

УДК 591.1:159.944.4

DOI 10.5281/ZENODO.19657949

ИЗМЕНЕНИЕ ИНДЕКСА ТРЕВОЖНОСТИ КРЫС САМОК ПРИ ДЕЙСТВИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВОДОРОДА В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

*Хусаинов Д. Р.¹, Лукашевич Е. Д.², Аудинов И. Д.¹, Рыбка А. С.³, Туманянц К. Н.¹,
Хома П. Н.¹, Мушта Я. А.¹*

¹ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В. И. Вернадского», Симферополь,
Республика Крым, Россия

²Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение «Лицей Крымской весны»,
Мирное, Симферопольский район, Республика Крым, Россия

³Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного образования
Республики Крым «Малая академия наук «Искатель», Симферополь, Республика Крым, Россия
E-mail: gangliu@yandex.ru

Настоящее исследование посвящено влиянию молекулярного водорода на стресс индуцируемое повышение индекса тревожности крыс самок линии Wistar. Исследование проведено на двух группах животных возрастом 7 месяцев: контроль – 9 особей и «Водород» – 8 особей. Крысы группы «Водород» помещались на 20 минут в водородную воду с температурой 31–32⁰С (вода насыщалась водородом с помощью водородного бальнео-генератора SuisoMed SMT-1). Крысы контрольной группы помещались в обычную воду и все исследовательские мероприятия были идентичны с группой «Водород». Выявлено, что молекулярный водород способен снижать выраженность стресс индуцированного повышения уровня тревожности животных, но полностью не препятствует этому эффекту. Возможно, при условно среднем и малом уровне стресс фактора молекулярный водород будет способен оказывать более выраженное стресс протекторное влияние.

Ключевые слова: молекулярный водород, индекс тревожности, стресс протекторное влияние.

ВВЕДЕНИЕ

В повседневных условиях современного цивилизационного развития человек сталкивается с хроническими стресс факторами различной природы, практически, в ежедневном режиме. В результате от каждого из нас требуется существенный запас адаптивного потенциала и внутренних ресурсов для противодействия переходу в состояние дисстресса с вероятным истощением и крайне негативными последствиями. Но даже в стадии сопротивления стресс воздействия вызывают изменение многих психофизиологических показателей человека и животных, в том числе, увеличивается уровень агрессии, усиливаются депрессивноподобные, тревожные проявления; перестраивается болевая чувствительность, подавляются когнитивные функции и т.д. В связи с этим, остается крайне актуальным поиск естественных и максимально безопасных средств, которые способны противодействовать негативным эффектам различных стрессоров и способствовать

расширению адаптивного потенциала человека и животных. Одним из перспективных факторов является молекулярный водород (H_2), который обладает доказанным антиоксидантным воздействием [1–3]. Также, продемонстрированы противовоспалительный [3, 4], нейропротекторный [3, 5] и, даже, ноотропный [6] эффекты. В исследованиях различных авторов продемонстрировано, что молекулярный водород эффективен в борьбе с окислительным стрессом [7], нейровоспалением [3] и обладает большим терапевтическим потенциалом при лечении широкого спектра заболеваний головного мозга, включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона, снижает выраженность тревожных и депрессивных расстройств [3, 5]. В исследованиях на животных показано, что молекулярный водород снижает уровни стрессовых гормонов и воспалительных цитокинов, таких как кортикостерон, адренкортикотропный гормон, интерлейкин-6 и фактор некроза опухоли- α , что способствует повышению устойчивости к стрессу [8]; отмечается и улучшение когнитивных функций [9]. Также, молекулярный водород продемонстрировал стресс протекторную активность на клеточном уровне при стрессе Гольджи [10].

В описанной проблематике особое внимание заслуживают гендерные отличия в силу того, что у женщин и самок животных наблюдаются существенные вариации гормонального фона и текущего психоэмоционального состояния. Поэтому реактивность женского организма и самок животных на различные стресс факторы и стресс протекторные агенты может иметь специфические особенности и отличаться от реакции мужчин и самцов животных. В связи с этим была сформулирована следующая цель исследовательской работы: выяснить влияние молекулярного водорода на стресс индуцируемое повышение индекса тревожности крыс самок линии Wistar.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования в тесте «Открытое поле» (ООО «Открытая наука», Россия) были отобраны 17 крыс самок возрастом 7 месяцев линии Wistar. Животные были разделены на две равные группы:

- Группа 1 – 9 особей – контроль;
- Группа 2 – 8 особей – «Водород»;

Все животные тестировались в установке «Открытое поле», в которой оценивалось фоновое значение индекса тревожности (ИТ). ИТ рассчитывался по формуле $(t_{\text{общее}} - t_{\text{отк}}) / t_{\text{общее}}$, где $t_{\text{общее}}$ – время тестирования в установке – 5 мин, $t_{\text{отк}}$ – суммарное время нахождения в открытых зонах тестовой установки. Для открытого поля $t_{\text{отк}}$ – это суммарное время в зонах 1 (центр) и 2 (пространство возле центра, рис. 1). Смысловой подход такого расчета достаточно простой: чем дольше животное находится в открытых зонах, тем меньше уровень тревожности. Следовательно, если $t_{\text{отк}} = t_{\text{общее}}$, то ИТ минимален и равен нулю и, наоборот, если $t_{\text{отк}} = 0$ – ИТ максимален и равен единице.

Время нахождения каждой крысы в тестовой установке составляло 5 минут. Этот отрезок времени записывался видеокамерой высокого разрешения, затем видеозапись автоматически анализировалась в программном комплексе Noldus

EthoVision 12 (Noldus Information Technology, Нидерланды).

