

Використання послідовних пилкоподібних стимулів для експрес-діагностики імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа

В.А. Яворський, О.О. Лук'янець

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; E-mail: jva@biph.kiev.ua

Досліджували зміни імпульсної активності нейронів гіпокампа із застосуванням пилкоподібної форми стимуляції. Описано використання серійних реєстрацій електричної активності нейронів для експрес-діагностики генераторної здатності ізольованих клітин. Встановлено, що запропонований протокол дає можливість визначати додаткові характеристики імпульсної активності нейрона – поріг ініціації і пригнічення генерації, форму та амплітуду залежностей між імпульсними інтервалами при різній деполаризації нейрона. Запропоновані нами протоколи стимуляції та відповідний аналіз є інструментами, що можуть ефективно використовуватися для обґрунтування достовірності впливу хімічних сполук або інших експериментальних факторів на імпульсну активність нейронів під час фази «стабільної» активності тривалістю до 30 хв.

Ключові слова: нейрони гіпокампа; перфорований patch-clamp; потенціал дії; гіпокамп; акомодация; міжімпульсний інтервал; ремп.

ВСТУП

Ремп-протокол, в якому тестовий сигнал лінійно зростає та окреслює трикутник (англ. ramp) після перемикання на базовий рівень, є найбільш застосованим базовим варіантом електрофізіологічної стимуляції збудливих клітин після степ-тестування із формою „сходинки”. В умовах фіксації потенціалу, сигнал ремп (“voltage ramp”) може бути використано для миттєвого тесту збудливих клітин на вольт-амперну залежність резистивної та неінергетичної компонент трансмембранного струму [1]. Маніпуляція швидкістю наростання потенціалу (від 0,2 до 1,2 мВ/мс) дала змогу вирахувати дві компоненти струму через натрієвий канал типу $Na_v1.3$ [2]. Було показано, що повільний ремп-сигнал може зменшити нефіксований натрієвий струм і запобігти активації швидких натрієвих каналів [3].

В умовах фіксації струму, ремп-тестування (“current ramp”) є основним інструментом

для визначення збудливості та гіперчутливості нейронів, залежності генерації від зміни трансмембранних струмів. Також ремп-сигнал використовували для визначення внеску в імпульсну генерацію нейронів інергетичної [4] та неінергетичної [5,6] компонент натрієвого струму [7,8], фосфорилування натрієвих каналів [9], низькопорогового кальцієвого струму [10], калієвого струму [11], Н- і TRP-струмів [12], М-струму [13], кальцій- залежного калієвого SK-струму [14]. Різновидом згаданого вище ремп- протоколу є зворотній ремп (reverse ramp) із від’ємним приростом сигналу, який може слугувати для визначення генераційної адаптації або для зменшення ємнісних артефактів реєстрації [15].

В останній час ремп-протокол використовується особливим чином як ефективний метод дослідження для виявлення тонких особливостей та „аномалій” генерації, що не можуть бути отримані степ-протоколом із прямокутним імпульсом струму [15]. Систе-

© В.А. Яворський, О.О. Лук'янець

матичне ремп-тестування слугує для вивчення змін активності в умовах біляпорогового збудження, визначення залежності частотного кодування від попередньої активності, зокрема швидкості акомодатії. Ремп-протокол використовувався також як „екзаменатор” математичної моделі генерації нейрона [16], оскільки якісно інша форма сигналу сприяла уникненню явища „перенавчання” моделі за записами потенціалу із степ-деполяризацією нейронів.

Із ремп-записів потенціалу переважно обліковують комплекс показників реакції нейронів на стимул. Так, ефективність ремп-деполяризації [12] була визначена за трьома показниками: часу початку генерації серії потенціалів дій (ПД), середнього нахилу потенціалу до початку генерації, тривалості серії ПД. Аналіз порогового потенціалу виникнення ПД застосували для визначення змін генерації після ініціації LTP в умовах ремп-протоколу із нахилом 250 пА/с [17]. Із ремп-записів вираховують підпороговий вхідний опір нейронів [14,18], міжімпульсні інтервали між викликаними ПД або миттєву частоту генерації залежно від амплітуди вхідного струму [13]. Важливим показником може бути початкова частота генерації (або відповідно перший міжпіковий інтервал), яка не залежить від нахилу ремп-сигналу [12]. Порівняння збудливості нейронів [11] ґрунтувалося на обрахунку амплітуд та тривалості ПД, кількості ПД у відповідь на ремп із тривалістю 1 с, а також побудові тахограм – послідовностей міжпікових інтервалів залежно від часу генерації.

