

ВЛИЯНИЕ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ МЕМБРАНЫ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА НА СПАЙКОВУЮ АКТИВНОСТЬ IN VITRO¹

© 2014 А.Н. Инюшкин, М.А. Ткачева, А.А. Петрова, Т.В. Рязанцева, А.В. Парфенова²

На переживающих срезах гипоталамуса крыс исследованы особенности спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра в условиях деполяризации их мембраны *in vitro*. Деполяризация мембраны приводила к росту активности клеток и снижению энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов, являющейся мерой нерегулярности генерации спайков. Обсуждаются возможные механизмы, лежащие в основе данных эффектов.

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

Введение

Для понимания физиологических механизмов, которые лежат в основе функциональной активности главного циркадианного осциллятора организма млекопитающих, локализованного в супрахиазматическом ядре, особый интерес представляет биоэлектрическая активность расположенных здесь нейронов. Важнейшим результатом электрофизиологических исследований этого ядра явилось обнаружение циклических изменений активности его нейронов. Было установлено, что ритмические изменения активности супрахиазматических клеток выявляются не только *in vivo*, но и в экспериментах *in vitro* при регистрации спайковой активности отдельных нейронов в гипоталамических срезах мозга [5; 6; 15]. При этом показано, что уровень спайковой активности большинства нейронов супрахиазматического ядра демонстрирует ритмические колебания с околосуточным периодом, повышаясь в дневное время и снижаясь в ночные часы.

До настоящего времени в подавляющем большинстве работ, посвященных анализу активности нейронов супрахиазматического ядра, в качестве универсальной меры уровня их активности использовалась средняя частота генерации потенциалов действия. Альтернативный подход, позволяющий получить дополнительные

¹Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 10-04-00653 и 13-04-97000-р_поволжье_a).

²Инюшкин Алексей Николаевич (ainyushkin@mail.ru), Ткачева Маргарита Андреевна (margoshagt@mail.ru), Петрова Альбина Анатольевна (albina-90@list.ru), Рязанцева Татьяна Викторовна (tanya-777-91@mail.ru), Парфенова Алена Владимировна (alena.melae@mail.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета. 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

данные об особенностях спайкового кодирования информации, может заключаться в анализе продолжительности межспайковых интервалов. Данный подход, основанный на теории информации, был разработан в ходе реализации нашей совместной с коллегами из университета Кембриджа (Великобритания) программы научных исследований. В частности, было показано, что в качестве характеристики нейронного кода клеток супрахиазматического ядра может использоваться энтропия логарифма межспайковых интервалов как мера нерегулярности спайковой активности [1–3; 8; 9].

Циркадианный ритм изменений спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра может объясняться циклическими изменениями их мембранного потенциала. Ранее было показано, что важнейший фактор настройки циркадианного осциллятора эпифизарный гормон мелатонин способен вызывать гиперполяризацию мембраны значительной части супрахиазматических клеток путем активации выходящего калиевого тока и ингибирования I_h тока [8; 10; 16]. Поскольку продукция мелатонина эпифизом осуществляется ночью и резко падает в дневные часы [4; 7], есть все основания для предположения о том, что мембрана нейронов супрахиазматического ядра деполяризуется днем и гиперполяризуется ночью, что в свою очередь приводит к циркадианным изменениям параметров их электрической активности. В настоящей работе, выполненной на гипоталамических срезах крысы, было изучено влияние мембранной деполяризации, вызванной повышением концентрации ионов калия в перфузионном растворе, на показатели спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра.

Методика проведения эксперимента

Исследования выполнены на 11 белых лабораторных крысах-самцах массой тела 90–140 г. Экспериментальный протокол был согласован с комиссией по биологической этике Самарского государственного университета. Животных наркотизировали уретаном (1,3 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировали. С помощью вибротома Vibroslice NVSL (Япония) при температуре около +2 °С готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, содержащие супрахиазматическое ядро. Срезы помещали в раствор следующего состава: NaCl — 124 мМ, NaHCO_3 — 25 мМ, KCl — 3 мМ, CaCl_2 — 1,5 мМ, MgSO_4 — 1 мМ, NaH_2PO_4 — 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, смонтированная на антивибрационном столике (Vibration-Free Workstation, США), включала перфузионную камеру, масляный микроманипулятор и микроскоп (МБС-12, Россия). Регистрацию производили стеклянными микроэлектродами, заполненными раствором для перфузии. Сигнал с микроэлектрода усиливали, блокировали шум частотой 50 Гц с помощью устройства HumBag 50/60 Hz Noise Eliminator (Quest Scientific, Канада), оцифровывали 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 среднюю частоту генерации потенциалов действия. Дополнительно в ходе обработки данных рассчитывали энтропию логарифма распределения межспайковых интервалов с целью параметрической оценки важнейшего показателя спайкового кодирования информации — регулярности генерации спайков [1–3; 8; 9].