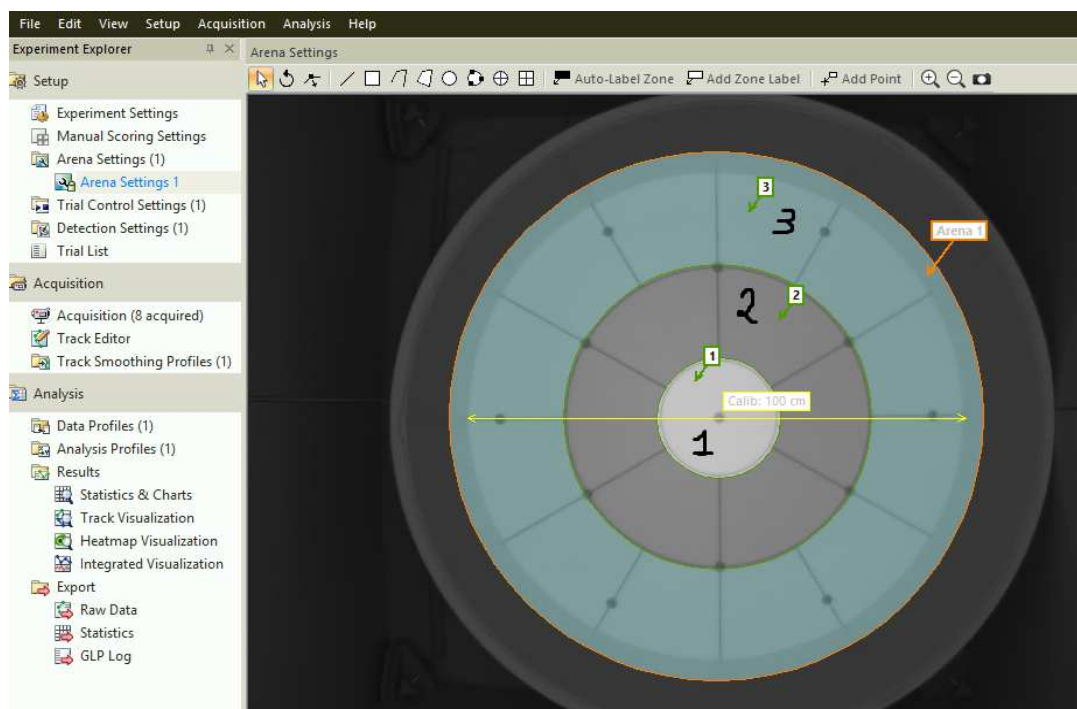


Рис. 1. Разделение тестового пространства установки «Открытое поле» в программном пакете Noldus EthoVision.

Примечания: 1 – центр; 2 – пространство возле центра; 3 – пристеночное пространство; двойной стрелкой отмечен калибровочный отрезок 100 см; англоязычный лейбл соответствует общему пространству поиска животного.

Через 10 дней после фонового тестирования группы крыс самок линии Wistar подвергались запланированному экспериментальному воздействию. Крысы-самки группы «Водород» помещались в водородную воду с температурой 31–32⁰С на двадцать минут в емкость по четыре особи. Вода предварительно (2 минуты до размещения крыс) насыщалась водородом с помощью водородного бальнеогенератора SuisoMed SMT-1 (ООО «Азия Медикал», Россия) с потоком водорода 4000 мл/мин, чистота водорода: 99,99 %, концентрация молекулярного водорода до 10 000 РРВ (рисунок 2), который продолжал потоковое насыщение воды молекулярным водородом на протяжении всех 20-ти минут. Следовательно, для крыс самок группы «Водород» одновременно моделировалось и стресс воздействие и интервенция молекулярного водорода, которые осуществлялись по схеме: 5 дней воздействие – 2 дня прерывание – 5 дней воздействие. По истечении 20-ти минут крысы изымались, обсушивались и тестировались в открытом поле на первый, пятый и десятый дни описанного воздействия.



Рис. 2. Внешний вид водородного бальнео-генератора SuisoMed SMT-1 (слева) и крысы самки в емкости с водородной водой (справа).

Крысы контрольной группы помещались в обычную воду с температурой $31-32^{\circ}\text{C}$ на 20 минут в емкость по четыре особи. Необходимо отметить, что в эту емкость помещались элементы водородного бальнеогенератора, но сам прибор не запускался. Все остальные исследовательские мероприятия были идентичны с группой «Водород».

Далее на иллюстрациях и в тексте для удобства будет использована конструкция от 1-го до 10-го дня воздействия, подразумевая двухдневный перерыв.

Статистический анализ всех массивов осуществлялся в программе GraphPad Prism 8.0. Для анализа применялись методы описательной статистики, проверка нормальности распределения осуществлялась с помощью более точного определения соответствия распределения массива данных закону Гаусса – Residual Gaussian Process, который, в том числе, предусматривает применение Brown-Forsythe test, Bartlett's test и Normality of Residuals test [11]. Во всех случаях присутствовали массивы с непараметрическим распределением данных, поэтому для множественного сравнения применялся метод Краскелла-Уоллеса и критерий Дана.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально представим результаты, которые были получены в группе «Водород». Итак, крысы-самки этой группы десять раз подвергались стресс воздействию с двухдневным перерывом посередине временного отрезка, но в момент стресс воздействия находились в «водородной воде». Изменение ИТ самок этой группы представлено на рисунке 3. Фоновая величина ИТ крыс самок группы «Водород» по медиане составляла 0,80 (0,78; 0,82) у.е., после первого стресс воздействия – 0,99 (0,99; 0,99) у.е. при $p=0,00002$ по сравнению с фоновым значением, после пятого воздействия показатель ИТ практически не изменялся и оставался существенно повышенным 0,98 (0,89; 0,99) у.е. при $p = 0,0113$.