Ремп-сигнал має застосування в широкому колі досліджень практичного і теоретичного значення. Наприклад, для з’ясування впливу мутацій каналів на пороговий струм і збільшення збудливості ноцицептивних нейронів [19], оцінки дії препаратів на генерацію ПД [3,12], визначення нелінійної трансформації нейроном вхідного сигналу у вихідний, впливу попередньої активності на генерацію.

Від якості та стабільності відведень імпульсної активності залежить надійність висновків досліджень, з огляду на ендогенні зрушення генеративної здатності нейронів у часі. Тому важливим чинником при проведенні ремп-тестування є додаткові методичні умови, які допомагають нормувати та контролювати базовий рівень активності. Це може бути відбір клітин за ознаками стабільності мембранного потенціалу в межах 2 мВ за 10 хв [11] або незмінності кількості викликаних ПД за цей час [20]. Можливий попередній відбір „здорових” нейронів за комплексним критерієм стабільного потенціалу спокою не вище ніж -35 мВ і варіації потенціалу менше як 10%, овершуту ПД і амплітуди натрієвого струму понад 1 нА [19]. Інший спосіб підвищення якості вимірювань – це зменшення тривалості тестування, у тому числі обмеження часу контрольної реєстрації до 3 хв [21] для мінімізації самовільних змін активності нейронів за час експериментального відведення. Введення прекодиційного етапу деполяризації мембрани клітин та застосування фізіологічних концентрацій іонів також має на меті отримання сталої активності нейронів [22].

У попередніх роботах ми дослідили властивості імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа [23] та її часові зміни в умовах степ-деполяризації. Нами були виділені [24] три фази зміни імпульсної активності ізольованих нейронів в процесі експериментальної реєстрації в режимі перфорований patch-clamp: «посилення» активності, «стабільної» активності і «згасання» активності нейрона. Ми показали, що застосування серійних тахограм дає змогу зменшити внесок випадкових подій при аналізі реєстрацій електричної активності нейронів.

У цій роботі пропонується методичний підхід із використанням послідовних ремп-реєстрацій для контролю і порівняння генераторної активності ізольованих нейронів гіпокампа в конфігурації перфорований patch-clamp.

МЕТОДИКА

Методика отримання ізольованих нейронів гіпокампа шурів в цілому відповідає такій, що описана у наших попередніх працях [23, 25, 26]. Тварин (30 шурів 14-добового віку) декапітували після анестезії ефіром; мозок швидко витягували і переносили в холодний (4 °С) розчин А. Зрізи гіпокампа товщиною 0,4–0,5 мм нарізали за допомогою леза і потім витримували 60 хв у розчині Б при кімнатній температурі (21–25 °С), розміщували їх на нейлоновій сіточці в камері; аерацію середовища забезпечували карбогеном. Ферментативна обробка в розчині-Б з 0,1% пронази (тип 23) і 0,1% трипсину («Sigma», США) тривала 20–35 хв без зміни температури середовища. Диспергування зрізів гіпокампа давало змогу отримувати ізольовані нейрони необхідної зони, які зберігали невеликі частини апікальних і базальних дендритів і мали сому діаметром 15–20 мкм і довжиною 30–50 мкм.

Розчин-А містив (ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5, NEPES – 10, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкозу – 25. Розчин-Б: NaCl – 125, KCl – 5, NaH₂PO₄ – 1,25, NaHCO₃ – 25, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкозу – 10. Склад піпеткового розчину був наступним: C₆H₅O₇K₃ (трикалієва сіль лимонної кислоти) – 60, KCl – 20, NEPES – 10, MgCl₂ – 5; амфотерицин-В попередньо розчиняли в DMSO із розрахунку 1 мг на 5 мкл і додавали до піпеткового розчину (1 мг/мл). Всі речовини отримані від фірми «Sigma-Aldrich» (США).

Трансмембранні струми і потенціали вимірювали з використанням стандартної методики patch-clamp в умовах перфорації ділянки мембрани під дією амфотерицину-В [26]. Позаклітинний розчин замінювали в робочій камері через апікаційну піпетку з одночасним відкачуванням надлишку рідини перистальтичним насосом з іншого боку камери. Використовувалося програмне забезпечення «NewProg» (Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України) і підсилювача

(«Dagan Corp», США); мікропіпетки виробляли на пулері P97 («Sutter Instruments», США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У наших експериментах ми використовували ремп-тестування тривалістю 10 с як експрес-аналіз генеративної активності нейронів, утримуваних при мембранному потенціалі -80 мВ. Побудова графіків імпульсної генерації відбувалася у вигляді залежностей значень міжімпульсного інтервалу (МІ) від вхідного струму (рис. 1 а,б,в).

