

СТРЕСС-ЛИМИТИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО ТЕТРАГИДРОПИРРОЛОПИРАЗИНА

О. В. Филиппова¹

Изучено влияние соединения ПВ-174 на состояние крыс при иммобилизационном стрессе. Показано, что на фоне соединения уменьшается инволюция тимуса и селезенки, гипертрофия надпочечников и образование язв в желудке, вызываемые стрессом. Соединение блокирует стрессогенное увеличение перекисного окисления липидов в легких и миокарде. Вещество не влияет на эффекты экзогенного глюкокортикоида кеналага. Одним из механизмов стресспротекторного действия ПВ-174 является его влияние на ЦНС.

Ключевые слова: иммобилизационный стресс, глюкокортикостероиды, стресспротекторное действие

ВВЕДЕНИЕ

Коррекция стресса — важная проблема фармакологии, так как стресс-реакция может привести к истощению адаптационных резервов и срыву адаптации и, следовательно, к различным заболеваниям [3]. Результатом декомпенсации могут быть нарушения иммунной, репродуктивной, пищеварительной систем, а также различные нарушения деятельности сердечно-сосудистой системы [1, 6, 7].

В НИИ фармакологии РАМН в течение ряда лет под руководством Н. В. Кавериной и А. М. Лихошерстова ведется разработка новых кардиотропных средств на основе гетероциклических производных. В рамках этих исследований ранее нами было показано, что соединение фумарата 2-[(2'-гидрокси-2'-фенилоксиметил)этил]-1,2,3,4-тетрагидропирроло[1,2-а]пиразин (ПВ-174), синтезированное в НИИ фармакологии РАМН В. П. Пересадой, обладает антиишемической активностью. В частности, ПВ-174 способно ограничивать степень повреждения кардиомиоцитов при экспериментальном инфаркте миокарда и уменьшать тяжесть течения данного заболевания [5]. Поскольку инфаркт миокарда может рассматриваться как болезнь дезадаптации и, следовательно, один из видов стресс-реакции организма, представляется целесообразным исследовать наличие стресс-лимитирующих свойств у вещества ПВ-174.

Цель настоящей работы — изучение стресс-лимитирующих свойств соединения ПВ-174.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммобилизационный стресс воспроизводили на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 90 – 105 г. Иммобилизацию крыс на спине с фиксацией за конечности осуществляли на прямоугольных планшетах в помещении, которое имело стандартное освещение, температуру воздуха 18 – 20° С и изоля-

цию от посторонних шумов. Иммобилизация осуществлялась в течение 9 ч, после чего крысу декапитировали. Перед моделированием стресса крысы 24 ч голодали в условиях свободного доступа к воде. Исследуемое вещество вводили однократно внутрибрюшинно через 10 мин после начала иммобилизации в дозе 2 мг/кг в объеме жидкости 0,5 мл/100 г массы. Контрольную группу составили крысы, находящиеся в стандартных клетках в режиме голодания и свободного доступа к воде в течение (24 + 9) ч. Определяли массу тимуса, селезенки, надпочечников, их массовые индексы в мг/кг по формуле “Индекс органа = ($m_{\text{органа}} / m_{\text{тела}}$)”, наличие и количество язв слизистой оболочки желудка.

У крыс определяли концентрацию малонового диальдегида (МДА) в сердце и легких по реакции с тиобарбитуровой кислотой. Навеску ткани органа (500 мг — для легкого и 250 мг — для сердца) измельчали при 0° С и гомогенизировали в 3 мл буферного раствора (0,025 М трис-НСl, 0,175 М КСl; рН 7,4). 2,5 мл гомогената помещали в центрифужные пробирки и осаждали белок путем добавления 1 мл 17 % раствора трихлоруксусной кислоты. Образующийся осадок отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 4000 g. Надосадочную жидкость по 2 мл переносили в пробирки, добавляя по 1 мл 0,08 % водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты и помещали пробы на 10 мин в кипящую водяную баню. В качестве контроля использовали пробы, содержащие вместо супернатанта буферный раствор (рН 7,4). После развития розовой окраски пробы охлаждали до 18 – 20° С и измеряли оптическую плотность при 532 нм (КФК-3, кювета с длиной хода луча 1 см) против контрольной пробы. Количество малонового диальдегида рассчитывали, используя величину молярного коэффициента экстинкции $e = 156000 \text{ л/см} \cdot \text{моль}$. Полученный результат выражали в нмолях на пробу [4].

Глюкокортикоидзависимую гипоплазию лимфоидных органов и надпочечников вызывали путем однократного введения кеналага подкожно крысам в дозе

¹ Кафедра фармакологии (зав. — проф. К. М. Резников) Воронежской государственной медицинской академии им. Н. Н. Бурденко, Воронеж, 394000, ул. Студенческая, 10.

