

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ДОБОВОГО РИТМУ ЦИРКУЛЯТОРНИХ РІВНІВ ІНСУЛІНУ ТА ГЛЮКОЗИ ЗА МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ, ІНДУКОВАНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГІПОПІНЕАЛІЗМОМ*

Міщенко Т. В., Гладких О. І., Полторак В. В., Бондаренко Л. О.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків
chronobk@bk.ru

Відповідно до хронобіологічних уявлень про організацію фізіологічних функцій, гомеостаз в організмі обумовлений шляхом генерації добових ритмів ендогенною циркадною системою. Чіткий 24-годинний патерн забезпечує головний пейсмейкер часової структури — супрахіазматичні ядра гіпоталамуса завдяки синхронізації молекулярних осциляторів, розташованих в інших областях мозку та периферичних органах, згідно зі змінами циклу світло/темрява. Нейрогуморальним медіатором головного пейсмейкера являється гормон пінеальної залози — мелатонін, який модулює функцію багатьох органів та систем відповідно до астрономічного часу [1, 2]. На сьогодні вже не викликає сумніву існування зв'язку між порушенням фізіологічних ритмів (циркадним десинхронизмом) в організмі, зменшенням тривалості сну та рівня ендогенного мелатоніну в результаті нічного освітлення [3]. При цьому епідеміологічними дослідженнями встановлено існування паралельних тенденцій зни-

ження тривалості сну та зростання розповсюдженості ожиріння, діабету та артеріальної гіпертензії [4–6].

Гіпопінеалізм характеризується зниженням біосинтезу та секреції пінеальною залозою біологічно активних речовин індолюної та пептидної природи, зокрема мелатоніну [7]. Нашими попередніми дослідженнями було показано, що цілодобове освітлення навіть низької інтенсивності індукує розвиток гіпопінеалізму [8], на тлі якого розвивається комплекс основних складових метаболічного синдрому [9], до якого належить, зокрема, інсулінорезистентність/гіперінсулінемія та порушення толерантності до глюкози. Відомо, що циркадна система здійснює регуляторний вплив на продукцію інсуліну панкреатичними β -клітинами шляхом рецептор-опосередкованого ефекту мелатоніну, поєднаного з експресією годинникових генів в острівцях Лангерганса. Так, поряд з результатами досліджень *in vivo*, в яких показано, що формування циркадного патерну

*Дослідження виконано є фрагментом НДР лабораторії хроноендокринології ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України» «Дослідити механізми прискореного старіння при гіпопінеалізмі: хронобіологічні аспекти» (державний реєстраційний № 113U001282).

Установою, що фінансує роботу, є НАМН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості при виконанні роботи.

Рукопис надійшов до редакції 12.01.2015.

секреції інсуліну здорової людини, з характерними максимальними рівнями гормону в денний час та мінімальними — вночі, обумовлене постпрандіальним зростанням інсуліну в світлову фазу [10, 11], отримано також докази існування негативного зворотного зв'язку між добовим ритмом інсуліну та мелатоніну за умови постійної інфузії глюкози протягом доби [12]. В досліджах *in vitro* на ізольованих острівцях Лангерганса щурів встановлено існування добового ритму секреції інсуліну, у забезпечені якого важлива роль належить експресії годинникових генів β -клітинами [13]. Використовуючи дану модель, виявлено супресивний ефект мелатоніну на секрецію інсуліну панкреатичними β -клітинами [14] та посилення глюкозо- чи форсколін-стимульованої про-

дукції гормону інсулінпродукуючим апаратом внаслідок пінеалоектомії або блокування мембранних рецепторів мелатоніну його антагоністом лузіндолом (10 мкмоль/л) [15, 16].

Таким чином, існує досить обґрунтоване припущення, згідно з яким мелатонін здійснює модулюючий ефект на секрецію інсуліну β -клітинами острівців Лангерганса та, відповідно, глюкозний гомеостаз в організмі.

