

ISSN 1607-419X
ISSN 2411-8524 (Online)
УДК 616-089.843:599.323

Исследование внутрисердечной гемодинамики, инфаркт-лимитирующих эффектов и уровня микроРНК 223 при подавлении некроптоза на модели гетеротопической аллогенной трансплантации донорского сердца крысы

Ю. В. Дмитриев¹, Л. В. Васина², 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
06.12.18 и принята к печати 18.12.18.*

Резюме

Цель исследования — изучение влияния подавления некроптоза на морфофункциональное состояние миокарда и уровень микроРНК 223 в условиях гетеротопической аллогенной трансплантации донорского сердца крысы. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 20 крысах стока Wistar. Животные были разделены на следующие группы: 1) контроль ($n = 7$), 2) диметилсульфоксид (ДМСО) ($n = 6$), 3) некростатин-1s ($n = 7$). В качестве ингибитора некроптоза использовался некростатин-1s, который вводился внутривентрикулярно в растворе ДМСО за 1 час до начала эксперимента в дозе 1,65 мг/кг. В качестве консервирующего раствора использовался охлажденный до 4 °С Кустодиол. Спустя 2 часа после начала консервации донорского сердца производилась его трансплантация в брюшную полость животного-реципиента по схеме «аорта–аорта, легочная артерия — задняя полая вена». Через 3 часа параметры внутрисердечной гемодинамики донорского сердца оценивались путем регистрации давления в левом желудочке, частоты сердечных сокращений и скорости коронарного потока (СКП) на установке Лангендорфа. Уровень экспрессии микроРНК 223–5p и –3p в миокарде левого желудочка оценивался методом полимеразной цепной реакции. Уровень тропонина I в плазме крови оценивался методом иммуноферментного анализа. Размер некроза миокарда измерялся планиметрически по окончании эксперимента с помощью окраски срезов миокарда трифенилтетразолия хлоридом. **Результаты.** Ингибирование некроптоза значительно улучшало морфофункциональное состояние миокарда, что проявилось в уменьшении размера некроза миокарда в группе некростатина-1s по сравнению с группами контроля и ДМСО. Так, в группе некростатина-1s размер некроза миокарда составил $25 \pm 8,7\%$, что значительно меньше, чем в группах контроля и ДМСО ($56 \pm 9,5$ и $57 \pm 8,7\%$ соответственно; $p < 0,05$). В группе некростатина-1s регистрировалось более низкое диастолическое внутрижелудочковое давление, а также более высокие значения пульсового внутрижелудочкового давления и СКП, чем в группах контроля и ДМСО ($p < 0,05$). В образцах миокарда левого желудочка в группе некростатина-1s была выявлена более высокая экспрессия противонекропто-

тической микроРНК 223–5p и –3p по сравнению с группами контроля и ДМСО, а в плазме крови — более низкие уровни тропонина I ($p < 0,05$). **Выводы.** Подавление некроптоза в условиях аллогенной гетеротопической трансплантации донорского сердца сопровождается выраженными кардиопротективными эффектами и увеличивает уровень экспрессии противонекроптотической микроРНК 223–5p и –3p.

Ключевые слова: микроРНК 223, некроптоз, внутрижелудочковое давление, внутрисердечная гемодинамика, легочная артериальная гипертензия, донорское сердце, аллогенная трансплантация донорского сердца крысы, кардиопротекция, некростатин-1s

Для цитирования: Дмитриев Ю. В., Васина Л. В., Галагудза М. М. Исследование внутрисердечной гемодинамики, инфаркт-лимитирующих эффектов и уровня микроРНК 223 при подавлении некроптоза на модели гетеротопической аллогенной трансплантации донорского сердца крысы. Артериальная гипертензия. 2018;24(6):710–715. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-6-710-715

Intracardiac hemodynamics, infarct-limiting effects and myocardial expression of microRNA 223 after necroptosis inhibition in a rat model of heterotopic allogeneic heart transplantation

Yu. V. Dmitriev¹, L. V. Vasina², 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:

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

Received 6 December 2018;
accepted 18 December 2018.

