

УДК 616.12-005.4-089.811

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-126–133

Для цитирования: 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.

Прямое сравнение кардиопротективных свойств ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы

Дмитриев Ю.В., Минасян С.М., Байрашева В.К., Демченко Е.А., Галагудза М.М.

Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова
Россия, 197341, г. Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – провести сравнительную оценку кардиопротективных эффектов различных ингибиторов некроптоза на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного перфузируемого сердца крысы.

Материал и методы. Исследование выполнено на 38 крысах стока Wistar массой 250–300 г. Исследовались кардиопротективные эффекты следующих ингибиторов некроптоза: некростатина-1 (Nec-1), некростатина-5 (Nec-5), некростатина-1s (Nec-1s), некросульфонамида (NSA). Все исследуемые соединения вводились внутривентриально за 1 ч до начала эксперимента. В отдельных группах животным вводили растворитель для ингибиторов некроптоза диметилсульфоксид (ДМСО) и 0,9%-й раствор хлорида натрия (контроль). Через 1 ч после внутривентриальной инъекции у крыс извлекалось сердце, производилось канюлирование аорты и подключение сердца к модифицированному аппарату Лангендорфа. Путем прекращения ретроградной перфузии сердца оксигенированным раствором Кребса моделировалась нормотермическая 35-минутная глобальная ишемия, по окончании которой восстанавливалась ретроградная перфузия в течение 2 ч. До моделирования ишемии в полость левого желудочка вводился заполненный жидкостью баллон для регистрации внутрижелудочкового давления. Скорость коронарного потока определялась исходно и в период реперфузии по объему оттекающего от сердца перфузата. Объем некроза миокарда выражали в процентах от общего объема сердца после гистохимической окраски срезов сердец трифенилтетразолием хлоридом.

Результаты. Группы контроля и ДМСО не различались по объему некроза миокарда и функциональным параметрам работы сердца. По результатам проведенных экспериментов можно утверждать, что все ингибиторы некроптоза обладают инфаркт-лимитирующим эффектом, при этом статистически значимых различий показателей у животных, которым вводились различные ингибиторы некроптоза, не выявлено. Объем некроза миокарда в группе ДМСО составил $(50,5 \pm 7,82)\%$, в то время как в группе Nec-1 – $(29,9 \pm 3,42)\%$, в группе Nec-5 – $(27,7 \pm 3,42)\%$, в группе Nec-1s – $(30,6 \pm 3,82)\%$, в группе NSA – $(34,7 \pm 5,82)\%$ ($p < 0,01$ в сравнении с ДМСО для каждой из групп ингибиторов некроптоза). Выявлена способность двух ингибиторов некроптоза, а именно Nec-1s и NSA, улучшать функциональное состояние миокарда, что проявлялось в более высоком уровне пульсового давления ($p < 0,01$ по сравнению с контролем и ДМСО), скорости коронарного потока ($p < 0,05$ по сравнению с контролем и ДМСО), а

✉ Дмитриев Юрий Валерьевич, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

также в более низком уровне диастолического внутрижелудочкового давления ($p < 0,01$ по сравнению с контролем и ДМСО) в ходе реперфузии.

Заключение. Результаты проведенного исследования демонстрируют наличие у всех изученных ингибиторов некроптоза инфаркт-лимитирующего эффекта одинаковой степени выраженности. Однако Nec-1s и NSA выделяет способность улучшать функциональное состояние миокарда в периоде реперфузии, что с учетом их низкой токсичности и более низкой EC50 позволяет рассматривать их в качестве перспективных соединений кардиопротективного действия для последующих доклинических и клинических исследований.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия миокарда, кардиопротекция, некроптоз, некростатины.

ВВЕДЕНИЕ

По данным Американской ассоциации сердца, в Соединенных Штатах Америки более 15,5 млн человек в возрасте старше 20 лет имеют диагноз ишемической болезни сердца [1]. При этом ближайший и отдаленный прогноз у пациентов с наиболее грозной формой ишемической болезни сердца, а именно с инфарктом миокарда, прямо зависит от объема миокарда, сохранившего жизнеспособность после острой ишемии-реперфузии. Именно поэтому поиск фармакологических агентов, обладающих кардиопротективными свойствами, остается глобальным трендом в современной медицинской науке.