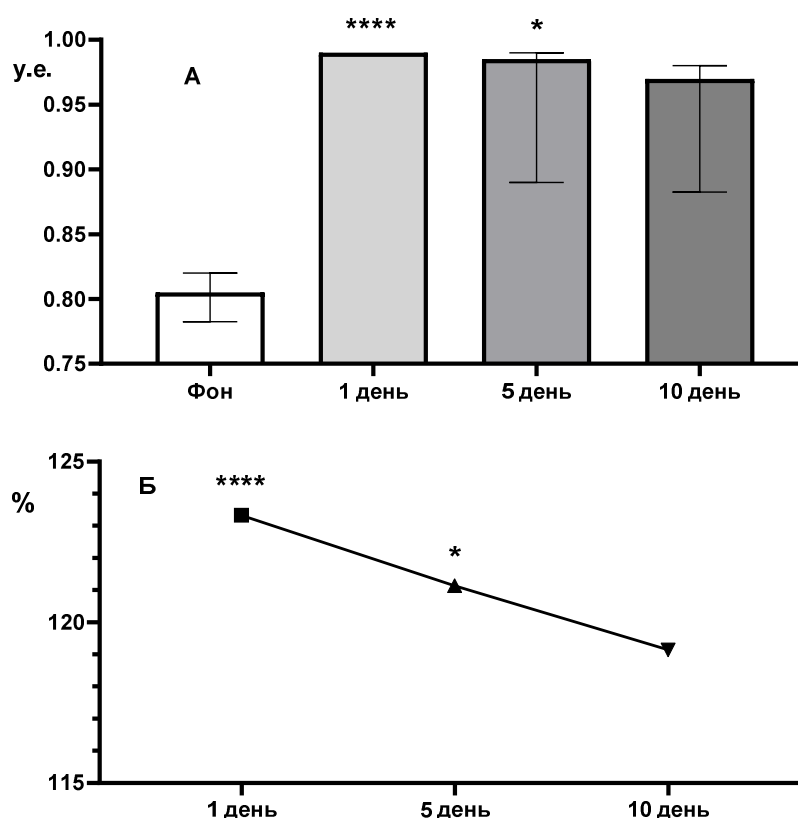


Рис. 3. Индекс тревожности крыс самок в условиях десятикратного воздействия «водородно-водных ванн» (группа «водород»).

Примечания: А – графическое отображение значений индекса тревожности, представлены медиана и квартили (Q1; Q3); Б – представлены медианы в %, за 100 % приняты фоновые показатели; фон – фоновое значение; 1 день – значение на первый день воздействия «водородно-водных ванн»; 5 день – значение на пятый день воздействия «водородно-водных ванн»; 10 день – значение на десятый день воздействия «водородно-водных ванн»; **** – отличия от фоновых показателей при $p<0,0001$; * – отличия от фоновых показателей при $p<0,05$.

Только после десятого совместного моделирования стресс воздействия и влияния молекулярным водородом у крыс самок наблюдалось некоторое снижение значения ИТ до 0,97 (0,88; 0,98) у.е. при $p = 0,0837$ по сравнению с фоном, т.е. уровень тревожности крыс самок не отличался от фонового значения.

Важно отметить, что после десятого «сеанса» ИТ крыс не отличался и от значений, которые регистрировались на первый и пятый дни воздействия. Этот экспериментальный факт позволяет говорить лишь о частичной компенсации молекулярным водородом стресс лимитированного повышения ИТ крыс самок.

Для более удобного визуального восприятия ИТ на рисунке 3 представлен и в процентном выражении. На этой части рисунка четко видно, что ИТ постепенно снижается, но не достигает величины близкой к 100 %: 123,33 % на первый день, 121,14 % на пятый и 119,14 % на десятый дни экспериментального стресс воздействия совместно с молекулярным водородом.

Далее на рисунке 4 представлен анализ ИТ крыс самок контрольной группы, напомним, что эти животные подвергались десятикратному помещению в идентичную стресс модель, но уже с обычной водой.

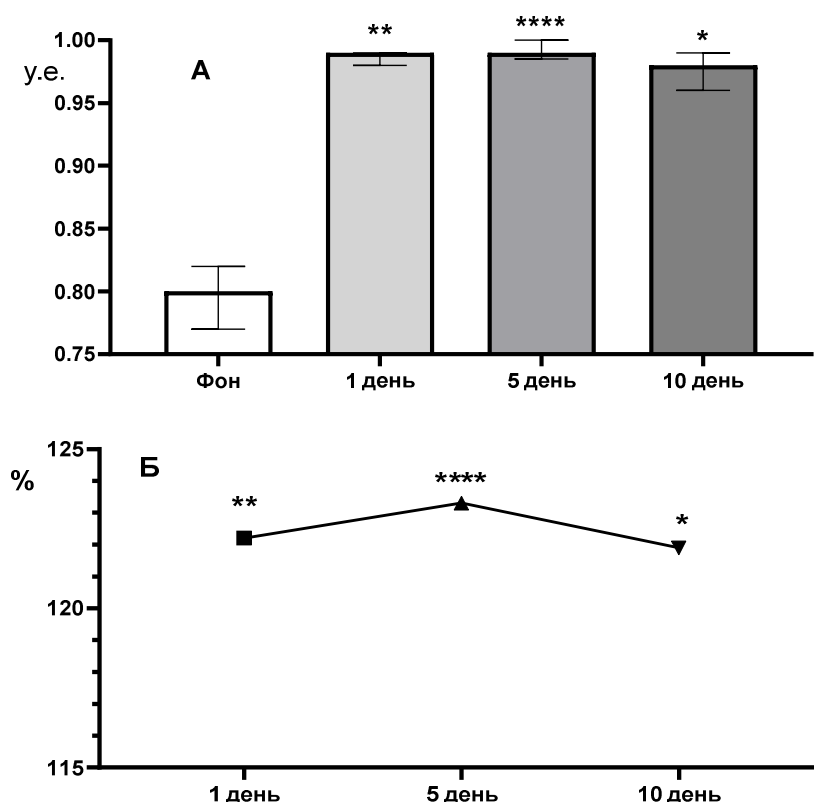


Рис. 4. Индекс тревожности крыс самок в условиях десятикратного воздействия «водных ванн» (контрольная группа).

