



УДК 612.826.4

ОСОБЕННОСТИ МОДУЛЯЦИИ РЕГУЛЯРНОЙ И НЕРЕГУЛЯРНОЙ СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНОМ



М. А. Ткачева, С. Д. Карян, Е. М. Инюшкина, А. Н. Инюшкин

Маргарита Андреевна Ткачева, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева, tkachevara@mail.ru

Сона Давидовна Карян, аспирант кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева, sona.karyan@mail.ru

Елена Михайловна Инюшкина, кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева, inyushkina@mail.ru

Алексей Николаевич Инюшкин, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, Самарский национальный исследовательский университет имени академика С. П. Королева, ainyushkin@mail.ru

Супрахиазматическое ядро, генерирующее биологические циркадианные ритмы млекопитающих и человека, содержит большое количество нейронов, продуцирующих аргинин-вазопрессин. В экспериментах *in vitro* на срезах гипоталамуса крыс выполнен сравнительный анализ влияния 20 нМ аргинин-вазопрессина на параметры спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра с регулярной ($n = 23$) и нерегулярной ($n = 28$) активностью. Аппликации вазопрессина приводили к росту частоты генерации потенциалов действия у нейронов обеих групп, однако процент клеток с нерегулярной активностью, ответивших на воздействие, оказался более высоким: частота генерации спайков под влиянием вазопрессина возросла у 64,3% нейронов с нерегулярной и 21,7% нейронов с регулярной активностью. Данные реакции активности нейронов также характеризовались снижением степени нерегулярности генерации спайков, в качестве показателя которой использовали энтропию логарифма распределения межспайковых интервалов. Воздействие вазопрессина, однако, не приводило к изменениям обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами, что свидетельствует об отсутствии существенного влияния данного пептида на степень паттернирования информации в спайковом коде исследуемых клеток. Полученные результаты указывают на способность аргинин-вазопрессина модулировать активность нейронов супрахиазматического ядра. Преимущественное влияние вазопрессина на нейроны с нерегулярной активностью указывает на то, что для проявления его эффектов необходима интактность синаптических афферентных входов. В то же время относительно слабое влияние вазопрессина на клетки с регулярной активностью делает маловероятным реализацию эффектов пептида на уровне собственных пейсмекерных механизмов генерации спайков.

Ключевые слова: аргинин-вазопрессин, супрахиазматическое ядро, циркадианный осциллятор, спайковая активность, потенциалы действия, кодирование информации, биологические ритмы.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-86-90

Введение

Супрахиазматическое ядро, отвечающее за биологические ритмы млекопитающих и человека, отличается разнообразием нейронов, входящих в его состав, и их химическими свойствами. Нейропептидом, наиболее широко распространенным в супрахиазматическом ядре, является аргинин-вазопрессин, который продуцируется примерно третью расположенных здесь клеток. Кроме того, в данном ядре выявлена высокая доля нейронов (более 40%), осуществляющих процессинг специфических для этого пептида рецепторов V1a [1, 2]. Эти данные косвенно указывают на важность роли вазопрессинергических структур в функции циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра, однако механизмы физиологической активности аргинин-вазопрессина на уровне данного гипоталамического ядра изучены недостаточно.

Исследования *in vivo* и *in vitro* показывают функциональную важность локальной вазопрессинергической сигнализации. Аксоны многих вазопрессинергических клеток проецируются местно в пределах супрахиазматического ядра, заполняя медиальную, дорсальную и латеральную его части, а также следуют в вентральную часть ядра [3]. Локальное высвобождение вазопрессина в супрахиазматическом ядре продемонстрировано с помощью техники микродиализа, при этом выход вазопрессина из аксонных терминалей может дополняться высвобождением этого пептида из дендритов и тел нейронов [4,5]. Установлено, что важнейшая функция аргинин-вазопрессина, местно высвобождающегося в супрахиазматическом ядре, заключается в синхронизации активности нейронов циркадианного осциллятора [6].