Abstract

Objective. To investigate the effect of necroptosis inhibition on the morphofunctional state of the myocardium and the expression of microRNA 223 after heterotopic allogeneic heart transplantation in rat. **Design and methods.** Twenty Wistar rats were examined in the study. Animals were divided into the following groups: 1) control ($n = 7$), 2) dimethyl sulfoxide (DMSO) ($n = 6$), 3) necrostatin-1s ($n = 7$). Necrostatin-1s was used as an inhibitor of necroptosis, which was administered intraperitoneally in DMSO solution 1 hour before the start of the experiment at a dose of 1,65 mg/kg. HTK solution cooled to 4 °C was used as a preservation solution. Two hours after heart arrest, the heart was heterotopically transplanted in the abdominal cavity of recipient rat using the scheme “aorta-aorta, pulmonary trunc-posterior vena cava”. Three hours later, intracardiac hemodynamics was assessed by recording the pressure in the left ventricle, heart rate and coronary flow rate in Langendorff-perfused heart. The expression level of microRNA 223–5p and –3p in left ventricular myocardium was assessed using real-time polymerase chain reaction. The plasma levels of troponin I were assessed by enzyme immunoassay. Myocardial infarct size was measured planimetrically at the end of the experiment by staining myocardium with triphenyltetrazolium chloride. **Results.** Inhibition of necroptosis significantly improved the morphofunctional state of the myocardium, which manifested in a decrease of myocardial infarct size in the necrostatin-1s group compared with the control group and DMSO group. Thus, in the necrostatin-1s group, myocardial infarct size was $25 \pm 8,7\%$, which was smaller than in the control and DMSO groups ($56 \pm 9,5$ and $57 \pm 8,7\%$, respectively; $p < 0,05$). Also in the necrostatin-1s group, lower diastolic intraventricular pressure was recorded, as well as

higher values of pulse intraventricular pressure and coronary flow rate than in control group and DMSO group ($p < 0,05$). Left ventricular myocardium in the necrostatin-1s group demonstrated higher expression of the anti-necroptotic miRNA 223–5p and –3p as compared with the control and DMSO groups, as well as lower plasma levels of troponin I ($p < 0,05$). **Conclusions.** Pharmacological inhibition of necroptosis in heterotopically transplanted donor heart is accompanied by marked cardioprotective effects and increases the expression of anti-necroptotic microRNA 223–5p and –3p.

Key words: MIR-223, necroptosis, intraventricular pressure, intracardial hemodynamics, pulmonary arterial hypertension, donor heart, allogenic rat heart transplantation, cardioprotection, necrostatin-1s

For citation: Dmitriev YuV, Vasina LV, Galagudza MM. Intracardiac hemodynamics, infarct-limiting effects and myocardial expression of microRNA 223 after necroptosis inhibition in a rat model of heterotopic allogeneic heart transplantation. Arterial'naya Gipertenziya = Arterial Hypertension. 2018;24(6):710–715. doi:10.18705/1607-419X-2018-24-6-710-715

Введение

В настоящее время во всем мире отмечается неуклонный рост числа пациентов с сердечной недостаточностью. Несмотря на совершенствование медикаментозных методов лечения, для пациентов с терминальной сердечной недостаточностью единственным методом лечения, улучшающим прогноз и качество жизни, является трансплантация сердца. Ежегодно в мире выполняется более 4000 трансплантаций сердца, подавляющее большинство вмешательств — в странах Европы и Северной Америки [1]. В последние годы в России также увеличивается количество операций трансплантации донорского сердца. Хорошее морфофункциональное состояние трансплантированного донорского сердца после операции определяется в том числе и качеством защиты миокарда донорского сердца от момента изъятия сердца у донора до имплантации его реципиенту. Неадекватная защита миокарда во время таких операций ведет к ишемическому и реперфузионному повреждению миокарда, последующей дисфункции сердечного графта и ухудшает как ближайший, так и отдаленный прогноз. С целью защиты миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения (ИРП) используют консервирующие растворы. В настоящее время известно, что во время ишемии-реперфузии миокарда происходит активация различных механизмов программируемой клеточной гибели, наиболее неблагоприятным из которых является некроптоз. В работах ряда авторов продемонстрировано уменьшение ИРП миокарда при фармакологическом воздействии на сигнальные пути некроптоза [2–5]. В последние годы появился ряд публикаций, касающихся роли микроРНК, в частности, микроРНК 223–5p и –3p в подавлении некроптоза [6–8]. Однако влияние ингибиторов некроптоза на уровень экспрессии микроРНК 223–5p и –3p, а также влияние ингибиторов некроптоза на морфофункциональное состояние донорского сердца при экспериментальной гетеротопической трансплантации донорского сердца крысы до сих пор остаются неизученными.

Цель настоящего исследования — изучить влияние фармакологического подавления некроптоза на морфофункциональное состояние миокарда и уровень экспрессии микроРНК 223–5p и –3p в условиях аллогенной гетеротопической трансплантации 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 были одобрены локальным этическим комитетом.