З огляду на вищевикладене, метою даного дослідження було вивчити особливості змін добового ритму рівнів інсуліну та глюкози в циркуляції у кролів із метаболічним синдромом, що розвивається на тлі гіпопінеалізму, індукованому тривалим цілодобовим освітленням.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Роботу виконано на 19 молодих статевозрілих (віком 4–5 місяців) самцях кролів. Контрольну групу утримували в умовах природного циклу світло/темрява, з метою моделювання гіпопінеалізму для піддослідних тварин був створений режим цілодобового освітлення (в світлу пору доби — природне сонячне світло, в темну — електричне освітлення інтенсивністю у клітках 30–40 люкс) [17]. Протягом дослідження усіх тварин утримували на стандартному раціоні. Тривалість експерименту складала 5 місяців. Дослідження проведено відповідно до загальних етичних принципів проведення експериментів на тваринах, узгоджених з Положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Хронобіологічний експеримент ґрунтувався на двох визначальних точках: день (13⁰⁰–14⁰⁰) та ніч (1⁰⁰–2⁰⁰). В ці години щомісячно проводили забір крові з крайової вени вуха тварин контрольної та піддослідної груп для проведення подальших гормональних та біохімічних досліджень.

Концентрацію інсуліну визначали в сироватці крові імуноферментним методом із використанням набору реактивів «Insulin ELISA» (DRG Instruments GmbH, Німеччина) та імуноферментного аналізатора Stat Fax 3200 («Awareness», США). Для даного набору реактивів перехресна реакція антитіл до інсуліну людини з інсуліном кроля складає 63%, при цьому амінокислотна послідовність молекули інсуліну людини відрізняється від амінокислотного складу кроля лише варіацією в 30-му положенні В-ланцюга [18]. Рівень глюкози визначали в сироватці крові глюкозооксидазним методом за допомогою ферментативного аналізатора «Ексан-Г» (Литва).

Отримані вибірки перевіряли на розподіл відповідно до нормального закону за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Статистичну обробку даних проводили з використанням *t*-критерію Стюдента. Результати подано у вигляді $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$ (середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього арифметичного). Розходження вважали значущими при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У кролів контрольної групи впродовж дослідження зберігався незмінним циркадний ритм концентрації інсуліну та глюкози в сироватці крові, а саме, максимальний рівень — вдень, мінімальний — вночі (дані не представлені). Добові коливання концентрації інсуліну в динаміці розвитку гіпопінеалізму наведено в табл. 1.

Встановлено, що за умови природного циклу світло/темрява у піддослідних тварин відбувається значуще зниження циркуляторного рівня інсуліну вночі порівняно з денним показником. Ці дані вказують на існування добового ритму даного гормону у кролів та співпадають з існуючими результатами досліджень циркадного патерну концентрації інсуліну в крові у здорових людей репродуктивного віку [10, 11]. В результаті утримання кролів в умовах цілодобової світлової експозиції протягом 1–5 місяців зареєстровано нівелювання циркадних варіацій рівня інсуліну в циркуляції. Показано, що відсутність добового патерну секреції інсуліну спостерігалась за нормоінсулінемії (через 1, 3–5 місяців) або гіперінсулінемії (через 2 місяці). При цьому звертають на себе увагу добові особливості підвищення рівня інсуліну в різні терміни розвитку гіпопінеалізму. Так, через 1 місяць цілодобового освітлення у піддослідних тварин збільшення концентрації інсуліну ($p < 0,05$) встановлено лише вночі. В результаті подовження цілодобової світлової експозиції до 2 місяців було виявлено виразну гіперінсулінемію як вдень, так і вночі, яка, ймовірно, мала компенсаторний характер внаслідок розвитку у кролів в даний термін спостереження інсулінорезистентності, встановленої на підставі розрахунку НОМА-індексу ($10,95 \pm 0,79$ проти $2,68 \pm 0,25$ ум. од. у вихідному стані; $p < 0,05$) [19]. Останнє узгоджується з існуючими в науковій літературі даними, якими показано, що мелатонін здійснює стимулюючий рецептор-опосередкований ефект на інсулін-залежний транспорт глюкози в клітинах скелетних м'язів мишей та гіпоталамусі щурів [20, 21]. Згідно з результатами цих досліджень механізм такої дії гормону пов'я-

