

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Neurobiologijos studijų programos II kurso studentas

Robertas Guzulaitis

Magistrinis darbas

Motoneuronų perdavimo funkciją įtakoiantys veiksniai

Darbo vadovas:
doc. dr. Aidas Alaburda

Vilnius 2009

Motoneuronų perdavimo funkciją įtakojančys veiksniai

Darbas atliktas Gamtos mokslų fakulteto Biochemijos ir biofizikos katedroje,
Neurobiologijos laboratorijoje

Robertas Guzulaitis

Darbo vadovas:

doc. dr. Aidas Alaburda

Turinys.

Santrumpos.	4
Įvadas	5
Literatūros apžvalga.....	6
1. Motoneurono perdavimo funkcija.....	6
1.1. Motoneurono perdavimo funkcijos reguliacija.....	7
2. VP dažnio adaptacija.....	10
2.1. Pėdsekinė hiperpoliarizacija (AHP).....	11
2.2. M-srovė.....	13
2.3. I_{NaP}	15
2.4. Lėta Na^+ kanalų inaktyvacija	16
2.5. Na^+/K^+ -ATPazė.....	16
3. Na^+ kanalo, valdomo įtampos, struktūra	18
3.1 Na^+ kanalų klasifikacija.....	22
4. Pastovi Na^+ srovė (I_{NaP}).....	24
4.1. I_{NaP} tyrimai.....	24
4.2. I_{NaP} charakteristikos	26
4.3 I_{NaP} hipotezės.....	28
4.3.1 Langinės srovės hipotezė.....	28
4.3.2 Natrio kanalų, kurie nesiinaktyvuoja, buvimo hipotezė.....	29
4.3.3 Modalinio varstymosi hipotezė.....	30
4.4 I_{NaP} funkcija.....	32
4.4.1 I_{NaP} įtaka perdavimo funkcijai (f-I santykiui).....	32
4.5 I_{NaP} ir patologijos.....	33
5. Neuronų savybės neuroninio tinklo veikimo metu.....	36
5.1. GABA receptoriai.....	36
5.1.1. Neuronų atsakai aktyvavus GABA receptorius.....	38
Eksperimento metodika.....	40
1. Preparato paruošimas.....	40
2. Registravimo metodika.....	41
3. Dinaminės fiksacijos metodas.....	43
Rezultatai.....	45
1. I_{NaP} įtaka ląstelės savybėms.....	45
2. Varžos sumažinimo įtaka ląstelės savybėms.....	48
Išvados.....	51
Santrauka.....	52
Summary	53
Literatūros sarašas.....	54

Santrumpos.

Ach	acetilcholinas;
AED	priešepilepsiniai vaistai;
AHP	pėdsekinė hiperpoliarizacija;
ALS	šoninė amiotrofinė sklerozė;
a.r.	amino rūgštis;
BK	didelio laidumo kalcio valdomi kalio kanalai;
CNS	centrinė nervų sistema;
fAHP	greita pėdsekinė hiperpoliarizacija;
f-I	dažnio- srovės priklausomybė;
GABA	γ -amino sviesto rūgštis;
g_{NaP}	pastovio natrio jonų srovės laidumas;
g_{NaW}	„langinis“ laidumas;
I_{NaP}	pastovi natrio jonų srovė;
I_{NaT}	pereinama natrio jonų srovė;
IPSP	slopinantis posinapsinis potencialas;
mAHP	vidutinės trukmės pėdsekinė hiperpoliarizacija;
PKA	baltymų kinazė A;
PKC	baltymų kinazė C;
PNS	periferinė nervų sistema;
sAHP	lėta pėdsekinė hiperpoliarizacija;
SK	mažo laidumo kalcio valdomi kalio kanalai;
SOD1	Cu, Zn superoksiddismutazės fermentas;
STX	saksitoksinas;
TTX	tetrodotoksinas;
VP	veikimo potencialas.

Įvadas.

Neuronas sinapsines sroves (įėjimas) transformuoja į veikimo potencialų seką (išėjimas). Šią transformaciją apibūdina neurono perdavimo funkcija, kuri yra dažnio-srovės priklausomybė (f-I). Perdavimo funkciją galima tirti eksperimentiškai- tai neurono atsakas (VP dažnis) į skirtingų amplitudžių pastovios srovės impulsus. Ši dažnio-srovės (f-I) priklausomybė dažniausiai tiesinė, kurios polinkis charakterizuoja atsako jautrumą srovės pokyčiui.

VP, bei jo sekų generavimą labai įtakoja srovės, kurias generuoja įtampos valdomi jonų kanalai. Viena tokių srovių yra pastovi natrio jonų srovė (I_{NaP}), kuri aptikta prieš tris dešimtmečius. Ypatinga ši srovė tuo, kad aktyvuojasi ikislenkstinėse įtampos vertėse, bei neinaktyvuojasi per fiziologiškai prasmingus laiko tarpus depoliarizavus membraną. Ši srovė gali įtakoti tiek VP sekų generavimą, tiek perdavimo funkciją.

Tyrimuose su integruotais preparatais aptikta, kad neuroninio tinklo veikimo metu ženkliai keičiasi neurono savybės- mažėja ląstelės įėjimo varža. Šis varžos mažėjimas siejamas su padidėjusiu sinapsiniu įėjimu. Šiomis sąlygomis gali ženkliai pakisti neurono perdavimo funkcija.

Bendru atveju tiriant neuroną yra nežinoma nei iš kur signalas gaunamas, nei kur jis siunčiamas. Mūsų tyrimo objektas- motoneuronai yra paskutinė nervų sistemos dalis, inervuojanti raumenis. Todėl motoneurono atsaką galima interpretuoti tiesiogiai.

Darbo tikslas.

Pagrindinis darbo tikslas išsiaiškinti kaip I_{NaP} , bei ląstelės varžos sumažinimas įtakoja motoneurono perdavimo funkciją.

Darbo uždaviniai.

- Nustatyti pastovios natrio jonų srovės įtaką ląstelės savybėms (reobazei, perdavimo funkcijai).
- Nustatyti kaip ląstelės savybės (reobazė, perdavimo funkcija) keičiasi sumažinus ląstelės įėjimo varžą.

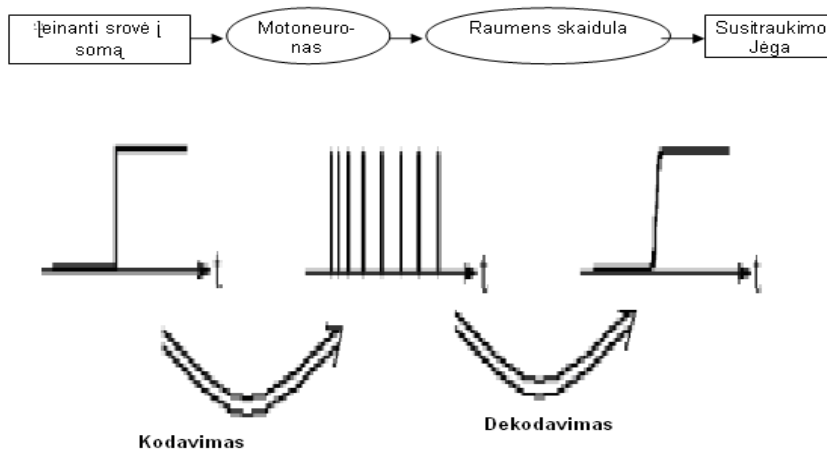
Literatūros apžvalga.

1. Motoneurono perdavimo funkcija.

Motorinį vienetą galima įsivaizduoti kaip kodavimo ir dekodavimo grandinę (Pav.1.1) (Kohn and Vieira 2002). Į motoneuroną kiti neuronai per sinapses perduoda signalą, kurio amplitudė koduoja informaciją apie signalo intensyvumą. Jei paduotas signalas motoneurone viršija slenkstį, tai motoneuronas sugeneruoja eilę veikimo potencialų (VP). VP amplitudės vienodos, o informacija apie stimulo intensyvumą koduojama VP dažniu. Motoneuronas įnervuoja raumeninę skaidulą, kuri priima veikimo potencialus, ir į juos atsako tolydžiu signalu- susitraukimo jėga.

Galima išskirti tris transformacijos etapus nuo sinapsinių įėjimų iki motorinių vienetų išėjimų (Binder et al. 1996):

- Sinapsinių srovių perdavimas iš sinapsių į motoneurono somą;
- Sinapsinių srovių pakeitimas į motoneurono VP dažnį;
- Motoneurono VP dažnio pakeitimas į raumens skaidulos jėgą.

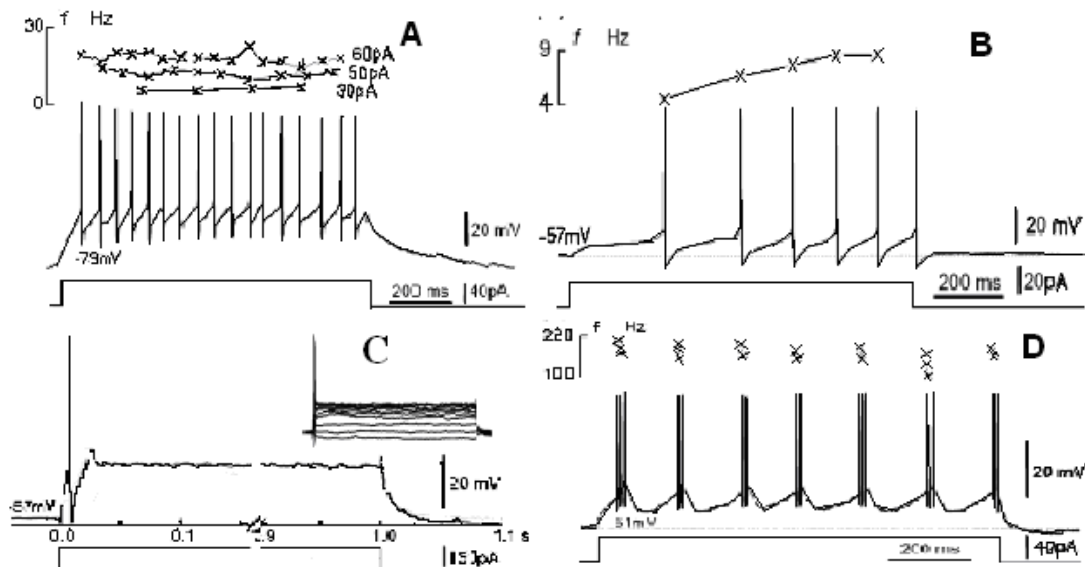


Pav. 1.1. Motorinis vienetas kaip kodavimo- dekodavimo grandinė.

Mus domina vidurinysis transformacijos etapas, kai sinapsinės srovės pakeičiamos VP seka. Šią transformaciją apibūdina perdavimo funkcija, kuri gali būti tiriama eksperimentiškai, kaip VP dažnio priklausomybė nuo įleidžiamos srovės (f-I santykis).

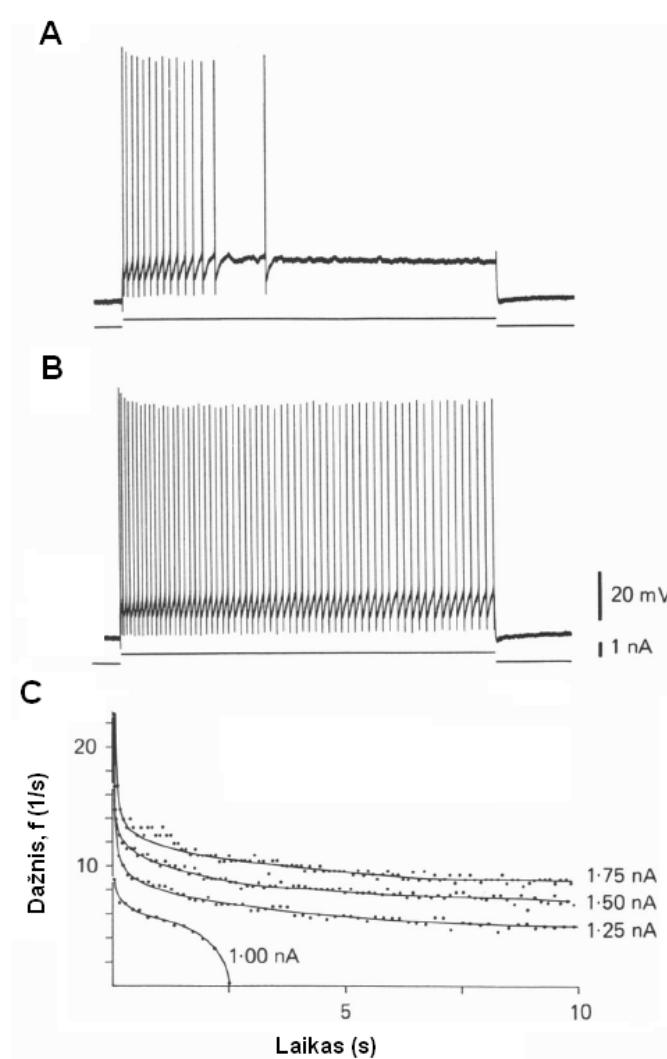
1.1. Motoneurono perdavimo funkcijos reguliacija.

Neuronai atsakydami į stimulą VP generuoja skirtingai: pavyzdžiui varlės tektume neuronai į stimulą gali atsakyti reguliariu VP generavimu (Pav.1.2A.), VP generuoti greitėjančiai (Pav.1.2B), pliūpsniais (Pav.1.2D) arba atsakyti į stimulą vieninteliu VP (faziniai neuronai) (Pav.1.2C) (Gutmaniene et al. 2003).



Pav.1.2. A) reguliarius VP generavimas; B) greitėjantis VP generavimas; C) fazinis VP generavimas; D) pliūpsninis VP generavimas (Gutmaniene et al. 2003).

Mūsų tyrimo objektas, vėžlių nugaros smegenų motoneuronai į depoliarizuojančios srovės impulsus atsako ritmišku VP generavimu. VP generavimo dažnis pasiekia maksimalią vertę kai tik įjungžiama depoliarizuojanti srovė, tačiau jis pradeda ženkliai mažėti ir pasiekia santykinai pastovią vertę po keletos sekundžių (Pav.1.3.) (Hounsgaard et al. 1988). Tai VP generavimas su adaptacija.



Pav.1.3. VP generavimas su adaptacija. A- motoneurono atsakas į srovės impulsą; B- atsakas į didesnį srovės impulsą; C- VP dažnis stimuliavimo eigoje (Hounsgaard et al. 1988).

Ankstesniuose tyrimuose nustatėme, kad motoneurono perdavimo funkcija (f-I) keičiasi laike. Stimulo pradžioje ji yra statesnė, nei stimuliavimo pabaigoje (Guzulaitis 2007). Šis f-I kitimas gali būti sąlygojamas VP dažnio adaptacijos, todėl tiriant perdavimo funkciją svarbu atsižvelgti į tai kuriuo laiko momentu analizuojamas VP dažnis. Norint geriau suprasti motoneurono perdavimo funkciją yra prasminga apžvelgti mechanizmus, kurie sąlygoja VP sekos generavimą su adaptacija, tai padarysime 2 skyriuje.

Neuronų VP generavimą ženkliai įtakoja srovės, kurias generuoja nuo įtampos priklausomi jonų kanalai (Alaburda et al. 2005). Šios srovės gali įtakoti ir neurono perdavimo funkciją. Mūsų darbe buvo tiriama pastovio natrio jonų srovės (I_{NaP}) įtaka

motoneurono perdavimo funkcijai, todėl I_{NaP} generuojančius kanalus, srovės charakteristikas, jos galimas funkcijas, bei įtaką neurono perdavimo funkcijai aptarsime 3 ir 4 skyriuose.

Dažniausiai neuronų savybės tiriamos smegenų pjūviuose, o siekiant mažesnio neuroninio tinklo „triukšmo“ blokuojami sinapsiniai perdavimai. Tokiu būdu galima gana tiksliai nustatyti neurono, izoliuoto nuo likusio neuroninio tinklo, savybes. Tačiau yra nustatyta, kad veikiant neuroniniam tinklui, ženkliai didėja neurono laidumas (Alburda et al. 2005). Šis laidumo padidėjimas taip pat gali įtakoti neurono perdavimo funkciją. Koku būdu galima sukelti neurono laidumo padidėjimą, ir taip priartėti prie sąlygų artimų neuroninio tinklo veikimo metu, aptarsime 5 skyriuje.

2. VP dažnio adaptacija.

Daugelis jaudriųjų ląstelių į viršslenkstinį įleidžiamos srovės impulsą atsako momentine veikimo potencialų salve, kurios dažnis laikui bėgant mažėja. Šis veikimo potencialų dažnio sumažėjimas vadinamas veikimo potencialų (VP) dažnio adaptacija (Powers et al. 1999).

