

ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМОСТЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ЗАДЕРЖАННОЙ ГЕНЕРАЦИИ В ЖЕЛАТИНОЗНОЙ СУБСТАНЦИИ КРЫСЫ

Поступила 26.06.10

Нейроны желатинозной субстанции (ЖС) по характеру генерации потенциалов действия (ПД) разделяют на три основных типа: тонические, адаптирующиеся и с задержанной генерацией (НЗГ). Предполагается, что задержка инициации ПД в НЗГ связана с активацией подпорогового калиевого тока А-типа (K_A). В настоящей работе эта гипотеза проверялась путем сравнения потенциалзависимостей данной задержки и процесса стационарной инактивации K_A в экспериментах на срезах спинного мозга трех-пятидневных крыс. Задержка генерации ПД уменьшалась в случае деполяризации мембраны исследуемых НЗГ и исчезала при ~ -60 мВ; генерация ПД такими нейронами становилась тонической или адаптирующейся. Это хорошо коррелировало с инактивацией K_A (в случаях отведения от целой клетки с низкой $[Cl^-]$ во внутриклеточном растворе). Рассматриваемый ток уменьшался почти до нуля при -60 мВ; потенциал половинной инактивации ($V_{1/2}$) составлял ~ -74.5 мВ. Однако в условиях использования внутриклеточного раствора с высокой $[Cl^-]$ между потенциалзависимостями задержки генерации ПД и инактивации K_A наблюдалась разница ~ 10 мВ; последняя зависимость сдвигалась в сторону отрицательных значений ($V_{1/2} \sim -88.3$ мВ). Эти результаты позволяют предполагать, что наличие K_A в НЗГ и характер его инактивации являются основной причиной задержки генерации ПД и её чувствительности к потенциалу, однако влияние внутриклеточного Cl^- на инактивацию K_A нуждается в дальнейшем изучении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спинной мозг, желатинозная субстанция, боль, тип генерации импульсов, калиевый А-ток.

ВВЕДЕНИЕ

В желатинозной субстанции (ЖС) спинного мозга представлены ряд групп разнообразных по своим свойствам интернейронов, участвующих в передаче болевой и температурной чувствительности. По типу генерации потенциалов действия (ПД), вызванной длительной деполяризацией, эти нейроны обычно подразделяют на тонические, адаптирующиеся и нейроны задержанной генерации (НЗГ) [1–5]. Считается, что наличие единиц со столь характерными свойствами важно для обработки сенсорной информации разных модальностей и может коррелировать с функциональной ролью того или иного нейрона в клеточных сетях дорсального рога спинного мозга [6–8]. В последнее время особенно ионных проводимостей, обуславливающих раз-

личия типов генерации импульсации (в частности, тонической и адаптирующейся), активно изучались [9, 10]. Что же касается НЗГ, то многие авторы отметили присутствие в таких клетках значительного калиевого тока А-типа (K_A), который в основном и может быть причиной, определяющей задержку генерации ПД [2–6, 11]. Однако прямые экспериментальные доказательства этого предположения не очень убедительны. Так, использование классического блокатора K_A 4-аминопиридина (4-АП) не совсем оправдано, поскольку данный агент блокирует не только K_A , но в значительной степени и калиевый ток задержанного выпрямления (K_{DR}) [12]. В настоящей работе мы исследовали сходство потенциалзависимостей K_A и задержки генерации ПД в нейронах НЗГ, чтобы получить прямые доказательства причинной связи между этими феноменами. Одной из отличительных черт K_A является его выраженная подпороговая инактивация [12, 13]. Поэтому мы выясняли, как зависят от потенциала стационарная инактивация K_A (в режиме фик-

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: igorm@biph.kiev.ua (И. В. Мельник).

сации потенциала) и упомянутая задержка ПД (в режиме фиксации тока). Оказалось, что обе характеристики проявляют сходную чувствительность к мембранному потенциалу (МП). Кроме того, было обнаружено, что уровень внутриклеточного Cl^- заметно влияет на инактивацию K_A .

