

## ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА НА ЧАСТОТУ СЕРДЕЧНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕМПЕРАТУРУ СУСЛИКА *Spermophilus undulatus* ПРИ ПРОБУЖДЕНИИ ОТ СПЯЧКИ

© 2017 г. Д.А. Игнатъев, Л.А. Андреева, З.Г. Амерханов, А.И. Ануфриев\*, А.Е. Алексеев\*\* \*\*\*, О.В. Накипова

Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

\*Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, 677890, Якутск, просп. Ленина, 41;

\*\*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3;

\*\*\*Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Stabile 5, Mayo Clinic, 200 1st Street SW, Rochester, MN 55905, USA

E-mail: olga.nakipova@gmail.com

Поступила в редакцию 19.10.16 г.

Исследовано влияние инсулина на частоту сердечных сокращений и температуру тела сусликов *Spermophilus undulatus* в процессе спровоцированного пробуждения от зимней спячки. Показано, что эффекты инъекции инсулина спящим сусликам зависят от стадии пробуждения и температуры тела животных, измеряемой ректально. На первом этапе при температуре сусликов ниже 10°C значения частоты сердечных сокращений и ректальной температуры меняются одинаково у контрольных животных и группы, получившей инъекцию инсулина. На следующей стадии пробуждения при повышении температуры выше 12°C у сусликов после инъекции инсулина значительно замедляется рост частоты сердечных сокращений и ректальной температуры, длительность этой стадии пробуждения увеличивается до 110 мин против 80 мин у контрольных животных. Напротив, при повышении ректальной температуры выше 20°C у животных с инъекцией инсулина происходит более ускоренный рост значений частоты сердечных сокращений и ректальной температуры, что сокращает длительность завершающей стадии пробуждения (до 40 мин против 60 мин в контроле). Обсуждаются возможные механизмы разнонаправленного действия инсулина на частоту сердечных сокращений и ректальную температуру суслика на отдельных этапах пробуждения в сопоставлении с изменением уровня эндогенного инсулина и глюкозы в сыворотке крови животных.

*Ключевые слова:* инсулин, гибернация, суслики, пробуждение.

Возможность управления уровнем метаболизма в тканях человека и животных с целью уменьшения последствий ишемического повреждения клеток и органов привлекает перспективами использования в клинике, в частности, при лечении инсульта и инфаркта [1,2]. Особое внимание исследователей вызывают механизмы естественного гипобиоза – зимней спячки млекопитающих (гибернации), позволяющей ряду видов животных в течение многих месяцев переживать холод и бескормицу за счет запасенного подкожного жира и снижения уровня метаболизма до 1–5% от исходного уровня. Клетки тканей гибернантов адаптированы к низким температурам (до 0°C), замедленному току кро-

ви, резкому падению содержания кислорода и глюкозы [3–6]. Периоды собственно спячки (бауты) периодически прерываются кратковременными пробуждениями, жизненно необходимыми животным, в частности, для возобновления и сохранения проводимости нервных клеток [7,8] и/или для восстановления запасов энергетических субстратов – глюкозы и жирных кислот, синтез которых невозможен при низких температурах [9]. Так, якутский суслик *S. undulatus* в сезон гибернации через каждые 1–2 недели спячки пробуждается на период времени до 12–14 ч с повышением температуры тела, измеряемой ректально ( $T_p$ ) до ~36°C [10–16]. Длительность пробуждения сусликов при температуре среды около 1°C составляет шесть–семь часов. При проведении опытов при комнатной температуре (18–20°C) суслики пробуждаются через 2,5–3 ч (до начала экспериментов

Сокращения:  $T_p$  – температура тела, измеряемая ректально, ЧСС – частота сердечных сокращений,  $T_c$  – температура в области сердца.

животные спят при температуре 1–3°C в темной комнате). В состоянии спокойного бодрствования частота сердечных сокращений (ЧСС) суслика составляет 130–160 уд/мин. При выходе из оцепенения ЧСС возрастает с 3–4 уд/мин в состоянии спячки до 350–400 уд/мин при достижении зоны повышенного термогенеза. Таким образом, зимоспящие млекопитающие обладают значительным потенциалом предотвращения реперфузионных повреждений при выходе из спячки без признаков нарушений функций клеток мозга или миокарда [7,10,13,17,18]. Результаты изучения естественных механизмов, лежащих в основе управления процессами пробуждения животных, могут найти применение при разработке достаточно адекватной методики, позволяющей при определенных условиях повышать уровень устойчивости клеток мозга или сердца обычных животных (и человека) к условиям ишемии/реперфузии.

Зимоспящие виды отмечены во всех отрядах млекопитающих. Полагают, что все млекопитающие имеют генетическую предрасположенность к состоянию оцепенения [3,19,20]. Основой адаптации гибернантов к условиям низких температур служат обычные физиологические системы организма, функционирующие и у незимоспящих теплокровных [21]. Считается также, что зимняя спячка является проявлением фенотипической адаптации: по набору генов зимоспящие млекопитающие не отличаются от незимоспящих [22].

Зимоспящие животные являются удобной моделью для поиска способа получения состояния управляемого гипобиоза, основанного на естественных физиологических механизмах [4,17,23–25]. Указывается на ряд возможных практических применений гипотермии в клинике [26]. При этом отмечается, что для обычных теплокровных животных и человека существуют серьезные ограничения по использованию фармакологических средств, связанные с резким возрастанием риска остановки сердца в условиях глубокой гипотермии. Поиск соединений, желателно естественной природы, способных эффективно влиять на глубину состояния оцепенения у зимоспящих животных, может значительно ускорить разработку новых методик клинического лечения ряда заболеваний [2,26].