Žiurkės motoneuronuose įnervuojančiuose liežuvį išskiriamos trys adaptacijos fazės: pradinė, ankstyvoji ir vėlyvoji (Powers et al. 1999). Pradinė fazė susideda iš staigaus VP dažnio kritimo, kuris yra tiesinė laiko funkcija. Po jos seka labiau laipsniškas mažėjimas-ankstyvoji fazė. Jos funkcija artima dviejų eksponenčių sumai, kurios laiko pastovioji 250 ms. Paskutinioji- vėlyvoji fazė, tai lėtesnis eksponentinis procesas, kurio laiko pastovioji 10- 20 s. (Powers et al. 1999)

Aptiktas įdomus adaptacijos reiškinys: interneuronuose (spontaniškai negeneruojantys VP) aptikta užlaikyta pradinė adaptacija- VP dažnis po poros VP pakyla, o tik vėliau mažėja (McDonagh et al. 1999).

Manoma, kad pirmieji didelio dažnio VP reikalingi greitam raumens susitraukimui, o pastoviai raumens jėgai palaikyti užtenka ir mažesnio dažnio VP (Sawczuk et al. 1995).

Priežastis tokio VP generavimo gali būti energijos taupymas. Buvo nustatyta, padavus vienodą impulsą į skirtingus motoneuronus, kad motoneuronuose be adaptacijos per sekundę buvo sugeneruojama apie 100 VP, tuo tarpu motoneuronuose su adaptacija tik 65 VP. Pirmoji kodavimo- dekodavimo sistema (be adaptacijos) yra neefektyvi energetiniu požiūriu, lyginant su antrąja (su adaptacija) (Kohn and Vieira 2002). Taip pat buvo nustatyta, kad motorinis vienetas pasižymintis adaptacija gali sugeneruoti didesnės jėgos raumens susitraukimą, nei motorinis vienetas be adaptacijos (Kohn and Vieira 2002).

Yra manančių, kad vėlyvoji adaptacijos fazė gali būti susijusi su nuovargiu atliekant nepertraukiamą raumens susitraukimą (Miles et al. 2005).

Pagrindiniai ląsteliniai mechanizmai, sukeliantys VP dažnio adaptaciją, nėra visiškai ištirti. Taip yra todėl, kad adaptacijos mechanizmas susideda iš daugelio komponentų (lentelė 1.).

Lentelė 1. Galimi mechanizmai sukeltantys VP dažnio adaptaciją (Sawczuk et al. 1997).

Fazė	Santykinė reikšmė, %	Laiko trukmė, s	Galimi mechanizmai
Pradinė	74 ± 27	Trukmė = 0.038 ± 0.011	mAHP sumacija, greita Na ⁺ kanalų inaktyvacija
Ankstyvoji	13 ± 16	= 0.24 ± 0.37	Nuolatinės Na ⁺ srovės inaktyvacija, sAHP, M-tipo K ⁺ srovė, lėta Na ⁺ kanalų inaktyvacija, Na ⁺ -K ⁺ siurblio aktyvumas, prisotinimas Ca ²⁺ izoliuotų sistemų
Vėlyvoji	14 ± 10	= 23 ± 19	Tas pats kaip ankstyvojoje fazėje

Labiau ištirtus mechanizmus aptarsime plačiau.

2.1. Pėdsekinė hiperpolarizacija (AHP).

Po kiekvieno veikimo potencialo seka gerai atskiriamos greita (fAHP) ir lėta (sAHP) (kitur ji vadinama vidutinės trukmės (mAHP)) pėdsekinės hiperpolarizacijos (Hounsgaard et al. 1988).

Kanalai generuojantys AHP

Šiuo metu yra žinomos trys kalcio valdomų kalio kanalų grupės: dideli (BK), vidutiniai (IK), bei maži (SK) (B.Hille 2001). Šie kanalai taip suskirstyti dėl laidumo: BK kalio kanalai pasižymi itin dideliu laidumu, IK laidumas yra šiek tiek mažesnis lyginant su BK, o SK kanalų laidumas yra net daugiau nei 10 kartų mažesnis už BK tipo kanalų laidumą.

SK kanalai generuoja srovę atsakingą už sAHP (B.Hille 2001), o BK kanalai- už fAHP (Christof Koch 1999).

fAHP

BK tipo kalio kanalą sudaro dviejų skirtingų tipų subvienetai: α subvienetai, kurie formuoja porą, ir β subvienetai, kurie atsakingi už kanalo reguliavimo funkciją (Vergara et al. 1998).

Srovė, kurią sugeneruoja BK kalio kanalai, vadinama I_c (Christof Koch 1999). I_c tai gana didelė išeinančioji srovė, kurios aktyvumas priklauso nuo kalcio koncentracijos (ląstelės

viduje) ir įtampos. Ji greitai aktyvuojama kai kalcis patenka į ląstelės vidų po kiekvieno veikimo potencialo. Šios srovės funkcija- ląstelės repoliarizacija po VP ir greita pėdsekinė hiperpolarizacija (fAHP). Šią srovę užblokavus su TAE ląstelės repoliarizacija lėtėja, o fAHP amplitudė sumažėja (Sah 1996).

Atlikus tyrimus su žiurkės *nucleus tractus solitarii* neuronais, BK kanalus blokuojant ChTX'u, jokių pakyčių VP dažnio adaptacijoje nebuvo pastebėta (Yen et al. 1999). Tai leidžia daryti išvadą, kad didelio laidumo nuo kalcio priklausomi kalio kanalai neprisideda prie VP dažnio adaptacijos.

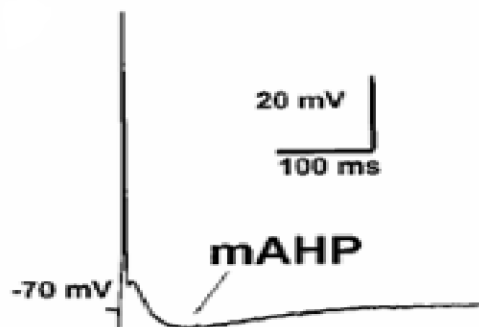
sAHP (mAHP)

SK kanalai nėra priklausomi nuo įtampos, taip pat jų neveikia TAE, bei jų jautrumas kalcio jonams yra didesnis, nei BK kanalų (Sah 1996). Pro SK tipo kanalus tekanti kalio jonų srovė arba repoliarizuoja, arba net hiperpolarizuoja ląstelę, kai kalcio koncentracija ląstelės viduje padidėja (B.Hille 2001). Šie kanalai uždaryti prie ramybės potencialo (Lape and Nistri 2000).

Veikimo potencialo metu greita ląstelės depoliarizacija aktyvuoja daugybę nuo įtampos priklausomų kalcinių kanalų, ko pasekoje įėjęs kalcis į ląstelės vidų aktyvuoja kalio kanalus atsakingus už mAHP (kitur sAHP) (Powers et al. 1999). Todėl manoma, kad SK kalio kanalai yra lokalizuoti arti kalcio kanalų, kurie valdomi įtampos (Vergara et al. 1998).

Pėdsekinės hiperpolarizacijos srovės dydis priklauso nuo veikimo potencialų dažnio (Christof Koch 1999). Kuo VP dažnis didesnis, tuo AHP amplitudė didesnė. Jei du veikimo potencialai įvyksta per trumpą laiko tarpą, tai antrasis VP gali įvykti prieš sunykstant kalcio koncentracijai (ląstelės viduje), bei prieš išnykstant kalcio aktyvuojamam kalio laidumui iki ramybės potencialo vertės (Powers et al. 1999). Šio proceso išvadoje sumuojasi abu kalio laidumai ir didėja AHP.

Motoneuronuose įnervuojančiuose liežuvį nustatyta, kad mAHP amplitudė yra apie 10mV (po vieno veikimo potencialo), didėjimas eksponentinis su laiku pastoviaja (23 ± 2 ms), mažėjimas taip pat eksponentinis, tik laiko pastovioji (150 ± 10 ms) (Pav.1.4.) (Lape and Nistri 2000).



Pav.1.4. mAHP (Lape and Nistri 2000).

Srovę, sukeliama SK kanalų, galima blokuoti užląstelinį Ca^{2+} pakeitus ta pačia koncentracija Co^{2+} (Lape and Nistri 2000) arba Mn^{2+} (Powers et al. 1999). Po tokio srovės blokavimo mAHP išnyksta (Lape and Nistri 2000), bei VP dažnio adaptacija ryškiai sumažėja pradžioje (tik paleidus srovę) (Powers et al. 1999). Tai parodo, kad mAHP labiausiai įtakoja adaptaciją pradinėje fazėje.

Kitas būdas blokuoti šią srovę naudojant SK kalio kanalų blokatorių apaminą-neurotoksiną išskiriamą iš bičių nuodų (John M.Power et al. 2000). Apaminas ženkliai padidina neurono VP dažnį, kas rodo adaptacijos sumažėjimą (Lape and Nistri 2000).

2.2. M-srovė.

M-srovės vardas atsirado, kai buvo nustatyta, kad acetilcholinai veikdamas per muskarininius receptorių šią srovę blokuoja (M=muskarininis) (B.Hille 2001). M-srovė padeda repoliarizuoti membraną po veikimo potencialo, riboja ląstelės jautrumą, bei mažina VP dažnį (B.Hille 2001).

Kanalai generuojantys M-srovę

M-srovę generuoja KCNQ šeimos kalio kanalai, kurie valdomi įtampos (B.Hille 2001). KCNQ kalio kanalų šeimą sudaro šie atstovai: KCNQ1, KCNQ2 ir KCNQ3 (Wang et al. 1998).

Kad nustatyti, kuris kanalas generuoja M-srovę, į varlės oocitus buvo sušvirkščiami šių kanalų mRNR (Wang et al. 1998). Remiantis šiais eksperimentais buvo padaryta išvada,

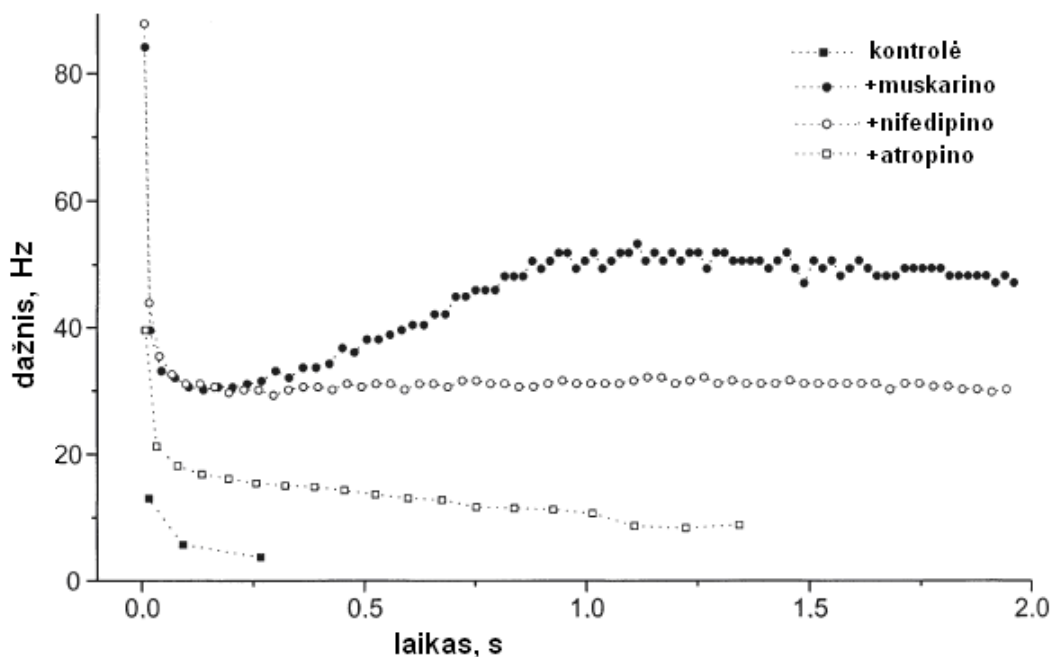
kad M-srovę generuoja kalio kanalai sudaryti iš KCNQ2 ir KCNQ3 subvienetų (heteropolimeras) (Wang et al. 1998).

M-srovės įtaka VP dažnio adaptacijai

Acetilholinas gali veikti nikotininius receptorių sukeldamas greitą trumpalaikį sužadimą, arba muskarininius receptorių sukeldamas lėtą, ilgalaikį sužadimą (Nowak and Macdonald 1983). Ach (arba muskarinas) veikdamas muskarininius receptorių sukelia lėtą membranos depoliarizaciją, kuri siejama su sumažėjusiu membranos laidumu (blokuojami kalio kanalai) (Nowak and Macdonald 1983).

M-srovę galima blokuoti muskarinu (Alaburda et al. 2002), XE991 (Alaburda et al. 2002; Wang et al. 1998), linopiridinu (Aiken et al. 1995). Tirtuose neuronuose šios srovės blokavimas sukelia sumažėjusią adaptaciją (Aiken et al. 1995; Alaburda et al. 2002; Wang et al. 1998). Be to blokuojant M-srovę ląstelė depoliarizuojama, kas leidžia daryti išvadą, kad M-srovė padeda palaikyti ląstelės ramybės potencialą (Aiken et al. 1995).

Pavyzdžiui suaugusio vėžlio nugaros smegenų neuroną paveikus muskarinu stebimas ryškus VP dažnio padidėjimas (Alaburda et al. 2002) (Pav.1.5.). Kaip žinia muskarinas taip pat aktyvina pastovios srovės įėjimą į ląstelę per L-tipo kalcinius kanalus (Svirskis and Hounsgaard 1998), o tai sukelia uždelstą VP dažnio didėjimą. Pridėjus L-tipo kalcinių kanalų blokatorių- nifedipino, šis uždelstas VP dažnio padidėjimas išnyksta (Pav.1.5.) (Alaburda et al. 2002). Likęs VP dažnio padidėjimas ir siejamas su M-srovės blokavimu (Alaburda et al. 2002). Pridėjus atropino, kuris atblokuoja muskarininius receptorių matome, kad VP dažnis stipriai sumažėja (Alaburda et al. 2002). Šis eksperimentas pagrindžia M-srovės įtaką adaptacijoje.



Pav.1.5. VP dažnio adaptacija kontrolėje, pridėjus muskarino, pridėjus nifedipino ir pridėjus atropino (Alaburda et al. 2002).

2.3. I_{NaP} .

Aptikta, kad VP dažnio adaptacija susijusi su veikimo potencialo formos pakitimais: mažėjant VP dažniui mažėja VP aukštis, ilgėja jo trukmė, bei mažėja VP depoliarizacijos ir repoliarizacijos greičiai (Zeng et al. 2005). Manoma, kad šie VP pakitimai ir VP dažnio adaptacija yra susijusi su pastovios įeinančios srovės inaktyvacija (Zeng et al. 2005).

Motoneuronams įnervuojantiems liežuvį būdingos pastovios įtekančios natrio (I_{NaP}) ir kalcio srovės. Norint nustatyti, kuri srovė būdinga tiriamam neuronui, užlūstelinis $CaCl_2$ buvo pakeistas $MnCl_2$, tačiau srovė neišnyko. Be to srovė blokuojama TTX'u. Šie rezultatai įrodo, kad tai I_{NaP} (Zeng et al. 2005).

I_{NaP} buvo blokuojamos phenytoin'u (Zeng et al. 2005) ir riluzoliu (riluzole) (Miles et al. 2005). Nors po srovės blokavimo VP aukštis sumažėja (Zeng et al. 2005), tačiau nei pradinėje, nei vėlyvesnėje adaptacijos fazėse esminių skirtumų neaptikta (Miles et al. 2005; Zeng et al. 2005).

Tyrimo neigiamas rezultatas (I_{NaP} neprisideda prie VP dažnio adaptacijos) aiškinamas tuo, kad sumažėjusi VP amplitudė, gali sukelti mažesnę kalcio įėjimą į ląstelę, o tai lemia sumažėjusį kalcio aktyvuojamų kalio kanalų laidumą, kuris lemia AHP. Toks įeinančių ir išeinančių srovių balansas galėjo nesukelti laukto phenytoin'o poveikio (Zeng et al. 2005). Tačiau tai tik samprotavimai, o realių įrodymų, kad I_{NaP} ar jos inaktyvacija gali sukelti VP dažnio adaptaciją, nėra.

2.4. Lėta Na^+ kanalų inaktyvacija.

Pastebėta, kad po ilgo neurono stimuliavimo mažėja neurono atsako VP depoliarizacijos greitis (Fleidervish et al. 1996). Šis VP parametras siejamas su pereinama natrio jonų srove (I_{NaT}), o repoliarizacija, už kurią atsakingos kalio srovės, stimuliavimo eigoje nekinta (Fleidervish et al. 1996).

VP depoliarizacijos greičio, bei VP maksimalios vertės (overshoot'as) mažėjimas koreliuoja su lėta VP dažnio adaptacija, todėl yra manančių, kad lėtą adaptaciją sukelia lėta I_{NaT} inaktyvacija (mažėja natrio kanalų galinčių sukelti VP) (Fleidervish et al. 1996; Miles et al. 2005).

