

## ВЛИЯНИЕ ГРЕЛИНА НА СПАЙКОВУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙРОНОВ СУПРАХИАЗМАТИЧЕСКОГО ЯДРА КРЫСЫ

© 2024 г. А. Н. Инюшкин, А. Ю. Шарафутдинова, Е. М. Инюшкина,  
А. А. Инюшкин\*

*Самарский национальный исследовательский университет им. академика*

*С. П. Королева, Самара, Россия*

*\* E-mail: ainyushkin@mail.ru*

Поступила в редакцию 16.04.2024 г.

После доработки 15.05.2024 г.

Принята к публикации 16.05.2024 г.

В одном из важнейших нефотических механизмов синхронизации циркадианных биологических часов супрахиазматического ядра гипоталамуса с внешним геофизическим 24-часовым ритмом используется информация о режиме питания, составе и калорийности пищи. В рамках данного механизма потенциальным носителем сигнала является гормон грелин – продукт нейроэндокринных париетальных клеток слизистой оболочки желудка. В экспериментах на сагиттальных срезах гипоталамуса крыс-самцов Вистар изучали влияние 25 нМ грелина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра. Аппликации грелина приводили к росту частоты спайков и снижению энтропии распределения межспайковых интервалов у 32.1% зарегистрированных нейронов. У 29.6% клеток наблюдались реакции противоположной направленности, в виде снижения активности и роста энтропии распределения межспайковых интервалов. Показатели спайковой активности остальных 38.3% нейронов супрахиазматического ядра не изменялись. Наблюдавшиеся изменения энтропии распределения межспайковых интервалов свидетельствуют о соответствующих изменениях степени нерегулярности межспайковых интервалов под влиянием грелина. Аппликация селективного высокоаффинного антагониста GHS-R1a рецептора JMV 2959 (100 нМ) не приводила к изменениям исследуемых параметров спайковой активности, однако она полностью предотвращала изменения частоты спайков и энтропии распределения межспайковых интервалов, возникавшие в присутствии грелина. Полученные данные показывают, что гормон грелин при непосредственном воздействии на супрахиазматическое ядро *in vitro* оказывает модулирующее влияние на уровень активности и спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов этого ядра, причем обнаруженные эффекты грелина реализуются через GHS-R1a рецепторы. Результаты настоящего исследования служат дополнительным аргументом в пользу гипотезы об участии грелина в механизмах нефотической настройки циркадианных биологических часов в соответствии с выраженностью пищевой мотивации и уровнем метаболизма.

*Ключевые слова:* грелин, биологические часы, циркадианные ритмы, супрахиазматическое ядро, спайковая активность, спайковый код

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепринятым является положение о том, что все разнообразие циркадианных ритмов регулируется биологическими часами супрахиазматического ядра гипоталамуса [1, 2]. Период эндогенного циркадианного ритма осциллятора супрахиазматического ядра обычно не соответствует 24-часовой продолжительности суток, в связи с чем нуждается в синхронизации с геофизическим суточным ритмом окружающего мира. Наряду с основным, фотическим механизмом синхронизации, основанным на афферентации от фоточувствительных ганглиозных клеток сетчатки [3], в циркадианной системе млекопитающих существуют и другие, нефотические механизмы синхронизации биологических часов. В рамках одного из них роль синхронизирующего сигнала выполняет информация о режиме питания, составе и калорийности пищи. При этом циркадианные часы регулируют суточный паттерн обмена питательных веществ и энергии, а метаболические и гормональные регуляторы являются носителями синхронизирующего сигнала обратной связи [4, 5].

Одним из биохимических регуляторов, потенциально способных принимать участие в синхронизации циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра в соответствии с пищевой мотивацией и уровнем метаболизма, является орексигенный гормон грелин. Основным местом продукции этого гормона являются нейроэндокринные париетальные клетки слизистой оболочки желудка, при этом продукция грелина растет при голодании и снижается после приема пищи [6]. В исследовании, выполненном на голодающих добровольцах, продемонстрировано, что суточный паттерн периодов роста концентрации грелина в плазме крови соответствует времени приема пищи в дни, предшествующие голоданию, при этом не было обнаружено корреляции концентрации грелина с глюкозой, инсулином и гормоном роста [7].

Из системного кровотока грелин способен проникать сквозь гематоэнцефалический барьер и непосредственно действовать на структуры гипоталамуса, при этом важную роль в транспорте грелина приписывают фенестрированным капиллярам, обеспечивающим возможность его воздействия на данный отдел мозга [8]. Модуляция грелином центральных механизмов регуляции аппетита продемонстрирована в исследовании на крысах, где введение экзогенного грелина в латеральный желудочек мозга стимулировало потребление пищи дозозависимым образом [9]. Кроме этого, получены свидетельства существования центральной продукции грелина нейронами ряда ядер гипоталамуса, в частности, аркуатного, паравентрикулярного, дорсомедиального, вентромедиального ядра; менее значительный уровень продукции грелина обнаружен в супрахиазматическом ядре и в ряде экстрагипоталамических структур [10, 11].

Эффекты грелина реализуются через рецепторы секретогона гормона роста GHS-R1a, относящиеся к семейству рецепторов, сопряженных с G-протеинами [12, 13]. В мозге наивысшая концентрация мРНК GHS-R1a рецепторов обнаружена в нейронах супрахиазматического, аркуатного, вентромедиального, паравентрикулярного и других ядер гипоталамуса [14–16]. Присутствие в данном списке супрахиазматического ядра указывает на возможность непосредственного влияния грелина на функцию циркадианных часов. Такая возможность подтверждена исследованием на трансгенных мышцах с нокаутом грелиновых рецепторов, у которых обнаружены нарушения циркадианных ритмов локомоторной активности и питания [17]. Периферическое введение грелиномиметика GHRP-6 приводило к уменьшению фазового запаздывания циркадианного ритма, вызванного световым воздействием в ZT 13 на 45% [18], что косвенно подтверждает существование модулирующего влияния на циркадианные часы со стороны грелинергической системы. В электрофизиологической работе, выполненной на срезах гипоталамуса мышей, было продемонстрировано, что непосредственное воздействие грелина на супрахиазматическое ядро в середине

проецированного светлого времени суток (ЗТ 6) приводит к 3-часовому опережающему сдвигу циркадианного ритма частоты спайков и ритма экспрессии комплекса *mPER2::LUC* [19]. Вместе с тем в данной работе не содержится сведений о влиянии грелина на частоту потенциалов действия и параметры спайкового кодирования информации, существенно дополняющие характеристику биоэлектрической активности нейронов [20]. Особое внимание к спайковому кодированию информации нейронами супрахиазматического ядра обусловлено тем, что в исследовании на крысах *in vivo* [21] было продемонстрировано существование в нейронах циркадианного осциллятора суточного ритма параметров спайкового кода. До сих пор возможное влияние гормона грелина на спайковую активность и спайковый код нейронов циркадианного осциллятора оставалось неизученным. При этом известно о способности других гормонов и нейропептидов, участвующих в формировании пищевой мотивации, в частности, лептина, нейропептида Y, орексина модулировать параметры спайковой активности клеток супрахиазматического ядра [22–24].

