.3. Nuolatinės Na⁺ srovės įtaka perdavimo funkcijos vertei

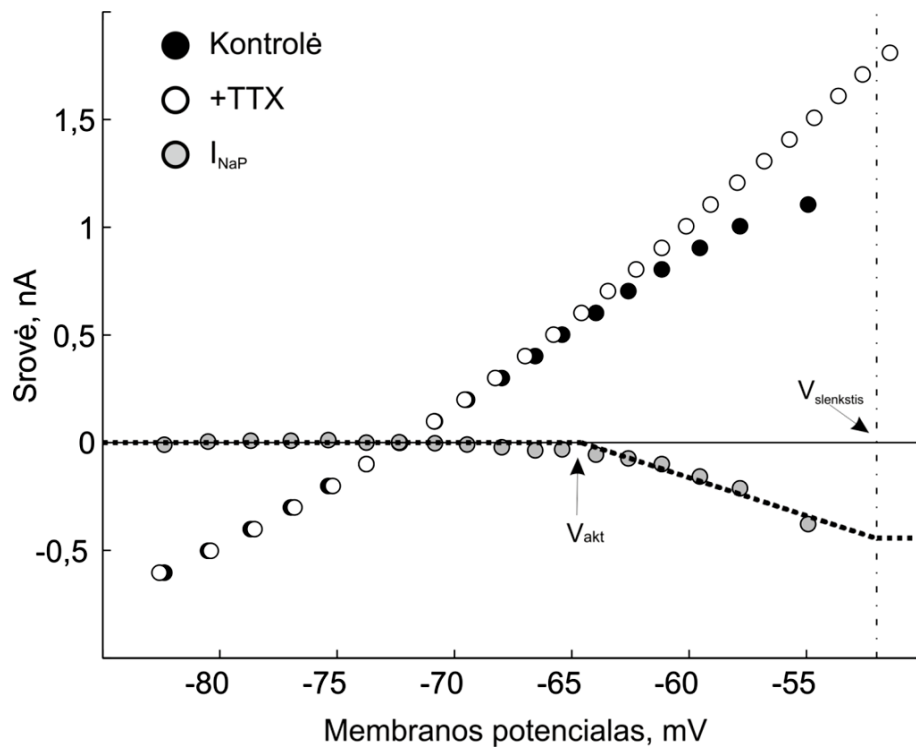
Specifinis Na⁺ kanalų blokatorius TTX ne tik blokavo veikimo potencialų generavimą, bet ir sumažino membranos depoliarizacijos lygį (Pav. 4.18). TTX poveikis hiperpolarizuojančių stimulių atsakams neturėjo įtakos. Tai parodė, kad TTX blokuoja ne tik VP generuojančius greitai inaktyvuojančius, bet membranos potencialo valdomą impulso metu neįaktyvuojantį Na⁺ laidumą. Ši Na⁺ srovė atsiranda, kai membranos potencialo vertė yra teigiamesnė už membranos RP vertę ir didėja iki membranos potencialas pasiekia slenkstinę membranos potencialo vertę. Tai atitinka įtekančios nuolatinės Na⁺ srovės (I_{NaP}) savybėms, aprašytoms kituose neuronuose.



Pav. 4.18. Motoneurono atsakai į depoliarizuojančių ir hiperpolarizuojančių stačiakampių stimulių poveikį kontrolinėmis ir TTX poveikio sąlygomis. TTX sumažino MN atsako lygį iki slenkstiniam membranos potencialo lygmenyje dėl I_{NaP} blokavimo; neurono atsakai į depoliarizuojančius stačiakampius srovės stimulus kontrolinėmis sąlygomis buvo didesni (kairėje) už to paties neurono atsakus esant TTX poveikiui (dešinėje); punktyrinė linija žymi slenkstinį membranos potencialo lygį ($V_{slenkstis}$).

4.3.1. Stacionarios nuolatinės Na⁺ srovės voltamperinės charakteristikos

MN atsakai į stačiakampius srovės stimulus kontrolinėmis ir TTX poveikio sąlygomis (Pav. 4.18) buvo panaudoti įvertinant I_{NaP} kiekybiškai. Visuose tirtuose MN (n=11) membranos ramybės potencialas buvo stabilus ir jokių reikšmingų pokyčių nebuvo pastebėta praėjus 50 ms po stačiakampio stimulo (200 ms trukmės) pabaigos. Tai patvirtina faktą, kad I_{NaP} inaktyvacijos laiko konstanta yra kelių sekundžių eilės (Kay et al., 1998; Magistretti ir Alonso, 1999). Todėl darėme prielaidą, kad I_{NaP} MN stimuliacijos metu yra aktyvuota ir tokia išlieka iki stimuliacijos pabaigos. Stacionari MN srovės-įtampos priklausomybė (I-V) buvo vertinta pagal membranos potencialo nuokrypius stimuliuojant MN stačiakampiais srovės stimulais. Lyginome I-V charakteristikas kontrolėje ir užblokavus Na⁺ TTX (Pav. 4.19). I-V priklausomybė kontrolinėmis sąlygomis (Pav. 4.19, juodi taškai) sutapo su I-V pridėjus TTX (Pav. 4.19, balti taškai) hiperpolarizacijos metu gautomis vertėmis ir pradėjo išsiskirti iki slenkstinės stimuliacijos metu. Tai patvirtina faktą, kad I_{NaP} sąlygoja TTX poveikiui jautrūs ir įtampos valdomi nugaros smegenų MN membranos laidumai. Skirtumai tarp I-V priklausomybių kontrolinėmis ir TTX atveju parodo I_{NaP} I-V (Pav. 4.19, pilki taškai).



Pav. 4.19. Motoneurono membranos voltamperinė (I-V) charakteristika. I_{NaP} (pilki taškai) buvo tirta vertinant skirtumą tarp I-V verčių prieš (juodi taškai) ir po (balti taškai) TTX poveikio; punktyrinė linija žymi tiesinę I_{NaP} I-V priklausomybės dalį.

Tolimesniems tyrimams buvo sudarytas kiekybinis I_{NaP} modelis. Visuose tirtuose MN (n=11) stacionari I_{NaP} I-V priklausomybė iki slenkstiniame membranos potencialo lygyje buvo aproksimuota tiese (Pav. 4.19, juoda tiesė) pagal šią lygčių sistemą:

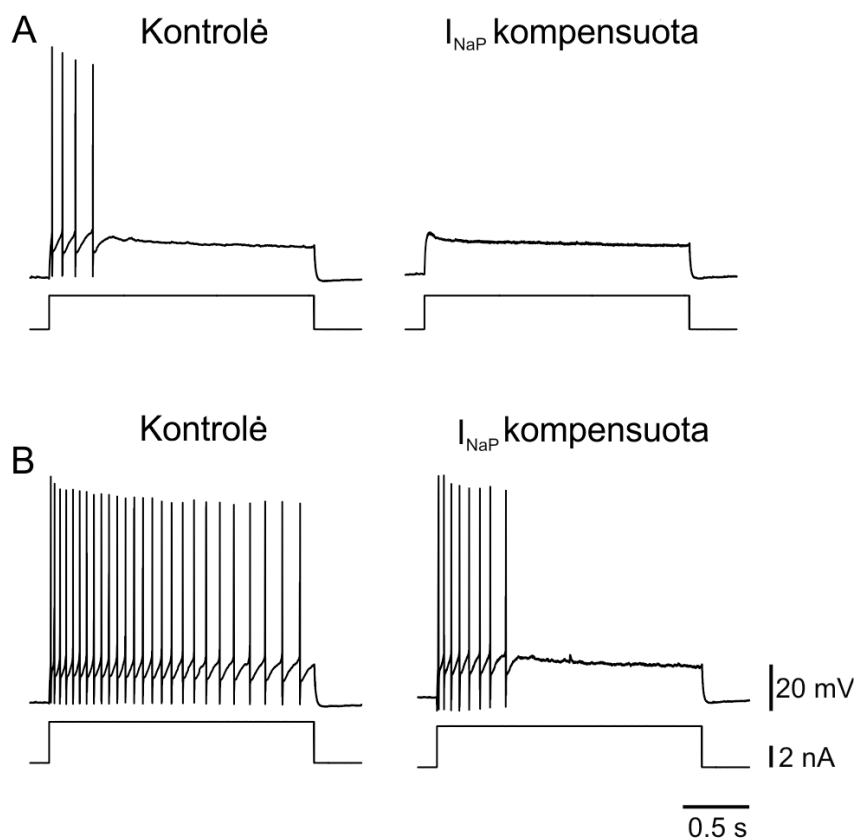
$$\left. \begin{aligned}
 I_{NaP}(V) &= k(V_{akt} - V_{slenkstis}); V \geq V_{slenkstis} \\
 I_{NaP}(V) &= k(V_{akt} - V); V \geq V_{akt} \geq V_{slenkstis} \\
 I_{NaP}(V) &= 0; V < V_{akt}
 \end{aligned} \right\} (1)$$

Čia, V_{akt} - membranos potencialo vertė, kuriai esant abscisių ašį kerta I_{NaP} I-V. Tai žymi efektyvų membranos potencialą, kuris aktyvuoja I_{NaP} . $V_{slenkstis}$ - membranos potencialo slenkstinė vertė, kurią pasiekus pradedami generuoti VP. Eksperimentų rezultatai parodė, kad $V_{akt} = -60,97 \pm 0,93$ mV (n=11).