Šie tyrimai neigia, kad VP dažnio adaptacijoje dalyvauja mAHP laidumas (blokuojama apaminu), BK-tipo nuo Ca^{2+} priklausomi K^+ kanalai (iberotoksinu), įtampos aktyvuojami Ca^{2+} kanalai ($CdCl_2$), M-srovė (linopiridinu) ir pastovi Na^+ srovė (riluzoliu) (Miles et al. 2005; Fleidervish et al. 1996).

Tyrėjų palaikančių šią idėją yra mažai, o ir išvadų pagrindumas kelia abejonių. Mano nuomone, šiai teorijai patvirtinti arba paneigti reikėtų daugiau įrodymų, nes vien VP pakitimai nėra ženklus pagrindimas, kad VP dažnio adaptaciją sukelia lėta I_{NaT} inaktyvacija.

2.5. Na^+/K^+ -ATPazė.

Yra manančių, kad Na^+/K^+ -ATPazė VP dažnio adaptaciją gali įtakoti vėlesnėse fazėse. Norint nustatyti ar ši pompa prisideda prie adaptacijos, buvo panaudotas Na^+/K^+ -

ATPazės blokatorius ouabain'as (Sawczuk et al. 1997). Buvo stebima adaptacija prieš pridėdant blokatoriaus, įdėjus blokatoriaus į užląstelinį skystį ir blokatorių išplovus. Indikatorius, kad ouabain'as blokuoja pompos veiklą, buvo hiperpolarizacijos amplitudė išjungus depolarizuojančią srovę. Ši hiperpolarizacija atsiranda dėl lėtos pompos veiklos. Įdėjus blokatoriaus hiperpolarizacijos amplitudė sumažėja, ir jos sumažėjimas priklauso nuo pridėtos ouabain'o koncentracijos. Deja spėjimai nepasitvirtino- Na^+/K^+ -ATPazės išjungimas neturėjo įtakos VP dažnio adaptacijai nei pradinėje, nei tolimesnėse adaptacijos fazėse (Sawczuk et al. 1997).

Nors šiame darbe (su žiurkės motoneuronais) nebuvo patvirtinta Na^+/K^+ -ATPazės įtaka VP dažnio adaptacijai, tačiau yra įrodyta, kad Na^+/K^+ -ATPazės aktyvumas prisideda prie lėtosios adaptacijos fazės bestuburių mechanoreceptoriuose (Powers et al. 1999).

3. Na⁺ kanalo, valdomo įtampos, struktūra.

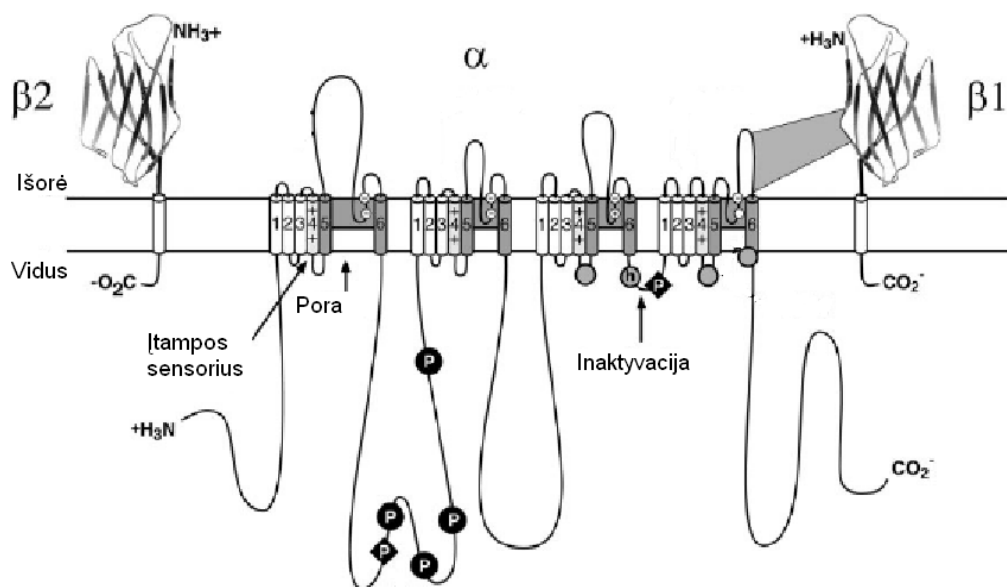
Įtampos valdomi Na⁺ kanalai yra viena iš svarbiausių nervų sistemos sudedamųjų dalių. Dėl trumpalaikio ir regeneratyvaus natrio jonų laidumo padidėjimo, sugeneruojamas veikimo potencialas, kuris gali skliti ilgais atstumais aksonu (Taylor 1993).

Pirmieji natrio jonų sroves užregistravo Hodgkin ir Huxley. Jie natrio jonų kanalus charakterizavo esminiais bruožais: nuo įtampos priklausoma kanalo aktyvacija; greita inaktyvacija; selektyviu jonų laidumu (Catterall 2000). Kanalo sritis, kurios atsakingos už šias savybes aptarsime plačiau šiame skyriuje.

Na⁺ kanalai sudaryti iš α (260 kDa), $\beta 1$ (36 kDa) ir $\beta 2$ (33 kDa) subvienetų (Catterall 2000).

α subvienetas.

Jis susideda iš keturių homologiškų domenų. Kiekvienas domenas turi šešis transmembraninius segmentus S1-S6, bei P kilpą tarp S5 ir S6 segmento, kuri sudaro poros dalį (Goldin 2002). (Pav.1.6.)

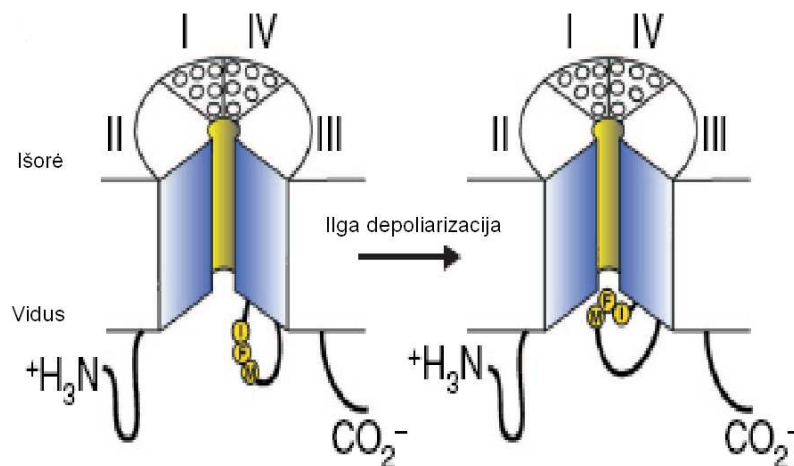


Pav.1.6. Na⁺ kanalo, valdomo įtampos, struktūra (Catterall et al. 2005).

P kilpa tarp S5 ir S6 segmentų (I-IV domenuose) formuoja selektyvumo filtrą. Jo funkciją apsprendžia neigiamai įkrautos a.r., kurios suformuoja du neigiamai įkrautus žiedus: išorinį (EEDD) ir vidinį (DEKA) (Catterall 2000). Taip pat P kilpoje yra sritys prie kurių jungiasi kanalo blokatoriai. Šių sričių mutacijos sukelia ženklų efektą TTX ir STX veikimui- kanalas tampa atsparesnis blokatoriams (TTX ir STX yra Na⁺ kanalų blokatoriai) (Yu and Catterall 2003).

S4 transmembraninis segmentas kas trečioje pozicijoje turi teigiamai įkrautą a.r., o tarp jų dvi hidrofobinės a.r. (Catterall 2000). Teigiamai įkrautos a.r. dalyvauja kaip sensorius kanalo aktyvacijai (Catterall et al. 2005). Depoliarizavus membraną S4 segmentas juda į išorę sukeldamas kanalo konformacinius pokyčius, kurie atidaro kanalą (Catterall 2000). Neutralizavus šio segmento teigiamai įkrautas a.r., sumažėja atsidarymo priklausomybė nuo įtampos (Yu and Catterall 2003).

Inaktyvaciją apsprendžia kilpa tarp III ir IV domenu, jos motyvas IFM (Ile-Phe-Met) (Yu and Catterall 2003). Ilgos depoliarizacijos metu ši kilpa įsijungia į kanalo struktūrą ir blokuoja porą, nepraleisdama jonų (Catterall et al. 2005). (Pav.1.7.)



Pav.1.7. Na⁺ kanalo inaktyvacija (Yu and Catterall 2003).

Inaktyvacijai reikalinga ir receptorinė sritis- sritis prie kurios jungiasi IFM motyvas. Mutagenėzės eksperimentais nustatyta, kad receptorine sritim gali dalyvauti: IV domeno S6 transmembraninio segmento viduląstelinio galo hidrofobinės a.r.; III domeno

viduląstelinės kilpos, jungiančios S4 ir S5 segmentus, a.r.; IV domeno viduląstelinės kilpos, jungiančios S4 ir S5 segmentus, a.r. (Catterall 2000). Pakeitus šias a.r. inaktyvacija susilpnėja- suardoma receptorinė sritis.

Yra manoma, kad kanalo aktyvacija su inaktyvacija yra glaudžiai susijusios (Catterall 2000). Šiame procese gali dalyvauti IV domeno S4 segmentas, nes pakeitus teigiamai įkrautas a.r. viduląsteliniame šio segmento gale, selektyviai pakinta inaktyvacija. Šio segmento judėjimas dėl įtampos pokyčio (aktyvacija) gali būti signalas kanalo inaktyvacijai (Catterall 2000).

β subvienetai.

Pagrindinės kanalo funkcijos: kanalo atsidarymas, jonų selektyvumas ir greita inaktyvacija pasireiškia kai kanalą sudaro tik α subvienetas (Yu and Catterall 2003), tačiau normaliai įtampos priklausomybei, bei varstymosi kinetikai reikalingi β subvienetai (Catterall 2000).

Natrio kanalai subrendusioje CNS turi β1 (arba β3) ir β2 subvienetus, o kanalai subrendusiuose skeleto raumenyse turi tik β1 subvienetą (Goldin et al. 2000). Jau nustatytas ir β4 subvienetas, kuris randamas CNS'e (Catterall et al. 2005).

β subvienetai turi panašią formą (erdvinį išsidėstymą) tačiau jų amino rūgščių sudėtis skiriasi (Catterall 2000). Jie turi didelį užląstelinį domeną, vieną transmembraninį segmentą ir mažą viduląstelinį domeną (Catterall 2000).

Natrio kanalo β subvienetai, manoma, atlieka dvi funkcijas- kanalo varstymosi moduliaciją ir sąveika tarp ląstelių. Įdomu, kad nustačius β1 ir β2 subvienetų pirminę struktūrą pasirodė, kad jie struktūriškai labai panašūs į ląstelių sulipimo (cell adhesion) šeimos molekules. Šios molekulės dalyvauja ląstelių sąveikoje nervų sistemoje, bei kituose audiniuose. Todėl manoma, kad šie subvienetai gali dalyvauti formuojant specifines sritis, pasižyminčias dideliu natrio kanalų tankiu: Ranvje sąsmauka, aksono kalnelis (Catterall 2000).

Neuromoduliacija.

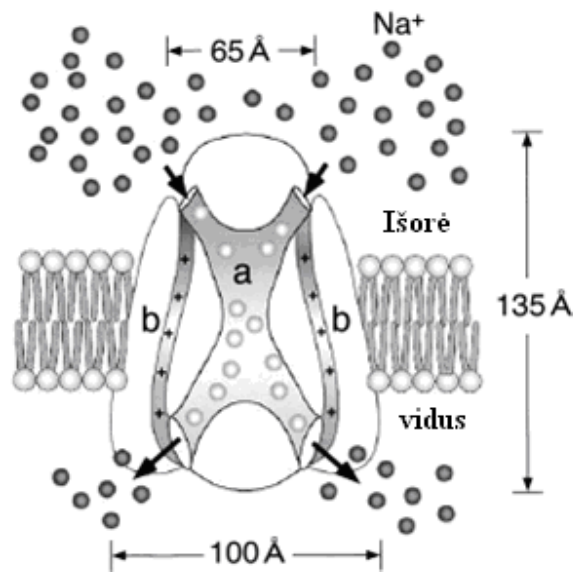
Natrio kanalai gali būti fosforilinami baltymų kinazės A (PKA). Fosforilinimo sritys-viduląstelinė kilpa jungianti I ir II domenų (Pav.1.6. juodi apskritimai). Ši kanalų

moduliacija sukelia natrio jonų srovės sumažėjimą, tačiau aktyvacijos ir inaktyvacijos priklausomybė nuo įtampos nepakinta (Catterall 2000).

Taip pat natrio kanalai gali būti fosforilinami baltymų kinazės C (PKC). Po šios kanalų moduliacijos sumažėja natrio jonų srovė, bei sulėtėja inaktyvacija. Inaktyvacija lėtėja, nes fosforilinama sritis atsakinga už inaktyvaciją, o srovės sumažėjimas vyksta dėl fosforilintos kilpos jungiančios I ir II domenų (Pav.1.6. juodi rombai)(Catterall 2000).

Erdvinė kanalo struktūra.

Trimatė Na^+ kanalo struktūra buvo nustatinėjama naudojant žemos temperatūros elektronų mikroskopiją, šaldant heliu, ir kombinuojant su vienos dalelės atvaizdo analize (Ogata and Ohishi 2002). Nustatyta, kad Na^+ kanalas (iš unguorio *Electrophorus electricus*) yra varpo formos, kanalo aukštis 135Å, viduląstelinis plotis 100Å ir kvadrato formos, o plotis ląstelės išorėje 65Å ir yra pusiau sferiškas (Pav.1.8.).



Pav.1.8. Ketvirtinė Na^+ kanalo struktūra (Ogata and Ohishi 2002).

Išorinėje membranos pusėje kanalas turi keturias mažas angas, pro kurias Na^+ jonai tikriausiai patenka į kanalą. Šios angos jungiasi į centrinę porą, manoma, kad tai jonų pralaidumo pora. Centrinė pora susiaurėja transmembraninėje dalyje ir pasidalija į keturias išėjimo angas viduląstelinėje kanalo pusėje. Pro jas manoma išleidžiami jonai.

Be centrinės poros kanale yra 4 plonos ir iškraipytos periferinės poros (po viena kiekviename domene). Manoma jos dalyvauja įtampos jutime, bei kanalo atsidaryme. (Ogata and Ohishi 2002)

3.1 Na⁺ kanalų klasifikacija.

Žinduolių Na⁺ kanalų nomenklatūra: priešdėlis, kuris apibūdina kokius jonus kanalas praleidžia, bei pažymi pagrindinį fiziologinį kanalo reguliatorių (Nav). Po to seka skaičius nurodantis geno pošeimį (Nav1). Toliau sekantis dešimtainis skaičius nurodo kanalo izoformą (Nav1.1) (Goldin 2002). Splaisingo variantai pažymimi raide, sekančia po dešimtainio skaitmens (Nav1.1a) (Goldin et al. 2000).

Ši nomenklatūra paremta įtampos valdomų kalio kanalų nomenklatūra. Panaši nomenklatūra sudaryta ir įtampos valdomiems kalcio kanalams (Catterall et al. 2005).

Devynios žinduolių natrio kanalų izoformos, kurios buvo identifikuotos ir funkciškai ekspresuotos, yra daugiau nei 50% identiškios pagal amino rūgščių seką tiek transmembraninėse srityse, tiek ekstraląstelinuose domenuose (Goldin et al. 2000). Kalio ir kalcio įtampos valdomi kanalai, kurių a.r. panašumas mažesnis nei 50% suskirstyti į atskirus pošeimius. Kadangi natrio kanalų izoformos labai panašios (panašumas didesnis nei 50%), tai jie sudaro vieną pošeimį (Catterall et al. 2005).

Įtampos valomi Na⁺ kanalai yra atstovai kanalų superšeimos į kurią taip pat įeina įtampos valdomi K⁺ kanalai, įtampos valdomi Ca²⁺ kanalai, bei cikliniu nukleotidų valdomi kanalai. Na⁺ ir Ca²⁺ kanalų domenai yra vienoje amino rūgščių grandinėje, o K⁺ ir ciklinių nukleotidų valdomų kanalų domenai atskiri, sudaro tetramerą. Žiūrint tik struktūriškai, galima manyti, kad Na⁺ ir Ca²⁺ kanalai evoliucionavo iš vieno domeno genų duplikacijos eigoje (Goldin 2002). Kiti mano, kad natrio kanalai kilo iš kalcio kanalų šeimos, kuri taip pat turi keturis homologinius domenų (Yu and Catterall 2003). Tuo tarpu kalcio kanalai galėjo kilti iš kalio arba ciklinių nukleotidų valdomų kanalų įvykus dvigubai genų duplikacijai (Yu and Catterall 2003).

Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.7 kanalai yra labiausiai homologiški. Jie yra ekspresuojami neuronuose ir pasižymi dideliu jautrumu TTX'ui. Jų genai yra antroje chromosomoje (Goldin et al. 2000).

