

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 616.12-092.9:615.22

Прямое сравнение инфаркт-лимитирующих и гемодинамических эффектов различных ингибиторов некроптоза на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы

Ю. В. Дмитриев¹, С. М. Минасян¹, М. М. Галагудза^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Дмитриев Юрий Валерьевич,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com

Статья поступила в редакцию
02.10.18 и принята к печати 20.10.18.

Резюме

Цель исследования — оценка влияния различных ингибиторов некроптоза на морфофункциональное состояние миокарда на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 38 крысах стока Wistar. Животные были разделены на следующие группы: 1) контроль ($n = 7$), 2) диметилсульфоксид (ДМСО) ($n = 7$), 3) некростатин-1s ($n = 6$), 4) некросульфонамид ($n = 6$), 5) некростатин-5 ($n = 6$), 6) некростатин-1 ($n = 6$). Ингибиторы некроптоза после предварительного растворения в ДМСО вводились путем внутрибрюшинной инъекции за 1 час до начала эксперимента. В качестве консервирующего раствора использовался охлажденный до 4 °C Кустодиол. Функциональное состояние миокарда оценивалось путем непрерывной регистрации давления в левом желудочке, частоты сердечных сокращений и скорости коронарного потока. Морфологические изменения в миокарде оценивались по размеру зоны некроза миокарда, измеренной планиметрически по окончании 8-часовой глобальной ишемии (4 °C) и 2-часовой реперфузии *ex vivo*. **Результаты.** Все исследованные ингибиторы некроптоза значительно улучшали морфофункциональное состояние миокарда, что проявилось в уменьшении размера некроза миокарда в группах ингибиторов некроптоза по сравнению с группами контроля и ДМСО. Так, в группах некросульфонамида и некростатина-1s размер зоны некроза миокарда составил $31 \pm 8,7\%$ и $27 \pm 8,2\%$ соответственно; в группах некростатина-5 и некростатина-1 — $37 \pm 9,2\%$ и $34 \pm 7,8\%$ соответственно, что существенно меньше, чем в группах контроля и ДМСО ($58 \pm 8,6\%$ и $60 \pm 7,6\%$ соответственно; $p < 0,05$). Также в группах ингибиторов некроптоза в периоде реперфузии регистрировалось более низкое диастолическое внутрижелудочковое давление, а также более высокие значения пульсового внутрижелудочкового давления и скорости коронарного потока, чем в группах контроля и ДМСО ($p < 0,05$). Значимых различий между различными ингибиторами некроптоза по выраженности их влияния на морфофункциональное состояние миокарда в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца выявить не удалось. **Выводы.** Все

ингибиторы некроптоза в равной степени улучшают морфофункциональное состояние миокарда при длительной холодовой консервации донорского сердца.

Ключевые слова: микроРНК 223, некроптоз, внутрижелудочковое давление, легочная артериальная гипертензия, гемодинамические эффекты, холодовая консервация донорского сердца, кардиопротекция, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, ингибиторы некроптоза

Для цитирования: Дмитриев Ю. В., Минасян С. М., Галагудза М. М. Прямое сравнение инфаркт-лимитирующих и гемодинамических эффектов различных ингибиторов некроптоза на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы. Артериальная гипертензия. 2018;24(5):581–585. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-5-581-585

Direct comparison of the infarct-limiting and hemodynamic effects of various necroptosis inhibitors in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart

Yu. V. Dmitriev¹, S. M. Minasian¹, M. M. Galagudza^{1,2}

¹ Almazov National Medical Research Centre, St Petersburg, Russia

² First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St Petersburg, Russia

Corresponding author:

Yuri V. Dmitriev,
Almazov National Medical
Research Centre,
2 Akkuratov street, St Petersburg,
197341 Russia.
E-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com

Received 2 October 2018;
accepted 20 October 2018.