Одним из наиболее активно исследуемых методов кардиопротекции является воздействие на программируемую клеточную гибель (ПКГ). К настоящему времени наиболее изучены такие виды ПКГ, как апоптоз и аутофагия. Результаты модуляции данных видов клеточной гибели противоречивы. Так, например, в работе Т. Ноллы и соавт. (1999) на сердце кролика после регионарной ишемии-реперфузии (ИРП) была показана способность панкаспазного ингибитора YVAD-cmk уменьшать апоптоз и некроз кардиомиоцитов [2]. Однако, согласно данным других авторов, селективное подавление этих видов клеточной гибели не приводит к улучшению морфофункционального состояния миокарда и, более того, активация данных видов клеточной гибели обладает протекторным значением при ИРП миокарда [3–5]. Более того, «проксимальная» блокада апоптоза и аутофагии может способствовать возникновению феномена «переключения», когда на фоне подавления апоптоза и аутофагии в геометрической прогрессии возрастает количество клеток, гибнущих путем некроза [6, 7].

Одним из наиболее активно исследуемых видов ПКГ является открытый в 2005 г. некроптоз, характеризующийся морфологическими призна-

ками некроза, но имеющий молекулярные мишени для таргетного ингибирования. В настоящее время значение некроптоза как фактора, способствующего ухудшению морфофункционального состояния органов и тканей, доказано при различных патологических процессах, в частности при ишемии головного мозга и ишемии-реперфузии миокарда [8, 10, 11].

Выявлено также значение активности некроптоза как фактора, определяющего функциональное состояние сердечного аллографта и выраженность реакции отторжения сердечного трансплантата после трансплантации донорского сердца [14]. К настоящему времени известно несколько ингибиторов некроптоза, которые показали способность подавлять некроптоз в опытах *in vitro* и *in vivo*. Однако прямого сравнения различных ингибиторов некроптоза на предмет их органопротективной активности до сих пор не проводилось.

Цель настоящего исследования – сравнительная оценка кардиопротективной активности таких ингибиторов некроптоза, как некростатин-1 (Nec-1), некростатин-5 (Nec-5), некростатин-1s (Nec-1s) и некросульфонамид (NSA), в условиях глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты выполнены на 38 самцах крыс стока Wistar массой 250–300 г, наркотизированных хлоралгидратом в дозе 450 мг/кг. Животные были случайным образом разделены на шесть групп: 1) контроль (Кон, $n = 5$); 2) диметилсульфоксид (ДМСО, $n = 5$); 3) некростатин-1 (Nec-1, $n = 7$); 4) некростатин-5 (Nec-5, $n = 7$); 5) некростатин-1s (Nec-1s, $n = 5$); 6) некросульфонамид (NSA, $n = 8$). Всем животным за 1 ч до начала перфузии изолированного сердца внутривенно вводили 0,9%-й раствор хлорида натрия в

объеме 0,1 мл (контроль), ДМСО (группа ДМСО) либо ингибиторы некроптоза, растворенные в ДМСО (группы Nec-1, Nec-5, Nec-1s и NSA). Ингибиторы некроптоза вводились в дозе 1,65 мг/кг. После изъятия сердца из грудной полости его подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа.