Sinapsinių signalų integracijoje MN labai svarbų vaidmenį atlieka joniniai membranos laidumai, kurie aktyvuojami membranos potencialui esant arti slenkstinės vertės. V_{akt} buvo įvertinta atsižvelgiant į membranos slenkstinį potencialą. Nustatyta, kad V_{akt} vertė yra $10,88 \pm 0,78$ mV neigiamesnė už membranos slenkstinį potencialą. Parametras k nurodo I-V priklausomybės kreivės statumą ir gali būti laikomas kaip efektyvaus membranos laidumo I_{NaP} matas iki slenkstiniame lygmenyje. Tyrimai parodė, kad $k=0,054 \pm 0,009$ μS . Žinoma, kad šis dydis priklauso nuo MN dydžio, formos, Na^+ kanalų tankio membranoje bei kitų moduliacinių savybių turinčių faktorių. I_{NaP} reikšmingai įtakoja MN membranos potencialų dinamiką iki slenkstiniame membranos potencialo lygmenyje.

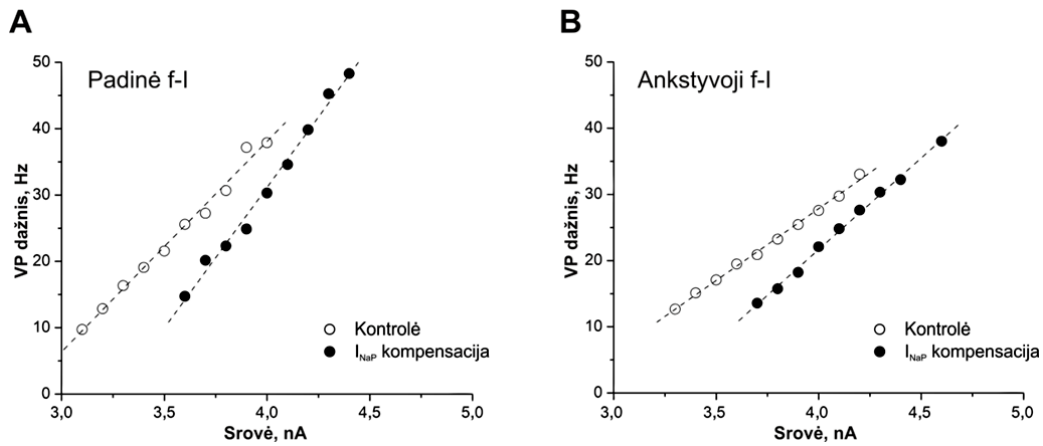
4.3.2. Nuolatinės Na^+ srovės reikšmė nugaros smegenų motoneuronų sužadynamumui

I_{NaP} įtaka MN VP generavime buvo tirta lyginant MN atsakus į stačiakampius srovės stimulus kontrolinėmis sąlygomis ir inaktyvavus I_{NaP} dinaminio srovės fiksacijos metodo dėka (žiūrėti metodiką). Leidžiamos į neuroną srovės vertė, dinaminio srovės fiksavimo metodu, buvo nustatoma pagal matematinę lygčių sistemą (1), kurioje parametras k buvo lygus $0,05$ μS , V_{akt} vertė buvo nustatoma kiekvienam MN atskirai, kad ši vertė visada būtų 10 mV mažesnė už slenkstinę membranos potencialo vertę. Rezultatai parodė, kad I_{NaP} kompensacija (eksperimentinis inaktyvavimas) sumažino visų tirtų MN ($n=11$) sužadynamumo lygį (Pav. 4.20.A.B). Srovės stimulus, kuris galėdavo sukelti MN žemo dažnio veikimo potencialų generavimą kontrolinėse sąlygose, visada buvo iki slenkstinio potencialo lygio, kai I_{NaP} būdavo kompensuojama dinaminio fiksavimo metodu (Pav. 4.20.A). Didesnės amplitudės srovės stimulai sąlygodavo daugiau veikimo potencialų MN kontrolinėmis sąlygomis, nei esant I_{NaP} kompensacija (Pav. 4.20.B).



Pav. 4.20. I_{NaP} kompensavimas sumažino motoneurono sužadynamumo lygį. **(A)** sužadinta motoneurono būseną (veikimo potencialų generavimas) stimuliacijos metu buvo gražinta į iki slenkstinę membranos potencialo vertę dinaminio srovės fiksavimo metodu kompensavus I_{NaP} ; **(B)** I_{NaP} kompensavimas sumažino veikimo potencialų skaičių.

I_{NaP} blokavimas įtakojo ir MN perdavimo funkcijos vertę. Sumažėjusiai reobazei buvo būdingas postūmis į dešinę pusę f-I priklausomybėje (Pav. 4.21). F-I priklausomybės kreivės statumas tai pat padidėjo. Kompensavus I_{NaP} dinaminio srovės fiksacijos metodu reikšmingai $64 \pm 19\%$ ($n=11$) padidėjo pradinė perdavimo funkcija ir $38 \pm 10\%$ ankstyvoji perdavimo funkcija. Šie rezultatai rodo, kad I_{NaP} mažina pradinės ir ankstyvosios MN perdavimo funkcijos vertes.



Pav. 4.21. I_{NaP} kompensavimas padidino pradinės ir ankstyvosios perdavimo funkcijų vertes MN; **(A)** pradinės f-I kreivės statumas padidėjo kompensavus I_{NaP} ; **(B)** ankstyvosios f-I kreivės statumas tai pat padidėjo dėl I_{NaP} kompensavimo.

10 iš 11 tirtų MN galėjo nepertraukiamai generuoti veikimo potencialus bent 1 s, stimuliuojant neuronus stačiakampiais skirtingos amplitudės srovės stimulais (2 s trukmės) prieš ir po I_{NaP} inaktyvavimo. Stacionarių f-I priklausomybės kreivių statumai reikšmingai nesiskyrė ($-4 \pm 5\%$, $n=10$, $p=0,78$). I_{NaP} kompensavimo įtaka MN perdavimo funkcijai esant maksimaliam veikimo potencialų generavimo dažniui nebuvo tirta dėl ribotų techninių galimybių įleisti į neuroną pakankamai daug srovės ir f-I priklausomybės įsisotinimo.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1. Srovės stimulo formos įtaka motoneuronų perdavimo funkcijos vertinimui

Mūsų atliktų eksperimentų rezultatai patvirtino kitų tyrėjų anksčiau atliktų tyrimų išvadas, kad vėžlio nugaros smegenų MN perdavimo funkcijos vertė, tirta taikant stačiakampius kintamos amplitudės srovės stimulus, reikšmingai mažėja dėl VP adaptacijos (Hounsgaard et al., 1988b). Atliktų eksperimentų rezultatai tai pat parodė, kad pradinės vėžlio nugaros smegenų MN perdavimo funkcijos vertė yra daugiau nei tris kartus didesnė už stacionarią perdavimo funkciją. Parodėme, kad pradinė MN perdavimo funkcijos vertė yra reikšmingai didesnė ne tik už stacionarią, bet ir už ankstyvąją perdavimo funkcijos vertę. Šis rezultatas rodo, kad MN perdavimo funkcijos vertės mažėjimas prasideda jau po pirmųjų VP, kurie generuojami kaip atsakas į MN membraną depoliarizuojantį stačiakampį srovės stimulą (Hounsgaard et al., 1988b). Mūsų tyrimai parodė, kad MN perdavimo funkcijų statumai priklauso nuo elektriniam MN stimuliavimui taikytos metodikos. Parodėme, kad MN perdavimo funkcijų vertės, gautos MN stimuliuojant lėtais trikampaiais srovės stimulais (Bennett et al., 2001a; Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Hultborn et al., 2004; Lee ir Heckman, 1998, 2000), yra tokios pat kaip ir stacionarių perdavimo funkcijų vertės, nustatytos taikant stačiakampius srovės stimulus MN stimuliacijai. Atliktų tyrimų rezultatai leidžia mums teigti, kad MN stimuliacijai taikant trikampačius srovės stimulus ir jų pagalba vertinant perdavimo funkciją gaunama ne visa galima informacija. Stačiakampių srovės stimulų metodika pateikia išsamesnę informaciją apie MN perdavimo funkcijos vertes ir jų kitimą. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad MN perdavimo funkcija gali būti matematiškai aprašoma dvejomis skirtingų statumų tiesėmis: pirminė perdavimo funkcijos dalis (I fazė) aprašoma mažesnio statumo tiese VP diapazone nuo 0 iki 20 Hz, o perdavimo funkcijos kitimas esant didesniems VP dažniams (20-200 Hz) ir srovėms aprašomas kita

(II fazė) statesne tiese (Hounsgaard et al., 1988b; apžvelgta Kernell, 2006). Mūsų rezultatai leido tinkamai įvertinti MN perdavimo funkcijos kitimą tik didesnių VP dažnių ir srovių diapazone (II fazėje), nes pradinė mažesnių VP dažnių ir srovių sritis (iki 20 Hz) buvo stebima ne visose tirtose ląstelėse. MN perdavimo funkcijų vertės buvo tirtos esant tokioms stimuliuojančioms srovėms, kurios sąlygodavo ištisinį MN VP generavimą viso stimulo metu (2 s). Šiame stimuliuojančių srovių diapazone perdavimo funkcijos kitimas buvo tiesinis, kuris esant pakankamai didelėms srovėms sąlygojo perdavimo funkcijos įsisotinimą. Remiantis šiuo tyrimu taikytų elektrinių stimulų vertėmis ir jų dėka sukeltų MN VP dažnių diapazonu (nuo 20 iki 120 Hz) galima teigti, kad MN pradinė perdavimo funkcija kinta ne I ir II VP dažnių diapazone, kaip teigia kiti tyrėjai (Hounsgaard et al., 1988b; apžvelgta Kernell, 2006), o tik II.