МЕТОДИКА

Эксперименты выполняли на продольных и поперечных срезах (толщина 300 мкм) поясничного отдела спинного мозга крыс (возраст три–пять недель). После обезболивания (внутрибрюшинная инъекция 30 мг/кг пентобарбитала натрия) производили ламинэктомию и последующую резекцию пояснично-крестцового отдела спинного мозга. Изъятый участок переносили в охлажденный до 4 °С физиологический раствор, насыщенный газовой смесью из 95 % O_2 и 5 % CO_2 . После нарезки срезы инкубировали не менее 30 мин при 34 °С. Для экспериментов срезы переносили в рабочую камеру и суперфузировали физиологическим раствором со скоростью 3 мл/мин при температуре 32 °С. Камера размещалась на неподвижной площадке микроскопа, снабженного устройством инфракрасного дифференциально-интерференционного контраста и объективом водной иммерсии $\times 60$ (“Olympus”, Япония).

Физиологический раствор содержал в себе (в миллимолях на 1 л): $NaCl$ – 124, KCl – 3, $CaCl_2$ – 2.5, $MgSO_4$ – 1.3, NaH_2PO_4 – 1.4, $NaHCO_3$ – 26, глюкозу – 10 (рН 7.4 при насыщении 95 % O_2 + 5 % CO_2). После заполнения внутриклеточным раствором с низкой $[Cl^-]$ следующего состава (в миллимолях на 1 л): К-глюконат – 125, KCl – 4, $MgATФ$ – 5, $NaГТФ$ – 0.3, ЭГТА – 5, $HEPES$ – 5, креатин фосфат – 8 (рН доводили КОН до 7.25, а осмолярность – до 295 мОсм) пипетки имели сопротивление 5–7 МОм. Полученные отведения корректировали на величину контактного потенциала $E_{LJ} \approx +10$ мВ; значение последнего вычисляли с использованием внутренней программы комплекса “pCLAMP” (ионы ЭГТА, АТФ и ГТФ при этом не учитывали, так как они не входили в листинг программы). В некоторых экспериментах К-глюконат замещался KCl (раствор с высокой $[Cl^-]$) для минимизации E_{LJ} ($\approx +1$ мВ); последний в данном случае не компенсировали. Для регистраций использовался усилитель “MultiClamp 700B” (“Axon Instruments”, США). Сигналы фильтровали с частотой

среза 3 кГц и оцифровывали с частотой 10^4 с⁻¹ с помощью компьютерного интерфейса Digidata 1322 и программного комплекса “pCLAMP 9.2” (“Axon Instruments”, США). Последовательное сопротивление не превышало 25 МОм и не компенсировалось. Генерация ПД вызывалась путем приложения деполяризационных толчков тока длительностью 500 мс возрастающей интенсивности (10–650 пА). Ток утечки и емкостные токи вычитались в режиме on-line с использованием стандартного программного протокола Р/4. Графики стационарной инактивации аппроксимировались уравнением Больцмана (“Origin 6.1”):

$$I / I_{\max}(V) = 1 / (1 + \exp[(V_{1/2} - V) / k]),$$

где I_{\max} – максимальный ток, $V_{1/2}$ – потенциал половинной инактивации, k – наклон кривой. Данные представлены как средние \pm ошибка среднего. Достоверность межгрупповых различий оценивали с использованием критерия Стьюдента (парного или непарного), уровень $P < 0.05$ принимался как свидетельство достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Отведения были получены от 57 НЗГ, а для качественного сравнения – дополнительно от 11 тонических и шести адаптирующихся нейронов ЖС. Использовали экспериментальные условия двух типов – с низкой (4 мМ, $n = 33$) и высокой (138 мМ, $n = 24$) внутриклеточной $[Cl^-]$. Первое условие было выбрано потому, что для нейронов ЦНС обычно характерна низкая концентрация Cl^- [14]. Высокая же внутриклеточная $[Cl^-]$ предположительно обеспечивает оптимальные условия для отведения в силу незначительного E_{LJ} ; кроме того, такие условия позволяли сопоставлять получаемые результаты с данными наших предыдущих исследований [9–11]. МП покоя составлял -73 ± 1.8 и -70 ± 1.4 мВ для двух упомянутых условий соответственно. НЗГ генерировали ПД с заметной задержкой, т. е. в конце приложения деполяризационного толчка (рис. 1, А, показано для низкой $[Cl^-]$). Отличительной чертой генерации этого типа была ее зависимость от потенциала: задержка уменьшалась в условиях деполяризации мембраны и исчезала при ~ -60 мВ. Иными словами, задержанная генерация ПД прекращалась, и ответы трансформировались в тонические или же в адаптирующиеся (А). Активности