После регистрации активности нейронов в исходном состоянии с целью деполяризации мембраны повышали концентрацию ионов калия в перфузионном растворе. Необходимую концентрацию ионов калия в растворе определяли с помощью производного уравнения Нернста по ранее описанной методике [2] так, чтобы обеспечить ступенчатую деполяризацию на +3, +6, +9, +12 и +15 мВ. С этой целью повышали концентрацию ионов калия в перфузионном растворе соответственно на 0,51, 1,08, 1,72, 2,44 и 3,25 мМ. Продолжительность действия каждого раствора составляла 15 минут, при этом значения параметров спайковой активности клеток определяли в конце этого 15-минутного интервала, когда полностью завершалась адаптация к новому раствору и активность нейронов стабилизировалась.

Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке. При анализе изменений показателей спайковой активности использовали тест ANOVA, который дополняли тестом Бонферрони (Bonferroni t-test) для попарного сравнения значений исследуемых параметров с исходным уровнем. В случае несоответствия данных нормальному распределению использовали ранговый тест ANOVA, а для попарного сравнения значений параметров с исходным уровнем использовали тест Данна (Dunn's 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. Дополнительно для выяснения зависимости между параметрами спайковой активности и степенью деполяризации мембраны применяли корреляционный анализ. В случае соответствия данных в выборках нормальному распределению использовалась корреляция Пирсона, в остальных случаях — ранговая корреляция Спирмена.

Результаты исследования

Внеклеточная микроэлектродная регистрация биоэлектрической активности нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro* позволила определить основные особенности спайковой активности расположенных здесь клеток в условиях ступенчатой деполяризации их мембраны. Всего было зарегистрировано 34 нейрона. Среди них оказалось 16 нейронов с нерегулярной активностью, 11 нейронов с регулярной активностью, 5 нейронов с низкой активностью и 2 нейрона с залповой активностью. Поскольку при деполяризации мембраны каких-либо существенных различий в реакциях у нейронов с различными типами активности обнаружено не было, все данные анализировались совместно, без их подразделения в соответствии с типами активности. В целом для всей группы зарегистрированных нейронов в исходном состоянии медиана средней частоты генерации потенциалов действия составила $1,01 \text{ с}^{-1}$, энтропия распределения межспайковых интервалов для этих нейронов составила $6,84 \pm 0,13$ бит.

Ступенчатая деполяризация мембраны нейронов привела к прогрессивному росту уровня их спайковой активности ($P < 0,001$: ранговый тест ANOVA), что проявилось в увеличении частоты генерации потенциалов действия (рис. 1, 2, 3, а).

Одновременно отмечалось снижение энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов ($P < 0,001$; ANOVA), свидетельствующее об увеличении регулярности генерации спайков (рис. 3, б).

