

**УДК 612.826.4**

**МОДУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ АРГИНИН-ВАЗОПРЕССИНА  
НА НЕЙРОНЫ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА С РАЗЛИЧНЫМИ  
ТИПАМИ СПАЙКОВОЙ АКТИВНОСТИ**

*Инюшкин А. Н., Исакова Т. С., Инюшкина Е. М., Павленко С. И., Инюшкин А. А.*

*Самарский национальный исследовательский университет им. академика С. П. Королева,  
Самара, Российская Федерация  
E-mail: ainyushkin@mail.ru*

Влияние 20 нМ аргинин-вазопрессина на уровень спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра и параметры спайкового кодирования информации изучено на фронтальных срезах гипоталамуса крыс. Численно преобладающий тип реакции на вазопрессин заключался в росте активности нейронов, снижении энтропии распределения межспайковых интервалов, являющейся показателем нерегулярности генерации потенциалов действия, и повышении обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами, отражающей паттернирование спайковой информации. Такие реакции были характерны для нейронов с нерегулярным типом активности, предположительно являющихся вазопрессинергическими, и реже встречались среди нейронов с регулярным и залповым типом активности. Полученные результаты указывают на механизмы синхронизирующего влияния вазопрессина, реализующегося в пределах супрахиазматического ядра.

**Ключевые слова:** супрахиазматическое ядро, аргинин-вазопрессин, циркадианные ритмы, спайковая активность, спайковое кодирование информации.

**ВВЕДЕНИЕ**

В организме млекопитающих суточные физиологические, гомеостатические и поведенческие ритмы регулируются циркадианными биологическими часами, расположенными в супрахиазматическом ядре гипоталамуса, нейроны которого генерируют эндогенный околосуточный ритм спайковой активности [1, 2]. Среди пептидергических нейронов супрахиазматического ядра наиболее широко представлены нейроны, продуцирующие аргинин-вазопрессин, при этом их наивысшая концентрация обнаруживается в дорсомедиальном отделе ядра [3]. Известно, что вазопрессинергические нейроны являются основным источником эфферентных проекций супрахиазматического ядра [4], кроме этого, важную функциональную роль играет локальная вазопрессиновая сигнализация. Аксоны многих вазопрессинергических клеток проецируются в пределах супрахиазматического ядра, направляясь в медиальный, дорсальный, латеральный и вентральный отделы ядра [3, 5]. Предполагается, что аргинин-вазопрессин, локально высвобождающийся в супрахиазматическом ядре, играет ведущую роль в синхронизации активности нейронов циркадианного осциллятора [6] и в ГАМК-зависимой регуляции периода его спайковой активности в суточном цикле [7],

однако механизмы синхронизирующего влияния вазопрессина нуждаются в детальном изучении. В этом плане перспективным методическим подходом представляется исследование влияния аргинин-вазопрессина на параметры спайкового кодирования информации нейронами циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

В нашем предыдущем исследовании продемонстрировано существование ритмических циркадианных изменений важнейших параметров спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра: энтропии распределения межспайковых интервалов, отражающей степень неоднородности их продолжительности, и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами, являющейся показателем паттернирования спайковой информации [8]. Характерно, что циркадианный ритм изменений параметров спайкового кода в супрахиазматическом ядре проявлялся с более высокой статистической значимостью, чем хорошо известный ритм изменений частоты генерации потенциалов действия. В настоящей работе *in vitro* на переживающих срезах гипоталамуса крыс изучено влияние аппликаций аргинин-вазопрессина на уровень активности и показатели спайкового кодирования информации; кроме этого, впервые проанализированы особенности реакций нейронов супрахиазматического ядра с основными типами спайковой активности на воздействие данного пептида.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 28 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 (Series 1000, Horwell Instruments, США) готовили фронтальные 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. Искусственная цереброспинальная жидкость содержала 124 мМ NaCl, 25 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 3 мМ KCl, 1,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ MgSO<sub>4</sub>, 0,5 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ глюкозы. Для регистрации биоэлектрической активности нейронов срезы переносили в перфузионную камеру из органического стекла, смонтированную на антивибрационном столике (Vibraplane, США) для обеспечения стабильности. Срезы перфузировали искусственной цереброспинальной жидкостью с постоянной скоростью 1,5 мл/мин с помощью перистальтической помпы (Minipuls 3, Gilson, Франция). Регистрацию производили при температуре 27–30 °С.

Спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра регистрировали внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм, заполненных искусственной цереброспинальной жидкостью для перфузии среза. Сигнал от микроэлектрода усиливали (Axopatch 200, Axon Instruments, США), устраняли шум частотой 50 Гц (Hum Bug; Quest Scientific, Канада), оцифровывали (Micro 1401, CED, Великобритания) и подавали на персональный компьютер. Визуализацию сигнала, хранение и первичную обработку данных осуществляли с помощью программного пакета Spike 2 (CED, Великобритания).

Учитывая рост процессинга мРНК специфических рецепторов вазопрессина в супрахиазматическом ядре в ночное время суток [9, 10], регистрацию спайковой активности осуществляли в субъективное тёмное время суток (ZT 12-24, момент включения освещения соответствовал ZT 0). С этой целью освещение в виварии было включенным с 22 до 10 часов, а регистрацию активности нейронов осуществляли с 10 до 22 часов. После появления спайковой активности наблюдали за ней в исходном состоянии в течение 10 минут. После этого, при отсутствии видимой тенденции к нарушению постоянства частоты генерации спайков, перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением 20 нМ аргинин-вазопрессина на 10 минут, а затем возвращались к исходному раствору для «отмывания» среза от исследуемого вещества. Продолжительность «отмывания» составляла 15 минут. Во избежание возможной десенситизации ткани к аргинин-вазопрессину на каждый срез производилась лишь единственная аппликация пептида.

Первым этапом обработки данных было тщательное выделение всех зарегистрированных спайков из шума и артефактов, которое выполнялось с помощью программы LabSpike [11]. Использование данной программы, в частности, позволяло удостовериться, что источником всех зарегистрированных спайков является один и тот же нейрон. Далее, наряду с расчётом средней частоты генерации спайков, вычисляли два параметра, характеризующих спайковое кодирование информации: энтропию распределения межспайковых интервалов, являющуюся показателем нерегулярности генерации потенциалов действия, и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами, отражающую паттернирование спайковой информации [8, 11–14].

Для выяснения характера и выраженности 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 [15]. Далее анализировали исследуемые параметры в течение заключительного пятиминутного периода «отмывания» среза и делали вывод о степени восстановления исходной спайковой активности.

Полученные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения значений исследуемых показателей в период действия аргинин-вазопрессина с исходным состоянием использовали парный *t*-тест или ранговый тест Уилкоксона (в

случае несоответствия распределения данных в выборках нормальному). Нормальность распределения проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Для сравнения пропорций использовали z-тест. Статистические данные о параметрах спайковой активности нейронов в исходном состоянии представлены как средние арифметические  $\pm$  стандартные ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Всего были исследованы реакции на воздействие 20 нМ аргинин-вазопрессина 56 нейронов супрахиазматического ядра. В целом для всей этой группы клеток в исходном состоянии частота генерации потенциалов действия составила  $2,90 \pm 0,24 \text{ с}^{-1}$ . Энтропия распределения межспайковых интервалов для этих нейронов равнялась  $6,42 \pm 0,13$  бит, а обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами составила  $0,064 \pm 0,013$  бит.

У 23 из 56 зарегистрированных нейронов (41,1 %) был выявлен регулярный тип активности. Характерными признаками данного типа активности была высокая частота генерации потенциалов действия ( $4,17 \pm 0,30 \text{ с}^{-1}$ ) в сочетании с коротким межспайковым интервалом. Высокая степень регулярности генерации потенциалов действия нейронами данного типа выражалась, в частности, в минимальном среди всех типов нейронов значении энтропии распределения межспайковых интервалов, которая равнялась  $5,56 \pm 0,14$  бит. Обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами у клеток с регулярной активностью равнялась  $0,034 \pm 0,014$  бит, что указывает на низкий уровень паттернирования информации в нейронном коде данных клеток. У 28 из 56 клеток (50,0 %) был зарегистрирован наиболее часто встречающийся нерегулярный тип спайковой активности, который характеризовался непостоянством межспайковых интервалов, короткими периодами высокочастотной активности и редкими непродолжительными паузами, как правило, не превышавшими 10 секунд. Нерегулярная активность отличалась относительно невысоким значением частоты генерации потенциалов действия ( $2,21 \pm 0,29 \text{ с}^{-1}$ ) и умеренно-высоким значением энтропии распределения межспайковых интервалов ( $7,03 \pm 0,08$  бит). Обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов с нерегулярной была равна  $0,069 \pm 0,019$  бит, что соответствует умеренной степени паттернирования информации в спайковом коде клеток данной популяции. Наконец, у 5 из 56 нейронов (8,9 %) был обнаружен залповый паттерн спайковой активности, который характеризовался чередованием периодов высокочастотной активности (залпов) и продолжительных пауз. Длительность залпов как правило составляла от нескольких секунд до минуты, а межзалповые паузы продолжались от 10-15 секунд до минуты. Наличие таких пауз обусловило низкое значение средней частоты генерации спайков у нейронов данной популяции:  $0,95 \pm 0,39 \text{ с}^{-1}$ . В противоположность этому, значение обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами у залповых нейронов оказалось наивысшим ( $0,170 \pm 0,079$  бит), что указывает на высокую степень паттернирования спайковой информации в

нейронном коде этих клеток. Энтропия распределения межспайковых интервалов в спайковом коде нейронов данной популяции составила  $6,92 \pm 0,52$  бит.

