

## МОДУЛЯЦИЯ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА ЛОКОМОТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ИНСУЛИНОМ<sup>1</sup>

© 2011 К.А. Мистрюгов, А.Н. Инюшкин<sup>2</sup>

В хронических экспериментах на крысах исследовали влияние однократного интраназального введения инсулина на циркадианный ритм произвольной локомоторной активности. Выявлен опережающий фазовый сдвиг акрофазы суточного ритма, выраженность которого определялась моментом введения инсулина.

**Ключевые слова:** циркадианные ритмы, инсулин, локомоторная активность.

### Введение

Представления о функциях инсулина в организме млекопитающих в настоящее время значительно расширились. Гормональные эффекты инсулина на уровне периферических тканей хорошо изучены. Вместе с тем обнаружено, что инсулиновые рецепторы широко представлены в головном мозге, включая обонятельную луковицу, гипоталамус, гиппокамп, мозжечок, амигдалу и кору головного мозга [1], здесь же активно осуществляется и экспрессия их матричной РНК [2]. Это предполагает наличие у данного вещества негормональных эффектов, реализующихся на уровне различных структур ЦНС. В особенности высокая экспрессия инсулиновых рецепторов происходит в супрахиазматическом и паравентрикулярном ядрах гипоталамуса [3]. В мозге инсулиновые рецепторы экспрессируются астроцитами и нейронами [4]. Нейронные инсулиновые рецепторы концентрируются в синапсах, особенно в компонентах постсинаптической мембраны [5]. Периферические чувствительные и автономные ганглии также содержат инсулиновые рецепторы [6]. Предполагается, что на уровне центральной нервной системы инсулин может играть роль нейромодулятора и фактора роста [7]. Однако значение инсулина в качестве времязадателя циркадианных ритмов локомоторной активности супрахиазматического ядра не изучено.

### Методика проведения эксперимента

Эксперименты проводились в октябре 2009 г. — августе 2010 г. на 16 взрослых крысах-самцах Вистар весом  $212 \pm 17$  г в начале наблюдения. В лаборатории под-

<sup>1</sup>Работа поддержана грантом РФФИ № 10-04-00653а.

<sup>2</sup>Мистрюгов Константин Алексеевич (Mistryugov@yandex.ru), Инюшкин Алексей Николаевич (ainyushkin@mail.ru), кафедра физиологии человека и животных Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

держивали постоянную температуру ( $21 \pm 1$  °C), свет — 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) использовался тусклый темно-красный свет интенсивностью менее 3 лк. 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*) циркадианного осциллятора супрахиазматического ядра. Через 7–8 суток после перехода на режим ТТ производили однократное интраназальное билатеральное введение 0,2 мкг инсулина (Актрапид НМ, Novo Nordisk A/S, Дания, 60 мкл водного раствора) в один из четырех моментов субъективного суточного цикла: 1, 7, 13 или 19 часов (начало световой фазы при режиме СТ в начале эксперимента соответствует 0 часов) и продолжали регистрацию в течение 7–10 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 свободнотекущего ритма локомоторной активности и определяли 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 выборки, соответствующие нормальному распределению, представлены как средние  $\pm$  ошибки среднего. Изменения исследуемых параметров считались статистически значимыми при  $P \leq 0,05$ .

## Результаты исследования

В условиях освещения СТ произвольная локомоторная активность животных значительно преобладала в субъективную ночь. При переходе на условия ТТ (свободно текущая активность) произвольная локомоторная активность животных вплоть до конца экспериментов продолжала соответствовать субъективной темной фазе.

Эффекты однократного интраназального введения 0,2 мкг инсулина определялись субъективным временем его введения в пределах суточного цикла. 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, т. е. в начале субъективного темного периода. После введения инсулина происходило смещение локомоторной активности в направлении фазового опережения, в результате чего эта активность перемещалась из субъективного темного периода во вторую половину субъективного светового периода. Данные реакции, однако, не сопровождались статистически значимыми изменениями суммарной суточной активности. Величина этого показателя также не изменялась и при введении инсулина в другие моменты суточного цикла. Анализ сдвига акрофазы произвольной локомоторной активности выявил статистически значимое фазовое опережение данного показателя на  $5,48 \pm 1,98$  часа ( $P=0,039$ : парный t-тест) после интраназального введения инсулина в 13 часов субъективного времени.

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

Интраназальное введение растворителя в контрольных экспериментах не вызвало статистически значимых изменений исследуемых показателей независимо от времени введения.

## Обсуждение результатов

В настоящей работе изучалось влияние инсулина на суточный ритм произвольной локомоторной активности. При этом исследуемое вещество вводили интраназально в дозе 0,2 мкг. Следует отметить, что такой способ введения полипептидов, в частности инсулина, становится все более популярным в экспериментальной практике, особенно в тех работах, где целью ставится воздействие этих веществ на структуры головного мозга. Установлено, что при интраназальном введении полипептиды быстро проникают в головной мозг в значительной концентрации, следуя вдоль обонятельных и тройничных нервов, минуя гематоэнцефалический барьер [8]. Кроме этого, одним из преимуществ такого метода введения является ограничение попадания вещества в системный кровоток, что снижает вероятность возникновения побочных эффектов. Действительно, в исследованиях на людях при интраназальном введении инсулина обнаружено повышение уровня концентрации этого вещества в ЦНС, но не в системном кровотоке [9; 10].