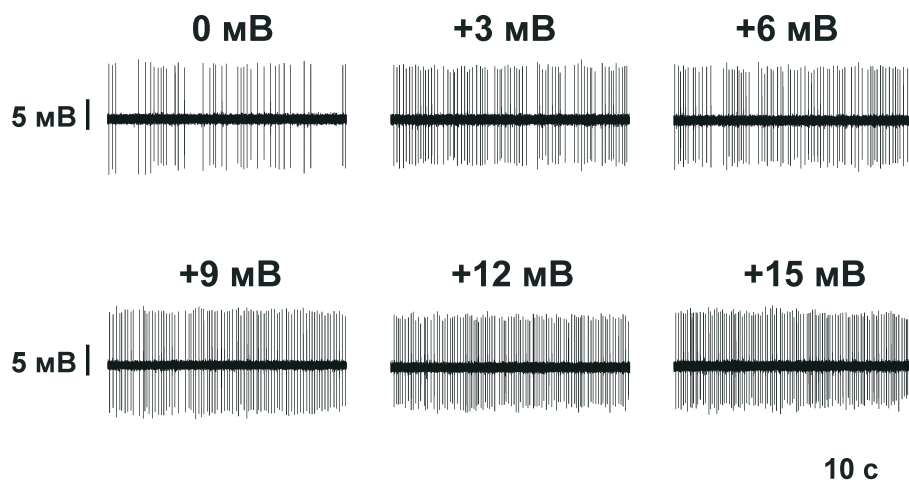


Рис. 1. Влияние ступенчатой деполяризации мембраны на спайковую активность нейрона супрахиазматического ядра с исходной нерегулярной активностью *in vitro*. Представлены 30-секундные фрагменты записи в исходном состоянии (0 мВ) и при различных степенях деполяризации (значения над фрагментами). Слева — калибровка по амплитуде (5 мВ), внизу — калибровка по времени (10 с)

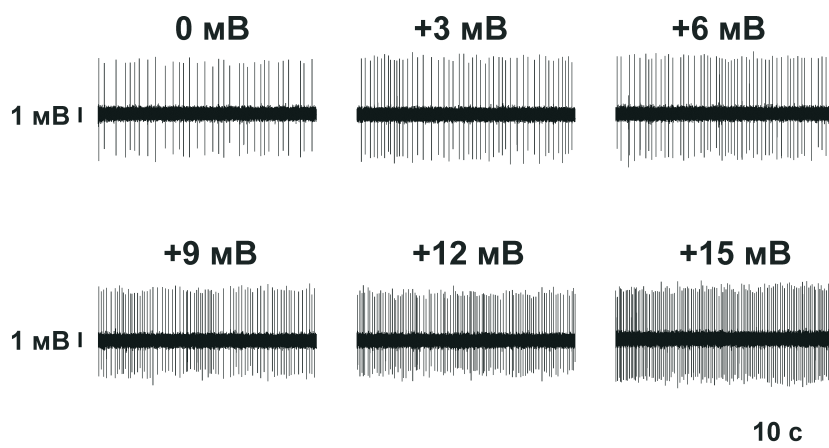


Рис. 2. Влияние ступенчатой деполяризации мембраны на спайковую активность нейрона супрахиазматического ядра с исходной регулярной активностью *in vitro*. Представлены 30-секундные фрагменты записи в исходном состоянии (0 мВ) и при различных степенях деполяризации (значения над фрагментами). Слева — калибровка по амплитуде (1 мВ), внизу — калибровка по времени (10 с)

Для выяснения зависимости между уровнем спайковой активности нейронов и степенью деполяризации мембраны использовали корреляционный анализ по-

лученных данных. Поскольку распределение значений частоты генерации потенциалов действия отличалось от нормального, была использована ранговая корреляция Спирмена. В результате анализа была выявлена статистически значимая ($P < 0,001$) позитивная корреляция между этими показателями с коэффициентом корреляции $r = 0,472$. Аналогичный анализ зависимости между энтропией логарифма распределения межспайковых интервалов и степенью деполяризации с использованием корреляции Пирсона выявил наличие статистически значимой негативной корреляции ($P < 0,001$) с коэффициентом $r = -0,232$.

