

Potential anxiolytic effect of melatonin on intact and L-NAME hypertensive rats

Potenciálny anxiolytický účinok melatonínu u intaktných a L-NAME hypertenzných potkanov

Aziriová S¹, Krajčírovičová K¹, Baka T¹, Repová K¹, Paulis L¹, Šimko F^{1,2,3}

¹Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Bratislava, Slovenská republika

Aziriova S, Krajcirovicova K, Baka T, Repova K, Paulis L, Simko F. **Potential anxiolytic effect of melatonin on intact and L-NAME hypertensive rats.** Cardiology Lett. 2018;27(3):143–147

Abstract. *Aims:* The mutual interrelation between cardiovascular diseases and anxiety disorder has been frequently discussed. The aim of this study was to show whether L-NAME (N[omega]-nitro-L-arginine methyl ester)-induced hypertension could induce behavioural disturbances in rats and whether these potential disorders could be modified by chronic treatment with melatonin.

Material and Methods: 12-week-old male Wistar rats were divided into 4 groups (n = 10 per group): control, melatonin (10 mg/kg/day p.o.), L-NAME (40 mg/kg/day p.o.), L-NAME + melatonin. Systolic blood pressure (SBP) was measured by non-invasive plethysmography once a week. Elevated plus maze (EPM) and light/dark box (LDB) tests were used for investigation of anxiety behaviour.

Results: L-NAME administration induced the increase in SBP and melatonin in part prevented hypertension development. L-NAME did not induce anxiety-like behaviour in rats. Melatonin in normotensive rats significantly increased the time spent in the light part of LDB, and the number of transitions in LDB. Melatonin also increased the number of transitions into the open arms in EPM in L-NAME hypertensive rats.

Conclusion: L-NAME-induced hypertension did not induce anxiety-like behaviour in rats. Melatonin induced potential anxiolytic behaviour in controls and in L-NAME hypertensive rats. Fig. 2, Ref. 29, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk/sk

Key words: L-NAME – hypertension – behaviour – anxiety – melatonin

Aziriová S, Krajčírovičová K, Baka T, Repová K, Paulis L, Šimko F. **Potenciálny anxiolytický účinok melatonínu u intaktných a L-NAME hypertenzných potkanov.** Cardiology Lett. 2018;27(3):143–147

Abstrakt. *Ciele:* Vzájomná súvislosť medzi kardiovaskulárnymi ochoreniami a psychickými poruchami, ako anxieta, je problém, o ktorom sa diskutuje stále viac. Cieľom experimentu bolo zistiť, či hypertenzia navodená L-NAME (N[omega]-nitro-L-arginín-metyl-ester) indukuje správanie podobné anxiety u potkanov a sledovať potenciálny protektívny efekt melatonínu na uvedené behaviorálne alterácie.

Metódy: 12-týždňové samce potkanov kmeňa Wistar boli rozdelené do štyroch skupín po 10: kontroly, melatonín (10 mg/kg/deň p. o.), L-NAME (40 mg/kg/deň p. o.) a kombinácia L-NAME s melatóninom. Systolický tlak krvi (STK) sa meral neinvazívne pletyzmografickou metódou raz týždenne. Správanie podobné anxiety sa sledovalo na konci štvrtého týždňa experimentu pomocou testov správania: vyvýšeným krížovým bludiskom (EPM) a testom preferencie svetla/tmy (LDB).

Výsledky: Aplikácia L-NAME spôsobila vzostup STK a melatonín čiastočne zabránil vzniku hypertenzie. Hypertenzia navodená L-NAME neindukovala anxiózne prejavy pokusných zvierat. Melatonín signifikantne predĺžil

Z ¹Ústavu patologickej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, ²III. internej kliniky, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave a ³Ústavu experimentálnej endokrinológie, BMC, Slovenská akadémia vied v Bratislave, Slovenská republika

Do redakcie došlo dňa 17. mája 2018; prijaté dňa 21. mája 2018

Adresa pre korešpondenciu: prof. MUDr. Fedor Šimko, CSc., Ústav patologickej fyziológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: fedor.simko@fmed.uniba.sk

čas strávený v osvetlenej časti LDB a zvýšil počet prechodov do osvetlenej časti LDB u kontrolných potkanov. Melatonín tiež zvýšil počet prechodov do otvorených ramien EPM u potkanov ovplyvnených L-NAME.