5.2. Trikampių srovės stimulų kilimo greičio ir adaptacijos įtaka motoneuronų perdavimo funkcijos vertinimui

Mūsų eksperimentuose naudotų trikampių srovės stimulų kilimo greitis gali būti svarbus veiksnys nustatant konkrečią MN perdavimo funkcijos vertę. Trikampių stimulų elektriniai parametrai (kilimo ir leidimosi greitis, maksimali amplitudė ir trukmė) gali keisti MN perdavimo funkcijos vertę. Kiti tyrėjai dažnai naudoja įvairaus kilimo greičio (greitesnius arba lėtesnius) trikampius srovės stimulus nuo 0,4 iki 6 nA/s tiriant perdavimo funkciją (Bennett et al., 2001a; Button et al., 2006; Harvey et al., 2006c; Hounsgaard et al., 1984, 1988a; Lee ir Heckman, 1998). Svarbu paminėti, kad tiriami gali būti įvairių dydžių MN, turintys skirtingą somos plotą, dendritinį medį, kuris sąlygoja įėjimo varžą ir membranos potencialo slenkstinę vertę bei reobazę. Šie MN parametrai gali didinti perdavimo funkcijų variabilumą. Mūsų eksperimentuose taikytų trikampių srovės stimulų kilimo greitis buvo keičiamas nuo 0,5 iki 20 nA/s bandant įvertinti ne tik stacionarios, bet ir pradinės perdavimo funkcijos vertę. Didžiausia MN perdavimo funkcijos vertė taikant trikampių stimulų

metodiką buvo $23,7 \pm 8,6$ % ($n=9$) didesnė už stacionarią perdavimo funkciją vertintą taikant stačiakampių srovės stimulų metodiką. Tačiau pradinė perdavimo funkcijos vertė buvo reikšmingai didesnė $60,9 \pm 4,8$ %, o ankstyvoji perdavimo funkcija didesnė $52,9 \pm 3,3$ % už didžiausią perdavimo funkcijos vertę gautą taikant įvairių kilimo greičių trikampių srovės stimulus. Trikampių srovės stimulų atveju tirtos MN perdavimo funkcijos vertės reikšmingai didėjo, kai trikampių srovės stimulų kilimo greitis didėjo nuo 0,5 iki 5 nA/s, tačiau kilimo greitį padidinus iki 20 nA/s, perdavimo funkcijos vertė pasiekė įsisotinimą ir nebedidėjo. Mūsų rezultatai parodė, kad didėjant trikampo stimulo kilimo greičiui nuo 5 iki 20 nA/s, MN perdavimo funkcijos vertė reikšmingai nekito. VP skaičius buvo atvirkščiai proporcingas trikampo stimulo kilimo greičiui. Nustatyta neigiama koreliacija tarp trikampo srovės impulso kilimo greičio ir MN membranos slenkstinio potencialo. Šie tyrimų rezultatai gali būti grindžiami tuo, kad dalis potencialo valdomų Na^+ kanalų, kuriems būdinga greita inaktyvacija, yra inaktyvuoti lėtų trikampių stimulų atveju (Henze ir Buzsaki, 2001; Munoz ir Fuentealba, 2012).

Žinoma, kad pėdsekinė MN membranos hiperpolarizacija sąlygoja MN perdavimo funkcijos vertę (Vervaeke et al., 2006; Vogalis et al., 2003) ir sukelia VP dažnio adaptaciją (Powers et al., 1999; Sawczuk et al., 1995, 1997). Mūsų eksperimentų rezultatai rodo, kad nugaros smegenų MN VP dažnio adaptacija prasideda jau nuo pirmo sugeneruoto VP stimuliuojant MN stačiakampiu virš slenkstinio srovės stimulu. Taikant MN elektrinei stimuliacijai trikampių srovės stimulus MN membranos potencialas depolarizuojamas laipsniškai iki tam tikros vertės. Šiuo atveju MN VP dažnis priklauso nuo momentinės stimulo srovės dydžio ir adaptacijos lygio. Ca^{2+} patekimas į ląstelę VP metu įtakoja lėtą pėdsekinę hiperpolarizaciją, kuri sąlygoja adaptacijos mechanizmą ir perdavimo funkcijos vertę (Hounsgaard ir Mintz, 1988; Powers et al., 1999; apžvelgta Rekling et al., 2000). Tyrimo rezultatai parodė, kad MN generuoja daugiau VP, kai jie elektriškai stimuliuojami lėtesniais (mažo kilimo greičio) trikampaiais srovės stimulais, o kai impulso kilimo greitis didėja, VP kiekis ženkliai mažėja. Remiantis šiais

rezultatais galima teigti, kad taikant greitus trikampus srovės stimulus MN sukeliama mažai VP ir pasireiškia silpnesnė VP adaptacija.

Remiantis gautais rezultatais galima būtų teigti, kad MN perdavimo funkcijos tyrimui ir įvertimui metodiškai tinkamesni yra stačiakampiais srovės stimulai nei trikampiai. Tai ypač aktualu, kai norima tirti perdavimo funkcijos modifikavimą.

5.3. Padidėjusio membranos laidumo įtaka motoneuronų sužadinumui ir perdavimo funkcijai

Žinoma, kad esant aktyvuotam neuroniniam tinklui, MN membranos laidumas gali padidėti iki 800 % (Berg et al., 2008). Mūsų atliktų tyrimų rezultatai parodė, kad muskimolio sukeltas membranos laidumo padidėjimas reikšmingų pokyčių perdavimo funkcijos statumui neturėjo. Šie rezultatai neprieštarauja kitų tyrėjų rezultatams, kuriuose teigiama, kad MN membranos laidumas neturėtų keisti perdavimo funkcijos verčių. Padidėjęs membranos laidumas nekeičia perdavimo funkcijos vertės tiriant katės galvos smegenų žievės neuronų modelius (Holt ir Koch, 1997). Modeliavimo rezultatai parodė, jog šuntuojantis sinapsinis slopinimas fiziologinėmis sąlygomis turėtų įtakoti ne perdavimo funkcijos statumą, o jos poslinkį srovės ašies atžvilgiu. Dinaminio srovės fiksavimo metodu katės stuburo smegenų MN nustatyta, kad sinapsinio slopinimo metu padidėjęs membranos laidumas sumažina VP dažnį, tačiau nekeičia perdavimo funkcijos kreivės statumo (Brizzi et al., 2004). Tiriant žiurkių CA1 (galvos smegenų hipokampo sritis) srities piramidinių neuronų perdavimo funkciją *in vitro* parodyta, kad padidėjusio neurono somos membranos laidumo metu sumažėja stacionari perdavimo funkcija, tačiau pradinė perdavimo funkcija nepakinta (Fernandez ir White, 2010).

Mūsų atliktuose tyrimuose MN perdavimo funkcija buvo tirta nugaros smegenų pjūviuose, kai fiziologiškai normaliai nebeveikia neuroninis tinklas ir MN sinapsiniai įėjimai yra neaktyvūs. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad MN perdavimo funkcijos tyrimas taikant viduląstelinę elektrinę stimuliaciją nėra

pilnai adekvatus fiziologiškai natūraliam MN sužadimui veikiant sinapsiniams įėjimams. Muskimolio sukeltas laidumo padidėjimas ($38,6 \pm 4,9$ %) yra mažesnis nei nugaros smegenų neuroninio tinklo veikimo metu (Berg 2008). Kita vertus, tokio tipo nenatūralus MN aktyvavimas leidžia greitai ir efektyviai tirti MN elektrinius atsakus esant ne tik fiziologiškai normalioms, bet tyrėjo nustatytoms eksperimentinėmis sąlygomis, kai parenkami specifiniai dirgikliai ir tiriama tik jų įtaka. Visa tai būtų labai sudėtinga padaryti veikiant tik natūraliam sinapsiniam aktyvumui ir įtakoje neuroniniam tinklui.

5.4. Nuolatinės Na^+ srovės įtaka motoneuronų sužadimui ir perdavimo funkcijai

Parodėme, kad vėžlio nugaros smegenų MN savybes veikia I_{NaP} . I_{NaP} gali sąlygoti svarbius procesus sinapsinių signalų integracijoje ir informacijos apdorojime MN. Nustatėme, kad I_{NaP} didina MN sužadimumą ir mažina pradinę perdavimo funkcijos vertę, o stacionarios perdavimo funkcijos neįtakoja. Kitų tyrėjų buvo parodyta, kad blokuojant I_{NaP} cheminiu blokatoriumi riluzoliu MN perdavimo funkcijos vertės lyginat prieš ir po I_{NaP} inaktyvacijos reikšmingai nepakito (Harvey et al., 2006c). Tyrėjai elektrinei MN stimuliacijai taikė lėtus trikampus srovės stimulus. Jų rezultatai patvirtina mūsų rezultatus, kad I_{NaP} neįtakoja stacionarios perdavimo funkcijos vertės, o trikampiai srovės stimulai metodiškai tinkami tirti tik stacionarią MN perdavimo funkciją.