В наших предыдущих исследованиях спайковой активности нейронов циркадианного осциллятора было продемонстрировано наличие у преобладающего числа клеток регулярной либо нерегулярной активности [7]. Данные типы спайковой активности различаются не только частотой генерации потенциалов действия, но и параметрами импульсного кодирования информации – энтропией распределения межспайковых



интервалов, являющейся показателем неоднородности их продолжительности, и обоюдной информацией между сопряжёнными межспайковыми интервалами, отражающей степень паттернирования спайковой информации [7–9]. Основной задачей настоящего исследования был сравнительный анализ модулирующего влияния аргинин-вазопрессина на нейроны супрахиазматического ядра с регулярной и нерегулярной активностью.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар массой тела 80 – 140 г в возрасте 4–6 недель. Экспериментальный протокол был согласован с комиссией по биологической этике Самарского национального исследовательского университета им. академика С. П. Королёва. Животных содержали в условиях свободного доступа к пище и воде при режиме освещения в виде регулярной смены 12-часовых светлых и тёмных периодов.

В начале эксперимента крыс анестезировали уретаном (1.2 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировали. Головной мозг извлекали из полости черепа, охлаждали в искусственной цереброспинальной жидкости при температуре 1–3 °С, а затем с помощью вибратора готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, включающие супрахиазматическое ядро. Срезы по меньшей мере в течение часа инкубировали в насыщенной кислородом искусственной цереброспинальной жидкости при температуре 37 °С вплоть до начала регистрации. Для регистрации спайковой активности нейронов срезы переносили в камеру из органического стекла и перфузировали с постоянной скоростью 1,5 мл/мин с помощью перистальтической помпы. Регистрацию производили при температуре 27–30 °С.

Спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра регистрировали внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных искусственной цереброспинальной жидкостью для перфузии среза. Сигнал от микроэлектрода усиливали и подавали на персональный компьютер. После появления спайковой активности наблюдали за ней в исходном состоянии не менее 10 мин, чтобы убедиться в стабильности частоты генерации потенциалов действия. При отсутствии видимого тренда к нарушению постоянства этого показателя перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением 20 нМ аргинин-вазопрессина на 10 мин, а затем возвращались к исходному раствору для

«отмывания» среза от исследуемого вещества. Продолжительность «отмывания» составляла 15 мин. С целью исключения возможной десенситизации на каждый срез производили однократную аппликацию аргинин-вазопрессина.

Для выяснения эффектов аргинин-вазопрессина сравнивали значение параметров спайковой активности в течение двух пятиминутных интервалов времени: в исходном состоянии (непосредственно перед аппликацией пептида), и в конце периода аппликации. Нейронами, реагирующими на воздействие аргинин-вазопрессина, считались лишь те, у которых частота генерации спайков изменялась под влиянием этого вещества не менее чем на 20% от исходной [10]. Далее анализировали исследуемые параметры в течение заключительного пятиминутного периода «отмывания» среза и делали вывод о степени восстановления исходной активности нейрона. Для сравнения значений исследуемых показателей в ходе экспериментальных воздействий с исходным состоянием использовали парный *t*-тест, для сравнения доли в выборке – *z*-тест. Статистические данные представлены как средние арифметические ± стандартные ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты и их обсуждение

В ходе экспериментов в супрахиазматическом ядре обнаружено 23 нейрона с регулярным типом спайковой активности. Регулярная активность характеризовалась высокой частотой генерации спайков ($4,17 \pm 0,30 \text{ с}^{-1}$) в сочетании со стабильной короткой продолжительностью межспайкового интервала. Высокая степень регулярности генерации потенциалов действия нейронами данного типа выражалась, в частности, в низком значении энтропии распределения межспайковых интервалов, которая равнялась $5,56 \pm 0,14$ бит. Значение обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами у клеток с регулярной активностью оказалось равным $0,034 \pm 0,014$ бит, что указывает на низкий уровень паттернирования информации в нейронном коде данных клеток.

