

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

Кардиопротективные эффекты некростатина-1s и некросульфонида на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы

Ю. В. Дмитриев, С. М. Минасян, Е. А. Демченко,
В. К. Байрашева, М. М. Галагудза^{1,2}

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

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «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, 197341, Россия
E-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com

Статья поступила в редакцию
28.08.17 и принята к печати 01.10.17.

Резюме

Цель исследования. Изучить влияние ингибиторов некроптоза — некросульфонида и некростатина-1s — на морфофункциональное состояние миокарда на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы. **Материалы и методы.** Исследование проведено на 27 крысах стока Wistar. Животные были разделены на следующие группы: 1) контроль (n = 7), 2) диметилсульфоксид (ДМСО, n = 6), 3) некростатин-1s (n = 8), 4) некросульфонида (n = 6). Все исследуемые соединения вводились внутривентриально за 1 час до начала эксперимента. В качестве консервирующего агента был использован охлажденный до 4 °С кустодиол. ДМСО был использован в качестве растворителя для некростатина-1s и некросульфонида. Во время эксперимента регистрировались давление в левом желудочке, частота сердечных сокращений и скорость коронарного потока. По окончании 8-часовой ишемии и 2-часовой реперфузии планиметрически оценивали размер некроза. **Результаты.** Некростатин-1s и некросульфонида обладают кардиопротективными эффектами, о чем свидетельствуют значительно более низкие объемы некроза миокарда в данных группах, а также лучшие показатели внутрисердечной гемодинамики в период реперфузии. В группах некросульфонида и некростатина-1s размер некроза миокарда составил $32,2 \pm 9,6$ и $29,0 \pm 9,2$ %, что значительно меньше, чем в группах контроля и ДМСО ($54,4 \pm 6,6$ и $59,2 \pm 5,6$ % соответственно; $p < 0,05$). В период реперфузии в группах некросульфонида и некростатина-1s регистрировались более высокие значения пульсового внутрижелудочкового давления и скорости коронарного потока, а также более низкое диастолическое внутрижелудочковое давление, чем в группах контроля и ДМСО ($p < 0,05$). **Выводы.** Ингибиторы некроптоза некростатин-1s и некросульфонида улучшают морфофункциональное состояние миокарда при длительной холодовой консервации донорского сердца.

Ключевые слова: некроптоз, холодовая консервация донорского сердца, кардиопротекция, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, некросульфонида, некростатин-1s

Для цитирования: 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:10.18705/1607-419X-2017-23-5-468-471

Cardioprotective effects of necrostatin-1s and necrosulfonamide in the model of prolonged static cold storage of the donor rat heart

Yu. V. Dmitriev¹, S. M. Minasian¹, E. A. Demchenko¹,
V. K. Bayrasheva¹, M. M. Galagudza^{1,2}

¹ Almazov National Medical Research Centre,
St Petersburg, Russia

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

Corresponding author:

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

Received 28 August 2017;
accepted 1 October 2017.

Abstract

Objective. To investigate the effects of necroptosis inhibitors — necrosulfonamide and necrostatin-1s — on morphofunctional characteristics of the myocardium in the model of prolonged cold preservation of the donor rat heart. **Design and methods.** The study was performed on 27 Wistar rats. The animals were divided into the following groups: 1) control (n = 7), 2) dimethylsulfoxide (DMSO, n = 6), 3) necrostatin-1s (n = 8), 4) necrosulfonamide (n = 6). All test compounds were administered intraperitoneally 1 hour before the start of the experiment. Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution cooled to 4 °C was used as a preservative agent. DMSO was used as a solvent for necrostatin-1s and necrosulfonamide. During the experiment, left ventricular pressure, heart rate and coronary flow were recorded. At the end of 8-hour of ischemia and 2-hour of reperfusion, myocardial infarct size was planimetrically evaluated. **Results.** Necrostatin-1s and necrosulfonamide show cardioprotective effects, as evidenced by the significantly lower levels of myocardial necrosis in these groups, as well as the best indices of intracardiac hemodynamics during reperfusion. In the groups of necrosulfonamide and necrostatin-1s, myocardial infarct size was $32,2 \pm 9,6$ and $29,0 \pm 9,2\%$, respectively, which is significantly lower than in control groups and DMSO ($54,4 \pm 6,6$ and $59,2 \pm 5,6\%$, respectively, $p < 0,05$). During reperfusion in necrosulfonamide and necrostatin-1s groups, higher values of pulse intraventricular pressure and coronary flow rates were recorded, as well as lower diastolic intraventricular pressure, compared to control group and DMSO ($p < 0,05$). **Conclusions.** Necroptosis inhibitors necrostatin-1s and necrosulfonamide improve morphofunctional characteristics of the myocardium state during prolonged cold preservation of the donor heart.