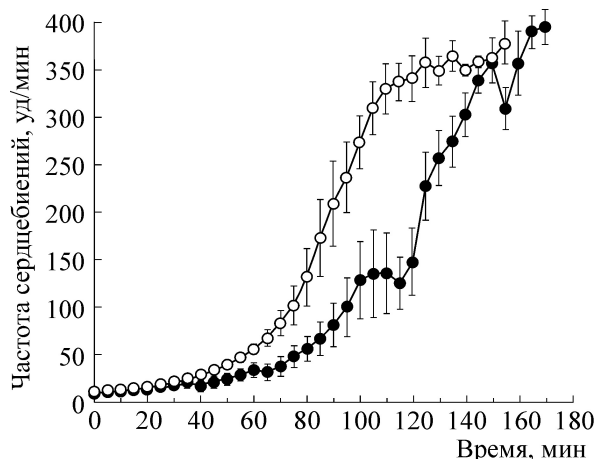
Результаты наших предыдущих исследований [27,28], а также данные литературы [29] дают основания полагать, что инсулин может играть значительную роль в механизмах пробуждения гибернантов от спячки. Содержание инсулина в плазме крови зимоспящих значительно увеличивается в процессе накопления

животными подкожного жира в осенний период, предшествующий спячке, и снижается в сезон гибернации с декабря по январь; при этом снижается и чувствительность тканей к экзогенному инсулину со значительным подавлением его секреции [30]. Отмечено также увеличение концентрации инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы в период спячки, что способствует быстрому повышению содержания этого гормона в плазме крови при периодических пробуждениях животных [31]. Показано, что уровень инсулина в крови зимних животных при кратких пробуждениях намного превышает его содержание у активных летних животных; чувствительность тканей к инсулину также восстанавливается [28,32–34]. Обратимость подобного типа дисрегуляции является признаком наличия у зимоспящих специфических адаптивных механизмов, управляющих значительными изменениями уровня метаболических состояний, что может опираться на свойственную данным животным способность активно настраивать эндокринную систему и, соответственно, липидный и глюкозный гомеостаз [29,35,36].

В настоящей работе проведено исследование влияния инсулина на характер роста температуры тела, измеряемой ректально, и ЧСС сусликов при пробуждении от зимней спячки. Показано, что инъекция инсулина сусликам при провокации пробуждения в целом замедляет выход животных из состояния оцепенения, при этом характер и направленность эффектов гормона зависит от стадии пробуждения и температуры животных. Изменения  $T_r$  и ЧСС сусликов при пробуждении происходят на фоне соответствующего повышения уровня эндогенного инсулина и концентрации глюкозы в плазме крови, зафиксированных на животных, не подвергавшихся инъекции гормона. Полученные данные дают основание полагать, что содержание глюкозы является лимитирующим фактором на различных стадиях пробуждения животных.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на якутских длиннохвостых сусликах *Spermophilus undulatus* обоего пола массой 500–800 г в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите животных (1986, 86/609/ЕЕС). Сусликов отлавливали летом в окрестностях Якутска и содержали в условиях вивария в индивидуальных клетках при естественном освещении и свободном доступе к пище и воде. Перед сезоном спячки клетки с сусликами переносили в темное по-



**Рис. 1.** Влияние инсулина на ЧСС сусликов при выходе из состояния спячки. Светлые кружки — контрольные животные, темные кружки — животные, инъецированные инсулином. Кривые усреднены по группам из пяти сусликов; показаны доверительные интервалы для 5%-го уровня значимости.

мещение с температурой 1–3°C. Исследования проводили в середине сезона гибернации с конца декабря до начала февраля.

Провокацию пробуждения проводили на четвертый день спячки, перед опытом сусликов переносили в светлую комнату с температурой 18–20°C. Ранее с помощью телеметрии нами было показано, что выход сусликов из оцепенения при провокации пробуждения происходит сходным образом с естественным пробуждением животных, но несколько быстрее [13,14,37].

Извлечение суслика из гнезда и подготовка опыта занимали 5–7 мин, после чего животным внутривенно вводили инсулин в дозе 3 ЕД в 0,7 мл физиологического раствора. Контрольным сусликам вводили в том же объеме физиологический раствор.

Температуру тела сусликов измеряли с точностью  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  ректально при помощи термодатчика RST 1Q307 (Швейцария), вводимого в ободочную кишку на глубину 6 см. Кардиограмму животных регистрировали с помощью электроэнцефалографа ЭЭГП4-02; отводящие электроды размещали подкожно на передней левой лапе и над лопаткой животного. Измерение ЧСС и  $T_p$  проводили каждые 4 мин после начала пробуждения. Часть животных декапитировали на разных этапах пробуждения для сопоставления температуры в области сердца ( $T_c$ ) с ректальной  $T_p$ .

В начале наших исследований был важен правильный выбор дозы инсулина. Стандартные дозы, применяемые на обычных животных,

составляют 0,3–0,8 ЕД на кг массы при температуре тела  $\sim 37^\circ\text{C}$ . Суслик в состоянии глубокой спячки снижает  $T_p$  до 2–3°C, при этом в сотни раз падает ритм дыхания, частота сердцебиений, уровень метаболизма. В пробных опытах мы использовали дозы в диапазоне концентраций от 0,12 до 12 ЕД. Доза 3 ЕД на животное массой 500–600 г (5 ЕД в пересчете на 1 кг массы) показала наиболее значимый результат и была выбрана в качестве основной для исследований. Концентрация 3 ЕД на порядок выше принятых за стандарт для обычных животных, однако необходимо учитывать, что физиологические и обменные процессы организма спящего суслика могут быть на два порядка ниже по сравнению с обычными лабораторными животными. При используемых нами дозах инсулина от 0,12 до 12 ЕД у сусликов никогда не наблюдалось судорог, которые свидетельствовали бы о передозировке.