Abstract

Objective. To investigate the effects of various necroptosis inhibitors on the morphological and functional characteristics of the myocardium in the model of prolonged cold preservation of the donor rat heart. **Design and methods.** Thirty eight Wistar rats were divided into the following groups: 1) control (n = 7), 2) dimethylsulfoxide (DMSO) (n = 7), 3) necrostatin-1s (n = 6), 4) necrosulfonamide (n = 6), 5) necrostatin-5 (n = 6), 6) necrostatin-1 (n = 6). Necroptosis inhibitors were administered by intraperitoneal injection 1 hour prior to the start of the experiment, previously dissolved in DMSO. HTK solution cooled to 4 °C was used as a preservative solution. The functional state of the myocardium was assessed by continuous recording of intraventricular pressure, heart rate and coronary flow velocity. Morphological changes in the myocardium were assessed by the size of myocardial necrosis, measured planimetrically after the end of 8-hour ischemia and 2-hour reperfusion. **Results.** All investigated necroptosis inhibitors significantly improved the morphological and functional state of the myocardium, which manifested itself in a significantly smaller amount of myocardial necrosis in the groups of necroptotic inhibitors in comparison with control groups and DMSO. Thus, in the groups of necrosulfonamide and necrostatin-1s, myocardial necrosis size was $31 \pm 8,7\%$ and $27 \pm 8,2\%$, respectively; in necrostatin-5 and necrostatin-1 groups — $37 \pm 9,2\%$ and $34 \pm 7,8\%$, respectively, which is lower than in control groups and DMSO ($58 \pm 8,6\%$ and $60 \pm 7,6\%$, respectively, $p < 0,05$). Also, diastolic intraventricular pressure was lower and pulse intraventricular pressure and coronary flow velocity were higher during the reperfusion period in the groups of necroptosis inhibitors compared to control group and DMSO group ($p < 0,05$). We did not find any significant differences between necroptosis inhibitors regarding cardioprotective activity in the model of

prolonged cold preservation of the donor heart. **Conclusions.** All inhibitors of necroptosis equally improved the morphological and functional state of the myocardium in the model of prolonged static cold storage of the donor heart.

Key words: MIR-223, necroptosis, intraventricular pressure, pulmonary arterial hypertension, hemodynamic effects, cold preservation of the donor heart, cardioprotection, myocardial ischemia and reperfusion injury, necroptosis inhibitors

For citation: Dmitriev YuV, Minasian SM, Galagudza MM. Direct comparison of the infarct-limiting and hemodynamic effects of various necroptosis inhibitors in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2018;24(5):581–585. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-5-581-585

Введение

В настоящее время для пациентов с терминальной сердечной недостаточностью трансплантация сердца является единственным методом лечения, позволяющим улучшить прогноз и качество жизни. По данным Регистра Международного общества трансплантации сердца и легких, в мире ежегодно выполняется более 3800 трансплантаций сердца. Несмотря на мизерные по сравнению со странами Западной Европы и США объемы оперативных вмешательств в России, количество пересадок сердца увеличивается и в нашей стране. Ближайший и отдаленный прогноз у пациентов, подвергшихся пересадке сердца, определяется целым рядом факторов, а именно: морфофункциональным состоянием сердца донора, во многом определяющимся качеством защиты миокарда от глобальной ишемии, а также сложными иммунологическими процессами, возникающими в ответ на имплантацию чужеродной ткани в организм реципиента.

Одной из наиболее частых причин, приводящих к сердечной недостаточности, является ишемическое повреждение миокарда вследствие развития инфаркта миокарда с последующей недостаточностью насосной функции сердца. Активация механизмов программируемой клеточной гибели занимает центральное место в патогенезе ишемического реперфузионного повреждения миокарда. В серии исследований, проведенных нашим коллективом, были продемонстрированы кардиопротективные эффекты некростатина-1s (Nec-1s) и некросульфонамида (NSA) в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца крысы, а также подтверждены кардиопротективные эффекты ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы [1, 2]. Однако прямое сравнительное исследование кардиопротективной активности широкого ряда ингибиторов некроптоза в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца крысы никогда не проводилось.

Цель настоящего исследования — изучить влияние различных ингибиторов некроптоза на морфофункциональное состояние миокарда в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца крысы.

Материалы и методы

Все эксперименты были проведены в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных» (публикация Национального института здоровья, США, № 85–23) и одобрены локальным этическим комитетом.

