

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

А.А.Дьяков, В.Н.Перфилова, И.Н.Тюренков

### ПРОТИВОАРИТМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ

Пятигорская Государственная фармацевтическая академия, Волгоградский Государственный медицинский университет

*С целью изучения противоаритмических свойств феруловой кислоты на четырех экспериментальных моделях аритмий (повреждение изолированного, спонтанно сокращающегося сердца пероксидом водорода, реперфузионной, аконитиновой и хлоридкальциевой) выполнены опыты на изолированных сердцах и белых крысах линии Вистар.*

**Ключевые слова:** феруловая кислота, реперфузионные аритмии, аконитиновые аритмии, хлоридкальциевые аритмии, пероксид водорода, перекисное окисление липидов

*To study antiarrhythmic properties of ferulic acid on four experimental models of arrhythmia (damage of isolated spontaneously contracting heart by hydrogen peroxide; reperfusion, aconitin, and calcium-chloride arrhythmias), the experiments were made on isolated rat hearts and Wistar rats.*

**Key words:** ferulic acid, reperfusion arrhythmias, aconitin arrhythmias, calcium-chloride arrhythmias, hydrogen peroxide, lipid peroxidation.

Феруловая кислота (ФК) (3-гидрокси-4-метокси-фенилпропеновая кислота) является широко распространенным природным соединением растительного происхождения. В растениях ФК образуется в результате метаболизма фенольных аминокислот - фенилаланина и тирозина [8]. Обладая широким спектром биологической активности и низкой токсичностью, ФК служит активным компонентом некоторых растительных лекарственных препаратов, использующихся в традиционных китайской и японской медицине [7, 11, 14, 15, 17, 20, 23].

Анализ литературных данных показал наличие у ФК противовоспалительной [10, 11, 15, 16, 17], антиаллергической [11, 25], антиагрегантной [22, 24], противоопухолевой [12, 19], антиоксидантной [21, 23], гепатопротекторной [13, 23], антибактериальной [6], противовирусной [9, 20] и другой активности. Фармакологические эффекты ФК обусловлены, в большей степени, ее мощным антиоксидантным действием [5] - торможением процессов перекисного окисления липидов в биомембранах, а также влиянием на активность мембраносвязанных ферментов, ингибированием свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов и лейкотриенов, катализируемых циклооксигеназой и липооксигеназой, а также посредством блокирования специфических рецепторов медиаторов воспаления.

В патогенезе ишемического и стрессорного повреждения миокарда и связанных с ними аритмий существенную роль играет усиление процессов перекисного окисления липидов, изменение реологических свойств крови, а также воспалительные процессы, связанные с инфильтрацией нейтрофилов и макрофагов в очаг ишемии [4]. Исходя из изложенного, можно предполагать, что ФК будет оказывать кардиопротекторное действие при ишемическом, аритмогенном и стрессорном воздействии на сердце.

В этой связи, целью настоящего исследования являлось изучение противоаритмических свойств феруловой кислоты на различных моделях нарушений сердечного ритма.

© А.А.Дьяков, В.Н.Перфилова, И.Н.Тюренков

### МАТЕРИАЛИ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Антиаритмическое действие ФК изучали на четырех экспериментальных моделях аритмий: повреждение изолированного спонтанно сокращающегося сердца пероксидом водорода, реперфузионной, аконитиновой и хлоридкальциевой моделях аритмий.

В первой серии экспериментов перфузию изолированного сердца осуществляли по методу Лангендорфа [3]. Через 1 мин. от начала перфузии сердца подогретым до 37 °С раствором Рингера-Локка к его верхушке прикрепляли крючок, соединенный с индуктивным датчиком. Датчик через электронный преобразователь соединялся с самописцем (КСП-4). Таким образом осуществляли регистрацию механограммы перфузируемого сердца. Сердца животных группы интактного контроля перфузировались раствором Рингер-Локка, без добавления перекиси водорода. Аритмию изолированного спонтанно сокращающегося сердца в группах негативного контроля (n=12) и опытной (n=12) вызывали добавлением в перфузионный раствор пероксида водорода до концентрации 0,025%. ФК в концентрации 10<sup>-3</sup> моль/л добавляли в перфузат за 5 мин до воздействия на сердце пероксидом водорода (ФК синтезирована на кафедре органической химии пятигорской государственной фармацевтической академии).