На основі графіків активності ми визначали поріг ініціації генерації (ПІГ) – як найменшу амплітуду вхідного струму, при якій починається імпульсація. Інша характеристика імпульсної активності – поріг пригнічення генерації (ПІГ), була визначена нами як найбільша амплітуда вхідного струму, вище якої генерація не відбувалася. Ми також аналізували початкові та кінцеві значення МІ, яких визначають при ПІГ та ПІГ відповідно.

На старті експериментального відведення ізольовані нейрони мали початкову генерацію при вхідному струмі від 3,7 до 27,4 пА, в середньому 12,5±7,9 пА (n=18). Міжімпульсний інтервал зменшувався від початкового 168±48 до 61±25 мс із пригніченням генерації при вхідному струмі у середньому 67±37 пА. При цьому для 4 клітин нами було враховано поріг ПІГ у +110 пА, оскільки при такому максимальному подразненні здатність до генерації не втрачалася.

Значні коливання ПІГ виявляються як при порівнянні активності нейронів на початку тестування, так і в повторних реєстраціях ремп-стимулом при відведенні активності від окремих клітин. Спеціальна перевірка ПІГ на одному нейроні виявила суттєву дисперсію у 7,4 пА при середньому значенні ПІГ 44,7 пА (19 послідовних ремп-записів). Це якісно контрастує із дисперсією у 1,3 пА порога ПІГ при середньому значенні 13,4 пА, де відхилення початку генерації має рівень одного міжімпульсного інтервалу.

Між порогами ініціації та пригнічення генерації нами виявлена значима позитивна кореляція на рівні 0,01 (коефіцієнт Спірмена $\rho = 0,664$, $n = 17$), а також встановлена значима від'ємна кореляція ППГ та кінцевого міжімпульсного інтервалу ($\rho = -0,685$).

При перевірці взаємозалежності значень ППГ та ППГ та відповідних ним МІ, метод головних компонент факторного аналізу виділяє дві основні компоненти (приховані фактори), які пояснюють 83% дисперсії значень 4-х змінних. Найбільший внесок у першу компоненту дають ППГ та ППГ, тоді як друга переважно пов'язана з початковим значенням МІ.

Класифікаційний аналіз показав три кластери нейронів: найбільший складався із 10 клітин (55,6%) та характеризувався високим ППГ ($17,4 \pm 7,1$ пА) та ППГ (90 ± 19 пА) при високій частоті генерації. Інший кластер із 4 нейронів (22,2%) відрізнявся повільною генерацією за будь-якої інтенсивності деполяризації, ще 4 нейрони (22,2%) мали найнижчий ППГ одночасно із високочастотною імпульсацією.

Методом повторних ремп-тестувань із інтервалом 10 хв були виявлені загальні ефекти посилення і зменшення імпульсної реакції 7 нейронів у часі експериментального відведення. Подібно до змін генерації при степ-тестуванні, нами виділено фази «посилення», «стабільності» та «згасан-

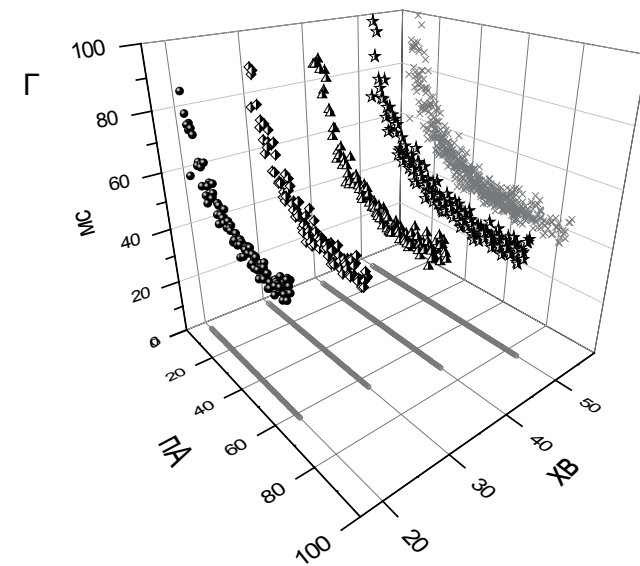
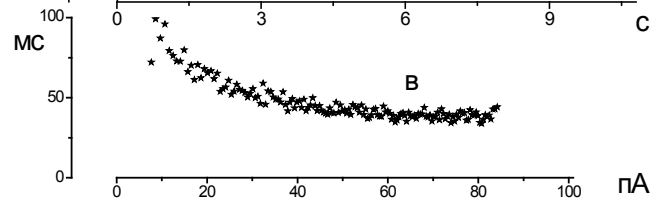
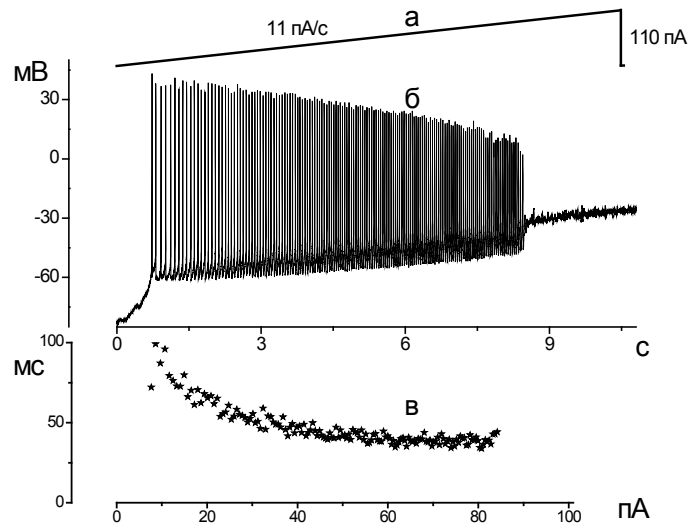