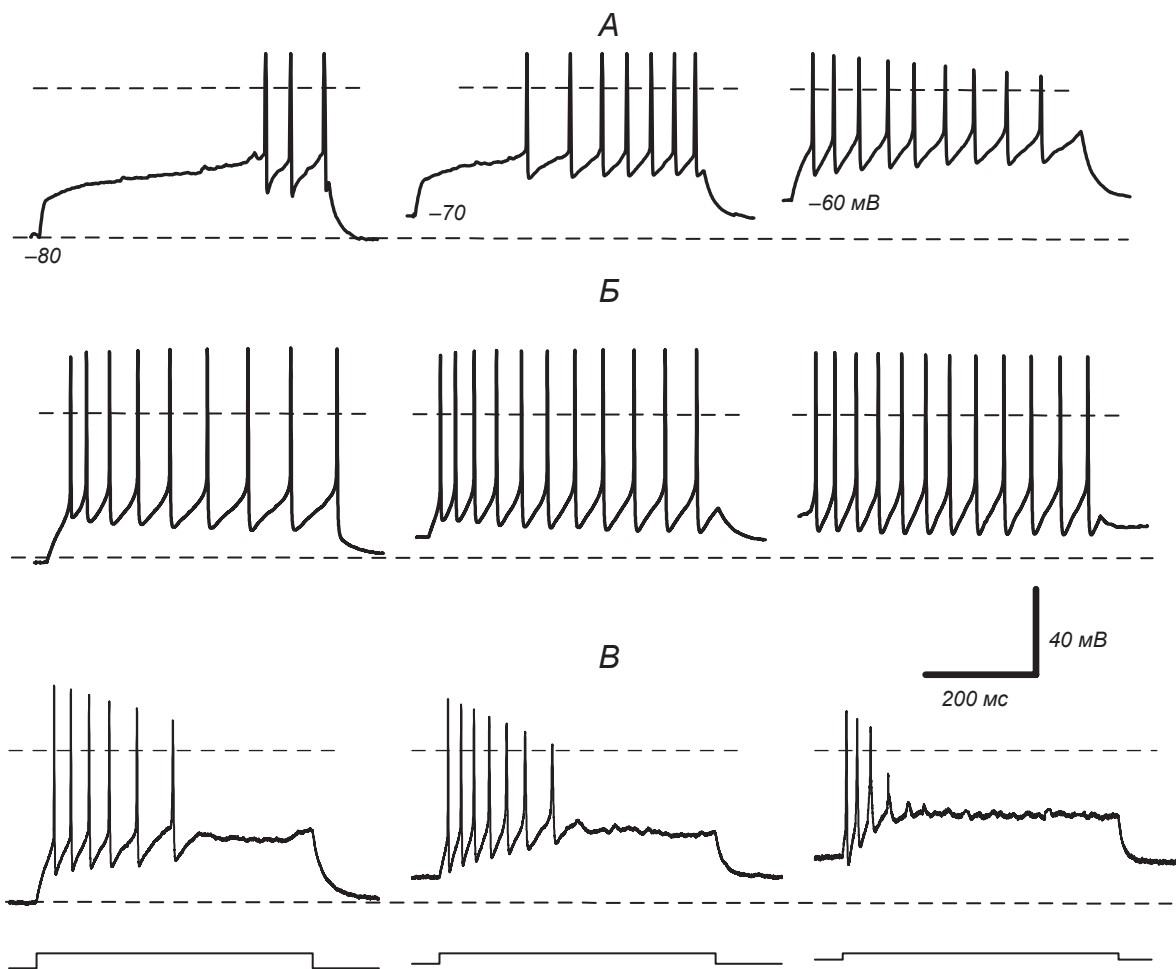


Рис. 1. Зависимость паттерна генерации потенциалов действия от потенциала на мембране при стимуляции нейронов желатинозной субстанции длительными прямоугольными толчками тока. *А* – нейрон задержанной генерации; при деполяризации тип активности изменился, и она стала тонической. *Б* – тонический, *В* – адаптирующийся нейрон. Отведения в режиме фиксации тока при уровнях мембранного потенциала -80 , -70 и -60 мВ. Штриховой линией вверху указан уровень 0 мВ. Протокол стимуляции приведен внизу. Внутривиточный раствор содержал в себе 4 мМ Cl^- .

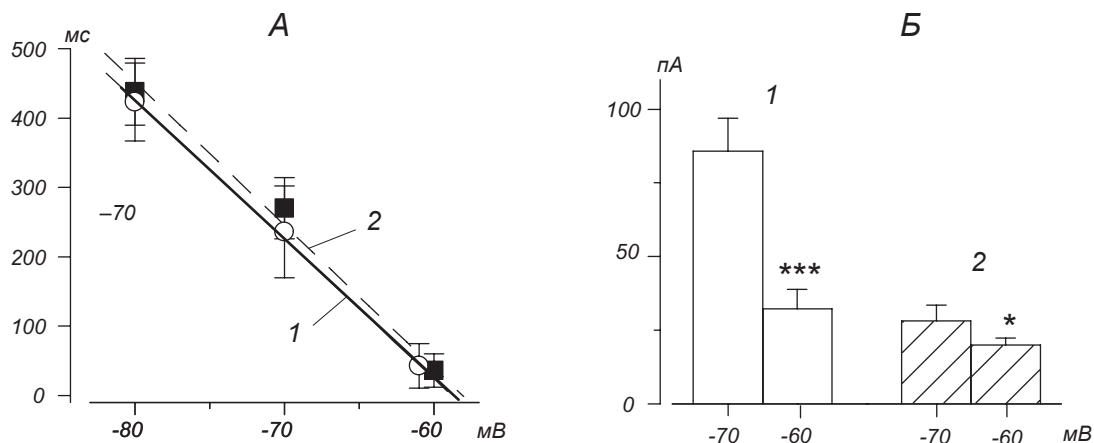
Рис. 1. Залежність паттерну генерації потенціалів дії від потенціалу на мембрані при стимуляції нейронів желатинозної субстанції тривалими прямокутними поштовхами струму.

собственно тонического и адаптирующегося типов были нечувствительны к МП (тестировались значения между -80 и -60 мВ; *Б*, *В*).

Данные по потенциалзависимости задержки генерации ПД для двух экспериментальных ситуаций просуммированы на рис. 2, *А*. Линии регрессии, проведенные через полученные точки, оказались почти параллельными. Этот факт подтверждает предположение о том, что наличие одного и того же потенциалзависимого тока (предположительно K_A [13]) является причиной упомянутой задержки

в условиях и низкой, и высокой внутриклеточной $[\text{Cl}^-]$. Дополнительным аргументом, свидетельствующим в пользу гипотезы о роли K_A , было значительное уменьшение реобазы для НЗГ: при -60 мВ она уменьшалась в среднем до 37.6 % исходной (*Б*). В тонических же нейронах, имеющих низкую плотность K_A [9], такое уменьшение реобазы было гораздо менее значительным (до 71.4 %; *Б*).