2 мг/кг (контрольной группе интактных животных вводили идентичный объем 0,9 % раствора NaCl). Через 15 мин, 24, 36, 72 ч всем животным вводили подкожно исследуемое соединение ПВ-174 в дозе 2 мкг/кг или (группам “контроль” и “каналог”) 0,9 % раствор NaCl в объеме 1 мл/кг. Через 96 ч после начала опыта крыс забивали декапитацией под легким эфирным наркозом и определяли у них массу тимуса, селезенки и надпочечников.

Все опыты выполняли на сериях по 6 животных в каждой. Полученные данные обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате иммобилизации у крыс наблюдали снижение массового индекса тимуса на 23 %, уменьшение массы селезенки на 6 %, увеличение массы надпочечников на 30 %, а также формирование макроскопически различимых геморрагически-язвенных дефектов слизистой оболочки желудка (табл. 1). Последнее выявлялось в 100 % случаев; количество язв варьировало от 5 до 11 и в среднем составляло 7,4 язвы на одно животное. Использование соединения ПВ-174 нормализовывало показатели массы селезенки, тимуса и надпочечников, количество язв снижалось до 1,8 на животное и встречалось у 83,3 % крыс.

Эмоционально-болевым стресс сопровождался резким усилением процессов перекисного окисления липидов: количество МДА в сердце возрастало в 2,4 раза, в легких — в 1,2 раза. Использование исследуемого вещества приводило к снижению количества МДА. Так, в сердце его количество составило 77,4 % от группы со стрессом, в легких соединение блокиро-

вало вызываемое стрессом увеличение количества МДА, нормализуя данный показатель.

Тимико-лимфатическая инволюция, наблюдаемая нами при стрессе, развивается вследствие действия эндогенных кортикоидов, концентрация которых при эмоционально-болевым стрессе повышена. Уменьшение изменений тимуса, селезенки и надпочечников на фоне соединения ПВ-174 может наблюдаться как за счет снижения реакции организма на стимуляцию кортикоидными гормонами, так и за счет уменьшения выделения кортикостероидов под действием соединения. Поэтому в отдельных сериях опытов было исследовано влияние вещества ПВ-174 на эффекты экзогенного глюкокортикоида каналого.

Как следует из полученных данных (табл. 2), на фоне каналого наблюдалось умеренное замедление роста животных — прибавка в массе у крысят была в два раза меньше по сравнению с контрольной группой. Глюкокортикоид вызывал гипоплазию тимуса (снижение массы втрое, $p < 0,01$) и надпочечников (снижение массы на 30 %, $p < 0,05$). Достоверных изменений массы селезенки в наших опытах зафиксировано не было.

На фоне применения соединения ПВ-174 зарегистрировано отчетливое усиление катаболического действия каналого — крысята не только не прибавляли в массе, но и худели на 6–8 % от исходного. Гипоплазию тимуса и состояние селезенки введение исследуемого вещества не изменяло. Соединение ПВ-174 частично блокировало гипоплазию надпочечников, вызываемую каналогом.

Тимус — орган, гипоплазия которого при стрессе наиболее кортикоидзависима [2, 8]. Отсутствие блокады действия каналого на тимус соединением ПВ-174

Таблица 1. Состояние крыс при стрессе и его коррекция веществом ПВ-174 ($n = 6$)

| Показатель | Контроль | Стресс | Стресс + ПВ-174 |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|-----------------|
| Изменение массы крысы, г | – 2,5 ± 2,5 | – 4,83 ± 0,05 | – 5,03 ± 0,09 |
| Масса тимуса, мг | 275,5 ± 11,9 | 199,4 ± 18,5 | 236,3 ± 13,9 |
| Массовый индекс тимуса, мг/г | 2,492 ± 0,109 | 2,076 ± 0,063* | 2,367 ± 0,156 |
| Масса тимуса, % от контроля | 100 | 83,3 | 94,9 |
| Масса селезенки, мг | 443,5 ± 65,7 | 283,4 ± 61,1 | 404,8 ± 18,1 |
| Массовый индекс селезенки, мг/г | 4,495 ± 0,747 | 2,989 ± 0,690 | 4,065 ± 0,118 |
| Масса селезенки, % от контроля | 100 | 66,5 | 90,4 |
| Масса надпочечников, мг | 34,8 ± 5,0 | 38,4 ± 2,7 | 36,9 ± 4,4 |
| Массовый индекс надпочечников, мг/г | 0,299 ± 0,019 | 0,400 ± 0,021** | 0,372 ± 0,050 |
| Масса надпочечников, % от контроля | 100 | 134,8 | 124,4 |
| Наличие язв, % | 0 | 100 | 83,3 |
| Количество язв на 1 животное | 0 | 7,4 ± 1,3 | 1,8 ± 1,1 |
| МДА миокарда: | | | |
| нмоль/проба | 280,28 ± 0,33 | 672,88 ± 6,60** | 520,78 ± 2,03* |
| % от контроля | 100 | 240,1 | 185,8 |
| МДА легких | | | |
| нмоль/проба | 463,84 ± 3,08 | 569,66 ± 3,89** | 449,02 ± 5,62 |
| % от контроля | 100 | 122,8 | 96,8 |