Эксперименты выполнены на 38 крысах-самцах стока Wistar массой 250–350 граммов, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг. Животные были разделены на 6 групп: 1) контроль (Кон) (n = 7); 2) диметилсульфоксид (ДМСО) (n = 7); 3) NSA (n = 6); 4) Nec-1s (n = 6), 5) некростатин-5 (Nec-5) (n = 6), 6) некростатин-1 (Nec-1) (n = 6). Все животные за 1 час до эксперимента получили внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора (группа Кон), либо ДМСО (группа ДМСО), либо ингибитора некроптоза в ДМСО (группы NSA, Nec-1s, Nec-1 соответственно). Все ингибиторы некроптоза вводились внутрибрюшинно в дозе 1,65 мг/кг за 1 час до эксперимента. Изъятые из грудной полости сердца подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа. В стабилизационном периоде и в периоде реперфузии проводили непрерывную регистрацию пульсового и диастолического внутрижелудочкового давления, а также скорости коронарного потока. После 10-минутного периода стабилизации в сердце вводился охлажденный до 4 °C Кустодиол (НТК) на протяжении четырех минут. Далее сердца прекращали перфузировать на 8 часов с целью воспроизведения глобальной ишемии миокарда. Во время ишемии миокарда температура сердца поддерживалась на уровне 4 °C. По окончании 8-часового периода ишемии производилось возобновление перфузии оксигенированным раствором Кребса при температуре 37 °C. После 2-часовой реперфузии проводилась окраска срезов сердца в 1-процентном растворе трифенилтетра-

золия хлорида и расчет размера некроза миокарда. Результаты представлены в виде «среднее $\pm$ среднеквадратическое отклонение». Значимость различий в размере некроза миокарда оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни с использованием программы Statistica 10.0. Различия между группами по внутрисердечной гемодинамике оценивали с помощью ANOVA теста с использованием критерия Тьюки в программе SPSS 24 (IBM Inc.). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все исследованные ингибиторы некроптоза значимо улучшали морфофункциональное состояние миокарда, что проявилось в существенно меньшем размере некроза миокарда в группах ингибиторов некроптоза по сравнению с группами контроля и ДМСО. Так, в группах некротсульфонамида и некростатина-1s размер некроза миокарда составил $31 \pm 8,7\%$ и $27 \pm 8,2\%$ соответственно; в группах некростатина-5 и некростатина-1–37 $\pm 9,2\%$ и $34 \pm 7,8\%$ соответственно, что меньше, чем в группах контроля и ДМСО ($58 \pm 8,6\%$ и $60 \pm 7,6\%$ соответственно; $p < 0,05$) (рис. 1). В группах ингибиторов некроптоза в период реперфузии регистрировались более низкое диастолическое внутрижелудочковое давление, а также более высокие значения пульсового внутрижелудочкового давления и скорости коронарного потока, чем в группах контроля и ДМСО ($p < 0,05$). Значимых различий между различными ингибиторами некроптоза по выраженности их влияния на морфофункцио-

нальное состояние миокарда в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца выявить не удалось.

В последние годы большое внимание исследователей привлекает изучение механизмов развития и способы модуляции наиболее неблагоприятного вида клеточной гибели — некроптоза. Выявлены новые механизмы развития некроптотического поражения органов, в частности определено значение микроРНК, в частности микроРНК223–5p и –3p и микроРНК 103/107 в регулировании некроптоза миокарда в условиях ишемии-реперфузии, в частности, в регуляции постинфарктного ремоделирования миокарда [3–7]. Также установлено, что в условиях гипоксии нарушение регуляции уровня экспрессии антинекроптотической микроРНК 223 приводит к гипертрофии миокарда, преимущественно правого желудочка и структурным нарушениям в легочных артериях и легочной гипертензии [8]. Однако подавляющее количество исследований проводилось на моделях кратковременной ишемии-реперфузии миокарда. Редким исключением является работа А. Pavlovsky и соавторов (2014), в которой подавление некроптоза приводило к лучшей выживаемости клеток сердечного трансплантата, лучшему морфофункциональному состоянию миокарда и меньшей лейкоцитарной инфильтрации при экспериментальной трансплантации сердца [9].

Выводы

Таким образом, в нашей работе впервые проведено прямое сравнение инфарктомитирующих и гемодинамических эффектов различных ингибиторов некроптоза и продемонстрировано их эквивалентное по силе кардиопротективное действие в условиях длительной холодовой консервации донорского сердца крысы.