По окончании 10-минутного стабилизационного периода вызывали 35-минутную глобальную ишемию путем прекращения ретроградной перфузии сердца оксигенированным раствором Кребса – Хенселейта. По окончании периода ишемии возобновляли перфузию в течение 120 мин при температуре раствора 37 °С. Для оценки параметров внутрисердечной гемодинамики производилась непрерывная регистрация внутрижелудочкового давления (ВЖД) и измерение скорости коронарного потока (СКП). В стабилизационном периоде и во время реперфузии регистрировали конечно-диастолическое и пульсовое внутрижелудочковое давление (ДВЖД и ПВЖД соответственно). Регистрация ВЖД проводилась с помощью программно-аппаратного комплекса PhysExp (ООО «Кардиопротект», г. Санкт-Петербург). По окончании периода реперфузии сердца разрезали на пять равных по толщине поперечных срезов и в течение 15 мин окрашивали путем инкубации в 1%-м растворе трифенилтетразолия хлорида (ТТХ) при 37 °С. Затем получали цифровые фотографии срезов. Объем некроза миокарда рассчитывали планиметрически по площади ТТХ-негативных зон при помощи программы Adobe Photoshop CS. Оценивали процентное отношение суммы площадей ТТХ-негативных зон к сумме общей площади сердца. Результаты представляли в виде «среднее ± среднеквадратическое отклонение». Значимость различий в объеме некроза миокарда оценивали с помощью *U*-критерия Манна – Уитни с использованием программы Statistica 10.0. Различия между группами по функциональным параметрам оценивали с помощью теста ANOVA с использованием критерия Тьюки в программе SPSS 24 (IBM Inc.). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контроле объем некроза миокарда составил ($57,2 \pm 6,6$)%, что достоверно не отличалось от объема некроза миокарда в группе ДМСО ($(50,5 \pm 7,8)\%$, $p > 0,05$). В группах Nec-1 и Nec-5 объем некроза миокарда составил ($29,9 \pm 3,4$)% и ($27,7 \pm 3,4$)% соответственно, что оказалось значи-

мо меньше, чем в группе ДМСО ($(50,5 \pm 7,8)\%$, $p < 0,01$). В группах Nec-1s и NSA объем некроза миокарда составил ($30,6 \pm 3,8$)% и ($34,7 \pm 5,8$)%, что было значимо меньше, чем в группе ДМСО ($p < 0,01$).

Значения объема некроза миокарда в экспериментальных группах представлены на рис. 1.

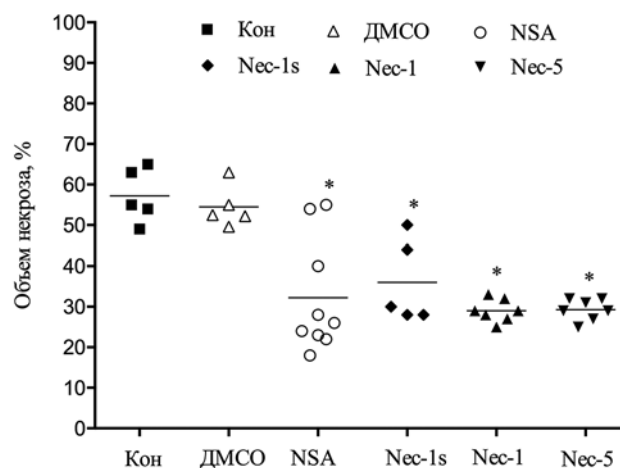


Рис. 1. Объем некроза миокарда в экспериментальных группах. * $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 1. The size of myocardial necrosis in experimental groups. * $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

нами не обнаружено достоверных различий показателей в сравниваемых группах в динамике нарастания среднего ВЖД во время ишемии. Параметры внутрисердечной гемодинамики во время реперфузии миокарда в экспериментальных группах представлены на рис. 2–4. Интересные данные были получены при оценке влияния ингибиторов некроптоза на функциональное состояние миокарда в период ишемии-реперфузии. Так, несмотря на наличие инфаркт-лимитирующего эффекта Nec-1 и Nec-5, данные ингибиторы некроптоза оказались не способными оказать существенное влияние на внутрисердечную гемодинамику при ишемии-реперфузии миокарда. Так, показатели ПВЖД, ДВЖД и СКП не отличались между группами ингибиторов некроптоза и группами Кон и ДМСО ($p > 0,05$).

Противоположные данные были получены в группах Nec-1s и NSA, где при анализе динамики ПВЖД, ДВЖД и СКП в трех временных точках реперфузии выявлены значимо более высокие значения ПВЖД и СКП по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,01$), и достоверно более низкие значения ДВЖД по сравнению с группами Кон и ДМСО ($p < 0,01$).

