

МОДУЛЯЦИЯ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА ФУНКЦИИ ПОЧЕК ПОД ДЕЙСТВИЕМ АГОНИСТА ГАМК_A-РЕЦЕПТОРОВ И МЕЛАТОНИНА

Поступила 06.10.08

В экспериментах на крысах в условиях, приближенных к естественным, изучали влияние инъекций активатора ГАМК-эргических церебральных систем аминалона и эпифизарного гормона мелатонина на циркадианный ритм экскреторной активности почек. Введение экзогенного мелатонина приводило к существенному усилению экскреторной деятельности почек в середине как дневного, так и ночного периода. Инъекции аминалона подавляли эффекты мелатонина; в условиях комбинированного введения этих агентов циркадианный ритм деятельности почек существенно нивелировался. Полученные результаты рассматриваются как свидетельство важной роли реципрокных взаимодействий ГАМК-эргических нейронных систем (прежде всего, в основном центральном пейсмейкере циркадианного ритма – супрахиазматических ядрах гипоталамуса) и мелатонинпродуцирующих элементов эпифиза мозга в регуляции указанного ритма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циркадианный ритм, супрахиазматические ядра, ГАМК-эргические нейроны, мелатонин, экскреторная функция почек.

ВВЕДЕНИЕ

Гипоталамус представляет собой важнейший комплекс центральных структур, которые ответственны за адекватное поддержание основных вегетативных показателей, в частности таких, как гемодинамические параметры, пищевое поведение, водно-солевой баланс и температура тела [1, 2]. Супрахиазматические ядра (СХЯ) гипоталамуса рассматриваются в настоящее время как основной центральный пейсмейкер циркадианных ритмов у млекопитающих, включая человека [3]. Еще в 1979 г. Абе и соавт. [4] показали, что разрушение медиальной преоптической зоны вызывает нарушения суточной ритмики пищевого поведения, изменений температуры тела, секреции кортикостероидов и тиреоидных гормонов. Пересадка нейронов СХЯ после предшествующего разрушения этого ядра приводила к восстановлению циркадианного ритма, но характерного не для реципиента, а для донора [5–7].

В то же время результаты исследований последних 50 лет убедительно продемонстрировали, что исключительно существенную роль в формировании биологических ритмов играет эпифиз мозга (пинеаль-

ная железа) [8–10]. Это обусловило необходимость определить функциональные отношения между гипоталамическими структурами (прежде всего СХЯ), с одной стороны, и эпифизом – с другой. В соответствующих исследованиях был получен обширный фактический материал, давший основания для ряда гипотез, однако многие полученные данные оказались противоречивыми. Решение возникших вопросов затрудняется высокой сложностью внутренней организации СХЯ [11–14] и, прежде всего, тем обстоятельством, что СХЯ включает в себя большое количество нейронных популяций, различных по своим нейрохимическим характеристикам [15–21]. Было показано [19–26], что важнейшую роль в регуляции активности СХЯ играют ГАМК-эргические нейроны. Ряд исследователей рассматривают ГАМК-эргические нейроны как принципиальный регулятор циркадианного ритма, обеспечиваемого активностью СХЯ [19, 27]. В целом же, несмотря на большой прогресс в исследованиях внутренней функциональной организации СХЯ и взаимоотношений этой гипоталамической подсистемы и других систем мозга, проблема центральной регуляции циркадианных ритмов во многих аспектах остается далекой от окончательного решения.

Как свидетельствуют данные литературы [28], экскреторная функция почек у животных, поведенчески

¹ Черновицкий национальный университет им. Ю. Федьковича (Украина).

активных в темновой фазе суточного цикла, демонстрирует настолько стабильную и четко выраженную циркадианную ритмику (с акрофазой в ночные часы и батифазой в середине дня), что деятельность почек может эффективно использоваться в качестве тест-феномена в хронофармакологических и хронотоксикологических исследованиях. Изложенные выше сведения и соображения обусловили направление нашей работы, в которой мы тестировали эффекты введения агониста ГАМК_A-рецепторов аминалона в отношении циркадианного ритма экскреторной функции почек у крыс. Эти эффекты сопоставлялись с изменениями данного ритма, обусловленными введением основного эпифизарного гормона мелатонина.