Реакции на аппликацию 20 нМ аргинин-вазопрессина были выявлены у 29 из 56 исследованных нейронов (51,8 %). Оставшиеся 27 нейронов (48,2 %) не реагировали на воздействие пептида. Численно преобладавшие реакции выражались в повышении средней частоты генерации потенциалов действия. Такие реакции наблюдались у 26 из 56 (46,4 %) зарегистрированных нейронов супрахиазматического ядра. При анализе реакций на воздействие аргинин-вазопрессина этих 26 нейронов было установлено, что под влиянием данного пептида значительно возросла медиана частоты генерации спайков с 1,20 до 2,20  $\text{с}^{-1}$  ( $p < 0,001$ : ранговый тест Уилкоксона). Другой характерной особенностью реакций этих клеток был статистически значимый рост обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами. Медиана этого параметра с 0,015 бит в исходном состоянии выросла до 0,049 бит в период воздействия аргинин-вазопрессина ( $p = 0,046$ : ранговый тест Уилкоксона), что указывает на увеличение степени паттернирования информации в спайковом коде. Одновременно с этим в данной группе клеток было обнаружено снижение энтропии распределения межспайковых интервалов, медиана которой уменьшилась с 7,23 до 6,88 бит ( $p = 0,013$ : ранговый тест Уилкоксона); это свидетельствует о повышении степени регулярности генерации спайков в нейронном коде под влиянием аргинин-вазопрессина. Группа из 26 нейронов, отвечавших на воздействие аргинин-вазопрессина повышением спайковой активности, включала 5 нейронов с регулярной активностью, 18 нейронов с нерегулярной активностью и 3 нейрона с залповой активностью. При этом среди клеток, реагировавших на аппликацию аргинин-вазопрессина ростом частоты генерации спайков, доля нейронов с нерегулярной активностью оказалась выше, чем доля нейронов с регулярной  $p < 0,001$  (z-тест) и с залповой активностью  $p < 0,001$  (z-тест). Характерные примеры реакций спайковой активности на воздействие аргинин-вазопрессина представлены на Рис. 1 и 2.

Степень обратимости реакций спайковой активности на воздействие аргинин-вазопрессина оценивалась 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.



Рис. 1. Пример реакции нейрона супрахиазматического ядра с регулярной активностью на аппликацию 20 нМ аргинин-вазопрессина. Представлены два 50-секундных интервала записи спайковой активности: а – непосредственно перед воздействием, б – в конце 10-минутной аппликации аргинин-вазопрессина.

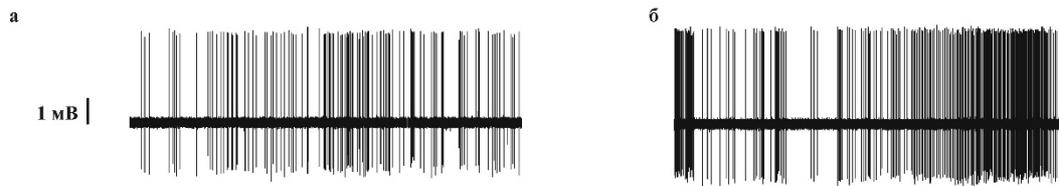


Рис. 2. Пример реакции нейрона супрахиазматического ядра с нерегулярной активностью на аппликацию 20 нМ аргинин-вазопрессина. Представлены два 50-секундных интервала записи спайковой активности: а – непосредственно перед воздействием, б – в конце 10-минутной аппликации аргинин-вазопрессина.

