

УДК 611.814.1

ОСОБЕННОСТИ СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА¹

© 2013 А.Н. Инюшкин, К.А. Мистрюгов²

На переживающих срезах гипоталамуса крыс исследованы особенности спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*. Выявлены 4 различных типа активности: регулярная, нерегулярная, залповая и низкая. Обсуждаются возможные механизмы генерации данных типов активности.

Ключевые слова: супрахиазматическое ядро, циркадианные ритмы, нейроны, спайковая активность.

Введение

Среди большого количества разнообразных биологических ритмов наибольший биологический интерес представляют циркадианные (околосуточные) ритмы, характеризующиеся одинаковым периодом — около 24 часов. Примерами циркадианных ритмов являются ежесуточные циклы сна/бодрствования, изменения температуры тела, секреции кортизола и многих других гормонов, частоты сердечных сокращений, артериального давления, дыхания и др. Циркадианные ритмы являются внешними проявлениями активности нейронов супрахиазматического ядра гипоталамуса.

Особенности структурно-функциональной организации супрахиазматического ядра подробно изучены на грызунах. Установлено, что это небольшое парное ядро содержит около 20 000 нейронов [1] и отличается широким разнообразием продуцируемых ими нейромедиаторов и нейромодуляторов, среди которых наиболее часто встречается ГАМК [13]. Кроме последней, нейроны супрахиазматического ядра продуцируют многочисленные нейропептиды: аргинин-вазопрессин, вазоактивный интестинальный полипептид, гастрин-релизинг пептид, соматостатин, тахикинины, ангиотензин II, энкефалины, нейротензин, калретинин, калбайдин [2; 6; 14; 16; 18].

Для понимания физиологических механизмов, лежащих в основе функциональной активности циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра, особый интерес представляет биоэлектрическая активность расположенных здесь нейронов. Исследования *in vivo* выявили значительное количество клеток, обладающих

¹Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-00653а и 13-04-97000-р_поволжье_а.

²Инюшкин Алексей Николаевич (ainyushkin@mail.ru), Мистрюгов Константин Алексеевич (Mistryugov@yandex.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

спонтанной активностью. Было установлено, что уровень спайковой активности большинства нейронов супрахиазматического ядра демонстрирует ритмические колебания с околосуточным периодом, повышаясь в дневное время и снижаясь в ночные часы [8; 12; 17]. При этом в подавляющем большинстве работ, посвященных анализу спайковой активности, в качестве основного исследуемого параметра использована частота генерации потенциалов действия. В то же время крайне недостаточно изучены другие аспекты электрической активности этих клеток. В ходе реализации совместной с коллегами из университета Кембриджа (Великобритания) программы научных исследований нами был предложен новый подход к анализу спайкового кода, основанный на теории информации. Было продемонстрировано, что в качестве параметров, характеризующих кодирование информации нейронами гипоталамуса, могут успешно использоваться энтропия логарифма межспайковых интервалов как мера нерегулярности спайковой активности и обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами как мера выраженности паттерна [3–5; 9; 10]. В настоящей статье описаны особенности спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра *in vitro* в переживающих срезах гипоталамуса крыс, изученные с использованием данного подхода к анализу экспериментальных данных.

Методика проведения эксперимента

Исследования выполнены на 11 белых лабораторных крысах-самцах массой тела 85–130 г. Экспериментальный протокол был согласован с комиссией по биологической этике Самарского государственного университета. Животных наркотизировали уретаном (1,3 г/кг массы тела внутривенно), декапитировали. С помощью вибротома Vibroslice NVSL (США) при температуре около +2 °С готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 350 мкм, содержащие супрахиазматическое ядро. Срезы помещали в раствор следующего состава: NaCl — 124 мМ, NaHCO₃ — 25 мМ, KCl — 3 мМ, CaCl₂ — 1,5 мМ, MgSO₄ — 1 мМ, NaH₂PO₄ — 0,5 мМ, D-глюкоза — 30 мМ. В этом растворе срезы инкубировали при температуре 37 °С по меньшей мере в течение часа до начала регистрации. Раствор насыщали карбогеном (95 % кислорода и 5 % углекислого газа). В ходе регистрации срезы перфузировали раствором того же состава с постоянной скоростью 1,5 мл/мин с помощью перистальтической помпы Gilson Minipuls 3 (Франция).