В настоящей работе, выполненной на срезах гипоталамуса крыс, изучены особенности влияния грелина на спайковую активность и параметры спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра и установлено, что эффекты грелина реализуются через рецепторы секретагога гормона роста GHS-R1a.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 37 крысах-самцах Вистар массой тела 80–140 г. Крысы содержались в виварии при режиме освещения в виде регулярной смены 12-часовых светлых и темных периодов и имели свободный доступ к воде и пище.

В начале эксперимента животных наркотизировали уретаном (Sigma-Aldrich, США, 1.2 г/кг массы тела внутривенно) и декапитировали. Из полости черепа быстро извлекали головной мозг и охлаждали в искусственной цереброспинальной жидкости (иЦСЖ) при температуре 1–3 °С. С помощью вибратора (NVSL, World Precision Instruments, США) готовили сагиттальные срезы гипоталамуса толщиной 300 мкм, включавшие супрахиазматическое ядро. Состав иЦСЖ был следующим (мМ): 124 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 3 KCl, 1,5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 0,5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 глюкозы. Приготовленные срезы инкубировали в насыщенном карбогеном (95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub>) иЦСЖ по меньшей мере в течение часа при температуре 37 °С до начала регистрации. Регистрацию активности нейронов в срезах производили в камере из органического стекла при температуре 27–30 °С. Ложе для срезов, выполненное из полиэтиленовой сетки, находилось приблизительно на 0.5 см выше дна камеры, что позволяло перфузионному раствору равномерно омывать обе поверхности среза. В камере срезы фиксировали с помощью 5 параллельных 20 мкм нейлоновых нитей, натянутых на плоскую П-образную рамку из нержавеющей стали. Во время регистрации срезы перфузировали иЦСЖ, насыщенным карбогеном, с постоянной скоростью 1.5 мл/мин с помощью перистальтической помпы (Minipuls 3, Gilson, Франция).

Спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра регистрировали внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика около 1 мкм, заполненных иЦСЖ того же состава. Сигнал от микроэлектрода усиливали (Dagan 2400A, США), устраняли шум частотой 50 Гц (Hum Bug; Quest Scientific, Канада), оцифровывали (Micro 1401, CED, Великобритания) и подавали на персональный компьютер. Для визуализации, хранения и первичной обработки данных использовался программный пакет Spike 2 (CED, Великобритания).

В первой серии экспериментов регистрировали изменения параметров спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра ( $n = 81$ ) на аппликации 25 нМ грелина (Merck) в перфузионный раствор. Концентрацию грелина выбирали на основании данных литературы о значении EC<sub>50</sub> при взаимодействии данного вещества

со специфическими рецепторами GHS-R1a [25]. Регистрацию активности нейронов производили в светлое время суток (в период с ZT 4 до ZT 12; где ZT 0 соответствует моменту включения освещения в виварии). После появления спайковой активности нейрона в исходном состоянии, в течение 10 мин наблюдали за стабильностью частоты потенциалов действия. При отсутствии заметной тенденции к нарушению постоянства этого показателя перфузию меняли на раствор того же состава с добавлением грелина на 10 мин, а затем возвращались к исходному раствору на 15 мин для «отмывания» среза от исследуемого вещества. С целью исключения возможной десенситизации, к каждому срезу всегда производили однократную аппликацию грелина.

Для оценки эффектов грелина сравнивали значение параметров спайковой активности в течение двух пятиминутных интервалов времени: в исходном состоянии (непосредственно перед аппликацией), и в конце периода аппликации. Нейронами, реагирующими на воздействие, считались лишь те, у которых частота спайков изменялась под влиянием грелина не менее, чем на 20% от исходной [22]. Для определения степени восстановления спайковой активности анализировали ее параметры в течение заключительного пятиминутного периода «отмывания» среза и сравнивали с исходной активностью.

Экспериментальный протокол второй серии опытов, выполненной на 22 нейронах супрахиазматического ядра, отличался тем, что после первоначальной 10-минутной регистрации активности нейрона в исходном состоянии производили 20-минутную аппликацию в перфузионный раствор 100 нМ JMV 2959 (Merck) – антагониста рецептора секреторного гормона роста GHS-R1a. При выборе концентрации антагониста опирались на данные об IC<sub>50</sub> [13]. Через 10 мин после начала действия антагониста в перфузионный раствор дополнительно апплицировали 25 нМ грелина на 10 мин, так что в течение этого периода грелин и антагонист действовали одновременно. После этого возвращались к перфузии и ЦСЖ на 15 мин в попытке «отмывания» среза от исследуемых веществ.

Первичную обработку зарегистрированных нейронограмм производили с помощью компьютерной программы LabSpike [26]. Использование программы позволяло тщательно выделить все зарегистрированные спайки из шума и артефактов, а также убедиться, что источником всех зарегистрированных спайков является один и тот же нейрон. После этого рассчитывали значение параметров спайковой активности. При этом наряду с расчётом основного «традиционного» параметра электрической активности – частоты спайков (Гц), вычисляли два параметра, характеризующих спайковое кодирование информации: энтропию распределения межспайковых интервалов (бит), отражающую степень нерегулярности продолжительности последних, и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами (бит), являющуюся показателем паттернирования спайковой информации. Методика расчета параметров спайковой активности была подробно описана ранее [21, 24, 26, 27].