Реакции противоположной направленности в виде снижения средней частоты генерации спайков зарегистрированы лишь у 3 из 56 нейронов (5,4 %), причем все эти нейроны генерировали нерегулярную активность. Статистический анализ, однако, не позволил выявить значимых изменений частоты генерации потенциалов действия под влиянием аргинин-вазопрессина в данной группе клеток. Медиана этого показателя в исходном состоянии составила  $2,15 \text{ с}^{-1}$ , а при воздействии аргинин-вазопрессина –  $1,23 \text{ с}^{-1}$  ( $p=0,250$ : ранговый тест Уилкоксона). Также не выявлено изменений энтропии распределения межспайковых интервалов, несмотря на тенденцию этого показателя к росту с  $6,52 \pm 0,07$  бит до  $7,00 \pm 0,19$  бит ( $p=0,057$ : ранговый тест Уилкоксона). Обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами также не изменилась ( $0,070 \pm 0,047$  бит в исходном состоянии, и  $0,091 \pm 0,037$  бит на фоне действия аргинин-вазопрессина;  $p=0,170$ : ранговый тест Уилкоксона). Отсутствие статистически значимых реакций параметров спайковой активности в данной группе нейронов, по всей видимости, объяснялось её малочисленностью ( $n=3$ ).

У 27 исследованных нейронов существенных изменений уровня спайковой активности после аппликации 20 нМ аргинин-вазопрессина не обнаружено. Статистически значимых изменений частоты генерации потенциалов действия этими клетками не произошло (медиана в исходном состоянии была равна  $3,20 \text{ с}^{-1}$ , а при воздействии аргинин-вазопрессина –  $3,38 \text{ с}^{-1}$ ;  $p=0,057$ : ранговый тест Уилкоксона). В этой группе нейронов не выявлено также изменений энтропии распределения межспайковых интервалов, которая до воздействия составляла  $6,04 \pm 0,19$  бит, а на фоне действия аргинин-вазопрессина –  $6,09 \pm 0,19$  бит ( $p=0,482$ : парный t-тест). Не изменилось и значение обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами, медиана которой в исходном состоянии равнялась  $0,012$  бит, а в период действия аргинин-вазопрессина –  $0,024$  бит ( $p=0,196$ : ранговый тест Уилкоксона).

Таким образом, количественное соотношение реакций на аппликации 20 нМ аргинин-вазопрессина у нейронов с регулярной активностью ( $n=23$ ) оказалось следующим: рост активности – 5 случаев (21,7 %), отсутствие реакции – 18 случаев (78,3 %), реакций в виде снижения активности не было. При этом доля нейронов, не прореагировавших на воздействие аргинин-вазопрессина, оказалась выше, чем доля

клеток, ответивших на воздействие пептида ростом активности ( $p < 0,001$ : z-тест). Иными словами, на воздействие аргинин-вазопрессина прореагировало меньшинство нейронов с регулярной активностью. Принципиально иным было количественное соотношение реакций на аргинин-вазопрессин в популяции нейронов с нерегулярной активностью ( $n = 28$ ). В этой группе клеток реакции в виде роста активности зарегистрированы в 18 (64,3 %) случаях, реакции в виде снижения активности – в 3 (10,7 %) случаях, отсутствие реакции – в 7 (25,0 %) случаях, причем реакции в виде роста активности встречались чаще, чем реакции в виде снижения активности ( $p < 0,001$ : z-тест) и случаи отсутствия реакций ( $p = 0,007$ : z-тест). Следовательно, на воздействие аргинин-вазопрессина большинство нейронов с нерегулярным паттерном генерации потенциалов действия ответило ростом спайковой активности. В малочисленной популяции нейронов с залповой активностью ( $n = 5$ ) в 3 случаях (60,0 %) наблюдались реакции в виде роста активности, еще в 2 случаях (40,0 %) реакция отсутствовала. При этом статистически значимых различий между встречаемостью реакций в виде роста и снижения активности, а также отсутствием реакции обнаружено не было ( $p > 0,05$ : z-тест).

Циркадианный ритм спонтанной спайковой активности является важнейшим свойством нейронов супрахиазматического ядра. Установлено, что генетические и молекулярные циклические механизмы нейронов циркадианного осциллятора не только регулируют параметры спайковой активности этих нейронов, но и сами находятся под их регулирующим влиянием [16]. В связи с этим большой интерес представляют данные о характере реакций параметров спайковой активности клеток супрахиазматического ядра на воздействие нейромедиаторов и нейромодуляторов, в том числе, нейропептидов. В нейронах супрахиазматического ядра среди всех нейропептидов наиболее широко представлен аргинин-вазопрессин. В ходе настоящей работы было исследовано влияние аргинин-вазопрессина на спайковую активность и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра *in vitro*.

Ранее в ряде работ, с использованием техники внеклеточной и внутриклеточной регистрации активности отдельных нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*, были получены данные о наличии здесь разнообразных типов спайковой активности: регулярной, нерегулярной, залповой [12, 17–19]. В настоящей работе применялся подход к анализу спайковой активности, в соответствии с которым кроме частоты генерации потенциалов действия оценивались показатели спайкового кодирования информации: энтропия распределения межспайковых интервалов и обоюдная информация между сопряженными межспайковыми интервалами. Такой подход оказался полезным в плане количественной оценки нейронного кода, а также идентификации типа активности клеток.