Nav1.5, Nav1.8 ir Nav1.9 kanalų amino rūgščių seka daugiau nei 74% homologiška kanalams užkoduotiems antroje chromosomoje. Jie mažiau jautrūs TTX'ui, ekspresuojami širdyje, nugarinių šaknelių ganglijiniuose neuronuose. Genai yra trečioje chromosomoje (Goldin et al. 2000).

Nav1.4 ekspresuojami skeleto raumenyse, o Nav1.6 CNS'e (Goldin et al. 2000).

Iš pelių, žiurkių ir žmogaus buvo klonuoti baltymai labai panašūs į natrio kanalus, tačiau jie dar funkciškai neekspresuoti (Na_x). Jie apie 50% homologiški pirmajam natrio kanalų tipui, tačiau yra reikšmingų skirtumų amino rūgščių sekoje, koduojančioje įtampos sensorių, inaktyvacijos vartus ir poros regioną, o tai yra svarbios kanalo sritys, todėl pasiūlyta, kad tai galėtų būti atskiras pošeimis (Goldin et al. 2000). Į atskirą pošeimį Na_x išskiriamas dar ir todėl, kad jis yra apie 50% panašūs į Nav1, o Na_x tarpusavio panašumas siekia daugiau nei 80% (Catterall et al. 2005). Šie baltymai ekspresuojami širdyje, gimdoje, lygiuosiuose raumenyse, astrocituose ir PNS neuronuose.

Kadangi įtampos sensoriuje (S4 segmentas) yra mažiau teigiamai įkrautų a.r., tai manoma, kad šie kanalai jautrūs ne įtampai, o natrio jonų koncentracijos gradientui (Ogata and Ohishi 2002). Taip pat manoma, kad šių kanalų selektyvumas natrio jonams yra mažesnis (Goldin et al. 2000).

β1 subvieneto genas yra 19 chromosomoje, o β2 ir β3- 11 chromosomoje. Tačiau β1 ir β3 yra labiau panašūs pagal a.r. seką, bei funkciją (Yu and Catterall 2003).

4. Pastovi Na^+ srovė (I_{NaP}).

Pagrindinė įtampos valdomų Na^+ jonų kanalų generuojamos srovės funkcija-generavimas ir sklidimas VP. Iš tyrimų su raumenim, širdies raumenim, bei nerviniais audiniais atrasta, kad be greitos, greitai besiinaktyvuojančios Na^+ jonų srovės (I_{NaT}), ląstelėm būdinga nesiinaktyvuojanti, TTX'ui jautri natrio jonų srovė (Alzheimer et al. 1993). Ši srovė pavadinta pastovia natrio jonų srove (I_{NaP}).

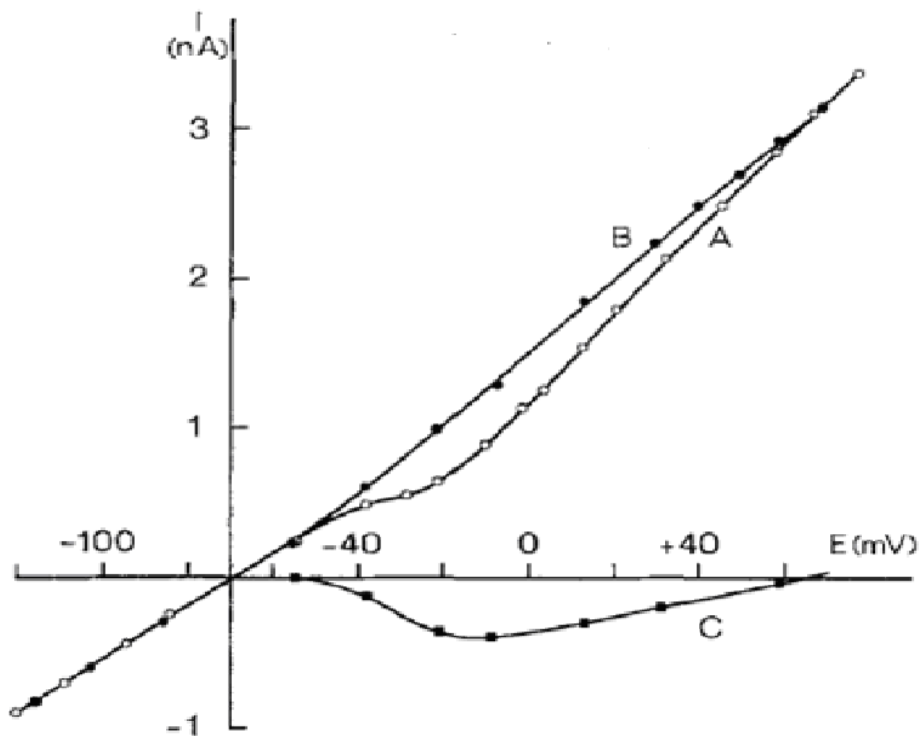
Nesiinaktyvuojanti, arba lėtai besiinaktyvuojanti natrio jonų srovė buvo aptikta: Ranyje sąsmaukose, žinduolių neokortekso neuronuose, motoneuronuose, gumbure, entorinėje žievėje, hipokampe, smegenėlėse, žmogaus neokortekso neuronuose (Crill 1996; Dubois and Bergman 1975; Ogata and Ohishi 2002), glijoje (Taylor 1993). Ir net bestuburiuose: medicininė dėlė, medūza, aktinija, plokščiosios kirmėlės, vabzdžiai, polipai, galvakojai, bei sraigės (Kiss 2008).

4.1. I_{NaP} tyrimai.

Pirmieji eksperimentai, kurių metu buvo nustatyta I_{NaP} , atlikti su varlių mielinizuotų skaidulų Ranyje sąsmaukomis (Dubois and Bergman 1975). Srovei nustatyti buvo naudojamas potencialo fiksacijos protokolas. Tiriama srovės pokyčiai į laiptelio pavidalo įtampos pokyčius.

Fiksavus įtampą viršslenkstinėje įtampų srityje be I_{NaP} aktyvuojasi ir I_{NaT} , tačiau tuoj po aktyvacijos srovė inaktyvuojasi. Užblokavus kalio jonų kanalus (+TEA) ląstelė nerepoliarizuojasi, o neįvykus ląstelės repoliarizacijai I_{NaT} pakartotinai negali aktyvuotis. Tokiu atveju matuojant po tam tikro laiko (100-200 ms) atsaką, I_{NaT} komponentė išnyksta, lieka tik I_{NaP} (Dubois and Bergman 1975).

1.9. paveiksle pavaizduoti eksperimento metu gauti rezultatai. A kreivė atspindi kontrolinį matavimą, B kreivė rodo ląstelės atsaką blokavus I_{NaP} TTX'u, o C kreivė rodo skirtumą tarp A ir B kreivių (atspindi I_{NaP} komponentę) (Dubois and Bergman 1975).



Pav. 1.9. Lāstelēs atsakai ī potencialo pokyčius. A- kontrolē, B- blokavus Na^+ jonū kanalus TTX'ū, C- skirtumas tarp A ir B (I_{NaP} komponentē) (Dubois and Bergman 1975).

Kitas būdas išskirti I_{NaP} , nustatyti srovės aktyvavimosi priklausomybę nuo įtampos, bei kitus srovės parametrus, yra panaudoti lėto įtampos kilimo (rampos) protokolą (20-50mV/s). Tokiu būdu I_{NaT} inaktyvuojasi greičiau nei aktyvuojasi, ir registruojama tik I_{NaP} (Crill 1996; Kiss 2008).

I_{NaP} specifinio blokatoriaus nėra, tačiau yra vaistas riluzolis (riluzole), kuris kartais naudojamas šios srovės tyrimams (Urbani and Belluzzi 2000). Riluzolio veikimo mechanizmas dvejopas- pirmiausia siejamas su slopinimu natrio kanalų valdomų įtampos, bei glutamato išskyrimo sumažinimu. Jis neblokuoja I_{NaP} specifiskai, veikia ir I_{NaT} - sumažina pereinamą natrio jonų srovę pastumdamas inaktyvacijos vertę į neigiamesnių potencialų vertes. Tačiau jis labiau slopina I_{NaP} , nei I_{NaT} (Urbani and Belluzzi 2000). Todėl kiti mokslininkai jį naudoja kaip specifinį I_{NaP} blokatorių (Kuo et al. 2004; Kuo et al. 2005; Pieri et al. 2009).

4.2. I_{NaP} charakteristikos

Aktyvacija.

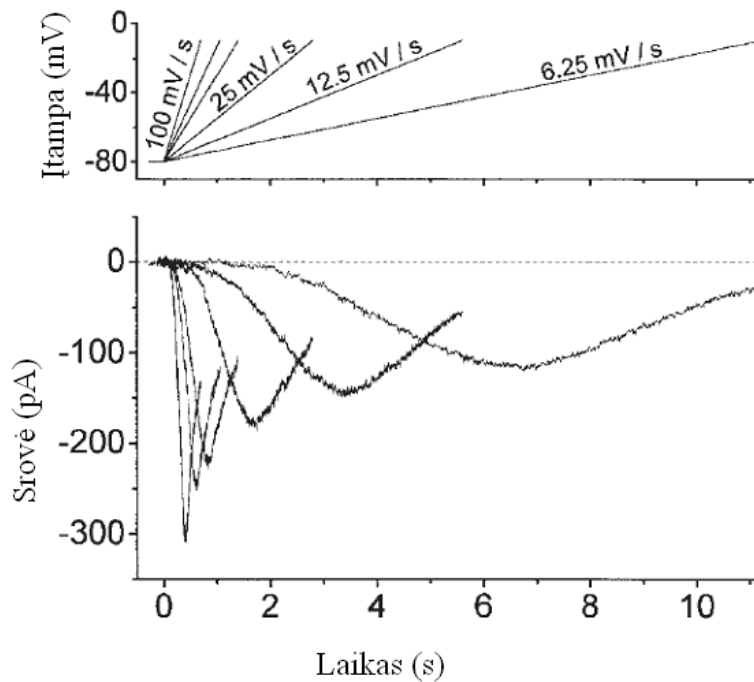
I_{NaP} aktyvacija greita- laiko pastovioji apie 1 ms (Vervaeke et al. 2006). I_{NaP} aktyvacijos slenkstis skiriasi nuo I_{NaT} - pastovi natrio jonų srovė aktyvuojasi prie ~10 mV neigiamesnių įtampos verčių lyginant su pereinamąja natrio jonų srove (Brown et al. 1994; Crill 1996; Magistretti et al. 2006; Urbani and Belluzzi 2000; Vervaeke et al. 2006).

Santykinis srovės dydis.

I_{NaP} lyginant su I_{NaT} , pastovi natrio jonų srovė yra labai maža, sudaro kelis procentus pereinamosios natrio jonų srovės (Crill 1996; Magistretti et al. 2006; Urbani and Belluzzi 2000). Nors ši srovė yra sąlyginai maža, tačiau ji aktyvuojasi iki VP slenksčio. Tame įtampų intervale ląstelės įėjimo varža yra labai didelė, todėl net ir nedidelė I_{NaP} srovė sukelia žymius potencialo pakitimus (Crill 1996; Magistretti et al. 2006; Urbani and Belluzzi 2000).

Inaktyvacija.

Nors teigiama, kad pastovi natrio jonų srovė neinaaktyvuojasi, tačiau yra duomenų, kad egzistuoja I_{NaP} lėta inaktyvacija priklausanti nuo įtampos ir laiko (Magistretti and Alonso 1999a). I_{NaP} dydis priklauso nuo įtampos kitimo greičio (Pav.1.10.). Įtampai kylant lėčiau, maksimali srovės vertė mažesnė (Magistretti and Alonso 1999a). Nustatyta, kad inaktyvacijos laiko konstantos yra sekundžių eilės (2-7s) (Magistretti and Alonso 1999a).



Pav.1.10. I_{NaP} dydžio priklausomybė nuo įtampos kitimo greičio. Viršuje- įtampos kitimai, o apačioje- registruojama I_{NaP} (Magistretti and Alonso 1999a).

Srovės lokalizacija.

I_{NaP} gali būti lokalizuota aksone, somoje ar dendrituose. Dėl kanalų tankio pasiskirstymo neurone, kanalo subvienetų sudėties, pasiskirstymo sąveikos tarp kanalų ir vidinės, bei išorinės terpės, neuromoduliacijos regioninio pasiskirstymo- I_{NaP} gali būti išreiškiami skirtingais kiekiais, skirtingose neurono srityse (Astman et al. 2006).

Lokalus TTX'o naudojimas parodė, kad blokatoriaus pridėjimas prie aksono blokuoja I_{NaP} registruotą somoje. Tuo tarpu TTX'o pridėjimas prie somos ar dendritų nesukėlė I_{NaP} pokyčių (Astman et al. 2006). Šio eksperimento išvada- I_{NaP} ekspresuojama proksimaliniame aksone. Tai gali būti išvada didesnio kanalų tankio aksone, didesnės vėlyvų atsivėrimų tikimybės arba šie mechanizmai gali veikti lygiagrečiai (Astman et al. 2006).

Srovės moduliacija.

Smegenų žievės neuronų aktyvumas gali būti keičiamas daugelio ligandų, kurie aktyvuoja baltymų kinazę C (Astman et al. 1998). Dažniausiai teigiama, kad PKC neuronų aktyvumą keičia per įtampos valdomus kalio jonų kanalus, mažėja kalio jonų

laidumas. Tačiau PKC keičia ne tik kalio, bet ir natrio jonų laidumus (Astman et al. 1998).

Aktyvavus PKC *phorbol* esteriu pastebėta, kad I_{NaP} sumažėja prie depoliarizuotų įtampos varčių, tačiau tai neturi didelės įtakos neuronui, nes prie šių įtampos varčių aktyvuojamos didelės amplitudės kalio ir natrio srovės. Įdomiau tai, kad I_{NaP} aktyvavimo priklausomybė pasislenka į neigiamų įtampos varčių pusę. Todėl I_{NaP} labiau neigiamesnėse įtampos vertėse padidėja, o tai sukelia VP slenksčio poslinkį į neigiamesnių įtampų pusę (10-20mV). To išvadoje padidėja neuronų aktyvumas (sužadynamumas) (Astman et al. 1998).

4.3 I_{NaP} hipotezės.

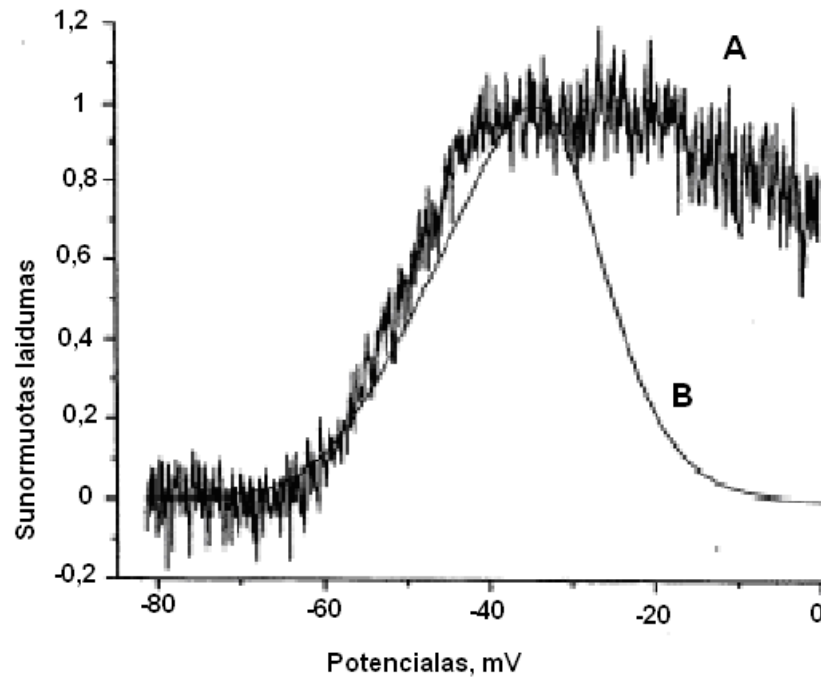
Yra trys I_{NaP} hipotezės (Crill 1996):

- ✓ langinė srovė, paremta Hodgkin-Huxley modeliu;
- ✓ šią srovę generuoja kitas natrio jonų kanalų pošeimis, kurio kanalams nebūdinga inaktyvacija;
- ✓ šią srovę generuoja pereinamos natrio jonų srovės kanalai, tik keičiasi jų inaktyvacija (modalinio varstymosi hipotezė).

4.3.1 Langinės srovės hipotezė

Pagal Hodgkin-Huxley modelį egzistuoja tam tikras įtampos intervalas (vadinamas langu) kuriame natrio kanalas yra atidarytas nusistovėjus pusiausvyrai (B.Hille 2001). Tačiau ši hipotezė yra paneigta (Magistretti and Alonso 1999b).

Palyginus „langinio“ laidumo (g_{NaW}) ir g_{NaP} (I_{NaP} laidumas) priklausomybę nuo įtampos, pastebėti ženklūs skirtumai įtampų intervale teigiamesniame nei -40mV (Pav.1.11.). g_{NaW} numatomas greitas kritimas nuo -40mV, o ties -10mV numatoma visiška inaktyvacija. Tuo tarpu g_{NaP} šiame įtampų intervale lieka beveik nepakitęs (Magistretti and Alonso 1999b).