Разведение кристаллического инсулина проводили в подкисленной среде (0,003 М HCl, pH 2,7–3,0) до его полного растворения.

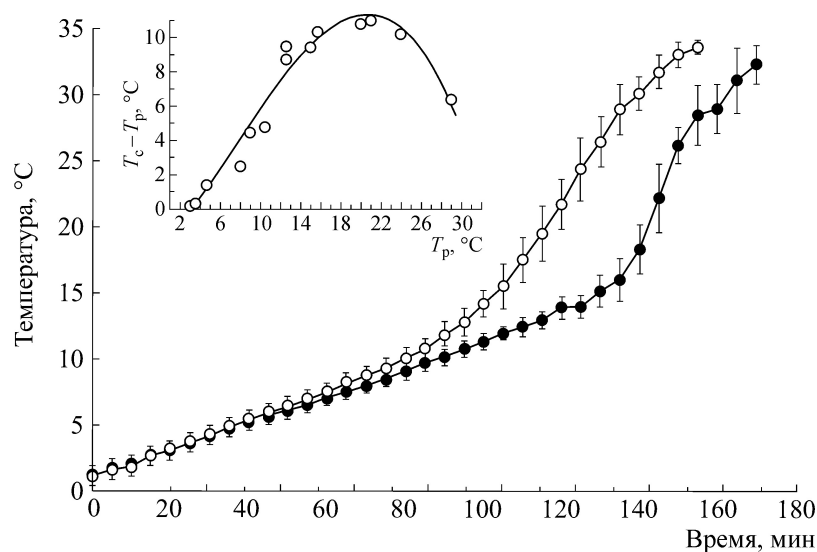
Пробы сыворотки крови сусликов собирали в состоянии спячки ( $T_c = 3\text{--}5^\circ\text{C}$ ), в процессе пробуждения при  $T_c$  порядка 20–22°C и 28–32°C, что соответствует  $T_p$  10–12°C и 18–20°C соответственно [14], и в активном состоянии между баутами спячки. Цельную кровь центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин. Полученную сыворотку крови хранили при температуре  $-20^\circ\text{C}$ . Содержание инсулина в сыворотке крови суслика определяли иммунорадиометрическим методом, используя тестовый комплект INSULIN(E)IRMA (набор IMMUNOTECH INSULIN, кат. № 3210, IMMUNOTECH, Чехия) с использованием двух видов мышиных моноклональных антител к различным эпитомам его молекулы.

Измерение уровня глюкозы в крови суслика проводили с помощью глюкометра Accu-Check Go (Roche, Германия). Опыты по регистрации уровня инсулина и глюкозы в сыворотке крови животных выполнены в условиях «натошак».

Для статистической обработки данных использовали пакет программ Origin 5.0 (Microcal Origin, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Извлечение сусликов из гнезда и введение инсулина или физиологического раствора инициировало пробуждение животных. На рис. 1 представлены кривые нарастания частоты сердечных сокращений сусликов при выходе из состояния спячки, приведенные по группам (по-



**Рис. 2.** Влияние инсулина на температуру сусликов при выходе из состояния спячки. Светлые кружки – контроль, темные – суслики с инъекцией инсулина. Кривые усреднены по группам из пяти сусликов, показаны доверительные интервалы для 5%-го уровня значимости. На врезке: изменение соотношения значений ректальной температуры и температуры в области сердца в процессе пробуждения сусликов.

лучивших инъекцию инсулина и контрольных животные).

В начале пробуждения ЧСС сусликов была минимальна и составляла 5–6 уд/мин; через 40 мин после начала пробуждения ЧСС увеличивалась до 30–40 уд/мин, практически не различаясь по группам животных. В дальнейшем рост сердцебиений в группах начинал существенно различаться: к 80-й минуте пробуждения при  $T_p = 10\text{--}12^\circ\text{C}$  у контрольных животных значения ЧСС составляли в среднем 130 уд/мин, у сусликов с инъекцией инсулина аналогичные значения достигались только к 110-й минуте пробуждения. На 120-й минуте ЧСС у контрольных сусликов поднималась до 350 уд/мин, тогда как у животных с инъекцией инсулина этот уровень сердцебиений достигался только к 150 мин от начала пробуждения.

На рис. 2 представлены изменения ректальной температуры сусликов при выходе из спячки.

На начальном этапе пробуждения скорость роста  $T_p$  была сходна по группам животных и составляла порядка  $0,1^\circ\text{C}/\text{мин}$ ; к 80-й минуте  $T_p$  в обеих группах достигала  $8\text{--}9^\circ\text{C}$ . Как и в случае ЧСС, дальнейшая динамика роста ректальной температуры начинала существенно различаться по группам животных. Контрольные суслики увеличивали скорость роста  $T_p$  до  $0,3^\circ\text{C}/\text{мин}$  и к 140-й минуте температура животных повышалась до  $28\text{--}30^\circ\text{C}$ ; далее скорость подъема  $T_p$  несколько замедлялась и к пробуждению животных на 160-й минуте их температура достигала  $\sim 34^\circ\text{C}$ . У сусликов с инъек-

цией инсулина после 80-й минуты пробуждения скорость роста  $T_p$  не увеличивалась и к 140-й минуте составляла в среднем всего  $\sim 14^\circ\text{C}$ . Однако в дальнейшем скорость роста  $T_p$  быстро повышалась до  $0,4^\circ\text{C}/\text{мин}$  (больше, чем в контроле) и в результате к 180-й минуте достигла  $\sim 34^\circ\text{C}$ .

На врезке (рис. 2) показано превышение значений температур сусликов в области сердца ( $T_c$ ) над ректальной температурой ( $T_p$ ) в процессе пробуждения от спячки. Можно видеть, что рост  $T_c$  происходит быстрее и в фазе повышенного термогенеза превышает значения  $T_p$  на  $10\text{--}12^\circ\text{C}$ . К пробуждению животных расхождения значений температур постепенно нивелируются.