Záver: Hypertenzia navodená L-NAME neindukovala správanie podobné anxiety u potkanov. Melatonín pôsobil potenciálne anxiolyticky u kontrolných potkanov aj u zvierat s L-NAME-navodenou hypertenziou. Obr. 2, Lit. 29, on-line full text (Free, PDF) www.cardiologyletters.sk

Kľúčové slová: L-NAME – hypertenzia – správanie – anxieta – melatonín

Vzájomná úzka prepojenosť medzi somatickými a psychickými alteráciami je známa od staroveku. Moderná medicína priniesla množstvo dôkazov, že kardiovaskulárne ochorenia a anxiózne, ako aj depresívne ladenie pacientov spolu mnohostranne súvisia. Na jednej strane kardiovaskulárna patológia môže indukovať psychické alterácie vo forme posttraumatickej stresovej poruchy, anxiety a depresie (1, 2) a na druhej strane prítomnosť anxiety, depresie a iných zmien psychiky zhoršuje nielen adhérenciu k správne životnému štýlu a samotnej terapii (3), ale psychopatologické zmeny prispievajú ku vzniku porúch kardiovaskulárneho systému (2, 4). Tieto úvahy sa týkajú nielen závažných kardiovaskulárnych udalostí, ale aj takých bežných hemodynamických porúch, akou je hypertenzná choroba (5, 6, 7). Preto štúdium vzájomných vzťahov hypertenzie a anxiety sa stáva mimoriadne diskutovanou témou.

Melatonín je látka, ktorej hlavnou úlohou je synchronizovanie fyziologických funkcií s periodicitou dňa a noci (8). Jestvuje množstvo nálezov, ktoré naznačujú, že melatonín a jeho syntetické deriváty by mohli pôsobiť anxiolyticky a antidepresívne (9).

Cieľom našej práce bolo zistiť, či melatonín pôsobí anxiolyticky pri intaktných potkanoch a potkanoch s hypertenziou indukovanou L-NAME.

Materiál a metódy

Pokusné zvieratá a liečba

Dospelé, 12 týždňov staré samce potkanov kmeňa Wistar sa náhodne rozdelili do štyroch skupín po 10: kontroly (Ctrl), melatonín (Sigma Aldrich, 10 mg/kg/deň; Mel), L-NAME (40 mg/kg/deň; LN) a L-NAME s melatonínom (LN + Mel) v zodpovedajúcich dávkach. Látky sme podávali denne v pitnej vode *per os* počas štyroch týždňov trvania experimentu. Pokusné zvieratá boli chované v kontrolovaných podmienkach pokusného zariadenia v 12/12-hodinovom cykle svetlo/tma, pri teplote prostredia 22 – 24 °C v kliebkach po jednom s neobmedzeným príjmom vody a potravy.

Systolický tlak krvi (STK) sa meral raz týždenne neinvazívne pletyzmograficky na chvoste. Priemerný STK sa vypočítal z priemerných hodnôt týždňových meraní. Pokusné zvieratá sa merali vo vyrovnaných skupinách počas piatich dní v týždni (od pondelka do piatku), vždy medzi 7:00 a 9:00, každá skupina sa merala v rovnakom čase počas dňa. Pokus-

né zvieratá boli počas merania umiestnené do priesvitného plastového tunelového boxu, pričom počas tejto procedúry neboli u potkanov pozorované žiadne známky stresu.

Prejavy anxiety v správaní pokusných zvierat boli sledované vyvýšeným krížovým bludiskom a testom preferencie svetla/tmy po štvrtom týždni podávania látok pred eutanáziou pomocou narkózy a následnou dekapitáciou.