заний з посиленням фосфорилування по тирозину субстрата інсулінового рецептора-1 та активності фосфатидилінозитол-3-кінази (IRS-1/PI-3-кіназний каскад). Додатковим свідченням ролі індоламіну в глюкозному гомеостазі являється ініціація інсулінорезистентності на тлі стандартного раціону у лінії мишей з генетично зумовленим порушенням (зниженням) функціонування мембранних рецепторів мелатоніну [22].

Надалі, через 3 місяці після початку експерименту рівень інсуліну і вдень, і вночі залишався вищим за контроль, проте значно нижчим, ніж в попередній термін спостереження. Через 4 та 5 місяців після початку цілодобового освітлення концентрація інсуліну вдень вже статистично не відрізнялась від показника у вихідному стані ($p > 0,05$), проте вночі даний параметр значуще збільшувався на 99,2 та 111,8 %, відповідно.

Результати гормональних досліджень свідчать про те, що підшлункова залоза чутливо реагує на тривалий дефіцит мелатоніну в організмі в різну пору доби, проте вночі ця реакція проявляється раніше і яскравіше виражена.

Результати визначення добових ритмів глюкози у тих самих кролів наведено в табл. 2.

Із таблиці 2 видно, що інтактним молодим статевозрілим кролям, яких утримували в умовах природної зміни дня і ночі, характерний добовий ритм концентрацій глюкози в крові з максимумом удень та мінімумом уночі, що цілком співпадає з даними, отриманими на молодих здорових волонтерах [10, 11]. Через 1 місяць цілодобового освітлення добовий ритм глюкози був збережений, ймовірно, за рахунок зростання концентрації інсуліну вночі, проте амплітуда добових коливань зменшувалась з 1,62 до 0,66 ммоль/л. В результаті цілодобової світлової експозиції протягом 2 місяців встановлено інверсію добового ритму рівня глюкози, оскільки в цей термін спостереження нічний показник значуще перевищував денну величину ($p < 0,05$). Аналогічну тенденцію було виявлено для циркадних змін рів-

ня інсуліну, оскільки нічний показник концентрації гормону перевищував денний на 22,6 %, але не досягав статистичної значущо-

сті. В результаті цілодобової світлової експозиції протягом 3–5 місяців у кролів із гіпопінеалізмом зареєстровано нівелювання до-

Т а б л и ц я 1

Динаміка змін добового ритму циркуляторного рівня інсуліну у кролів із гіпопінеалізмом, індукованим тривалим цілодобовим освітленням, пмоль/л

Група, кількість тварин	Умови досліджу	Пора доби	
		день	ніч
I n = 11	Вихідний стан (природна зміна дня і ночі)	105,37 ± 14,46	62,84 ± 7,49*
Цілодобове освітлення			
II n = 10	1 місяць	117,50 ± 11,86 r _{I-II} > 0,05	102,40 ± 11,97 r _{I-II} < 0,05
III n = 7	2 місяці	446,90 ± 53,10 r _{I-III} < 0,001	547,80 ± 58,89 r _{I-III} < 0,001
IV n = 9	3 місяці	155,20 ± 17,19 r _{I-IV} < 0,05	117,10 ± 10,26 r _{I-IV} < 0,001
V n = 6	4 місяці	120,30 ± 12,86 r _{I-V} > 0,05	125,20 ± 8,39 r _{I-V} < 0,001
VI n = 6	5 місяців	131,10 ± 15,93 r _{I-VI} > 0,05	133,10 ± 16,30 r _{I-VI} < 0,001

П р и м і т к а. Значущість при співставленні показників день-ніч: * — p < 0,05.

