

# Вплив гіпоксії та мелатоніну на поведінкову реакцію щурів з різним рівнем енергетичного метаболізму

Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський, М.І. Левашов, О.Г. Чака, Р.В. Янко

Інститут фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: lidiianik@ukr.net

*Досліджували вплив переривчастої нормобаричної гіпоксії (ПНГ) саногенного рівня та мелатоніну (5 мг/кг) на рухову та емоційну активність молодих щурів лінії Вістар у тесті «відкрите поле». Тварин поділили на дві групи: із низьким та високим вихідним рівнем енергетичного метаболізму (РЕМ). Загальна рухова активність у щурів контрольної групи з високим РЕМ була вірогідно нижчою на 17 % відносно щурів з низьким рівнем. Показано, що спільна дія ПНГ і мелатоніну підвищувала горизонтальну рухову активність на 22-38 %, знижувала емоційність в 2,5-2,7 раза у щурів незалежно від їх рівня енергетичного метаболізму. У тварин з низьким РЕМ гіпоксія як окремо, так і сумісно з мелатоніном збільшувала частоту (в 4,0 та 8,7 раза відповідно) і тривалість ґрумінгу (в 1,7 та 4,9 раза відповідно) порівняно з інтактною групою. Після 28 сеансів ПНГ у них вірогідно знижувалася маса тіла на 10 % порівняно з контролем. Спільна дія ПНГ і мелатоніну активувала орієнтувально-дослідницьку поведінку щурів, зменшувала рівень тривожності, що може свідчити про антистресорну дію такого впливу.*

*Ключові слова: переривчаста нормобарична гіпоксія; мелатонін; рівень енергетичного метаболізму; поведінкова реакція.*

## ВСТУП

Здоров'я людини урбанізованого суспільства пов'язане з постійним впливом стресових ситуацій, що може бути однією з причин виникнення «хвороб цивілізації». Водночас відомо, що у патогенезі неврозів важливу роль відіграють індивідуальні особливості та психоемоційна стійкість особистості [1, 2]. У «відкритому полі» у щурів виникає певний стрес на незвичайні умови. Тварини змінюють свою поведінку відповідно до індивідуальних особливостей організму та додаткових зовнішніх впливів [3].

Мелатонін є одним з важливих компонентів стрес-лімітуючої системи організму людини і тварин. Він знижує стрес-індуковану активацію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної системи [4], здійснює протизапальну, анагетичну [5] і антиоксидантну дію [6]. Відтворення експериментальної гіпермелатоніемії (інтрагастральним введенням мелатоніну у дозі 0,3 мг/кг на добу протягом

© Л.М. Плотнікова, В.Я. Березовський, М.І. Левашов, О.Г. Чака, Р.В. Янко

10, 30 та 55 діб) викликає зниження загальної рухової активності в період до 30-ї доби спостереження, різко зменшує вертикальну і горизонтальну пошукову активність щурів [7, 8].

Встановлено, що дихання гіпоксичними газовими сумішами саногенного рівня активує кисневий метаболізм, стимулює діяльність систем, які відповідають за постачання кисню та енергетичний метаболізм. Гіпоксичні тренування широко використовуються для підвищення стійкості організму до стресових факторів навколишнього середовища [9, 10]. Сеанси дихання газовою сумішшю з 10 % O<sub>2</sub> по 60 хв на добу протягом тижня істотно змінюють поведінкові реакції молодих щурів у тесті «відкрите поле» і водночас здійснюють антистресорну дію, підвищують горизонтальну рухову активність [11].

Мета нашого дослідження – вивчити вплив мелатоніну та нормобаричної гіпоксії саногенного рівня на поведінкову реакцію (у

тому числі рухову активність) щурів із різним рівнем енергетичного метаболізму.

## МЕТОДИКА

Експериментальне дослідження проведено на 96 молодих статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар віком 3 міс, одержаних із розплідника віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. На кінець експерименту вік тварин становив 4 міс. Знаходилися вони під наглядом ветеринарного лікаря у стандартних умовах віварію при природному циклі світло/темрява та отримували стандартний раціон харчування. Масу тіла щурів контролювали щотижнево.