МЕТОДИКА

Опыты были проведены на 36 крысах-самцах линии Вистар массой 140–180 г. Животные находились в специальных обменных клетках со свободным доступом к пище (зерно пшеницы) и питью (1 %-ный раствор натрия хлорида в воде для компенсации низконатриевого рациона). Животные содержались при стандартном световом режиме (12 ч освещения / 12 ч темноты). До начала эксперимента животных адаптировали к данным условиям обитания в течение 10 дней.

На протяжении двух дней эксперимента у крыс собирали мочу, выделенную в ходе спонтанного диуреза в течение 3 ч в середине дня (с 11.00 до 14.00) и в середине ночи (с 23.00 до 2.00). В пробах мочи определяли концентрацию ионов натрия (потенциометрически, с использованием натрийчувствительного ионселективного электрода и хлор-серебряного электрода сравнения). В качестве показателя гломерулярной фильтрации измеряли концентрацию эндогенного креатинина (колориметрически, с пикриновой кислотой, по Фолину в модификации Виктора [29]). Экскрецию титруемых кислот и ионов аммония определяли, используя комбинированный метод [30] с титрованием проб мочи раствором NaOH (0.01 М), индикатор – фенолфталеин. Рассчитывали значения интенсивностей диуреза (мл/ч) и экскреции упомянутых выше веществ (мкмоль/ч).

Вита-мелатонин (ЗАО Киевский витаминный завод, Украина) вводили в дозе 1.5 мг/кг, внутривентриально, однократно два раза в сутки (9.00 и 21.00). Внутривентриальные инъекции аминалона (300 мг/кг) осуществлялись в таком же режиме.

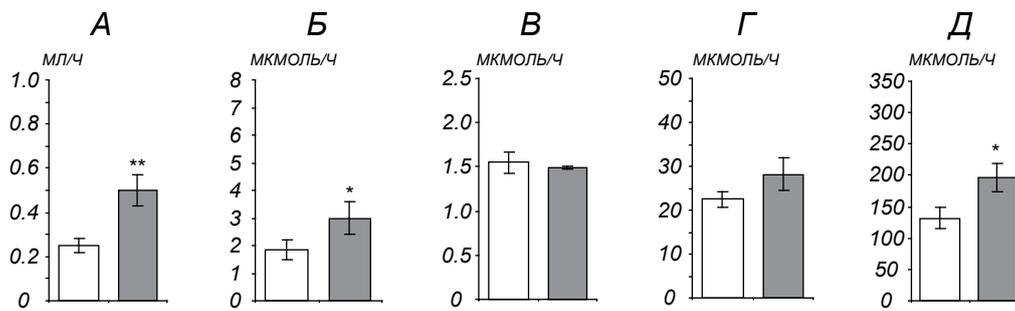
Числовые данные анализировали с использованием программы «Statistica for Windows 5.0»; межгрупповые различия определялись согласно критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты измерений характеристик экскреторной функции почек у животных экспериментальных групп приведены на рис. 1–4.

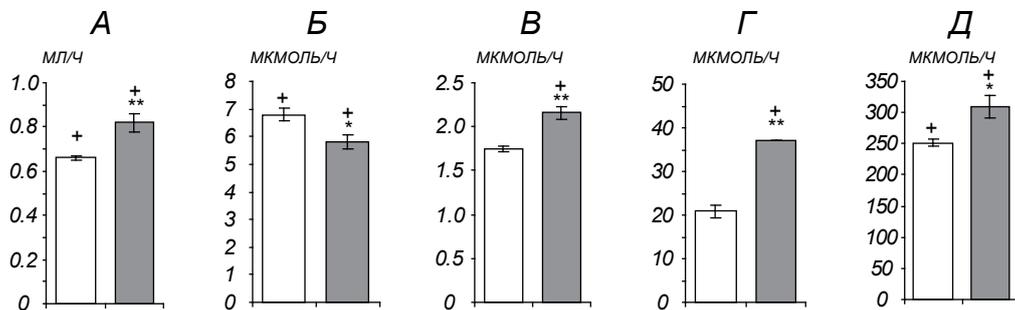
Как видно из рис. 1, у интактных крыс контрольной группы в ночное время отмечалась отчетливая интенсификация экскреторной функции почек. Диурез и экскреция ионов натрия в ночные часы увеличивались в 2.0 и 1.6 раза по сравнению с тем, что наблюдалось днем (*A*, *B*); заметно повышалась и экскреция солей аммония (*D*). Отсутствие достоверного роста скорости экскреции кислот фосфатов (титруемых кислот; *Г*), видимо, связано с сохранением примерно стабильной интенсивности клубочковой фильтрации. Практически не были выражены и циркадианные изменения скорости экскреции креатинина (*B*).