Во второй серии экспериментов моделировали окклюзию (10 мин) с последующей реперфузией нисходящей ветви левой коронарной артерии сердца [3, 18]. Эксперименты проводились на наркотизированных (этамилал натрия 40 мг/кг, внутривенно) белых крысах линии Вистар. После интубации трахеи и перевода животных на искусственную вентиляцию легких по 4-5 межреберью производили левостороннюю торакотомию и перевязку передней нисходящей ветви левой коронарной артерии на уровне нижнего края ушка левого предсердия. Антиаритмическое действие феруловой кислоты оценивали по ее влиянию на время начала, длительность и тяжесть аритмий, количество летальных исходов. Арит-

мии регистрировали при помощи векторэлектрокардиооскопа (ВЭКС-1п) и электрокардиографа (ЭКГ Т-03М) с использованием игольчатых электродов на ЭКГ во II стандартном отведении. Первой группе животных (n=6) ФК вводили внутривенно за 30 мин до начала окклюзии коронарной артерии в дозе 30 мг/кг. Вторая группа (n=6) в качестве препарата сравнения получала обзидан внутривенно за 30 мин до перевязки коронарной артерии (в латеральную вену хвоста) в дозе 0,25 мг/кг. Контрольной группе животных вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентных количествах.

Аконитиновую аритмию вызывали у крыс непрерывной дозированной внутривенной (в наружную яремную вену) инфузией аконитина (2 мкг/0,1 мл/мин) при помощи насоса Lineomat (Германия). Противоаритмическое действие веществ оценивали по времени начала экстрасистолии, времени начала фибрилляции и времени наступления полной остановки сердца [2]. Эксперименты проводились на 36 белых крысах линии Вистар массой 200-240 г. Животным контрольной группы за 10 мин до инфузии аконитина вводили физиологический раствор. В качестве препарата позитивного контроля применяли новокаинамид в дозе 40 мг/кг. ФК вводили внутривенно в дозах 10, 30 и 60 мг/кг.

Хлоркальциевую аритмию индуцировали внутривенным (в латеральную вену хвоста) быстрым (1-2 сек) введением хлористого кальция по 0,2 мл 10% раствора на 100 г. массы тела животного [1]. Эксперименты проводили на 40 белых крысах линии Вистар массой 200-220 г, наркотизированных этаминалом натрия в дозе 40 мг/кг. Контрольной группе животных внутривенно (в латеральную вену хвоста) вводили изотонический раствор хлорида натрия в эквивалентных количествах за 30 мин до инфузии хлористого кальция. ФК вводили внутривенно в дозах 10, 30 и 60 мг/кг, соответственно, за 30 мин до инфузии хлористого кальция. В качестве препарата положительного контроля использовали верапамил 0,25 мг/кг.

### ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Интактное, перфузируемое раствором Рингера-Локка, изолированное сердце в течение 90 мин сокращалось практически без изменения частоты и силы сердечных сокращений. В группе негативного контроля в результате воздействия пероксида водорода в изолированном сердце возникали фазные изменения сократительной функции. В первые 1-2 мин происходило увеличение силы и частоты сердечных сокращений. В последующие 3-5 минут учащение сердечного ритма сменялось урежением и появлением экстрасистолии (в среднем 25 экстрасистол в течение 4 мин). В третьей фазе изменений сократительной активности, длившейся 2-3 мин, нарастала брадиаритмия с переходом к редким беспорядочным сокращениям, которые заканчивались полной остановкой сердца. В данной серии экспериментов в 10 случаях из 12 наблюдалась остановка сердца в течение 10 минут перфузии раствором Рингера-Локка, содержащим пероксид водорода.

В серии наблюдений, в которых изолированные сердца за 5 мин. до и в течение 10 мин. воздействия пероксидом водорода перфузировались раствором ФК ( $10^{-3}$  моль/

л) в первую фазу изменений сократительной активности (длительностью 1-2 мин) так же отмечалось увеличение частоты и силы сердечных сокращений. Затем наступала вторая фаза продолжительностью 5-7 мин, которая сопровождалась умеренной брадикардией и редкими экстрасистолами (5-8 в одном опыте). Вторая фаза обычно заканчивалась восстановлением исходных параметров механограммы (частоты и силы сердечных сокращений). В этой серии опытов в результате 10 минутного воздействия пероксидом водорода только в одном из 12 случаев наблюдалась остановка сердца.

В группе негативного контроля в результате воздействия пероксидом водорода быстро, уже в течение 1 минуты и в последующем на 72% уменьшалась скорость коронарной перфузии. В группе с ФК при добавлении пероксида водорода в перфузат скорость коронарной перфузии так же уменьшалась, но значительно менее выражено в сравнении с контрольной группой и составляла около 49% от исходной величины, до воздействия пероксида водорода.