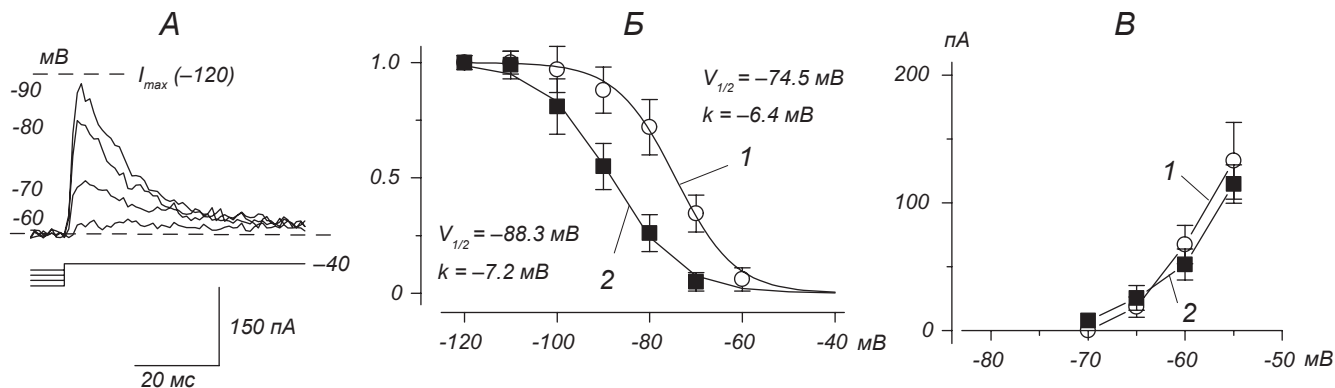
Следующие эксперименты были проведены в режиме фиксации потенциала на целой клетке; мы изучали процесс стационарной инактивации K_A и



Р и с. 2. Влияние внутриклеточной $[Cl^-]$ на потенциалзависимость вызванной импульсной активности у нейронов задержанной генерации (НЗГ).

A – потенциалзависимость задержки генерации потенциалов действия (мс). Линии регрессии в условиях низкой (1) и высокой (2) $[Cl^-]$ почти параллельны (наклоны -20.6 и -21 мс/мВ соответственно). *Б* – значения реобазы (пА) НЗГ (1), измеренные при мембранном потенциале -70 мВ и деполяризации до -60 мВ ($P < 0.001$, указано тремя звездочками, парный *t*-тест, $n = 6$). В тонических нейронах, показанных для сравнения (2), соответствующее изменение значительно меньше ($P < 0.05$, указано одной звездочкой, парный *t*-тест, $n = 5$).

Р и с. 2. Вплив внутрішньоклітинної $[Cl^-]$ на потенціалзалежність викликаної імпульсної активності у нейронах затриманої генерації.



Р и с. 3. Влияние внутриклеточной $[Cl^-]$ на стационарную инактивацию калиевого тока А-типа (K_A).

A – стационарная инактивация K_A в условиях низкой $[Cl^-]$; численные значения кондиционирующей поляризации указаны рядом с соответствующими реализациями. Максимальный ток наблюдался при гиперполяризации до -120 мВ. *Б* – график стационарной инактивации K_A в условиях низкой (1) и высокой (2) $[Cl^-]$, аппроксимация функцией Больцмана (потенциал половинной инактивации $V_{1/2}$ и наклон k обозначены на рисунке). По оси абсцисс – мембранный потенциал, мВ; по оси ординат – нормированные токи. При высокой внутриклеточной $[Cl^-]$ (2) кривая сдвигалась в отрицательном направлении. *В* – начальная вольт-амперная характеристика K_A в условиях низкой (1) и высокой (2) $[Cl^-]$. Порог активации в обеих экспериментальных ситуациях был практически одинаковым (~ -65 мВ).

Р и с. 3. Вплив внутрішньоклітинної $[Cl^-]$ на стаціонарну інактивацію калієвого струму А-типу.