В таблице представлены результаты измерений уровня инсулина и глюкозы в сыворотке крови сусликов, находившихся в следующих физиологических состояниях: а) в глубокой спячке при температуре тела  $3\text{--}5^\circ\text{C}$ ; б) в процессе пробуждения при  $T_p = 10\text{--}12^\circ\text{C}$  (что соответствует  $T_c = 18\text{--}20^\circ\text{C}$ ); в) при  $T_p > 13\text{--}15^\circ\text{C}$  (что соответствует  $T_c = 29\text{--}34^\circ\text{C}$ ), г) зимой в активном состоянии между баутами спячки; д) в активный летний период – для сравнения.

Из данных, приведенных в таблице, можно видеть, что содержание глюкозы и инсулина в сыворотке крови сусликов менялось в зависимости от физиологического состояния животных. У спящих сусликов отмечены самые низкие концентрации инсулина и глюкозы:  $11,68 \pm 1,77$  и  $5,6 \pm 0,7$  мМоль/л соответственно. В процессе

Содержание инсулина и глюкозы в сыворотке крови сусликов *S. undulatus* на разных этапах пробуждения от зимней спячки, а также в активный летний период

Суслики	Инсулин (мкЕД/л)	Глюкоза (мМ/мл)
Зимние спящие (январь–февраль)	11,68 ± 1,77 ( <i>n</i> = 8)	5,57 ± 0,66 ( <i>n</i> = 10)
Пробуждающиеся ( $T_c = 20^\circ\text{C}$ ; февраль–март)	21,41 ± 1,20 ( <i>n</i> = 2)	5,42 ± 1,50 ( <i>n</i> = 6)
Пробуждающиеся ( $T_c = 29\text{--}34^\circ\text{C}$ ; февраль–март)	34,47 ± 3,72 <sup>§</sup> ( <i>n</i> = 7)	10,47* ± 1,36 ( <i>n</i> = 6)
Зимние активные (между баутами спячки, январь–февраль)	16,03 ± 2,45* ( <i>n</i> = 6)	6,07 ± 0,55 ( <i>n</i> = 6)
Летние активные (конец июня–июль)	18,20 ± 2,27* ( <i>n</i> = 8)	8,28 ± 0,35* ( <i>n</i> = 12)

Примечание. \* –  $P < 0,05$ ; § –  $P < 0,002$  (в сравнении со спящими сусликами).

пробуждения уже при достижении температуры сердца сусликов порядка  $20^\circ\text{C}$  ( $T_p = 10\text{--}12^\circ\text{C}$ ) концентрация эндогенного инсулина примерно в два раза превышала таковую у спящих животных; при этом, как можно видеть из таблицы, содержание глюкозы еще не отличалось от состояния спячки. В фазе повышенного термогенеза, когда  $T_c$  достигала  $29\text{--}34^\circ\text{C}$  ( $T_p = 13\text{--}15^\circ\text{C}$ ), уровень эндогенного инсулина повышался практически в три раза относительно его уровня в спячке ( $34,47 \pm 3,72 / 11,68 \pm 1,77$ ), при этом содержание глюкозы также увеличилось почти в два раза по сравнению с уровнем, характерным для спящих, а также активных летних животных. После пробуждения сусликов отмечается несколько повышенный уровень инсулина в сыворотке крови, тогда как содержание глюкозы снижается до уровня, сопоставимого с состоянием спячки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как показывают наши исследования, инсулин способен оказывать влияние на характер выхода сусликов из состояния спячки, проявляя при этом как ингибирующие, так и активирующие свойства в зависимости от этапа пробуждения и температуры тела животных.

На начальной низкотемпературной стадии пробуждения, когда температура сусликов не превышала  $8\text{--}9^\circ\text{C}$ , не было выявлено значимых эффектов инъекции инсулина по сравнению с контрольной группой животных. На следующем этапе пробуждения, который у контрольных сусликов протекал в зоне повышенного термогенеза с быстрым ростом ЧСС и  $T_p$ , в группе животных с инъекцией инсулина рост этих параметров был заторможен на  $\sim 80$  мин по сравнению с контролем (с 40-й по 120-ю минуту; рис. 1 и 2). Однако на завершающей стадии пробуждения у животных с инъекцией инсулина отмечено быстрое нарастание ЧСС и  $T_p$ , превышающее рост этих параметров у контрольных сусликов в зоне повышенного термогенеза.

Как известно, в начале пробуждения сусликов от спячки основным термогенным органом выступает бурая жировая ткань, расположенная в непосредственной близости к жизненно важным органам: сердцу, легким, спинному мозгу и кровеносным сосудам, идущим к головному мозгу. Приток теплой крови к тканям периферии ограничен в этот период сужением кровеносных сосудов [16,38,39]. По мере разогревания животных восстанавливается общее снабжение кровью холодных тканей периферии и более теплых внутренних органов, в частности сердца, что временно понижает рост температуры и ЧСС [15]. Этот относительно короткий, но характерный период незначительно отражается на статистической кривой значений ЧСС и  $T_p$  у контрольной группы животных, однако отчетливо проявляется у сусликов, получивших инъекцию инсулина; рост частоты сердечных сокращений останавливается и даже понижается во временном интервале от 100-й до 120-й минуты пробуждения (рис. 1), что в среднем замедляет на 80 мин (с 40-й до 120-й минуты) длительность начального периода пробуждения. Последующая стадия пробуждения, зона повышенного термогенеза, протекает у этих животных даже несколько активнее по сравнению с контролем.

