

УДК 611.814.1

## ИНСУЛИН КАК ФАКТОР НАСТРОЙКИ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА ПРОИЗВОЛЬНОЙ ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ

К. А. Мистрюгов

В хронических экспериментах на крысах было установлено, что инсулин при его однократном интраназальном введении в различные моменты проецированного суточного цикла: 1, 7, 13 и 19 часов оказывает различное влияние на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра. В особенности инсулин вызывал опережающий фазовый сдвиг акрофазы суточного ритма, выраженность которого определялась моментом введения инсулина.

Биологические ритмы представляют собой повторяющиеся циклы физиологической, метаболической и поведенческой активности, период которых детерминирован геофизическими циклами окружающей среды или времязадателями: суточным вращением Земли, лунными циклами, вращением Земли вокруг Солнца. При этом значительный биологический интерес представляют циркадианные (*circa* – вокруг, около, *dies* – день) или околосуточные ритмы, имеющие одинаковый период (около 24 часов). К ним относятся, например, циркадианные изменения температуры тела, секреции гормонов, двигательной активности, частоты сердечных сокращений, цикл сон-бодрствование и др. [1,2].

Все эти ритмы могут поддерживаться даже в отсутствие внешних «подстраивающих» факторов, таких как изменения освещенности и температуры окружающей среды, поскольку являются проявлением активности супрахиазматического ядра (SCN) гипоталамуса, которое выполняет функцию главного циркадианного пейсмекера у млекопитающих [1].

Фотическая информация поступающая от фоторецепторов сетчатки по ретиногипоталамическому тракту в SCN, является наиболее важной «подстраивающей» информацией, позволяющей осциллятору SCN син-

хронизировать собственный эндогенный ритм с внешними циклами окружающей среды [1, 10]. Однако настраивать циркадианные ритмы SCN способны и факторы нефотического характера, в особенности режим приема пищи, ее состав и калорийность. В этом плане особый интерес представляет изучение центральных эффектов орексигенных и анорексигенных пептидов на уровне SCN и их влияния на физиологические и поведенческие циркадианные ритмы. Одним из наиболее важных анорексигенных полипептидов является инсулин. Инсулин, обладая хорошо известными гормональными эффектами на уровне периферических тканей, имеет целый ряд эффектов на уровне центральной нервной системы (ЦНС), в частности, участвует в регуляции потребления пищи, веса тела, вовлечен в осуществление репродуктивной и когнитивной функций человека [9]. Установлено, что большая часть этих эффектов обусловлена модулирующим влиянием инсулина на активность нейронов аркуатного ядра гипоталамуса. В то же время влияние инсулина на функцию SCN не изучено, несмотря на данные о наличии здесь инсулиновых рецепторов, а также отдельные свидетельства о способности инсулина модулировать уровень электрической активности нейронов данного ядра [17]. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение инсулина в качестве фактора настройки циркадианного ритма произвольной локомоторной активности лабораторных крыс.

### Условия и методы исследования

Эксперименты проводились в октяб-

---

*Мистрюгов Константин Алексеевич*  
(*mistryugov@yandex.ru*), младший научный сотрудник  
кафедры физиологии человека и животных  
Самарского государственного университета, 443011,  
Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1

ре 2009 г. и августе 2010 г. на 16 взрослых крысах-самцах линии Вистар весом  $212 \pm 17$  г в начале наблюдения. В лаборатории поддерживали постоянную температуру ( $21 \pm 1$  °C), свето- и звукоизоляцию. Все животные содержались индивидуально в одинаковых клетках, оборудованных беговым колесом и получали пищу и питьевую воду *ad libitum*. В течение всего эксперимента проводили автоматический мониторинг произвольной локомоторной активности животных, о которой судили по количеству оборотов бегового колеса. Эпоха измерения составляла 5 с.