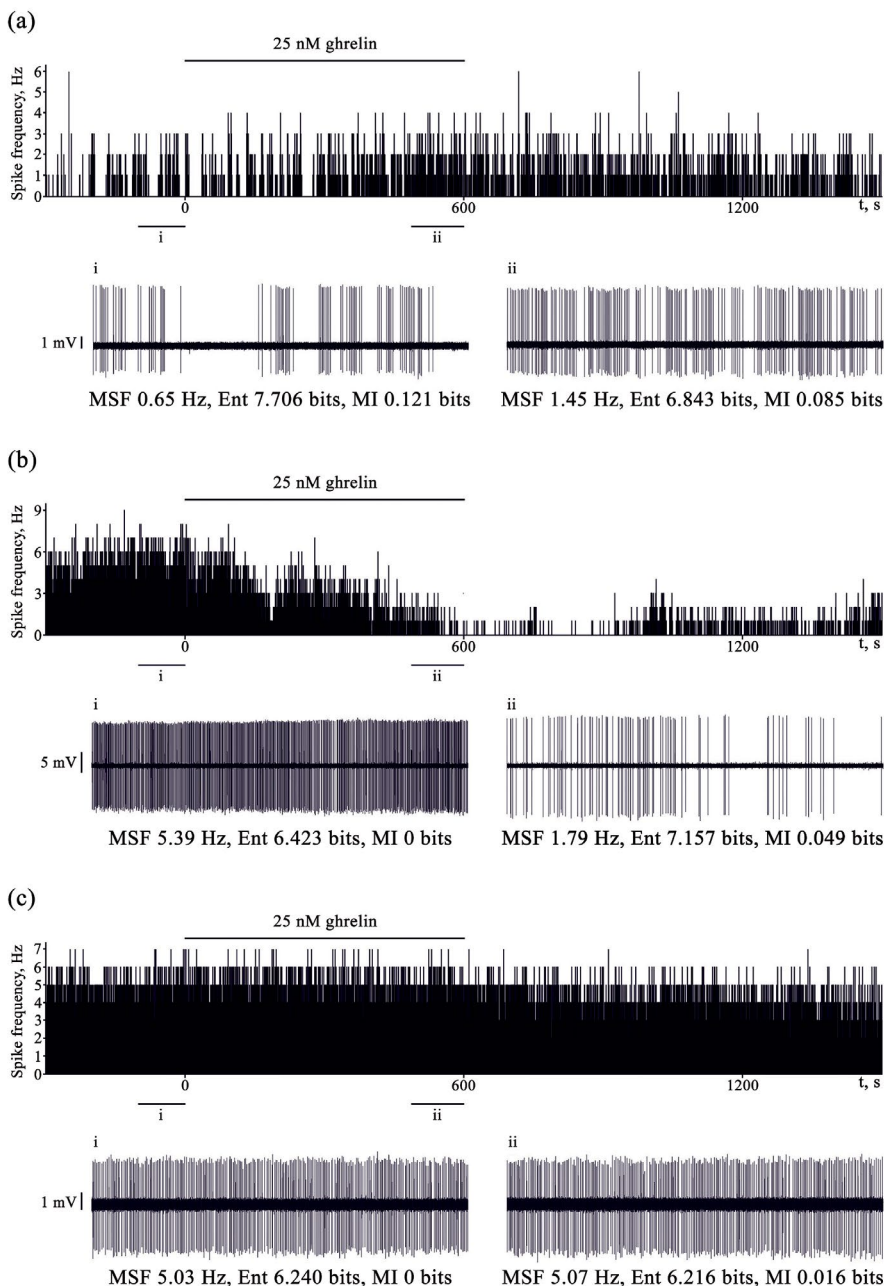
Полученные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения значений исследуемых показателей в исходном состоянии, в период действия веществ и заключительного «отмывания» среза использовали тест ANOVA с апостериорным тестом Стьюдента-Ньюмена-Кейлса. Сравнение значений параметров спайковой активности у нейронов разных групп выполняли с использованием теста Манна-Уитни (распределение данных в выборках отличалось от нормального). Нормальность распределения данных проверяли с помощью теста Шапиро-Уилка, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Статистические данные о параметрах спайковой активности, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние арифметические ± стандартные ошибки среднего ( $M \pm SEM$ ), в остальных случаях – как медиана и квартили: Me (Q1; Q2). Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

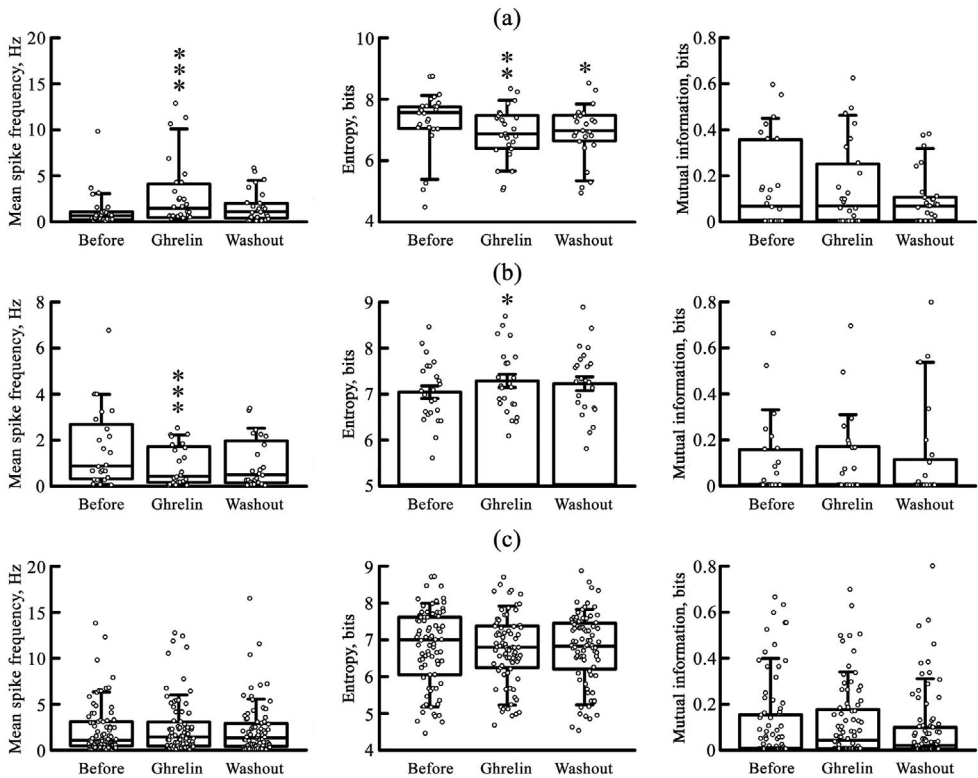
Реакции параметров спайковой активности на воздействие грелина изучены на 81 нейроне супрахиазматического ядра. В исходном состоянии частота потенциалов действия для всей группы нейронов равнялась 1.08 (0.45; 3.13) Гц, энтропия распределения межспайковых интервалов была равна  $6.79 \pm 0.12$  бит, а обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами составляла 0.008 (0.000; 0.155) бит.