Т а б л и ц я 2

Динаміка змін добового ритму концентрації глюкози в сироватці крові у кролів із гіпопінеалізмом, індукованим тривалим цілодобовим освітленням, ммоль/л

Група, кількість тварин	Умови досліджу	Пора доби	
		день	ніч
I n = 14	Вихідний стан (природна зміна дня і ночі)	5,54 ± 0,20	3,92 ± 0,31**
Цілодобове освітлення			
II n = 10	1 місяць	4,69 ± 0,25 r _{I-II} < 0,05	4,03 ± 0,16* r _{I-II} > 0,05
III n = 11	2 місяці	4,36 ± 0,18 r _{I-III} < 0,001	4,96 ± 0,19* r _{I-III} < 0,05
IV n = 7	3 місяці	5,76 ± 0,60 r _{I-IV} > 0,05	5,18 ± 0,20 r _{I-IV} < 0,05
V n = 6	4 місяці	5,64 ± 0,28 r _{I-V} > 0,05	5,75 ± 0,16 r _{I-V} < 0,05
VI n = 6	5 місяців	5,56 ± 0,45 r _{I-VI} > 0,05	6,50 ± 0,24 r _{I-VI} < 0,001

П р и м і т к а. Значущість при співставленні показників день-ніч: * — p < 0,05; ** — p < 0,001.

бових змін концентрації глюкози на підставі відсутності значущих відмінностей між денними та нічними величинами, що відбувалось на тлі відсутності добового ритму інсуліну (див. табл. 1).

Особливу увагу привертають дані, які вказують на те, що підвищення концентрації глюкози в крові найяскравіше проявляється саме вночі, що може бути використано як діагностичний тест для раннього виявлення порушень метаболізму вуглеводів при метаболічному синдромі, що розвивається на тлі гіпопінеалізму.

Аналізуючи результати досліджень даного фрагменту роботи, слід зазначити, що незважаючи на те, що майже всі показники концентрації глюкози в крові (за виключенням нічних визначень через 5 місяців після початку моделювання гіпопінеалізму) не виходять за межі фізіологічного коридору для даного показника і при однократному визначенні повинні трактуватися як «норма», тільки завдяки хронобіологічним дослідженням стає можливим виявити такі порушення, як нівелювання або інверсія ритму глюкози — стан, що передує більш глибоким змінам вуглеводного метаболізму і може лежати в основі маніфестації цукрового діабету.

Результати даної експериментальної роботи співпадають з існуючими в науковій літературі уявленнями про участь циркадної системи в регуляції функціонування інсулінпродукуючого апарату острівців Лангерганса поряд з таким визначеним фактором періодичної активності панкреатичних β -клітин, як споживання їжі [10, 11]. Цілком ймовірно, що вплив порушення природного циклу світло/темрява на добовий ритм біосинтезу та секреції інсуліну у піддослідних кролів

може бути реалізований шляхом зниження рівня мелатоніну в організмі [8] — гормону, якому притаманний супресивний ефект щодо функціональної активності панкреатичних β -клітин, та / або шляхом порушення експресії годинникових генів [12–16].

Отримані нами дані певною мірою узгоджуються з дослідженням [23], в якому встановлено, що споживання їжі не являється єдиним визначним фактором рівня інсуліну в організмі при утримуванні щурів як на збалансованій, так і на високожировій, високофруктозній дієті, але за умови різних світлових режимів. Односпрямованими являються результати спостережень, отримані нами на кролях, та дані [24], якими показано, що утримування щурів в умовах штучно створеного цілодобового освітлення або в природних умовах так званих «білих ночей» Карелії викликає розвиток гіперінсулінемії, гіперглікемії та глюкозурії, а також низки інших складових метаболічного синдрому (абдомінального ожиріння, гіперхолестеринемії, гіпербеталіпопротеїнемії).