Эксперименты выполнены на 20 крысах-самцах стока Wistar SPF категории (питомник «Пушино») массой 250–350 г. Использовались животные-доноры и животные-реципиенты. Животные-доноры были разделены на 3 группы: 1) контроль (Кон) ($n = 7$); 2) диметилсульфоксид (ДМСО) ($n = 6$); 3) некростатин-1s (Nec-1s) ($n = 7$). Все животные-доноры за 1 час до эксперимента получили внутривенную инъекцию физиологического раствора (группа Кон), либо ДМСО (группа ДМСО), либо некростатина-1s в ДМСО в дозе 1,65 мг/кг (группы Кон, ДМСО, Nec-1s соответственно).

Крысы-доноры наркотизировались хлоралгидратом внутривенно из расчета 450 мг на 1 кг массы тела крысы, затем проводилось подключение к аппарату искусственной вентиляции легких. Проводились двухсторонняя торакотомия и перевязка всех вен, впадающих в камеры сердца единой лигатурой, затем сердце эксплантировалось и консервировалось *ex vivo* охлажденным до +4 °C кардиopleгическим раствором Кустодиол (НТК), который перфузировался в восходящую аорту ретроградно в течение 10 минут под давлением 80 мм рт. ст. После окончания перфузии сердце находилось в охлажденном до +4 °C растворе Кустодиол в течение двух часов до момента запуска кровотока в нем после имплантации реципиенту.

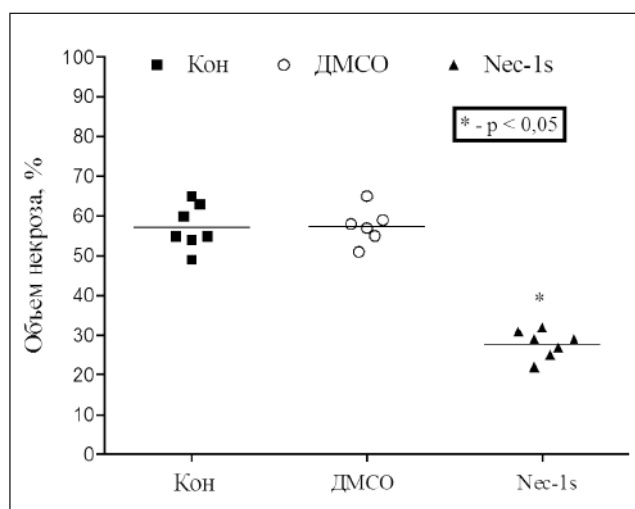
Животных-реципиентов наркотизировали изофлюраном (1,5–1,8%) масочно на спонтанном дыхании. Выполнялась срединная продольная лапаротомия, выделялись инфраренальный сегмент аорты и задняя полая вена. Накладывался артериальный анастомоз между аортой крысы-реципиента и восходящей аортой донорского сердца, а также венозный анастомоз между стволом легочной артерии донорского сердца и задней полую веной крысы-реципиента. Далее производилось ушивание лапаротомной раны, и крыса-реципиент оставалась под анестезией в течение 3 часов. Затем для оценки функционального состояния миокарда донорское сердце эксплантировалось и подключалось к аппарату Лангендорфа, где проводилась регистрация пульсового внутрижелудочкового давления (ПВЖД) и диастолического внутрижелудочкового давления (ДВЖД), а также скорости коронарного потока (СКП). Непосредственно перед эксплантацией проводился забор крови для определения уровня тропонина I (Tn I). Уровень тропонина I в плазме крови оценивался методом иммуноферментного анализа. Верхушку эксплантированного сердца помещали в жидкий азот для последующего анализа относительного уровня нитей микроРНК 223–5p и –3p методом полимеразной цепной реакции. Объем некроза миокарда оценивали непосредственно после эксперимента путем окраски срезов 1-процентным раствором трифенилтетразолия хлорида. Результаты представлены в виде «среднее $\pm$ среднеквадратическое отклонение». Значимость различий в размере некроза миокарда, а также уровня Tn I и микроРНК 223–5p и –3p 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 их обсуждение