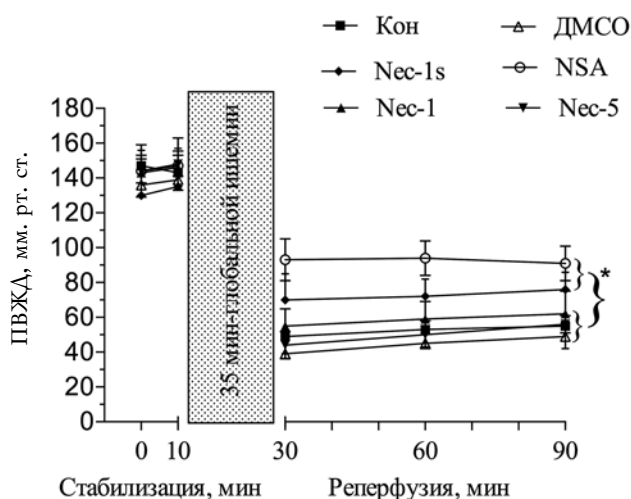


Рис. 2. Диастолическое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 2. Diastolic intraventricular pressure during the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

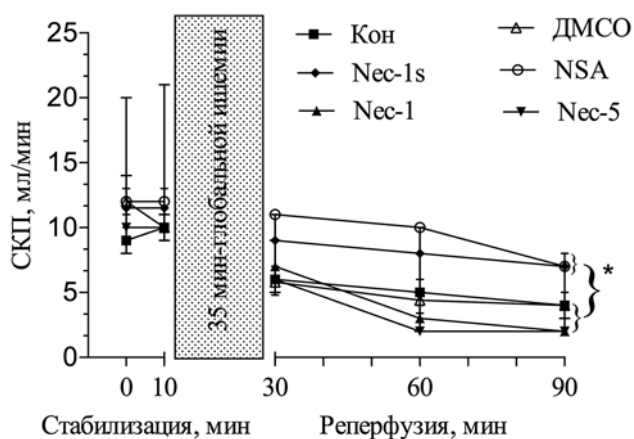


Рис. 4. Скорость коронарного потока в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 4. Coronary flow velocity during the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

ОБСУЖДЕНИЕ

В условиях острой ишемии миокарда жизненно необходимо раннее восстановление кровотока, которое ограничивает объем необратимого повреждения миокарда. Вместе с тем даже восстановление кровотока по инфаркт-ассоциированной артерии не всегда позволяет добиться значительного ограничения повреждения миокарда, поскольку само по себе может вызвать необратимое повреждение ткани, получившее на-

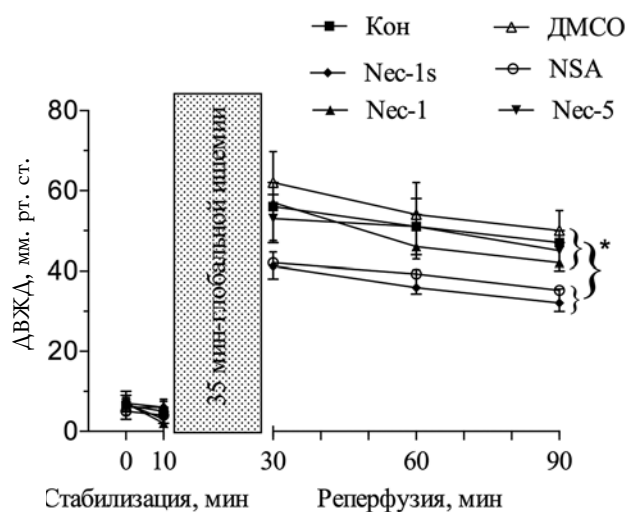


Рис. 3. Пульсовое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии.

* $p < 0,01$ по сравнению с Кон и ДМСО

Fig. 3. Pulse intraventricular pressure in the stabilization period and reperfusion.

* $p < 0,01$ as compared with the control and dimethylsulphoxide (DMSO)

звание реперфузионного. В настоящее время активно изучается проблема предотвращения ишемического-реперфузионного повреждения (ИРП) миокарда с помощью модуляторов программируемой клеточной гибели.