Аппликации аргинин-вазопрессина оказывали влияние на уровень спайковой активности более половины от всех исследованных нейронов супрахиазматического ядра, при этом в подавляющем большинстве случаев наблюдались реакции возбуждения. Эти данные согласуются с гипотезой о том, что на уровне супрахиазматического ядра вазопрессин играет роль локального «усилителя»

циркадианного сигнала, функционирующего по принципу положительной обратной связи [20]. Ранее было продемонстрировано, что нейроны, электрическая активность которых чувствительна к действию вазопрессина, характеризуются повышенной амплитудой циркадианного ритма спонтанной спайковой активности [21]. В настоящем исследовании реакции возбуждения нейронов сопровождались изменениями параметров спайкового кодирования информации: снижением энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов, отражающей степень нерегулярности генерации спайков, и ростом обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами, являющейся показателем выраженности спайкового паттерна. Использование энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов имеет существенное преимущество перед другими показателями нерегулярности генерации спайков (например, коэффициента вариации или стандартного отклонения среднего межспайкового интервала), т.к. энтропия включает все аспекты variability, чувствительна к форме и модальности распределения межспайковых интервалов [8, 11, 22]. Это особенно важно для характеристики активности супрахиазматического ядра, нейроны которого зачастую демонстрируют бимодальное или полимодальное распределение межспайковых интервалов. Значение обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами возрастает при появлении в спайковом коде повторяющихся устойчивых последовательностей потенциалов действия (дуплетов, триплетов, залпов и др.), что повышает степень паттернирования спайковой информации [22]. Обнаруженные реакции спайкового кодирования информации, по всей видимости, свидетельствуют об изменениях паттерна высвобождения нейротрансмиттеров из дистальных окончаний аксонов исследованных нейронов супрахиазматического ядра в условиях воздействия на них аргинин-вазопрессина.

Статистический анализ показал, что реакции на воздействие вазопрессина в виде возбуждения чаще встречались у нейронов с нерегулярным типом активности. В противоположность этому, у нейронов с регулярной и залповой активностью такой особенности реакций не выявлено, а клетки с регулярной активностью чаще были нечувствительны к аргинин-вазопрессину. Известно, что нерегулярная спайковая активность является характерным электрофизиологическим свойством вазопрессинергических нейронов супрахиазматического ядра [19]. Таким образом, наблюдавшиеся реакции в виде возбуждения у нейронов с нерегулярной активностью могут отражать локальные ауторегуляторные ответы вазопрессинергических клеток этого ядра на воздействие аргинин-вазопрессина. Различие в реакциях популяций нейронов супрахиазматического ядра с разными паттернами спайковой активности предполагает наличие существенных различий в распределении на их мембране специфических вазопрессиновых рецепторов. В супрахиазматическом ядре осуществляется экспрессия V1a- и V1b-рецепторов вазопрессина [23], при этом доминирующим является V1a подтип рецепторов, относительно равномерно распределённый по всему объёму ядра [9, 23]. Данный подтип специфических вазопрессиновых рецепторов обнаружен на мембране клеток супрахиазматического ядра, продуцирующих вазопрессин и вазоактивный

интестинальный пептид [24]. По всей видимости, V1a-рецепторы играют важную роль в механизмах реакций нейронов супрахиазматического ядра на аргинин-вазопрессин, поскольку их мРНК обнаружена в вазопрессинергических нейронах [24], однако, в ауторегуляции активности этих нейронов могут также участвовать рецепторы V1b-подтипа, подобно тому, как это происходит в супраоптическом ядре [23, 25].

Таким образом, результаты настоящего исследования *in vitro* показывают, что аргинин-вазопрессин при непосредственном воздействии способен модулировать уровень активности и оказывать влияние на спайковый код большей части нейронов супрахиазматического ядра. Учитывая обилие локальных проекций вазопрессинергических нейронов, полученные результаты раскрывают электрофизиологические особенности синхронизирующего влияния аргинин-вазопрессина, реализующегося в пределах супрахиазматического ядра.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

1. В срезах гипоталамуса крыс-самцов Вистар при внеклеточной регистрации спайковой активности клеток супрахиазматического ядра обнаруживаются нейроны с регулярной, нерегулярной и залповой активностью.
2. Воздействие 20 нМ аргинин-вазопрессина вызывает реакции спайковой активности у более половины зарегистрированных нейронов; при этом в большинстве случаев наблюдаются реакции в виде роста частоты генерации потенциалов действия, снижения энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов, отражающей степень нерегулярности генерации спайков, и ростом обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами, являющейся показателем выраженности спайкового паттерна.
3. Реакции на воздействие аргинин-вазопрессина в виде роста частоты генерации потенциалов действия, снижения энтропии логарифма распределения межспайковых интервалов и роста обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами характерны для нейронов супрахиазматического ядра с нерегулярным типом активности, предположительно являющихся вазопрессинергическими. Полученные результаты указывают на возможные механизмы участия аргинин-вазопрессина в синхронизации нейронной сети циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-29-14073.*

### **Список литературы**

1. Арушанян Э. Б. Современные представления о роли супрахиазматических ядер гипоталамуса в организации суточного периодизма физиологических функций / Э. Б. Арушанян, А. В. Попов // Успехи физиол. наук. – 2011. – Т. 42, № 4. – С. 39–58.

2. Hastings M. H. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus / M. H. Hastings, E. S. Maywood, M. Brancaccio // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2018. – Vol. 19. – P. 453–469.
3. Morin L. P. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus / L. P. Morin, K. Y. Shivers, J. H. Blanchard, L. Muscat // *Neuroscience* – 2006. – Vol. 137. – P. 1285–1297.
4. Leak R. K. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons / R. K. Leak, R. Y. Moore // *J. Comp. Neurol.* – 2001. – Vol. 433. – P. 312–334.
5. Moore R. Y. Suprachiasmatic nucleus organization / R. Y. Moore, J. C. Speh, R. K. Leak // *Cell Tissue Res.* – 2002. – Vol. 309. – P. 89–98.
6. Maywood E. S. A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits / E. S. Maywood, J. E. Chesham, J. A. O'Brien, M. H. Hastings // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108. – P. 14306–14311.
7. Maejima T. GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior / T. Maejima, Y. Tsuno, S. Miyazaki, Y. Tsuneoka, E. Hasegawa, M. T. Islam, R. Enoki, T. J. Nakamura, M. Mieda // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – Vol. 118, No 6. – e2010168118.
8. Bhumbra G. S. Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / G. S. Bhumbra, A. N. Inyushkin, K. Saeb-Parsy, A. Hon, R. E. D. Dyball // *J. Physiol.* – 2005. – Vol. 653. – P. 291–307.
9. Li J. D. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei / J. D. Li, K. J. Burton, C. Zhang, S. B. Hu, Q. Y. Zhou // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2009. – Vol. 296. – R824–R830.
10. Young W. S. The diurnal rhythm in vasopressin V1a receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin / W. S. Young, K. Kovacs, S. J. Lolait // *Endocrinology* – 1993. – Vol. 133. – P. 585–590.
11. Bhumbra G. S. Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus / G. S. Bhumbra, A. N. Inyushkin, R. E. D. Dyball // *J. Neuroendocrinol.* – 2004. – Vol. 16. – P. 390–397.
12. Инюшкин А. Н. Влияние нейропептида Y на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра крыс *in vitro* / А. Н. Инюшкин, А. А. Петрова, М. А. Ткачева, Е. М. Инюшкина // *Росс. физиол. ж. им. И. М. Сеченова* – 2015. – Т. 101, № 11. – С. 1257–1269.
13. Inyushkin A. N. Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / A. N. Inyushkin, G. S. Bhumbra, J. A. Gonzalez, R. E. D. Dyball // *J. Neuroendocrinol.* – 2007. – Vol. 19. – P. 671–681.
14. Inyushkin A. N. Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus / A. N. Inyushkin, G. S. Bhumbra, R. E. D. Dyball // *J. Neuroendocrinol.* – 2009. – Vol. 21. – P. 705–714.
15. Brown T. M. Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons *in vitro* / T. M. Brown, A. N. Coogan, D. J. Cutler, A. T. Hughes, H. D. Piggins // *Neurosci. Lett.* – 2008. – Vol. 448. – P. 273–278.
16. Colwell C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN / C. S. Colwell // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2011. – Vol. 12. – P. 553–569.
17. Jackson A. C. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons / A. C. Jackson, G. L. Yao, B. P. Bean // *J. Neurosci.* – 2004. – Vol. 24. – P. 7985–7998.
18. Kononenko N. I. Mechanism of irregular firing of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices / N. I. Kononenko, F. E. Dudek // *J. Neurophysiol.* – 2004. – Vol. 91. – P. 267–273.
19. Pennartz C. M. A. Membrane properties and morphology of vasopressin neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus / C. M. A. Pennartz, N. P. A. Bos, M. T. G. De Jeu, A. M. S. Geurtsen, M. Mirmiran, A. A. Sluiter, R. M. Buijs // *J. Neurophysiol.* – 1998. – Vol. 80. – P. 2710–2717.
20. Ingram C. D. Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus / C. D. Ingram, R. Ciobanu, I. L. Coculescu, R. Tanasescu, M. Coculescu, R. Mihai // *Prog. Brain Res.* – 1999. – Vol. 119. – P. 351–364.
21. Ingram C. D. Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat / C. D. Ingram, R. K. Snowball, R. Mihai // *Neuroscience* – 1996. – Vol. 75. – P. 635–641.
22. Bhumbra G. S. Measuring spike coding in the rat supraoptic nucleus / G. S. Bhumbra, R. E. D. Dyball // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 555. – P. 281–296.