Pav.1.11. „Langinio“ laidumo (B) ir I_{NaP} laidumo (A) palyginimas (Magistretti and Alonso 1999b).

Numatomas g_{NaW} dydis yra žymiai mažesnis lyginant su g_{NaP} , išmatuotu realiose ląstelėse. Maksimalus g_{NaW} sudaro mažiau nei 10% maksimalaus g_{NaP} (Magistretti and Alonso 1999b).

Šie duomenys patvirtina, kad I_{NaP} , esanti entorinės žievės II sluoksnio neuronuose, negali būti priežastis klasikinės Hodgkin-Huxley „langinės“ srovės (Magistretti and Alonso 1999b).

4.3.2 Natrio kanalų, kurie nesiinaktyvuoja, buvimo hipotezė.

Esant kitam natrio jonų kanalų pošeimiui rodo skirtingas pereinamosios ir pastovios natrio jonų srovės aktyvacijos slenkstis: pastovios yra apie 10 mV neigiamesnis, nei pereinamosios. Nesiinaktyvuojantys Na^+ kanalai buvo aptikti amono rago neuronų kultūrose ir Purkinjė ląstelėse (Crill 1996).

Skilvelių miocituose pereinamoji natrio jonų srovė yra TTX'ui nejautri, o pastovi- jautri (Kiss 2008). Jautrumo TTX'ui skirtumas parodo, kad a.r. seka yra skirtinga kanalų

generuojančių pereinamą ir pastovią natrio jonų srovę. Skirtis turi bent jau sritis prie kurios jungiasi TTX molekulė, o tai reiškia, kad srovės gali būti generuojamos skirtingų kanalų (Kiss 2008). TTX'ui nejautri pastovi natrio jonų srovė aptinkama ir kitose ląstelėse (Taylor 1993). Tai gali būti srovė generuojama kanalų atskirų nuo I_{NaT} .

Ląstelės dažniausiai ekspresuoja ne vieną, bet kelis įtampos valdomų natrio kanalų potipius. Pavyzdžiui žiurkės nugarinės šaknelės ganglijiniai neuronai (DRG) turi 6 natrio kanalų potipius: $Na_v1.1$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$, Na_x . Manoma, kad I_{NaT} yra mišinys srovių generuojamų $Na_v1.1$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$ kanalų, o I_{NaP} gali generuoti $Na_v1.8$, $Na_v1.9$ kanalai (Kiss 2008). Kiti teigia, kad I_{NaP} gali būti generuojama $Na_v1.6$ kanalų (Astman et al. 2006; Ogata and Ohishi 2002).

Šiai hipotezei prieštarauja tai, kad I_{NaP} gali generuoti $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, bei $Na_v1.6$ kanalai, kurie generuoja ir I_{NaT} (Mantegazza et al. 2005). Taip pat I_{NaP} gali būti moduluojama, kai $Na_v1.1$ ir $Na_v1.2$ kanalai (atsakingi už I_{NaT}) veikiami G baltymo $\beta\gamma$ subvienetų (Mantegazza et al. 2005). Tai parodo, kai šios srovės generuojamos tų pačių kanalų.

4.3.3 Modalinio varstymosi hipotezė.

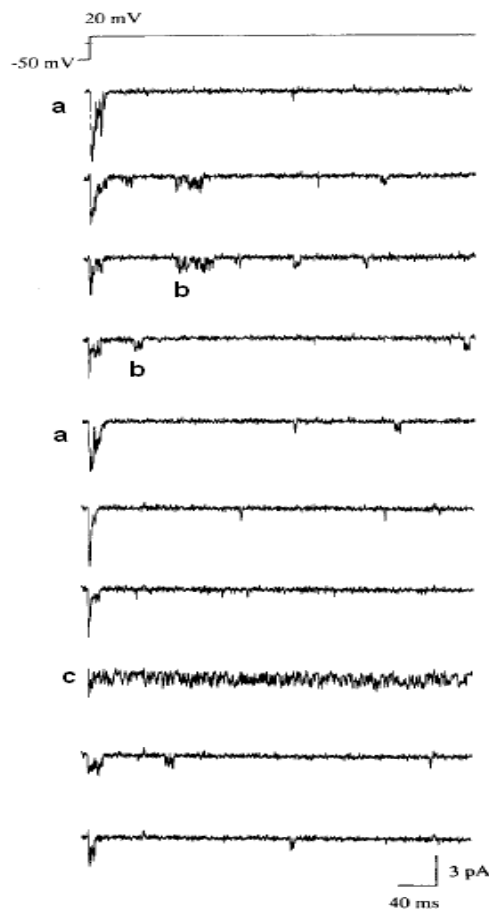
Gigantinio kalmaro aksone pašalinus I_{NaT} inaktyvaciją su viduląstelinėmis *papain*'o ir *N-bromoacetamide*'o injekcijomis, kanalų aktyvacija tampa kaip I_{NaP} (t.y. apie 10mV neigiamesnė) (Brown et al. 1994; Kiss 2008). Tokie eksperimento rezultatai paneigia hipotezę, kad I_{NaP} ir I_{NaT} generuoja skirtingi kanalai. Manoma, kad I_{NaP} yra generuojama tų pačių kanalų, kurie generuoja ir I_{NaT} , tiesiog prarandama šių kanalų inaktyvacija (Brown et al. 1994).

Kitas svarus šios hipotezės argumentas tai, kad dažniausiai TTX blokuoja I_{NaT} ir I_{NaP} . Greičiausiai šios srovės ir generuojamos to pačio kanalo, o šių srovių kinetika skiriasi dėl skirtingų kanalo varstymosi modų (Stafstrom 2007).

Geras įrodymas natrio kanalų modalinio varstymosi gautas iš tyrimų atliktų naudojant vieno kanalo lopinėlio fiksacijos protokolus (Alzheimer et al. 1993). Ilgi depoliarizacijos impulsai parodė tris skirtingas Na^+ kanalų aktyvumo modas (Alzheimer et al. 1993):

- a. Tipinis I_{NaT} sukeliantis kanalų atsivėrimas;

- b. Na^+ kanalai parodė pavienius trumpalaikius atsidarymus, kurie kartais pereidavo į minipliūpsnius (10-40 ms);
- c. Trečia varstymosi moda pasireiškia kaip pliūpsnis kanalo atsivėrimų trunkančių net iki depoliarizacijos pabaigos. Tokių varstymosi modų aptikta apie 1% visų įrašų. (Pav.1.12.)



Pav.1.12. Skirtingos varstymosi modos. a- kanalų atsivėrimas sąlygojantis I_{NaT} , b- pavieniai atsidarymai ir minipliūpsniai, c- nenutrūkstantis kanalo atsidarymas (Alzheimer et al. 1993).

Paskaičiavimai parodė, kad trumpalaikiai vėlyvi kanalo atsidarymai ir nepertraukiami atsivėrimų pliūpsniai gali generuoti mažą, bet reikšmingą ląstelei srovę (Alzheimer et al. 1993). Tai galėtų būti I_{NaP} .

Paprasčiausia paaiškinti nepertraukiamą pliūpsninį aktyvumą galima laikinu blokavimu perėjimo į inaktyvacijos būseną (Alzheimer et al. 1993).

4.4 I_{NaP} funkcija.

Kaip jau minėta anksčiau I_{NaP} aktyvuojasi prie neigiamesnių įtampų, nei VP slenkstis. Tada ląstelės varža yra didelė, todėl net ir maža srovė sukelia ryškų potencialo pokytį. Pavyzdžiui, jei pastovioji natrio jonų srovė sudaro tik 0,25% pereinamosios srovės, ji gali membraną depoliarizuoti apie 20 mV, ar net daugiau (Crill 1996). Taigi dėl tokių I_{NaP} savybių, ji gali veikti kaip žadinančių postsinapsinių potencialų stiprintuvas (Kiss 2008; Magistretti and Alonso 1999a; Stafstrom 2007).

Taip pat manoma, kad I_{NaP} gali dalyvauti VP iniciacijoje (Magistretti et al. 2006), apspręsti VP sekų formavimą (Magistretti and Alonso 1999a; Stafstrom 2007), pagreitinti VP generavimą (Kiss 2008).

Ši srovė gali sukelti (Kiss 2008; Taylor 1993) arba sustiprinti (Stafstrom 2007) ikislenkstines oscilacijas; inicijuoti bistabilumą (Magistretti and Alonso 1999a); prisidėti prie plato potencialų nervų sistemos ląstelėse (Taylor 1993), griaučių ir širdies raumenyse (Kiss 2008).

Srovės funkcija ir jos paplitimas glaudžiai susiję: distaliniuose dendrituose I_{NaP} sustiprina sinapsinius įėjimus, padėdamas jiems pasiekti ląstelės kūną; I_{NaP} aksone sukelia VP iniciaciją; aksono kalvelėje- VP generavimo ritmiškumą (Stafstrom 2007).

Buvo manyta, kad I_{NaP} inaktyvacija gali dalyvauti ankstyvojoje ir vėlyvojoje adaptacijos fazėse (2.3. skyrius). Tačiau nėra tvirtų eksperimentinių įrodymų, kad I_{NaP} inaktyvacija yra vienas iš adaptacijos mechanizmų.

Manoma, kad pastovios srovės kanalai dalyvauja skausmo jutime, bei perdavime (Kiss 2008).

I_{NaP} glijos ląstelėse reikalinga K^+/Na^+ ATP-azės veiklai, bei jonų koncentracijos gradientui sukurti (kalio jonų koncentracijai glijos viduje palaikyti) (Taylor 1993).

4.4.1 I_{NaP} įtaka perdavimo funkcijai (f-I santykiui).

Pagrindinis mechanizmas veikiantis f-I priklausomybę yra pėdsekinės hiperpoliarizacijos, sekančios po kiekvieno VP. AHP laidumai valdo VP dažnį,

reguliarumą, apsprendžia refrakterinį periodą ir neigiamu grįžtamu ryšiu reguliuoja VP dažnį (Vervaeke et al. 2006).

Nustatyta, kad I_{NaP} ženkliai padidina AHP, o padidėjimas priklauso nuo įtampos: prie teigiamesnių įtampos verčių padidėjimas didesnis, nei prie neigiamesnių įtampos verčių (Vervaeke et al. 2006). Kadangi I_{NaP} padidina AHP, tai greičiausiai I_{NaP} padidins ir AHP neigiamą grįžtamą ryšį f-I priklausomybei.

Spėjimai pasitvirtino. Blokavus I_{NaP} dinaminės fiksacijos būdu f-I priklausomybė padidėjo 44% (VP dažnis skaičiuojamas tarp pirmųjų keturių VP). Blokavus I_{NaP} reobazė visada padidėja (Vervaeke et al. 2006).

Be to, blokavus I_{NaP} sumažėja AHP, kas atsiliepia VP regularumui- VP generuojami nereguliariai (Vervaeke et al. 2006).

Yra ir priešingų tyrimo rezultatų. Sekančiame skyriuje aptarsime, kaip I_{NaP} blokavimas riluzoliu sukelia f-I priklausomybės statumo sumažėjimą.

4.5 I_{NaP} ir patologijos.

I_{NaP} yra įeinanti srovė, kuri padidina neuronų sužadinamumą. Srovės dydžio nukrypimai nuo normos yra siejami su patologijomis. Aptarsime dvi ligas kurios siejamos su padidėjusia I_{NaP} .

Epilepsija

Paveldimos epilepsijos formos yra susijusios su joninių kanalų sutrikimais, kurie pakeičia neuronų sužadinamumą. Tai įtampos arba ligando valdomų kanalų sutrikimai (Stafstrom 2007).

Pirmieji kanalų pokyčiai susieti su epilepsija, buvo įtampos valdomuose kalio jonų kanaluose. Manoma, kad mutacijos įtampos valdomuose natrio kanaluose taip pat gali sukelti epilepsijos sindromus. Ne išimtis ir kanalai generuojantys pastovią natrio jonų srovę- I_{NaP} (Stafstrom 2007).

Mutacijos gali sulėtinti, sumažinti kanalo inaktyvaciją; pagreitinti aktyvaciją; sukelti pokyčius S4 įtampos sensoriuje; pakeisti inaktyvacijos (teigiamai), bei aktyvacijos (neigiamai) priklausomybes nuo įtampos; pagreitinti atsistatymą po inaktyvacijos;

padidinti vėlyvųjų atsivėrimo modų tikimybę. Šiais būdais sukeliama didesnė I_{NaP} , bei padidėja VP generavimas, kas gali iššaukti epilepsinius priepuolius (Stafstrom 2007).

Priešepilepsiniai vaistai (AED): *phenytoin*, *valproic rūgštis*, *topiramate*, *losigamone*, *lamotrigine*, riluzolis ir kiti mažina I_{NaP} . Tai puikus įrodymas kad epilepsiją sukelia padidėjusi pastovi natrio jonų srovė (Stafstrom 2007).

ALS.

Šoninė amiotrofinė sklerozė (ALS) yra nervų degeneracinė liga, kurios pasėkoje žūsta žievės smegenų, smegenų kamieno, bei nugaros smegenų motoriniai neuronai (Pieri et al. 2009). 90% ši ligą yra atsitiktinė, o 10% paveldima (Pieri et al. 2009). Apie 20% visų paveldimų ALS siejama su fermento Cu, Zn superoksiddismutazės fermento (SOD1), kuris atsakingas už detoksikaciją, mutacijomis (Kuo et al. 2004;Kuo et al. 2005;Pieri et al. 2009).

Ankstyvas ALS požymis- tai kortikomotorinio slenksčio sumažėjimas. Tai gali atsirasti dėl nenormalaus žievės ar nugaros smegenų neuronų sužadynamumo. Padidėjęs neuronų sužadynamumas buvo parodytas neurovaizdinimu, neurofiziologiniais eksperimentais, transkranijine magnetine stimuliacija (TMS) (Pieri et al. 2009).

Išvesta transgeninių pelių linija (G93A), kuri ekspresuoja mutantinį SOD1 geną, bei pasižymi simptomais panašiais į žmonių ALS (Kuo et al. 2004;Kuo et al. 2005;Pieri et al. 2009).

Nustatyta, kad pasyvios membranos savybės (laiko pastovioji, laidumas) nesiskiria tarp žievės neuronų laukinio tipo ir G93A pelių, tačiau mutantinių pelių neuronuose nustatytas padidėjęs sužadynamumas (Pieri et al. 2009). Kadangi AHP reguliuoja VP dažnį, buvo manyta, kad padidėjęs sužadynamumas yra nulemtas sumažėjusios AHP amplitudės ar greitesnio AHP gesimo. Tačiau kontrolės ir G93A motoneuronų AHP amplitudės vienodos (Kuo et al. 2004).

Parodyta, kad žievės neuronų padidėjęs sužadynamumas sukiamas padidėjusio I_{NaP} tankio, tai pasireiškia padidėjusiu VP dažniu į srovės impulsą (Pieri et al. 2009). I_{NaP} aktyvacijos slenkstis ir potencialas prie kurio srovė pasiekia maksimumą nesiskiria tarp neuronų kultūrų, tačiau srovės amplitudė didesnė G93A neuronų, nei kontrolės (Pieri et al. 2009).

Nustatyta, kad riluzolis sulėtina ALS eigą žmonėm ir pelėm su SOD1 mutacijomis, jis prailgina ALS pacientų gyvenimo laiką (Kuo et al. 2005). Riluzolis blokuodamas I_{NaP} G93A neuronus padaro panašius į kontrolinius- jų sužadynamumas (VP dažnis) susilygina (Pieri et al. 2009).

Be to pastebėta, kad dideli motoneuronai ir jų nervo- raumens jungtys turi polinkį žūti pirmiau už mažus motoneuronus G93A SOD1 pelėse, o jų f-I statusas didesnis nei kontrolės. Tai rodo, kad I_{NaP} f-I statumą padidina (Kuo et al. 2005). Riluzolis blokuoja (sumažina) I_{NaP} , bei sumažina f-I statumą G93A motoneuronuose iki statumo nustatyto kontroliniuose motoneuronuose (Kuo et al. 2005).

Dėl padidėjusio VP dažnio daugiau kalcio įeina į ląstelę, per įtampos valdomus kalcio jonų kanalus (Pieri et al. 2009). Beto nustatyta, kad ALS pažeidžiami motoneuronai blogiau suriša kalcio jonus, nei ALS atsparūs motoneuronai, todėl padidėjęs sužadynamumas ir padidėjęs įėjusio kalcio kiekis ląstelėje gali sąlygoti selektyvų motoneuronų žuvimą (Kuo et al. 2004).

Žievės padidėjęs sužadynamumas nustatytas ne tik paveldimos ALS, bet ir atsitiktinės ALS atveju. Tai parodo galimus tuos pačius patofiziologinius procesus (Pieri et al. 2009).