Среди всех типов ПКГ наиболее изученным является апоптоз. Однако изолированное подавление апоптоза не сопровождается уменьшением ИРП миокарда. Известно, что при попытке изолированного подавления апоптоза или аутофагии в условиях ишемии-реперфузии миокарда происходит «переключение» апоптоза или аутофагии на наиболее неблагоприятный вид клеточной гибели – некроз [3].

Начало исследования некроптоза положено в 2005 г., когда сотрудниками Гарвардской медицинской школы на культуре клеток Jurkat при действии индуктора апоптоза – фактора некроза опухоли альфа и панкаспазного ингибитора апоптоза ZVAD.fmk – был выявлен процесс клеточной гибели, морфологически не отличимый от некроза, характеризующийся активацией аутофагии, но в отличие от некроза, имеющий молекулярные мишени для ингибирования. Авторы данного исследования назвали этот вид клеточной гибели некроптозом и в результате скрининга нескольких тысяч химических соединений выявили несколько из них, способных ее предотвращать. Эти химические соединения получили название некростатинов. Тогда же на модели фокальной ишемии головного мозга у мышей была проде-

монстрирована способность Nec-1 оказывать инфаркт-лимитирующий эффект [8]. Был выявлен один из механизмов действия некростатинов — специфическое ингибирование киназы RIP1 [9].

В последующие годы рядом авторов, в том числе и нашей группой, исследовалось влияние ингибиторов некроптоза при ишемии-реперфузии миокарда и на модели постинфарктной сердечной недостаточности. Так, С. Smith и соавт. (2007) на модели изолированного сердца по Лангендорфу были опубликованы первые результаты применения Nec-1 в качестве кардиопротектора, которые продемонстрировали способность Nec-1 уменьшать объем некроза миокарда [10]. В дальнейшем М. Oerlemans и соавт. (2012) на модели регионарной ишемии-реперфузии миокарда у мышей *in vivo* показали уменьшение объема некроза миокарда и подавление активности киназ RIP1 и RIP3 при действии Nec-1 [11].

В 2013 г. нашей группой были выявлены инфаркт-лимитирующие свойства Nec-5, а также наличие положительного инотропного эффекта у Nec-1 [12]. Кроме того, нами на модели постинфарктной хронической сердечной недостаточности у крыс была выявлена способность Nec-7 уменьшать объем рубцовой ткани через 21 день после перманентной коронарной окклюзии у крыс, а также предотвращать патологическое постинфарктное ремоделирование миокарда и улучшать его функциональное состояние. Последнее подтверждалось более низким уровнем предшественника мозгового натрийуретического пептида в плазме крови крыс в группе Nec-7 [13].

В последние годы появился ряд публикаций, касающихся значения некроптоза в развитии реакции отторжения сердечного трансплантата. Так, А. Pavlovsky и соавт. (2014) на нокаутных по медиаторам некроптоза RIP1 и RIP3 мышцах продемонстрировали лучшую выживаемость сердечного трансплантата и меньшую лимфоцитарную инфильтрацию ткани миокарда по сравнению с контрольной группой [14]. Нами на модели длительной холодовой консервации донорского сердца крысы обнаружено усиление кардиопротективных эффектов консервирующего раствора «Кустодиол» при добавлении в него Nec-1 [15].

По нашему представлению, «идеальный» ингибитор некроптоза, который может иметь перспективы использования в практике, должен удовлетворять, по крайней мере, двум критериям, а именно: высокая эффективность и низкая токсичность. Именно этим критериям соответствуют два ингибитора некроптоза: Nec-1s и NSA. Первый из них обладает меньшей, чем у

Nec-1, ЕС 50 и низкой токсичностью, а второй осуществляет «дистальную» блокаду некроптоза на уровне спирального белка mixed lineage kinase domain-like (MLKL), которая фосфорилируется с участием киназы RIP3, является компонентом некрсомного комплекса и запускает финальную стадию некроптоза [16, 17]. Активация MLKL приводит к встраиванию некрсомного комплекса в клеточную мембрану, повышению ее проницаемости и к гибели клетки [18]. Эффективность подавления некроптоза на уровне MLKL для предотвращения повреждения клеток уже показана в исследовании J. Wu и соавт. (2013) на модели экспериментального панкреатита, вызванного введением церулетида, а также в работе Y. Qu и соавт. (2016) [19, 20]. Исследовательской группой L. Sun и соавт. (2012) на клеточной линии HeLa была выявлена эффективность NSA в подавлении некроптоза посредством блокады MLKL [21].