Аппликации 25 нМ грелина в перфузионный раствор вызвали изменение частоты потенциалов действия у 50 из 81 протестированного нейрона, что составило 61.7%. При этом у 26 нейронов (32.1%) реакции на воздействие грелина характеризовались ростом частоты спайков. Пример реакции на аппликацию грелина в виде повышения спайковой активности показан на рис. 1а. В этой группе нейронов ранговый тест ANOVA показал значимый рост частоты спайковой активности ( $p < 0.001$ ), а апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями данного показателя, равнявшимся 0.66 (0.22; 1.19) Гц в исходном состоянии и 1.47 (0.45; 4.11) Гц ( $p < 0.001$ ) на фоне действия грелина. Характерной особенностью реакций этих нейронов на аппликацию грелина было снижение энтропии распределения межспайковых интервалов ( $p < 0.001$ : ранговый тест ANOVA). Апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями энтропии, которая в исходном состоянии составила 7.565 (7.036; 7.772) бит, а в период действия грелина – 6.867 (6.388; 7.489) бит ( $p < 0.01$ ). После «отмывания» среза и ЦСЖ значение энтропии распределения межспайковых интервалов равнялось 6.977 (6.613; 7.489) бит и все еще не отличалось от исходного ( $p < 0.05$ ), что указывает на неполное восстановление нерегулярности спайковой активности. Статистически значимых изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов этой группы обнаружено не было: ( $p > 0.05$ : ранговый тест ANOVA). Данные об изменениях параметров спайковой активности нейронов, отвечавших на воздействие грелина ростом частоты потенциалов действия ( $n = 26$ ), представлены на рис. 2а.

Реакции нейронов противоположной направленности, в виде снижения биоэлектрической активности ( $p < 0.001$ : ранговый тест ANOVA) под действием 25 нМ грелина, зарегистрированы в 24 случаях из 81 (29.6%). Пример такой реакции представлен на рис. 1б. В исходном состоянии частота потенциалов действия и обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами у нейронов данной группы не имела статистически значимых различий с нейронами, показавшими рост активности под влиянием грелина ( $p > 0.05$ : тест Манна-Уитни). Однако, значение энтропии распределения межспайковых интервалов оказалось выше в группе нейронов, реагировавших на воздействие грелина ростом активности – 7.565 (7.036; 7.772) бит, по сравнению с нейронами, активность которых под влиянием грелина снижалась – 7.026 (6.564; 7.580) бит ( $p < 0.05$ : тест Манна-Уитни). Апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил снижение медианы частоты спайков у нейронов данной группы ( $n = 24$ ) с 0.88 (0.30; 2.79) Гц в исходном состоянии до 0.43 (0.15; 1.76) Гц в присутствии грелина ( $p < 0.001$ ). Одновременно со снижением уровня спайковой активности у этих нейронов при воздействии грелина наблюдалось повышение энтропии распределения межспайковых интервалов. Тест ANOVA показал значимый рост данного показателя ( $p < 0.05$ ), а апостериорный тест Стьюдента-Ньюмена-Кейлса выявил различия между значениями энтропии в исходном состоянии ( $7.041 \pm 0.137$  бит) и на фоне действия грелина ( $7.286 \pm 0.144$  бит,  $p < 0.05$ ). Изменений обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами обнаружено не было ( $p > 0.05$ : ранговый тест ANOVA). На рис. 2б представлены статистические данные об изменениях параметров спайковой активности в группе нейронов, отвечавших на воздействие грелина снижением частоты потенциалов действия ( $n = 24$ ).



**Рис. 1.** Примеры реакций нейронов супрахиазматического ядра на аппликацию 25 нМ грелина в виде роста спайковой активности (а), снижения спайковой активности (б) и отсутствия существенных изменений активности (с). Для всех нейронов в верхней части рисунка представлены гистограммы с данными об изменении уровня спайковой активности клеток по ходу эксперимента. Период аппликации грелина показан горизонтальным отрезком над гистограммой. По оси абсцисс – время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат – частота спайков (Гц). Горизонтальным отрезкам под гистограммой (i, ii) соответствуют 100-секундные интервалы записи спайковой активности нейронов, представленные под гистограммой: (i) – непосредственно перед воздействием, (ii) – в конце аппликации грелина.



**Рис. 2.** Статистические данные о влиянии 25 нМ грелина на среднюю частоту потенциалов действия, Гц (левые диаграммы), энтропию распределения межспайковых интервалов, бит (средние диаграммы) и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами, бит (правые диаграммы) нейронов супрахиазматического ядра. (а) Нейроны, активность которых повышалась под влиянием грелина ( $n = 26$ ). (б) Нейроны, активность которых снижалась под влиянием грелина ( $n = 24$ ). (с) Вся совокупность зарегистрированных нейронов ( $n = 81$ ). Обозначения под диаграммами: Before – исходное состояние; Ghrelin – на фоне действия грелина; Washout – после «отмывания» среза иЦСЖ. Звёздочками отмечены статистически значимые различия с исходным состоянием: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Остальные нейроны (31 из 81; 38.3%) не изменяли уровень спайковой активности в присутствии грелина ( $p > 0.05$ ; ранговый тест ANOVA). В данной группе нейронов по ходу эксперимента также не выявлялось изменений энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами ( $p > 0.05$ ; ранговый тест ANOVA). Пример отсутствия реакции на воздействии 25 нМ грелина представлен на рис. 1с. Анализ реакций на воздействие грелина всех протестированных нейронов как единой группы ( $n = 81$ ) также не выявил статистически значимых изменений частоты спайков, энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами ( $p > 0.05$ ; ранговый тест ANOVA), что подтверждает разнонаправленность реакций отдельных категорий нейронов внутри общей группы. Статистические данные о параметрах спайковой активности всех протестированных нейронов супрахиазматического ядра как единой группы по ходу эксперимента представлены на рис. 2с.