Testovanie správania

Správanie podobné anxiety sa sledovalo dvoma testami v tomto poradí: vyvýšené krížové bludisko a test preferencie svetla/tmy. Správanie bolo zaznamenávané na videozáznam a vyhodnocované v programe Ethovision XT 10 tracking software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

Vyvýšené krížové bludisko (*elevated plus maze*, EPM) predstavovalo zariadenie so štyrmi ramenami v tvare znaku plus vyvýšené 50 cm nad podlahou a rozdelené na dve protiľahlé otvorené ramená a dve protiľahlé uzavreté ramená, ktoré boli ohraničené stenou z nepriesvitného plastu vysokou 30 cm. Testovanie prebiehalo podľa práce (5).

Test preferencie svetla/tmy (*light/dark box*, LDB) sa robil v zariadení s rozmermi 30 × 50 × 30 cm, rozdelenom na dve časti, osvetlenú a uzavretú, ktoré boli vzájomne prepojené prechodovým otvorom. Osvetlená časť bola osvetlená svetlom intenzity 50 luxov a snímaná kamerovým systémom, uzavretá časť bola zakrytá nepriesvitným plastovým vrchnákom, s intenzitou svetla vnútri boxu 0 luxov. Testovanie prebiehalo podľa práce (5).

Štatistická analýza

Výsledky sú vyjadrené ako priemerná hodnota ± S.E.M. Rozdiely medzi skupinami boli štatisticky významné na úrovni $p < 0,05$. Na zistenie normálneho rozloženia údajov sa použil Shapiro-Wilkov test. Údaje boli normálne rozložené v parametroch úzkostného správania a STK. Na štatistickú analýzu sa použila jednorozmerná analýza rozptylu (one-way ANOVA) s LSD post hoc testom.

Výsledky

Priemerný systolický tlak krvi

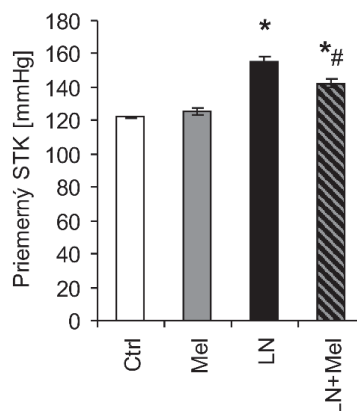
Priemerný systolický tlak krvi (PSTK) v kontrolnej skupine bol $123,6 \pm 2,1$ mmHg a v L-NAME skupine vý-

znamne stúpol o 47,8 % ($p < 0,05$). Podávanie melatonínu neznižovalo PSTK u kontrolnej skupiny (2,42 %, ns), kým u hypertenzných potkanov sa PSTK znížil o 14,7 % ($p < 0,05$) (obrázok 1).

Vyvýšené krížové bludisko

Percentuálny čas strávený v otvorených ramenách v kontrolnej skupine bol $15,8 \pm 4,3$ %. L-NAME predlžovalo čas strávený v otvorených ramenách o 98,8 % (ns). Podávanie melatonínu kontrolným potkanom predlžovalo čas strávený v otvorených ramenách o 77,1 % (ns), kým u hypertenzných potkanov skracovalo o 6,2 % (ns) (obrázok 2A).

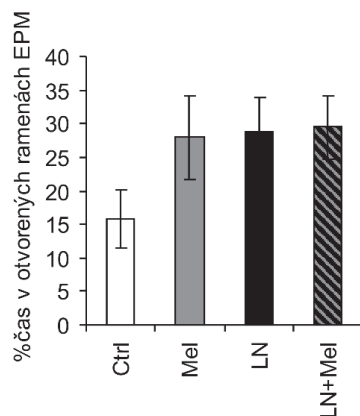
Počet tranzícií do otvorených ramien bol u kontrol 19,6 $\pm$ 2,6 a L-NAME ich zvyšovalo o 5,6 % (ns). Podávanie melatonínu u normotenzných potkanov zvyšovalo počet tranzícií o 12,3 % (ns) a u hypertenzných potkanov o 38,9 % ($p < 0,05$) (obrázok 2B).