Установка для внеклеточной регистрации активности нейронов была смонтирована на антивибрационном столике (Vibration-Free Workstation, США) и включала перфузионную камеру, масляный микроманипулятор и микроскоп (МБС-12, Россия). Регистрацию производили стеклянными микроэлектродами, заполненными раствором для перфузии. Сигнал с микроэлектрода подавали на вход усилителя биопотенциалов (2400А, Dagan, США), затем блокировали шум частотой 50 Гц с помощью устройства HumBag 50/60 Hz Noise Eliminator (Quest Scientific, Канада), отцифровывали при помощи АЦП Micro 1401 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) и регистрировали на персональном компьютере. Для регистрации, обработки и хранения данных использовали программу Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Великобритания).

В качестве основного показателя спайковой активности нейронов использовали "традиционный" параметр, позволяющий оценить уровень активности клеток — среднюю частоту генерации потенциалов действия. Дополнительно в ходе обработки данных применяли метод анализа нейронного кода, основанный на теории

информации [3–5; 9; 10]. Данный метод позволяет выполнить параметрическую оценку основных показателей спайкового кодирования информации — регулярности генерации спайков и степени паттернирования спайковой информации. Он основан на расчете двух показателей — энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке. При анализе данных использовали тест ANOVA, который дополняли тестом Холма-Сайдака (Holm-Sidak test) для попарного сравнения значений исследуемых параметров у нейронов разных типов. В случае несоответствия данных нормальному распределению использовали ранговый тест ANOVA, а для попарного сравнения значений параметров у нейронов разных типов использовали тест Таки (Tukey test). Нормальность распределения данных в выборках проверяли с помощью теста Колмогорова — Смирнова, однородность дисперсий — с помощью теста Левена. Все данные, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние арифметические \pm стандартные ошибки среднего, в остальных случаях — как медианы.

Результаты исследования

Внеклеточная микроэлектродная регистрация биоэлектрической активности нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro* позволила определить основные особенности спайковой активности расположенных здесь клеток. Всего было зарегистрировано 37 нейронов супрахиазматического ядра.

В целом для всей группы зарегистрированных нейронов медиана средней частоты генерации потенциалов действия составила $1,52 \text{ с}^{-1}$. Энтропия распределения межспайковых интервалов для этих нейронов составила $6,558 \pm 0,158$ бит; медиана обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами равнялась $0,030$ бит. Анализ особенностей спайковой активности позволил выделить 4 различных типа нейронов супрахиазматического ядра, характерные примеры которых представлены на рисунке.

У 13 из 37 зарегистрированных нейронов (35,1 %) был выявлен регулярный тип активности. Наиболее характерными признаками такой активности была высокая, по сравнению с другими типами нейронов, частота генерации потенциалов действия ($3,75 \pm 0,60 \text{ с}^{-1}$) в сочетании с относительно стабильной продолжительностью межспайковых интервалов и полным отсутствием заметных пауз между соседними спайками (рис., а). Высокая, "монотонная" регулярность генерации спайков клетками данного типа выражалась, в частности, в самом низком среди всех типов нейронов значении энтропии распределения межспайковых интервалов — $5,570 \pm 0,196$ бит. Медиана обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами у нейронов данного типа оказалась равной нулю, что свидетельствует об отсутствии заметных признаков спайкового паттернирования информации.