Примечание. Отличия от контроля достоверны: * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Таблица 2. Влияние соединения ПВ-174 на эффекты кеналог у крыс ($n = 6$)

| Показатель | Контроль | Кеналог | Кеналог + ПВ-174 |
|-------------------------------------|-----------------|---------------|------------------|
| Масса животных, % от исходного | 116,2 ± 3,1 | 108,4 ± 3,8 | 94,4 ± 2,1** |
| Изменение массы животных, г | + 18,0 ± 3,2 | + 9,5 ± 4,5 | - 6,9 ± 2,8* |
| Масса тимуса, мг | 276,4 ± 22,6** | 87,6 ± 10,7 | 87,3 ± 5,4 |
| Массовый индекс тимуса, мг/г | 2,138 ± 0,190** | 0,744 ± 0,129 | 0,804 ± 0,054 |
| Масса тимуса, % от контроля | 100 | 34,8 | 37,6 |
| Масса селезенки, мг | 462,0 ± 9,5 | 422,8 ± 48,7 | 403,9 ± 28,6 |
| Массовый индекс селезенки, мг/г | 3,559 ± 0,127 | 3,527 ± 0,502 | 3,670 ± 0,057 |
| Масса селезенки, % от контроля | 100 | 99,1 | 103,1 |
| Масса надпочечников, мг | 37,0 ± 3,3** | 24,2 ± 2,2 | 27,2 ± 1,7 |
| Массовый индекс надпочечников, мг/г | 0,286 ± 0,028* | 0,201 ± 0,025 | 0,248 ± 0,011 |
| Масса надпочечников, % от контроля | 100 | 70,3 | 86,7 |

Примечание. Отличия от группы “Кеналог” достоверны: * — $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

свидетельствует об отсутствии прямого антагонизма между этими соединениями.

Снижение гипоплазии надпочечников при действии кеналог на фоне вещества ПВ-174, по-видимому, достигается за счет разрыва обратной связи в системе “гипоталамус — гипофиз — надпочечники”. Это может быть реализовано как через влияние на надпочечники, так и через центральные механизмы. Увеличение массы надпочечников и стимуляция синтеза собственных глюкокортикоидов за счет влияния на клетки коры надпочечников приводила бы к увеличению язвообразования на фоне стресса, чего не наблюдается. Следовательно, возможная точка приложения исследуемых веществ на данной модели — ЦНС.

ВЫВОД

Соединение ПВ-174 обладает стресс-лимитирующим эффектом на модели иммобилизационного стресса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. М. Белкина, Д. Д. Мациевский, Ф. З. Меерсон, *Бюл. экпер. биол.*, № 6, 35 – 38 (1983).
2. П. П. Голиков, *Рецепторные механизмы глюкокортикоидного ответа*, Медицина, Москва (1998).
3. М. Г. Пшенникова, *Пат. физиол. и экпер. тер.*, № 4, 28 – 40 (2001).
4. И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, *Современные методы в биохимии*, Москва (1976), сс. 66 – 69.
5. О. В. Филиппова, А. Л. Лавренов, *Новости клинической цитологии России*, 6(1 – 2), 46 – 49 (2002).
6. M. Cebelin and C. S. Hirsch, *Hum. Pathol.*, **11**, 123 – 132 (1980).
7. J. J. Morris, C. M. O'Connor, and J. A. Blumental, *J. A. M. A.*, **275**(21), 1651 – 1656 (1996).
8. A. Munck, P. M. Cuyre, and N. J. Holbrook, *Endocrine Rev.*, **5**, 25 – 44 (1984).

Поступила 27.04.04

STRESS-LIMITING PROPERTIES OF A NEW TETRAHYDROPYRROLOPYRAZINE DERIVATIVE

O. V. Filippova

Pharmacology Department, Voronezh State Medical Academy, Studencheskaya ul. 10, Voronezh, 394000 Russia

The effect of compound PV-174, selected from a series of tetrahydropyrrolopyrazine derivatives was studied on a model of immobilization stress in rats. Pretreatment with PV-174 decreases the stress-induced involution of thymus and spleen, hypertrophy of epinephrosis, and gastric ulceration. The drug also blocks the stress-enhanced lipid peroxidation in lungs and myocardium, while not influencing the effect of kenalog (an exogenous glucocorticoid). It is suggested that one of the possible mechanisms of the antistressor effect of PV-174 is related to the drug action upon CNS.