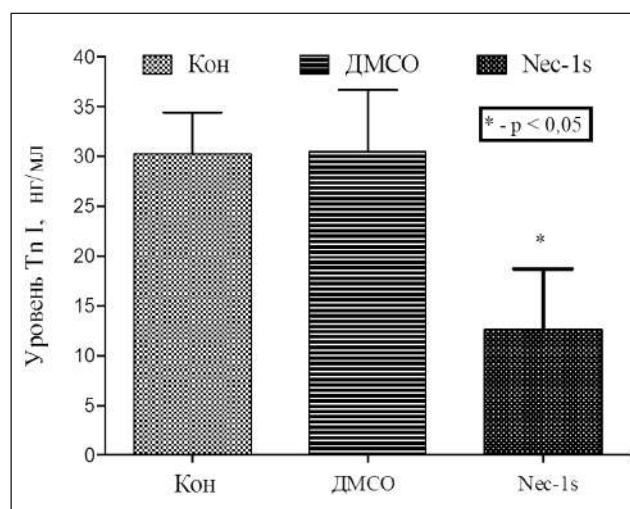
По результатам проведенного исследования можно утверждать, что некростатин-1s оказывал выраженный кардиопротективный эффект, о чем свидетельствует как значительно меньший размер некроза миокарда, так и лучшие параметры внутрисердечной гемодинамики и меньший уровень тропонина I в плазме крови в группе некростатина-1s, по сравнению с группами контроля и ДМСО. Так, в группе некростатина-1s размер некроза миокарда составил $25 \pm 8,7\%$, тогда как в группах контроля и ДМСО $56 \pm 9,5$ и $57 \pm 8,7\%$ соответственно ($p < 0,05$) (рис. 1). Также в группе некростатина-1s в период реперфузии регистрировалось более низкое ДВЖД, а также более высокие значения ПВЖД и СКП, чем в группах контроля и ДМСО ($p < 0,05$). Различия по уровню тропонина I в плазме крови экспериментальных животных представлены на рисунке 2 и были более низкими в группе некростатина-1s по сравнению с группами контроля и ДМСО ($p < 0,05$). Следует отметить, что лучшим параметрам внутрисердечной гемодинамики, меньшему объему некроза миокарда и уровня Tn I в группе некростатина-1s, по сравнению с группами контроля и ДМСО, сопутствовал значительно более высокий уровень экспрессии микроРНК 223–5p и –3p ($p < 0,05$) (рис. 3).

Рисунок 1. Объем некроза миокарда в экспериментальных группах



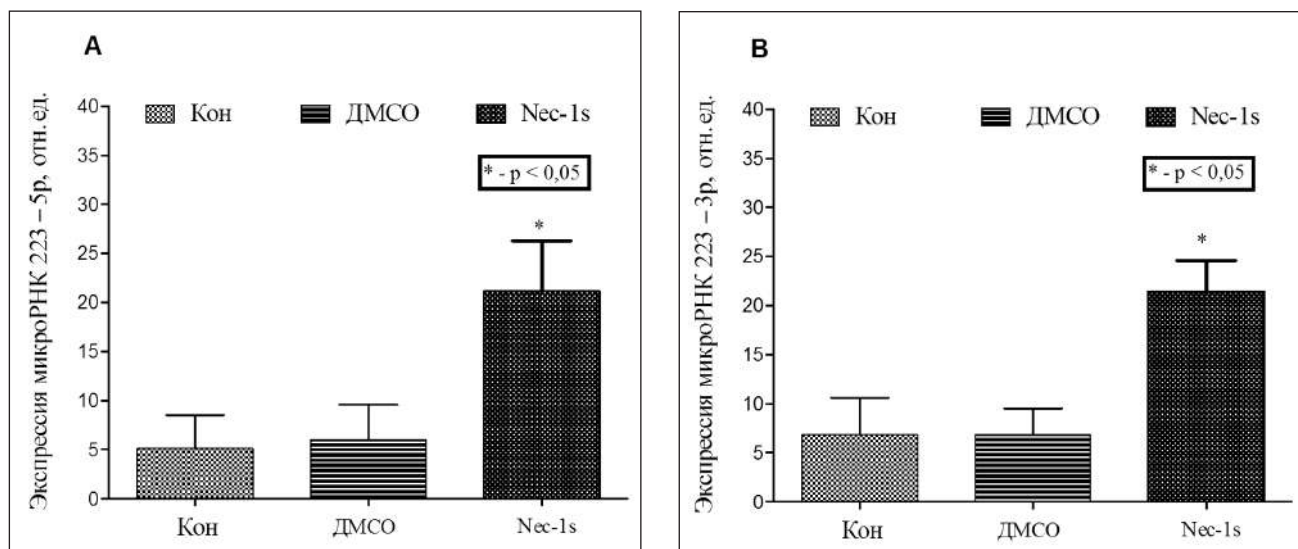
Примечание: Кон — контроль; ДМСО — диметилсульфоксид; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем и диметилсульфоксидом.