У 28 нейронов супрахиазматического ядра зарегистрирован нерегулярный тип активности. Последний характеризовался непостоянством межспайковых интервалов, наличием коротких периодов высокочастотной активности и редких непродолжительных (до 10 с) пауз. Нерегулярная активность отличалась низким, по сравнению с регулярной, значением частоты генерации потенциалов действия ($2,21 \pm 0,29 \text{ с}^{-1}$) и высоким

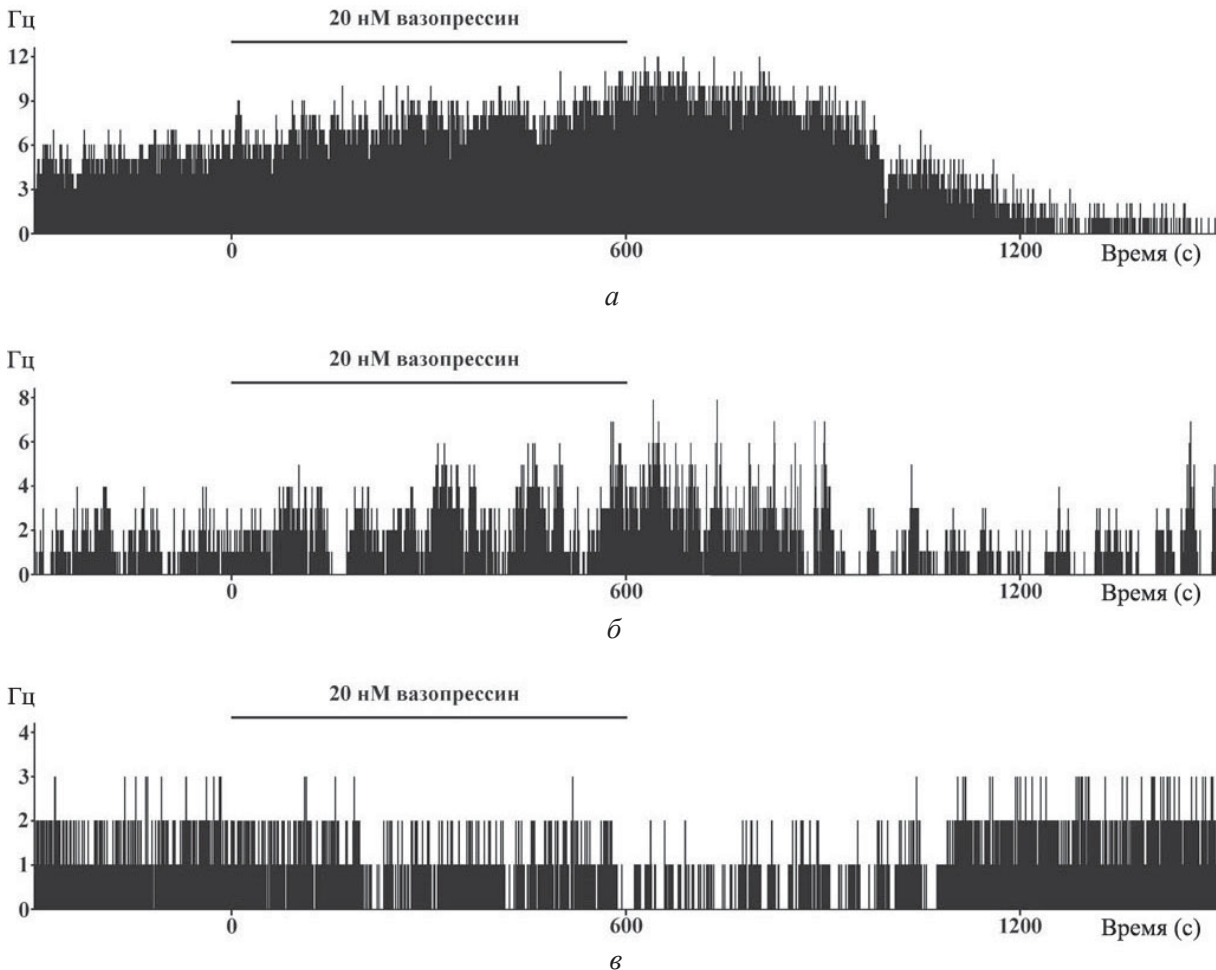


значением энтропии распределения межспайковых интервалов ($7,03 \pm 0,08$ бит). Обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов с нерегулярной активностью оказалась равной $0,069 \pm 0,019$ бит, что указывает на высокую степень паттернирования информации в спайковом коде этих клеток.

Преобладающими по численности реакциями на аппликацию 20 нМ аргинин-вазопрессина в перфузионный раствор были ответы в виде повышения средней частоты генерации потенциалов действия. Такие реакции возникали у 18 (64,3%) нейронов с нерегулярной и у 5 (21,7%) нейронов с регулярной активностью (рисунок). При этом частота спайков у данных групп нейронов возросла соответственно на $1,74 \pm 0,39 \text{ с}^{-1}$ ($p < 0,001$, парный t -тест) и на $2,22 \pm 0,73 \text{ с}^{-1}$ ($p = 0,038$, парный t -тест). Важно заметить,

что процент реакций данного типа у нейронов с нерегулярной активностью оказался выше ($p = 0,006$, z -тест). В то же время у 3 (10,7%) нейронов с нерегулярной активностью под действием аргинин-вазопрессина наблюдалось снижение частоты генерации спайков, тогда как у клеток с регулярной активностью подобных реакций не зарегистрировано. В целом процент нейронов с нерегулярной активностью, прореагировавших на воздействие аргинин-вазопрессина, был выше, чем у нейронов с регулярной активностью: соответственно 75 и 21,7% ($p < 0,001$, z -тест).

Реакции в виде роста частоты спайковой активности у нейронов с нерегулярной активностью сопровождались снижением энтропии распределения межспайковых интервалов на $0,34 \pm 0,12$ бит ($p = 0,012$, парный t -тест). У нейронов с регулярной активностью подобных измене-