Протокол дослідження: 1 день – маркування і зважування щурів; 2-4 – визначення споживання кисню з 10.00 до 13.00; 5-33 – введення мелатоніну о 10.00, з 11.00 до 13.00 дихання гіпоксичною газовою сумішшю ( $12\% \pm 1\% \text{O}_2$ ) в переривчастому режимі; 34 – з 10.30 до 11.30 проведення тесту «відкрите поле».

Споживання кисню ( $\text{VO}_2$ ) щурами визначали натщесерце в закритій системі дослідження газообміну [12]. Лабораторна пневматична камера для тварин складалася зі скляного ексикатора ємністю 3 л, що герметично закривався кришкою, термометра і водного манометра. Для поглинання  $\text{CO}_2$  всередину камери поміщали натронне вапно. Розраховували споживання кисню у мілілітрах на кілограм маси тіла на годину (мл/кг/год) за формулою:

$$\text{VO}_2 = (\Delta H \cdot A \cdot Kt \cdot 1000 \cdot K_{\text{STPD}}) / M,$$

де  $\Delta H$  – різниця в показниках водного манометра за 10 хвилин (мм);  $A$  – ціна поділки водного манометра (1 мм = 1 мл);  $M$  – маса щура в грамах;  $Kt$  – коефіцієнт часу для розрахунку споживання кисню за 1 год; 1000 – коефіцієнт розрахунку споживання кисню на 1 кг маси тіла;  $K_{\text{STPD}}$  – коефіцієнт приведення об'єму газу до температури  $0^\circ$ , тиску 760 мм рт. ст. при відсутності водяних парів.

Межі середньої індивідуальної варіації

$\text{VO}_2$  становили від 3500 до 3900 мл/кг/год ( $M \pm m = 3684 \pm 167$  мл/кг/год). Залежно від інтенсивності споживання кисню всю популяцію щурів-самців розділили на тварин з низьким ( $\text{VO}_2 < 3500$  мл/кг/год) і високим ( $\text{VO}_2 > 3900$  мл/кг/год) рівнем енергетичного метаболізму (РЕМ). Щурів розподілили на 8 груп по 12 особин: I і II групи – контрольні тварини з високим і низьким РЕМ; III і IV – щури з високим і низьким РЕМ, які дихали гіпоксичною газовою сумішшю; V і VI – тварини з високим і низьким РЕМ, які отримували перорально мелатонін («Unipharm Inc.», США) о 10.00 в дозі 5 мг/кг; VII і VIII – тварини з високим і низьким РЕМ, які зазнавали сумісного впливу гіпоксії та мелатоніну. Щурів, що піддавалися впливу ПНГ, розміщували в проточній камері, в яку за допомогою мембранного газорозподільчого елемента, під контролем ротаметрів, подавали газову суміш (12 % кисню в азоті) в переривчастому режимі: 15 хв деоксигенація / 15 хв реоксигенація протягом 2 год щоденно та 22 год дихання атмосферним повітрям. Тривалість експерименту – 28 діб.

Для виявлення індивідуальних розбіжностей характеристик поведінки тварин використовували стандартну методику «відкритого поля» [13, 14]. «Поле» являло собою квадратну ділянку (1 м<sup>2</sup>), обмежену по периметру непрозорим бортом висотою 40 см і графічно поділену на 25 однакових квадратів. Джерелом освітлення була лампа 60 Вт, встановлена на висоті 1 м над центром «поля». Тестування кожної тварини у «відкритому полі» проводили у звукоізолюваній кімнаті впродовж 3 хв. Для уникнення артефактів за 2 год до тестування щурів витримували у тихому, слабоосвітлюваному приміщенні. У цей період не проводили їх перегрупування, не годували і не здійснювали жодних інших маніпуляцій [15]. Реєстрували горизонтальну та вертикальну рухову активність (за числом перетнутих квадратів і стійок), «емоційність» (за числом актів дефекацій і уринацій), реакції умивання та інші види грумінгу (чищення,

викушування шерсті та лапок, облизування, почісування). З огляду на сезонні та добові зміни рухової активності, досліди проводили у осінній (листопад) період року у ранкові години [13]. Усі експерименти здійснювали з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин.