Рис. 1. Реєстрація послідовностей міжімпульсного інтервалу (МІ) та побудова тахограм: а – ремп-протокол зміни вхідного струму від 0 до 110 пА зі швидкістю 11 пА/с; б – реєстрація мембранного потенціалу нейрона під впливом ремп-сигналу; в – графік імпульсної генерації (тахограма), за віссю ординат – тривалість МІ; за віссю абсцис – середня амплітуда вхідного струму на відповідних інтервалах, пА; г – тривимірний графік імпульсної генерації, представлені послідовності МІ у фазі «стабільної» активності на 20-й (○), 30-й (◇), 40-й (Δ) і 50-й (☆) хвилини після початку відведення від клітини, сірим кольором позначені проєкції значень у площинах XY (°) та YZ (×)

ня» генераційної активності [24].

Ознакою фази «стабільності» або стабільної активності є сталі ремп-залежності, з незмінною формою та рівнем значень генеральної послідовності МІ (рис. 1, г). Тривалість фази становила від 10 до 60 хв; впродовж цього періоду ППГ істотно не змінювався, на відміну від підвищення значень ППГ на 20–50%. Наведений на рисунку приклад демонструє 34%-ву зміну ППГ з 65 пА на 20-й хвилині відведення до 87 пА на 50-й хвилині. Дисперсія значень у генеральній послідовності МІ є найменшою в фазі «стабільності», і може слугувати критерієм для визначення часових рамок фази. Ріст дисперсії на 30% від мінімального рівня ми обирали як порогове значення, яке визначає умовний поділ фаз активності. Подібний характер активності в контрольних умовах мали і інші нейрони.

Імпульсна генерація нейронів характерно зростає на початку експериментального відведення в умовах ремп-потоклу, чим може бути обґрунтоване виділення відповідної фази «посилення» – збільшення активності нейрона. Основні зміни відбуваються в спроможності нейрона генерувати ПД при деполяризації струмом в діапазоні від 40 до 80 пА, та конкретно в поступовому збільшенні ППГ (рис. 2, а). Наведений на рисунку запис вказує на двократне зростання ППГ із 35 пА на початку відведення до 65 пА на 20-й хвилині. Разом із незначними змінами ППГ, значно розширювався діапазон амплітуд вхідного струму, де нейрони генерували ПД.

Найбільші порушення генерації в умовах ремп-протоколу ми визначили у фазі «згасання» – зменшення активності нейрона, в якій суттєвих змін зазнають форми залежностей і амплітуди МІ. Характерною ознакою фази було поступове збільшення дисперсії значень МІ у 3–10 разів та підвищення ППГ до 20–60 пА. На рис. 2, б наведені тахограми генерації ПД ізолюваного нейрона у фазі «згасання» – зменшення активності впродовж 20 хв. Поріг ППГ підвищився з 8 до 23 пА, за 10 хв змінювався нахил тахограми, значно зростали