Введение экзогенного мелатонина в целом не приводило к качественным изменениям циркадианных вариаций экскреторной функции почек с выраженной акрофазой в ночное время суток и батифазой в дневные часы (рис. 2). Однако повышение уровня мелатонина в организме существенно усиливало упомянутую функцию почек и приводило к заметным изменениям количественных соотношений дневных и ночных показателей. Интенсивность диуреза в дневное и ночное время у животных группы 2 составляла в среднем 264 и 164 % аналогичных значений в контрольной группе 1. Упомянутый показатель в дневной период у крыс после инъекций мелатонина превышал соответствующий «ночной» показатель в группе контроля. Однако при этом разница между ночными и дневными показателями была не двукратной, как у интактных животных; указанные значения различались всего на 25 % (*A*). Существенно возростала интенсивность экскреции креатинина и солей аммония (*B*, *D*). Скорость экскреции ионов натрия у животных группы 2 примерно вдвое превышала таковую у контрольных крыс, однако существенной разницы между ночными и дневными значениями этого показателя в «мелатониновой» группе 2 не наблюдалось. Величина данного параметра днем в среднем была даже несколько выше (*B*).



Р и с. 1. Циркадианные изменения экскреторной функции почек у контрольных крыс (группа 1). *A* – интенсивность диуреза, мл/ч; *B–Д* – интенсивности экскреции ионов натрия (*B*, ммоль/ч), креатинина (*B*, ммоль/ч), титруемых кислот (*Г*, ммоль/ч) и ионов аммония (*Д*, ммоль/ч). Представлены значения средних \pm ошибка среднего. Белые столбики соответствуют значениям показателей днем (в интервале 11.00–14.00), заштрихованные – ночью (23.00–2.00). Одной и двумя звездочками отмечены случаи достоверных различий между ночными и дневными значениями показателей ($P < 0.05$ и $P < 0.01$ соответственно).

Р и с. 1. Циркадианні зміни екскреторної функції нирок у контрольних щурів (група 1).



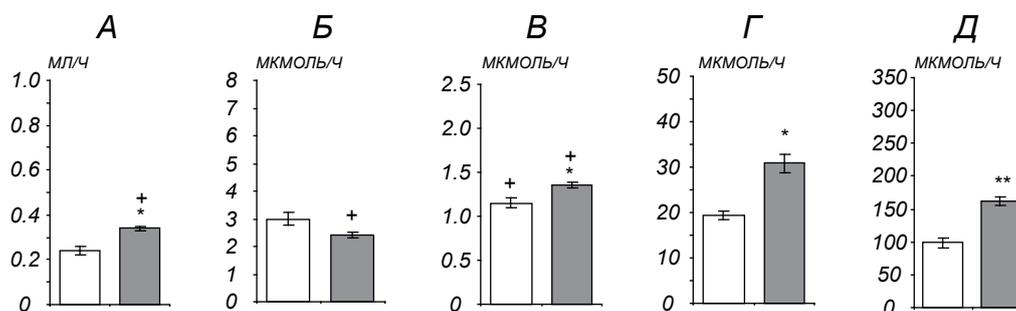
Р и с. 2. Циркадианные изменения экскреторной функции почек у крыс, которым вводился мелатонин (группа 2). Крестиками отмечены случаи достоверных отличий показателей от аналогичных значений в группе 1 ($P < 0.05$). Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Р и с. 2. Циркадианні зміни екскреторної функції нирок у щурів, котрим вводили мелатонін (група 2).