5. Neuronų savybės neuroninio tinklo veikimo metu.

Yra nustatyta, kad veikiant neuroniniam tinklui, ženkliai keičiasi pačio neuroono savybės (Alaburda and Hounsgaard 2003; Alaburda et al. 2005). Stimuliuojant vėžlio šarvą iššaukiamas kasymosi refleksas (Alaburda and Hounsgaard 2003). Neuroninio tinklo veikimo (kasymosi) metu, glutamatui veikiant mGluR1 receptorius, padidėja L-tipo kalcio jonų srovė motoneuronuose (Alaburda and Hounsgaard 2003). Dėl padidėjusios L-tipo kalcio srovės neuroninio tinklo veikimo metu, ir netgi po jo (apie 10s), motoneuronams padidėja sužadimumas (Alaburda and Hounsgaard 2003).

Be to kasymosi metu ženkliai padidėja neuronų laidumas (Alaburda et al. 2005). Laidumo kitimas yra ritmiškas, jo padidėjimas sutampa su šlaunies fleksoriaus aktyvumu, ir tai siejama su padidėjusiu sinapsiniu įėjimu (Alaburda et al. 2005).

Padidėjusio laidumo sąlygomis VP generavimas apsprendžiamas ne neuronų savybių (AHP, plato), bet membranos potencialo kitimo, kurį sukelia sinapsiniai įėjimai (Alaburda et al. 2005).

Dėl šių rezultatų prasmingiau yra neuronų savybes tirti integruotuose preparatuose (ląstelės tiriamos veikiant neuroniniam tinklui). Kitas būdas priartėti prie neuroninio tinklo veikimo sąlygų- sumažinti ląstelės varžą. Tai galima padaryti farmakologiškai: į ekstraląstelinę terpę pridėjus muscimol'io- selektyvaus GABA_A receptorių agonisto (Alaburda et al. 2005).

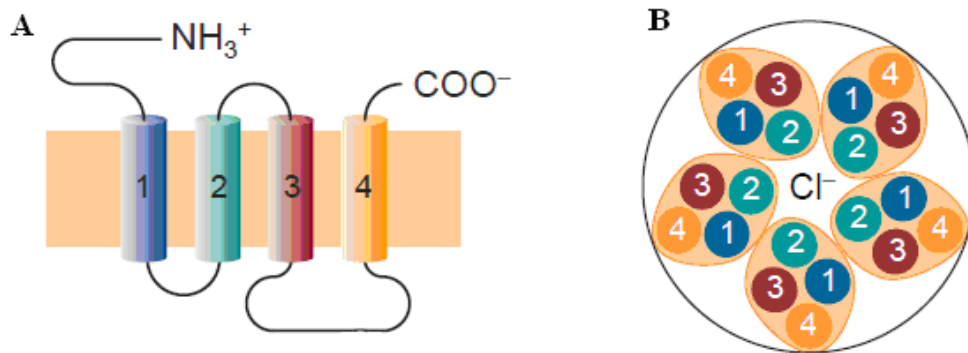
5.1. GABA receptoriai.

Yra žinomi trys γ -amino sviesto rūgšties (GABA) receptoriai: GABA_A, GABA_B ir GABA_C (Chebib and Johnston 1999). GABA_A ir GABA_C receptoriai priklauso transiterių valdomų joninių kanalų superšeimai- tai jonotropiniai receptoriai, o GABA_B metabotropinis (Chebib and Johnston 1999).

Jonotropiniai GABA receptoriai.

Kaip jonotropinis GABA receptorius tradiciškai pateikiamas GABA_A (B.Hille 2001), tačiau stuburinių tinklainėje aptiktas kitas GABA jonotropinis receptorius- GABA_C (Bormann 2000).

GABA_A receptorius- tai Cl⁻ jonų kanalas, kuris susideda iš 4 transmembraninių domenu, 5 subvienetų (Pav.1.13.) (B.Hille 2001;Bormann 2000). GABA_A receptoriaus subvienetai: α(1-6), β(1-4), γ(1-4), δ ir ε (Chebib and Johnston 1999). Subvienetams jungiantis įvairiomis kombinacijomis, suformuojama didelė receptorių įvairovė (Nakayasu et al. 1995).



Pav.1.13. GABA_A receptoriaus struktūra. A- subvieneto išsidėstymas membranoje; B- receptoriaus ketvirtinė struktūra (Bormann 2000).

Antrasis transmembraninis domenas (TMII) dalyvauja kanalo poros formavime, bei apsprendžia praleidžiamų jonų selektyvumą (Nakayasu et al. 1995).

GABA_A receptoriaus aktyvavimas sukelia greitą slopinantį posinapsinį potencialą (IPSP) (Chebib and Johnston 1999;Nakayasu et al. 1995). Šis receptorius gali būti moduluojamas benzodiazepiniais, barbitūratais, neurosteroidais, bei alkoholiu (Bormann 2000), taip padidinama slopinančių postsinapsinių potencialų (IPSP) amplitudė, bei jų trukmė (B.Hille 2001).

Neuronus stimuliuojant GABA_A agonistais, mažėja pačių receptorių ekspresija, o stimuliuojant inversiniais agonistais- receptorių ekspresija didėja (Nakayasu et al. 1995).

Kaip minėjome GABA_C receptorius aptiktas stuburinių tinklainėje (Bormann 2000). Tai taip pat Cl⁻ kanalas, kuris dalyvauja greitoje inhibicijoje (Chebib and Johnston 1999), jis sudarytas iš ρ (1-3) subvienetų (Bormann 2000).

GABA_A ir GABA_C receptoriai skiriasi (2 lentelė).

2. Lentelė. GABA_A ir GABA_C palyginimas (Bormann 2000).

Savybės	GABA _A	GABA _C
Jautrumas agonistui GABA	Mažas	Apie 10 kartų didesnis
Aktyvacija/inaktyvacija	Greita	Lėta
Laidumas	27-30 pS	7 pS
Laikas atidarytoje būsenoje	25-30 ms	150-200 ms
Selektyvumas	Cl ⁻ jonai	Cl ⁻ jonai
Poros dydis	5.6 Å	5.1 Å
Receptoriaus sudėtis	Heterooligomeras	Homooligomeras
Paplitimas	Visoje CNS	Tinklainėje

Metabotropiniai GABA receptoriai.

Metabotropinis GABA receptorių- GABA_B (B.Hille 2001). GABA_B- tai su G baltymu susijęs receptorių, kurio aktyvavimas sukelia lėtą IPSP (Nakayasu et al. 1995). GABA_B, veikdamas per G baltymą, gali slopinti cAMP ir IP3 formavimą, blokuoti Ca²⁺ kanalus, aktyvuoti K⁺ kanalus (Bormann 2000; Nakayasu et al. 1995), kas sukelia slopinantį poveikį membranai.

5.1.1. Neuronų atsakai aktyvavus GABA receptorių.

GABA receptorių aktyvavimas gali sukelti slopinimą tiek priešsinapsinėje, tiek posinapsinėje membranoje (Gutovitz et al. 2001). GABA_B receptorių aktyvavimas dažniausiai sukelia Ca²⁺ srovės sumažėjimą ir/arba K⁺ srovės padidėjimą (slopinimo efektas), tačiau omaro nervo-raumens sinapsėje aktyvavus GABA_B receptorių presinapsinėje membranoje, į sinapsę išleidžiamas didesnis neurotransmiterio kiekis (žadavimo efektas) (Gutovitz et al. 2001). GABA_B receptorių aktyvavimas sukelia lėtus neuronų atsakus, nes tai metabotropiniai receptoriai (Gutovitz et al. 2001).

GABA_A receptorių aktyvavimas sukelia greitus slopinančius efektus tiek priešsinapsinėje, tiek posinapsinėje membranoje (Gutovitz et al. 2001; Peng and Frank 1989). GABA_A receptorių aktyvavimą galima sukelti muscimoliu- alkaloidu išskirtu iš *Amanita* genties musmirių (Alaburda et al. 2005; Gutovitz et al. 2001; Halpern 2004; Peng and Frank 1989). Naudojant muscimolį stebimas ląstelės varžos sumažėjimas (laidumo padidėjimas) (Alaburda et al. 2005; Gutovitz et al. 2001; Peng and Frank 1989), nes atidaromi Cl⁻ kanalai.

Panaudojus muscimolį sukiamas neuronų varžos sumažėjimas, artimas varžos sumažėjimui kurį sukelia neuroninio tinklo aktyvavimas (Alaburda et al. 2005).

Eksperimento metodika.

1. Preparato paruošimas.

Eksperimentai buvo atliekami su raudonausiais vėžliais (*Chrysemys scripta elegans*). Buvo naudojami vėžlio nugaros smegenų D8-S2 segmentai. Šių segmentų pilkosios medžiagos pilviniuose raguose išsidėstę motoneuronai, inervuojantys užpakalines galūnes. Šie motoneuronai ir buvo mūsų tyrimo objektas.

Vėžlys padedamas ant ledo 2- 3 valandoms, inicijuoti hipoterminei anestezijai. Po užšaldymo vėžlys dekapituojamas. Atidarius kiautą ir į širdį įvedus vamzdelį, vėžlio kraujas perfuzijos būdu buvo pakeistas ringerio tirpalu (koncentracija mM: 120 NaCl, 5 KCl, 15 NaHCO₃, 20 gliukozės, 2 MgCl, 3 CaCl₂), kuris buvo prisotintas dujomis (98% O₂ ir 2% CO₂), kad pasiekti tirpalo pH = 7.6. Tai atliekama todėl, nes kraujas krešėdamas gali pažeisti nervines ląsteles. Po to išpjauinama kiauto dalis (D8-S2 segmentai) su nugaros smegenimis, kurios vėliau išimamos praardžius kiautą ir nukirpus nervines šakeles einančias iš nugaros smegenų.

Nugaros smegenys supjaustomos į 1,5 mm storio riekeles. Riekelės patalpinamos į kolbą su ringerio tirpalu prisotintu dujomis ir įdedamos į šaldytuvą. Šaldytuve nugaros smegenys išlieka gyvybingos apie 4-6 dienas, tai priklauso nuo to kaip kokybiškai jos buvo išpreparuotos ir supjaustytos.

Norint atlikti matavimus, nugaros smegenų riekelė prikljuojama prie filtrinio popieriaus. Tai atliekama tam, kad uždėjus svarelius ant filtrinio popieriaus galų nugaros smegenų riekelė būtų panardinta po tirpalu. Taip preparatas tyrimo vonelėje išlieka nejudantis ir visiškai apsuptas tirpalo.

Preparatas visą eksperimento laiką yra perfuzuojamas ringerio tirpalu prisotintu 98% O₂/2% CO₂ (apie 1-2 ml/min).

Eksperimentai buvo atliekami kambario temperatūroje (apie 20° C).

2. Registravimo metodika.

Neuronų registracijai naudojami stikliniai elektrodai, pagaminti naudojant elektrodų ištraukėją (pulerį) (PUL100, WPI). Stiklinės pipetės buvo užpildomos 0.1 M KCl ir 0.9 M acetato. Pagamintų elektrodų varža buvo apie 30-50 M Ω . Nustatyta, kad tokios varžos elektrodų galiuko diametras apie 1 μ m. Naudojant šiuos elektrodus, registruojama ląstelė išlikdavo stabili iki kelių valandų (2-4 val.).

Elektrodas į preparatą buvo įvedamas motorizuoto mikromanipulatoriaus (DC3001R, WPI) pagalba, kuris gali judėti trimis kryptimis, o jo vieno poslinkio dydis reguliuojamas.

Mūsų eksperimentų metu viduląsteliniam įrašams atlikti buvo naudotas srovės fiksacijos režimas, kuris atliekamas Axoclamp 2B stiprintuvu (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA).

Nugaros smegenyse, be motoneuronų aptinkami ir interneuronai. Tyrimams atrenkami tik motoneuronai naudojantis šiais kriterijais (McDonagh et al., 1999):

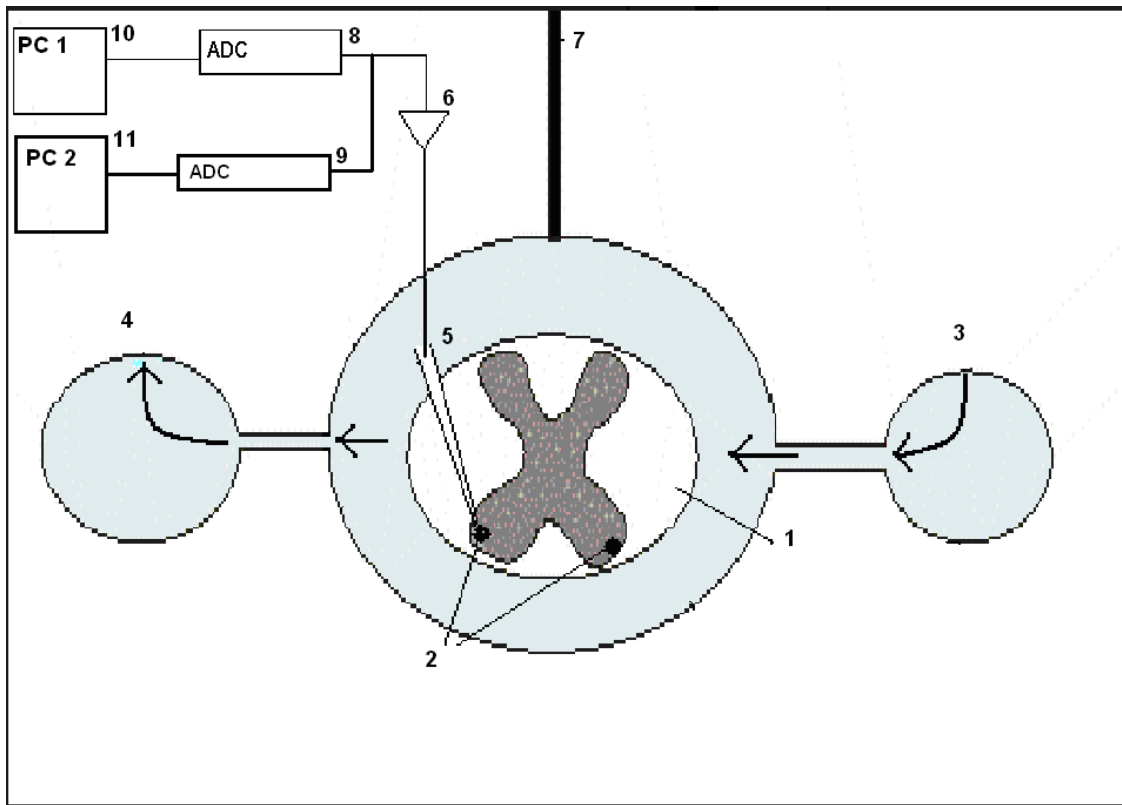
1. Interneuronai savaime generuoja veikimo potencialus, o motoneuronai – ne.
2. Interneuronų veikimo potencialų aukštis dažnai nesiekia 70 mV, tuo tarpu motoneuronų – patenka į intervalą nuo 90 iki 100 mV.

Tirti motoneuronai buvo atrenkami: jie pasirenkami tyrimui tik tada, kai jų ramybės potencialas buvo neigiamesnis už -50mV ir stabilus.

Duomenys buvo diskretizuojami naudojant 12 skilčių analogas- kodas keitiklį (Digidata 1200; Axon Instruments). Naudota Clampex ir Axoscope programinė įranga (Axon Instruments). Poto duomenys buvo įrašinėjami į kompiuterį tolesnei jų analizei. Duomenys analizuojami *Clampfit*, *Excel*, *Origin* programomis.

Daugiausia motoneuronai buvo tiriami nugaros smegenyse 100-300 μ m gylyje nuo paviršiaus. Elektrodas buvo įvedinėjamas 2 μ m žingsniu, pastoviai palaikant mažos teigiamos srovės impulsus. Jei elektrodas buvo įvedamas į ląstelę, tai buvo stebimas lėtas potencialo atsako didėjimas su atitinkama laiko konstanta, ar net veikimo potencialai, jei duodama teigiama srovė viršydavo VP generavimo slenkstį. Įvedus į ląstelę elektrodą, paleidžiama neigiama hiperpolarizuojanti srovė. Taip ląstelė buvo hiperpolarizuojama

keletą minučių, kol membrana užsitaiso aplink elektroda. Po to hiperpolarizuojanti srovė buvo nutraukiama ir laukiama tol, kol ląstelės ramybės potencialas nusistovės.



Pav.2.1. Tyrimo kamera su nugaros smegenų pjūviu.

Tyrimo kamera (Pav.2.1) susideda iš trijų dalių: vienoje guli preparatas (1), į kitą paduodamas skystis (3), o iš trečiosios skystis nusiurbiamas (4). Šias tris dalis jungia siauras kanalas. Trys dalinai atskirtos erdvės reikalingas tam, kad perfuzijos metu staigesni skysčio padavimo ar nusiurbimo svyravimai neįtakotų tyrimo sistemos stabilumo. 2- motoneuronų sanaupos; 5- stiklinis elektrodas; 6- stiprintuvas; 7- referentinis elektrodas; 8, 9- analogas- kodas keitiklis; 10- personalinis kompiuteris (Pentium III) skirtas duomenų saugojimui, vaizdavimui realiaime laike ir srovės impulsų formavimui; 11- personalinis kompiuteris (Pentium IV) į kurį įmontuota speciali duomenų surinkimo plokštė PCI-MIO-16XE-10 (National Instruments, JAV). Jis reikalingas įgyvendinti dinaminei fiksacijai.