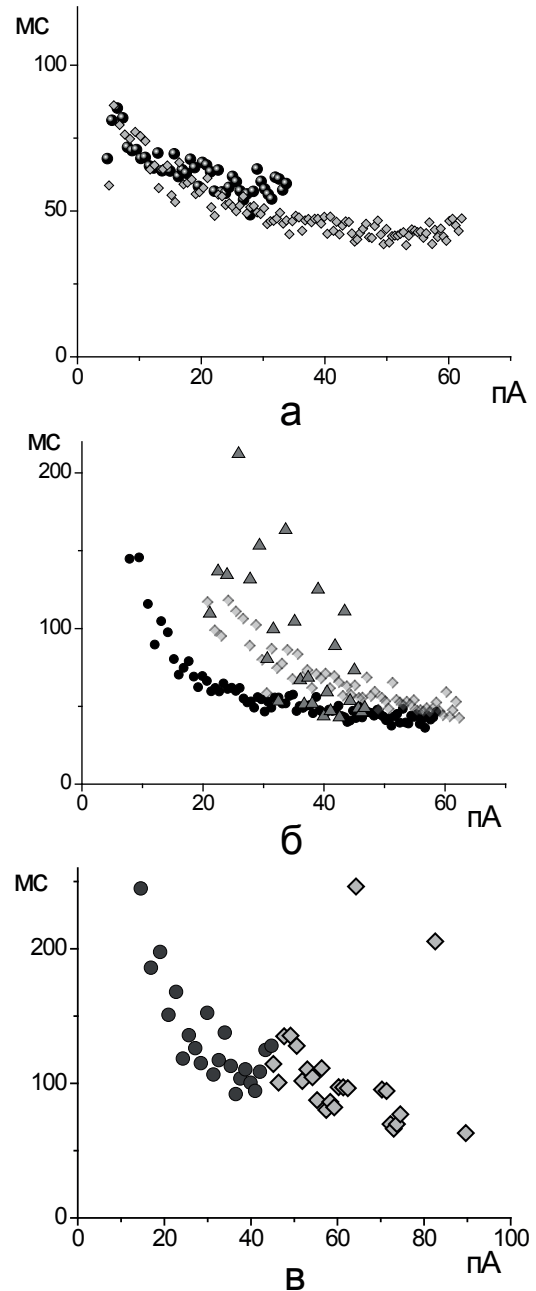


Рис. 2. Порівняння тахограм в фазах «посилення» і «згасання» імпульсної активності: а – графік тахограм у фазі «посилення» активності на початку відведення (●) та через 20 хв (◆); б – тахограми у фазі «згасання» імпульсної активності при реєстрації на 10-й (●), 20-й (◆) та 30-й (▲) хвилинах після початку відведення; в – порівняння тахограм в фазах «посилення» і «згасання» імпульсної активності на початку відведення (●) та на 50-й хвилині (◆) відповідно. Тахограми на окремих графіках відображають активність різних нейронів

амплітуди і дисперсія МІ у відповідь на струм 20–40 пА. Хоча ППГ тимчасово збільшувався на 5 пА, однак в цілому діапазон генерації звузився з 50 до 43 пА. Надалі відбувалося ще більше його звуження до 25 пА, через 10 хв фіксували порушення ритмічної генерації нейрона та трикратне відхилення значень МІ. Усі тестовані нейрони припиняли імпульсну генерацію на завершення фази «згасання» в умовах ремп-протоколу та перфорованого patch-clamp, хоча були неушкодженими та проявляли трансмембранні струми.

Зсув діапазону генерації може бути виявлений та наочно представлений на графіках тахограм за допомогою ремп-протоколу. На рис. 2, в наведено порівняння послідовностей МІ на початку та наприкінці експериментального відведення активності окремого нейрона за рівних контрольних умов. Можна бачити, що за 50 хв діапазон активності змістився в бік деполяризації; на початку та в кінці відведення відсутнє перекриття діапазонів генерації через підвищення ППГ на 30 пА. Щонайменше для деяких нейронів будь-яка амплітуда тестового стимулу є ефективною протягом обмеженого часу, що потребує контролю під час експерименту.

При підозрі, що тривала деполяризація нейронів шкодить їх спроможності до генерації або вони швидко втрачають свою імпульсну активність, ремп-стимуляція є адекватною заміною протоколу із серією степ-стимулів, оскільки за 10 с здатна виявити генераторну здатність на різних рівнях збудження.

Таким чином, ремп-протокол доповнює методичні умови тестування генераційної активності клітин, разом із відбором нейронів за зовнішніми ознаками та їх тестуванням на рівень потенціалу спокою та овершут ПД. Ремп-стимуляція може виявити часові рамки фази стабільної імпульсної активності при тестуванні з періодом 5–10 хв, а також визначити зміну найбільш важливих показників генерації: ППГ, залежності МІ від вхідного струму, дисперсії МІ.

Наші дослідження показують, що набір показників імпульсної активності, які вираховуються на розсуд дослідників, потребує певної систематизації та переоцінки. Загалом, визначаються такі показники: а) кількість ПД у відповідь на стимул або тривалість серії; б) порогові значення стимулів або потенціалів, при яких виникає або змінюється генерація; в) частоту чи відповідний їй період генерації в порогових точках або в діапазоні стимулів; г) похідні показники ПД – нахил, амплітуда, напівширина, які визначаються із запису потенціалу.