Тест „відкрите поле” широко застосовують для дослідження особливостей поведінки (рухової активності й емоційності) у тварин. Грумінг у гризунів, поряд з купанням, позіханням і потягуванням, традиційно відносять до категорії комфортної поведінки, а зменшення кількості болюсів та уринацій – до зниження емоційності та тривожності [8].

Статистичну обробку результатів здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою комп’ютерної програми Statistica 5.0. Вірогідність різниці між контрольними і дослідними групами (за умов нормального розподілення) оцінювали за критерієм t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження рухової активності у «відкритому полі» виявило істотні відмінності між групами щурів з високим і низьким РЕМ за загальним числом перетнутих квадратів і стійок. Після сумісного впливу ПНГ з мелатоніном у щурів з високим РЕМ вірогідно зросла горизонтальна рухова активність на 38 % (таблиця). Зниження дефекації в 2,7 раза може свідчити про зменшення емоційної активності і тривожності. Після введення мелатоніну не виявлено вірогідної різниці між показниками поведінкової активності щурів порівняно з контролем. У щурів з високим РЕМ після впливу ПНГ, окрім зниження кількості фекальних болюсів в 3,3 раза відносно контрольних значень, інших відмінностей не спостерігали. ПНГ та сумісний вплив гіпоксії і мелатоніну позитивно впливали на емоційно-поведінкові реакції щурів з високим РЕМ в осінній період, хоча вони були менше виражені порівняно зі щурами з низьким РЕМ.

Аналіз орієнтовно-дослідницької поведінки щурів з низьким РЕМ у тесті «відкрите поле» за показниками загальної рухової активності (горизонтальної і вертикальної) характеризує мотиваційну складову поведінку тварин. Загальна рухова активність у щурів контрольної групи з високим РЕМ була вірогідно нижчою на 17 % відносно значень у тварин з низьким РЕМ. Зазвичай високу рухливість пов’язують з активністю норадренергічних і дофамінергічних, а низьку – холінергічних і серотонінергічних систем мозку [16]. Після ПНГ і поєднаного впливу гіпоксії з мелатоніном у щурів з низьким РЕМ підвищувалася горизонтальна рухова активність на 12-22 %, кількість актів грумінгу в 4-9 раза, тривалість грумінгу в 1,7-4,9 раза, знизилась дефекація в 2,5 раза. Таким чином, щоденне дихання щурів з низьким РЕМ газовою сумішшю зі знизеним парціальним тиском кисню як окремо, так і разом із введенням мелатоніну сприяло зниженню психо-емоційного напруження і тривожності, підвищенню стресостійкості, локомоторної та дослідницької активності тварин щодо контролю.

Для аналізу отриманих результатів доцільно більш детально зупинитися на трьох теоретично можливих рівнях розвитку реакції організму на зміну умов існування. До основних фізіологічних механізмів підвищення рухової активності і фізичної працездатності при адаптації до гіпоксії варто віднести, у першу чергу, загальнобіологічні структурно-функціональні зміни організму, спрямовані на розширення використання функціональних резервів організму на збільшення швидкості доставки тканинам кисню до необхідного рівня. Це досягається за рахунок оптимізації дихання і кровообігу, збільшення кисневої ємності і зниження в’язкості крові. Іншим механізмом є так звані адаптивні органоспецифічні зміни, спрямовані на підвищення ефективності «працюючих» органів – м’язів. До них відносяться збільшення капіляризації працюючих м’язів, підвищення вмісту в них міоглобіну, вдосконалення рухової діяльно-

сті в результаті оптимізації функціонування «рухових одиниць». Також включаються тканинні і клітинні пристосувальні механізми: збільшення числа мітохондрій і їх крист у міоцитах, підвищення активності ферментів гліколізу і циклу Кребса, а також ферментів дихального ланцюга. Наслідком цих змін є підвищення анаеробної здатності і аеробної продуктивності, а також загальної фізичної працездатності [9, 10, 17].