Таким образом, влияние инсулина на пробуждение сусликов носит выраженный фазный характер. Ингибирующий эффект начинает значимо проявляться при повышении  $T_p$  свыше  $10\text{--}12^\circ\text{C}$ ; наиболее выраженные влияния инсулина отмечены при значениях ЧСС выше 130–140 уд/мин, когда рост сердечбиений приостанавливается. Активирующие влияния инсулина наблюдаются при превышении  $T_p$  свыше  $18\text{--}20^\circ\text{C}$  (130–160 мин).

Характер влияний инсулина, зависящий от стадии пробуждения и температуры животных, по-видимому определяется свойствами адаптации организма гибернантов к оптимальному выходу из состояния спячки. Бурая жировая

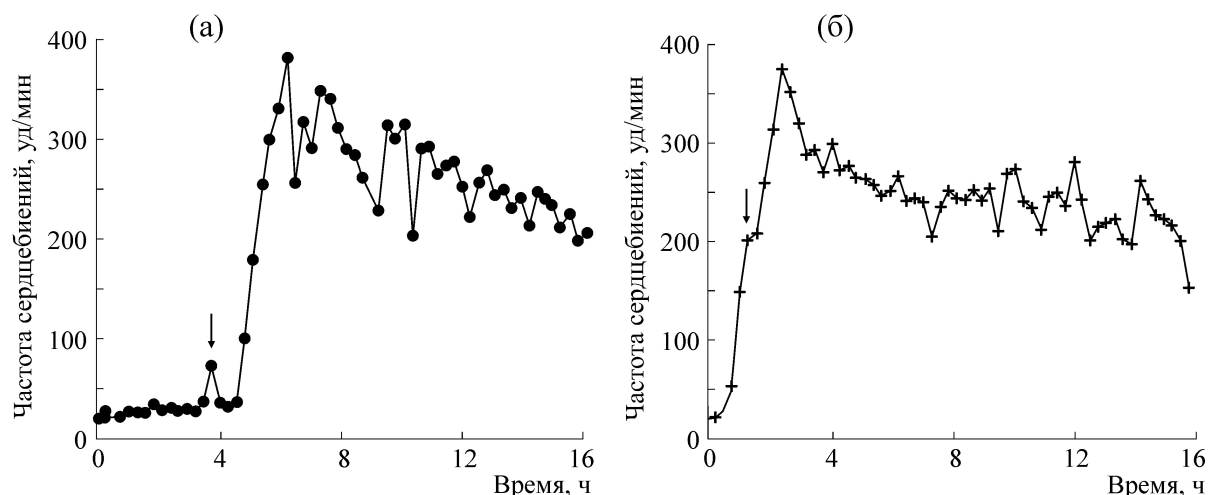


Рис. 3. Примеры изменения частоты сердечных сокращений суслика, полученные с помощью телеметрии при естественном (а) и спровоцированном (б) выходе из состояния зимней спячки. По оси абсцисс – время (ч); по оси ординат – ЧСС (уд/мин). Стрелкой отмечено характерное временное замедление роста ЧСС.

ткань, расположенная в непосредственной близости к жизненно важным органам, является в начале пробуждения своеобразной «запальной свечой» для ряда энергетических субстратов организма зимоспящих животных [38,39]. Известно, что наряду со своими основными функциями инсулин способен выполнять роль «регулятора энергии» бурой жировой ткани, значительно экономя ее запасы для оптимального использования в ходе пробуждения животных [40,41].

Учитывая важность этого положения для нашего дальнейшего анализа, на конкретных примерах рассмотрим особенности изменений частоты сердечных сокращений суслика при естественном (спонтанном) и спровоцированном пробуждении от спячки. Эти данные получены нами ранее с помощью телеметрии. В естественной среде обитания провокация пробуждения возникает, например, при проникновении в гнездо суслика крыс или мышей, весьма опасных для жизни спящих животных. В практике эксперимента иногда возникает необходимость спровоцировать пробуждение суслика в определенный период баута спячки.

На рис. 3а приведена конкретная кривая изменений ЧСС одного из сусликов при естественном пробуждении от зимней спячки.

На начальной стадии пробуждения наглядно проявляется характерное временное замедление роста ЧСС, связанное с моментом притока к внутренним органам охлажденной крови периферии (отмечено стрелкой). На последующей стадии пробуждения (в фазе повышенного термогенеза) частота сердечбиений быстро на-

растает (до 400 уд/мин). После окончательного пробуждения суслика ЧСС постепенно понижается до уровня спокойного бодрствования.

Аналогичная кривая получена на этом же суслике при провокации пробуждения в следующем бауте спячки (рис. 3б). Основное отличие здесь проявляется на начальной стадии пробуждения, которая при провокации пробуждения протекает быстрее и имеет менее выраженное краткосрочное замедление, что происходит при достижении ЧСС порядка 200 уд/мин.

В наших опытах (рис. 1 и 2) процедура извлечения сусликов из гнезда и инъекция им инсулина или физиологического раствора практически провоцировала пробуждение животных. У контрольной группы выход из состояния спячки протекал сходно с тем, как это наблюдалось при провокации пробуждения в условиях телеметрии (рис. 1 и 3б). У сусликов с инъекцией инсулина на десятки минут замедлялся рост ЧСС и выход животных из состояния спячки. Сопоставляя этот результат (рис. 1) с данными естественного пробуждением суслика (рис. 3а), ткани которого также содержат определенное количество эндогенного инсулина, можно отметить следующее: а) имеется определенное сходство в характере замедления роста ЧСС на низкотемпературной стадии пробуждения при естественном и спровоцированном выходе суслика из состояния спячки; б) умеренная дополнительная инъекция сусликам экзогенного инсулина значительно пролонгирует выход животных из состояния спячки, в то время как сама процедура инъекции провоцировала ускорение пробуждения; в) влияние инсулина на частоту сердечбиений сусликов имеет выражен-

ный фазный характер, зависящий от температуры животных: начальная низкотемпературная стадия пробуждения характеризуется временным замедлением роста ЧСС; при повышении температуры сусликов свыше 18–20°C значения ЧСС быстро нарастают, превышая в фазе повышенного термогенеза ЧСС контрольных животных.