Примеры реакций возбуждения у нейронов супрахиазматического ядра с исходной регулярной (а) и нерегулярной (б) активностью и реакции торможения у нейрона с исходной нерегулярной активностью (е) на аппликацию 20 нМ аргинин-вазопрессина. Представлены гистограммы с данными об изменениях уровня спайковой активности нейрона по ходу эксперимента. Период аппликации аргинин-вазопрессина показан горизонтальным отрезком над гистограммой. По оси абсцисс – время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат – частота генерации спайков (с^{-1})



ний энтропии не наблюдалось и значение этого параметра уменьшилось лишь незначительно (на $0,09 \pm 0,24$ бит; $p = 0,714$, парный t -тест). Таким образом, под действием аргинин-вазопрессина степень неоднородности межспайковых интервалов уменьшилась лишь у клеток с нерегулярной активностью. Рост уровня активности нейронов, наблюдавшийся при воздействии аргинин-вазопрессина, не приводил к изменениям обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами, несмотря на тенденцию к росту. У нейронов с регулярной активностью значение данного показателя под действием пептида повысилось лишь на ($0,044 \pm 0,040$ бит; $p = 0,279$, парный t -тест), а у нейронов с нерегулярной активностью – на ($0,070 \pm 0,040$ бит; ($p = 0,157$, парный t -тест). Эти данные свидетельствуют об отсутствии существенных изменений спайкового паттернинга у клеток обеих исследуемых групп.

У оставшихся 18 нейронов с регулярной активностью и 7 нейронов с нерегулярной активностью существенных изменений уровня спайковой активности после аппликации 20 нМ аргинин-вазопрессина не обнаружено.

В ходе экспериментов также определяли степень обратимости реакций спайковой активности на воздействие аргинин-вазопрессина путём сравнения значений исследуемых показателей в конце 15-минутного периода «отмывания» среза с исходной активностью. Статистически значимых различий между параметрами спайковой активности в исходном состоянии и после «отмывания» выявить не удалось, что указывает на полное или частичное восстановление исходной активности и обратимость реакций на воздействие пептида.