Варто звернути увагу на зміни маси тіла щурів з різним вихідним РЕМ до і після впли-

ву гіпоксії. Початкова маса тіла 3-місячних щурів становила 190-220 г. Через 28 діб експерименту маса тіла щурів у контролі була 230-260 г. Після сеансів ПНГ щури з низьким РЕМ важили на 10 % менше за контрольну групу. У тварин дослідних груп з високим РЕМ вірогідних відмінностей в прирості маси тіла відносно контролю не виявлено. Показано, що після впливу ПНГ гризуни з низьким РЕМ, на фоні зниження маси тіла, виявляли більшу рухову активність, ніж тварини з високим РЕМ. Літературні дані

**Показники поведінкової активності щурів лінії Вістар контрольної і дослідних груп з різним рівнем енергетичного метаболізму в осінній період року (M±m, n=12)**

Показники поведінкової активності щурів	Контроль	Гіпоксія	Мелатонін	Гіпоксія і мелатонін
<b>Високий рівень енергетичного метаболізму</b>				
Горизонтальна рухова активність, кількість квадратів				
Центральних	8,2±2,2	4,8±1,8	5,3±0,6	9,3±2,7
Периферичних	43,0±4,1	49,2±5,3	42,5±5,1	61,5±5,8*
Вертикальна рухова активність, кількість стійок				
З опорою на стіну	16,0±3,9	10,2±1,9	12,7±1,3	12,3±2,8
Без опори на стіну	5,3±0,9	5,3±0,7	4,7±0,8	7,2±1,0
Грумінг				
Кількість	0,8±0,4	1,7±0,6	0,9±0,3	1,3±0,5
Тривалість, с	10,2±3,1	11,5±4,6	15,4±5,7	6,3±2,7
Емоційність				
Дефекація, кількість болюсів	4,0±0,8	1,2±0,5*	3,5±0,3	1,5±0,5*
Уринація	0,7±0,3	1,0±0,4	0,6±0,1	0,5±0,2
<b>Низький рівень енергетичного метаболізму</b>				
Горизонтальна рухова активність, кількість квадратів				
Центральних	14,5±2,4	13,2±3,0	10,4±2,1	7,8±1,8*
Периферичних	52,0±5,2	61,3±5,7	50,3±5,1	73,0±6,3*
Вертикальна рухова активність, кількість стійок				
Число стійок із опорою	14,8±3,6	13,0±2,9	13,7±1,6	18,0±4,1
Без опори на стіну	5,8±1,2	6,8±1,1	4,3±0,9	4,4±0,7
Грумінг				
Кількість	0,3±0,1	1,2±0,3*	1,0±0,3*	2,6±0,3*
Тривалість, с	3,7±1,4	6,2±1,8*	12,3±3,9*	18,0±5,3*
Емоційність				
Дефекація, кількість болюсів	2,5±0,6	1,0±0,4*	1,2±0,4*	0*
Уринація	0	0,3±0,1	0,4±0,2	0

\*P<0,05 порівняно з контролем

свідчать, що помірна гіпоксія (14-15 % O<sub>2</sub>) збільшує доступність глюкози і інсуліну до м'язових волокон і зменшує ожиріння у щурів [18]. Отримані нами результати свідчать, що вплив ПНГ може бути засобом зниження надлишкової маси тіла у особин з низьким РЕМ.

Слід відмітити також, що підвищення значень горизонтальної рухової активності й показників грумінгу щурів з низьким РЕМ більшою мірою проявилось після сумісного впливу ПНГ і мелатоніну. Це може бути свідченням їх здатності до прискорення адаптації в умовах тесту «відкрите поле». За даними літератури відомо, що застосування мелатоніну при дії гіпоксії призводить до збільшення ефективності утилізації кисню з крові і нівелює рівень тканинної гіпоксії; підвищує активність систем антиоксидантного захисту і обмежує процеси перекисного окиснення ліпідів в плазмі крові і міокарді; мелатонін сприяє вазодилатації артеріальних і венозних мікросудин, поліпшує кровопостачання і кисневе забезпечення тканин [19]. Результати проведеного нами дослідження дають підстави вважати, що поєднаний вплив ПНГ і мелатоніну здійснює антистресорну дію через зниження емоційності і тривожності щурів незалежно від вихідного рівня енергетичного метаболізму.