Manoma, kad perdavimo funkcijos reguliacija vyksta dėl sąveikos tarp I_{NaP} ir membranos laidumų pokyčių, kurie nulemia membranos potencialo vertes tarp atskirų VP (Chance et al., 2002; Vervaeke et al., 2006). Ankstesni kitų tyrėjų darbai parodė, kad I_{NaP} padidina pėdsekinę hiperpoliarizacija (Hounsgaard ir Mintz, 1988), ir taip suformuoja neigiamą grįžtamą ryšį, kuris reguliuoja VP dažnį

Mūsų taikytas I_{NaP} apibūdinimas matematiškai kaip tiesinės funkcijos turinčios slenkstį ir įsisotinimą yra adekvatus tik iki slenkstiniame membranos

potencialo lygmenyje. Virš slenkstinės joninės srovės yra dešimteriopai didesnės už iki slenkstines sroves, todėl I_{NaP} savybės yra svarbios membranos potencialui esant iki slenkstiniame lygyje. Parametrai k ir V_{akt} taikyti šiame matematiniam modelyje taikytini tiriant I_{NaP} tik membranos potencialui esant iki slenkstiniame lygyje. Šių tyrimų atveju buvo ignoruojamos neurono kabelinės savybės ir galimai netolygus joninių kanalų pasiskirstymas MN membranoje. Minėti matematinio modelio sąlygų supaprastinimai įgalina įvertinti I_{NaP} dydį ir poveikį. Taigi, įvertinus minėtas metodines aplinkybes mūsų išvada apie tai, kad I_{NaP} mažina pradinę MN perdavimo funkcijos vertę yra kokybiniu požiūriu patikima, tačiau maksimalų I_{NaP} dydį ir kitas savybes dar reikia papildomai iširti.

6. IŠVADOS

1. Motoneuronų perdavimo funkcijos vertės stimuliuojant motoneuronus trikampaiais srovės stimulai sutampa su stacionaria perdavimo funkcija gauta stimuliuojant motoneuronus stačiakampiais srovės stimulai.
2. Stačiakampiai, bet ne trikampaiai srovės stimulai tinkamiausi vertinti pradinę ir ankstyvą perdavimo funkcijų vertes.
3. Motoneurono membranos laidumo padidėjimas nekeičia perdavimo funkcijos statumo.
4. Nuolatinė Na^+ srovė padidina motoneurono sužadynamumo lygį, mažina pradinę ir ankstyvą perdavimo funkcijų vertes, tačiau neįtakoja stacionarios perdavimo funkcijos.

7. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Ahn H.S., Choi J.S., Choi B.H., Kim M.J., Rhie D.J., Yoon S.H., Jo Y.H., Kim M.S., Sung K.W., Hahn S.J. (2005) Inhibition of the cloned delayed rectifier K⁺ channels, K_{v1.5} and K_{v3.1}, by riluzole. *Neuroscience* 133:1007-1019.
2. Aiken S.P., Lampe B.J., Murphy P.A., Brown B.S. (1995) Reduction of spike frequency adaptation and blockade of M-current in rat CA1 pyramidal neurones by linopirdine (DuP 996), a neurotransmitter release enhancer. *Br J Pharmacol* 115:1163-1168.
3. Alaburda A., Buisas R., Guzulaitis R., Kaminskas O., Ruksenas O. (2010) Locust wing stretch receptor adaptation and recovery from adaptation. *Biologija* 56:24-28.
4. Alaburda A., Hounsgaard J. (2003) Metabotropic modulation of motoneurons by scratch-like spinal network activity. *J Neurosci* 23:8625-8629.
5. Alaburda A., Perrier J.F., Hounsgaard J. (2002a) An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540:875-881.
6. Alaburda A., Perrier J.F., Hounsgaard J. (2002b) Mechanisms causing plateau potentials in spinal motoneurons. *Adv Exp Med Biol* 508:219-226.
7. Alaburda A., Russo R., MacAulay N., Hounsgaard J. (2005) Periodic high-conductance states in spinal neurons during scratch-like network activity in adult turtles. *J Neurosci* 25:6316-6321.
8. Bakels R., Kernell D. (1993) Matching between motoneuron and muscle unit properties in rat medial gastrocnemius. *J Physiol* 463:307-324.
9. Baldissera F., Campadelli P., Fava E., Piccinelli L. (1983) Properties of the spike afterhyperpolarization in pyramidal tract neurons. *Brain Res* 259:143-146.
10. Barrett E.F., Barrett J.N., Crill W.E. (1980) Voltage-sensitive outward currents in cat motoneurons. *J Physiol* 304:251-276.
11. Barrett J.N., Crill W.E. (1980) Voltage clamp of cat motoneuron somata: properties of the fast inward current. *J Physiol* 304:231-249.

12. Bennett D.J., Hultborn H., Fedirchuk B., Gorassini M. (1998a) Short-term plasticity in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *J Neurophysiol* 80:2038-2045.
13. Bennett D.J., Hultborn H., Fedirchuk B., Gorassini M. (1998b) Synaptic activation of plateaus in hindlimb motoneurons of decerebrate cats. *J Neurophysiol* 80:2023-2037.
14. Bennett D.J., Li Y., Harvey P.J., Gorassini M. (2001a) Evidence for plateau potentials in tail motoneurons of awake chronic spinal rats with spasticity. *J Neurophysiol* 86:1972-1982.
15. Bennett D.J., Li Y., Siu M. (2001b) Plateau potentials in sacrocaudal motoneurons of chronic spinal rats, recorded in vitro. *J Neurophysiol* 86:1955-1971.
16. Berg R.W., Alaburda A., Hounsgaard J. (2007) Balanced inhibition and excitation drive spike activity in spinal half-centers. *Science* 315:390-393.
17. Berg R.W., Ditlevsen S., Hounsgaard J. (2008) Intense synaptic activity enhances temporal resolution in spinal motoneurons. *PLoS One* 3:e3218.
18. Berg R.W., Hounsgaard J. (2009) Signaling in large-scale neural networks. *Cogn Process* 10 Suppl 1:S9-15.
19. Binder M.D., Heckman C.J., Powers R.K. (2010) The Physiological Control of Motoneuron Activity. In: *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Inc. (knygos skyrius).
20. Brizzi L., Meunier C., Zytnicki D., Donnet M., Hansel D., D'Incamps B.L., Van V.C. (2004) How shunting inhibition affects the discharge of lumbar motoneurons: a dynamic clamp study in anaesthetized cats. *J Physiol* 558:671-683.
21. Brock L.G., Coombs J.S., Eccles J.C. (1952) The recording of potentials from motoneurons with an intracellular electrode. *J Physiol* 117:431-460.
22. Brodwick M.S., Junge D. (1972) Post-stimulus hyperpolarization and slow potassium conductance increase in *Aplysia* giant neurone. *J Physiol* 223:549-570.
23. Brown A.M., Schwandt P.C., Crill W.E. (1994) Different voltage dependence of transient and persistent Na⁺ currents is compatible with

- modal-gating hypothesis for sodium channels. *J Neurophysiol* 71:2562-2565.
24. Brown D.A., Adams P.R. (1980) Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neurone. *Nature* 283:673-676.
 25. Buchanan J.T. (1993) Electrophysiological properties of identified classes of lamprey spinal neurons. *J Neurophysiol* 70:2313-2325.
 26. Burke R.E., Fyffe R.E., Moschovakis A.K. (1994) Electrotonic architecture of cat gamma motoneurons. *J Neurophysiol* 72:2302-2316.
 27. Button D.C., Gardiner K., Marqueste T., Gardiner P.F. (2006) Frequency-current relationships of rat hindlimb alpha-motoneurons. *J Physiol* 573:663-677.
 28. Cao Y.J., Dreixler J.C., Couey J.J., Houamed K.M. (2002) Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole. *Eur J Pharmacol* 449:47-54.
 29. Carlin K.P., Jones K.E., Jiang Z., Jordan L.M., Brownstone R.M. (2000) Dendritic L-type calcium currents in mouse spinal motoneurons: implications for bistability. *Eur J Neurosci* 12:1635-1646.
 30. Castro A., Aguilar J., Andres C., Felix R., Delgado-Lezama R. (2011) GABA_A receptors mediate motoneuron tonic inhibition in the turtle spinal cord. *Neuroscience* 192:74-80.
 31. Chance F.S., Abbott L.F., Reyes A.D. (2002) Gain modulation from background synaptic input. *Neuron* 35:773-782.
 32. Clemens S., Hochman S. (2004) Conversion of the Modulatory Actions of Dopamine on Spinal Reflexes from Depression to Facilitation in D3 Receptor Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 24:11337-11345.
 33. Collins D.F., Burke D., Gandevia S.C. (2001) Large involuntary forces consistent with plateau-like behavior of human motoneurons. *J Neurosci* 21:4059-4065.
 34. Coombs J.S., Curtis D.R., Eccles J.C. (1957a) The generation of impulses in motoneurons. *J Physiol* 139:232-249.
 35. Coombs J.S., Curtis D.R., Eccles J.C. (1957b) The interpretation of spike potentials of motoneurons. *J Physiol* 139:198-231.