23. Kalamatianos T. Ageing and the diurnal expression of the mRNAs for vasopressin and for the V<sub>1a</sub> and V<sub>1b</sub> vasopressin receptors in the suprachiasmatic nucleus of male rats / T. Kalamatianos, I. Kallo, C. W. Coen // *J. Neuroendocrinol.* – 2004. – Vol. 16. – P. 493–501.
24. Young W. S. The diurnal rhythm in vasopressin V<sub>1a</sub> receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin / W. S. Young, K. Kovacs, S. J. Lolait // *Endocrinology* – 1993. – Vol. 133. – P. 585–590.
25. Hurbin A. The vasopressin receptors colocalize with vasopressin in the magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus and are modulated by water balance / A. Hurbin, H. Orceel, G. Alonso, F. Moos, A. Rabie // *Endocrinology* – 2002. – Vol. 143. – P. 456–466.

## **MODULATORY EFFECTS OF ARGININE VASOPRESSIN ON NEURONES OF THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS WITH DIFFERENT TYPES OF SPIKE ACTIVITY**

*Inyushkin A. N., Isakova T. S., Inyushkina E. M., Pavlenko S. I., Inyushkin A. A.*

*Samara National Research University, Samara, Russian Federation  
E-mail: ainyushkin@mail.ru*

In the experiments on frontal hypothalamic slices of male Wistar rats, the effects of 20 nM arginine vasopressin on the spike activity of the suprachiasmatic nucleus neurons and spike information coding were studied using extracellular recordings. In 23 out of 56 neurones tested (41.1 %), a regular activity was recorded. Regular activity was characterised by high firing frequency, low value of the entropy of the log interspike interval distribution (used as measure of the variability of the interspike interval distribution), and low mutual information between adjacent log intervals (used as an objective measure of patterned activity). In 28 out of 56 neurones tested (50.0 %), non-regular activity was found. Non-regular activity was characterised by a variability of interspike intervals and pauses in spike generation lasted up to 10 seconds. The units generating non-regular activity displayed a moderate firing frequency, entropy of the log interspike interval distribution and mutual information between adjacent log intervals. Finally, in 5 out of 56 neurones tested, bursting activity was recorded. Such type of activity was characterised by alternation of high-frequency bursts, lasted from a few seconds to 1 minute, and long pauses (from 10–15 seconds to 1 minute). The units generating non-regular activity displayed a low value of the mean firing frequency alone with high value of mutual information between adjacent log intervals and respectively high value of the entropy of the log interspike interval distribution.

Application of arginine vasopressin into the perfusion solution induced changes of spike activity in 29 out of 56 neurones tested; the remaining 27 neurones (48.2 %) did not respond to arginine vasopressin. The most frequent effect of arginine vasopressin consisted of an increase in the mean spike frequency alone with a reduction of the entropy of the log interspike interval distribution and an increase in mutual information between adjacent log intervals. Such effect was recorded in 26 out of 56 (46,4 %) cells tested. This group of the neurones included 18 cells with non-regular activity, 5 cells with regular activity and 3 cells with bursting activity, and the proportion of neurones with non-regular

activity was significantly higher than regular or bursting cells ( $p < 0.001$ : z-тест). The opposite effect of arginine vasopressin (a decrease in the mean spike frequency) was observed just in 3 out of 56 suprachiasmatic neurones tested, and all the three neurones had non-regular activity.

Thus, in the group of neurones with non-regular activity, the proportion of cells displaying excitatory responses to arginine vasopressin (18 cells) was significantly higher than the proportion of cells displaying inhibitory responses (3 cells;  $p < 0.001$ : z-тест) or non-responsive cells (7 cells;  $p = 0.007$ : z-тест). By contrast, in the group of neurones with regular activity, the proportion of non-responsive cells (18 cells) was significantly higher ( $p < 0.001$ : z-тест) than the proportion of cells displayed excitatory responses (5 cells). There were no cells with regular activity displayed inhibitory responses to the application of arginine vasopressin. In the group of 5 neurones with bursting activity, 3 cells displayed excitatory responses and 2 additional cells did not respond to arginine vasopressin (the difference between the proportions of the responses is not significant:  $p > 0.05$ : z-тест).