## ВИСНОВКИ

1. В осінній період комбінований вплив мелатоніну і нормобаричної гіпоксії саногенного рівня в переривчастому режимі активує рухову активність щурів лінії Вістар незалежно від вихідного рівня енергетичного метаболізму.

2. Мелатонін і переривчаста нормобарична гіпоксія як окремо, так і сумісно підвищують частоту і тривалість грумінгу, знижують емоційність у щурів з низьким рівнем енергетичного метаболізму відносно контрольних тварин.

3. Переривчаста нормобарична гіпоксія саногенного рівня знижує масу тіла тільки у

щурів з низьким вихідним рівнем енергетичного метаболізму.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**Л.Н. Плотникова, В.А. Березовский,  
М.И. Левашов, Е.Г. Чака, Р.В. Янко**

## **ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ И МЕЛАТОНИНА НА ПОВЕДЕНЧЕСКУЮ РЕАКЦИЮ КРЫС С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА**

Исследовали влияние прерывистой нормобарической гипоксии (ПНГ) саногенного уровня и мелатонина (5 мг/кг) на двигательную и эмоциональную активность молодых крыс линии Вистар в тесте «открытое поле». Животных разделили на две группы: с низким и высоким исходным уровнем энергетического метаболизма (УЭМ). Общая двигательная активность у крыс контрольной группы с высоким УЭМ была достоверно ниже на 17 % относительно крыс с низким уровнем. Показано, что совместное влияние ПНГ и мелатонина повышало горизонтальную двигательную активность на 22-38 %, снижало эмоциональность в 2,5-2,7 раза у крыс независимо от их уровня энергетического метаболизма. У животных с низким УЭМ гипоксия как отдельно, так и совместно с мелатонином увеличивала частоту (в 4,0 и 8,7 раза соответственно) и продолжительность груминга (в 1,7 и 4,9 раза соответственно) по сравнению с интактной группой. После 28 сеансов ПНГ у них достоверно снизилась масса тела на 10 % по сравнению с контролем. Совместное действие ПНГ и мелатонина активировало ориентировочно-исследовательское поведение крыс, уменьшало уровень тревожности, что может свидетельствовать об антистрессовом действии такого влияния.

Ключевые слова: прерывистая нормобарическая гипоксия; мелатонин; уровень энергетического метаболизма; поведенческая реакция.

**L.M. Plotnikova, V.Y. Berezovskyi, M.I. Levashov,  
O.G. Chaka, R.V. Yanko**

## **THE INFLUENCE OF HYPOXIA AND MELATONIN ON THE BEHAVIORAL RESPONSE OF RATS WITH DIFFERENT LEVEL OF ENERGY METABOLISM**

We investigated the effect of intermittent normobaric hypoxia

(INH) of sanogenic level and melatonin (5 mg/kg) on locomotor and emotional activity of young Wistar rats in the test «open field». The animals were divided into two groups: with low and high level of energy metabolism (LEM). Total locomotor activity in rats with high LEM control group was significantly lower by 17 % relatively low LEM rats. It was shown that joint ingestion of INH and melatonin increased horizontal motor activity by 22-38 %, decreased emotionality of rats in 2,5-2,7 times irrespective of their level of energy metabolism. In animals with low LEM, hypoxia, both separately and together with melatonin, increased the frequency (by 4,0 and 8,7 times, respectively) and the duration of the grooming (in 1,7 and 4,9 times, respectively) compared with the intact group. After 28 sessions of INH in them, the weight of the body significantly decreased by 10 % compared to the control. The combined action of INH and melatonin activated the orienting and research behavior of rats, reduced the level of anxiety, which may indicate an anti-stress effect of such influence.