В 4 случаях из 37 (10,8 %) наблюдалась залповая активность нейронов, которая характеризовалась чередованиями периодов активности (залпов) и продолжительных пауз. При этом продолжительность залпов активности составляла от нескольких секунд до минуты, а паузы между залпами — от 4–5 до 40 секунд (рис., б). Одним из наиболее характерных отличительных признаков активности залповых нейронов было наивысшее среди всех типов клеток значение медианы

ны обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами ($0,122 \pm 0,036$ бит), что указывает на высокую способность паттернирования спайковой информации в нейронном коде. Также относительно высоким оказалось значение энтропии распределения межспайковых интервалов ($7,044 \pm 0,177$ бит), что является признаком нерегулярной генерации спайков нейронами этого типа. В то же время активность клеток данного типа характеризовалась относительно невысокой частотой генерации потенциалов действия — $1,93 \pm 0,82$ с⁻¹.

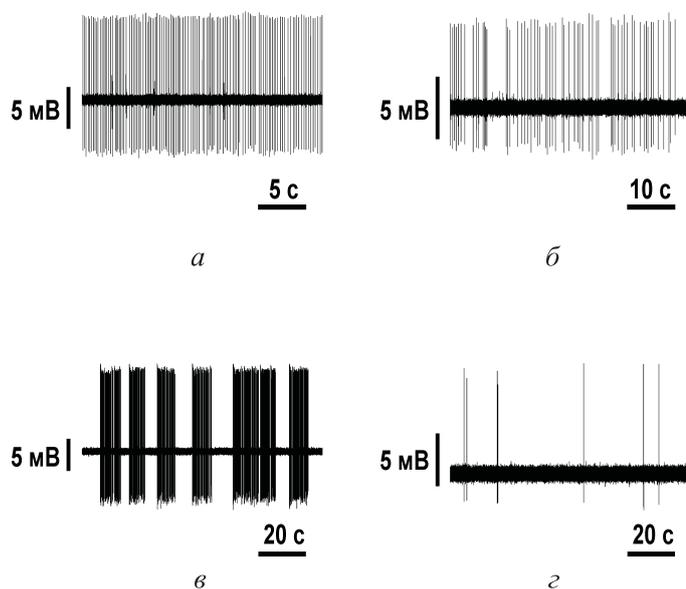


Рис. Типы спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*: а — регулярная; б — нерегулярная; в — залповая; г — низкая. Слева от каждой нейрограммы — калибровка по амплитуде (5 мВ), внизу — калибровка по времени

Наиболее часто встречающимся типом активности нейронов супрахиазматического ядра, который был зарегистрирован у 16 из 37 клеток (43,2 %), оказался нерегулярный тип спайковой активности. Он характеризовался непостоянством межспайковых интервалов, наличием коротких периодов высокочастотной активности и редких непродолжительных пауз, длительность которых, как правило, не превышала 10 с (рис., б). Нейроны данного типа демонстрировали умеренные значения частоты генерации спайков и энтропии распределения межспайковых интервалов: соответственно $1,98 \pm 0,34$ с⁻¹ и $6,950 \pm 0,145$ бит. Медиана обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами также оказалась относительно невелика $0,041$ бит.

Наконец, 4 из 37 зарегистрированных клеток (10,8 %) были отнесены к нейронам с низкой активностью (рис., г). Наиболее характерным признаком таких клеток была низкая частота генерации потенциалов действия: $0,15 \pm 0,07$ с⁻¹. Другими характерными отличительными признаками клеток с низкой активностью оказались наивысшее среди всех типов клеток значение энтропии распределения межспайковых интервалов ($7,734 \pm 0,157$ бит) и отсутствие обоюдной информации между сопряженными межспайковыми интервалами (у всех 4 нейронов значение

этого показателя равнялось нулю). Таким образом, спайковый код этих клеток отличался высокой нерегулярностью генерации потенциалов действия и отсутствием признаков паттернирования информации.