Ląstelės varžos sumažinimui į ekstraląstelinį skystį buvo pridedama ($2\mu\text{M}$) *muscimol hydrobromide* (Sigma)- GABA_A receptorių agonisto.

Imčių skirtumai analizuojami poriniu t-testu. Skirtumai laikomi reikšmingais, jei patikimumo lygmuo $p < 0.05$. Matavimų rezultatai pateikiami tokiu formatu: vidurkis \pm standartinis kvadratinis nuokrypis.

3. Dinaminės fiksacijos metodas.

Nustatyti srovės funkciją, dažnai naudojamos farmakologinės medžiagos (aktyvatoriai ir blokatoriai), kurių prisijungimas prie kanalo (kuris generuoja tiriamą srovę) sukelia kanalo aktyvavimą ar blokavimą. Deja mūsų tiriamai pastoviai natrio jonų srovei nėra specifinių aktyvatorių ar blokatorių. Gerai žinomas natrio kanalų blokatorius TTX- blokuoja I_{NaP} , tačiau blokuojama ir I_{NaT} - ląstelė nebegeneruoja VP. Naudojant šį blokatorių srovę galima ištirti tik ikislenkstinėse vertėse. Taip pat kaip I_{NaP} blokatorius naudojamas riluzolis, bet jis taip pat nėra specifinis, nes veikiama I_{NaT} , bei sinapsėse glutamato išskyrimas (Urbani and Belluzzi 2000).

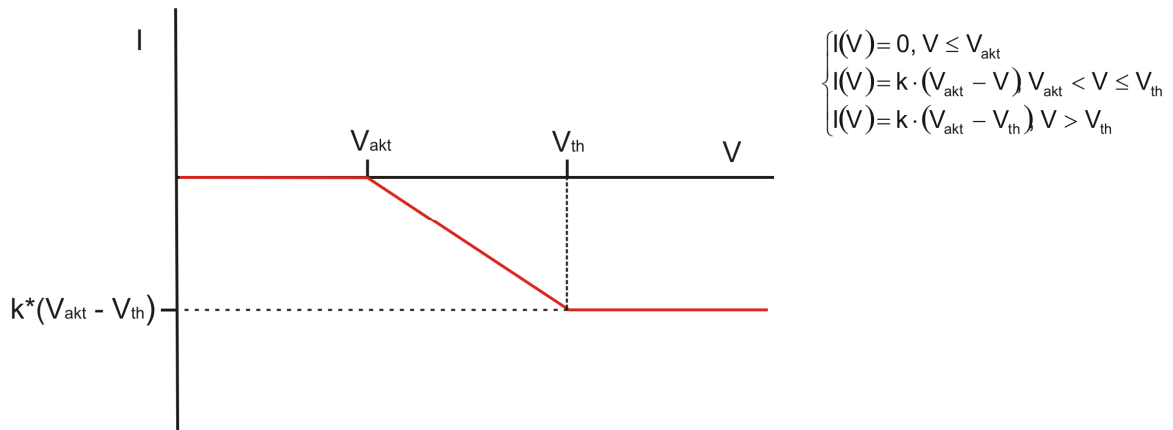
Kitas būdas tirti srovės funkciją- panaudojant dinaminės fiksacijos metodą. Įgyvendinti šį metodą sukuriama srovės modelis, kuris aprašo tiriamos srovės priklausomybes nuo laiko, įtampos, bei kitų faktorių. Pro stimuliavimo elektrodą, tam tikru dažniu, į ląstelę įleidžiama pagal srovės modelį apskaičiuota srovė. Tokiu būdu ląstelėje imituojama tiriamoji srovė. Tai pakeičia farmakologinį aktyvatoriaus naudojimą.

Dinaminės fiksacijos metodu galima ir eliminuoti tiriamą srovę įleidžiant priešingos krypties srovę- tiriamoji ir įleidžiamoji srovės viena kitą kompensuoja. Tai atitinka farmakologinį blokatoriaus naudojimą.

I_{NaP} funkcija vėžlio motoneuronuose buvo tiriama imituojant srovės blokavimą- pro elektrodą įleidžiama priešingos krypties srovė, atitinkanti tiriamajai I_{NaP} . Šios srovės modelis buvo sukurtas ankstesniuose darbuose (Gabrielaitis 2007) (Pav. 2.2.). Dinaminei fiksacijai įgyvendinti panaudota dr. G. Svirskio sukurta programinė įranga.

Mūsų tiriamą srovę priklauso nuo ląstelės potencialo, o jis laike kinta. Todėl kiekvienu laiko momentu yra matuojamas ląstelės potencialas, jis sustiprinamas ir per analogas-kodas keitklį siunčiamas į kompiuterį (Pav. 2.1 9-11). Kompiuteryje atliekami

matematiniai veiksmai suskaičiuoti srovės vertę prie atitinkamos įtampos, o suskaičiuota priešingos krypties srovė per analogas-kodas keitikli siunčiama į ląstelę. Ir procesas kartojamas iš naujo.



Pav.2.2. I_{NaP} modelis (Gabrielaitis 2007).

V_{akt} yra šios srovės aktyvavimosi įtampa. Eksperimentiškai nustatyta, kad srovė aktyvuojasi prie 10 mV neigiamesnių įtampos verčių, nei VP slenkstis. V_{th} ląstelės VP generavimo slenkstis. Taigi parametrai V_{akt} ir V_{th} kiekvienai ląstelei nustatomi individualiai. k - tai efektyvusis Na^+ kanalų sąlygojančių I_{NaP} laidumo įvertis. Jis buvo suskaičiuotas iš ankstesnių matavimų, jo vertė $k=0.05 \mu S$.

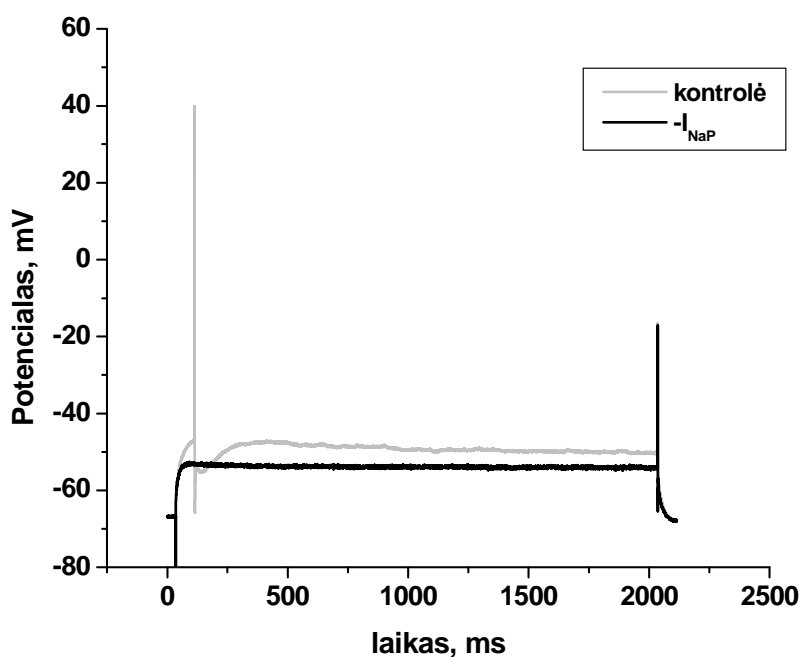
Ši srovė buvo ištirta tik ikislenkstinėje srityje. Pasiekus slenktį aktyvuojasi natrio, kalio, kalcio jonų laidumai ir ląstelės varža labai sumažėja. Kadangi I_{NaP} , palyginus su pereinama natrio jonų srove, yra labai maža, tai viršslenkstinėje dalyje I_{NaP} ląstelės atsaką įtakos mažai, todėl prie įtampos verčių, teigiamesnių nei VP generavimo slenkstis, buvo tariama, kad srovė įsisotina ir nebekinta.

Rezultatai.

1. I_{NaP} įtaka ląstelės savybėms.

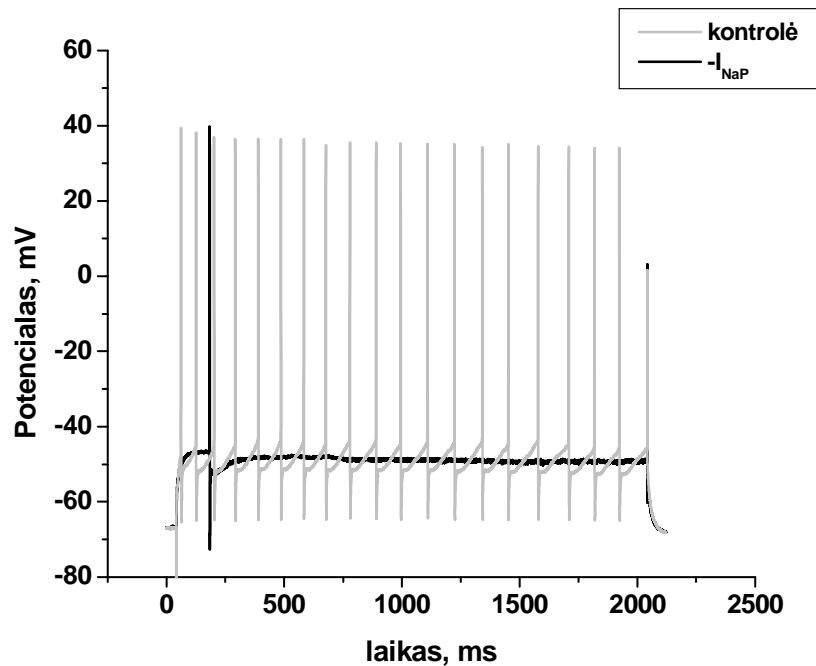
Reobazė.

VP generavimo slenkstinė srovė (reobazė), tai srovės dydis reikalingas įleisti į ląstelę, kad ji sugeneruotų VP. Nustatyti reobazę ląstelė buvo dirginama 2 sekundžių trukmės didėjančiais srovės impulsais. Po to atliekami matavimai su ta pačia ląstele eliminavus I_{NaP} . Kadangi I_{NaP} yra žadinanti srovė, tai jos blokavimas turėtų padidinti reobazę (reikia daugiau depoliarizuojančios srovės, kad sugeneruoti VP).



Pav.3.1 Ląstelės atsakai į 1.2 nA srovės impulsą.

Iš 3.1 paveikslo matome, kad į vienodo stiprumo srovės impulsą ląstelė atsako skirtingai: pilka kreivė- tai kontrolinis atsakas (generuojamas VP), o juoda- atsakas eliminavus I_{NaP} (VP negeneruojamas).



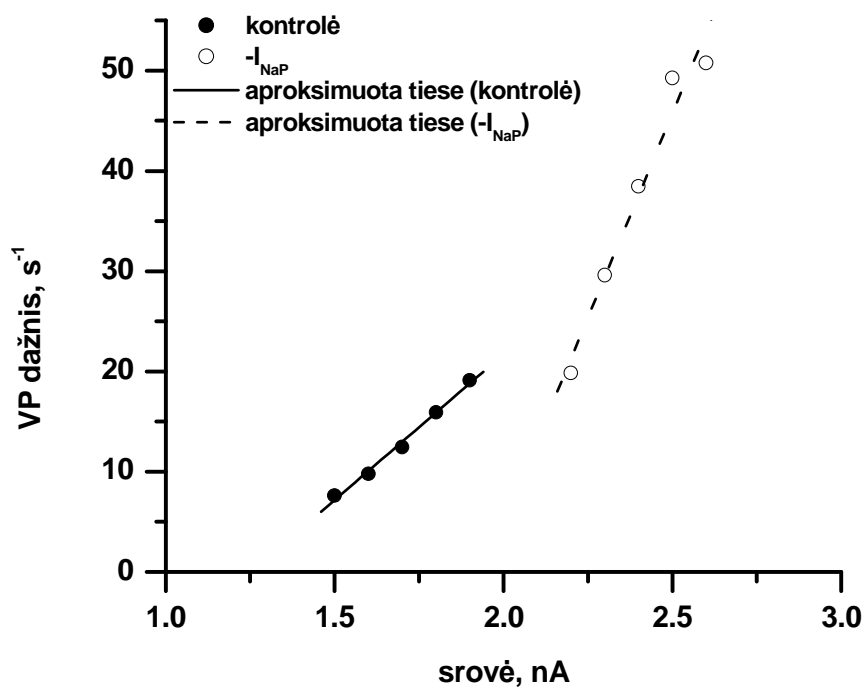
Pav. 3.2 Ląstelės atsakai į 1.7 nA srovę.

Padidinus įleidžiamą srovę VP pradeda generuoti ir eliminavus I_{NaP} (Pav. 3.2). Reobazės poslinkis buvo $0.48 \pm 0.01 \text{ nA}$ ($n=12$). $p < 0.05$.

Perdavimo funkcija (f-I).

Šiame etape taip pat tiriama ląstelių atsakai į 2 sekundžių skirtingo dydžio srovės impulsus kontrolėje ir eliminavus I_{NaP} dinaminės fiksacijos būdu. Perdavimo funkcija- tai VP dažnio priklausomybė nuo įleidžiamos srovės.

Ankstesniuose tyrimuose nustatyta, kad dėl VP dažnio adaptacijos perdavimo funkcija laike kinta, todėl VP dažnį skaičiavome skirtingais laiko tarpais: 1) dažnis tarp dviejų pirmųjų VP; 2) dažnių vidurkis tarp pirmųjų keturių VP; 3) paskutinės pusės sekundės VP dažnių vidurkis.



Pav. 3.3 Motoneurono perdavimo funkcija (dažnis tarp pirmųjų 2 VP) kontrolėje ir eliminavus I_{NaP} .

Motoneurono perdavimo funkcijos kontrolėje ir eliminavus I_{NaP} skiriasi (Pav. 3.3.). Dažnis skaičiuotas tarp pirmųjų dviejų VP. Perdavimo funkciją charakterizuoja tiesinės regresijos statusas. Po I_{NaP} eliminavimo perdavimo funkcijos statusas patikimai padidėjo $53 \pm 41\%$ ($n=12$). Atitinkamai I_{NaP} perdavimo funkcijos statumą sumažina $31 \pm 15\%$. ($p < 0.05$)

Kai dažnis skaičiuojamas kaip vidurkis dažnių tarp pirmųjų keturių VP, tai po I_{NaP} eliminavimo perdavimo funkcijos statusas patikimai padidėjo $40 \pm 33\%$ ($n=12$). Atitinkamai I_{NaP} perdavimo funkcijos statumą sumažina $25 \pm 16\%$ ($p < 0.05$). Varveake (Varveake et al., 2006) gavo panašius rezultatus- f-I statusas tarp pirmųjų keturių VP pašalinus I_{NaP} padidėjo 44%.

Kai dažnis skaičiuojamas kaip paskutinės pusės sekundės dažnių vidurkis, tai po I_{NaP} eliminavimo perdavimo funkcijos statusas patikimai padidėjo $32 \pm 18\%$ ($n=7$). Atitinkamai I_{NaP} perdavimo funkcijos statumą sumažina $23 \pm 10\%$. ($p < 0.05$)

Perdavimo funkcijos statusas charakterizuoja ląstelės atsako jautrumą į srovės impulsą. Kuo statusas didesnis, tuo ląstelė reaguoja jautriau. Iš gautų rezultatų galime manyti, kad I_{NaP} statusą sumažina ir tokiu būdu ląstelė gali tiksliau atsakyti į dirgiklį.