сопоставляли его особенности с потенциалзависимостью задержки генерации ПД в НЗГ, наблюдаемой в режиме фиксации тока. Протокол стимуляции соответствовал предварительной поляризации мембраны НЗГ от -120 до -60 мВ толчком тока длительностью 300 мс, за которым следовал тест-скачок до -40 мВ. Такой протокол позволял изолированно активировать K_A при потенциалах, подпороговых для возникновения входящего натриевого тока, без сопутствующей активации K_{DR} (рис. 3, А; показано для низкого значения $[Cl^-]$) [9]. Из рисунка видно, что K_A существенно инактивировался уже при потенциале -70 мВ, близком к потенциалу покоя, а в области -60 мВ этот ток уменьшался почти до нуля. Суммарные данные о стационарной инактивации для двух экспериментальных ситуаций были аппроксимированы функцией Больцмана (Б, 1); указаны потенциал половинной инактивации $V_{1/2}$ и наклон k . Таким образом, в условиях низкой внутриклеточной $[Cl^-]$ инактивация K_A хорошо коррелировала с регистрациями потенциала: K_A почти полностью инактивировался, а задержка генерации ПД исчезала при одном и том же потенциале ~ -60 мВ (рис. 2, А, 1; 3, Б, 1). Было обнаружено, однако, что в условиях высокой внутриклеточной $[Cl^-]$ кажущаяся инактивация K_A сдвигалась в область более отрицательных значений (рис. 3, Б, 2). Это обуславливало несоответствие между регистрациями в режимах фиксации тока и потенциала, примерно равное ~ 10 мВ. K_A почти полностью инактивировался при -70 мВ, т. е. при потенциале, при котором все ещё наблюдалась значительная задержка генерации ПД. Мы рассмотрели гипотезу о неспецифическом происхождении данного феномена (например, в результате ошибки оценки потенциала вследствие варьирования E_{Cl}), сравнивая процессы инактивации и активации K_A (рис. 3, В). Оказалось, что кажущийся порог активации (т. е. потенциал, при котором K_A мог быть явно выделен из электрического шума амплитудой порядка 5 пА) для обоих экспериментальных условий составлял около -65 мВ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Причины различия типов вызванной импульсной активности нейронов ЦНС представляют очевидный интерес [15]. В дорсальном роге спинного мозга были обнаружены нейроны, генерирующие при стимуляции длительными толчками тока тони-

ческую, адаптирующуюся и задержанную активность [1–5]. Ответы тонического типа вполне могут быть связаны с активацией и взаимодействием лишь двух ионных проводимостей – быстрой натриевой и задержанной калиевой (K_{DR}), в то время как плотность K_A должна быть минимальной [9]. Низкая плотность натриевых каналов может обуславливать адаптационные изменения импульсной активности в нейронах [10]. Относительно же задержанной генерации ПД в упомянутых ответах было высказано предположение, что она определяется наличием существенного подпорогового K_A [4–6, 11]. В соответствии с этой гипотезой, K_A при его достаточной плотности эффективно противодействует активации входящего натриевого тока в ответ на стимуляцию длительным толчком тока и блокирует деполяризацию мембраны. ПД инициируются только после того, как K_A инактивируется; последнее и определяет задержку их генерации. Однако получить прямые экспериментальные подтверждения этой очевидной гипотезы затруднительно. Исключением являются культивируемые гранулярные клетки мозжечка, в которых K_A был инактивирован генетически [16]. Данные, касающиеся эффектов фармакологического блокирования указанного тока, неоднозначны. Так, сообщалось, что 4-АР устранял задержку генерации ПД в нейронах ЖС [4, 5]. Однако в других работах было показано, что 4-АР блокирует не только K_A , но и K_{DR} [12]. В настоящей работе для доказательства связи между влиянием K_A и задержкой генерации ПД в НЗГ мы сравнивали зависимость этих феноменов от потенциала. В случае использования внутриклеточного раствора с низкой $[Cl^-]$, что аналогично ситуации *in situ* у “взрослых” нейронов ЖС [14], задержка генерации ПД и процесс стационарной инактивации K_A демонстрировали одинаковую чувствительность к потенциалу. Так, при -60 мВ K_A почти полностью инактивировался, а задержка генерации импульсов исчезала, что подтверждает причинную связь между обоими процессами. Было, однако, обнаружено, что заполнение клеток раствором с высокой $[Cl^-]$ приводит к кажущемуся сдвигу кривой инактивации K_A в область отрицательных значений и появлению разницы порядка 10 мВ между наблюдаемым в режимах фиксации потенциала и тока. Можно предложить по крайней мере три разных объяснения этого феномена. Ошибка оценки потенциала может, например, быть следствием варьирования контактного потенциала (E_{Cl}); последний неизбежно возникает в случае

