

## ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И НЕЙРОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА

© 2010 А.Н. Инюшкин, М.А. Киселёва, К.А. Мистрюгов, Е.М. Инюшкина

Самарский государственный университет, г. Самара

Поступила 17.06.2009

В статье рассматриваются основные электрофизиологические и нейрохимические свойства супрахиазматического ядра грызунов. Представлены литературные данные и краткий обзор собственных исследований о структуре и функции супрахиазматического ядра.

*Ключевые слова:* супрахиазматическое ядро, циркадианные ритмы, нейронная активность.

Биологические ритмы представляют собой регулярные циклы физиологической, метаболической и поведенческой активности, которые позволяют организму адекватно реагировать на воздействие различных геофизических факторов, являющихся следствием суточного вращения Земли, лунных циклов, вращения Земли вокруг Солнца. Наибольший биологический интерес представляют циркадианные ритмы, проявляющиеся в виде околосуточных циклов сон-бодрствование, изменений температуры тела, секреции гормонов, двигательной активности, частоты сердечных сокращений и др. Важно отметить, что все эти ритмы имеют одинаковый период (около 24 часов) и поддерживаются даже в отсутствие внешних «подстраивающих» факторов, таких как изменения освещённости и температуры окружающей среды. Циркадианные ритмы являются внешними проявлениями активности супрахиазматического ядра (SCN) гипоталамуса, которое выполняет функцию биологических часов у млекопитающих. Согласно существующим представлениям, сигналы, генерируемые данным ядром, регулируют физиологические и поведенческие ритмы на уровне структур ЦНС и периферических тканей.

Структурно-функциональные свойства SCN наиболее подробно исследованы на грызунах. У этих животных SCN представляет собой небольшое парное ядро, непосредственно прилегающее с дорсальной стороны к хиазме зрительных нервов и содержащее около 10 000 нейронов [1]. SCN состоит из фенотипически гетерогенных мелких (диаметр сомы 7-12 мкм) нейронов, содержащих широкий спектр нейромедиаторов и нейромодуляторов, среди которых наиболее распространённым является ГАМК [22, 25]. Морфологически в SCN выде-

ляют «ядро», расположенное в вентролатеральной части ядра, и «оболочку», включающую дорсомедиальные отделы SCN. Выделение «ядра» в SCN первоначально основывалось на результатах изучения локализации входов из сетчатки: подавляющее большинство волокон ретиногипоталамического тракта, через посредство которого в SCN поступает наиболее важная «подстраивающая» информация от фоторецепторов сетчатки, оканчивается в области «ядра». Вместе с тем обнаружены существенные различия в фенотипических свойствах нейронов «ядра» и «оболочки» [3, 6, 23]. В частности, оказалось, что последняя содержит большое количество нейронов, синтезирующих аргинин-вазопрессин [31], в то время как область «ядра» характеризуется наличием нейронов разнообразных нейрохимических фенотипов, среди которых обнаружено большое количество клеток, синтезирующих вазоактивный интестинальный полипептид и гастрин-рилизинг пептид [11]. В SCN обнаружено большое количество других нейропептидов, в частности, соматостатина, тахикининов, ангиотензина II, энкефалинов, нейротенина, калретинина, калбайндина, при этом существуют значительные межвидовые различия в пространственном распределении нейропептидов в SCN [4, 21, 27].

Особый интерес представляет характер электрической активности нейронов SCN. Исследования *in vivo* и *in vitro* выявили значительный процент клеток, обладающих спонтанной активностью. При этом, уровень спайковой активности большинства нейронов ритмически колеблется с периодом около 24 часов, повышаясь в дневное время и снижаясь в ночные часы [12, 20, 29]. В подавляющем большинстве работ, посвящённых анализу спайковой активности клеток SCN, в качестве основного исследуемого параметра использована частота генерации потенциалов действия. В то же время крайне недостаточно изучены другие аспекты электрической активности этих клеток. В наших собственных работах, выполненных в рамках совместной программы научных исследований с коллегами из университета Кэмбриджа (Великобритания) было продемонстрировано,

---

*Инюшкин Алексей Николаевич*, доктор биологических наук, заведующий кафедрой физиологии человека и животных, [ainyushkin@mail.ru](mailto:ainyushkin@mail.ru); *Киселёва Мария Александровна*, аспирант, [pantera.fox@mail.ru](mailto:pantera.fox@mail.ru); *Мистрюгов Константин Алексеевич*, аспирант, [mistryugov@yandex.ru](mailto:mistryugov@yandex.ru); *Инюшкина Елена Михайловна*, кандидат биологических наук, старший преподаватель той же кафедры, [inyushkina@mail.ru](mailto:inyushkina@mail.ru).