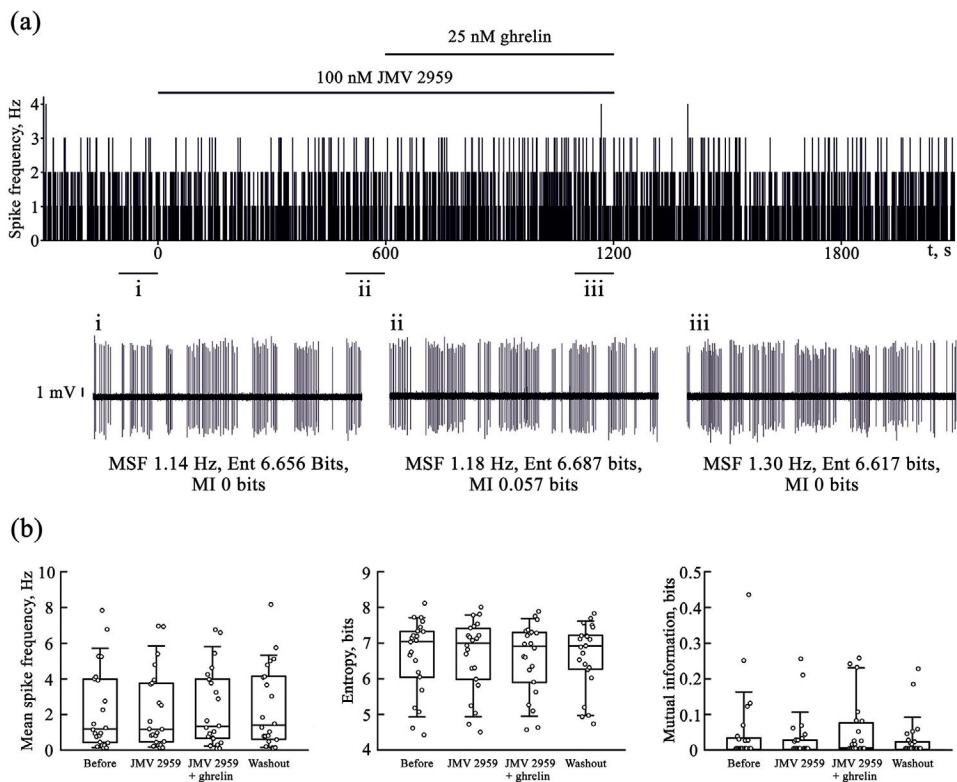
Поскольку активность грелина реализуется через GHS-R1a рецепторы [25], в отдельной серии экспериментов на 22 нейронах супрахиазматического ядра изучены эффекты селективного антагониста этих рецепторов JMV 2959. Установлено, что аппликация данного антагониста в концентрации 100 нМ сама по себе не оказывает влияния на параметры спайковой активности нейронов, однако она эффективно предотвращает влияние 25 нМ грелина. Пример экспериментальной записи, представленный на рис. 3а, показывает отсутствие существенных изменений спайковой активности как в период действия антагониста, так и в период воздействия грелина на фоне JMV 2959. В данной серии экспериментов лишь в одном из 22 случаев (4.5%) зарегистрирован рост частоты спайков выше порогового уровня, принятого в настоящем исследовании (> 20%) под влиянием грелина на фоне антагониста GHS-R1a рецепторов, что значительно меньше ( $p < 0.05$ : z-тест), чем в первой серии экспериментов (26 из 81 нейрона). Ранговый тест ANOVA не выявил существенных изменений частоты спайков, энтропии распределения межспайковых интервалов и обоюдной информации между сопряжёнными межспайковыми интервалами по ходу эксперимента с использованием грелина на фоне антагониста GHS-R1a рецепторов ( $p > 0.05$ : ранговый тест ANOVA,  $n = 22$ ). Статистические данные о значениях параметров спайковой активности на всех последовательных стадиях эксперимента представлены на рис. 3б. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние грелина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра реализуется через GHS-R1a рецепторы.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синхронизация циркадианного осциллятора млекопитающих, расположенного в супрахиазматическом ядре, с 24-часовым ритмом окружающего мира осуществляется с участием совокупности времязадателей. Главным среди них является суточный ритм естественного освещения, действующий в рамках фотического механизма настройки биологических часов [3]. Наряду с данным механизмом, в циркадианной системе существуют также нефотические механизмы синхронизации циркадианнных часов. В частности, важную роль в нефотической настройке биологических часов играют времязадатели, связанные с пищей, такие как суточный режим питания, состав и калорийность пищи, а также метаболические и гормональные сигналы, являющиеся носителями информации о метаболическом статусе и уровне питательных веществ [28–30]. Однако физиологический механизм пищевой синхронизации циркадианной системы остается недостаточно изученным [31]. Ранее популярная гипотеза о существовании осциллятора, настраиваемого пищей (“food entrainable oscillator”, FEO) и независимого от циркадианнных часов супрахиазматического ядра [32], не нашла достаточных экспериментальных подтверждений, поскольку локализацию такого осциллятора установить не удалось, и само существование его осталось недоказанным.

В качестве потенциального времязадателя циркадианной системы, являющегося носителем сигнала о пищевой мотивации и уровне метаболизма, рассматривается орексигенный гормон грелин. Главным местом продукции этого гормона являются нейроэндокринные клетки слизистой оболочки желудка, выработка грелина в которых растет при голодании и снижается после приема пищи [6]. Важно заметить, что суточный паттерн периодов роста концентрации грелина в плазме крови голодного человека соответствует времени приема пищи в дни, предшествующие голоданию [7]. При этом корреляции концентрации грелина с глюкозой, инсулином и гормоном роста обнаружено не было. Суточный ритм концентрации грелина в плазме крови крыс характеризуется пиком в дневное время (около ZT 5) и снижением в ночное время [33]. В промоторе гена грелина описаны многочисленные элементы E-box, известные как мишени для протеинов циркадианнных часов [34], что предполагает их участие в регуляции суточного ритма продукции грелина. У трансгенных мышей с нокаутом грели-





**Рис. 3.** Селективный антагонист GHS-R1a рецепторов JMV 2959 не оказывал влияния на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра, но предотвращал эффекты 25 нМ грелина. (а) Пример реакции нейрона на аппликацию антагониста и последующую аппликацию грелина. В верхней части рисунка представлена гистограмма с данными о частоте спайков нейрона по ходу эксперимента. Периоды аппликации антагониста и грелина показаны горизонтальными отрезками над гистограммой. По оси абсцисс – время в секундах (момент начала аппликации соответствует 0), по оси ординат – частота спайков (Гц). Горизонтальным отрезкам под гистограммой (i, ii, iii) соответствуют 100-секундные интервалы записи спайковой активности нейронов, представленные под гистограммой: (i) – непосредственно перед воздействием, (ii) – в конце аппликации антагониста, (iii) – в конце аппликации грелина на фоне действия антагониста. (б) Статистические данные о влиянии 100 нМ JMV 2959 и 25 нМ грелина на фоне действия антагониста на среднюю частоту потенциалов действия, Гц (левая диаграмма), энтропию распределения межспайковых интервалов, бит (средняя диаграмма) и обоюдную информацию между сопряжёнными межспайковыми интервалами, бит (правая диаграмма) нейронов ( $n = 22$ ). Обозначения под диаграммами: Before – исходное состояние; JMV 2959 – на фоне действия антагониста; JMV 2959 + Ghrelin – на фоне совместного действия антагониста и грелина; Washout – после «отмывания» среза иЦСЖ.