Щодо аналізу піків ПД, в наших результатах ми вбачаємо найбільш сталими ППГ і тахограми генерації, значення яких зберігаються на певному рівні впродовж фази стабільної активності. Реєстрація в цій фазі найкращим чином відмежовує вплив експериментальних факторів від ендогенних змін активності нейронів і може тривати від 10 до 30 хв в умовах перфорованого patch-clamp.

Ми вважаємо невинуватим критерій незмінності кількості ПД для визначення якості реєстрації, оскільки спостерігається постійний ріст ППГ у часі в контрольних умовах. Підвищення цього порогу у нормі збільшує кількість ПД у степ-протоколі залежно від амплітуди стимулу, тому вибірка клітин за таким правилом є неадекватною. З іншого боку, кількість ПД може зменшуватися через активне підвищення ППГ в фазі згасання активності, що компенсує ріст ППГ і призводить до зсуву діапазону генерації. Також як мінімум для 5 клітин ми спостерігали значні відхилення в кількості генерованих ПД в межах окремої серії стимуляції (більше 20%). Єдиною позитивною стороною критерію є витрата часу на його застосування на початку відведення, однак лише з позиції проходження фази посилення активності.

Сумнівним показником активності гостроізольованих нейронів ми вважаємо потенціал спокою, який вимірюється в режимі нульового вхідного струму. Ферментативна

обробка та ізолювання нерівномірно пошкоджують клітини, чим викликають деполяризаційний зсув мембранного потенціалу різної інтенсивності. Традиційний відбір «здорових» клітин із потенціалом спокою нижче за -40 мВ лише підкреслює важливість їх якісного ізолювання, та ставить статистичний показник потенціалу спокою в залежність від вправності експериментатора. За нашими результатами, склад зовнішньоклітинних розчинів модулює потенціал спокою також через вплив буферних систем або концентрації глюкози.

Порівняння генерації клітин під впливом речовин або інших факторів можливе лише у фазі «стабільної» активності, за умов достатньої її тривалості. В фазах «посилення» та «згасання» зіставлення імпульсації може виявитися неадекватним або неможливим. Гіпотези щодо зміни активності неможливо перевірити на реєстраціях в різних фазах, коли відбуваються значні зсуви діапазону генерації, як на рис.2, в.

Імпульсна активність нейронів нелінійно пов'язана з трансмембранними струмами, та знаходиться під впливом внутрішньоклітинних факторів, які зумовлюють щонайменше зміну картини генерації у часі в умовах реєстрації контрольної активності. Істотним фактором може слугувати внутрішньоклітинна кальцієва сигналізація, оскільки зовнішня концентрація кальцію значно впливає на частоту генерації ізолюваних нейронів та ефект акомодатії, як було показано нами раніше [27, 28]. Імпульсна активність нейронів гіпокампа модулюється іонами літію [26] та епілептогенною речовиною пілокарпіном [25, 29], через залучення калієвих каналів М-типу та різних типів G-білків.

Ми припускаємо, що внутрішньоклітинні фактори впливають на імпульсну активність нейронів через механізм ритмогенезу, який викликає коливання поки невстановленої природи під зовнішньою мембраною клітини. В свою чергу, ці коливання рухають

трансмембранний потенціал клітини, стимулюють багаторазову повторну генерацію ПД та водночас підтримують її ритмічність. Підтвердженням існування механізму ритмогенезу можуть бути наші досліди про вплив на імпульсну активність речовини карбоніл-ціанід-м-хлорфенілгідразону (СССР), роз'єднувача протонного градієнта мітохондрій [10]. Так, СССР вже в наднизькій концентрації 1 нмоль/л повністю блокував множинну генерацію ПД як при прямокутній тест-деполяризації, так і при застосуванні ремп-сигналу. Однак іонні канали мембрани нейрона зберігали здатність формувати один повноцінний ПД у відповідь на прямокутний тест-стимул. Ми припускаємо, що блокування мітохондріальних функцій захоплення кальцію або продукції АТФ порушує механізм ритмогенезу і відповідно здатність нейрона до тривалої генерації ПД.

Пошкодження внутрішньоклітинного механізму ритмогенезу у фазі «згасання» активності може пояснювати різнобічні зовнішні ефекти розладу генерації ПД на мембрані нейрона. Так, перерви ритму коливань може викликати збільшення дисперсії генерації ПД. З іншого боку, ослаблення впливу механізму ритмоведіння на клітинну мембрану може призводити до деполяризаційного зсуву порогу ініціації генерації. Тобто порушення як мінімум двох ланок механізму ритмогенезу викликає два головних типи порушень активності в контрольних умовах.