что в качестве параметров, характеризующих кодирование информации нейронами гипоталамуса, может успешно использоваться энтропия логарифма межспайкового интервала как мера нерегулярности спайковой активности и обоюдная информация (mutual information) между соседними межспайковыми интервалами как мера выраженности паттерна [7-9]. Нам удалось обнаружить наличие циркадианного ритма энтропии у нейронов SCN с пиком в середине субъективной ночной фазы. Интересно, что статистическая значимость ритма энтропии ( $P < 0.001$ : тест Монте-Карло) оказалась значительно выше, чем циркадианного ритма логарифма среднего межспайкового интервала – параметра, производного от средней частоты генерации спайков ( $P = 0.012$ : тест Монте-Карло). Таким образом, циркадианные изменения уровня электрической активности нейронов SCN сопровождаются выраженными изменениями регулярности генерации спайков, что может играть важную роль в регуляции паттерна высвобождения нейромедиаторов как внутри данного ядра, так и в других структурах-мишенях, иннервируемых клетками SCN.

Наряду с информацией, поступающей в SCN от фоторецепторов сетчатки, в «подстройке» уровня активности нейронов SCN важную роль играет ряд эндогенных нейроэндокринных факторов, наиболее важным среди которых считается гормон мелатонин. Недавно в нашем исследовании *in vitro* [16] на переживающих срезах гипоталамуса были продемонстрированы возможные электрофизиологические механизмы действия мелатонина на уровне нейронов SCN. Было установлено, что воздействие мелатонина не оказывает влияния на среднюю частоту генерации потенциалов действия нейронами SCN. В то же время, данный гормон повышал нерегулярность генерации спайков, что проявлялось в росте энтропии логарифма межспайкового интервала ( $P = 0.004$ : парный тест Стьюдента). Кроме этого, под действием мелатонина обнаруживался рост обоюдной информации между соседними межспайковыми интервалами ( $P < 0.001$ : тест Уилкоксона). В экспериментах, выполненных в условиях фиксации мембранного тока, показано, что в основе этих изменений могут лежать влияния мелатонина на мембранный потенциал клеток SCN и форму их спайков. В частности, мелатонин оказывал гиперполяризующее действие ( $P = 0.019$ : тест Уилкоксона) на мембрану популяции нейронов SCN, обладавших способностью генерировать спайки под воздействием кратковременной 250 мс гиперполяризации мембраны. Этот эффект сопровождался ростом входного сопротивления ( $P = 0.007$ : тест Уилкоксона), что свидетельствует о снижении ионной проводимости мембраны под влиянием мелатонина. Влияние мелатонина также выражалось в

статистически значимом росте амплитуды следовой деполяризации ( $P = 0.007$ : тест Уилкоксона) и в укорочении продолжительности следовой гиперполяризации ( $P = 0.013$ : тест Уилкоксона). Обнаруженные изменения в форме следовых потенциалов способны приводить к соответствующим изменениям возбудимости мембраны нейронов SCN в определённые периоды после потенциалов действия, что в свою очередь влияет на вероятность генерации последующих спайков и определяет характер эффектов мелатонина на кодирование информации клетками SCN.

Установлено, что нейроны «ядра» и «оболочки» обладают функциональными различиями, выявляемыми при исследовании их электрической активности и экспрессии циркадианных генов. В частности, в «ядре» обнаруживается меньший процент нейронов, демонстрирующих циркадианную ритмичность, чем в «оболочке»; кроме того, суточный пик электрической активности и экспрессии генов в нейронах «оболочки» наблюдается в более раннее время, чем в нейронах «ядра» [13, 18, 28]. К тому же в экспериментах *in vivo* продемонстрирована замедленная ресинхронизация нейронов «оболочки» по сравнению с нейронами «ядра» после фазового сдвига циркадианного ритма, индуцированного воздействием света [2, 24]. По всей видимости, функциональная гетерогенность нейронов «ядра» и «оболочки» в отношении их электрофизиологических свойств и экспрессии циркадианных генов тесно связана с фундаментальными физиологическими характеристиками SCN, в частности, она может определять оптимальную скорость и последовательность распространения синхронизирующего сигнала от фоторецепторов сетчатки, а также способствовать формированию адекватных параметров ритмического циркадианного эфферентного выхода из «оболочки» SCN [3, 6].