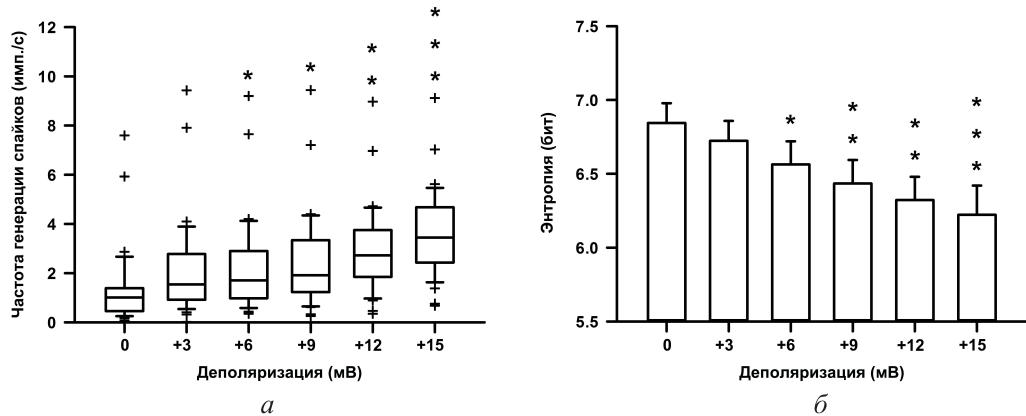


Рис. 3. Влияние ступенчатой деполяризации мембраны на частоту генерации спайков (а) и энтропию логарифма распределения межспайковых интервалов (б) нейронов супрахиазматического ядра ($n = 34$). Звездочками отмечены статистически значимые различия с исходным состоянием (0 мВ): * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Обсуждение результатов

В ходе настоящей работы изучали влияние деполяризации мембраны нейронов супрахиазматического ядра на показатели их спайковой активности. В исходном состоянии было выявлено 4 типа активности клеток: нерегулярная, регулярная, низкая и залповая, причем первые 2 типа встречались значительно чаще. Однако деполяризация мембраны вызывала похожие изменения электрической активности независимо от ее исходного типа. Таким образом, исходный тип спайковой активности супрахиазматических клеток в данном случае не играет существенной роли, а реакции всех нейронов на мембранную деполяризацию развиваются похожим образом.

Результаты исследования показали, что ступенчатая деполяризация мембраны нейронов супрахиазматического ядра вызывала рост частоты генерации потенциалов действия и снижение энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов, выраженность которых возрастала с увеличением степени мембранной деполяризации. Использование наряду с "традиционным" показателем уровня активности нейронов (средней частотой генерации потенциалов действия) дополнительного показателя — энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов — позволило получить сведения о влиянии деполяризации мембраны на спайковое кодирование информации. Известно, что степень нерегулярности генерации спайков, параметрической мерой которой является энтропия, играет важную роль в передаче информации между нервными клетками [14]. При этом энтропия имеет существенные преимущества перед другим показателем, отражающим степень разнообразия продолжительности межспайковых интервалов — коэффициентом вариальности, поскольку на величину энтропии оказывают влияние те

аспекты, к которым величина коэффициента вариабельности нечувствительна. К ним, в частности, относятся форма, количество и локализация пиков на гистограмме распределения логарифма межспайковых интервалов [1]. Снижение энтропии при деполяризации мембраны супрахиазматических клеток, по всей видимости, отражает особенности спайкового кодирования информации, имеющие место *in vivo* в дневное время и возникающие вследствие резкого снижения продукции гормона эпифиза мелатонина.

Причина роста частоты генерации потенциалов действия под влиянием мембранной деполяризации выглядят вполне очевидной. В данных экспериментальных условиях величина мембранного потенциала приближается к критическому уровню деполяризации. Это приводит к увеличению возбудимости клеток, большее количество ВПСП, чем в исходном состоянии, достигает критического уровня и вызывает генерацию большего количества спайков в единицу времени. В то же время причины снижения энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов под влиянием деполяризации мембраны выглядят не столь очевидными. В частности, существует предположение о том, что нерегулярная активность у нейронов супрахиазматического ядра может объясняться формой следовой гиперполяризации, монофазной или бифазной [13]. В нашем исследовании [8], выполненном с использованием пэтч-клемп техники *in vitro*, аппликации мелатонина приводили к росту энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов. Причиной данного эффекта мелатонина явилось существенное изменение формы следовых потенциалов: укорочение следовой гиперполяризации и значительный рост амплитуды следовой деполяризации. В то же время в отсутствие мелатонина отмечались признаки мембранной деполяризации, следовая гиперполяризация была продолжительной, а следовая деполяризация слабо выраженной, что привело к снижению энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов и к повышению регулярности генерации спайков. Не исключено, что аналогичные изменения следовых потенциалов послужили причиной снижения энтропии, наблюдавшегося в настоящей работе. Другой возможной причиной увеличения степени регулярности генерации потенциалов действия при мембранной деполяризации является снижение тормозного влияния со стороны ГАМКергических нейронов, в большом количестве присутствующих в супрахиазматическом ядре [12]. В исходном состоянии клетки, подвергавшиеся периодическому торможению через ГАМКергические синапсы, должны были разряжаться нерегулярно и с меньшей частотой. В условиях же деполяризации мембраны, когда эффект ГАМКергического торможения снижен, должны были расти уровень активности и степень регулярности генерации спайков. Косвенные подтверждения такой возможности ранее были получены в специальном исследовании [11].