В условиях введения ГАМК_A-агониста аминалона циркадианные вариации экскреторной функции почек в определенной степени сохранялись, но количественные отношения исследуемых показателей существенно преобразовывались. Интенсивность диуреза днем у животных группы 3 была аналогичной наблюдаемой в группе контроля, но ночной показатель под влиянием аминалона становился существенно меньше, составляя всего 68 % соответствующей величины у интактных животных (рис. 3, *A*; 1, *A*). Соответственно, разница между ночной и дневной интенсивностями диуреза в условиях экспериментальной активации ГАМК_A-рецепторов равнялась 42 %, т. е. была значительно меньшей, чем у интактных крыс. Скорости экскреции креатинина, титруемых кислот (днем) и ионов аммония в группе 3 были ниже аналогичных показателей в норме, сохраняя при этом более высокие

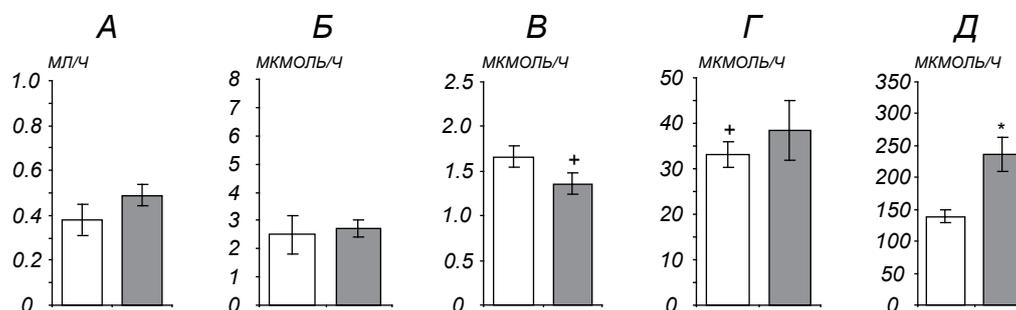
значения в ночное время (*B–Д*). Скорость экскреции ионов натрия в «аминалоновой» группе 3 была близка к таковой у интактных животных, но циркадианная ритмика данного показателя по сравнению с нормой инвертировалась (хотя разница не достигала уровня достоверности; *B*).

Совместное введение аминалона и мелатонина приводило к существенному ослаблению активирующего действия последнего на экскреторную функцию почек. Интенсивность диуреза в ночное время в указанной экспериментальной группе соответствовала таковой у интактных крыс; в дневные же часы этот показатель был несколько выше. «Ночная» интенсивность диуреза превышала «дневную» всего на 28 % (рис. 4, *A*). Значения интенсивности экскреции натрия, креатинина и титруемых кислот, наблюдаемые днем и ночью, были весьма близки друг к другу (*B–Г*), и лишь скорость экскреции солей аммония но-



Р и с. 3. Циркадианные изменения экскреторной функции почек у крыс, которым вводился аминалон (группа 3). Обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 3. Циркадіанні зміни екскреторної функції нирок у щурів, котрим вводили аміналон (група 3).



Р и с. 4. Циркадианные изменения экскреторной функции почек у крыс после комбинированного введения мелатонина и аминалона (группа 4). Обозначения те же, что и на рис. 2 и 3.

Р и с. 4. Циркадіанні зміни екскреторної функції нирок у щурів після комбінованого введення мелатоніну та аміналону (група 4).

чью заметно превышала соответствующий дневной показатель (Д). Таким образом, в условиях одновременной активации центральных ГАМК_A-рецепторов и повышения уровня мелатонина в организме проявления циркадианного ритма экскреторной функции почек в значительной мере сглаживались.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже упоминалось во Введении, циркадианные биологические ритмы, очевидно, в значительной степени определяются взаимодействием нейронных и нейроэндокринных систем СХЯ, с одной стороны, и эпифиза мозга – с другой. Результаты нейрогистологических и иммуноцитохимических исследований показали наличие полисинаптических связей между клеточными элементами СХЯ и нейроэндокринными клетками эпифиза [8, 10, 31]. Шибата и соавт. [32] обнаружили, что мелатонин – основной гормон эпифиза – в экспериментах *in vitro* угнетает электрическую активность нейронов СХЯ в поздние часы «субъективного дня». Макси-

мальное угнетающее влияние на нейроны СХЯ мелатонин проявлял в темновой фазе суточного ритма [22]. Предполагалось, что эти эффекты реализуются в значительной степени через ГАМК-эргические нейронные системы мозга. У млекопитающих фотостимуляция, приводящая к активации нейронов ретино-гипоталамического тракта [33], сопровождается повышением уровня глутамата в нейронах СХЯ, усилением активности нейронов, высвобождающих вазоинтестинальный пептид (VIP-нейронов), и интенсификацией секреции аргинин-вазопрессина. Пик секреции этого гормона совпадает с серединой «субъективного дня» [34]. Оказалось, что между секрецией аргинин-вазопрессина нейронами СХЯ и выделением мелатонина пинеалоцитами существуют реципрокные отношения.