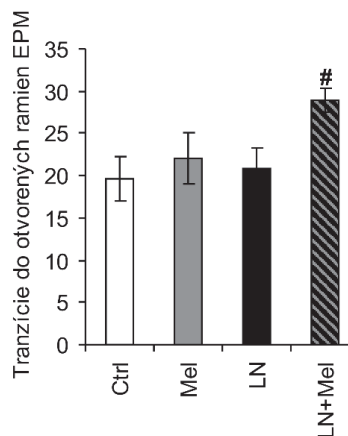
Obrázok 1 Priemerný systolický tlak krvi (STK). Efekt melatonínu na STK u kontrolnej skupiny (Mel) a pri hypertenzii indukovanej L-NAME (LN + Mel)

Ctrl – kontroly; LN – L-NAME. * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. LN

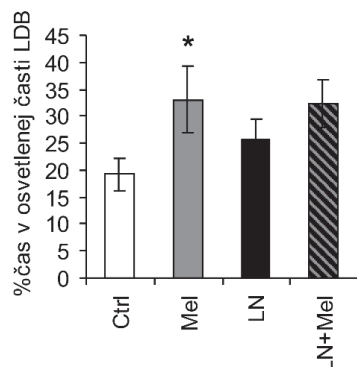
A



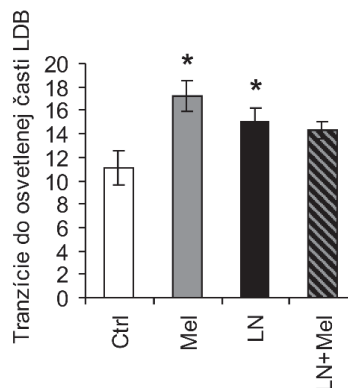
B



C



D



Obrázok 2 Efekt melatonínu na správanie podobné anxiété u kontrolnej skupiny (Mel) a pri hypertenzii indukovanej L-NAME (LN + Mel). Percentuálny čas strávený v otvorených ramenách vyvýšeného krížového bludiska (EPM) (A), počet tranzícií do otvorených ramien EPM (B), percentuálny čas strávený v osvetlenej časti testu preferencie svetla/tmy (LDB) (C) a počet tranzícií do osvetlenej časti LDB (D) Ctrl – kontroly; LN – L-NAME. * $p < 0,05$ vs. Ctrl, # $p < 0,05$ vs. LN

Test preferencie svetla/tmy

Percentuálny čas strávený v osvetlenej časti LDB bol u kontrol $19,2 \pm 3,1$ % a L-NAME ho nesignifikantne predlžovalo o 34,3 % (ns). Podávanie melatonínu u normotenzných potkanov ho predlžovalo o 71,6 % ($p < 0,05$) a u hypertenzných potkanov o 24,9 % (ns) (**obrázok 2C**).

Počet tranzícií do osvetlenej časti LDB bol u kontrol $11,1 \pm 1,5$ a L-NAME ich zvyšovalo o 35,1 % ($p < 0,05$). Podávanie melatonínu u normotenzných potkanov zvyšovalo počet prechodov o 55 % ($p < 0,05$) a u hypertenzných potkanov ich znižovalo o 4,7 % (ns) (**obrázok 2D**).

Diskusia

Aplikácia L-NAME spôsobila vzostup STK a melatonín vzostupu STK čiastočne zabránil. Hypertenzia navodená L-NAME neindukovala anxiózne prejavy pokusných zvierat. Melatonín signifikantne predĺžil čas strávený v osvetlenej časti LDB a zvýšil počet prechodov do osvetlenej časti LDB u kontrolných potkanov. Melatonín tiež zvýšil počet prechodov do otvorených ramien EPM u potkanov ovplyvnených L-NAME.