На реперфузионной модели аритмии во всех группах начинались через 6-15 секунд после начала реперфузии миокарда, однако, длительность и тяжесть аритмии существенно отличалась. В контрольной группе постишемическая реперфузия у всех животных вызывала желудочковую тахикардию общей длительностью  $77 \pm 13$  с. и фибрилляцию желудочков длительностью  $19 \pm 5$  с. Период регистрации аритмий при реперфузии в этой группе составил  $166 \pm 22$  с. Реперфузия привела к необратимой остановке сердца у 2-х животных из 6-ти. В группе животных, получавших ФК, нарушения ритма при реперфузии регистрировались в течение 1 мин. после снятия окклюзии коронарной артерии чаще всего в виде желудочковой тахикардии общей длительностью  $34 \pm 3$  с. У 3 животных из 6 была зарегистрирована фибрилляция желудочков длительностью  $4 \pm 0,1$  с. В этой группе период регистрации аритмий, индуцированных реперфузией нисходящей ветви левой коронарной артерии, был значительно меньше чем у контрольных животных  $58 \pm 8$  с. ( $p < 0,01$ ). В группе с ФК не было зарегистрировано случаев остановки сердца при реперфузионном повреждении сердца. У животных, получавших обзидан, аритмии, вызванные реперфузией коронарной артерии, наблюдались в течение 1 мин. после снятия лигатуры, так же как и в группе животных, получавших ФК. При этом у 5 животных из 6 была зарегистрирована желудочковая тахикардия длительностью  $23 \pm 5$  с. ( $p < 0,02$  в сравнении с контролем) и у 2 животных наблюдалась кратковременная фибрилляция желудочков (длительностью  $3 \pm 0,1$  с.). В данной группе общее время регистрации аритмий при реперфузии нисходящей ветви левой коронарной артерии, так же как и в группе животных, получавших ФК, было значительно короче чем у контрольных животных и составляло  $54 \pm 11$  с. ( $p < 0,01$ ).

ФК в дозах 10, 30 и 60 мг/кг практически не влияла на течение аритмий, вызванных внутривенной инфузией аконитина и хлористого кальция у крыс.

Антиаритмическое действие ФК на используемых моделях нарушения сердечного ритма связано, вероятно, с ее антиоксидантной и антигипоксической активностью. На моделях аритмий, вызванных избыточным по-

ступлением в клетки проводящей системы сердца и в кардиомиоциты  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  ФК не предупреждает и не уменьшает аритмии, вызванные аконитином и хлоридом кальция.

Индукция процессов перекисного окисления липидов при перфузии сердца пероксидом водорода, и реперфузии миокарда приводит к снижению электрической стабильности сердца. Благодаря наличию в структуре молекулы ФК углеродной цепи, содержащей двойную связь (остаток пропеновой кислоты) и гидроксильной группы в фенильном ядре, она легко вступает в свободно-радикальные реакции с образованием стабильного, слабо реакционно-способного феноксильного радикала, т.е. способствует терминции цепных свободно-радикальных реакций, является высокоэффективной ловушкой свободных радикалов [8]. Подавляя процессы перекисного окисления липидов, ФК выступает в качестве мембранопротектора, предупреждает нарушения активности  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, предотвращает нарушение электрической стабильности плазматической мембраны и выключает таким образом главные звенья патогенеза аритмий, оказывая антиаритмическое действие.