36. Coombs J.S, Eccles J.C., Fatt P. (1955) The electrical properties of the motoneurone membrane. *J Physiol* 130:291-325.
37. Crill W.E. (1996) Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 58:349-362.
38. Dedek K., Kunath B., Kananura C., Reuner U., Jentsch T.J., Steinlein O.K. (2001) Myokymia and neonatal epilepsy caused by a mutation in the voltage sensor of the KCNQ2 K⁺ channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:12272-12277.
39. Delgado-Lezama R., Perrier J.F., Nedergaard S., Svirskis G., Hounsgaard J. (1997) Metabotropic synaptic regulation of intrinsic response properties of turtle spinal motoneurons. *J Physiol* 504 (Pt 1):97-102.
40. Desmedt J.E., Godaux E. (1977a) Ballistic contractions in man: characteristic recruitment pattern of single motor units of the tibialis anterior muscle. *J Physiol* 264:673-693.
41. Desmedt J.E., Godaux E. (1977b) Fast motor units are not preferentially activated in rapid voluntary contractions in man. *Nature* 267:717-719.
42. Doble A. (1996) The pharmacology and mechanism of action of riluzole. *Neurology* 47:S233-S241.
43. Dubois J.M., Bergman C (1975) Late sodium current in the node of Ranvier. *Pflugers Arch* 357:145-148.
44. Duchateau J., Enoka R.M. (2011) Human motor unit recordings: origins and insight into the integrated motor system. *Brain Res* 1409:42-61.
45. Eccles J.C. (1957) *The Physiology of Nerve Cells*. Johns Hopkins University Press. (knyga).
46. Enriquez D.M., Wienecke J., Zhang M., Hultborn H.R., Kirkwood P.A. (2012) Voltage dependent amplification of synaptic inputs in respiratory motoneurons. *J Physiol* 590(Pt 13):3067-90.
47. Fedirchuk B., Dai Y. (2004) Monoamines increase the excitability of spinal neurones in the neonatal rat by hyperpolarizing the threshold for action potential production. *J Physiol* 557:355-361.
48. Fernandez F.R., White J.A. (2010) Gain control in CA1 pyramidal cells using changes in somatic conductance. *J Neurosci* 30:230-241.

49. French A.S. (1989) Ouabain selectively affects the slow component of sensory adaptation in an insect mechanoreceptor. *Brain Res* 504:112-114.
50. Gorassini M.A., Knash M.E., Harvey P.J., Bennett D.J., Yang J.F. (2004) Role of motoneurons in the generation of muscle spasms after spinal cord injury. *Brain* 127:2247-2258.
51. Gorman R.B., McDonagh J.C., Hornby T.G., Reinking R.M., Stuart D.G. (2005) Measurement and nature of firing rate adaptation in turtle spinal neurons. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 191:583-603.
52. Granit R., Henatsch H.D., Steg G. (1956) Tonic and phasic ventral horn cells differentiated by post-tetanic potentiation in cat extensors. *Acta Physiol Scand* 37:114-126.
53. Granit R., Kernell D., Lamarre Y. (1966) Algebraical summation in synaptic activation of motoneurons firing within the 'primary range' to injected currents. *J Physiol* 187:379-399.
54. Granit R., Kernell D., Shortess G.K. (1963a) Quantitative aspects of repetitive firing of mammalian motoneurons, caused by injected currents. *J Physiol* 168:911-931.
55. Granit R., Kernell D., Smith R.S. (1963b) Delayed depolarization and the repetitive response to intracellular stimulation of mammalian motoneurons. *J Physiol* 168:890-910.
56. Granit R., Phillips C.G., Skoglund S., Steg G. (1957) Differentiation of tonic from phasic alpha ventral horn cells by stretch, pinna and crossed extensor reflexes. *J Neurophysiol* 20:470-481.
57. Grunnet M., Jespersen T., Perrier J.F. (2004) 5-HT_{1A} receptors modulate small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Neurosci Res* 78:845-854.
58. Guertin P.A., Hounsgaard J. (1998) NMDA-Induced intrinsic voltage oscillations depend on L-type calcium channels in spinal motoneurons of adult turtles. *J Neurophysiol* 80:3380-3382.
59. Gustafsson B., Linstrom S., Zangger P. (1978) Firing behaviour of dorsal spinocerebellar tract neurones. *The Journal of Physiology* 275:321-343.
60. Gustafsson B., Pinter M.J. (1984) An investigation of threshold properties among cat spinal alpha-motoneurons. *J Physiol* 357:453-483.

61. Guzulaitis R., Hounsgaard J., Alaburda A. (2012) Inhibition of motoneurons during the cutaneous silent period in the spinal cord of the turtle. *Exp Brain Res* 220(1):23-28.
62. Harris-Warrick R.M. (2002) Voltage-sensitive ion channels in rhythmic motor systems. *Current Opinion in Neurobiology* 12:646-651.
63. Harvey P.J., Li X., Li Y., Bennett D.J. (2006a) 5-HT₂ receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *J Neurophysiol* 96:1158-1170.
64. Harvey P.J., Li X., Li Y., Bennett D.J. (2006b) Endogenous monoamine receptor activation is essential for enabling persistent sodium currents and repetitive firing in rat spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 96:1171-1186.
65. Harvey P.J., Li Y., Li X., Bennett D.J. (2006c) Persistent sodium currents and repetitive firing in motoneurons of the sacrocaudal spinal cord of adult rats. *J Neurophysiol* 96:1141-1157.
66. Hausser M., Spruston N., Stuart G.J. (2000) Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* 290:739-744.
67. Heckman C.J., Binder M.D. (1991) Computer simulation of the steady-state input-output function of the cat medial gastrocnemius motoneuron pool. *J Neurophysiol* 65:952-967.
68. Heckman C.J., Johnson M., Mottram C., Schuster J. (2008) Persistent inward currents in spinal motoneurons and their influence on human motoneuron firing patterns. *Neuroscientist* 14:264-275.
69. Heckman C.J., Lee R.H., Brownstone R.M. (2003) Hyperexcitable dendrites in motoneurons and their neuromodulatory control during motor behavior. *Trends Neurosci* 26:688-695.
70. Henze D.A., Buzsaki G. (2001) Action potential threshold of hippocampal pyramidal cells in vivo is increased by recent spiking activity. *Neuroscience* 105:121-130.
71. Hille B. (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. Sinauer Associates Inc. 3rd edition (knyga).

72. Holloway S.F., Poppele R.E. (1984) Post-tetanic hyperpolarization evoked by depolarizing pulses in crayfish stretch receptor neurones in tetrodotoxin. *J Physiol* 350:343-360.
73. Holt G.R., Koch C. (1997) Shunting inhibition does not have a divisive effect on firing rates. *Neural Comput* 9:1001-1013.
74. Hornby T.G., McDonagh J.C., Reinking R.M., Stuart D.G. (2002a) Effects of excitatory modulation on intrinsic properties of turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 88:86-97.
75. Hornby T.G., McDonagh J.C., Reinking R.M., Stuart D.G. (2002b) Electrophysiological properties of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188:397-408.
76. Hornby T.G., McDonagh J.C., Reinking R.M., Stuart D.G. (2002c) Motoneurons: A preferred firing range across vertebrate species? *Muscle Nerve* 25:632-648.
77. Hounsgaard J., Hultborn H., Jespersen B., Kiehn O. (1984) Intrinsic membrane properties causing a bistable behaviour of alpha-motoneurons. *Exp Brain Res* 55:391-394.
78. Hounsgaard J., Hultborn H., Jespersen B., Kiehn O. (1988a) Bistability of alpha-motoneurons in the decerebrate cat and in the acute spinal cat after intravenous 5-hydroxytryptophan. *J Physiol* 405:345-367.
79. Hounsgaard J., Kiehn O. (1985) Ca²⁺ dependent bistability induced by serotonin in spinal motoneurons. *Exp Brain Res* 57:422-425.
80. Hounsgaard J., Kiehn O. (1989) Serotonin-induced bistability of turtle motoneurons caused by a nifedipine-sensitive calcium plateau potential. *J Physiol* 414:265-282.
81. Hounsgaard J., Kiehn O., Mintz I. (1988b) Response properties of motoneurons in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 398:575-589.
82. Hounsgaard J., Kjaerulff O. (1992) Ca²⁺-Mediated Plateau Potentials in a Subpopulation of Interneurons in the Ventral Horn of the Turtle Spinal Cord. *European Journal of Neuroscience* 4:183-188.
83. Hounsgaard J., Mintz I. (1988) Calcium conductance and firing properties of spinal motoneurons in the turtle. *J Physiol* 398:591-603.