Временное замедление роста ЧСС и  $T_p$  сусликов в начале пробуждения прямо связано со следующими, уже отмеченными выше факторами: первое – это способность инсулина подавлять быстрый рост тепла бурой жировой тканью [40,41], второе, прямо связанное с этим моментом, – приток к внутренним органам холодной крови периферии, ограниченное до этого периода сужением кровеносных сосудов [38,39]. Связь отмеченных факторов имеет адаптивный характер, обеспечивая оптимальный выход животных из состояния спячки с наименьшими затратами энергии.

Одна из основных функций инсулина – транспорт глюкозы из крови в клетки, где она превращается в энергию. Результаты наших исследований с введением экзогенного инсулина при провокации пробуждения сусликов сопоставимы с данными, полученными при измерении содержания эндогенного инсулина и глюкозы в крови сусликов в период пробуждения от зимней спячки. Как следует из таблицы, при достижении температуры в области сердца ~20°C концентрация эндогенного инсулина уже примерно в два раза превышала его уровень у спящих животных; при этом содержание глюкозы пока еще практически не отличалось от состояния спячки. И только в зоне повышенного термогенеза содержание глюкозы быстро нарастало и при температуре сердца 29–34°C в два раза превышало ее концентрацию по сравнению со спящими животными. Как следует из таблицы, наиболее интенсивный рост уровня инсулина происходит на завершающей стадии пробуждения: при достижении температуры сердца 29–34°C содержание гормона практически в три раза превышает его уровень в состоянии спячки. Через несколько часов после пробуждения, когда суслики вновь погружались в сонное состояние, готовясь к очередному бауту спячки, содержание инсулина и глюкозы в крови животных начинало понижаться и становилось сопоставимым с тем, которое наблюдается в состоянии глубокой спячки (см. таблицу), хотя температура животных пока еще находилась на достаточно высоком уровне (~34°C).

По литературным данным преимущественным источником энергии для мозга и сердца

пробуждающихся животных служит не глюкоза, а кетоновые тела, производные жирных кислот [5]. Запасы глюкозы, накопленные за счет катаболизма кетонов, интенсивно расходуются именно на завершающей стадии пробуждения, когда инсулин также начинает оказывать выраженное активирующее влияние на сократительную функцию миокарда.

Известно, что у животных, находящихся в состоянии спячки, глюкоза крови не регулируется экзогенно введенным инсулином, в то время как глюкагон вызывает существенное увеличение ее концентрации [36]. По нашим данным уровень глюкозы в сыворотке крови спящих сусликов минимален и соответствует состоянию голодания. В то же время на завершающихся этапах пробуждения при достижении температуры сердца 29–34°C он увеличивается почти в два раза, что свидетельствует об определяющей роли углеводных субстратов в процессе разогревания животных.

Наши данные согласуются с результатами исследователей, полученных на гибернантах других видов – ежах и сонях [31–33]. В частности показано, что уровень инсулина в крови спящих ежей очень низок, но значительно возрастает при спонтанном пробуждении [32]. В плазме крови садовой сони уровень инсулина начинал увеличиваться при температуре тела животных свыше 17°C и достигал максимальных значений при 26°C [36].

Дыхательный коэффициент пробуждающихся сусликов на начальной стадии разогревания составляет порядка 0,78, что говорит о смешанном липидно-углеводном типе используемых энергетических субстратов [42]. Дыхательный коэффициент на завершающей стадии пробуждения равняется единице, таким образом, в этот период углеводы становятся преобладающим энергетическим субстратом.

Окислительная активность бурого жира примерно в 2,5 раза превышает таковую для миокарда и в 5,5 раза – для скелетных мышц [38], однако на последующем этапе разогревания более значительную роль начинает играть скелетная мускулатура как система с наибольшим объемом теплопродукции организма. По оценкам, сделанным в работе [38], у обычных теплокровных с массой тела около 0,5 кг на долю мышц приходится около 60% потребляемого кислорода. У гибернантов эта оценка, видимо, выше за счет специфических адаптивных механизмов, ускоряющих разогрев животных. Пробуждение сусликов в этот период сопровождается выраженной мышечной дрожью; при этом происходят обратимые изменения в составе сократительных белков мышц сусликов,

приводящие к сокращениям с более низким коэффициентом полезного действия, но увеличенным выделением тепла [43].

Согласно нашим данным введение инсулина замедляет пробуждение сусликов, что связано со стабилизацией содержания глюкозы на пониженном уровне. Можно предположить, что инсулин-индуцируемая гипогликемия до определенного момента ограничивает доступность глюкозы к тканям, что, видимо, связано с особой ролью глюкозы в процессах пробуждения [5].

На завершающихся стадиях пробуждения дополнительно введенный инсулин может способствовать утилизации глюкозы, в пользу чего свидетельствует повышение скорости роста частоты сердцебиений при температуре сердца выше 25°C, соответствующей максимальному значению дыхательного коэффициента. В пользу этого положения говорят и наши данные, полученные ранее на изолированной папиллярной мышце сердца суслика. При выделении папиллярной мышцы на различных стадиях пробуждения инсулин практически не влиял на сократительную активность мышцы в процессе выхода из состояния спячки и только на завершающей стадии пробуждения в диапазоне температуры сердца 29–35°C начинал оказывать значимый инотропный эффект [28].

Проведенные нами исследования свидетельствуют о высокой пластичности эндокринной системы гибернантов при регуляции гомеостаза глюкозы, являющейся частью адаптивной программы организма по оптимальному переходу животных на новый уровень метаболизма.