контакта двух разных растворов, особенно с различными $[Cl^-]$ [17]. Считается общепринятым, что внутрипипеточный раствор с высокой $[Cl^-]$ “обнуляет” E_{LJ} ; на первый взгляд, это должно обуславливать оптимальные условия отведения. Однако здесь необходимо вспомнить, что “взрослые” нейроны ЦНС млекопитающих характеризуются низкими уровнями Cl^- внутри клеток [14]; последние отличаются сложной структурой с разветвленным дендритным деревом. В данной ситуации использование высокой внутрипипеточной $[Cl^-]$ действительно минимизирует E_{LJ} на границе пипетка – сома клетки. Однако, с другой стороны, это вызывает появление неизвестного и некомпенсированного E_{LJ} на границе сома – дендриты; последние, вероятно, сохраняют естественную низкую концентрацию Cl^- в силу очевидных ограничений для процесса диффузии. Другим источником ошибки могут служить фиксированные внутриклеточные заряды, формирующие доннановский потенциал; данный потенциал, однако, минимизируется при использовании низкой внутриклеточной $[Cl^-]$ [18]. Таким образом, в силу вышперечисленного наиболее обоснованным и физиологичным представляется использование внутрипипеточного раствора с низкой $[Cl^-]$. Возможность появления ошибки оценки потенциала была частично проверена в условиях регистрации порога активации K_A (в дополнение к его инактивации), однако данный порог был одинаков в разных условиях регистрации (рис. 3, В). Это позволяет предположить наличие специфического действия внутриклеточного Cl^- на инактивационные свойства K_A . Такое объяснение представляется наиболее вероятным. И в-третьих, задержка генерации ПД может появляться в результате некоего пока неизвестного дополнительного процесса, зависящего от потенциала.

Представленные данные позволяют предполагать, что K_A является причиной задержки генерации импульсов и её потенциалзависимости в НЗГ, однако возможная роль внутриклеточного Cl^- в инактивации K_A нуждается в дальнейшем изучении.

И. В. Мельник¹

ПОТЕНЦІАЛЗАЛЕЖНІСТЬ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ ЗАТРИМАНОЇ ГЕНЕРАЦІЇ В ЖЕЛАТИНОЗНІЙ СУБСТАНЦІЇ ЩУРА

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

Резюме

Нейрони желатинозної субстанції (ЖС) спинного мозку за характером генерації потенціалів (ПД) підрозділяють на три основних типи: тонічні, такі, що адаптуються, та із затриманою генерацією (НЗГ). Зроблено припущення, що затримана ініціація ПД у НЗГ пов'язана з активацією підпорогового калієвого струму А-типу (K_A). Ця гіпотеза перевірялась у даній роботі за допомогою порівняння потенціалзалежностей вказаної затримки та процесу стаціонарної інактивації K_A в експериментах на зрізах спинного мозку три-п'ятиденних щурів. Затримка генерації ПД зменшувалась у разі деполяризації мембрани досліджуваних НЗГ і зникала при ~ -60 мВ; генерація ПД зазначеними нейронами ставала тонічною або такою, що адаптувалась. Це добре корелювало з інактивацією K_A (в умовах відведення від цілої клітини з низькою $[Cl^-]$ у внутрішньоклітинному розчині). Досліджуваний струм зменшувався майже до нуля при -60 мВ; потенціал половинної інактивації ($V_{1/2}$) складав ~ -74.5 мВ. Однак в умовах використання внутрішньоклітинного розчину з високою $[Cl^-]$ між потенціалзалежностями затримки генерації ПД та інактивації K_A спостерігалась різниця ~ 10 мВ; остання залежність зміщувалась у бік негативних значень ($V_{1/2} \sim -88.3$ мВ). Ці результати дозволяють припустити, що наявність K_A в НЗГ та характер його інактивації є основною причиною затримки генерації ПД та її чутливості до потенціалу, однак вплив внутрішньоклітинного Cl^- на інактивацію K_A потребує додаткового вивчення.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. В. Мельник, “Физиологические типы нейронов желатинозной субстанции спинного мозга крысы”, *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **40**, № 3, 191-198 (2008).
2. T. J. Grudt and E. R. Perl, “Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn,” *J. Physiol.*, **540**, 189-207 (2002).
3. J. A. Lopez-Garcia and A. E. King, “Membrane properties of physiologically classified rat dorsal horn neurons *in vitro*: correlation with cutaneous sensory afferent input,” *Eur. J. Neurosci.*, **6**, 998-1007 (1994).
4. R. Ruscheweyh and J. Sandkuhler, “Lamina-specific and discharge properties of rat spinal dorsal horn neurons *in vitro*,” *J. Physiol.*, **541**, 231-244 (2002).