Key words: intermittent normobaric hypoxia; melatonin; level of energy metabolism; behavioral response.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: lidiianik@ukr.net*

## REFERENCES

- Hill R, McKernan L, Wang L, Coronado R. Changes in psychosocial well-being after mindfulness-based stress reduction: a prospective cohort study. *J Man Manip Ther.* 2017; 25(3):128-36.
- Kaidashev I. Changing lifestyles, the violation of energy metabolism and systemic inflammation as factors of civilization diseases. *Ukr Med Magazine.* 2013;5(97):103-8. [Russian].
- Gostyukhina A, Zamoshchina T, Svetlik M, Zhukova O, Zaitsev K, Abdulkina N. Behavioral activity of rats in the «open field» after the light and dark deprivation and physical exhaustion. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2016;15(3):16-23. [Russian].
- Shi L, Li N, Bo L, Xu Z. Melatonin and hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Cur Med Chem.* 2013; 20(15):2017-31.
- Arushanyan E, Naumov S. Anti-inflammatory potential of melatonin. *Clinical medicine.* 2013; 91(7):18-22.
- Rodriguez C, Mayo J, Sainz R, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter R. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Jour Pin Res.* 2004;36(1):1-9.
- Tsebrzhynskyy O, Frenkel Y. Features of testing «open field» rats that had hyper- and hipomelatoninemiyi. *The World of Medicine and Biology.* 2006; 3:47-52. [Ukrainian].
- Frankel Y. Assessment of behavioral laboratory rats in the test «open field» when playing the experimentally hyper- and hipomelatoninemii. *Modern health problems, radiation and environmental medicine: Coll Scientific articles.* 2014;4: 306-10. [Russian].
- Berezovsky V. *Natural and instrumental oroterapiya.* Donetsk: Publisher Zaslavsky AJ. 2012: 304 p. [Russian].
- Serebrovskaya T, Shatilo V. Experience of using interval hypoxia in prevention and treatment of cardiovascular diseases: Review. *Blood Circulation and Hemostasis.* 2014;1-2:16-33. [Russian].
- Balabekova M, Ryspekova N, Zhukesheva M, Askarova A, Nurmuhambetov A. Study of behavioral reactions of old rats treated with hypoxia. *Medical Sciences.* 2014; 7:662-6. [Russian].
- Ol'nyanskaya R, Isaakyan L. *Research methods gas exchange in humans and animals.* Moscow: Medgiz. 1959:180 p. [Russian].
- Buresh J, Bureshova O, Houston P. *The methodology and basic experiments for the study of brain and behavior.* Moscow: High school. 1991: 299 p. [Russian].
- Kulikov V. Individual features of spontaneous locomotor activity and adaptive behavior in rats. *Zh Higher Nerve Activity.* 1990; 40(1):85-92. [Russian].
- Vlizlo V, Fedoruk R, Ratych I. *Laboratory methods of research in biology, veterinary medicine.* Lviv. 2012: 762 p. [Ukrainian].
- Shevereva V. Influence of chronical emotional stress on the behaviour in open field of rats with different level of motional activity. *Fiziol. Zh.* 2011;57(1):94-105. [Ukrainian].
- Gridin L. Modern understanding of the physiological and therapeutic and prophylactic effects of actions hypoxia and hypercapnia. *Journal of Medicine.* 2016;3:45-68. [Russian].
- Chen C, Tsa Y, Kao C, Lee S, Wu M, Mallikarjuna K, Liao Y, Ivy J, Kuo C. Effect of mild intermittent hypoxia on glucose tolerance, muscle morphology and AMPK-PGC-1alpha signaling. *Chin J Physiol.* 2010; 53(1):62-71.
- Sun H, Gusdon A, Qu S. Effects of melatonin on cardiovascular diseases: progress in the past year. *Curr Opin Lipidol.* 2016; 27(4):408-13.

*Матеріал надійшов до редакції 13.12.2016*