2. Varžos sumažinimo įtaka ląstelės savybėms.

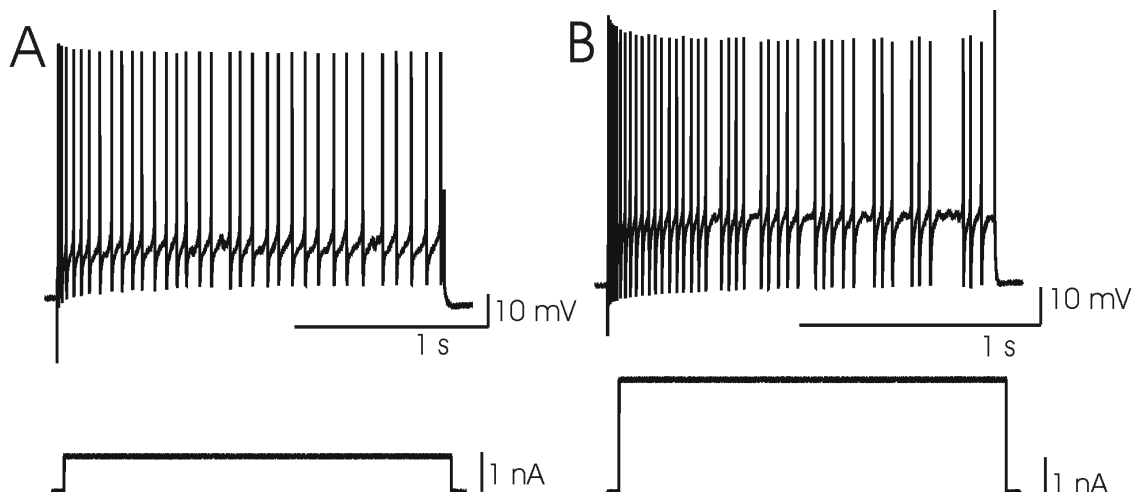
Muscimolio ($2\mu\text{M}$) pridėjimas į ekstraląstelinę terpę sukėlė ląstelės varžos sumažėjimą $22\pm 16\%$ ($n=8$). Nors ląstelės varža sumažėjo visose ląstelėse (nuo 5% iki 56%), tačiau sumažėjimas nėra patikimas ($p>0.05$). Taip yra todėl, kad ląstelės varžos ženkliai skiriasi nuo 5 iki $27\text{ M}\Omega$.

Reobazė.

Reobazė buvo nustatinėjama analogiškai kaip ir eksperimentuose su I_{NaP} . Po ląstelės varžos sumažinimo, reobazė padidėjo $0,8\pm 0,57\text{ nA}$ ($p<0,05$; $n=8$).

f-I.

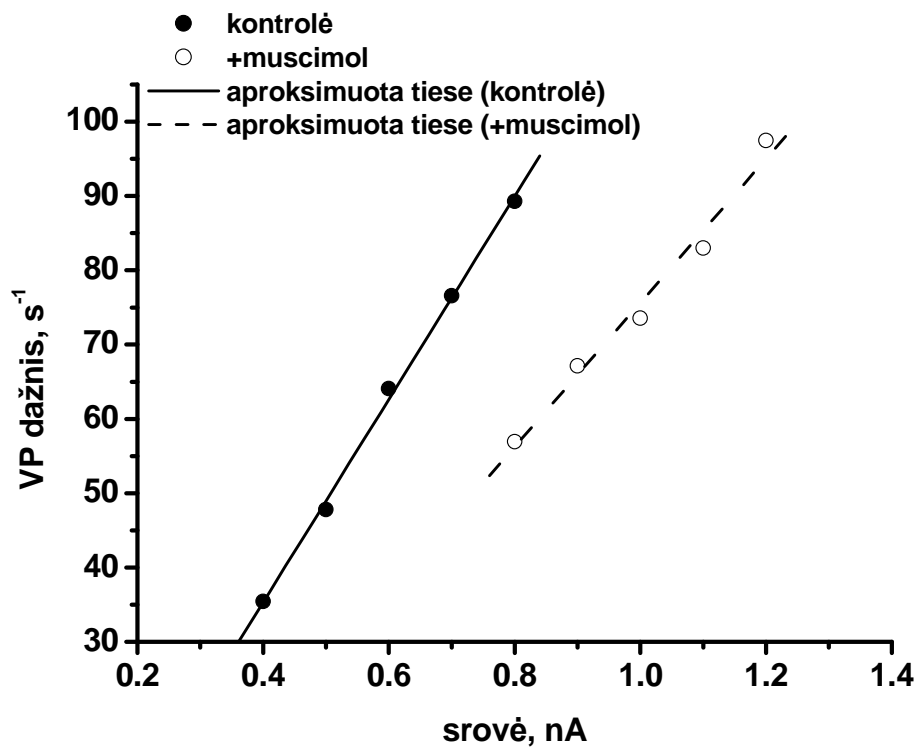
Pastebėta, kad pridėjus muscimolio dalis motoneuronų ($n=3$) VP stimulo pabaigoje pradeda generuoti netolygiai (Pav.3.4.). Todėl nustatinėjant motoneurono perdavimo funkciją, dažnis pasirenkamas tik stimuliavimo pradžioje (tarp pirmų 2 VP ir tarp pirmų 4 VP).



Pav.3.4. Motoneurono atsakas į srovės impulsą. A- kontrolė; B- pridėjus muscimolio.

3.5. paveiksle pavaizduotos motoneurono perdavimo funkcijos (kontrolėje ir pridėjus muscimolio), kai VP dažnis tarp pirmųjų 4 VP. Perdavimo funkciją charakterizuoja tiesinės regresijos statumo koeficientas.

Paveikus motoneuroną muscimoliu perdavimo funkcijos statusas sumažėja $34,1 \pm 24,5\%$ ($n=8$; $p<0.05$), kai dažnis skaičiuojamas tarp pirmųjų 2 VP, ir $18,6 \pm 10,7\%$ ($n=8$; $p<0.05$), kai dažnis skaičiuojamas tarp pirmųjų 4 VP.



Pav.3.5. f-I kontrolėje ir paveikus muscimoliu (dažnis tarp pirmųjų 4 VP).

f-I statumo mažėjimas aptiktas ir neuroninio tinklo veikimo metu (Berg and Hounsgaard 2007). Tai parodo, kad varžos sumažinimas muscimoliu leidžia priartėti prie sąlygų, artimų neuroninio tinklo veikimo metu.

Tyrimai parodė, kad priešingos srovės (įtekanti I_{NaP} ir ištekanti Cl^- jonų srovė) sukelia skirtingus reobazės poslinkius. Kadangi srovės yra priešingos, tai rezultatas nestebina.

Įdomiau yra tai, kad priešingos srovės sukelia vienodą perdavimo funkcijos kitimą (f-I statusas mažėja).

Išvados.

- Dėl pastovios natrio jonų srovės, motoneuronas veikimo potencialą sugeneruoja stimuliuojant mažesnės amplitudės srove.
- Pastovi natrio jonų srovė sumažina perdavimo funkcijos (f-I) statumą.
- Dėl ląstelės įėjimo varžos sumažinimo, motoneuronas veikimo potencialą sugeneruoja stimuliuojant didesnės amplitudės srove.
- Ląstelės įėjimo varžos sumažinimas sumažina perdavimo funkcijos (f-I) statumą.

Vilniaus Universitetas
Gamtos mokslų fakultetas
Biochemijos ir biofizikos katedra
Robertas Guzulaitis

Magistrinis darbas

Motoneuronų perdavimo funkciją įtakojančios veiksniai

Santrauka

Motoneuronas sinapsines sroves transformuoja į veikimo potencialų (VP) seką. Šią transformaciją apibūdina motoneurono perdavimo funkcija, kurią galima tirti eksperimentiškai, kaip VP dažnio priklausomybę nuo įleidžiamos srovės dydžio (f - I santykis).

Veikimo potencialo ir jo sekų generavimą stipriai įtakoja srovės, kurias generuoja įtampos valdomi jonų kanalai. Viena tokių srovių yra pastovi natrio jonų srovė (I_{NaP}).

Tyrimai atlikti su vėžlių (*Chrysemys scripta elegans*) nugaros smegenų motoneuronais. Nustatyta, kad I_{NaP} motoneuronuose sukelia reobazės poslinkį į mažesnių srovių pusę. Taip pat I_{NaP} sumažina perdavimo funkcijos (f - I) statumą.

Nustatyta, kad kasymosi reflekso metu (veikiant neuroniniam tinklui) motoneuronų laidumas ženkliai padidėja. Motoneurono laidumo padidėjimą galima sukelti į ekstraląstelinę terpę pridėjus muscimolio- $GABA_A$ receptorių agonisto.

Nustatėme, kad ląstelės laidumo padidėjimas reobazę paslenka į didesnių srovių pusę. Motoneurono laidumo padidėjimas taip pat sukelia perdavimo funkcijos (f - I) statumo sumažėjimą.

Vilnius University
Faculty for Natural Sciences
Department of Biochemistry and Biophysics
Robertas Guzulaitis

Master thesis

Factors affecting f-I relation in motoneurons

Summary

Motoneurons transform synaptic inputs into sequences of action potentials (AP). This transformation can be investigated as dependence of spike frequency on injected current (f-I relation).

Generation of AP and firing-pattern are strongly influenced by a number of voltage dependant ion conductance. The role of persistent sodium current (I_{NaP}) on f-I relation was investigated. The investigation was performed on motoneurons from adult turtle (*Chrysemys scripta elegans*) spinal cord.

We found that I_{NaP} decreased the rebase and decreased the steepness of f-I relation.

It was found, that during scratching (when neurons network are active) the conductance of motoneurons was strongly increased. We investigated how high conductance affects rebase and f-I relation. The conductance of motoneurons was increased by bath applied muscimol– an agonist of GABA_A receptors.

We found that increased motoneuron conductance increased rebase and decreased the steepness of f-I relation.

Literatūros sąrašas.

1. Aiken SP, Lampe BJ, Murphy PA, Brown BS (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
2. Alaburda A, Hounsgaard J (2003) Metabotropic modulation of motoneurons by scratch-like spinal network activity. *J Neurosci* 23:8625-8629
3. Alaburda A, Perrier JF, Hounsgaard J (2002) An M-like outward current regulates the excitability of spinal motoneurons in the adult turtle. *J Physiol* 540:875-881
4. 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
5. Alzheimer C, Schwindt PC, Crill WE (1993) Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J Neurosci* 13:660-673
6. Astman N, Gutnick MJ, Fleidervish IA (1998) Activation of protein kinase C increases neuronal excitability by regulating persistent Na⁺ current in mouse neocortical slices. *J Neurophysiol* 80:1547-1551
7. Astman N, Gutnick MJ, Fleidervish IA (2006) Persistent sodium current in layer 5 neocortical neurons is primarily generated in the proximal axon. *J Neurosci* 26:3465-3473
8. B.Hille (2001) Ion channels of excitable membranes.
9. Berg, R. W and Hounsgaard, J. (2007) Balanced inhibition and excitation: a mechanism for gain modulation in spinal motoneurons? Ref Type: Conference Proceeding
10. Binder MD, Heckman CJ, Powers RK (1996) *Handbook of Physiology*
11. Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19
12. Brown AM, Schwindt PC, Crill WE (1994) Different voltage dependence of transient and persistent Na⁺ currents is compatible with modal-gating hypothesis for sodium channels. *J Neurophysiol* 71:2562-2565

13. Catterall WA (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25
14. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57:397-409
15. Chebib M, Johnston GA (1999) The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:937-940
16. Christof Koch (1999) *Biophysics of computation*.
17. Crill WE (1996) Persistent sodium current in mammalian central neurons. *Annu Rev Physiol* 58:349-362
18. Dubois JM, Bergman C (1975) Late sodium current in the node of Ranvier. *Pflugers Arch* 357:145-148
19. Fleidervish IA, Friedman A, Gutnick MJ (1996) Slow inactivation of Na⁺ current and slow cumulative spike adaptation in mouse and guinea-pig neocortical neurones in slices. *J Physiol* 493 (Pt 1):83-97
20. Gabrielaitis M. (2007) Nuolatinės natrio jonų srovės vėžlio strėnų srities motoneuronuose tyrimas. Bakalaurinis darbas. Vilniaus universitetas, GMF, biochemijos ir biofizikos katedra.
21. Goldin AL (2002) Evolution of voltage-gated Na(+) channels. *J Exp Biol* 205:575-584
22. Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368
23. Gutmaniene N, Svirskiene N, Svirskis G (2003) Firing properties of frog tectal neurons in vitro. *Brain Res* 981:213-216
24. Gutovitz S, Birmingham JT, Luther JA, Simon DJ, Marder E (2001) GABA enhances transmission at an excitatory glutamatergic synapse. *J Neurosci* 21:5935-5943
25. Guzulaitis R. (2007) Motoneurono perdavimo funkcijos kitimo adaptacijos metu tyrimas. Bakalaurinis darbas. Vilniaus universitetas, GMF, biochemijos ir biofizikos katedra.
26. Halpern JH (2004) Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Pharmacol Ther* 102:131-138

27. Hounsgaard J, Kiehn O, Mintz I (1988) Response properties of motoneurons in a slice preparation of the turtle spinal cord. *J Physiol* 398:575-589
28. John M.Power, M.Matthew Oh, Lucien T.Thompson, and John F.Disterhorft. Apamin increase excitability of CA1 hippocampal pyramidal neurons. 2000. 2000.
Ref Type: Internet Communication
29. Kiss T (2008) Persistent Na-channels: origin and function. A review. *Acta Biol Hung* 59 Suppl:1-12
30. Kohn AF, Vieira MF (2002) Optimality in the encoding/decoding relations of motoneurons and muscle units. *Biosystems* 67:113-119
31. Kuo JJ, Schonewille M, Siddique T, Schults AN, Fu R, Bar PR, Anelli R, Heckman CJ, Kroese AB (2004) Hyperexcitability of cultured spinal motoneurons from presymptomatic ALS mice. *J Neurophysiol* 91:571-575
32. Kuo JJ, Siddique T, Fu R, Heckman CJ (2005) Increased persistent Na(+) current and its effect on excitability in motoneurons cultured from mutant SOD1 mice. *J Physiol* 563:843-854
33. Lape R, Nistri A (2000) Current and voltage clamp studies of the spike medium afterhyperpolarization of hypoglossal motoneurons in a rat brain stem slice preparation. *J Neurophysiol* 83:2987-2995
34. Magistretti J, Alonso A (1999a) 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
35. Magistretti J, Alonso A (1999b) Slow voltage-dependent inactivation of a sustained sodium current in stellate cells of rat entorhinal cortex layer II. *Ann N Y Acad Sci* 868:84-87
36. 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
37. Mantegazza M, Yu FH, Powell AJ, Clare JJ, Catterall WA, Scheuer T (2005) Molecular determinants for modulation of persistent sodium current by G-protein betagamma subunits. *J Neurosci* 25:3341-3349
38. McDonagh JC, Gorman RB, Gilliam EE, Hornby TG, Reinking RM, Stuart DG (1999) Electrophysiological and morphological properties of neurons in the ventral horn of the turtle spinal cord. *J Physiol Paris* 93:3-16

39. Miles GB, Dai Y, Brownstone RM (2005) Mechanisms underlying the early phase of spike frequency adaptation in mouse spinal motoneurons. *J Physiol* 566:519-532
40. Nakayasu H, Kimura H, Kuriyama K (1995) Cerebral GABAA and GABAB receptors. Structure and function. *Ann N Y Acad Sci* 757:516-527
41. Nowak LM, Macdonald RL (1983) Ionic mechanism of muscarinic cholinergic depolarization of mouse spinal cord neurons in cell culture. *J Neurophysiol* 49:792-803
42. Ogata N, Ohishi Y (2002) Molecular diversity of structure and function of the voltage-gated Na⁺ channels. *Jpn J Pharmacol* 88:365-377
43. Peng YY, Frank E (1989) Activation of GABAA receptors causes presynaptic and postsynaptic inhibition at synapses between muscle spindle afferents and motoneurons in the spinal cord of bullfrogs. *J Neurosci* 9:1516-1522
44. Pieri M, Carunchio I, Curcio L, Mercuri NB, Zona C (2009) Increased persistent sodium current determines cortical hyperexcitability in a genetic model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 215:368-379
45. Powers RK, Sawczuk A, Musick JR, Binder MD (1999) Multiple mechanisms of spike-frequency adaptation in motoneurons. *J Physiol Paris* 93:101-114
46. Sah P (1996) Ca²⁺-activated K⁺ currents in neurones: types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* 19:150-154
47. Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1995) Intrinsic properties of motoneurons. Implications for muscle fatigue. *Adv Exp Med Biol* 384:123-134
48. Sawczuk A, Powers RK, Binder MD (1997) Contribution of outward currents to spike-frequency adaptation in hypoglossal motoneurons of the rat. *J Neurophysiol* 78:2246-2253
49. Stafstrom CE (2007) Persistent sodium current and its role in epilepsy. *Epilepsy Curr* 7:15-22
50. Svirskis G, Hounsgaard J (1998) Transmitter regulation of plateau properties in turtle motoneurons. *J Neurophysiol* 79:45-50
51. Taylor CP (1993) Na⁺ currents that fail to inactivate. *Trends Neurosci* 16:455-460
52. Urbani A, Belluzzi O (2000) Riluzole inhibits the persistent sodium current in mammalian CNS neurons. *Eur J Neurosci* 12:3567-3574
53. Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998) Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8:321-329

54. Vervaeke K, Hu H, Graham LJ, Storm JF (2006) Contrasting effects of the persistent Na⁺ current on neuronal excitability and spike timing. *Neuron* 49:257-270
55. Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D (1998) KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Science* 282:1890-1893
56. Yen JC, Chan JY, Chan SH (1999) Involvement of apamin-sensitive SK channels in spike frequency adaptation of neurons in nucleus tractus solitarii of the rat. *J Biomed Sci* 6:418-424
57. Yu FH, Catterall WA (2003) Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol* 4:207
58. Zeng J, Powers RK, Newkirk G, Yonkers M, Binder MD (2005) Contribution of persistent sodium currents to spike-frequency adaptation in rat hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 93:1035-1041