новых рецепторов имеются характерные нарушения циркадианных ритмов локомоторной активности и питания [17], что указывает на непосредственное участие грелина в функции биологических часов. Это предположение подтвердилось в исследовании с периферическим введением грелиномиметика GHRP-6, которое привело к уменьшению фазового запаздывания циркадианного ритма, вызванного световым воздействием в ЗТ 13 на 45% [18]. Результаты анализа суточного паттерна локомоторной активности, потребления пищи, продукции грелина и экспрессии часовых генов в клетках

слизистой желудка мышей [35] позволили предположить, что эти клетки могут играть роль периферического осциллятора, настраиваемого пищей (FEO). Вместе с тем, влияние грелина на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра до сих пор оставалось практически неизученным. В единственной доступной публикации на эту тему, выполненной по итогам работы на срезах гипоталамуса мышей, было продемонстрировано, что непосредственное воздействие грелина на супрахиазматическое ядро в середине проецированного светлого времени суток (ZT 6) приводит к 3-часовому опережающему сдвигу циркадианного ритма частоты спайков и ритма экспрессии комплекса *mPER2::LUC* [19].

В настоящем электрофизиологическом исследовании изучалось влияние грелина на уровень спайковой активности и параметры спайкового кодирования информации нейронами супрахиазматического ядра крыс *in vitro*. При этом кроме частоты потенциалов действия рассчитывались энтропия распределения межспайковых интервалов и обоюдная информация между сопряжёнными межспайковыми интервалами, что позволило выполнить количественную оценку реакций нейронного кода на воздействие грелина. Апликация грелина оказывала влияние на частоту спайков у 61.7% нейронов супрахиазматического ядра. Учитывая тот факт, что эффекты грелина проявлялись в экспериментах на переживающих срезах гипоталамуса, есть все основания полагать, что действие этого вещества осуществлялось через клетки супрахиазматического ядра и не зависело от его влияния на афферентные входы из экстрагипоталамических структур. Полученные данные, по всей видимости, отражают значительную в количественном отношении долю нейронов супрахиазматического ядра, осуществляющих экспрессию рецепторов, способных взаимодействовать с грелином. Такими рецепторами являются рецепторы секретагога гормона роста *GHS-R1a* [12, 13], при этом супрахиазматическое ядро отличается высокой интенсивностью экспрессии этих рецепторов [14–16]. Реакции частоты спайков у нейронов супрахиазматического ядра на воздействие грелина оказались разнонаправленными: в 32.1% случаев наблюдался рост этого показателя, в 29.6% было зарегистрировано его снижение. Стоит заметить, что разнонаправленные реакции спайковой активности нейронов супрахиазматического ядра зарегистрированы и при воздействии другого орексигенного пептида орексина А [22], с той разницей, что в последнем случае рост активности наблюдался в 31%, а ее снижение – в 48% случаев. Похожая разнонаправленность реакций спайковой активности наблюдалась и при воздействии грелина на нейроны соседнего аркуатного ядра гипоталамуса. В этом случае разнонаправленность реакций определялась нейрохимическим фенотипом нейронов, подвергавшихся воздействию грелина. В частности, под влиянием грелина возрастала спайковая активность нейронов, экспрессирующих нейрорепептид Y, транспортер дофамина (*DAT*) и агути-родственный пептид (*AgRP*), тогда как активность нейронов, продуцирующих проопиомеланокортин (*POMC*), снижалась [10, 36]. Супрахиазматическое ядро является в высшей степени нейрохимически гетерогенной структурой [37, 38], что может быть причиной разнообразия реакций на воздействие грелина. Другое возможное объяснение данного феномена связано с существованием в супрахиазматическом ядре локальной ГАМКергической нейронной сети, в состав которой входят практически все нейроны этого ядра [39, 40]. Если действие грелина будет осуществляться через тормозный ГАМКергический пресинаптический нейрон, характер реакции регистрируемого постсинаптического нейрона может меняться на противоположный. Стоит особо заметить, что эффекты ГАМК на уровне нейронов супрахиазматического ядра не всегда тормозные, наряду с ними здесь описано и возбуждающее влияние ГАМК [41, 42]. Наконец, различия в реакциях нейронов супрахиазматического ядра на воздействие грелина могут объясняться включением в реакцию различных каскадов внутриклеточных посредников. Взаимодействие грелина с *GHS-R1a* рецепторами вызывает стимуляцию сигнального пути фосфолипазы C, приводящую к образованию инозитолфосфата и активации протеинкиназы C, что

в свою очередь инициирует высвобождение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточного депо [43]. Одновременно активация GHS-R1a рецепторов ингибирует ионные каналы  $\text{K}^+$ , что способствует входу внеклеточных ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциал-зависимые L-каналы. Рост концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в клетке вызывает коактивацию CaMKK2 (кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II) и p53-Sirt1, что приводит к последующему фосфорилированию AMPK (АМФ-киназы) и к реализации эффектов грелина [44].

Поскольку информация между нейронами ЦНС передается с помощью спайкового кода [45], в настоящей работе для оценки эффектов грелина на уровне супрахиазматического ядра кроме частоты потенциалов действия использованы параметры кодирования информации, позволяющие более полно охарактеризовать реакции спайковой активности клеток. Установлено, что одновременно с изменением уровня активности нейронов под влиянием грелина происходят противоположные по направленности реакции энтропии распределения межспайковых интервалов. В группе из 26 нейронов, ответивших на воздействие грелина ростом частоты спайковой активности, наблюдалось снижение энтропии, тогда как у 24 нейронов, активность которых в присутствии грелина снижалась, энтропия повышалась. Поскольку энтропия распределения межспайковых интервалов не зависит от частоты спайков, изменения этого параметра, характеризующего степень нерегулярности потенциалов действия, представляют отдельный интерес [21]. Энтропия является параметром, особенно подходящим для характеристики спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра, поскольку среди них часто встречаются клетки с бимодальным и полимодальным распределением межспайковых интервалов [46]. В отличие от других часто используемых параметров варибельности (например, коэффициента вариации, стандартного отклонения), энтропия является величиной, зависящей от формы и модальности распределения межспайковых интервалов, а также от их дисперсии [27]. Таким образом, важное преимущество использования энтропии заключается в учете всех аспектов варибельности. В то же время грелин не оказывал влияния на обоюдную информацию между сопряженными межспайковыми интервалами. Такой характер реакций свидетельствует о том, что при воздействии грелина у нейронов супрахиазматического ядра наблюдались изменения нерегулярности потенциалов действия без существенных изменений степени паттернирования спайковой информации в нейронном коде. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что грелин при непосредственном воздействии способен модулировать уровень активности и оказывать влияние на спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра.