Model hypertenzie indukovanej L-NAME je založený na inhibícii endotelovej NO syntázy s redukciou produkcie NO vo viacerých orgánoch, vrátane ľavej komory srdca, obličiek a mozgu (10, 11). Nedostatok oxidu dusnatého sa prejaví proliferatívnym účinkom s fibrotickou prestavbou srdca, obličiek a aorty (11, 12, 13, 14). Neurohormonálna alterácia na modeli hypertenzie indukovanej L-NAME je však oveľa komplexnejšia ako samotný deficit NO a zahŕňa aktiváciu renín-angiotenzín-aldosteronového systému (15), a to dominantne aktiváciou angiotenzínu (16), alebo aldosterónu (17). Vzájomná interferencia medzi komplexnou neurohormonálnou a hemodynamickou alteráciou je pravdepodobne príčinou, že literárne údaje týkajúce sa psychoemocionálnych ukazovateľov pri tomto type hypertenzie značne kolíšu. Kým niektorí autori pozorovali anxiogénny efekt (18, 19, 20), v iných prácach prevládali anxiolytické a antidepresívne prejavy (21). Chronické podávanie L-NAME v našom experimente viedlo skôr k anxiolytickému efektu, čo je v súlade s viacerými predchádzajúcimi prácami. Guimaraes et al. (22) pozorovali anxiolytický účinok injekčného podávania L-NAME do špecifických zón mozgu zodpovedných za anxiu u potkanov. Analogické pozorovania sa zaznamenali aj u depresívneho správania potkanov indukovaného chronickou hypobarickou hypoxiou, keď L-NAME chránilo pred zvýšením zápalových cytokínov v mozgu spolu s redukciou stupňa depresie (21).

Melatonín je hormón produkovaný v corpus pineale, predovšetkým v nočných hodinách (23, 24). Jeho chronobiologický efekt sa zakladá na modifikácii intenzity fyziologických a patologických dejov s rytmiami dňa a noci (8, 25). Okrem účinkov sprostredkovaných špecifickými melatonínovými

receptormi vykazuje melatonín pleiotropné účinky, medzi ktoré patrí zlepšenie endotelovej funkcie a zvýšenie produkcie NO (26, 27), redukcia oxidačnej záťaže v extra- aj intracelulárnom priestore (26) a sympatikolytické pôsobenie (28). Výsledky klinických štúdií so syntetickými derivátmi agonistov melatonínových receptorov naznačujú antidepresívny a anxiolytický efekt (9). Zdá sa, že aj sám melatonín vykazuje nielen sedatívne (29), ale aj anxiolytické pôsobenie (5). V prípade hypertenzie indukovanej L-NAME v našom experimente melatonín v súlade s predchádzajúcimi prácami zvyšoval čas strávený v osvetlených častiach EPM a LDB, čo nasvedčuje jeho anxiolytickému pôsobeniu, a to nielen u hypertenzných, ale aj kontrolných potkanov.

Limitácie

Bolo by zaujímavé sledovať, do akej miery sú psychoemocionálne zmeny determinované melatonínom, spôsobené interferenciou s hemodynamickými faktormi a do akej miery je to odpoveď na neurohormonálnu aktiváciu. Takéto sledovania však presahovali rámec našej práce.

Záver

Hypertenzia indukovaná L-NAME v našom experimente nenavodila anxiogénne správanie. Chronické podávanie melatonínu vykazovalo známky anxiolytického pôsobenia nielen u intaktných potkanov, ale aj pri hypertenzii indukovanej L-NAME. Naše výsledky naznačujú, že melatonín by mohol pôsobiť anxiolyticky u fyziologických aj patologických typov správania.

Práca bola podporená grantami VEGA 1/0071/15, VEGA 2/0195/15 a UK/258/2016.

Literatúra

1. Vilchinsky N, Ginzburg K, Fait K, et al. Cardiac-disease-induced PTSD (CDI-PTSD): A systematic review. *Clin Psychol Rev* 2017;55:92-106.
2. Pedersen SS, von Känel R, Tully PJ, et al. Psychosocial perspectives in cardiovascular disease. *Eur J Prev Cardiol* 2017;24(3_suppl):108-115.
3. Gentil L, Vasiliadis HM, Prévile M, et al. Impact of mental disorders on the association between adherence to antihypertensive agents and all-cause healthcare costs. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2017;19(1):75-81.
4. Shields GS, Slavich GM. Lifetime stress exposure and health: A review of contemporary assessment methods and biological mechanisms. *Soc Personal Psychol Compass* 2017;11(8). pii: e12335.