Обсуждение результатов

В ходе настоящей работы *in vitro* были охарактеризованы особенности спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра, в котором локализован циркадианный осциллятор организма млекопитающих. При этом применялся новый подход к анализу спайковой активности, позволивший оценить не только уровень активности клеток, но и степень регулярности генерации ими потенциалов действия и степень паттернирования информации. Использование данного подхода дало возможность выявить 4 различных типа нейронов по характеру их спайковой активности: нейроны с регулярной, нерегулярной, залповой и низкой активностью. При этом установлена существенно неодинаковая частота встречаемости клеток различных типов и значительные различия как в среднем уровне их активности, так и в степени регулярности генерации спайков и в способности к паттернингу в нейронном коде.

Наиболее часто встречались клетки с нерегулярной (43,2 %) и регулярной (35,1 %) активностью, тогда как нейроны с залповой и низкой активностью встречались значительно реже: оба типа — в 10,8 % случаев. Средняя частота генерации потенциалов действия оказалась максимальной у нейронов с регулярной активностью и минимальной — у клеток с низкой активностью. Энтропия распределения межспайковых интервалов, характеризующая нерегулярность генерации спайков, была высокой у нейронов с залповой и особенно с низкой активностью, тогда как низкие значения этого показателя обнаружены у нейронов с регулярной активностью. Обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами, отражающая способность нейронов к паттернированию спайковой информации, оказалась наивысшей у залпово-активных клеток, значительно ниже — у нейронов с нерегулярной активностью, а у остальных двух типов клеток она была равна нулю. Таким образом, способ анализа спайковой активности, использованный в работе, помогает точно классифицировать нейроны супрахиазматического ядра.

Полученные данные о некоторых типах обнаруженных нейронов близки к результатам отдельных работ *in vitro*, выполненных ранее. Так, в исследовании [7], где авторы использовали технику пэтч-клемпа, ими описаны в супрахиазматическом ядре нейроны с регулярной и нерегулярной активностью. При этом первые генерировали спайки со средней частотой $> 3,5 \text{ с}^{-1}$, а вторые — со средней частотой $< 3,5 \text{ с}^{-1}$, что соответствует результатам, полученным нами. При этом авторы не указывают частоту встречаемости нейронов каждого типа, что, возможно, объясняется небольшой выборкой исследованных клеток. Также нет упоминания о других типах активности клеток, обнаруженных в нашем исследовании. В то же время в другой работе, выполненной на анофтальмических мышах *in vitro* [11], описаны 4 типа активности нейронов супрахиазматического ядра: приблизительно 10 % зарегистрированных нейронов имели регулярную активность, около 70 % — нерегулярную активность, менее 1 % — залповую активность и около 20 % — активность в виде частых коротких залпов с интервалами между ними около 1 с. Последний тип активности, однако, не встречался у контрольных животных и также не был обнаружен в нашем исследовании. Таким образом, несмотря на

определенные черты сходства отдельных результатов, полученных в настоящем исследовании, с данными других авторов, обнаруживаются существенные различия в частоте встречаемости клеток с регулярной, нерегулярной и залповой активностью, а нейроны с низкой активностью описаны лишь в нашей работе.

Для корректной интерпретации полученных результатов ключевым является вопрос о возможных механизмах, определяющих паттерн активности нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*. В этом плане следует учитывать обилие тормозных ГАМКергических нейронов, входящих в его состав [13]. В гипоталамических срезах, в условиях резкого редуцирования количества синаптических входов к сохранившимся нейронам, оставшиеся активными синапсы способны оказывать существенное влияние на характер активности постсинаптической клетки. Вполне вероятно, что нейроны, не подвергающиеся значительному воздействию через ГАМКергические синапсы, генерируют регулярную высокочастотную активность, тогда как клетки, испытывающие периодическое торможение через такие синапсы, разряжаются нерегулярно и с меньшей частотой. Косвенные подтверждения такой возможности получены в работе [7]. Существуют и другие возможные объяснения обнаруженной нерегулярности в спайковой активности некоторых типов нейронов. В частности [15], было высказано предположение о том, что нерегулярная активность у части нейронов супрахиазматического ядра может объясняться формой следовой гиперполяризации (моно- или бифазной). Еще одно объяснение существования нескольких типов спайковой активности заключается в нейрохимическом разнообразии клеток [2; 6; 14; 16; 18]. Например, нейроны супрахиазматического ядра, продуцирующие окситоцин и вазопрессин, существенно различаются по характеру спайковой активности — тонической у первых и залповой у последних [5]. Для проверки данного предположения необходимы комплексные исследования с дополнением электрофизиологической регистрации активности нейронов их нейрохимической идентификацией.