Key words: necroptosis, cold preservation of the donor heart, cardioprotection, myocardial ischemia and reperfusion injury, necrosulfonamide, necrostatin-1s

For citation: Dmitriev YuV, 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:10.18705/1607-419X-2017-23-5-468-471

Введение

Прогноз пациентов, перенесших операцию трансплантации сердца, во многом определяется качеством защиты миокарда донора от момента его изъятия до момента имплантации сердца реципиенту. Для защиты сердца от ишемиче-

ского и реперфузионного повреждения используют консервирующие растворы. В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают данные о возможности использования в качестве кардиопротекторов ингибиторов некроптоза. Данный вид клеточной гибели характеризуется

морфологическими признаками некроза, но имеет молекулярные мишени для подавления, такие как RIP1/RIP3-киназы (receptor-interacting protein kinases, взаимодействующая с рецептором протеинкиназы I и III), MLKL-псевдокиназа (mixed lineage kinase domain-like, доменоподобный белок киназы смешанной линии) и другие.

В нашей предыдущей работе нами была продемонстрирована способность ингибитора некроптоза некростатина-1 (Nec-1) оказывать кардиопротективные эффекты в условиях длительной холодовой консервации изолированного сердца крысы [1]. К сожалению, Nec-1 обладает узкой терапевтической широтой и может в высоких концентрациях оказывать противоположный эффект в виде увеличения количества гибнущих клеток [2].

Цель настоящего исследования — изучить влияние высокоактивных и низкотоксичных ингибиторов некроптоза — некросульфонамида (NSA) и некростатина-1s (Nec-1s) — 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 были одобрены локальным этическим комитетом.

Эксперименты выполнены на 27 крысах-самцах стока Wistar массой 250–350 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1) контроль (Кон) (n = 7); 2) диметилсульфоксид (ДМСО) (n = 6); 3) NSA (n = 6); 4) Nec-1s (n = 8). Все животные за 1 час до эксперимента получили внутрибрюшинную инъекцию физиологического раствора (группа Кон), либо ДМСО (группа ДМСО), либо NSA или Nec-1s в ДМСО (группы NSA или Nec-1s соответственно). NSA и Nec-1s вводились внутрибрюшинно в дозе 1,65 мг/кг за 1 час до эксперимента. После изъятия сердца из грудной полости его подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа. В стабилизационном периоде и в периоде реперфузии регистрировались диастолическое и пульсовое внутрижелудочковое давление (ДВЖД и ПВЖД соответственно), а также скорость коронарного потока (СКП). По окончании 10-минутного стабилизационного периода в сердце в течение 4 минут вводился охлажденный до 4 °С кустодиол (НТК). Затем перфузия сердца останавливалась на 8 часов с целью моделирования глобальной ишемии миокарда. В течение всего периода ишемии тем-

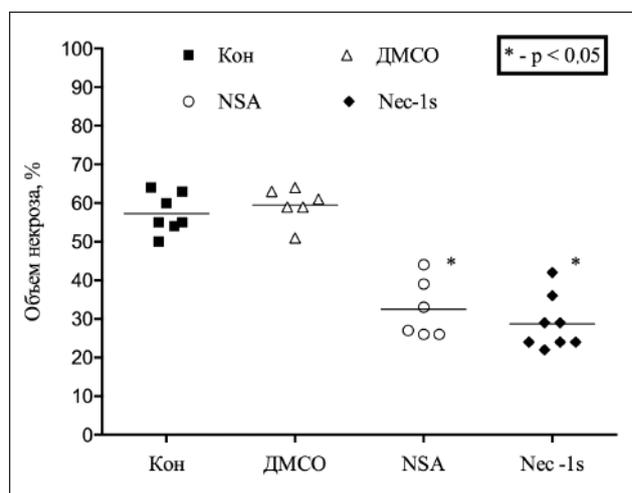
пература сердца поддерживалась на уровне 4 °С. По окончании 8-часового периода ишемии производилось возобновление перфузии оксигенированным раствором Кребса при температуре 37 °С. После 2-часовой реперфузии проводились окраска срезов сердца в 1-процентном растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) и расчет объема некроза миокарда.