Примечания: ** – отличия от фоновых показателей при $p < 0,01$; остальные обозначения, что и на рисунке 3.

Фоновая величина ИТ крыс самок контрольной группы по медиане составляла 0,80 (0,77; 0,82) у.е., после первого стресс воздействия – 0,99 (0,98; 0,99) у.е. при $p=0,0028$ по сравнению с фоновым значением, после пятого воздействия показатель ИТ по медиане равнялся 0,99 (0,98; 1,00) у.е. при $p = 0,000025$; и после десятого моделирования стресс воздействия значение ИТ составляло 0,98 (0,96; 0,99) у.е. при $p = 0,0158$ по сравнению с фоном, т.е. уровень тревожности крыс самок достоверно отличался от фонового значения.

В процентном выражении ИТ контрольной группы крыс самок на первый день равнялся 122,21 %, на пятый день 123,31 % и на десятый день стресс воздействия 121,90 % от фонового уровня.

Таким образом, в контрольной группе крыс самок наблюдается достаточно устойчивое повышенное значение ИТ на протяжении всего экспериментального периода.

На рисунке 5 представлено сравнение ИТ тревожности крыс самок контрольной группы и группы «Водород». Отметим, что фоновое значение ИТ крыс самок обеих групп не отличается, а следовательно, на «старте» животные были идентичны по уровню тревожности.

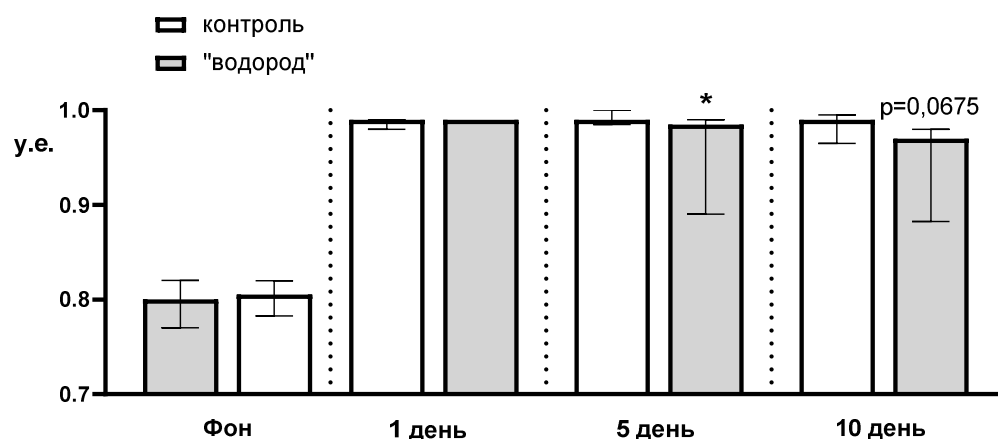


Рис. 5. Сравнение индекса тревожности контрольных крыс самок и животных группы «водород».

Примечание: контроль – значение индекса тревожности в контрольной группе крыс самок; «водород» – значение индекса тревожности в группе крыс самок, которые находились в воде с молекулярным водородом; * – отличия от показателей контрольной группы при $p < 0,05$.

После первого воздействия на крыс их ИТ повышается практически до максимума и не демонстрирует достоверного уровня отличий. На пятый день ИТ крыс самок группы «Водород» достоверно меньше при $p = 0,0285$ по сравнению с контрольным значением. На десятый день воздействия ИТ крыс самок группы «Водород», в целом, меньше по сравнению с ИТ контрольной группы, но демонстрирует отличие только на уровне тенденции при $p = 0,0675$.

Таким образом, проведенное сравнение еще раз подтверждает, что молекулярный водород способен снижать выраженность стресс индуцированного повышения уровня тревожности животных, но полностью не препятствует этому эффекту. Возможно, при условно среднем и малом уровне стресс фактора молекулярный водород будет способен оказывать более выраженное стресс протекторное влияние.

Результаты текущего исследования продемонстрировали потенциальную возможность применения молекулярного водорода в качестве стресспротекторного фактора, который способен снижать негативные последствия хронического стресс воздействия. Обратим внимание на то, что стресс модели с применением элементов вынужденного плавания для грызунов и, в частности, крыс являются моделями с мощным (сильным) стресс фактором сочетающими в себе эмоциональный стресс и аэробно-анаэробную физическую нагрузку [12]. Именно поэтому в нашем исследовании мы использовали некоторые методические приемы, которые были направлены на снижение выраженности стресс воздействия: температура воды 31–32⁰ С, а не классические 24⁰ С или более распространенные 25–27⁰ С [13]; также, крысы хвостом соприкасались с дном емкости. Такие методические изменения были применены в силу выбранного способа введения молекулярного водорода: чрескожное (бальнеологическое) в течении десяти сеансов. Следовательно, для крыс это являлось одновременно значимым стресс воздействием (стресс моделью) и способом «доставки» в организм молекулярного водорода. Именно поэтому мы и предприняли ряд описанных мер по снижению выраженности фактора стресса, тем более, в режиме хронического воздействия. Однако, считаем, что не смотря на примененные способы смягчения стресс воздействия, модель сохранила высокий уровень стрессогенности для крыс и эффект молекулярного водорода, скажем так, оказался на уровне смягчения негативных психоэмоциональных последствий хронического стресса. В качестве рабочей гипотезы, предполагаем, что при использовании моделей с более «слабыми» стресс факторами стресспротекторный эффект молекулярного водорода будет более выраженным. Высказанное предположение требует дальнейших детальных исследований.