На 1 этапе эксперимента в течение 2 недель использовали чередование 12 ч периодов освещения: белым светом и темноты (СТ). Во время светового периода (С) освещенность в клетках составляла приблизительно 170 лк. В период темноты (Т) применялось тусклое темно-красное освещение интенсивностью менее 3 лк. Известно, что такое освещение не воспринимается фоторецепторами сетчатки крыс и не оказывает влияния на циркадианный ритм их произвольной локомоторной активности. Второй этап эксперимента продолжали уже в условиях постоянной темноты (ТТ), поскольку в этих условиях, в отсутствие основного внешнего времязадателя – света – циркадианные ритмы определяются ритмическим свободнотекущим периодом активности (*free-running activity*) SCN. Через 7–8 суток после перехода на режим ТТ производили однократное интраназальное билатеральное введение 0,2 мкг инсулина (60 мкл водного раствора) в один из четырех моментов проецированного суточного цикла: 1, 7, 13 или 19 часов и продолжали регистрацию в течение 9–10 последующих суток. В контрольных экспериментах вместо инсулина вводили интраназально 60 мкл воды для инъекций.

Для выявления эффектов инсулина сравнивали данные за 5 суток, непосредственно предшествующих моменту интраназального введения, и 5 суток после введения. Определяли суммарную локомоторную активность и ее почасовое распределение в пределах суточного цикла. С использованием программ обработки актограмм, доступных на сайте [www.circadian.org](http://www.circadian.org), на основе косинор-анализа строили аппроксимирующие

графики циркадианного свободно текущего ритма локомоторной активности, определяли период и акрофазу ритма. Полученные экспериментальные данные подвергали статистической обработке. Для сравнения двух связанных выборок использовали парный t-тест или ранговый тест Уилкоксона (в случае несоответствия распределения данных в исследуемых выборках нормальному). Нормальность распределения данных в выборках проверяли с помощью теста Колмогорова-Смирнова, однородность дисперсий – с помощью теста Левена. Все данные выборок, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние арифметические и стандартные ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

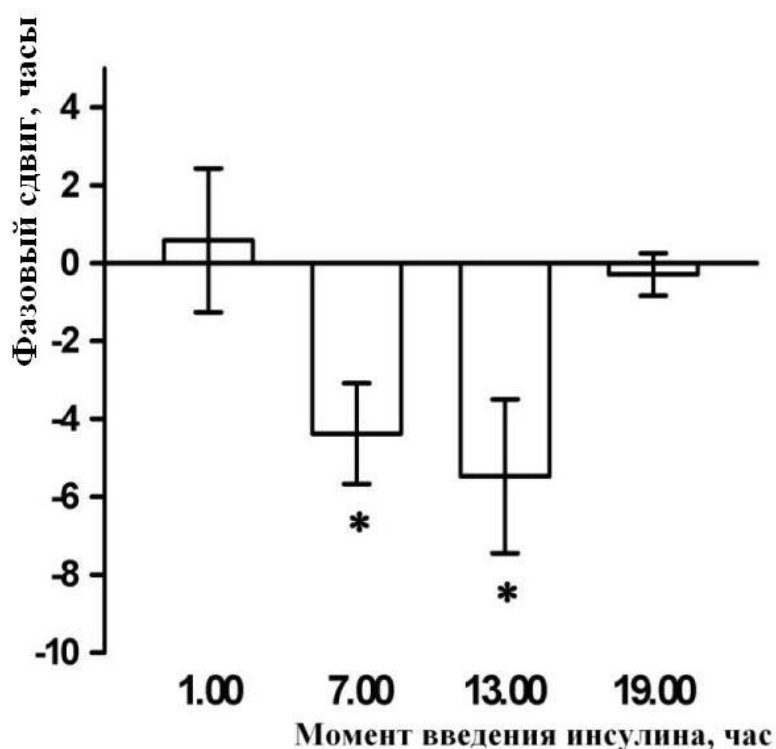
В условиях освещения СТ произвольная локомоторная активность животных значительно преобладала в темное время суток. При переходе на условия ТТ (свободнотекущая активность) произвольная локомоторная активность животных вплоть до конца экспериментов продолжала соответствовать проецированному темновому периоду. Эффекты однократного интраназального введения 0,2 мкг инсулина определялись проецированным временем его введения в пределах суточного цикла (см. рис. 1). Статистически значимые изменения исследуемых показателей произвольной локомоторной активности обнаружены в тех экспериментах, в которых инсулин вводили в 7 и 13 часов, тогда как его введение в 1 и 19 часов было неэффективным. Наиболее выраженные реакции отмечены при введении инсулина в 13 часов. Анализ сдвига акрофазы произвольной локомоторной активности выявил статистически значимое фазовое опережение на  $5,48 \pm 1,98$  часа ( $P = 0,039$ : парный t-тест).