Результаты представлены в виде «среднее ± 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 статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В группе NSA размер некроза миокарда составил $32,2 \pm 9,6\%$, что существенно ниже, чем в группах Кон и ДМСО ($54,4 \pm 6,6$ и $59,2 \pm 5,6\%$; $p < 0,05$). В группе Nec-1s размер некроза миокарда составил $29,0 \pm 9,2\%$ и также был существенно меньше, чем в группах Кон и ДМСО ($p < 0,05$) (рис.).

Объем некроза миокарда в экспериментальных группах



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

В группах NSA и Nec-1s во время реперфузии миокарда наблюдались значимо более высокие значения СКП по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,01$ для каждой из групп). Также наблюдалось существенно меньшее значение ДВЖД и значимо большее значение ПВЖД в группах NSA и Nec-1s

по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,05$ для каждого параметра и группы).

К настоящему времени кардиопротективные эффекты ингибиторов некроптоза при ишемическом и реперфузионном повреждении миокарда доказаны в целом ряде исследований [3–6]. Однако в большинстве этих исследований в качестве ингибитора некроптоза выступал Nec-1, обладающий узкой терапевтической широтой. Исследования, посвященные наиболее перспективным с позиций трансляционной медицины ингибиторам некроптоза, таким как Nec-1s и NSA, до настоящего времени отсутствуют. Кроме того, работы, в которых изучается значение некроптоза при трансплантации донорского сердца, единичны. Фактически единственной опубликованной к настоящему времени работой является работа А. Pavlovsky с соавторами (2014), в которой подавление некроптоза привело к лучшей выживаемости клеток сердечного трансплантата, лучшему морфофункциональному состоянию миокарда и меньшей лейкоцитарной инфильтрации при экспериментальной трансплантации сердца [7].

Выводы

Таким образом, в нашей работе впервые показаны кардиопротективные эффекты NSA и Nec-1s на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы.

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 grant of the Russian Foundation of Fundamental Studies, project № 17–04–02061 “MicroRNA 223–5p and –3p — dependent mechanisms of necroptosis in the myocardium of heart allograft after heart transplantation”.

Список литературы / References

1. Dmitriev Y, Minasyan S, Vasina L, Demchenko E, Galagudza M. Effects of inhibitors of necroptosis and autophagy on morphofunctional characteristics of the myocardium during static cold storage of donor rat heart. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015;159(6):792–795. <https://doi.org/10.1007/s10517-015-3078-3>
2. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, Du Hadaway J et al. Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Disease*. 2012;3: e437. doi:10.1038/cddis.2012.176
3. Smith C, Davidson S, Lim S, Simpkin J, Hothersall J, Yellon D. Necrostatin: A potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther*. 2007;21:227–233. doi:10.1007/s10557-007-6035-1

4. Dmitriev Y, Minasian S, Demchenko E, Galagudza M. 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/s10517-013-2124-2>.

5. Oerlemans M, Liu J, Arslan f, OudenBen K, Middelaar P, Doevendans PA et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res. Cardiol*. 2012;107(4):270. doi:10.1007/s00395-012-0270-8

6. Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death and Disease*. 2015;6: e1975. doi:10.1038/cddis.2015.316

7. Pavlovsky A, Lian D, Huang X, Yin Z, Haig A, Jevnikar A et al. RIPK3-mediated necroptosis regulates cardiac allograft rejection. *Am J Transpl*. 2014;14(8): 1778–1790. doi:10.1111/ajt.12779

Информация об авторах

Дмитриев Юрий Валерьевич — научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Минасян Саркис Минасович — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Демченко Елена Алексеевна — доктор медицинских наук, руководитель НИЛ Реабилитации института сердца и сосудов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Байрашева Валентина Кузьминична — научный сотрудник института эндокринологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Галагудза Михаил Михайлович — доктор медицинских наук, профессор, директор института экспериментальной медицины ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information

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

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

Elena A. Demchenko, MD, PhD, DSc, Head, Laboratory of Rehabilitation, Institute of Heart and Vessels, Almazov National Medical Research Centre;

Valentina K. Bayrasheva, MD, Research Fellow, Institute of Endocrinology, Almazov National Medical Research Centre;

Mikhail M. Galagudza, MD, PhD, DSc, Professor, Director, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre.