

**АНАЛИЗ АФФЕРЕНТНЫХ ВХОДОВ К НЕЙРОНАМ  
СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА ИЗ АРКУАТНОГО ЯДРА**

Кузютина Ольга Валерьевна, аспирант 3 курса Самарского национально-исследовательского университета имени академика С. П. Королева (биологический факультет).

Научный руководитель: д.б.н., профессор Инюшкин А.Н.

Полетаев Виталий Сергеевич, аспирант 3 курса Самарского национально-исследовательского университета имени академика С. П. Королева (биологический факультет).

Научный руководитель: д.б.н., профессор Инюшкин А.Н.

Суюндуков Рафаэль Рустамович, аспирант 2 курса биологического факультета Самарского национального исследовательского университета имени академика С.П. Королёва (биологический факультет).

Научный руководитель: д.б.н., профессор Инюшкин А.Н.

Аннотация. Идентификация и изучение характера аксонных проекций к нейронам супрахиазматического ядра из аркуатного ядра крыс *in vitro* с помощью электрофизиологической техники построения перистимульной временной гистограммы (PSTH).

Ключевые слова. Супрахиазматическое ядро (СХЯ), аркуатное ядро (АРК), циркадианный ритм, гипоталамус, спайк, перистимульная временная гистограмма (PSTH).

**ANALYSIS OF AFFERENT ENTRANCES TO SUPERCritical NUCLEI  
FROM NEURONS**

Olga V. Kuzyutina, 3rd year post-graduate student of the Samara National Research University named after academician S. P. Korolev (Faculty of Biology).

Scientific adviser: Doctor of Biological Sciences, Professor Inyushkin A.N.

Vitaly S. Poletaev, 3rd year postgraduate student of the Samara National Research University named after academician S.P.Korolev (Faculty of Biology). Scientific adviser: Doctor of Biological Sciences, Professor Inyushkin A.N.

Rafael R. Suyundukov, 2nd year postgraduate student of the Samara National Research University named after academician S.P.Korolev (Faculty of Biology). Scientific adviser: Doctor of Biological Sciences, Professor Inyushkin A.N.

Annotation. Identification and study of the nature of axonal projections to the neurons of the suprachiasmatic nucleus from the arcuate nucleus of rats in vitro using the electrophysiological technique of constructing a peristimulus time histogram (PSTH).

Keywords. Suprachiasmatic nucleus (SCN), arcuate nucleus (ARC), circadian rhythm, hypothalamus, spike, peristimulus time histogram (PSTH).

**Обзор литературных источников.** Циркадианные ритмы функциональной активности млекопитающих, проявляющиеся как на клеточном, так и на организменном уровнях, формируются под влиянием специальных нейронов-пейсмекеров, биологическая роль которых заключается в способности организма контролировать различные ритмы таких процессов, как метаболизм, клеточная пролиферация, поведенческие реакции (сон, бодрствование, прием пищи и воды, локомоторная активность и др.). Данные нейроны локализованы в супрахиазматическом ядре (СХЯ) гипоталамуса [8,9]. В нервной системе работу пейсмекеров можно увидеть в ритмической колебании выделения и выработки физиологически активных веществ, таких как серотонин, норадреналин, ацетилхолин, а также в уровне экспрессии рецепторов к данным веществам. Ритмогенерирующая функция СХЯ была доказана еще в 90-е годы двадцатого столетия в опытах с локальным разрушением и трансплантацией.

Благодаря афферентной информации, получаемой СХЯ происходит синхронизация ритма циркадианного осциллятора с ежесуточными ритмически повторяющимися событиями в окружающей среде.

Было выдвинуто предположение о наличии физиологической связи между супрахиазматическим и аркуатным (АРК) ядрами гипоталамуса, для подтверждения которого проводились различные эксперименты, заключающиеся в воздействии на нейроны АРК и выявлении их проекции в СХЯ. На данный момент все публикации, описывающие характеристики проекций из аркуатного ядра в супрахиазматическое, использовали нейрохимическое техники или токсические трейсеры [4]. Даже при условии, что электрофизиологические исследования данных проекций не производились, особый интерес представляло использование перистимульной временной гистограммы (PSTH) [1,5]. Данная методика позволяет не только идентифицировать наличие аксонных проекций, но и выявить их функциональный характер – возбуждающий или тормозный. Это способствовало выяснению механизмов воздействия нейронов АРК на клетки СХЯ [3,5,6].

**Описание эксперимента.** Для экспериментов потребовалось 12 лабораторных крыс-самцов массой тела от 90 до 130 г. В начале эксперимента животные наркотизировались уретаном (1.3 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировались. При помощи вибротома Vibroslice NVSL (World Precision Instruments, США) при температуре около +2 °С готовились сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, содержащие супрахиазматическое и аркуатное ядра.

Срезы помещались в раствор следующего состава: NaCl - 124 mM, NaHCO<sub>3</sub> - 25 mM, KCl - 3 mM, CaCl<sub>2</sub> - 1,5 mM, MgSO<sub>4</sub> - 1 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 0,5 mM, D-глюкоза - 30 mM. В этом растворе срезы инкубировались при температуре 37 °С по меньшей мере в течение часа до начала регистрации. Раствор насыщался карбогеном (95% кислорода и 5% углекислого газа). В ходе регистрации срезы перфузировались 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 антивибрационной платформе (Vibration - Free Workstation 800lbs 30x36", 2", World Precision Instruments, США), включала перфузионную камеру, масляный микроманипулятор и микроскоп (МБС-12, ЛОМО, Россия).

В ходе эксперимента изучали спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра *in vitro*, и ее модуляции, возникающие при электростимуляции аркуатного ядра с целью электрофизиологической характеристики состояния аксонных проекций к супрахиазматическим нейронам. При этом использовалась техника перистимульной временной гистограммы (PSTH).

Регистрация спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра производилась внеклеточно стеклянными микроэлектродами с диаметром кончика около 1 мкм, заполненными раствором для перфузии. Микроэлектроды готовились из боросиликатных капилляров с внешним диаметром 1.5 мм и внутренним диаметром 0.86 мм (Sutter Instruments, США). После заполнения раствором сопротивление микроэлектродов составляло около 10 МОм.

Сигнал с микроэлектрода подавался на вход усилителя биопотенциалов (Dagan 2400A, Dagan Corporation, США). Для эффективного поиска спайковой активности клеток сигнал прослушивался с помощью канала усиления низкой частоты, интегрированного в усилителе биопотенциалов. С выхода усилителя сигнал подавался на вход устройства HumBag 50/60 Hz Noise Eliminator (Quest Scientific, Канада) для блокировки шума частотой 50 Гц. Далее аналоговый сигнал отцифровывался при помощи АЦП Micro 1401 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) и регистрировался на персональном компьютере. Для регистрации, обработки и хранения данных использовалась программа Spike 2 v. 4.02 (Cambridge Electronic Design, Великобритания).

Перед началом стимуляции, регистрировали базовую спайковую активность (в исходном состоянии) в течении 5 мин., для того, чтобы убедиться в ее стабильности. Исследованию подвергали лишь те нейроны, амплитуда спайков которых превышала амплитуду шума не менее, чем в 5 раз.

Стимулирующий биполярный электрод помещался в область каудального отдела аркуатного ядра и во время регистрации спайковой активности нейронов СХЯ производилась электростимуляция аркуатного ядра (1 Гц, 200 пА) в течение 200-500 с., в зависимости от частоты генерации потенциалов действия [2].

Полученные с помощью программы Spike 2 v. 4.02 (Cambridge Electronic Design, Великобритания) записи позволяют построить перистимульные временные гистограммы (PSTHs), которые используются для определения интенсивности и характера (возбуждающего или тормозного) аксонных проекций из аркуатного в супрахиазматическое ядро.

Началом отсчета принимается время подачи стимула и отмечается на графике как 0. Период (200 мс) непосредственно перед началом импульсов стимуляции служит контролем. Наличие в PSTH высокого столбца, следующего непосредственно после подачи стимула (т. е. 0) сигнализирует о возбуждающем характере аксонных проекций. В противном случае, т. е. при полном отсутствии активности в нейронах СХЯ в период непосредственно следующий за стимулом, является свидетельством тормозного характера проекций. Если не наблюдаются видимые различия на графике в периодах до и после 0, то делаем вывод об отсутствии проекций в данных нейронах. Также встречаются случаи смешанных комплексных реакций коротколатентного ортодромного торможения с последующим длиннолатентным возбуждением или наоборот.

На гистограммах оценивали латентный период реакции и ее продолжительность.

Статистическое подтверждение наличия признаков возбуждения или торможения на перистимульной временной гистограмме производили с помощью методики кумулятивного суммирования данных [5]. Статистически значимыми считали реакции с  $P < 0,01$ .

### **Результаты статистической обработки данных.**

Нами были изучены реакции 51 нейрона супрахиазматического ядра. 32 из 51 (63%) протестированных нейронов показали статистически значимые реакции в ответ на стимуляцию. У 17 клеток из 51 (33,3%) нейрона, прореагировавших на стимуляцию аркуатного ядра, наблюдались простые однофазные ответы в виде возбуждения или торможения. Сложные двух- или трёхфазные реакции в виде различных сочетаний возбуждения и торможения были выявлены у 15 из 51 нейрона (29,4%). Такие сложные реакции не были предметом исследования в рамках настоящей работы и их анализ не проводился. В оставшихся 19 случаях (37,3%) статистически значимых реакций спайковой активности на стимуляцию аркуатного ядра не выявлялось.

Производя сравнения параметров ортодромного возбуждения и торможения нами были обнаружены следующие различия. Латентный период возбуждения оказался продолжительнее латентного периода торможения ( $P = 0.036$ : test Mann-Whitney) (Рис. 1.1). В тоже время продолжительность возбуждения была короче, чем продолжительность торможения ( $P = 0.013$ : test Mann-Whitney) (Рис. 1.2).

У 15 из 51 нейрона (29,4%) имели место сложные двух- или трёхфазные реакции в виде различных сочетаний возбуждения и торможения. Данные сложные комплексные реакции не были предметом исследования в рамках настоящей работы и их анализ не проводился.

У 19 из 51 протестированных нейронов супрахиазматического ядра (37,3%) в исходном состоянии статистически значимых реакций параметров перистимульной временной гистограммы на стимуляцию аркуатного ядра обнаружено не было.

Время (с)

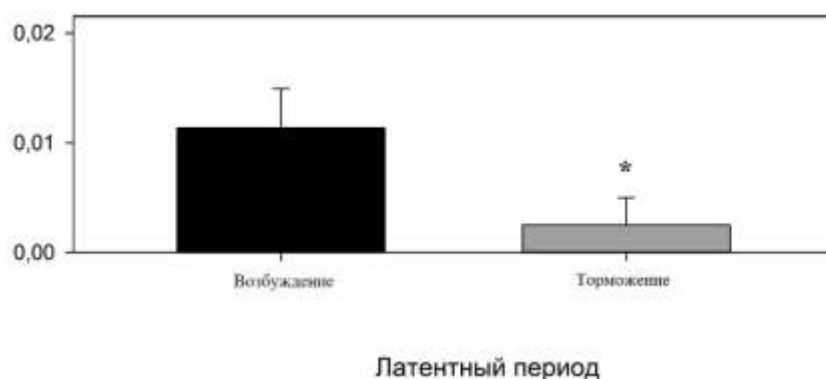


Рис.1.1. Сравнение латентных периодов в реакциях возбуждения и торможения. Звёздочкой отмечено статистически значимое различие между группами ( $P < 0,05$ : непарный t-тест).

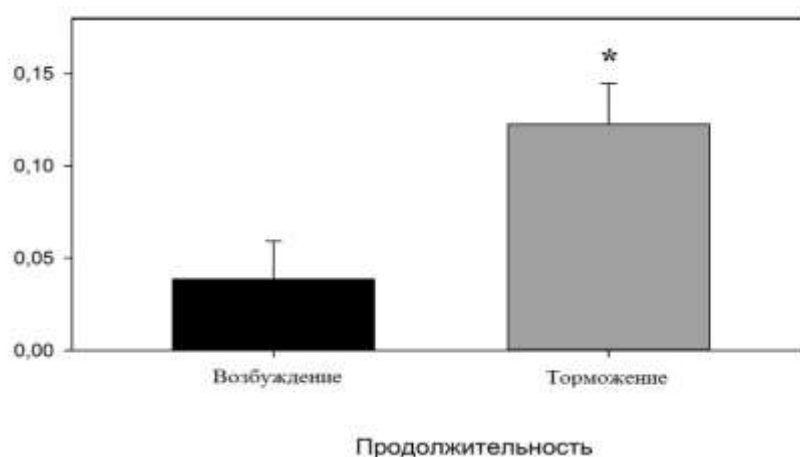


Рис.1.2. Сравнение общей продолжительности реакций возбуждения и торможения. Звёздочкой отмечено статистически значимое различие между группами ( $P < 0,05$ : непарный t-тест).