Одной из задач исследования была экспериментальная проверка положения о том, что эффекты грелина на уровне нейронов супрахиазматического ядра реализуются через GHS-R1a рецепторы. В настоящей работе использовали селективный высокоаффинный антагонист GHS-R1a рецептора JMV 2959 [13]. Апликация данного антагониста не приводила к реакциям исследуемых параметров спайковой активности, однако она полностью предотвращала изменения частоты спайков и энтропии распределения межспайковых интервалов, возникавшие в присутствии грелина. Эти данные свидетельствуют о том, что влияние грелина на параметры спайковой активности и спайкового кода нейронов супрахиазматического ядра реализуется через GHS-R1a рецепторы. Исследований влияния блокады GHS-R1a рецепторов на спайковую активность нейронов супрахиазматического ядра ранее не проводилось, однако полученные в нашей работе результаты аналогичны данным электрофизиологического исследования *in vitro* Salome с соавт. [47], выполненного на нейронах соседнего аркуатного ядра, в котором апликация JMV 2959 не влияла на спайковую активность клеток, однако полностью предотвращала эффекты 50 нМ грелина.

В целом результаты настоящего исследования показывают, что гормон грелин при непосредственном воздействии на супрахиазматическое ядро *in vitro* оказывает модулирующее влияние на уровень активности и спайковый код относительно многочисленной популяции нейронов этого ядра. Эти эффекты грелина реализуются через

GHS-R1a рецепторы. Полученные данные указывают на участие грелина в механизмах нефотической настройки циркадианных биологических часов в соответствии с выраженностью пищевой мотивации и уровнем метаболизма.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям комитета по биоэтике биологического факультета Самарского национального исследовательского университета им. академика С.П. Королева (протокол № 2018–41 от 3.10.2018 г.). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23–28–00720).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

### ВКЛАД АВТОРОВ

Идея и концепция работы (А. Н. И.), планирование эксперимента (А. Н. И., Е. М. И.), сбор данных (А. Ю. Ш., А. Н. И., Е. М. И., А. А. И.), обработка данных (А. А. И., А. Н. И.), написание и редактирование манускрипта (А. Н. И., А. Ю. Ш., Е. М. И., А. А. И.).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M* (2018) Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Rev Neurosci* 19: 273–278.  
<https://doi.org/10.1038/s41583-018-0026-z>
2. *Hastings MH, Maywood ES, Brancaccio M* (2019) The mammalian circadian timing system and the suprachiasmatic nucleus as its pacemaker. *Biology* 8: 13.  
<https://doi.org/10.3390/biology8010013>
3. *Ashton A, Foster RG, Jagannath A* (2022) Photic entrainment of the circadian system. *Int J Mol Sci* 23:729.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23020729>
4. *Pickel L, Sung HK* (2020) Feeding rhythms and the circadian regulation of metabolism. *Front Nutr* 7: 39.  
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00039>
5. *Grosjean E, Simonneaux V, Challet E* (2023) Reciprocal interactions between circadian clocks, food intake, and energy metabolism. *Biology* 12: 539.  
<https://doi.org/10.3390/biology12040539>
6. *Sakata I, Sakai T* (2010) Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int J Pept* 2010: 945056.  
<https://doi.org/10.1155/2010/945056>
7. *Natalucci G, Riedl S, Gleiss A, Zidek T, Frisch H* (2005) Spontaneous 24-h ghrelin secretion pattern in fasting subjects: maintenance of a meal-related pattern. *Eur J Endocrinol* 152: 845–850.  
<https://doi.org/10.1530/eje.1.01919>
8. *Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P* (2013) Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 1512–1517.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1212137110>

9. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194–198.  
<https://doi.org/10.1038/35051587>
10. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschop M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, Garcia-Segura LM, Nillni EA, Mendez P, Low MJ, Sotonyi P, Friedman JM, Liu H, Pinto S, Colmers WF, Cone RD, Horvath TL (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649–661.  
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00063-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00063-1)
11. Yi CX, van der Vliet J, Dai J, Yin G, Ru L, Buijs RM (2006) Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147: 283–294.  
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1051>
12. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG (2004) Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4679–4684.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0305930101>
13. Moulin A, Brunel L, Boeglin D, Demange L, Ryan J, M’Kadmi C, Denoyelle S, Martinez J, Fehrentz JA (2013) The 1,2,4-triazole as a scaffold for the design of ghrelin receptor ligands: development of JMV 2959, a potent antagonist. *Amino Acids* 44: 301–314.  
<https://doi.org/10.1007/s00726-012-1355-2>
14. Mitchell V, Bouret S, Beauvillain JC, Schilling A, Perret M, Kordon C, Epelbaum J (2001) Comparative distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) in *Microcebus murinus* (Primate, lemurian) and rat forebrain and pituitary. *J Comp Neurol* 429: 469–489.  
[https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20010115\)429:3<469::AID-CNE8>3.0.CO;2-%23](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20010115)429:3<469::AID-CNE8>3.0.CO;2-%23)
15. Zigan JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494: 528–548.  
<https://doi.org/10.1002/cne.20823>
16. Airapetov MI, Eresko SO, Lebedev AA, Bychkov ER, Shabanov PD (2021) Expression of the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) in the brain. *Physiol Rep*: e15113.  
<https://doi.org/10.14814/phy2.15113>
17. Waddington Lamont E, Bruton J, Blum ID, Abizaid A (2014) Ghrelin receptor-knockout mice display alterations in circadian rhythms of activity and feeding under constant lighting conditions. *Eur J Neurosci* 39: 207–217.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12390>
18. Yi CX, Challet E, Pevet P, Kalsbeek A, Escobar C, Buijs RM (2008) A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats. *Eur J Neurosci* 27: 1965–1972.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06181.x>
19. Yannielli PC, Molyneux PC, Harrington ME, Golombek DA (2007) Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci* 27(11): 2890–2895.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3913-06.2007>
20. Guo W, Fouda ME, Eltawil AM, Salama KN (2021) Neural coding in spiking neural networks: a comparative study for robust neuromorphic systems. *Front Neurosci* 15: 638474.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2021.638474>
21. Bhumbra GS, Inyushkin AN, Saeb-Parsy K, Hon A, Dyball RED (2005) Rhythmic changes in spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Physiol* 653: 291–307.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.079848>
22. Brown TM, Coogan AN, Cutler DJ, Hughes AT, Piggins HD (2008) Electrophysiological actions of orexins on rat suprachiasmatic neurons in vitro. *Neurosci Lett* 448: 273–278.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.10.058>
23. Inyushkin AN, Bhumbra GS, Dyball RED (2009) Leptin modulates spike coding in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neuroendocrinol* 21: 705–714.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01889.x>
24. Inyushkin AN, Petrova AA, Tkacheva MA, Inyushkina EM (2017) Effects of neuropeptide Y on neuron spike activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Behav Physiol* 47: 1257–1269.  
<https://doi.org/10.1007/s11055-017-0402-6>
25. Gross JD, Kim DW, Zhou Y, Jansen D, Slosky LM, Clark NB, Ray CR, Hu X, Southall N, Wang A, Xu X, Barnaeva E, Wetsel WC, Ferrer M, Marugan JJ, Caron MG, Barak LS, Toth K (2022) Discovery of a functionally selective ghrelin receptor (GHSR<sub>1a</sub>) ligand for modulating brain dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(10): e2112397119.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2112397119>