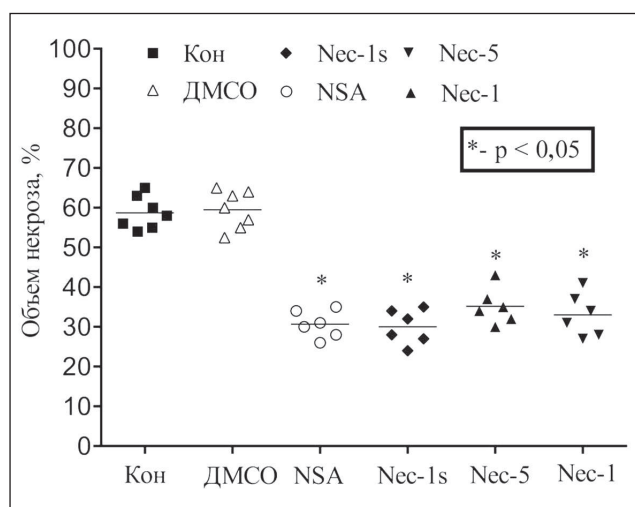
Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Financial support

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17–04–02061 «МикроРНК-223–5p и –3p-зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллогraftа при трансплантации донорского сердца». / The study is supported by the grant of the Russian Scientific Foundation № 17–04–02061 “MicroRNA-223–5p and –3p-dependent mechanisms of apoptosis in myocardium of allograft in donor heart transplantation”.

Рисунок 1. Объем некроза миокарда в экспериментальных группах



Примечание: Кон — контрольная группа; ДМСО — диметилсульфоксид; Nec-1s — некростатин-1s; NSA — некротсульфонамид; Nec-5 — некростатин-5; Nec-1 — некростатин-1; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем и ДМСО.

Список литературы / References

1. Дмитриев Ю. В., Минасян С. М., Демченко Е. А., Байрашева В. К., Галагудза М. М. Кардиопротективные эффекты некростатина 1s и некросульфонида на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы. Артериальная гипертензия. 2017;23(5):468–471. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-5-468-471> [Dmitriev YV, Minasian SM, Demchenko EA, Bayrasheva VK, Galagudza MM. Cardioprotective effects of necrostatin-1s and necrosulfonamide in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2017;23(5):468471. <https://doi.org/10.18705/1607419X-2017235-468471> In Russian].
2. Дмитриев Ю. В., Минасян С. М., Байрашева В. К., Демченко Е. А., Галагудза М. М. Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы. Бюллетень сибирской медицины. 2017;16(4):126–133. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2017-4-126-133> [Dmitriev YV, Minasian SM, Bayrasheva VK, Demchenko EA, Galagudza MM. Direct comparison of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors against global ischemia-reperfusion in the isolated rat heart. Bulletin of Siberian Medicine. 2017;16(4):126–133. doi:10.20538/1682-0363-2017-4-126-1333. In Russian].
3. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential in ischemic brain injury. Nat Chem Biol. 2005;1(2):116–119. doi:10.1038/nchembio711
4. Smith C, Davidson S, Lim S, Simpkin J, Hothersall J, Yellon D. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? Cardiovasc Drugs Ther. 2007;21(4):227–233. doi:10.1007/s10557-007-6035-1
5. Zhu H, Fan G. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. Cardiovasc Res. 2012;94(2):284–292. doi:10.1093/cvr/cvr291
6. Wang J, Zhang X, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao J et al. MicroRNA-103/107 regulate programmed necrosis and myocardial ischemia/reperfusion injury through targeting FADD. Circ Res. 2015;117(4):352–363. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.305781
7. Dmitriev YV, Minasian SM, Demchenko EA, Galagudza MM. Study of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors on isolated rat heart subjected to global ischemia-reperfusion. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2013;155(2):245–248. <https://doi.org/10.1007/s10517-013-2124-28>
8. Elia L, Condorelli G. MicroRNAs and pulmonary hypertension: a tight link. Cardiovasc Res. 2016;111(3):163–164. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw163>
9. Pavlovsky A, Lian D, Huang X, Yin Z, Haig A, Jevnikar A et al. RIPK3-mediated necroptosis regulates cardiac allograft rejection. Am J Transplant. 2014;14(8):1778–1790. doi:10.1111/ajt.12779

Информация об авторах

Дмитриев Юрий Валерьевич — научный сотрудник Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Минасян Саркис Минасович — старший научный сотрудник Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России; профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «СПбГМУ им. И. П. Павлова» Минздрава России.

Author information

Yuri V. Dmitriev, MD, Research Fellow, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Sarkis M. Minasian, MD, Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, DSc, Professor, Director, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre; Professor, Department of Pathophysiology, First Pavlov State Medical University of St. Petersburg.