Рисунок 2. Уровень тропонина I (Tn I) в экспериментальных группах



Примечание: Кон — контроль; ДМСО — диметилсульфоксид; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем и диметилсульфоксидом.

Рисунок 3. А. Уровень экспрессии микроРНК 223–5р в миокарде в экспериментальных группах. В. Уровень экспрессии микроРНК 223–3р в миокарде в экспериментальных группах



Примечание: Кон — контроль; ДМСО — диметилсульфоксид; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем и диметилсульфоксидом.

В настоящее время в научной литературе появляется большое количество публикаций, проливающих свет на механизмы развития некроптоза при ишемии-реперфузии миокарда. Особенно интересными представляются данные, касающиеся роли микроРНК в развитии некроптотического поражения органов и тканей. Так, выявлено значение микроРНК223–5р и –3р и микроРНК 103/107 в регулировании некроптоза миокарда в условиях ишемии-реперфузии, в особенности в регуляции постинфарктного ремоделирования миокарда [6–8]. Установлена роль антинекроптотической микроРНК 223 и при легочной гипертензии. Показано, что в условиях гипоксии нарушение регуляции уровня экспрессии микроРНК 223 приводит к гипертрофии миокарда, преимущественно правого желудочка и структурным нарушениям в легочных артериях и легочной гипертензии [9]. Вместе с тем значение микроРНК 223 и некроптоза в развитии повреждения сердечного графта и его дисфункции при трансплантации донорского сердца остается практически неизученным. Единственной работой, указывающей на роль некроптоза в морфофункциональном состоянии сердечного аллогraftа, является исследование А. Pavlovsky и соавторов (2014), в котором подавление некроптоза приводило к лучшей выживаемости клеток сердечного трансплантата, лучшему морфофункциональному состоянию миокарда и меньшей лейкоцитарной инфильтрации при экспериментальной трансплантации сердца [10]. Однако работ, касающихся влияния подавления некроптоза на морфофункциональное состояние миокарда и экспрессию микроРНК 223–5р и –3р

в условиях аллогенной гетеротопической трансплантации донорского сердца крысы, до сих пор не проводилось.

Выводы

Таким образом, в данном исследовании впервые выявлено благоприятное влияние фармакологического подавления некроптоза с помощью некростатина-1s на морфофункциональное состояние миокарда и уровень экспрессии в нем противонекроптотической микроРНК 223–5р и –3р при экспериментальной аллогенной гетеротопической трансплантации 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-223–5р и –3р-зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллогraftа при трансплантации донорского сердца».

The study was supported by the scientific grant of the Russian Foundation of the Basic Studies № 17–04–02061 “MicroRNA 223–5p and –3p-dependent mechanisms of necroptosis in the allograft myocardium in heart transplantation”.

Список литературы / References

1. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Goldfarb S et al. The Registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-second official adult heart

transplantation report-2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34(10):1244–1254. doi:10.1016/j.healun.2015.08.003

2. 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. doi: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):468–471. doi:doi.org/10.18705/1607-419X-2017-23-5-468-471 In Russian].

3. 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. Бюлл. сибирской медицины. 2017;17(4):126–133. doi: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:10.20538/1682-0363-2017-4-126-133 In Russian].

4. Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Anesth*. 2014;28(2):235–241. doi:10.1007/s00540-013-1716-3

5. 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

6. Zhu H, Fan GC. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodeling. *Cardiovasc Res*. 2012;94(2):284–292. doi:10.1093/cvr/cvr291

7. Wang JX, Zhang XJ, Li Q, Wang K, Wang Y, Jiao JQ 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

8. Qin D, Wang X, Li Y, Yang L, Wang R, Peng J et al. MicroRNA-223-5p and -3p cooperatively suppress necroptosis in ischemic/reperfused hearts. *J Biol Chem*. 2016;291(38):20247–20259. doi:10.1074/jbc.M116.732735

9. Elia L, Condorelli G. MicroRNAs and pulmonary hypertension: a tight link. *Cardiovasc Res*. 2016;111(3):163–164.

10. 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;

Васина Любовь Васильевна — доктор медицинских наук, заведующая кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО «ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России.

Author information

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

Lubov V. Vasina, MD, PhD, DSc, Head, Department of Biochemistry, First Pavlov Medical University of St. Petersburg;

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, DSc, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, DSc, Professor; Department of Pathophysiology, First Pavlov Medical University of St. Petersburg.