### Выводы

1. При анализе перистимульных временных гистограмм доказано существование аксонных проекций из аркуатного в супрахиазматическое ядро.
2. При стимуляции аркуатного ядра выявлены реакции типа: возбуждение, торможение, сложные двух- или трёхфазные реакции в виде различных

сочетаний возбуждения и торможения, а также отсутствие реакций. Это свидетельствует о наличии возбуждающих и тормозных проекций из аркуатного в супрахиазматическое ядро.

3. Статистически значимые реакции в ответ на стимуляцию были зарегистрированы у 32 из 51 (63,0%) протестированных нейронов. При этом 33,3% нейронов супрахиазматического ядра отвечали на стимуляцию аркуатного ядра простыми однофазными, а 29,4% - комплексными реакциями.

4. При сравнении параметров ортодромного (т.е. обычного, от тела нейрона) возбуждения и торможения нейронов супрахиазматического ядра установлено, что латентный период возбуждения продолжительнее латентного периода торможения. В тоже время общая продолжительность возбуждения короче, чем продолжительность торможения.

5. Анализ результатов проведенных экспериментов свидетельствует о возможности оказывать возбуждающее и тормозное влияние на функциональное состояние клеток циркадианного осциллятора супрахиазматического при стимуляции нейронов аркуатного ядра. Эти влияния могут лежать в основе настройки осциллятора в соответствии с уровнем активности центра регуляции аппетита, метаболизма и режима питания, расположенного в аркуатном ядре гипоталамуса.

## **СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Bhumbra G. S., Orlans H. O. and Dyball R. E. J. Osmotic modulation of stimulus-evoked responses in the rat supraoptic nucleus. // *European Journal of Neuroscience*. 2008. Vol. 27. pp. 1989–1998.
2. Blasiak A., Blasiak T., Lewandowski M.H.. Electrophysiology and pharmacology of the optic input to the rat intergeniculate leaflet in vitro. // *Journal of physiology and pharmacology*. 2009, vol. 60. 1. p. 171–180.



3. Chun-Xia Yi, Jan van der Vliet, et al. Ventromedial Arcuate Nucleus Communicates Peripheral Metabolic Information to the suprachiasmatic nucleus. // *Endocrinology*. 2006. Vol.147(1). p. 283–94.
4. 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.
5. Cui L.-N., Saeb-Parsy K. and Dyball R. E. J.. Neurones in the supraoptic nucleus of the rat are regulated by a projection from the suprachiasmatic nucleus. // *Journal of Physiology*. 1997. Vol. 502.1. pp.149–159.
6. Guzman-Ruiz M., Saderi N., et al. The suprachiasmatic nucleus changes the daily activity of the arcuate nucleus  $\alpha$ -MSH neurons in male rats. // *Endocrinology*. 2014 Feb. Vol. 155(2). – p. 525–535.
7. Krout K.E., Nguyen X.V., Karpitskiy V., Kollert A., Mettenleiter T.C., Loewy A.D. Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat Neurosci*. 1999 Dec; 2(12):1051-3.
8. Meijer J.H., Rietveld W.J. Neurophysiology of the fetus and suprachiasmatic circadianpacemaker in rodents. // *Physiol. Rev*. 1989. Vol. 69. P. 671–707.
9. Moore R.Y. Development of the suprachiasmatic nucleus. *Suprachiasmatic nucleus: Themind's clock* / Ed. D.C. Klein et al. N.Y. : Oxford Univ. press. 1991. P. 391–404.
10. Shinohara K., Honma S., Katsuno Y, Abe H., Honma K. Circadian release of amino acidsin the suprachiasmatic nucleus in vitro. // *Neuroreport*. 1998. Vol. 9. P. 137–140.
11. Shinohara K., Tominaga K., Inouye S.T.. Phase dependent response of vasoactive intestinalpolypeptide to light and darkness in the suprachiasmatic nucleus. // *Neurosci. Res*. 1999. Vol. 33. 1. R 105–110.