В целом результаты настоящего исследования *in vitro* показывают, что аргинин-вазопрессин при непосредственном воздействии способен модулировать уровень активности и оказывать влияние на спайковый код популяции нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра. Учитывая обилие локальных проекций вазопрессинергических нейронов, полученные результаты раскрывают электрофизиологические особенности синхронизирующего влияния аргинин-вазопрессина, реализующегося в пределах супрахиазматического ядра. Полученные результаты позволяют охарактеризовать особенности стимулирующего влияния аргинин-вазопрессина на нейроны супрахиазматического ядра с регулярной и нерегулярной активностью. Существенно, что количество нейронов с нерегулярной активностью,

ответивших на воздействие пептида, оказалось более высоким; при этом реакции клеток данного типа сопровождались снижением энтропии распределения межспайковых интервалов. Это свидетельствует о существовании связи между типом активности нейронов биологического осциллятора и характером реакции на аргинин-вазопрессин.

Тип активности нейронов (регулярный или нерегулярный) в значительной степени определяется соотношением собственных клеточных механизмов пейсмекерной активности и синаптических механизмов её модуляции. Первые проявляются в регулярной активности нейрона, тогда как синаптические воздействия вносят в спайковый код элемент нерегулярности, вызывая рост энтропии распределения межспайковых интервалов. Преимущественное влияние аргинин-вазопрессина на нейроны с нерегулярной активностью указывает на то, что для полноты проявления эффектов этого пептида необходима интактность синаптических афферентных входов. В то же время полученные данные позволяют предполагать, что аргинин-вазопрессин слабо влияет на собственные пейсмекерные механизмы генерации спайков, что нашло выражение в существенно меньшем проценте нейронов с регулярной активностью, ответивших на воздействие.

Заключение

1. Аргинин-вазопрессин вызывает преимущественно стимулирующее влияние на уровень спайковой активности значительной части нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*.
2. Доля нейронов супрахиазматического ядра с нерегулярной активностью, реагирующих на стимулирующее воздействие аргинин-вазопрессина, существенно выше, чем доля нейронов с регулярной активностью.
3. Реакции нейронов с нерегулярной активностью характеризуются снижением энтропии распределения межспайковых интервалов, что свидетельствует о влиянии аргинин-вазопрессина не только на уровень активности данного типа клеток, но и на параметры спайкового кодирования информации.
4. Для полноты проявления эффектов аргинин-вазопрессина необходима интактность синаптических афферентных входов к нейронам циркадианного осциллятора.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-44-630632-р_а) и Правительства Самарской области.



Список литературы

1. Moore R. Y., Speh J. C., Leak R. K. Suprachiasmatic nucleus organization // *Cell Tissue Res.* 2002. Vol. 309. P. 89–98.
2. Kalamatianos T., Kallo I., Coen C. W. Ageing and the diurnal expression of the mRNAs for vasopressin and for the V1a and V1b vasopressin receptors in the suprachiasmatic nucleus of male rats // *J. Neuroendocrinol.* 2004. Vol. 16. P. 493–501.
3. Morin L. P., Shivers K.-Y., Blanchard J. H., Muscat L. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus // *Neuroscience.* 2006. Vol. 137. P. 1285–1297.
4. Kubota M., Landgraf R., Wotjak C. T. Release of vasopressin within the rat suprachiasmatic nucleus: no effect of a V1/V2 antagonist // *Neuroreport.* 1996. Vol. 7. P. 1933–1936.
5. Castel M., Morris J., Belenky M. Non-synaptic and dendritic exocytosis from dense-cored vesicles in the suprachiasmatic nucleus // *Neuroreport.* 1996. Vol. 7. P. 543–547.
6. Maywood E. S., Chesham J. E., O'Brien J. A., Hastings M. H. A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108. P. 14306–14311.
7. Инюшкин А. Н., Петрова А. А., Ткачева М. А., Инюшкина Е. М. Влияние нейропептида Y на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro* // *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 2015. № 101 (11). С. 1257–1269.
8. Bhumbra G. S., Inyushkin A. N., Dyball R.E.D. Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus // *J. Neuroendocrinol.* 2004. Vol. 16. P. 390–397.
9. Bhumbra G. S., Inyushkin A. N., Saeb-Parsy K., Hon A., Dyball R.E.D. Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus // *J. Physiol.* 2005. Vol. 653. P. 291–307.
10. Brown T. M., Coogan A. N., Cutler D. J., Hughes A. T., Piggins H. D. Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons *in vitro* // *Neurosci. Lett.* 2008. Vol. 448. P. 273–278.