Несмотря на наличие единой нейронной сети в SCN, циркадианная ритмичность ясно проявляется на уровне изолированных нейронов этого ядра. Дисперсная культура нейронов SCN, культивируемая на мультиэлектродных пластинках, способна генерировать циркадианный ритм спонтанной спайковой активности в течение нескольких недель [14, 30]. При этом когерентность электрической активности существенно зависит от концентрации нейронов в культуре. В культурах с малым числом клеток на единицу площади поверхности ритмы активности индивидуальных нейронов могут значительно различаться по периоду и фазе [15]. Следовательно, в данных экспериментальных условиях, когда отдельные нейроны SCN слабо связаны между собой и не формируют развитой нейронной сети, они способны функционировать как автономные циркадианные

пейсмекеры. Увеличение концентрации культивируемых нейронов приводит к формированию когерентного согласованного выходного сигнала с синхронизированным периодом (приблизительно 24 часа) и максимумом активности в фазу субъективного дня, что аналогично картине, продемонстрированной на гипоталамических срезах [5, 10]. Таким образом, несмотря на то, что изолированные нейроны SCN обладают пейсмекерными свойствами, фазы циркадианного ритма их активности синхронизируются благодаря взаимодействию с другими нейронами сети, что в конечном итоге приводит к формированию когерентного выходного сигнала.

Особый интерес вызывает исследование роли нарушений функции SCN в патогенезе различных заболеваний и разработка методов их лечения, связанных с целенаправленным воздействием на циркадианную функцию. Известно, что циркадианные ритмы нарушаются при самых разных патологических состояниях [17, 19]. Однако фенотипически проявляющиеся циркадианные нарушения не всегда являются следствием дисфункции SCN. Например, в нашей работе [26], выполненной на генетически модифицированных мышах, являющихся носителями гена болезни Хантингтона не удалось выявить статистически значимых различий уровня активности и кодирования информации нейронами этого ядра *in vitro* по сравнению с контрольными животными. Более того, на органотипических срезах гипоталамуса мышей-мутантов, с помощью техники люциферазного имиджинга было показано, что экспрессия циркадианных генов в изолированном SCN не изменена. Вместе с тем данная мутация *in vivo* закономерно приводит к выраженным нарушениям поведенческих циркадианных ритмов, которые сопровождаются расстройствами регуляции экспрессии циркадианных генов в SCN. Для объяснения полученных результатов предложена гипотеза о том, что механизм поведенческих и молекулярных циркадианных нарушений, выявленных у мышей-носителей гена болезни Хантингтона, обусловлен патологическими изменениями в нейронных сетях на уровне структур головного мозга, посылающих афферентные сигналы к нейронам SCN. Регулярное введение седативного препарата алпразолама привело к нормализации ранее нарушенной экспрессии некоторых генов в SCN и нормализовало некоторые поведенческие реакции, что, в частности, проявилось в улучшении результатов теста с распознаванием зрительных образов. В целом роль и механизмы участия нейронов SCN в патогенезе конкретных заболеваний требуют интенсивного изучения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abrahamson E.E., Moore R.Y.* Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Res.* 916: 172–191. 2001.
2. *Albus H., Vansteensel M.J., Michel S., Block G.D., Meijer, J.H.* A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Curr. Biol.* 15: 886–893. 2005.
3. *Antle M.C., Silver R.* Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci.* 28: 145–151. 2005.
4. *Arvanitogiannis A., Robinson B., Beaule C., Amir S.* Calbindin-D28k immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus and the circadian response to constant light in the rat. *Neuroscience.* 99: 397–401. 2000.
5. *Aton S.J., Colwell C.S., Harmar A.J., Waschek J., Herzog E.D.* Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat. Neurosci.* 8: 476–483. 2005.
6. *Aton S.J., Herzog E.D.* Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron.* 48: 531–534. 2005.
7. *Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Dyball R.E.J.* Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 16: 390–397. 2004.
8. *Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Saeb-Parsy K., Hon A., Dyball R.E.J.* Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Physiol.* 563: 291–307. 2005.
9. *Bhumbra G.S., Inyushkin A.N., Syrimi M., Dyball R.E.J.* Spike coding during osmotic stimulation of the rat supraoptic nucleus. *J. Physiol.* 569: 257–274. 2005.
10. *Brown T.M., Hughes A.T., Piggins H.D.* Gastrin-releasing peptide promotes suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity in the absence of vasoactive intestinal polypeptide-VPAC2 receptor signaling. *J. Neurosci.* 25: 11155–11164. 2005.
11. *Card J.P., Fitzpatrick-McElligott S., Gozes I., Baldino F.Jr.* Localization of vasopressin-, vasoactive intestinal polypeptide-, peptide histidine isoleucine- and somatostatin-mRNA in rat suprachiasmatic nucleus. *Cell Tissue Res.* 252: 307–315. 1988.
12. *Groos G., Hendriks J.* Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 34: 283–288. 1982.
13. *Hamada T., Antle M.C., Silver R.* Temporal and spatial expression patterns of canonical clock genes and clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 19: 1741–1748. 2004.
14. *Herzog E.D., Geusz M.E., Khalsa S.B., Straume M., Block, G.D.* Circadian rhythms in mouse suprachiasmatic nucleus explants on multimicroelectrode plates. *Brain Res.* 757: 285–290. 1997.
15. *Herzog E.D., Takahashi J.S., Block G.D.* Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1: 708–713. 1998.
16. *Inyushkin A.N., Bhumbra G.S., Gonzalez J.A., Dyball R.E.J.* Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 19: 671–681. 2007.
17. *Lamont E.W., James F.O., Boivin D.B., Cermakian N.* From circadian clock gene expression to pathologies. *Sleep Med.* 8: 547–556. 2007.
18. *Maywood E.S., Reddy A.B., Wong G.K., O'Neill J.S., O'Brien J.A., McMahon D.G., Harmar A.J., Okamura H., Hastings, M.H.* Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by