Таким чином, реєстрація послідовностей МІ із застосуванням ремп-стимулів дає змогу визначати додаткові характеристики імпульсної активності – ППГ і ППГ, форму і амплітуду залежностей МІ при різній деполяризації нейрона. Запропоновані нами протоколи стимуляції та відповідний аналіз є інструментами, що обґрунтовують достовірність впливу хімічних речовин або інших експериментальних факторів на імпульсну активність нейронів.

В.А. Яворский, Е.А. Лукьянец

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНЫХ ПИЛООБРАЗНЫХ СТИМУЛЯЦИЙ ДЛЯ ЭКСПРЕСС- ДИАГНОСТИКИ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

В данной работе исследовались изменения импульсной активности нейронов гиппокампа при применении стимуляций пилообразной формы. Описано использование серийных регистраций электрической активности нейронов для экспрес-диагностики генераторной способности изолированных клеток. Установлено, что предложенный протокол дает возможность определять дополнительные характеристики импульсной активности нейрона – порог инициации генерации и порог подавления генерации, форму и амплитуду зависимостей межимпульсных интервалов при различной деполяризации нейрона. Предлагаемые нами протоколы стимуляции и соответствующий анализ являются инструментами, которые могут эффективно использоваться для обоснования достоверности влияния химических соединений или других экспериментальных факторов на импульсную активность нейронов во время фазы «стабильной» активности длительностью до 30 мин.

Ключевые слова: нейроны гиппокампа; перфорированный patch-clamp; потенциал действия; аккомодация; межимпульсный интервал.

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина.

V.A. Yavorsky, E.A. Lukyanetz

USING THE SERIAL RAMP RECORDINGS FOR RAPID TESTING OF THE GENERATING ABILITY OF IMPULSE ACTIVITY OF ISOLATED HIPPOCAMPAL NEURONS

In this study we investigated changes of impulse activity of hippocampal neurons of the hippocampus by using ramp recordings. We have described the usage of serial ramp recordings of neuronal electrical activity for rapid testing of the generating ability of isolated hippocampal neurons. An analysis of the data has shown that the proposed protocol of serial ramp recordings allows to define additional characteristics of the neuronal impulse activity: (i) the thresholds for initiation of generation and suppression of the generation, (ii) the shape and amplitude of relationship between the interpulse intervals and neuronal depolarizations. The suggested stimulation protocols and related analysis are tools that can be effectively used to justify influence of chemicals or other experimental factors on the impulse activity of neurons.

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

REFERENCES

1. Lunko OO, Isaev DS, Maximyuk OP, Krishtal OA, Isaeva EV. The effect of enzymatic treatment using proteases on properties of persistent sodium current in CA1 pyramidal neurons of rat hippocampus. *Fiziol Zh.* 2014; 60 (3): 75-9. [Ukrainian].
2. Estacion M, Waxman SG. The response of Na(V)1.3 sodium channels to ramp stimuli: multiple components and mechanisms. *J Neurophysiol.* 2013; 109 (2): 306-14.
3. Kononenko NI, Shao LR, Dudek FE. Riluzole-sensitive slowly inactivating sodium current in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurophysiol.* 2004; 91 (2): 710-8.
4. Power KE, Carlin KP, Fedirchuk B. Modulation of voltage-gated sodium channels hyperpolarizes the voltage threshold for activation in spinal motoneurons. *Exp Brain Res.* 2012; 217 (2): 311-22.
5. Wu SN, Lo YC, Shen AY, Chen BS. Contribution of non-inactivating Na⁺ current induced by oxidizing agents to the firing behavior of neuronal action potentials: experimental and theoretical studies from NG108-15 neuronal cells. *Chin J Physiol.* 2011; 54 (1): 19-29.
6. Cheng X, Dib-Hajj SD, Tyrrell L, Te Morsche RH, Drenth JP, Waxman SG. Deletion mutation of sodium channel Na(V)1.7 in inherited erythromelalgia: enhanced slow inactivation modulates dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *Brain.* 2011; 134 (Pt 7): 1972-86.
7. Estacion M, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Effects of ranolazine on wild-type and mutant hNav1.7 channels and on DRG neuron excitability. *Mol Pain.* 2010; 6: 35.
8. Estacion M, Gasser A, Dib-Hajj SD, Waxman SG. A sodium channel mutation linked to epilepsy increases ramp and persistent current of Nav1.3 and induces hyperexcitability in hippocampal neurons. *Exp Neurol.* 2010; 224 (2): 362-8.
9. Yan J, Melemedjian OK, Price TJ, Dussor G. Sensitization of dural afferents underlies migraine-related behavior following meningeal application of interleukin-6 (IL-6). *Mol Pain.* 2012; 8: 6.
10. Ku WH, Schneider SP. Multiple T-type Ca²⁺ current subtypes in electrophysiologically characterized hamster dorsal horn neurons: possible role in spinal sensory integration. *J Neurophysiol.* 2011; 106 (5): 2486-98.
11. Miao X, Meng X, Wu G, Ju Z, Zhang HH, Hu S, Xu GY. Upregulation of cystathionine-beta-synthetase expression contributes to inflammatory pain in rat temporomandibular joint. *Mol Pain.* 2014; 10 (1): 9.
12. Locatelli F, Botta L, Prestori F, Masetto S, D'Angelo E. Late-onset bursts evoked by mossy fibre bundle stimulation in unipolar brush cells: evidence for the involvement of H- and TRP-currents. *J Physiol.* 2013; 591 (Pt 4): 899-918.
13. Cains S, Blomeley CP, Bracci E. Serotonin inhibits low-threshold spike interneurons in the striatum. *J Physiol.* 2012; 590 (Pt 10): 2241-52.
14. Chen QH, Andrade MA, Calderon AS, Toney GM. Hypertension induced by angiotensin II and a high salt