Полученные данные заставили более детально рассмотреть структурную организацию СХЯ гипоталамуса. Было показано, что в этих ядрах можно выделить центральную группу нейронов – «сердцевину» («core»). Указанные нейроны не генерируют спонтанной ритмической электрической активности. Активация данных клеток обуславливается

поступлением импульсации по ретино-гипоталамическому тракту. Кнаружи от нейронов «сердцевины» расположена «оболочка» («shell»). Ее нервные клетки генерируют спонтанную импульсацию и синтезируют аргинин-вазопрессин. Как уже упоминалось, максимум их активности приходится на середину дневного периода [11].

Результаты нейроцитохимических исследований показали, что в СХЯ присутствуют различные популяции нейронов, синтезирующие ряд нейротрансмиттеров (в том числе глутамат, пептиды и моноамины – дофамин, серотонин и норадреналин) и нейроэндокринных факторов – аргинин-вазопрессин, гастрин-высвобождающий фактор, VIP, калбиндин, калретицин, кортикотропинреализующий фактор, энкефалин. Кроме того, в СХЯ локализованы многочисленные ГАМК-продуцирующие нейроны [20, 21, 24, 35, 36]. ГАМК-эргические нейроны представлены как в дорсальной («shell»), так и в вентральной («core») частях СХЯ [12, 19]. Именно эти нейроны предлагалось рассматривать как принципиальный регулятор циркадианного ритма в пределах СХЯ [19].

Согласно данным наших экспериментов, введение агониста ГАМК_A-рецепторов аминалона несколько снижало интенсивность диуреза (особенно ночью) и обуславливало определенную тенденцию к нивелированию циркадиантных вариаций интенсивностей секреции ионов натрия и креатинина. С введением экзогенного мелатонина было связано общее существенное увеличение исследуемых показателей, но их циркадианная ритмика в значительной степени сохранялась. Комбинированное же введение аминалона и мелатонина вызывало существенное сглаживание проявлений циркадианного ритма экскреторной функции почек. Наши результаты в целом согласуются с данными Калсбека и соавт. [3, 13, 16] и Вана и соавт. [37] об угнетающем влиянии мелатонина на активность ГАМК-эргических нейронов СХЯ и на роль этих взаимодействий в механизмах поддержания циркадианного ритма. Естественно, что нельзя исключить участия в указанных механизмах и других нейронных систем СХЯ, кроме ГАМК-эргических.

Следует упомянуть, что опубликованные сведения о влиянии активации ГАМК_A-рецепторов на активность нейронов СХЯ в определенной степени противоречивы: в ночное время подобная активация ГАМК-систем могла вызывать либо подавление, либо возбуждение нейронов СХЯ [26, 33, 31]. Данные наших экспериментов согласуются с результатами исследований Грибкоффа и соавт. [10,

11], сообщавших, что введение агониста ГАМК_A-рецепторов мусцимола угнетало активность нейронов СХЯ, а инъекции антагонистов указанных рецепторов бикуккулина и пикротоксина приводили к активации этих клеток.

Таким образом, результаты наших экспериментов подтверждают важную роль реципрокных взаимодействий ГАМК-эргических элементов основного центрального пейсмекера циркадианного ритма – СХЯ гипоталамуса – и мелатонинпродуцирующей системы эпифиза в регуляции указанного ритма. Полученные данные акцентируют существенное значение сохранения адекватных характеристик функционирования этих систем, поскольку экспериментальная активация центральных ГАМК_A-рецепторов, комбинированная с одновременным повышением уровня мелатонина в организме, обуславливала отчетливые тенденции к нивелированию циркадиантных вариаций функции почек.