26. *Bhumra GS, Inyushkin AN, Dyball RED* (2004) Assessment of spike activity in the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol* 16: 390–397.  
<https://doi.org/10.1111/j.0953-8194.2004.01166.x>
27. *Bhumra GS, Dyball RED* (2003) Measuring spike coding in the rat supraoptic nucleus. *J Physiol* 555: 281–296.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.053264>
28. *Mistlberger RE* (2020) Food as circadian time cue for appetitive behavior. *F1000Research* 2020, 9(F1000 Faculty Rev): 61.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.20829.1>
29. *de Assis LVM, Oster H* (2021) The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. *Cell Mol Life Sci* 78: 4563–4587.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-021-03800-2>
30. *Chambers L, Seidler K, Barrow M* (2022) Nutritional entrainment of circadian rhythms under alignment and misalignment: A mechanistic review. *Clin Nutr ESPEN* 51: 50–71.  
<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.06.010>
31. *Pendergast JS, Yamazaki S* (2018) The mysterious food-entrainable oscillator: insights from mutant and engineered mouse models. *J Biol Rhythms* 33: 458–474.  
<https://doi.org/10.1177/0748730418789043>
32. *Dadivson AJ* (2006) Search for the feeding-entrainable circadian oscillator: a complex proposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1524–R1526.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00073.2006>
33. *Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F, Krueger JM* (2004) Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R1071–R1079.  
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00294.2004>
34. *Kanamoto N, Akamizu T, Tagami T, Hataya Y, Moriyama K, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K* (2004) Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145: 4144–4153.  
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1718>
35. *LeSauter J, Hoque N, Weintraub M, Pfaff DW, Silver R* (2009) Stomach ghrelin-secreting cells as food-entrainable circadian clocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13582–13587.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906426106>
36. *Na J, Park BS, Jang D, Kim D, Tu TH, Ryu Y, Ha CM, Koch M, Yang S, Kim JG, Yang S* (2022) Distinct firing activities of the hypothalamic arcuate nucleus neurons to appetite hormones. *Int J Mol Sci* 23: 2609.  
<https://doi.org/10.3390/ijms23052609>
37. *Moore RY, Speh JC, Leak RK* (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res* 309: 89–98.  
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>
38. *Morin LP, Shivers KY, Blanchard JH, Muscat L* (2006) Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 137: 1285–1297.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.10.030>
39. *Nygaard M, Palomba M* (2006) The GABAergic network in the suprachiasmatic nucleus as a key regulator of the biological clock: does it change during senescence? *Chronobiol Int* 23: 427–435.  
<https://doi.org/10.1080/07420520500545938>
40. *Kwon J, Jang MW, Lee J* (2021) Retina-attached slice recording reveals light-triggered tonic GABA signaling in suprachiasmatic nucleus. *Mol Brain* 14: 171.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-021-00881-9>
41. *Albers HE, Walton JC, Gamble KL, McNeill JKIV, Hummer DL* (2016) The dynamics of GABA signaling: revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Front Neuroendocrinol* 44: 35–82.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.11.003>
42. *Ono D, Honma KI, Honma S* (2021) GABAergic mechanisms in the suprachiasmatic nucleus that influence circadian rhythm. *J Neurochem* 157: 31–41.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.15012>
43. *Kojima M, Hosoda H, Kangawa K* (2001) Purification and distribution of ghrelin: The natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res* 51 (Suppl S1): 93–97.  
<https://doi.org/10.1159/000048143>
44. *Jiao ZT, Luo Q* (2022) Molecular mechanisms and health benefits of ghrelin: A narrative review. *Nutrients* 14: 4191.  
<https://doi.org/10.3390/nu14194191>

45. *Campo AT* (2020) Inferring neural information flow from spiking data. *Comput Struct Biotechnol J* 18: 2699–2708.  
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.007>
46. *Saeb-Parsy K, Dyball REJ* (2003) Defined cell groups in the rat suprachiasmatic nucleus have different day/night rhythms of single-unit activity in vivo. *J Biol Rhythms* 18: 26–42.  
<https://doi.org/10.1177/0748730402239674>
47. *Salome N, Haage D, Perrissoud D, Moulin A, Demange L, Egecioglu E, Fehrentz JA, Martinez J, Dickson SL* (2009) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 612: 167–173.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.066>

## The Effects of Ghrelin on Spike Activity of the Suprachiasmatic Nucleus Neurones of the Rat

A.N. Inyushkin\*, A. Yu. Sharafutdinova, E. M. Inyushkina, and A.A. Inyushkin

*Samara National Research University, Samara, Russia*

\* e-mail: [ainyushkin@mail.ru](mailto:ainyushkin@mail.ru)

In one of the most important non-photic mechanisms of the circadian biological clock synchronization with environmental geophysical 24 h rhythm, information on feeding schedule, composition and calorie content of food is used. Hormone ghrelin, a product of the neuroendocrine oxyntic cells of the gastric mucosa to be a signal molecule within this mechanism. In experiments on sagittal hypothalamic slices of male Wistar rats, the effects of 25 nM ghrelin on spike activity and parameters of spike information coding were investigated. Application of ghrelin induced an increase in spike frequency and a decrease in entropy of interspike interval distribution in 32.1% of the neurones recorded. In 29.6% of the cells, opposite responses in the form of a reduction of activity and an increase in the entropy of interspike interval distribution were observed. Parameters of spike activity of the remainder 38.3% neurones of the suprachiasmatic nucleus did not change. The observed responses of the entropy of interspike interval distribution indicate the appropriate changes in a degree of irregularity of interspike interval induced by ghrelin. Application of selective high-affinity antagonist of GHS-R1a receptor, JMV 2959 (100 nM) did not induce responses of the investigated parameters of spike activity but completely prevented changes of both, spike frequency and entropy of interspike interval distribution observed in the presence of ghrelin. The obtained data show that hormone ghrelin by a direct influence on the suprachiasmatic nucleus in vitro modulates the activity level and spike code of relatively numerous population of neurones of the nucleus, wherein the effects of ghrelin are implemented via GHS-R1a receptors. The results of the current study provide additional evidence in favour of the hypothesis on the involvement of ghrelin in mechanisms of non-photic entrainment of the circadian biological clock in accordance with severity of food motivation and level of metabolism.

*Keywords:* ghrelin, biological clock, circadian rhythms, suprachiasmatic nucleus, spike activity, spike code