Литература

- [1] Abrahamson E.E., Moore R.Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections // *Brain Res.* 2001. V. 916. P. 172–191.
- [2] Calbindin-D28k immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and the circadian response to constant light in the rat / A. Arvanitogiannis [et al.] // *Neuroscience.* 2000. V. 99. P. 397–401.
- [3] Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Dyball R.E.J. Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus // *J. Neuroendocrinol.* 2004. V. 16. P. 390–397.
- [4] Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / G.S. Bhumbra [et al.] // *J. Physiol.* 2005a. V. 563. P. 291–307.
- [5] Spike coding during osmotic stimulation of the rat supraoptic nucleus / G.S. Bhumbra [et al.] // *J. Physiol.* 2005b. V. 569. P. 257–274.
- [6] Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus / J.P. Card [et al.] // *Cell Tissue Res.* 1988. V. 252. P. 307–315.
- [7] Cononenko N.I., Dudek F.E. Mechanism of irregular firing of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices // *J. Neurophysiol.* 2004. V. 91. P. 267–273.

- [8] Groos G., Hendriks J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro // *Neurosci. Lett.* 1982. V. 34. P. 283–288.
- [9] Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / A.N. Inyushkin [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* 2007. V. 19. P. 671–681.
- [10] Inyushkin A.N., Bhumbra G.S., Dyball R.E.J. Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus // *J. Neuroendocrinol.* 2009. V. 21. P. 705–714.
- [11] Physiological and anatomical properties of the suprachiasmatic nucleus of an anophthalmic mouse / L.K. Laemle [et al.] // *Brain Res.* 2002. V. 953. P. 73–81.
- [12] Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats / J.H. Meijer [et al.] // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 9078–9087.
- [13] Moore R.Y., Speh J.C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system // *Neurosci. Lett.* 1993. V. 150. P. 112–116.
- [14] Morin L.P. SCN organization reconsidered // *J. Biol. Rhythms.* 2007. V. 22. P. 3–13.
- [15] Electrophysiological and morphological heterogeneity of neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus / C.M. Pennartz [et al.] // *J. Physiol.* 1998. V. 506. P. 775–793.
- [16] Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse and rat / H.D. Piggins [et al.] // *J. Comp. Neurol.* 2001. V. 438. P. 50–65.
- [17] Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice / S. Shibata [et al.] // *Brain Res.* 1982. V. 247. P. 154–158.
- [18] Van den Pol A.N., Tsujimoto K.L. Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens // *Neuroscience.* 1985. V. 15. P. 1049–1086.

Поступила в редакцию 22/III/2013;
в окончательном варианте — 22/III/2013.

THE PROPERTIES OF SPIKE ACTIVITY OF NEURONS OF SUPRACHIASMATIC NUCLEUS

© 2013 A.N. Inyushkin, K.A. Mistryugov³

On rat hypothalamic slices, the properties of spike activity of neurons of suprachiasmatic nucleus are investigated. Four different types of activity are identified: regular, irregular, bursting and low. The possible mechanisms of generation of mentioned types of activity are discussed.

Key words: suprachiasmatic nucleus, circadian rhythms, neurons, spike activity.

Paper received 22/III/2013.

Paper accepted 22/III/2013.

³Inyushkin Alexey Nikolaevich (ainyushkin@mail.ru), Mistryugov Konstantin Alexeevich (Mistryugov@yandex.ru), the Dept. of Human and Animal Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.