84. Hsiao C.F., Trueblood P.R., Levine M.S., Chandler S.H. (1997) Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* 77:2910-2924.
85. Hultborn H., Brownstone R.B., Toth T.I., Gossard J.P. (2004) Key mechanisms for setting the input-output gain across the motoneuron pool. *Prog Brain Res* 143:77-95.
86. Hultborn H., Murakami F., Tsukahara N., Gustafsson B. (1984) Afterhyperpolarization in neurones of the red nucleus. *Exp Brain Res* 55:333-350.
87. Hultborn H., Pierrot-Deseilligny E. (1979) Input-output relations in the pathway of recurrent inhibition to motoneurons in the cat. *J Physiol* 297:267-287.
88. Ito M., Oshima T. (1965) Electrical behaviour of the motoneurone membrane during intracellularly applied current steps. *J Physiol* 180:607-635.
89. Jehle T., Bauer J., Blauth E., Hummel A., Darstein M., Freiman T.M., Feuerstein T.J. (2000) Effects of riluzole on electrically evoked neurotransmitter release. *Br J Pharmacol* 130:1227-1234.
90. Jiang M.C., Heckman C.J. (2006) In vitro sacral cord preparation and motoneuron recording from adult mice. *J Neurosci Methods* 156:31-36.
91. Jodkowski J.S., Viana F., Dick T.E., Berger A.J. (1988) Repetitive firing properties of phrenic motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* 60:687-702.
92. Jones B.R., Thompson S.H. (2001) Mechanism of postinhibitory rebound in molluscan neurons. *Amer Zool* 41:1036-1048.
93. Jones S.M., Lee R.H. (2006) Fast amplification of dynamic synaptic inputs in spinal motoneurons in vivo. *J Neurophysiol* 96:2200-2206.
94. Kay A.R., Sugimori M., Llinas R. (1998) Kinetic and stochastic properties of a persistent sodium current in mature guinea pig cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 80:1167-1179.
95. Kernell D. (1965) The Adaptation and the Relation between Discharge Frequency and Current Strength of Cat Lumbosacral Motoneurons Stimulated by Long-Lasting Injected Currents. *Acta Physiologica Scandinavica* 65:65-73.

96. Kernell D. (1999) Repetitive impulse firing in motoneurons: facts and perspectives. *Prog Brain Res* 123:31-37.
97. Kernell D (2006). *The motoneurons and its Muscle Fibers*. Oxford University Press (knyga).
98. Kernell D., Monster A.W. (1982) Time course and properties of late adaptation in spinal motoneurons of the cat. *Experimental Brain Research* 46:191-196.
99. Kernell D., Sjöholm H. (1973) Repetitive impulse firing: comparisons between neurone models based on 'voltage clamp equations' and spinal motoneurons. *Acta Physiol Scand* 87:40-56.
100. Kiehn O., Eken T. (1998) Functional role of plateau potentials in vertebrate motor neurons. *Curr Opin Neurobiol* 8:746-752.
101. Koschak A., Reimer D., Huber I., Grabner M., Glossmann H., Engel J., Striessnig J. (2001) α 1D (Cav1.3) subunits can form l-type Ca^{2+} channels activating at negative voltages. *J Biol Chem* 276:22100-22106.
102. Kuo J.J., Lee R.H., Zhang L., Heckman C.J. (2006) Essential role of the persistent sodium current in spike initiation during slowly rising inputs in mouse spinal neurons. *J Physiol* 574:819-834.
103. Kuo J.J., Siddique T., Fu R., Heckman C.J. (2005) Increased persistent Na^+ current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843-854.
104. Larkum M.E., Rioult M.G., Lüscher H.R. (1996) Propagation of action potentials in the dendrites of neurons from rat spinal cord slice cultures. *J Neurophysiol* 75:154-170.
105. Lee R.H., Heckman C.J. (1998) Bistability in spinal motoneurons in vivo: systematic variations in rhythmic firing patterns. *J Neurophysiol* 80:572-582.
106. Lee R.H., Heckman C.J. (1999) Paradoxical effect of QX-314 on persistent inward currents and bistable behavior in spinal motoneurons in vivo. *J Neurophysiol* 82:2518-2527.
107. Lee R.H., Heckman C.J. (2000) Adjustable amplification of synaptic input in the dendrites of spinal motoneurons in vivo. *J Neurosci* 20:6734-6740.

108. Lee R.H., Heckman C.J. (2001) Essential role of a fast persistent inward current in action potential initiation and control of rhythmic firing. *J Neurophysiol* 85:472-475.
109. Li Y., Bennett D.J. (2003) Persistent sodium and calcium currents cause plateau potentials in motoneurons of chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 90:857-869.
110. Li Y., Gorassini M.A., Bennett D.J. (2004) Role of persistent sodium and calcium currents in motoneuron firing and spasticity in chronic spinal rats. *J Neurophysiol* 91:767-783.
111. Madison D.V., Nicoll R.A. (1984) Control of the repetitive discharge of rat CA1 pyramidal neurones in vitro. *J Physiol* 354:319-331.
112. Magistretti J., Alonso A. (1999) Biophysical properties and slow voltage-dependent inactivation of a sustained sodium current in entorhinal cortex layer-II principal neurons: a whole-cell and single-channel study. *J Gen Physiol* 114:491-509.
113. Magistretti J., Castelli L., Forti L., D'Angelo E. (2006) Kinetic and functional analysis of transient, persistent and resurgent sodium currents in rat cerebellar granule cells in situ: an electrophysiological and modelling study. *J Physiol* 573:83-106.
114. Manuel M., Meunier C., Donnet M., Zytnicki D. (2007) Resonant or not, two amplification modes of proprioceptive inputs by persistent inward currents in spinal motoneurons. *J Neurosci* 27:12977-12988.
115. McDonagh J.C., Gorman R.B., Gilliam E.E., Hornby T.G., Reinking R.M., Stuart D.G. (1998) Properties of spinal motoneurons and interneurons in the adult turtle: provisional classification by cluster analysis. *J Comp Neurol* 400:544-570.
116. McDonagh J.C., Gorman R.B., Gilliam E.E., Hornby T.G., Reinking R.M., Stuart D.G. (1999) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the ventral horn of the turtle spinal cord. *J Physiol Paris* 93:3-16.
117. Meehan C.F., Sukiasyan N., Zhang M., Nielsen J.B., Hultborn H. (2010) Intrinsic properties of mouse lumbar motoneurons revealed by intracellular recording in vivo. *J Neurophysiol* 103:2599-2610.
118. Melby E.C., Altman N.H. (1974) CRC handbook of laboratory animal science. CRC Press (knyga).

119. Mermelstein P.G., Bito H., Deisseroth K., Tsien R.W. (2000) Critical dependence of cAMP response element-binding protein phosphorylation on L-type calcium channels supports a selective response to EPSPs in preference to action potentials. *J Neurosci* 20:266-273.
120. Miles G.B., Dai Y., Brownstone R.M. (2005) Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566:519-532.
121. Miles G.B., Hartley R., Todd A.J., Brownstone R.M. (2007) Spinal cholinergic interneurons regulate the excitability of motoneurons during locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:2448-2453.
122. Millar A.G., Atwood H.L. (2004) Crustacean phasic and tonic motor neurons. *Integr Comp Biol* 44:4-13.
123. Moore J., Appenteng K. (1990) The membrane properties and firing characteristics of rat jaw-elevator motoneurons. *J Physiol* 423:137-153.
124. Moritz A.T., Newkirk G., Powers R.K., Binder M.D. (2007) Facilitation of somatic calcium channels can evoke prolonged tail currents in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 98:1042-1047.
125. Munoz F., Fuentealba P. (2012) Dynamics of action potential initiation in the GABAergic thalamic reticular nucleus in vivo. *PLoS One* 7:e30154.
126. Nowak L.M., Macdonald R.L. (1983) Ionic mechanism of muscarinic cholinergic depolarization of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurophysiol* 49:792-803.
127. Oda T., Himeno R., Hay C., Chino K., Kurihara T., Nagayoshi T., Kanehisa H., Fukunaga T., Kawakami Y. (2007) In vivo behavior of muscle fascicles and tendinous tissues in human tibialis anterior muscle during twitch contraction. *J Biomech* 40:3114-3120.
128. Parker D., Hill R., Grillner S. (1996) Electrogenic pump and a Ca²⁺-dependent K⁺ conductance contribute to a posttetanic hyperpolarization in lamprey sensory neurons. *J Neurophysiol* 76:540-553.
129. Perrier J.F., Alaburda A., Hounsgaard J. (2002) Spinal plasticity mediated by postsynaptic L-type Ca²⁺ channels. *Brain Res Brain Res Rev* 40:223-229.

130. Perrier J.F., Alaburda A., Hounsgaard J. (2003) 5-HT_{1A} receptors increase excitability of spinal motoneurons by inhibiting a TASK-1-like K⁺ current in the adult turtle. *J Physiol* 548:485-492.
131. Perrier J.F., Cotel F. (2008) Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *J Physiol* 586:1233-1238.
132. Perrier J.F., Delgado-Lezama R. (2005) Synaptic release of serotonin induced by stimulation of the raphe nucleus promotes plateau potentials in spinal motoneurons of the adult turtle. *J Neurosci* 25:7993-7999.
133. Perrier J.F., Hounsgaard J. (1999) Ca²⁺-activated nonselective cationic current (I_{CAN}) in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 82:730-735.
134. Perrier J.F., Hounsgaard J. (2000) Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull* 53:529-535.
135. Perrier J.F., Hounsgaard J. (2003) 5-HT₂ receptors promote plateau potentials in turtle spinal motoneurons by facilitating an L-type calcium current. *J Neurophysiol* 89:954-959.
136. Perrier J.F., Mejia-Gervacio S., Hounsgaard J. (2000) Facilitation of plateau potentials in turtle motoneurons by a pathway dependent on calcium and calmodulin. *J Physiol* 528 Pt 1:107-113.
137. Powers R.K., Binder M.D. (2001) Input-output functions of mammalian motoneurons. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 143:137-263.
138. Powers R.K., Binder M.D. (2003) Persistent sodium and calcium currents in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 89:615-624.
139. Powers R.K., Sawczuk A., Musick J.R., Binder M.D. (1999) Multiple mechanisms of spike-frequency adaptation in motoneurons. *J Physiol Paris* 93:101-114.
140. Prescott S.A., Koninck Y.D. (2003) Gain control of firing rate by shunting inhibition: roles of synaptic noise and dendritic saturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2076-2081.
141. Rekling J.C., Funk G.D., Bayliss D.A., Dong X.W., Feldman J.L. (2000) Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80:767-852.
142. Reyes A. (2001) Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* 24:653-675.