## ВЫВОДЫ

1. Феруловая кислота в концентрации  $10^{-3}$  моль/л в перфузионном растворе уменьшала тяжесть аритмий и предотвращала остановку изолированного сердца крысы, вызванных перфузией их 0,025% раствором пероксида водорода. Кардиопротекторный эффект феруловой кислоты в описанных условиях, вероятно, обусловлен торможением усиления процессов перекисного окисления липидов в мембранах кардиомиоцитов, а так же частичным предупреждением уменьшения скорости коронарной перфузии во время воздействия пероксида водорода на сердце.
2. Феруловая кислота в дозе 30 мг/кг обладает выраженным антиаритмическим эффектом при постишемической реперфузии миокарда. Противоаритмическое действие феруловой кислоты в данных экспериментальных условиях сопоставимо с антиаритмическим эффектом  $\beta$ -адреноблокатора обзидана.
3. Феруловая кислота не предупреждает нарушения ритма, вызванные активацией натриевых и кальциевых каналов, т.е. введением аконитина и хлорида кальция.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гацур В.В., Саратиков А.С. Фармакологические агенты в экспериментальной медицине и биологии. Томск: Изд-во ТГУ, 156 с. (1977).
2. Каверина Н.В., Бердяев С.Ю., Кишук Е.Н., Пасхина О.Е. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. /Под ред. В.П. Фисенко. М.: Римвидум, С. 209-216, (2000).
3. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия. – М.: Медицина, 344 с. (1971).
4. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам. – М.: Медицина. с. 253, (1988).
5. Огурцов Ю.А. Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых, посвященная 70-летию декрета о национализации аптек. Тез. докл. Куйбышев. С. 208, (1988).
6. Binutu O.A., Adesogan K.E., Okogun J.I. *Planta-Med.* Vol. 62, N 4. P. 352-353, (1996).
7. Chen K.J., Chen K. *Chin. Med. J. Engl.* Vol. 105, N 10. P. 870-3, (1992).
8. Graf E. *Free Radic. Biol. Med.* Vol 13, N 4. P. 435-448, (1992).
9. Edeas M., Khalfoun Y., Lazizi Y., Vergnes L., Labidalle S., Postaire E., Lindenbaum A. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* Vol. 189, N 3. P 367-373 (1995).
10. Hammond B., Kontos H., Hess M. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* Vol. 63. – P. 173-187, (1985).
11. Hirabayashi T., Ochiai H., Sakai S., Nakajima K., Terasawa K. *Planta. Med.* Vol. 61, N 3. P. 221-226, (1995).
12. Kaul A., Khanduja K.L. *Nutr. Cancer.* Vol. 32, N 2. P. 81-85, (1998).
13. Kuenzig W., Chau J., Norkus E., Holowaschenko H., Newmark H., Mergens W., Conney A.H. *Carcinogenesis.* Vol. 5. P. 309-313, (1984).
14. Lu Y., Xu C., Yang Y., Pan H. *Zhongguo. Yi. Xue. Ke.Xue. Yuan.Xue.Bao.* Vol. 20, N 1. P. 44-48, (1998).
15. Ozaki Y. *Chem. Pharm. Bull. Tokyo.* Vol. 40, N 4. P. 954-956, (1992).
16. Sakai S., Ochiai H., Nakajima K., Terasawa K. *Cytokine.* Vol 9, N 4. P. 242-248, (1997).
17. Sakai S., Kawamata H., Kogure T., Mantani N., Terasawa K., Umatake M., Ochiai H. *Mediators Inflamm.* Vol. 8, N 3. P. 173-175, (1999).
18. Selye H., Bajusz E., Grosso S., Mendell P. *Angiology.* Vol. 11. P. 398 - 407 (1960).
19. Tanaka T., Kojima T., Kawamori T., Wang A., Suzui M. Okamoto K., Mori H. *Carcinogenesis.* Vol. 14, N 7. P. 1321-1325, (1993).
20. Tawata S., Taira S., Kobamoto N., Zhu J., Ishihara M., Toyama S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Vol. 60, N 5. P. 909-910, (1996).
21. Wang H., Peng R.X. *Chung. Kuo. Yao.Li.Hsueh.Pao.* Vol. 15, N 1. P. 81-83, (1994).
22. Wang Z., Gao YH, Huang RS, Zhu G.Q. *Zhongguo. Yao. Li.Xue.Bao.* Vol. 9. P. 430-433, (1988).
23. Wu D.F., Peng R.X., Wang H. *Yao.Xue.Xue.Bao.* Vol. 30, N 11. P. 801-805, (1995).
24. Xu J., Li Y.K., Liang Z.J. *Chung. Kuo. Chung. Yao. Tsa.Chin.* Vol. 17, N 11. P. 680-682, 703-704, (1992).
25. Zhouen Z., Side Y., Weizhen L., Wenfeng W., Yizun J., Nianyun L. *Free Radic. ResVol.* Vol. 29, N 1. P. 13-16, (1998).

## ПРОТИВОАРИТМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ФЕРУЛОВОЙ КИСЛОТЫ

*А.А.Дьяков, В.Н.Перфилова, И.Н.Тюренков*

Феруловая кислота (ФК) является широко распространенным природным соединением растительного происхождения. Фармакологические эффекты ФК обусловлены, в большей степени, ее мощным антиоксидантным действием - торможением процессов перекисного окисления липидов в биомембранах, а также влиянием на активность мембраносвязанных ферментов, ингибированием свободнорадикальных стадий синтеза простагландинов и лейко-

риенов, катализируемых циклооксигеназой и липооксигеназой, а также посредством блокирования специфических рецепторов медиаторов воспаления. В этой связи, целью настоящего исследования являлось изучение противоаритмических свойств феруловой кислоты на различных моделях нарушений сердечного ритма.