Отметим, что при погружении крыс в водородную воду, конечно, осуществлялось не только чрескожное проникновение, но и, очевидно, ингаляционное (водород летуч и достаточно интенсивно диффундирует из водной среды), также животные периодически заглатывали водородную воду. Если переносить этот способ введения молекулярного водорода на человека, то, однозначно, сохранятся два варианта: чрескожное и ингаляционное проникновение молекулярного водорода в организм человека. Конечно, можно отдельно обогащать молекулярным водородом питьевую воду и употреблять ее одновременно с бальнеологической процедурой, но воспроизводить эту вариацию считаем нецелесообразным, т.к. во многих исследованиях показана низкая эффективность употребления именно питьевой воды, обогащённой молекулярным водородом [14]. Высокая степень эффективности показана для ингаляционного способа введения молекулярного водорода [14, 15], сочетанное в нашем исследовании с чрескожным проникновением, что дает нам основания полагать о высокой функциональной

эффективности бальнеологического способа «доставки» молекулярного водорода, без необходимости сопутствующего употребления водородной воды. Конечно, общеизвестным является тот факт, что проницаемость кожных покровов крыс заметно выше по сравнению с человеком [16]. Именно, поэтому крысы являются удобной моделью для оценки чрескожных воздействий, но одновременно этот биологический факт накладывает и ряд ограничений: при переходе на человека, часто, необходимо увеличивать длительность воздействия, наращивать концентрацию активных компонентов и др. Считаем, что в случае молекулярного водорода видовая разница в проницаемости кожных покровов не будет столь значимым фактором в силу малого размера молекулы и достаточно высокого значения коэффициента диффузии водорода в различных средах [17]. Несомненно, живые системы обладают рядом специфических особенностей, в том числе, и по проницаемости и эффективность чрескожного ведения молекулярного водорода применительно к человеку, все-таки, требует дальнейших детальных исследований на людях.

Выбранная схема экспериментальных воздействий: 5 дней воздействие – 2 дня прерывание – 5 дней воздействие (подробное описание представлено в разделе «Материалы и методы») сформирована не случайно. В социальной структуре жизни человека преобладает именно представленная система интервалов, которая связана с пятидневной рабочей неделей. В связи с этим многие повседневные стрессоры имеют схожую систему прерывания. Кроме того, в организациях, которые оказывают медицинские, реабилитационные и другие услуги у персонала, не редко, сформирована пятидневная рабочая неделя. Конечно, наша модель не распространяется на систему шестидневной рабочей недели; не учитывает вариации, например, так называемого, стресса выходного дня и целого ряда других факторов. Но, еще раз обратим внимание читателя: в настоящем исследовании мы применили модель прерывания, которая характерна для пятидневной рабочей недели, и на выходных днях человек попадает в ситуацию большего психоэмоционального комфорта с отсутствием целого ряда стрессоров. В дальнейшем видим актуальность исследования стресспротекторного влияния молекулярного водорода в схемах с иной интервальностью и, в том числе, при непрерывных воздействиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, настоящее исследование экспериментально подтверждает потенциал молекулярного водорода в качестве нового и перспективного средства для противодействия стрессиндуцированным изменениям уровня тревожности, демонстрируя перспективу дальнейшей разработки новых методов коррекции психоэмоциональных состояний у животных и человека. Для более объективной оценки стресспротекторного потенциала молекулярного водорода требуются дальнейшие детальные исследования, как на животных, так и на человеке. В рамках наших планов в самое ближайшее время будет проведено идентичное исследование, но на крысах самцах. Предполагается получить более устойчивый и однозначный

эффект молекулярного водорода в силу отсутствия у самцов крыс достаточно широкого диапазона гормонального фона, который характерен крысам самкам.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Экспериментальная физиология и биофизика» и НКЦ «Технологии здоровья и реабилитации» в рамках инициативной темы № АААА-А21-121011990099-6.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы статьи выражают глубокую благодарность доктору медицинских наук, генеральному директору ООО «Митохонкер» Матвееву Андрею Владимировичу и руководителю АНО «Водородные технологии» Окуневой Дарье Викторовне за предоставленное оборудование и консультационную помощь.