І. Г. Кушнір¹, Г. І. Кожушук¹

МОДУЛЯЦІЯ ЦИРКАДІАННОГО РИТМУ ФУНКЦІЇ НИРОК ПІД ВПЛИВОМ АГОНІСТА ГАМК_A-РЕЦЕПТОРІВ І МЕЛАТОНІНУ

¹ Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича (Україна).

Резюме

В експериментах на щурах в умовах, наближених до природних, вивчали вплив ін'єкцій активатора ГАМК-ергічних церебральних систем аміналону та епіфізарного гормону мелатоніну на циркадіанний ритм екскреторної активності нирок. Уведення екзогенного мелатоніну призводило до істотного посилення екскреторної діяльності нирок у середині як денного, так і нічного періодів. Ін'єкції аміналону пригнічували ефекти мелатоніну; в умовах комбінованого введення цих агентів циркадіанний ритм діяльності нирок істотно нівелювався. Отримані результати розглядаються як свідчення важливої ролі реципрокних взаємодій ГАМК-ергічних нейронних систем (перш за все, в основному центральному пейсмекері циркадіанного ритму – супрахізматичних ядрах гіпоталамуса) та мелатонінпродукуючих елементів епіфіза мозку в регуляції вказаного ритму.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R. M. Buijs and A. Kalsbeek, "Hypothalamic integration of central and peripheral clocks," *Nat. Rev. Neurosci.*, **2**, 521-526 (2001).
2. J. Antunes-Rodrigues, M. De Castro, L. L. K. Elias et al., "Neuroendocrine control of body fluid metabolism," *Physiol. Rev.*, **84**, 169-208 (2004).