5. M. Yoshimura and T. M. Jessell, "Membrane properties of rat substantia gelatinosa neurons *in vitro*," *J. Neurophysiol.*, **62**, 109-118 (1989).
6. I. V. Melnick, "Morphophysiological properties of delayed firing neurons in substantia gelatinosa of the rat spinal cord," *Фізіол. журн.*, **55**, № 2, 44-49 (2009).
7. Y. Lu and E. R. Perl, "Modular organization of excitatory circuits between neurons of the spinal superficial dorsal horn (laminae I and II)," *J. Neurosci.*, **25**, 3900-3907 (2005).
8. S. F. Santos, S. Rebelo, V. A. Derkach, and B. V. Safronov, "Excitatory interneurons dominate in sensory processing in the spinal substantia gelatinosa of rat," *J. Physiol.*, **581**, 241-254 (2007).
9. I. V. Melnick, S. F. Santos, K. Szocol, et al., "Ionic basis of tonic firing in spinal substantia gelatinosa neurons of rat," *J. Neurophysiol.*, **91**, 646-655 (2004).
10. I. V. Melnick, S. Santos, and B. V. Safronov, "Mechanism of spike frequency adaptation in substantia gelatinosa neurons of rat," *J. Physiol.*, **559**, 383-395 (2004).
11. S. Santos, I. V. Melnick, and B. V. Safronov, "Selective postsynaptic inhibition of tonic-firing neurons in substantia gelatinosa by μ -opioid agonist," *Anesthesiology*, **101**, 1177-1183 (2004).
12. R. Bardoni and O. Beluzzi, "Kinetic study and numerical reconstruction of A-type current in granule cells in rat cerebellar slices," *J. Neurophysiol.*, **69**, 2222-2231 (1993).
13. H. H. Jerng, P. J. Pfaffinger, and M. Covarubias, "Molecular physiology and modulation of somatodendritic A-type potassium channels," *Mol. Cell. Neurosci.*, **27**, 343-369 (2004).
14. V. Stein, I. Hermans-Borgmeyer, T. J. Jentsch, and C. A. Hubner, "Expression of the KCl cotransporter KCC2 parallels neuronal maturation and the emergence of low intracellular chloride," *J. Comp. Neurol.*, **468**, 57-64 (2004).
15. R. R. Llinas, "The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function," *Science*, **242**, 1654-1664 (1988).
16. R. Shibata, K. Nakahira, K. Shibasaki, et al., "A-type K⁺ current mediated by the Kv4 channel regulates the generation of action potential in developing cerebellar granule cells," *J. Neurosci.*, **20**, 4145-4155 (2000).
17. P. H. Barry and J. W. Lynch, "Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis," *J. Membrane Biol.*, **121**, 101-117 (1991).
18. R. Horn and A. Marty, "Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method," *J. Gen. Physiol.*, **92**, 145-159 (1988).