Список литературы

1. Fu Z. Role of Molecular Hydrogen in Ageing and Ageing-Related Diseases. / Fu Z., Zhang J., Zhang Y. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2022. – 2022. – P. 2249749. doi: 10.1155/2022/2249749. PMID: 35340218; PMCID: PMC8956398.
2. Johnsen H. M. Molecular Hydrogen Therapy-A Review on Clinical Studies and Outcomes. / Johnsen H. M., Hiorth M., Klaveness J. // *Molecules.* – 2023. – 28(23). – P. 7785. doi: 10.3390/molecules28237785. PMID: 38067515; PMCID: PMC10707987.
3. Wu C. Molecular Hydrogen: an Emerging Therapeutic Medical Gas for Brain Disorders. / Wu C., Zou P., Feng S., Zhu L., Li F., Liu T. C., Duan R., Yang L. // *Mol Neurobiol.* – 2023. – 60(4). – P. 1749–1765. doi: 10.1007/s12035-022-03175-w. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36567361.
4. Kura B. The Protective Role of Molecular Hydrogen in Ischemia/Reperfusion Injury. / Kura B., Slezak J. // *Int J Mol Sci.* – 2024. – 25(14). – P. 7884. doi: 10.3390/ijms25147884. PMID: 39063126; PMCID: PMC11276695.
5. Ramanathan D. Molecular hydrogen therapy for neurological diseases: a review of current evidence. / Ramanathan D., Huang L., Wilson T., Boling W. // *Med Gas Res.* – 2023. – 13(3). – P. 94–98. doi: 10.4103/2045-9912.359677. PMID: 36571372; PMCID: PMC9979207.
6. Pluta R. Molecular Hydrogen Neuroprotection in Post-Ischemic Neurodegeneration in the Form of Alzheimer's Disease Proteinopathy: Underlying Mechanisms and Potential for Clinical Implementation-Fantasy or Reality? / Pluta R., Januszewski S., Czuczwar S. J. // *Int J Mol Sci.* – 2022. – 23(12). – P. 6591. doi: 10.3390/ijms23126591. PMID: 35743035; PMCID: PMC9224395.
7. Zhang L. Molecular hydrogen reduces dermatitis-induced itch, diabetic itch and cholestatic itch by inhibiting spinal oxidative stress and synaptic plasticity via SIRT1- β -catenin pathway in mice. / Zhang L., Zhao F., Li Y., Song Z., Hu L., Li Y., Zhang R., Yu Y., Wang G., Wang C. // *Redox Biol.* – 2025. – 79. – P. 103472. doi: 10.1016/j.redox.2024.103472. Epub 2024 Dec 17. PMID: 39752998; PMCID: PMC11754494.
8. Gao Q. Molecular hydrogen increases resilience to stress in mice. / Gao Q., Song H., Wang X. T., Liang Y., Xi Y. J., Gao Y., Guo Q. J., LeBaron T., Luo Y. X., Li S. C., Yin X., Shi H. S., Ma Y. X. // *Sci Rep.* – 2017. – 7(1). – P. 9625. doi: 10.1038/s41598-017-10362-6. PMID: 28852144; PMCID: PMC5575246.
9. Choi K. S. Neuroprotective effects of hydrogen inhalation in an experimental rat intracerebral hemorrhage model. / Choi K. S., Kim H. J., Do S. H., Hwang S. J., Yi H. J. // *Brain Res Bull.* – 2018. – 142. – P. 122–128. doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.07.006. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30016724.
10. Meng S. Molecular hydrogen protects against sepsis-induced cardiomyopathy through improving Golgi stress-mediated autophagy, inflammation and apoptosis. / Meng S., Liu J., Luo Y., Fan Y., Wang Z., Song Y., Pei S., Huang X., Zhao L., Xie K. // *Br J Pharmacol.* – 2025. – 182(22). – P. 5627–5646. doi: 10.1111/bph.70132. Epub 2025 Jul 27. PMID: 40717465.

11. Xing Wei. Residual Gaussian Process: A Tractable Nonparametric Bayesian Emulator for Multi-fidelity Simulations / Xing Wei, Shah Akeel, Wang Peng, Fu Shandian, Kirby Robert // Elsevier BV. – 2021. – 10.48550/arXiv.2104.03743.
12. Применение теста "принудительное плавание" при проведении доклинических исследований / М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров, М. А. Горячева // Международный вестник ветеринарии. – 2015. – № 4. – С. 90–95. – EDN VFZYXB.
13. Григорьева М. Е. Роль пептидов глипролинового ряда в регуляции системы гемостаза при стрессогенных воздействиях / М. Е. Григорьева, Л. А. Ляпина // Успехи современной биологии. – 2020. – Т. 140, № 1. – С. 19–25. – DOI 10.31857/S0042132420010020. – EDN LRRYEC.
14. Jebabli N. Acute effect of hydrogen-rich water on physical, perceptual and cardiac responses during aerobic and anaerobic exercises: a randomized, placebo-controlled, double-blinded cross-over trial. / Jebabli N., Ouerghi N., Abassi W., Yagin F. H., Khlifi M., Boujabli M., Bouassida A., Ben Abderrahman A and Ardigo L. P. // Front. Physiol. – 2023. – 14. – P. 1240871. doi: 10.3389/fphys.2023.1240871
15. Dong G. Inhalation of Hydrogen-rich Gas before Acute Exercise Alleviates Exercise Fatigue: A Randomized Crossover Study. / Dong G., Wu J., Hong Y., et al. // International Journal of Sports Medicine. – 2024. – DOI: 10.1055/a-2318-1880. PMID: 38698624.
16. Martusevich A. K. Near-field resonance microwave sounding to study dielectric properties of different skin areas (experimental study). / Martusevich A. K., Epishkina A. A., Golygina E. S., Tuzhilkin A. N., Fedotova A. S., Galka A. G. // Sovremennye tehnologii v medicine. – 2020. – 12(5). P. 57–61. doi:10.17691/stm2020.12.5.06
17. Шишкова Т. А. Изотопный эффект при взаимодействии водорода с материалами термоядерных реакторов / Т. А. Шишкова, А. В. Голубева, М. Б. Розенкевич // Журнал физической химии. – 2023. – Т. 97, № 10. – С. 1371–1392. – DOI 10.31857/S0044453723100205. – EDN XZVKSX.