143. Russo R.E., Hounsgaard J. (1994) Short-term plasticity in turtle dorsal horn neurons mediated by L-type Ca^{2+} channels. *Neuroscience* 61:191-197.
144. Russo R.E., Hounsgaard J. (1999) Dynamics of intrinsic electrophysiological properties in spinal cord neurones. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72:329-365.
145. Safronov B.V., Vogel W. (1995) Single voltage-activated Na^+ and K^+ channels in the somata of rat motoneurons. *J Physiol* 487 (Pt 1):91-106.
146. Sanchez-Vives M.V., Nowak L.G., McCormick D.A. (2000) Membrane mechanisms underlying contrast adaptation in cat area 17 in vivo. *J Neurosci* 20:4267-4285.
147. Sawczuk A., Powers R.K., Binder M.D. (1995) Spike frequency adaptation studied in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol* 73:1799-1810.
148. Sawczuk A., Powers R.K., Binder M.D. (1997) Contribution of outward currents to spike-frequency adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol* 78:2246-2253.
149. Schroeder B.C., Hechenberger M., Weinreich F., Kubisch C., Jentsch T.J. (2000) KCNQ5, a novel potassium channel broadly expressed in brain, mediates M-type currents. *J Biol Chem* 275:24089-24095.
150. Schwindt P., Crill W. (1980a) Role of a persistent inward current in motoneuron bursting during spinal seizures. *J Neurophysiol* 43:1296-1318.
151. Schwindt P.C., Crill W.E. (1977) A persistent negative resistance in cat lumbar motoneurons. *Brain Res* 120:173-178.
152. Schwindt P.C. (1973) Membrane-potential trajectories underlying motoneuron rhythmic firing at high rates. *J Neurophysiol* 36:434-439.
153. Schwindt P.C., Crill WE (1980b) Properties of a persistent inward current in normal and TEA-injected motoneurons. *J Neurophysiol* 43:1700-1724.
154. Schwindt PC, Crill WE (1982) Factors influencing motoneuron rhythmic firing: results from a voltage-clamp study. *J Neurophysiol* 48:875-890.

155. Shapiro M.S., Roche J.P., Kaftan E.J., Cruzblanca H., Mackie K., Hille B. (2000) Reconstitution of muscarinic modulation of the KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels that underlie the neuronal M current. *J Neurosci* 20:1710-1721.
156. Sharp A.A., O'Neil M.B., Abbott L.F., Marder E. (1993) Dynamic clamp: computer-generated conductances in real neurons. *J Neurophysiol* 69:992-995.
157. Simon M., Perrier J.F., Hounsgaard J. (2003) Subcellular distribution of L-type Ca²⁺ channels responsible for plateau potentials in motoneurons from the lumbar spinal cord of the turtle. *Eur J Neurosci* 18:258-266.
158. Stein R.B. (1967) The frequency of nerve action potentials generated by applied currents. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 167:64-86.
159. Svirskis G., Gutman A., Hounsgaard J. (2001) Electrotonic structure of motoneurons in the spinal cord of the turtle: inferences for the mechanisms of bistability. *J Neurophysiol* 85:391-398.
160. Svirskis G., Hounsgaard J. (1997) Depolarization-induced facilitation of a plateau-generating current in ventral horn neurons in the turtle spinal cord. *J Neurophysiol* 78:1740-1742.
161. Svirskis G., Hounsgaard J. (1998) Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 79:45-50.
162. Tazerart S., Vinay L., Brocard F. (2008) The persistent sodium current generates pacemaker activities in the central pattern generator for locomotion and regulates the locomotor rhythm. *J Neurosci* 28:8577-8589.
163. Theiss R.D., Kuo J.J., Heckman C.J. (2007) Persistent inward currents in rat ventral horn neurones. *J Physiol* 580:507-522.
164. Tokizane T., Shimazu H. (1964) Functional Differentiation of Human Skeletal Muscle; Corticalization and Spinalization of Movement. C.C. Thomas (knyga).
165. Umemiya M., Berger A.J. (1994) Properties and function of low- and high-voltage-activated Ca²⁺ channels in hypoglossal motoneurons. *J Neurosci* 14:5652-5660.
166. Urbani A., Belluzzi O. (2000) Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 12:3567-3574.

167. Vervaeke K., Hu H., Graham L.J., Storm J.F. (2006) Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49:257-270.
168. Vogalis F., Storm J.F., Lancaster B. (2003) SK channels and the varieties of slow after-hyperpolarizations in neurons. *Eur J Neurosci* 18:3155-3166.
169. Wang H.S., Pan Z., Shi W., Brown B.S., Wymore R.S., Cohen I.S., Dixon J.E., McKinnon D. (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893.
170. Yu Y., Shu Y., McCormick D.A. (2008) Cortical action potential backpropagation explains spike threshold variability and rapid-onset kinetics. *J Neurosci* 28:7260-7272.
171. Zeng J., Powers R.K., Newkirk G., Yonkers M., Binder M.D. (2005) Contribution of persistent sodium currents to spike-frequency adaptation in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 93:1035-1041.
172. Zengel J.E., Reid S.A., Sybert G.W., Munson J.B. (1985) Membrane electrical properties and prediction of motor-unit type of medial gastrocnemius motoneurons in the cat. *J Neurophysiol* 53:1323-1344.
173. Zhong G., Masino M.A., Harris-Warrick R.M. (2007) Persistent sodium currents participate in fictive locomotion generation in neonatal mouse spinal cord. *J Neurosci* 27:4507-4518.

8. PUBLIKACIJOS

Straipsniai (disertacijos tema):

1. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Osvaldas Ruksenas and Aidan Alaburda. GAIN OF SPINAL MOTONEURONS MEASURED FROM SQUARE AND RAMP CURRENT PULSES. Brain Research. 2012. Vol. 1450. P. 33 – 39.
2. Mantas Gabrielaitis, **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Gytis Svirskis and Aidan Alaburda. PERSISTENT SODIUM CURRENT DECREASES TRANSIENT GAIN IN TURTLE MOTONEURONS. Brain Research. 2011. Vol. 1373. P. 11 – 16.

Straipsniai (neįtraukti į disertaciją):

1. Aidan Alaburda, **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Osvaldas Kaminskas and Osvaldas Ruksenas. ADAPTATION AND RECOVERY FROM ADAPTATION OF LOCUST WING STRETCH RECEPTOR. Biologija. 2010. Vol. 56. No. 1–4. P. 24–28.

Konferencijų pranešimų medžiaga ir tezės (disertacijos tema):

1. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Aidan Alaburda. GAIN OF SPINAL MOTONEURONS MEASURED FROM RAMPS OF DIFFERENT SPEED. Tarptautinės konferencijos „Biomedical Engineering 2011“ recenzuojama pranešimų medžiaga (Kaunas, Lietuva, 2011). P. 183-186.
2. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Aidan Alaburda. GAIN OF SPINAL MOTONEURONS MEASURED FROM CURRENT PULSES AND RAMPS. Tarptautinės konferencijos „Biomedical Engineering 2010“ recenzuojama pranešimų medžiaga (Kaunas, Lietuva, 2010). P. 143-145.
3. **Rokas Buišas**, Aidan Alaburda. VEIKIMO POTENCIALŲ ADAPTACIJOS ĮTAKA MOTONEURONŲ PERDAVIMO FUNKCIJAI. Tarptautinės konferencijos "Virtual instruments in biomedicine - 2011" pranešimų medžiaga (Klaipėda, Lietuva, 2011). P. 136-139.
4. **Rokas Buišas**, Robertas Guzulaitis, Aidan Alaburda. MEMBRANOS LAIDUMO ĮTAKA MOTONEURONŲ PERDAVIMO FUNKCIJAI. Konferencijos "II Lietuvos neuromokslų asociacijos konferencija" pranešimų medžiaga (Vilnius, Lietuva, 2010). P. 19.

Konferencijų pranešimų medžiaga ir tezės (neįtrauktos į disertaciją):

1. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Aidan Alaburda. TWO PHASES OF LOCUST WING STRETCH RECEPTOR ADAPTATION. Tarptautinės konferencijos „Biomedical Engineering 2009“ recenzuojama pranešimų medžiaga (Kaunas, Lietuva, 2009). P. 51-54.