В настоящем исследовании показано, что такие ингибиторы некроптоза, как некростатин-1, некростатин-5, некростатин-1s и некросульфонамид оказывают инфаркт-лимитирующий эффект в условиях глобальной ишемии-реперфузии миокарда. Степень выраженности инфаркт-лимитирующего действия указанных ингибиторов некроптоза одинакова. Помимо уменьшения объема ишемического некроза, некростатин-1s и некросульфонамид способствуют улучшению функции левого желудочка в постишемическом периоде.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 17-04-02061 «МикроРНК-223-5p и -3p – зависимые механизмы некроптоза в миокарде сердечного аллографта при трансплантации донорского сердца».

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Все эксперименты одобрены комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России (протокол № 2016/012 от 14.09.2016).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Writing Group Members, Mozaffarian D., Benjamin E., Go A., Arnett D., Blaha M., Cushman M., Das S., de Ferranti S., Després J., Fullerton H., Howard V., Huffman M., Isasi C., Jiménez M., Judd S., Kissela B., Lichtman J., Lisabeth L., Liu S., Mackey R., Magid D., McGuire D., Mohler E., Moy C., Muntner P., Mussolino M., Nasir K., Neumar R., Nichol G., Palaniappan L., Pandey D., Reeves M., Rodriguez C., Rosamond W., Sorlie P., Stein J., Towfighi A., Turan T., Virani S., Woo D., Yeh R., Turner M. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics--2016 Update: A Report From the American Heart Association // *Circulation*. 2016; 133: 447–454. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000366
2. Holly T., Drincic A., Byun Y., Nakamura S., Harris K., Klocke F., Cryns V. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion *in vivo* // *J. Mol. Cell Cardiol*. 1999; 31 (9): 1709–1715. DOI: 10.1006/jmcc.1999.1006.
3. Zhang Y., Kohler K., Xu J., Lu D., Braun T., Schlitt A., Buerke M., Müller-Werdan U., Werdan K., Ebelt H. Inhibition of p53 after acute myocardial infarction: Reduction of apoptosis is counteracted by disturbed scar formation and cardiac rupture // *J. Mol. Cell Cardiol*. 2011; 50 (3): 471–478. DOI: 10.1016/j.jmcc.2010.11.006
4. Buss S., Muenz S., Riffel J., Malekar P., Hagenmueller M., Weiss C., Bea F., Bekeredian R., Schinke-Braun M., Izumo S., Katus H., Hardt S. Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction // *J. Am. Coll Cardiol*. 2009; 54 (25): 2435–2446. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.08.031.
5. Wei C., Li H., Han L., Zhang L., Yang X. Activation of autophagy in ischemic postconditioning contributes to cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury in rat hearts // *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 2013; 61 (5): 416–422. DOI: 10.1097/FJC.0b013e318287d501.
6. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1833: 3448–3459. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001.
7. Nicotera P., Melino G. Regulation of the apoptosis–necrosis switch // *Oncogene*. 2004; 23: 2757–2765. DOI: 10.1038/sj.onc.1207559.
8. Degtarev A., Huang Z., Boyce M., Li Y., Jagtap P., Mizushima N., Cuny G.D., Mitchison T.J., Moskowitz M.A., Yuan J. 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.
9. Degtarev A., Hitomi J., Germscheid M., Ch'en I., Korkina O., Teng X., Abbott D., Cuny G., Yuan C., Wagner G., Hedrick S., Gerber S., Lugovskoy A., Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins // *Nat. Chem. Biol*. 2008; 4 (5): 313–321. DOI: 10.1038/nchembio.83.
10. 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.
11. Oerlemans M., Liu J., Arslan F., den Ouden K., van Middelaar B., Doevendans P., Sluijter J. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia–reperfusion *in vivo* // *Basic Res. Cardiol*. 2012; 107: 270. DOI: 10.1007/s00395-012-0270-8.
12. Dmitriev Y., Minasian S., Demchenko E., Galagudza M. Necrostatin-5 limits infarct size in isolated rat heart // *European Heart Journal*. 2013; 34(suppl_1): P55538. DOI: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh310.P55538>.
13. Dmitriev Y., Minasian S., Dracheva A., Karpov A., Chefu S., Demchenko E., Galagudza M. Necrostatin 7 Limits Myocardial Infarct Size and Reduces Cardiac Remodeling After Permanent Coronary Occlusion in Rats // *Circulation*. 2014; 130: A17348.
14. Pavlovsky A., Lian D., Huang X., Yin Z., Haig A., Jevnikar A., Zhang Z. RIPK3-Mediated Necroptosis Regulates Cardiac Allograft Rejection // *American Journal of Transplantation*. 2014; 14: 1778–1790. DOI: 10.1111/ajt.12779.
15. 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. DOI: 10.1007/s10517-015-3078-3.
16. Zhao J., Jitkaewa S., Caia Z., Choksi S., Li Q., Luo J., Liu Z. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis // *PNAS*. 2012; 109 (14): 5322–5327. DOI: 10.1073/pnas.1200012109.
17. Linkermann A., Green A. Necroptosis // *N. Engl. J. Med*. 2014; 370: 455–465. DOI: 10.1056/NEJMra1310050.
18. Shin Y., Kim J., Yang Y. Switch for the necroptotic permeation pore // *Structure*. 2014; 22 (10): 1374–1376. DOI: 10.1016/j.str.2014.09.002.
19. Wu J., Huang Z., Ren J., Zhang Z., He P., Li Y., Ma J., Chen W., Zhang Y., Zhou X., Yang Z., Wu S.Q., Chen L., Han J. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis // *Cell Res*. 2013; 23: 994–1006. DOI: 10.1038/cr.2013.91.
20. Qu Y., Shi J., Tang Y., Zhao F., Li S., Meng J., Tang J., Lin X., Peng X., Mu D. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain // *Experimental Neurology Volume*. 2016; 279: 223–231. DOI: 10.1016/j.expneur.
21. Sun L., Wang H., Wang Z., He S., Chen S., Liao D., Wang L., Yan J., Liu W., Lei X., Wang X. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase // *Cell*. 2012; 148: 213–227. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.031.