- diet involves reduced SK current and increased excitability of RVLN projecting PVN neurons. *J Neurophysiol.* 2010; 104 (5): 2329-37.
15. Zhao ML, Wu CF. Alterations in frequency coding and activity dependence of excitability in cultured neurons of *Drosophila* memory mutants. *J Neurosci.* 1997; 17 (6): 2187-99.
 16. Druckmann S, Berger TK, Schurmann F, Hill S, Markram H, Segev I. Effective stimuli for constructing reliable neuron models. *PLoS Comput Biol.* 2011; 7 (8): e1002133.
 17. Jung SC, Hoffman DA. Biphasic somatic A-type K channel downregulation mediates intrinsic plasticity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *PLoS One.* 2009; 4 (8): e6549.
 18. Chen QH, Toney GM. Excitability of paraventricular nucleus neurones that project to the rostral ventrolateral medulla is regulated by small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Physiol.* 2009; 587 (Pt 17): 4235-47.
 19. Huang J, Yang Y, Zhao P, Gerrits MM, Hoeijmakers JG, Bekelaar K, Merkies IS, Faber CG, Dib-Hajj SD, Waxman SG. Small-fiber neuropathy Nav1.8 mutation shifts activation to hyperpolarized potentials and increases excitability of dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci.* 2013; 33 (35): 14087-97.
 20. Feng B, Strichartz G. Endothelin-1 raises excitability and reduces potassium currents in sensory neurons. *Brain Res Bull.* 2009; 79 (6): 345-50.
 21. Lang PM, Hilmer VB, Grafe P. Differential contribution of sodium channel subtypes to action potential generation in unmyelinated human C-type nerve fibers. *Anesthesiology.* 2007; 107 (3): 495-501.
 22. Grundken C, Hanske J, Wengel S, Reuter W, Abdulazim A, Shestopalov VI, Dermietzel R, Zoidl G, Prochnow N. Unified patch clamp protocol for the characterization of Pannexin 1 channels in isolated cells and acute brain slices. *J Neurosci Methods.* 2011; 199 (1): 15-25.
 23. Yavorskii VA, Lukyanetz EA. Evoked Impulse Activity of Isolated Hippocampal Neurons in the Perforated Patch-Clamp Configuration. *Neurophysiology.* 2012; 43: 417-24.
 24. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Using serial tachograms to measure the evoked impulse activity of isolated hippocampal neurons. *Fiziol Zh.* 2013; 59 (5): 3-10. [Ukrainian]
 25. Yavorskii VA, Kostyuk PG, Lukyanetz EA. Accommodation properties of isolated hippocampal neurons under conditions of an experimental model of epilepsy. *Neurophysiology.* 2006; 38: 175-81.
 26. Yavorskii VA, Lukyanetz EA. Effect of lithium ions on the accommodation characteristics of neurons from the CA1 hippocampal zone. *Neurophysiology.* 2000; 32: 220-2.
 27. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. The role of Ca ions in frequency accommodation in rat hippocampal neurones. *Ukr Biokhim Zh.* 2001; 73: 127. [Ukrainian]
 28. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Interspike model of neuronal impulse activity. *Fiziol Zh.* 2009; 55: 135. [Ukrainian].
 29. Yavorsky VA, Lukyanetz EA. Pilocarpine-induced epileptiform activity of isolated CA1 hippocampal neurons. *Neurophysiology.* 1997; 29: 162-7.

*Матеріал надійшов
до редакції 15.09.2013*