2. **Rokas Buišas**, Aidas Alaburda. MIKROELEKTRODAI, JŲ GAMYBA BEI PANAUDOJIMAS ELEKTROFIZIOLOGINIULOSE EKSPERIMENTULOSE. Tarptautinės konferencijos "Virtual instruments in biomedicine - 2009" pranešimų medžiaga (Klaipėda, Lietuva, 2009). P. 13-19.
3. **Rokas Buišas**, Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda. SKĖRIO SPARNO VYRIO TEMPIMO RECEPTORIAUS ATSISTATYMAS PO ADAPTACIJOS. Konferencijos "I Lietuvos neuromokslų asociacijos konferencija" pranešimų medžiaga (Vilnius, Lietuva, 2009). P. 25.
4. **Rokas Buišas**, Vilma Kisnierienė. AUTOMATIZUOTOS DUOMENŲ RINKIMO IR VALDYMO SISTEMOS TAIKYMAS LAŠTELIŲ MEMBRANŲ ELEKTRINIŲ PARAMETRŲ MATAVIMAMS. Tarptautinės konferencijos "Virtual instruments in biomedicine - 2007", pranešimų medžiaga (Klaipėda, Lietuva, 2007). P. 91-96.
5. В. Сакалаускас, **Р. Буйшас**, В. Киснерене. ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ И КОБАЛТА НА ПАРАМЕТРЫ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ КЛЕТОК *NITELLOPSIS OBTUSA*. Материалы 3 международной научной конференции "Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды" (Минск – Нарочь, 2007). Стр. 336-337.
6. **Rokas Buišas**, Vidmantas Sakalauskas, Vilma Kisnierienė. K-ANESTEZIJOS IR MIKROELEKTRODINIO METODŲ TAIKYMAS TIRIANT CD^{2+} IR CO^{2+} POVEIKĮ MENTURDUMBLIO *NITELLOPSIS OBTUSA* LAŠTELIŲ MEMBRANŲ BIOELEKTRINIAMS PARAMETRAMS. VU GMF IV konferencijos "Mokslas Gamtos mokslų fakultete", pranešimų medžiaga (Vilnius, Lietuva, 2006). P. 246-247.

Stendiniai pranešimai:

1. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Ramunas Grigonis and Aidas Alaburda. THE INFLUENCE OF MEMBRANE CONDUCTANCE ON THE EXCITABILITY OF MOTONEURONS. 8th FENS Forum Of Neuroscience (Barselona, Ispanija, 2012).
2. Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda, Osvaldas Ruksenas, **Rokas Buisas** and J. Hounsgaard. MOTONEURONS ARE NOT INVOLVED IN TEMPORAL SUMMATION OF SENSORY INFORMATION. 8th IBRO World Congress of Neuroscience (Florencija, Italija, 2011).
3. **Rokas Buisas**, Robertas Guzulaitis, Aidas Alaburda. ESTIMATION OF GAIN OF SPINAL MOTONEURONS. Towards research in motoneurons (Paryžius, Prancūzija, 2010).

9. PADĖKA

Pirmiausia, reiškiu didžiulę padėką ir nuoširdų ačiū savo moksliniam vadovui doc. dr. Aidui Alaburdai už nuolatinę mokslinę pagalbą, naudingus patarimus ir diskusijas bei moralinį palaikymą visą doktorantūros laikotarpį ir ruošiant šią disertaciją.

Dėkoju savo kolegai doktorantui Robertui Guzulaičiui už teisingus komentarus ir pastabas rengiant mokslines publikacijas bei šią disertaciją. Ačiū už praktinius patarimus ir vertingą pagalbą atliekant mokslinius eksperimentus. Ačiū už pagalbą tariau ir savo kolegoms: Ramūnui Grigoniui, Laurai Mačiukaitei ir Ramunei Grikšienei.

Noriu nuoširdžiai padėkoti ir prof. dr. Osvaldui Rukšėnui už naudingus patarimus ir nuolatinį palaikymą visą studijavimo Vilniaus universitete, Gamtos mokslų fakultete laikotarpį.

Dėkoju dr. Vilmai Kisnierienei už naudingas ir reikšmingas pastabas skaitant mano disertacijos juodraštį bei visiems Vilniaus universiteto, Gamtos mokslų fakulteto biofizikams už nuoširdų palaikymą ir pagalbą visą studijų laikotarpį.

Reiškiu padėką savo *Alma Mater* - Vilniaus universitetui už suteiktą galimybę įžengti į mokslo pasaulį. Esu dėkingas ir Gamtos mokslų fakultetui bei Biochemijos ir biofizikos katedrai už sudarytas sąlygas atlikti mokslinius tyrimus ir įgyti naujų mokslinių žinių.

Galiausiai, savo šeimai ir draugams už nuolatinį ir besąlygišką palaikymą bei supratingumą tariau nuoširdų AČIŪ.

10. GYVENIMO APRAŠYMAS

Asmeninė informacija:

Vardas, pavardė	Rokas Buišas
Gimimo data	1983.09.19
Gimimo vieta	Kuršėnai, Šiaulių raj., Lietuva
Šeimyninė padėtis	Nevedęs

Kontaktinė informacija:

Adresas (darbo)	Čiurlionio 21/27, LT-03101, Vilnius, Lietuva Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir biofizikos katedra
Telefonas	+370 60 290 893 (asmeninis) + 370 5 2398237 (darbo)
E-paštas	rokas.buisas@gmail.com (asmeninis) rokas.buisas@gf.vu.lt (darbo)

Išsilavinimas:

- 2008 – dabar Biofizikos krypties doktorantūros studijos Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete.
- 2006 – 2008 Universitetinės antros pakopos (magistrantūros) studijos Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete. Įgytas biofizikos magistro kvalifikacinis laipsnis. Magistrinio darbo tema: „Indolil-3-acto rūgšties poveikio Nitellopsis obtusa ląstelių membranų elektriniams parametrams tyrimas“.
- 2002 – 2006 Universitetinės pirmos pakopos (bakalauro) studijos Vilniaus Universitete, Gamtos mokslų fakultete. Įgytas biofizikos bakalauro kvalifikacinis laipsnis. Bakalaurinio darbo tema: „Automatizuotos E-Biol sistemos ir K-anestezijos metodo taikymas tiriant Cd^{2+} ir Co^{2+} poveikį menturdumblių Nitellopsis obtusa ląstelių membranų bioelektriniams parametrams“.
-

Darbo patirtis:

- 2012 – dabar Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir biofizikos katedra. Pareigos: Jaunesnysis mokslo darbuotojas, lektorius.

2006 – 2011 Vilniaus Universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Biochemijos ir biofizikos katedra. Pareigos: Vyresnysis specialistas.

Pedagoginė veikla:

2007 - dabar Dėstomas teorinis kursas "Bioelektriniai reiškiniai", vedami moksliniai seminarai ir laboratoriniai darbai.

Profesinė narystė:

2009 - dabar Lietuvos neuromokslų asociacijos (LNA)

2009 - dabar FENS (Federation of European Neuroscience Societies)

Kvalifikacijos kėlimas:

2011 Dalyvauta VU Personalo direkcijos Darbuotojų kvalifikacijos tobulinimo skyriaus rengiamuose "Dėstymo patirties ir meistriškumo plėtos" modulio mokymuose (Vilnius, Lietuva).

2011 Dalyvauta VU Informacinių technologijų taikymo centre vykusiuose Europos struktūrinių fondų paramos biofarmacijos nacionalinės kompleksinės programos projekto „Biotechnologijos ir biofarmacijos sektoriui reikalingų aukštos kvalifikacijos specialistų rengimo tobulinimas (BIOTEFA-A)“ mokymuose (Vilnius, Lietuva).

2009 ERASMUS stažuotė Oslo Universiteto, Medicinos fakulteto, Fiziologijos Katedroje (Norvegija).

2009 Tarptautinė mokykla „FRAME Reduction Steering Committee Training School in the Experimental Design & Statistical Analysis of Biomedical Experiments“ (Mančesteris, Didžioji Britanija).

2008 Dalyvauta seminare „Pareiškų rašymas moksliniams projektams“, organizuotame vykdant ES struktūrinių fondų finansuojamą projektą „Biofizika: biofizikos magistrinių ir doktorantūros studijų programų modernizavimas“ (Vilnius, Lietuva).

2007 Tarptautinė mokykla „Advanced methods in biophysics“ (Trakai, Lietuva).

2007 Dalyvauta Europos struktūrinių fondų paramos projekto „Biofizika: biofizikos magistrinių ir doktorantūros studijų

programų modernizavimas,, praktiniuose seminaruose „Nuotolinio mokymosi kursų teikimas. Virtualios mokymosi terpės“, kuriuos organizavo KTU Distancinio mokymo centras (Trakai, Lietuva).

Dalyvavimas projektuose:

- 2011 - 2012 „Nugaros smegenų refleksų aktyvavimo mechanizmų tyrimas“, Lietuvos Mokslo Tarybos projektas (MIP-089/2011). Pareigos projekte: jaunesnysis mokslo darbuotojas.
- 2010 - dabar „Biotechnologijos ir biofarmacijos sektoriui reikalingų aukštos kvalifikacijos specialistų rengimo tobulinimas (BIOTEFA-A)“, Europos struktūrinių fondų paramos biofarmacijos nacionalinės kompleksinės programos projektas (VP1-2.2-ŠMM-09-V-01-009/PARS-13700-11557). Pareigos projekte: jaunesnysis mokslo darbuotojas.
- 2009 - 2009 „Nugaros smegenų motoneuronų aktyvavimas plaukimo metu“, Lietuvos valstybinio mokslo ir studijų fondo finansuojamas projektas (VMSF T-32/09). Projekto vadovas: doc. dr. Aidas Alaburda. Pareigos projekte: vyresnysis specialistas.
- 2006 - 2007 „Biofizika: biofizikos magistrinių ir doktorantūros studijų programų modernizavimas“. ES struktūrinių fondų finansuojamas projektas (BPD2004-ESF-2.5.0-01-04/0027). Projekto vadovas: habil. dr., prof. Osvaldas Rukšėnas. Pareigos projekte: vyresnysis specialistas.