Антиаритмическое действие ФК изучали на четырех экспериментальных моделях аритмий: повреждение изолированного спонтанно сокращающегося сердца пероксидом водорода, реперфузионной, аконитиновой и хлорид-кальциевой моделях аритмий. В первой серии экспериментов перфузию изолированных сердец крыс осуществляли по методу Лангендорфа, аритмию вызывали добавлением в перфузионный раствор пероксида водорода до концентрации 0,025%. ФК в концентрации  $10^{-3}$  моль/л добавляли в перфузат за 5 мин до воздействия на сердце пероксидом водорода. Во второй серии экспериментов моделировали окклюзию (10 мин) с последующей реперфузией нисходящей ветви левой коронарной артерии сердца белых крыс линии Вистар. Аконитиновую аритмию вызывали у крыс непрерывной дозированной внутривенной инфузией аконитина, хлоркальциевую - внутривенным быстрым (1-2 сек) введением хлористого кальция.

ФК в концентрации  $10^{-3}$  моль/л в перфузионном растворе уменьшала тяжесть аритмий и предотвращала остановку изолированного сердца крысы, вызванных перфузией их 0,025% раствором пероксида водорода. Кардиопротекторный эффект ФК в описанных условиях, вероятно, обусловлен торможением усиления процессов перекисного окисления липидов в мембранах кардиомиоцитов, а так же частичным предупреждением уменьшения скорости коронарной перфузии во время воздействия пероксида водорода на сердце. ФК в дозе 30 мг/кг обладает выраженным антиаритмическим эффектом при постишемической реперфузии миокарда. Противоаритмическое действие феруловой кислоты в данных экспериментальных условиях сопоставимо с антиаритмическим эффектом  $\beta$ -адреноблокатора обзидана. ФК не предупреждает нарушения ритма, вызванные активацией натриевых и кальциевых каналов, т.е. введением аконитина и хлорида кальция.

#### ANTIARRHYTHMIC EFFECT OF FERULIC ACID

*A.A. D'yakov, V.N. Perfilova, I.N. Tyurenkov*

Ferulic acid is a widespread compound of vegetal origin. The pharmacological effects of ferulic acid are primarily caused by its pronounced antioxidant effect, namely by inhibition of lipid peroxidation in biological membranes as well as due to its effect on the activity of membrane-bound enzymes and inhibition of free-radical stages of synthesis of prostaglandins and leukotrienes catalyzed by cyclooxygenase and lipoxygenase and also via blockade of specific receptors of inflammatory neurotransmitters. In this connection, the study purpose was to study antiarrhythmic properties of ferulic acid in different models of cardiac arrhythmias.

The antiarrhythmic effect of ferulic acid was studied using 4 following experimental models of arrhythmias: damage of isolated spontaneously contracting heart with hydrogen peroxide, as well as reperfusion, aconitine, and calcium-chloride arrhythmic models. In the first series of experiments, the isolated rat heart was perfused according to Langendorf technique; arrhythmia was caused by addition of hydrogen peroxide into perfusing solution up to the concentration of 0.025%. Ferulic acid in a concentration of 1 mmol/L was added to perfusing solution 5 minutes prior to hydrogen peroxide administration. In the second series of experiments, the 10-minute occlusion of the left descending coronary artery of Wistar rats was carried out. Aconitin arrhythmia was produced in rats by continuous intravenous infusion of aconitin; Calcium-chloride arrhythmia, by intravenous bolus injection (for 1-2 sec) of calcium chloride.

Ferulic acid at the concentration in perfusate 1 mmol/L reduced the severity of arrhythmia and prevented the arrest of isolated rat heart caused by perfusing them by 0.025% solution of hydrogen peroxide. The cardioprotective effect of ferulic acid under aforementioned conditions is possibly caused by inhibition of an increase in lipid peroxidation and cardiomyocyte membranes as well as by a partial prevention of decrease in coronary perfusion velocity during the heart perfusion with hydrogen peroxide solution. Ferulic acid in a dose of 30 mg/kg shows a considerable antiarrhythmic effect in post-ischemic myocardial reperfusion. The antiarrhythmic effect of ferulic acid under the experimental conditions is similar to that of a  $\beta$ -blocker, propranolol. Ferulic acid does not prevent arrhythmias caused by activation of sodium and calcium channels, i.e. by administration of aconitine and calcium chloride.