Однократное интраназальное введение 0,2 мкг инсулина в 7 часов суточного времени приводило к аналогичным, но в целом менее выраженным изменениям произвольной локомоторной активности крыс. Характерным признаком реакции был опережающий фазовый сдвиг акрофазы суточного ритма на  $4,38 \pm 1,29$  часа ( $P = 0,028$ : парный t-тест).

Статистически значимых изменений

суммарной суточной активности не было выявлено независимо от времени введения инсулина. Интраназальное введение растворителя в контрольных экспериментах также не

вызвало статистически значимых изменений исследуемых показателей независимо от времени введения.



**Рис. 1.** Влияние однократного интраназального введения инсулина (0,2 мкг) в разные моменты суточного цикла на выраженность фазового сдвига циркадианного ритма произвольной локомоторной активности (бег в колесе)

Положительные значения фазового сдвига соответствуют фазовому запаздыванию, отрицательные – фазовому опережению. Звездочкой (\*) отмечены статистически значимые изменения после введения инсулина ( $P < 0,05$ : парный t-тест)

### Заключение

В настоящей работе изучалось влияние инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности. При этом исследуемое вещество вводили интраназально в дозе 0,2 мкг. Преимуществами такого способа введения веществ, является, во-первых, быстрое их проникновение в головной мозг в значительной концентрации вдоль обонятельных и тройничных нервов, минуя гематоэнцефалический барьер [8]. Во-вторых, из-за ограничения попадания вещества в системный кровоток снижается вероятность возникновения побочных эффектов. Так, в исследованиях на людях при интраназальном введении инсулина обнаружено повышение уровня концентрации этого вещества в ЦНС, но не в системном кровотоке [5, 7]. В-третьих, интра-

назальный способ введения инсулина производился с целью его непосредственного воздействия на циркадианный осциллятор SCN, поскольку ранее в экспериментах на примере орексина А было показано, что гипоталамус является отделом головного мозга, где регистрируется наивысшая концентрация полипептидов, вводимых интраназально [11].

В пользу непосредственного участия инсулина в модуляции функции циркадианного осциллятора служат данные о наличии в SCN относительно высокой концентрации инсулиновых рецепторов [3]. Не исключено, однако, что в определенной степени эти эффекты могут быть опосредованы другим типом рецепторов, также обнаруженных в данной области мозга и обладающих сродством к инсулину – IGF-1 рецепторами [13, 18], хотя

аффинитет последних к инсулину приблизительно в 340 раз ниже, чему у инсулиновых рецепторов [20]. Эффекты инсулина, обнаруженные в настоящей работе, проще всего объяснить прямым воздействием этого вещества на инсулиновые рецепторы, расположенные на нейронах SCN. Об этом косвенно свидетельствуют данные, полученные на переживающих срезах мозга крыс об ингибирующем влиянии аппликаций инсулина на спайковую активность расположенных здесь нейронов [17]. Альтернативная возможность заключается в опосредованном действии инсулина, например, через аркуатное ядро гипоталамуса, нейроны которого, как известно, содержат высокую концентрацию инсулиновых рецепторов, реагируют на инсулин и проецируются в SCN [4, 6, 12, 14, 15, 16, 19]. Для окончательного решения вопроса о физиологических механизмах, лежащих в основе влияний инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности, необходимы специальные исследования, в частности, регистрация эффектов инсулина на уровне отдельных нейронов SCN.

*Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 01-04-00653-а).*

### Литература

1. Заморский И. И., Пишак В. П. Функциональная организация фотопериодической системы головного мозга // Успехи физиол. наук. 2003. 34 (4). С. 37–53.
2. Abrahamson E. E., Moore R. Y. Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections // Brain Research. 2001. Vol. 916. №1–2. 172–191 p.
3. Anhe G. F., Caperuto L. C., Pereira-da-Silva M., Souza L. C., Hirata A. F., Velloso L. A., Cipolla-Neto J., Caivalho C. L. O. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamic // J. Neurochemistry. 2004. Vol. 90. № 3. P. 559–566.
4. Belgardt B. F., Okamura T., Bruning J. C. Hormone and glucose signaling in POMC and AgRP neurons // J. Physiology. 2009. Vol. 587. № 22. 5305–5314 p.
5. Benedict C., Hallschmid M., Schmitz K., Schultes B., Ratter F., Fehm H. L., Born J., Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart // Neuro-psychopharmacology. 2007. Vol. 32. № 1. P. 239–243.
6. Benoit S. C., Clegg D. J., Seeley R. J., Woods S. C. Insulin and leptin as adiposity signals // Recent Progress in hormone research. 2004. Vol. 59. № 1. P. 267–285.
7. Bohringer A., Schwabe L., Richter S., Schachinger H. Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress // Psychoneuroendocrinology. 2008. Vol. 33. № 10. P. 1394–1400.
8. Frey W. H. Bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord // Drug Delivery Technology. 2002. Vol. 2. P. 46–49.
9. Gerozissis K. Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions // Cellular and molecular neurobiology. 2003. Vol. 23. №1. P. 1–25.
10. Golombek D. A., Rosenstein R. E. Physiology of circadian entrainment // Physiol. Rev. 2010. Vol. 90. № 3. P. 1063–1102.
11. Hanson L. R., Martinez P. M., Taheri S., Kamsheh L., Mignot E., Frey W. H. Intranasal administration of hypocretin 1 (orexin A) bypasses the blood-brain barrier and targets the brain: a new strategy for the treatment of narcolepsy // Drug Delivery Technology. 2004. Vol. 4. № 4. P. 1–9.
12. Konner A. C., Klockener T., Bruning J. C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond // Physiology Behavior. 2009. Vol. 97. № 5. P. 632–638.
13. Michels K. M., Saavedra J. M. Different development of insulin-like growth factor I binding in the suprachiasmatic nucleus and median eminence of the rat hypothalamus // Neuroendocrinology. 1991. Vol. 54. № 5. P. 504–514.
14. Niswender K. D., Baskin D. G., Schwartz M. W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis // Trends Endocrinology and Metabolism. 2004. Vol. 15. № 8. P. 362–369.
15. Numan S., Russell D. S. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain // Molecular Brain Research. 1999. Vol. 72. № 1. P. 97–102.
16. Schwartz M. W., Sipols A., Marks J. L., Sanacora G., White J. D., Scheurink A., Kahn S. E., Baskin D. G., Woods S. C., Figlewicz D. P. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y

gene expression by insulin // Endocrinology. 1992. Vol. 130. № 6. P. 3608–3616.

17. Shibata C., Liou S. Y., Ueki S., Oomura Y. Inhibitory action of insulin on supra-chiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparations // Physiology Behavior. 1986. Vol. 36. № 1. P. 79–81.

18. Wada A., Yokoo H., Yanagita T., Kobayashi H. New twist on neuronal insulin re-

ceptor signaling in health, disease and therapeutics // J. Pharmacology Science. 2005. Vol. 99. № 2. P. 128–143.

Yi C.-X., van der Vliet J., Dai J., Yin G., Ru L., Buijs R. M. Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus // Endocrinology. 2006. Vol. 147. № 1. P. 283–294.

*Статья поступила в редакцию 13.10.2012 г.*