CHANGES IN ANXIETY INDEX OF FEMALE RATS UNDER THE INFLUENCE OF MOLECULAR HYDROGEN IN CONDITIONS OF CHRONIC STRESS

***Husainov D. R.¹, Lukashevich E. D.², Aidinov I. D.¹, Rybka A. S.³, Tumanyants K. N.¹,
Khoma P. N.¹, Mushta Y. A.¹***

¹V. I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Russian Federation

*²Municipal Budgetary Educational Institution "Lyceum of the Crimean Spring", Mirnoye,
Simferopol District, Republic of Crimea, Russia*

*³State Budgetary Educational Institution of Additional Education of the Republic of Crimea "Small
Academy of Sciences "Iskatel", Simferopol, Republic of Crimea, Russia
E-mail: gangliu@yandex.ru*

Chronic stress has become an inherent part of modern technological civilisation, influencing many psychophysiological indicators in humans and animals, including an increase in depressive-like and anxious manifestations. The growing prevalence of such stress-induced psycho-emotional changes underscores the urgent need to find highly effective and safe stress protectors that can be used both as a supportive measure and even preventively. From this perspective, the application of molecular hydrogen as a stress-protective factor appears promising, demonstrating antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective, anxiolytic, and other effects [1–10]. It is noteworthy that the reactivity of female organisms to various factors may exhibit significant distinguishing features

compared to males. In light of this, the following aim was set for the study: to investigate the impact of molecular hydrogen on stress-induced increases in the anxiety index of female Wistar rats.

A total of 17 female Wistar rats, aged 7 months, were selected based on a similar anxiety index (AI), calculated using the formula $(t_{\text{total}} - t_{\text{open}}) / t_{\text{total}}$, where t_{total} is the testing time in the "Open Field" setup (LLC "Open Science", Russia) – 5 minutes, and t_{open} is the total time spent in the open areas of the testing apparatus. The behavioural responses of the animals in the testing setup were recorded using a high-resolution camera, and the video was subsequently analysed automatically with the Noldus EthoVision 12 software package (Noldus Information Technology, Netherlands).

The 17 animals were then divided into two groups: control – 9 individuals and "Hydrogen" – 8 individuals. It should be noted that the baseline AI of female rats in both groups was not significantly different, meaning that at the "start", the animals were identical in terms of anxiety levels. After selection, the animals in the formed groups remained in standard vivarium conditions for 10 days. Following this period, the female rats in the "Hydrogen" group were placed in hydrogen water at a temperature of 31–32°C for 20 minutes in groups of four. The water was pre-saturated with hydrogen using a hydrogen balneogenerator SuisoMed SMT-1 (LLC "Asia Medical", Russia) with a hydrogen flow of 4000 ml/min, purity of hydrogen: 99.99 %, and molecular hydrogen concentration of up to 10,000 PPB (Figure 2), which continued to saturate the water with molecular hydrogen throughout the 20 minutes. After 20 minutes, the rats were removed, dried, and tested in the "Open Field" setup on the first, fifth, and tenth days of exposure. The stress exposure and simultaneous impact of molecular hydrogen were implemented according to the scheme: 5 days of exposure – 2 days of interruption – 5 days of exposure. For convenience, the illustrations and text will use the terminology from the 1st to the 10th exposure, implying a two-day break.

The control group rats were placed in regular water at a temperature of 31–32°C for 20 minutes in groups of four. It is essential to note that elements of the hydrogen balneogenerator were added to this container, but the device itself was not activated. All other research activities were identical to those of the "Hydrogen" group.

The baseline AI of female rats in the "Hydrogen" group had a median of 0.80 (0.78; 0.82) units, after the first stress exposure – 0.99 (0.99; 0.99) units with $p=0.00002$ compared to the baseline value. After the fifth exposure, the AI value hardly changed, remaining significantly elevated at 0.98 (0.89; 0.99) units with $p = 0.0113$. Only after the tenth joint modelling of the stress exposure and the effect of molecular hydrogen did the AI in female rats show a slight reduction to 0.97 (0.88; 0.98) units with $p = 0.0837$ compared to the baseline, indicating that the anxiety level of the female rats was not different from the baseline value. It is important to note that after the tenth "session", the AI of the rats did not differ from the values recorded on the first and fifth days of exposure. This experimental fact suggests only a partial compensation by molecular hydrogen for the stress-induced increase in AI of female rats.

The baseline AI of female rats in the control group had a median of 0.80 (0.77; 0.82) units, after the first stress exposure – 0.99 (0.98; 0.99) units with $p=0.0028$ compared to the baseline value. After the fifth exposure, the AI median equalled 0.99 (0.98; 1.00) units

with $p = 0.000025$; and after the tenth stress modelling, the AI was 0.98 (0.96; 0.99) units with $p = 0.0158$ compared to the baseline, indicating that the anxiety level of the female rats in the control group was significantly different from the baseline value.

Thus, the control group of female rats exhibited a relatively stable elevated AI throughout the experimental period.

When comparing the AI of the control rats and the "Hydrogen" group, it was found that after the first exposure, the AI of the female rats in both groups increased nearly to the maximum and did not show a statistically significant difference. After the fifth exposure, the AI of the female rats in the "Hydrogen" group was significantly lower at $p = 0.0285$ compared to the control value. After the tenth exposure, the AI of the female rats in the "Hydrogen" group was generally lower compared to the control group, but showed a difference only at the trend level with $p = 0.0675$.

Molecular hydrogen has the potential to reduce the intensity of stress-induced increases in anxiety levels in female rats, but it does not entirely prevent this effect. It is possible that under conditionally moderate and low levels of stress factors, molecular hydrogen could exert a more pronounced stress-protective influence. Further detailed studies are required to assess the stress-protective potential of molecular hydrogen more objectively, both in animals and in humans.

Keywords: molecular hydrogen, anxiety index, stress protective effect.