Since non-regular spike activity is characteristic for vasopressinergic neurons of the suprachiasmatic nucleus, the data obtained show possible mechanisms of the involvement of arginine vasopressin in the synchronisation within the network generating circadian rhythmicity.

**Keywords:** suprachiasmatic nucleus, arginine vasopressin, circadian rhythms, spike activity, spike information coding.

#### References

1. Arushanyan E. B., Popov A. V. Recent data about the role of hypothalamic suprachiasmatic nucleus in circadian organization of physiological functions, *Progr. Physiol. Sci.*, **42**, 4 (2011).
2. Hastings M. H., Maywood E. S., Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus, *Nat. Rev. Neurosci.*, **19** (2018).
3. Morin L. P., Shivers K. Y., Blanchard J. H., Muscat L. Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus, *Neuroscience*, **137** (2006).
4. Leak R. K., Moore R. Y. Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons, *J. Comp. Neurol.*, **433** (2001).
5. Moore R. Y., Speh J. C., Leak R. K. Suprachiasmatic nucleus organization, *Cell Tissue Res.*, **309** (2002).
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*, **108** (2011).
7. Maejima T., Tsuno Y., Miyazaki S. [et al.] GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, 6 (2021).
8. 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.*, **653** (2005).
9. Li J. D., Burton K. J., Zhang C., Hu S. B., Zhou Q. Y. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **296** (2009).
10. Young W. S., Kovacs K., Lolait S. J. The diurnal rhythm in vasopressin V1a receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin, *Endocrinology*, **133** (1993).
11. Bhumbra G. S., Inyushkin A. N., Dyball R. E. D. Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus, *J. Neuroendocrinol.*, **16** (2004).
12. Inyushkin A. N., Petrova A. A., Tkacheva M. A., Inyushkina E. M. The effect of neuropeptide Y on spike activity of neurons in the suprachiasmatic nucleus of rat in vitro, *Russian Physiol. I. M. Sechenov Journal*, **101**, 11 (2015).

13. Inyushkin A. N., Bhumbra G. S., Gonzalez J. A., Dyball R. E. D. Melatonin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus, *J. Neuroendocrinol.*, **19** (2007).
14. Inyushkin A. N., Bhumbra G. S., Dyball R. E. D. Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus, *J. Neuroendocrinol.*, **21** (2009).
15. 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.*, **448** (2008).
16. Colwell C. S. Linking neural activity and molecular oscillations in the SCN, *Nat. Rev. Neurosci.*, **12** (2011).
17. Jackson A. C., Yao G. L., Bean B. P. Mechanism of spontaneous firing in dorsomedial suprachiasmatic nucleus neurons, *J. Neurosci.*, **24** (2004).
18. Kononenko N. I., Dudek F. E. Mechanism of irregular firing of suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slices, *J. Neurophysiol.*, **91** (2004).
19. Pennartz C. M. A., Bos N. P. A., De Jeu M. T. G. [et al.] Membrane properties and morphology of vasopressin neurons in slices of rat suprachiasmatic nucleus, *J. Neurophysiol.*, **80** (1998).
20. Ingram C. D., Ciobanu R., Coculescu I. L. [et al.] Vasopressin neurotransmission and the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus, *Prog. Brain Res.*, **119** (1999).
21. Ingram C. D., Snowball R. K., Mihai R. Circadian rhythm of neuronal activity in suprachiasmatic nucleus slices from the vasopressin-deficient Brattleboro rat, *Neuroscience*, **75** (1996).
22. Bhumbra G. S., Dyball R. E. D. Measuring spike coding in the rat supraoptic nucleus, *J. Physiol.*, **555** (2003).
23. Kalamatianos T., Kallo I., Coen C. W. Ageing and the diurnal expression of the mRNAs for vasopressin and for the V<sub>1a</sub> and V<sub>1b</sub> vasopressin receptors in the suprachiasmatic nucleus of male rats, *J. Neuroendocrinol.*, **16** (2004).
24. Young W. S., Kovacs K., Lolait S. J. The diurnal rhythm in vasopressin V<sub>1a</sub> receptor expression in the suprachiasmatic nucleus is not dependent on vasopressin, *Endocrinology*, **133** (1993).
25. Hurbin A., Orcel H., Alonso G., Moos F., Rabie A. The vasopressin receptors colocalize with vasopressin in the magnocellular neurons of the rat supraoptic nucleus and are modulated by water balance, *Endocrinology*, **143** (2002).