Резкий скачок уровня инсулина в крови (практически в три раза), казалось бы, мог вызвать снижение уровня глюкозы, однако в действительности же наблюдается его значительный рост (см. таблицу), что, возможно, происходит за счет активной иммобилизации глюкозы из различных депо. Давно установлено, что запасы глюкозы сохраняются в основном в печени и в ряде других тканей гибернантов в виде гликогена, которые сохраняются на протяжении спячки и активно иммобилизуются в плазму крови при пробуждении животных [44]. Считается, что в этот момент глюкоза особенно необходима для функционирования центральной нервной системы. В то же время на самой энергоемкой стадии пробуждения отмечен высокий уровень глюкозы, который, видимо, сохраняется для завершающей стадии пробуждения. Этот факт можно объяснить наличием каких-то иных источников энергии, функционирующих в зоне повышенного термогенеза, которые не требуют значительного расхода

глюкозы. Как показано в работе [5], основным энергетическим субстратом для мозга и сердца зимоспящих животных при выходе из спячки является не глюкоза, а кетоновые тела, производные жирных кислот. Преимущественная утилизация жировых запасов в период гибернации приводит к увеличению кетоновых тел в плазме крови, которое снижает не только потребление глюкозы в сердце и мышцах, но и обеспечивает энергетическую добавку различным органам последующим окислением кетоновых тел [45]. Все эти изменения могут способствовать сохранению глюкозы во время спячки.

Итак, приведенные в настоящей работе результаты исследований, полученные на интактных сусликах, показывают, что, наряду с отмеченным ранее активирующим свойством инсулина на завершающей стадии пробуждения, этот гормон обладает и способностью оказывать и ингибирующее влияние на низкотемпературной начальной стадии пробуждения.

Активирующий эффект инсулина перед пробуждением сусликов, видимо, опосредован механизмами его рецепторного действия на транспорт глюкозы. Как показывает анализ, ингибирующий эффект инсулина на начальной низкотемпературной стадии пробуждения связан со способностью этого гормона, наряду со своими другими функциями, выполнять и роль «регулятора энергии» бурой жировой ткани, основные затраты которой происходят именно на завершающей стадии пробуждения. Оптимальное использование бурого жира жизненно необходимо зимоспящим животным, учитывая, что в сезон гибернации пробуждения сусликов носят многократный периодический характер. Запасы бурой жировой ткани жизненно необходимы и при окончательном весеннем пробуждении сусликов, когда еще нет необходимого корма в условиях резкого повышения уровня метаболизма: повышенная гормональная активность, связанная с размножением животных в условиях отрицательной среднесуточной температуры среды.

Как показывают наши исследования, завершающая стадия пробуждения протекает при одновременном росте уровня эндогенного инсулина и концентрации глюкозы в крови животных; введение на этом фоне дополнительной умеренной дозы экзогенного инсулина, увеличивает в этот период скорость выхода животных из состояния спячки, которая была понижена на начальной стадии пробуждения. Этот факт свидетельствует в пользу того важного положения, что доступность глюкозы является лимитирующим фактором для процесса пробуждения сусликов.



Предварительные результаты данного исследования были представлены на Международном симпозиуме по биологической подвижности (Пушино, 2016 г.) [46].