- neuropeptidergic signaling. *Curr. Biol.* 16: 599–605. 2006.
19. *McClung C.A.* Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacol. Ther.* 114: 222–232. 2007.
  20. *Meijer J.H., Watanabe K., Schaap J., Albus H., Detari L.* Light responsiveness of the suprachiasmatic nucleus: long-term multiunit and single-unit recordings in freely moving rats. *J. Neurosci.* 18: 9078–9087. 1998.
  21. *Morin L.P.* SCN organization reconsidered. *J. Biol. Rhythms.* 22: 3–13. 2007.
  22. *Moore R.Y., Speh J.C.* GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci. Lett.* 150: 112–116. 1993.
  23. *Moore R.Y., Speh J.C., Leak R.K.* Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res.* 309: 89–98. 2002.
  24. *Nagano M., Adachi A., Nakahama K., Nakamura T., Tamada M., Meyer-Bernstein E., Sehgal A., Shigeyoshi Y.* An abrupt shift in the day / night cycle causes desynchrony in the mammalian circadian center. *J. Neurosci.* 23: 6141–6151. 2003.
  25. *Okamura H., Berod A., Julien J.F., Geffard M., Kitahama K., Mallet J., Bobillier P.* Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA. *Neurosci. Lett.* 102: 131–136. 1989.
  26. *Pallier P.N., Maywood E.S., Zheng Z., Chesham J.E., Inyushkin A.N., Dyball R., Hastings M.H., Morton A.J.* Pharmacological imposition of sleep slows cognitive decline and reverses dysregulation of circadian gene expression in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 27: 7869–7878. 2007.
  27. *Piggins H.D., Samuels R.E., Coogan A.N., Cutler D.J.* Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor immunoreactivity in the suprachiasmatic nuclei and intergeniculate leaflet of hamster, mouse, and rat. *J. Comp. Neurol.* 438: 50–65. 2001.
  28. *Schaap J., Albus H., VanderLeest H.T., Eilers P.H., Detari L., Meijer J.H.* Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 100: 15994–15999. 2003.
  29. *Shibata S., Oomura Y., Kita H., Hattori K.* Circadian rhythmic changes of neuronal activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat hypothalamic slice. *Brain Res.* 247: 154–158. 1982.
  30. *Shinohara K., Hiruma H., Funabashi T., Kimura F.* GABAergic modulation of gap junction communication in slice cultures of the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 96: 591–596. 2000.
  31. *Van den Pol A.N., Tsujimoto K.L.* Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience.* 15: 1049–1086. 1985.

## ELECTROPHYSIOLOGICAL AND NEUROCHEMICAL PROPERTIES OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS

© 2010 A.N. Inyushkin, M. A. Kiseleva, K.A. Mistryugov, Elena M. Inyushkina

Samara State University

In the paper main electrophysiological and neurochemical properties of the suprachiasmatic nucleus of rodents are discussed. Both the literature data and the short review of own results on structure and function of the suprachiasmatic nucleus are presented.

*Key words:* suprachiasmatic nucleus, circadian rhythms, neuronal activity.

---

*Alexey Inyushkin*, Professor, D.Sci. in Biology, Head of the Department of Human and Animal Physiology, e-mail: ainyushkin@mail.ru; *Mariya Kiseleva*, PhD student, e-mail: pantera.fox@mail.ru; *Konstantin Mistryugov*, PhD student, e-mail: mistryugov@yandex.ru; *Elena Inyushkina*, Cand. Sci. in Biology, Senior Lecturer of the Department of Human and Animal Physiology, e-mail: inyushkina@mail.ru