В настоящем исследовании интраназальное введение инсулина производилось с целью его непосредственного воздействия на гипоталамическое супрахиазматическое ядро, где расположен циркадианный осциллятор. Такой подход представляется теоретически обоснованным, поскольку ранее в экспериментах на грызунах на примере орексина А было продемонстрировано, что гипоталамус является отделом головного мозга, где регистрируется наивысшая концентрация полипептидов, вводимых интраназально [11]. Одним из аргументов, косвенно свидетельствующих в пользу непосредственного участия инсулина в модуляции функции циркадианного осциллятора, служат данные о наличии в супрахиазматическом ядре относительно высокой концентрации специфических инсулиновых рецепторов [12]. Известно, что инсулиновые рецепторы головного мозга идентичны инсулиновым рецепторам поджелудочной железы [7]. В мозге инсулиновые рецепторы участвуют в регуляции синаптической пластичности [13], детерминировании дли-

ны дендритных отростков [14], вовлечены в механизмы обучения и памяти [15] и связаны с патогенезом некоторых неврологических расстройств [16].

Эффекты инсулина, обнаруженные в настоящей работе, проще всего объяснить прямым воздействием этого вещества на инсулиновые рецепторы, расположенные на нейронах супрахиазматического ядра. Ранее в экспериментах *in vitro* была продемонстрирована способность другого анорексигенного пептида лептина вызывать фазовое опережение циркадианного ритма электрической активности нейронов супрахиазматического ядра крыс при непосредственном воздействии вещества на это ядро [17]. Альтернативная возможность заключается в опосредованном действии инсулина через аркуатное ядро, нейроны которого также содержат высокую концентрацию инсулиновых рецепторов и проецируются к супрахиазматическому ядру [18]. Для окончательного решения вопроса о физиологических механизмах, лежащих в основе обнаруженного нами влияния инсулина на циркадианный ритм локомоторной активности, необходимы дальнейшие исследования.

## Литература

- [1] Unger J.W., Betz M. Insulin receptors and signal transduction proteins in the hypothalamo-hypophyseal system: A review on morphological findings and functional implications // *Histol Histopathol.* 1998. V 13. P. 1215–1224.
- [2] Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by *in situ* hybridization / J.L. Marks [et al.] // *Endocrinology.* 1990. V 12. P. 3234–3236.
- [3] Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography / E.S. Corp [et al.] // *Neurosci Lett.* 1986. V 70. P. 17–22.
- [4] Structure-function relationships of insulin receptor interactions in cultured mouse astrocytes / S.Q. Zhu [et al.] // *Brain Res.* 1990. V 529. P. 329–332.
- [5] Abbott M.A., Wells D.G., Fallon J.R. The insulin receptor tyrosine kinase substrate p58/53 and the insulin receptor are components of CNS synapses // *Neurosci.* 1999. V 19. P. 7300–7308.
- [6] Waldbillig R.J., LeRoith D. Insulin receptors in the peripheral nervous system: a structural and functional analysis // *Brain Res.* 1987. V 409. P. 215–220.
- [7] Havrankova J., Brownstein M. Concentrations of insulin and of insulin receptors in the brain are independent of peripheral insulin levels // *Clin. Invest.* 1979. V 64. P. 636–642.
- [8] Frey W.H. Bypassing the blood-brain barrier to deliver therapeutic agents to the brain and spinal cord // *Drug Deliv. Tech.* 2002. V 2. P. 46–49.
- [9] Intranasal insulin improves memory in humans: superiority of insulin aspart / C. Benedict [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* 2007. V 32. P. 239–243.
- [10] Intranasal insulin attenuates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress / A. Bohringer [et al.] // *Psychoneuroendocrinology.* 2008. V 33. P. 1394–1400.
- [11] Intranasal administration of hypocretin 1 (orexin A) bypasses the blood-brain barrier and targets the brain: a new strategy for the treatment of narcolepsy / L.R. Hanson [et al.] // *Drug Deliv. Tech.* 2004. V 4. P. 1–9.
- [12] *In vivo* activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus / G.F. Anhe [et al.] // *J. Neurochem.* 2004. V. 90. P. 559–566.
- [13] Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD / E.C. Beattie [et al.] // *Nat Neurosci.* 2000. V. 3. P. 1291–1300.
- [14] Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth / C.M. Cheng [et al.] // *Neurosci Res.* 2003. V. 73. P. 1–9.

- [15] Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning / J.T. Dou [et al.] // *Learn Mem.* 2005. V. 12. P. 646–655.
- [16] Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction / Z. Zhao [et al.] // *Schizophr Res.* 2006. V. 84. P. 1–14.
- [17] Prosser R.A., Bergeron H.E. Leptin phase-advances the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro // *Neurosci. Lett.* 2003. V. 336. P. 139–142.
- [18] Numan S., Russell D.S. Discrete expression of insulin receptor substrate-4 mRNA in adult rat brain // *Mol. Brain. Res.* 1999. V. 72. P. 97–102.

Поступила в редакцию 26/XI/2010;  
в окончательном варианте — 26/XI/2010.

## MODULATION OF THE CIRCADIAN RHYTHM OF LOCOMOTOR ACTIVITY BY INSULIN

© 2011 K.A. Mistryugov, A.N. Inyushkin<sup>3</sup>

In chronic experiments, the effect of a single intranasal administration of insulin on the circadian rhythm of voluntary locomotor activity was studied. A phase-advance of acrophase of the daily rhythm depending on time of insulin administration was found.

**Key words:** circadian rhythms, insulin, locomotor activity.

Paper received 26/XI/2010.  
Paper accepted 26/XI/2010.

---

<sup>3</sup>Mistryugov Konstantin Alexeevich ([Mistryugov@yandex.ru](mailto:Mistryugov@yandex.ru)), Inyushkin Alexey Nikolaevich ([ainyushkin@mail.ru](mailto:ainyushkin@mail.ru)), the Dept. of Human and Animal Physiology, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.