Отже, результати проведеного дослідження вказують на те, що недостатність мелатоніну в організмі викликає зміни функціональної активності панкреатичних β -клітин та метаболізму глюкози. Виявлене нівелювання добового ритму інсуліну та глюкози може свідчити про тривалу напругу β -клітин і в сполученні з виразною гіперінсулінемією (через 2 місяці цілодобового освітлення), ймовірно, лежить в основі зниження функціональної активності (через 4 та 5 місяців) та прогресуючої загибелі панкреатичних β -клітин [25], посилення інсулінорезистентності як складової метаболічного синдрому [19] у кролів із гіпопінеалізмом.

ВИСНОВКИ

1. При метаболічному синдромі, що розвивається на тлі гіпопінеалізму, експериментально індукованому цілодобовим освітленням, відбуваються суттєві порушення циркадних ритмів концентрації інсуліну та глюкози, що слід розцінювати як важливу складову в патогенезі цього захворювання.
2. Підвищення концентрації глюкози в крові на різних етапах розвитку метаболічного синдрому при гіпопінеалізмі зафіксовано саме вночі, тому нічне визначення даного показника може бути використане для раннього виявлення порушень обміну вуглеводів.

**ЛІТЕРАТУРА
(REFERENCES)**

1. Morris CJ, Aeschbach D, Scheer FA. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 349(1):91-104.
2. Tsang AH, Barclay JL, Oster H. *J Mol Endocrinol* 2014; 52:1-16.
3. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, et al. *Ann Med* 2012; 44(6):564-577.
4. Van Cauter E, Knutson KL. *Eur J Endocrinol* 2008; 159:59-66.
5. Gangwisch JE, Heymsfield SB, Boden-Albala B, et al. *SLEEP* 2007; 30(12):1667-1673.
6. Knutson KL, Van Cauter E, Rathouz PJ, et al. *Arch Intern Med* 2009; 169(1):1055-1061.
7. Helimskij AM. Jеpифіз (shishkovidnaja zheleza), *Moskva*, 1969: 183 p.
8. Gubina-Vakulik GI, Bondarenko LA, Sotnik NN. *Uspehi Gerontologii* 2007; 20(1):92-95.
9. Bondarenko LO, Poltorak VV, Sergijenko LJ, et al. *Inform Bjul Dodatok do «Zhurnalu AMN Ukrainy»* 2009; 25:118-119.
10. Tasaka Y, Inoue S, Maruno K, et al. *Endocrinol Japon* 1980; 27(4):495-498.
11. Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. *J Clin Invest* 1988; 81:442-448.
12. Boden G, Ruiz J, Urbain J, et al. *Am J Physiol* 1996; 271(2):246-252.
13. Sadacca LA, Lamia KA, de Lemos AS, et al. *Diabetologia* 2011; 54:120-124.
14. Peschke E, Peschke D. *Klin Neurophysiol* 2010; 41(1):1085-1092.
15. Picinato MC, Haber EP, Carpinelli AR, et al. *J Pineal Res* 2002; 33:172-177.
16. Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, et al. *J Pineal Res* 2000; 28(3):156-164.
17. Patent 20383 UA. Sposib modeljuvannja involjutyvnyh procesiv u pineal'nij zalozі.
18. Shrejber V. Patofiziologija zhelez vnutrennej sekrecii, *Praga*, 1987: 493 p.
19. Mishhenko TV, Gladkyh OI, Poltorak VV, et al. Dosjagnennja ta perspektyvy eksperymental'noi' i klinichnoi' endokrynologii': materialy nauk.-prakt. konf., *Harkiv*, 2014: 107-108 p.
20. Anhe GF, Caperuto LC, Pereira-Da-Silva M, et al. *J Neurochemistry* 2004; 90:559-566.
21. Ha E, Yim SV, Chung JH, et al. *J Pineal Res* 2006; 41(1):67-72.
22. Contreras-Alcantara S, Baba K, Tosini G. *Obesity* 2010; 18(9):1861-1863.
23. Klötting I, Bahr J, Wilke B, et al. *Lab Anim* 2013; 47(1):31-35.
24. Vinogradova IA. *Uspehi Gerontologii* 2007; 20(2):70-75.
25. Bondarenko LO, Sergijenko LJ, Cherevko GM, et al. *Probl Endokryn Patologii'* 2014; 2:57-64.

ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ДОБОВОГО РИТМУ ЦИРКУЛЯТОРНИХ РІВНІВ ІНСУЛІНУ ТА ГЛЮКОЗИ ЗА МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ, ІНДУКОВАНОГО ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГІПОПІНЕАЛІЗМОМ

Міщенко Т. В., Гладких О. І., Полторак В. В., Бондаренко Л. О.

ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В. Я. Данилевського НАМН України», м. Харків
chrono@bk.ru

В експериментальному дослідженні на молодих статевозрілих самцях кролів встановлено нівелювання добового ритму концентрації інсуліну та порушення добового ритму глюкози (інверсія, що змінюється нівелюванням) в динаміці формування метаболічного синдрому, що розвивається на тлі гіпопінєалізму, індукованому тривалодіючою низькоінтенсивною світловою експозицією в темну пору доби. Виявлені зміни циркадного ритму секреції інсуліну, глюкози та гіперінсулінемія, що являються наслідком хронічного порушення природного циклу світло/темрява, лежать в основі маніфестації метаболічного синдрому при гіпопінєалізмі.

К л ю ч о в і с л о в а: гіпопінєалізм, метаболічний синдром, інсулін, глюкоза, добовий ритм.

ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ СУТОЧНОГО РИТМА ЦИРКУЛЯТОРНЫХ УРОВНЕЙ ИНСУЛИНА И ГЛЮКОЗЫ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ, ИНДУЦИРОВАННОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГИПОПИНЕАЛИЗМОМ

Мищенко Т. В., Гладких А. И., Полторак В. В., Бондаренко Л. А.

ГУ «Институт проблем эндокринной патологии им. В. Я. Данилевского НАМН Украины»,
г. Харьков
chrono@bk.ru

В экспериментальном исследовании на молодых половозрелых самцах кролей установлено нивелирование суточного ритма концентрации инсулина и нарушение циркадного паттерна глюкозы (инверсия, которая сменяется нивелированием) в динамике формирования метаболического синдрома, который развивается на фоне гипопинеализма, индуцированного длительно действующей низкоинтенсивной световой экспозицией в темное время суток. Изменения циркадного ритма секреции инсулина, глюкозы и гиперинсулинемия, являющиеся следствием хронического нарушения естественного цикла свет/темнота, лежат в основе манифестации метаболического синдрома при гипопинеализме.

К л ю ч е в ы е с л о в а: гипопинеализм, метаболический синдром, инсулин, глюкоза, суточный ритм.

FEATURES OF CHANGES IN CIRCADIAN RHYTHM OF CIRCULATING LEVELS OF INSULIN AND GLUCOSE IN THE METABOLIC SYNDROME INDUCED EXPERIMENTAL HYPOPINEALISM

T. V. Mishchenko, A. I. Gladkih, V. V. Poltorak, L. O. Bondarenko

SI «V. Danilevsky Institute for Endocrine Pathology Problems of the NAMS of Ukraine», Kharkiv
chrono@bk.ru

In the experimental study on young adult male rabbits it was found leveling of circadian rhythm in insulin concentration and violation of circadian pattern of glucose (inversion, which is replaced by leveling) in the dynamics of the formation of metabolic syndrome, which develops in the hypopinealism induced by long-term exposure to low-light in the dark. Change in the circadian rhythm of secretion of insulin, glucose, and hyperinsulinemia that result of chronic disturbance of natural light/dark cycle, are the basis of the manifestation of the metabolic syndrome in hypopinealism.

K e y w o r d s: hypopinealism, metabolic syndrome, insulin, glucose, daily rhythm.