References

1. Fu Z., Zhang J., Zhang Y. Role of Molecular Hydrogen in Ageing and Ageing-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev.*, **2022**, 2249749 (2022) doi: 10.1155/2022/2249749. PMID: 35340218; PMCID: PMC8956398.
2. Johnsen H. M., Hiorth M., Klaveness J. Molecular Hydrogen Therapy-A Review on Clinical Studies and Outcomes. *Molecules*, **28(23)**, 7785 (2023) doi: 10.3390/molecules28237785. PMID: 38067515; PMCID: PMC10707987.
3. Wu C., Zou P., Feng S., Zhu L., Li F., Liu T. C., Duan R., Yang L. Molecular Hydrogen: an Emerging Therapeutic Medical Gas for Brain Disorders. *Mol Neurobiol.*, **60(4)**, 1749 (2023) doi: 10.1007/s12035-022-03175-w. Epub 2022 Dec 26. PMID: 36567361.
4. Kura B., Slezak J. The Protective Role of Molecular Hydrogen in Ischemia/Reperfusion Injury. *Int J Mol Sci.*, **25(14)**, 7884 (2024) doi: 10.3390/ijms25147884. PMID: 39063126; PMCID: PMC11276695.
5. Ramanathan D., Huang L., Wilson T., Boling W. Molecular hydrogen therapy for neurological diseases: a review of current evidence. *Med Gas Res.*, **13(3)**, 94 (2023) doi: 10.4103/2045-9912.359677. PMID: 36571372; PMCID: PMC9979207.
6. Pluta R., Januszewski S., Czuczwar S. J. Molecular Hydrogen Neuroprotection in Post-Ischemic Neurodegeneration in the Form of Alzheimer's Disease Proteinopathy: Underlying Mechanisms and Potential for Clinical Implementation-Fantasy or Reality? *Int J Mol Sci.*, **23(12)**, 6591 (2022) doi: 10.3390/ijms23126591. PMID: 35743035; PMCID: PMC9224395.
7. Zhang L., Zhao F., Li Y., Song Z., Hu L., Li Y., Zhang R., Yu Y., Wang G., Wang C. Molecular hydrogen reduces dermatitis-induced itch, diabetic itch and cholestatic itch by inhibiting spinal oxidative stress and synaptic plasticity via SIRT1- β -catenin pathway in mice. *Redox Biol.*, **79**, 103472 (2025) doi: 10.1016/j.redox.2024.103472. Epub 2024 Dec 17. PMID: 39752998; PMCID: PMC11754494.
8. Gao Q., Song H., Wang X. T., Liang Y., Xi Y. J., Gao Y., Guo Q. J., LeBaron T., Luo Y. X., Li S. C., Yin X., Shi H. S., Ma Y. X. Molecular hydrogen increases resilience to stress in mice. *Sci Rep.*, **7(1)**, 9625 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-10362-6. PMID: 28852144; PMCID: PMC5575246.
9. Choi K. S., Kim H. J., Do S. H., Hwang S. J., Yi H. J. Neuroprotective effects of hydrogen inhalation in an experimental rat intracerebral hemorrhage model. *Brain Res Bull.*, **142**, 122 (2018) doi: 10.1016/j.brainresbull.2018.07.006. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30016724.

10. Meng S., Liu J., Luo Y., Fan Y., Wang Z., Song Y., Pei S., Huang X., Zhao L., Xie K. Molecular hydrogen protects against sepsis-induced cardiomyopathy through improving Golgi stress-mediated autophagy, inflammation and apoptosis. *Br J Pharmacol.*, **182**(22), 5627 (2025) doi: 10.1111/bph.70132. Epub 2025 Jul 27. PMID: 40717465.
11. Xing Wei, Shah Akeel, Wang Peng, Fu Shandian, Kirby Robert Residual Gaussian Process: A Tractable Nonparametric Bayesian Emulator for Multi-fidelity Simulations, *Elsevier BV.*, 10.48550/arXiv.2104.03743 (2021).
12. Kovaleva M. A., Makarova M. N., Makarov V. G., Goryacheva M. A. Application of the "Forced Swimming" Test in Preclinical Research. *International Bulletin of Veterinary Medicine*, **4**, 90 (2015). EDN VFZYXB.
13. Grigorieva M. E., Lyapina L. A. The Role of Glyproline Peptides in the Regulation of the Hemostasis System under Stressful Conditions. *Advances in Modern Biology*, **140**, **1**, 19 (2020). DOI 10.31857/S0042132420010020. – EDN LRRYEC.
14. Jebabli N., Ouerghi N., Abassi W., Yagin F. H., Khelifi M., Boujabli M., Bouassida A. Ben Abderrahman A. and Ardigò L. P. Acute effect of hydrogen-rich water on physical, perceptual and cardiac responses during aerobic and anaerobic exercises: a randomized, placebo-controlled, double-blinded cross-over trial. *Front. Physiol.*, **14**, 1240871 (2023) doi: 10.3389/fphys.2023.1240871
15. Dong G., Wu J., Hong Y., et al. Inhalation of Hydrogen-rich Gas before Acute Exercise Alleviates Exercise Fatigue: A Randomized Crossover Study. *International Journal of Sports Medicine*. (2024) DOI: 10.1055/a-2318-1880. PMID: 38698624.
16. Martusevich A. K., Epishkina A. A., Golygina E. S., Tuzhilkin A. N., Fedotova A. S., Galka A. G. Near-field resonance microwave sounding to study dielectric properties of different skin areas (experimental study). *Sovremennye tehnologii v medicine*, **12**(5), 57 (2020) doi:10.17691/stm2020.12.5.06
17. Shishkova T. A., Golubeva A. V., and Rozenkevich M. B. Isotopic Effect in the Interaction of Hydrogen with Materials of Thermonuclear Reactors. *Journal of Physical Chemistry*, **97**, **10**, 1371 (2023). DOI 10.31857/S0044453723100205. – EDN XZVKSX.