3. A. Kalsbeek, I. F. Palm, S. E. La Fleur, et al., "SCN outputs and the hypothalamic balance of life," *J. Biol. Rhythms*, **21**, No. 6, 458-469 (2006).
4. K. Abe, J. Kroning, M. A. Greer and V. Critchlow, "Effects of destruction of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythms in plasma corticosterone, body temperature, feeding and plasma thyrotropin," *Neuroendocrinology*, **29**, 119-131 (1979).
5. M. R. Ralph, R. G. Foster, F. C. Davis, and M. Menaker, "Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period," *Science*, **247**, 975-978 (1990).
6. J. Grosse and F. C. Davis, "Melatonin entrains the restored circadian activity rhythms of syrian hamsters bearing fetal suprachiasmatic nucleus grafts," *J. Neurosci.*, **18**, No. 19, 8032-8037 (1998).
7. F. I. Meyer-Bernstein, A. E. Jetton, Sh. Matsumoto, et al., "Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters," *Endocrinology*, **140**, 207-218 (1999).
8. R. Y. Moore, "Neural control of the pineal gland," *Behav. Brain Res.*, **73**, 125-130 (1996).
9. J. Vanecek, "Cellular mechanisms of melatonin action," *Physiol. Rev.*, **78**, No. 3, 687-721 (1998).
10. R. Tecler-Marim-Mesbah, G. J. Ter Horst, F. Postema, et al., "Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus-pineal pathway," *J. Comp. Neurol.*, **406**, 171-182 (1999).
11. T. T. Abrahamson and R. Y. Moore, "Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections," *Brain Res.*, **916**, Nos. 1/2, 172-191 (2001).
12. R. Y. Moore and J. C. Speh, "GABA is principal neurotransmitter of the circadian system," *Neurosci Lett.*, **150**, No. 1, 112-116 (1993).
13. A. Kalsbeek and R. M. Buijs, "Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting," *Cell Tissue Res.*, **309**, No. 1, 109-118 (2002).
14. L. P. Morin, K.-Y. Shivers, J. H. Blanchard, and L. Muscat, "Complex organization of mouse and rat suprachiasmatic nucleus," *Neuroscience*, **137**, No. 4, 1285-1297 (2006).
15. H. Okamura, A. Berod, J. F. Julien, et al., "Demonstration of GABAergic cell bodies in the suprachiasmatic nucleus: in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA and immunocytochemistry of GAD and GABA," *Neurosci. Lett.*, **102**, 131-136 (1989).
16. A. Kalsbeek, R. A. Cutrera, J. J. Van Heerikhuizen, et al., "GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat," *Neuroscience*, **91**, No. 2, 453-461 (1999).
17. J. Schaap, H. Albus, H. Tjebbe, et al., "Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: implications for circadian waveform and photoperiodic encoding," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15994-15999 (2003).
18. J. Itri, S. Michel, J. A. Waschek, and C. S. Colwell, "Circadian rhythm in inhibitory synaptic transmission in the mouse suprachiasmatic nucleus," *J. Neurophysiol.*, **92**, 311-319 (2004).
19. H. Albus, M. J. Vansteensel, S. L. Miche, et al., "A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock," *Current Biol.*, **15**, No. 10, 886-893 (2005).
20. M. C. Antle and R. Silver, "Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock," *Trends Neurosci.*, **28**, No. 3, 145-151 (2005).
21. R. M. Buijs, Y. X. Hou, S. Shinn, et al., "Ultrastructural evidence for intra- and extranuclear projections of GABAergic neurons of the suprachiasmatic nucleus," *J. Comp. Neurol.*, **340**, 381-391 (1994).
22. D. A. Golombek, P. Pévet, and D. P. Cardinali, "Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **20**, 403-412 (1996).
23. Q. H. Chen and A. N. van den Pol, "Presynaptic GABA_B autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons," *J. Neurosci.*, **18**, No. 5, 1913-1922 (1998).
24. V. K. Gribkoff, R. L. Pieschl, T. A. Wisialowski, et al., "A reexamination of the role of GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus," *J. Biol. Rhythms*, **14**, No. 2, 126-130 (1999).
25. K. Gribkoff, R. L. Pieschl, F. E. Dudek, et al., "GABA receptor-mediated inhibition of neuronal activity in rat SCN *in vitro*: Pharmacology and influence of circadian phase," *J. Neurophysiol.*, **90**, 1438-1448 (2003).
26. S. J. Aton, J. E. Huetthner, M. Straume, et al., "GABA and G_α differentially control circadian rhythms and synchrony in clock neurons," *PNAS Biol. Sci. Neurosci.*, **103**, No. 50, 19188-19193 (2006).
27. R. Y. Moore and J. C. Speh, "GABA is principal neurotransmitter of the circadian system," *Neurosci Lett.*, **150**, No. 1, 112-116 (1993).
28. M. Pons, A. Schnecko, K. Witte, et al., "Circadian rhythms in renal function in hypertensive TGR(mRen-2)27 rats and their normotensive controls," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **271**, R1002-R1008 (1996).
29. З. Виктор, *Клиническая нефрология*, ПГМИ, Варшава (1968).
30. С. И. Рябов, Ю. В. Наточин, Б. Б. Бондаренко, *Диагностика болезней почек*, Медицина, Ленинград (1979).
31. A. Kalsbeek, W. J. Drijfhout, B. H. Westerink, et al., "GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats are implicated in the control of melatonin and corticosterone release," *Neuroendocrinology*, **63**, No. 1, 69-78 (1996).
32. S. Shibata, V. M. Cassone, and R. Y. Moore, "Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus *in vitro*," *Neurosci. Lett.*, **97**, 140-144 (1989).
33. M. De Jeu and C. Pennartz, "Circadian modulation of GABA function in the rat suprachiasmatic nucleus: excitatory effects during the night phase," *J. Neurophysiol.*, **87**, 834-844 (2002).
34. K. Watanabe, J. Vanecek, and S. Yamaoka, "In vitro entrainment of the circadian rhythm of vasopressin-releasing cells in suprachiasmatic nucleus by vasoactive intestinal polypeptide," *Brain Res.*, **877**, 361-366 (2000).
35. R. Tecler-Marim-Mesbah, A. Kalsbeek, P. Pévet, and R. M. Buijs, "Direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection from the suprachiasmatic nucleus to spinal projecting hypothalamic paraventricular neurons," *Brain Res.*, **748**, 71-76 (1997).
36. Y. Isobe, T. Torii, and H. Nishino, "Melatonin inhibits Arg-vasopressin release via MT₂ receptor in the suprachiasmatic nucleus-slice culture of rats," *Brain Res.*, **889**, 214-219 (2001).
37. Q. Wan, H. Y. Man, F. Liu, et al., "Differential modulation of GABA_A receptor function by Mel_{1a} and Mel_{1b} receptors," *Nat. Neurosci.*, **2**, 401-403 (1999).