Заключение

Таким образом, деполяризация мембраны нейронов супрахиазматического ядра крысы *in vitro*, независимо от типа их исходной активности, вызывала рост частоты генерации потенциалов действия и снижение энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов, выраженность которых зависела от степени деполяризации. Подобные изменения активности клеток главного циркадианного осциллятора могут наблюдаться *in vivo* в дневное время, в условиях резкого снижения продукции мелатонина эпифизом.

Литература

- [1] 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.
- [2] Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / G.S. Bhumbra [et al.] // *J. Physiol.* 2005. V. 563. P. 291–307.

- [3] Spike coding during osmotic stimulation of the rat supraoptic nucleus / G.S. Bhumbra [et al.] // *J. Physiol.* 2005. V. 569. P. 257–274.
- [4] Cajochen C., Krauchi K., Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep // *J. Neuroendocrinol.* 2003. V. 15. P. 432–437.
- [5] Green D., Gillette R. Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slices // *Brain Res.* 1982. V. 245. P. 198–200.
- [6] Groos G., Hendriks J. Circadian rhythms in electrical discharge of rat suprachiasmatic neurones recorded in vitro // *Neurosci. Lett.* 1982. V. 34. P. 283–288.
- [7] Illnerova H., Sumova A. Photic entrainment of the mammalian rhythm in melatonin production // *J. Biol. Rhythms.* 1997. V. 12. P. 547–555.
- [8] Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / A.N. Inyushkin [et al.] // *J. Neuroendocrinol.* 2007. V. 19. P. 671–681.
- [9] 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.
- [10] Jiang Z.-G., Nelson C.S., Allen C.N. Melatonin activates an outward current and inhibits Ih in rat suprachiasmatic nucleus neurons // *Brain Res.* 1995. V. 687. P. 125–132.
- [11] Kononenko 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.
- [12] Moore R.Y., Speh J.C. GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system // *Neurosci. Lett.* 1993. V. 150. P. 112–116.
- [13] Electrophysiological and morphological heterogeneity of neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus / CMA. Pennartz [et al.] // *J. Physiol.* 1998. V. 506. P. 775–793.
- [14] Spikes: exploring the neural code / F. Rieke [et al.]. The MIT Press. Cambridge, MA, USA. 1997. 395 p.
- [15] 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.
- [16] Melatonin generates an outward potassium current in rat suprachiasmatic neurones in vitro independent of their circadian rhythm / M. Van den Top [et al.] // *Neuroscience.* 2001. V. 107. P. 99–108.

Поступила в редакцию 5/III/2014;
в окончательном варианте — 5/III/2014.

EFFECT OF MEMBRANE DEPOLARISATION OF SUPRACHIASMATIC NUCLEUS NEURONS ON SPIKE ACTIVITY IN VITRO

© 2014 A.N. Inyushkin, M.A. Tkacheva, A.A. Petrova, T.V. Ryazantseva, A.V. Parfenova³

The properties of spike activity of neurons of the suprachiasmatic nucleus during their membrane depolarisation in vitro are investigated on rat hypothalamic slices. Depolarisation of membrane caused an increase in activity of cells and a decrease in entropy log interspike interval distribution were used as a measure of spikes irregularity generation. Possible mechanisms of the effects are discussed.

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

Paper received 5/III/2014.

Paper accepted 5/III/2014.

³Inyushkin Aleksei Nikolaevich (ainyushkin@mail.ru), Tkacheva Margarita Andreevna (margoshagt@mail.ru), Petrova Al'bina Anatol'evna (albina-90@list.ru), Ryazantseva Tat'yana Viktorovna (tanya-777-91@mail.ru), Parfenova Alena Vladimirovna (alena.melae@mail.ru), the Dept. of Human and Animals Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.