Peculiarities of Modulation by Arginine-vasopressin the Regular and Non-Regular Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurons

M. A. Tkacheva, S. D. Karyan,
E. M. Inyushkina, A. N. Inyushkin

Margarita A. Tkacheva, ORCID 0000-0002-8961-9090, Samara National Research University named after Academician S. P. Korolev, 34, Moskovskoe Shosse, Samara, 443086, Russia, tkachevara@mail.ru

Sona D. Karyan, ORCID 000-0002-8550-4130, Samara National Research University named after Academician S. P. Korolev, 34, Moskovskoe Shosse, Samara, 443086, Russia, sona.karyan@mail.ru

Elena M. Inyushkina, ORCID 0000-0002-3390-962X, Samara National Research University named after Academician S. P. Korolev, 34, Moskovskoe Shosse, Samara, 443086, Russia, inyushkina@mail.ru

Alexey N. Inyushkin, ORCID 0000-0002-3678-2636, Samara National Research University named after Academician S. P. Korolev, 34, Moskovskoe Shosse, Samara, 443086, Russia, ainyushkin@mail.ru

The suprachiasmatic nucleus generating biological circadian rhythms in mammals and humans, contains a high proportion of neurons, producing arginine-vasopressin. In *in vitro* experiments on hypothalamic slices of rats, the comparative analysis of the effect of 20 nM arginine-vasopressin on the spike activity parameters of neurons with regular ($n=23$) and irregular ($n=28$) activity in the suprachiasmatic nucleus was performed. The application of vasopressin induced an increase in the spike frequency in neurons of both groups, but the percentage of cells with irregular activity, responding to the peptide, turned out to be higher: during the administration of vasopressin, firing frequency increased in 64,3% neurons with irregular and 21,7% neurons with regular activity. The responses of neuronal activity were also characterised by a decrease in irregularity of spike generation as reflected in entropy of log distribution of interspike intervals. Vasopressin though did not induce changes in the mutual information between the joined interspike intervals, suggesting a lack of significant effect of the peptide on a degree of information patterning in spike code of cells investigated. The data obtained indicate the ability of arginine-vasopressin to modulate the activity of neurons in the suprachiasmatic nucleus. The primary effect of vasopressin on neurons with irregular activity suggests necessity of intact synaptic afferent inputs for manifestation of the effects. At the same time, respectively weak influence of vasopressin on the activity of cells with regular activity makes unlikely implementation of the peptide effects at the level of own pacemaker mechanisms of spike generation.

Key words: arginine-vasopressin, suprachiasmatic nucleus, circadian oscillator, spike activity, action potentials, information coding, biological rhythms.

Образец для цитирования:

Ткачева М. А., Карян С. Д., Инюшкина Е. М., Инюшкин А. Н. Особенности модуляции регулярной и нерегулярной спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра аргинин-вазопрессином // *Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* 2018. Т. 18, вып. 1. С. 86–90. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-86-90.

Cite this article as:

Tkacheva M. A., Karyan S. D., Inyushkina E. M., Inyushkin A. N. Peculiarities of Modulation by Arginine-vasopressin the Regular and Non-Regular Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurons. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 1, pp. 86–90 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-86-90.