Статья посвящается светлой памяти С.Г. Колаевой, инициатора исследований проблем зимней спячки в ИБК РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Malatesta, M. Biggiogera, and C. Zancanaro, *Rev. Environ. Sci Biotechnol.* **6**, 47 (2007).
2. H. R. Bouma, E. M. Verhaag, J. P. Otis, et al., *J. Cell Physiol.* **227** (4), 1285 (2012).
3. H. V. Carey, M. T. Andrews, and S. L. Martin. *Physiol. Rev.* **83** (4), 1153 (2003).
4. H. V. Carrey, S. L. Martin, B. A. Horwitz, et al., *Circ. Res.* **110** (7), 915 (2012).
5. M. Andrews, K. Russeth, L. Drewes, and P. Henry, *Amer. J. Physiol.* **296**, R383 (2009).
6. F. I. Heinis, K. L. Vermillion, M. T. Andrews, and J. M. Metzger, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **309** (4), R368 (2015).
7. V. I. Popov and L. S. Bocharova, *Neuroscience* **48** (1), 53 (1992).
8. J. E. Larkin and H. C. Heller, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **276**, 522 (1999).
9. J. Dark and N. F. Ruby, in *Life in the cold: ecological, physiological, and molecular mechanisms*, Ed. by C. Carey, G. L. Florant, B. A. Wunder, and B. Horwitz (Westview, Boulder, 1993), pp. 167–174.
10. Н. Г. Соломонов, А. К. Ахременко и А. И. Ануфриев, в сб. *Механизмы зимней спячки*. (ОНТИ, Пушино, 1987), сс. 48–56.
11. С. Г. Колаева, *Вестн. РАН* **63** (12), 1076 (1993).
12. А. И. Ануфриев, Дис. ... докт. биол. наук (Инст. биол. проблем криолитозоны СО РАН, Якутск, 2005)
13. А. И. Ануфриев, *Экологические механизмы температурных адаптаций млекопитающих и зимующих птиц Якутии* (Издательство СО РАН, Новосибирск, 2013).
14. Д. А. Игнатъев, Г. С. Сухова, В. И. Загнойко и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии* **28** (4), 459 (1992).
15. Д. А. Игнатъев, Г. С. Сухова и В. П. Сухов, *Журн. общ. биологии* **62** (1), 66 (2001).
16. P. G. Osborne, J. Sato, N. Shuke, and M. Hashimoto, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289** (2), R554 (2005).
17. K. L. Drew, *J. Exp. Biol.* **216** (6), 927 (2013).
18. K. L. Drew, M. T. Rise, T. B. Kuhn, and M. A. Smith, *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 563 (2001).
19. F. Van Breukelen and S. L. Martin, *J. Appl. Physiol.* **92** (6), 2640 (2002).
20. A. Janke, X. Xu, and U. Arnason, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1276 (1997).
21. N. Mrosovsky, *Applton Cent. Crofts. USA* **287**, 9 (1971).
22. M. T. Andrews, *Bioassays* **29**, 431 (2007).
23. Q. J. Quinones, Q. Ma, Z. Zhang, et al., *Integr. Comp. Biol.* **54** (3), 497 (2014) .
24. F. Geiser, S. E. Currie, K. A. O'Shea, and S. M. Hiebert, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **307** (11), R1324 (2014).
25. Д. А. Игнатъев, Р. Я. Гордон, И. В. Патрушев и В.И. Попов, *Успехи физиол. наук* **1**, 48 (2012).
26. M. A. Peberdy, C. W. Callaway, R. W. Neumar, et al., *Circulation* **122** (18), S768 (2010).
27. О. В. Накипова, Р. З. Гайнуллин, В. Г. Сафронова и др., *Биофизика* **42** (6), 1297 (1997).
28. О. В. Накипова, Р. З. Гайнуллин, Л. А. Андреева и др., *Биофизика* **45** (2), 344 (2000).
29. C.-W. Wu, K. K. Biggar, and K. B. Storey, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **46**, 1 (2013).
30. T. Boswell, S. C. Woods, and G. J. Kenagy, *Gen. Comp. Endocrinol.* **96** (3), 339 (1994).
31. M. Laurila and P. Soomalainen, *Ann. Acad. Sci. Fenn. Biol.* **201**, 1 (1974).
32. R. Hoo-Paris, Ch. Castex, and B. C. Sutter, *Diabete Metab.* **4**, 13 (1978).
33. C. Castex, A. Tahri, R. Hoo-Paris, and B. C. Sutter, *Gen. Comp. Endocrinol.* **54**(1), 123 (1984).
34. G. L. Florant, A. K. Lawrence, K. Williams, and W. A. Bauman, *Am. J. Physiol.* **249**, R159 (1985).
35. C. Castex and R. Hoo-Paris, *Diabete Metab.* **13**, 176 (1987).
36. C. Castex, A. Tahri, R. Hoo-Paris, and B. C. Sutter, *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.* **88**, 33 (1987).
37. Д. А. Игнатъев, *Журн. общ. биологии* **56**, 450 (1995)
38. R. E. Smith and B. A. Horwitz, *Physiol. Rev.* **49** (2), 330 (1969).
39. C. P. Lyman, in *Hibernation and torpor in mammals and birds*, Ed. by C. P. Lyman, J. S. Willis, A. Malan, and L. C. H. Wang (Acad. press. New York, 1982), pp. 1–90.
40. J. Klein, M. Fasshauer, M. Benito, and C. R. Kahn, *Mol. Endocrinol.* **14** (6), 764 (2000).
41. Q. J. Yu, R. Si, N. Zhou, et al., *Apoptosis* **13** (2), 305 (2008).
42. S. A. Karpovich, O. Toien, C. L. Buck, and B. M. Barnes, *J. Comp. Physiol. B* **179**, 691 (2009).
43. Р. А. Лукоянова, М. Д. Шпагина, С. Н. Удальцов и др., *Биофизика* **41** (1), 116 (1996).
44. Н. И. Калабухов, *Спячка млекопитающих* (Наука, М., 1985).
45. B. L. Krilowicz, *Am. J. Physiol.* **249** R46 (1985).
46. D. A. Ignatiev, L. A. Andreeva, Z. G. Amerchanov, et al., in *Biological motility* (SYNCHROBOOK, Pushchino: 2016), pp. 85–90.

## **Insulin Administration Affects the Rate of Arousal of Hibernating Ground Squirrels *Spermophilus undulatus***

**D.A. Ignat'ev\*, L.A. Andreeva\*, Z.G. Amerkhanov\*, A.I. Anufriev\*\*,  
A.E. Alekseev\*\*\* \*\*\*\*, and O.V. Nakipova\***

*\*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia*

*\*\*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,  
prosp. Lenina 41, Yakutsk, 677890 Russia*

*\*\*\*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,  
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia;*

*\*\*\*\*Department of Molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics, Stabile 5, Mayo Clinic,  
200 1st Street SW, Rochester, MN 55905, USA*

This study addresses the effect of insulin injection on the heart rate and body temperature in ground squirrels *Spermophilus undulatus* during triggered arousal from hibernating state. We have found that the effects of insulin injection in hibernating animals varied during the time-course of arousal manifested by changes in the rectal temperature. During the first stage at ground squirrel's body temperature of less than 10°C the measured parameters of the heart rate and rectal body temperature in the group of animals injected with insulin were changed in the same manner as in control animal groups. However, during the next stage of arousal, when body temperature was above 12°C, the insulin-treated group exhibited significantly delayed elevation of heart rate and rectal temperature, which decelerated the course of arousal to 110 min-long compared to 80 min-long in control non-treated group. Contrariwise, when rectal temperature exceeded 20°C, the insulin-treated group demonstrated augmented elevation of heart rate and rectal temperature that ultimately accelerated the duration of the latter stage of arousal to 40 min-long compared to 60 min-long in control group. The plausible mechanisms responsible for the contra-directional insulin effects on changes in heart rate and rectal temperature during arousal of hibernating ground squirrels are discussed here with regard to the changes in endogenous insulin and glucose levels in the blood serum during the transition of these animals from torpid to active states.

*Key words: insulin, hibernation, ground squirrels, arousal*