5. Aziriova S, Repova Bednarova K, et al. Doxorubicin-induced behavioral disturbances in rats: protective effect of melatonin and captopril. *Pharmacol Biochem Behav* 2014;124:284-289.
6. Aziriova S, Repova K, Krajcirovicova K, et al. Effect of ivabradine, captopril and melatonin on the behaviour of rats in L-nitro-arginine methyl ester-induced hypertension. *J Physiol Pharmacol* 2016;67(6):895-902.
7. Repova K, Krajcirovicova K, Mullerova M, et al. Effect of melatonin on the behaviour of rats with continuous light-induced hypertension. *Gen. Physiol. Biophys.* 2018;37. In press 2018.
8. Simko F. Chronobiology of blood pressure: emerging implications of melatonin. *Eur J Clin Invest* 2012;42(11):1252-1254.
9. Paulis L, Simko F, Laudon M. Cardiovascular effects of melatonin receptor agonists. *Expert Opin Investig Drugs* 2012;21(11):1661-1678.
10. Bernátová I, Pechánová O, Simko F. Effect of captopril in L-NAME-induced hypertension on the rat myocardium, aorta, brain and kidney. *Exp Physiol* 1999;84(6):1095-1105.
11. Simko F, Matuskova J, Luptak I, et al. Effect of simvastatin on remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. *Life Sci* 2004;74(10):1211-1224.
12. Pechánová O, Bernátová I, Pelouch V, et al. Protein remodelling of the heart in NO-deficient hypertension: the effect of captopril. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29(12):3365-3374.
13. Simko F, Luptak I, Matuskova J, et al. L-arginine fails to protect against myocardial remodelling in L-NAME-induced hypertension. *Eur J Clin Invest* 2005;35(6):362-368.
14. Simko F, Pechanova O, Repova K, et al. Lactacystin-induced model of hypertension in rats: effects of melatonin and captopril. *Int J Mol Sci* 2017;18(8). pii: E1612.
15. Simko F, Simko J. The potential role of nitric oxide in the hypertrophic growth of the left ventricle. *Physiol Res* 2000;49(1):37-46.
16. Takemoto M, Egashira K, Usui M, et al. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest* 1997;99(2):278-287.
17. Simko F, Baka T, Krajcirovicova K, et al. Effect of Melatonin on the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in L-NAME-Induced Hypertension. *Molecules* 2018;23(2). pii: E265.
18. Vale AL, Green S, Montgomery AM, et al. The nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME produces anxiogenic-like effects in the rat elevated plus-maze test, but not in the social interaction test. *J Psychopharmacol* 1998;12(3):268-272.
19. Czech DA, Jacobson EB, LeSueur-Reed KT, et al. Putative anxiety-linked effects of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME in three murine exploratory behavior models. *Pharmacol Biochem Behav* 2003;75(4):741-748.
20. Zarrindast MR, Nasehi M, Khansari M, et al. Influence of nitric oxide agents in the rat amygdala on anxiogenic-like effect induced by histamine. *Neurosci Lett* 2011;489(1):38-42.
21. Deep SN, Baitharu I, Sharma A, et al. Neuroprotective Role of L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) against Chronic Hypobaric Hypoxia with Crowding Stress (CHC) Induced Depression-Like Behaviour. *PLoS One* 2016;11(4):e0153371.
22. Guimarães FS, de Aguiar JC, Del Bel EA, et al. Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *Neuroreport* 1994;5(15):1929-1932.
23. Simko F, Paulis L. Antifibrotic effect of melatonin-perspective protection in hypertensive heart disease. *Int J Cardiol* 2013;168(3):2876-2877.
24. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, et al. Mitochondria: Central Organelles for Melatonin's Antioxidant and Anti-Aging Actions. *Molecules* 2018;23(2). pii: E509.
25. Simko F, Pechanova O. Potential roles of melatonin and chronotherapy among the new trends in hypertension treatment. *J Pineal Res* 2009;47(2):127-133.
26. Simko F, Paulis L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. *J Pineal Res* 2007;42(4):319-322.
27. Manchester LC, Coto-Montes A, Boga JA, et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. *J Pineal Res* 2015;59(4):403-419.
28. Simko F, Baka T, Paulis L, et al. Elevated heart rate and nondipping heart rate as potential targets for melatonin: a review. *J Pineal Res* 2016;61(2):127-137.
29. Mistraletti G, Umbrello M, Sabbatini G, et al, et al. Melatonin reduces the need for sedation in ICU patients: a randomized controlled trial. *Minerva Anestesiol.* 2015 Dec;81(12):1298-12310. Epub 2015 May 13.