Поступила в редакцию 05.07.2017

Утверждена к печати 08.11.2017

Дмитриев Юрий Валерьевич, мл. науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Минасян Саркис Минасович, ст. науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Байрашева Валентина Кузьминична, науч. сотрудник, Институт экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Демченко Елена Алексеевна, зав. научно-исследовательской лабораторией реабилитации, Институт сердца и сосудов, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

Галагудза Михаил Михайлович, директор Института экспериментальной медицины, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, г. Санкт-Петербург.

(✉) Дмитриев Юрий Валерьевич, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.

УДК 616.12-005.4-089.811

DOI: 10.20538/1682-0363-2017-4-126–133

For citation: Dmitriev Yu.V., Minasian S.M., Bayrasheva V.K., Demchenko E.A., Galagudza M.M. 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.

Direct comparison of cardioprotective effects of necroptosis inhibitors against global ischemia-reperfusion in the isolated rat heart

Dmitriev Yu.V., Minasian S.M., Bayrasheva V.K., Demchenko E.A., Galagudza M.M.

Federal Almazov North-West Medical Research Centre
2, Str. Accuratova, St.-Petersburg, 197341, Russian Federation

ABSTRACT

The study was aimed at comparative assessment of cardioprotective properties of various necroptosis inhibitors in the isolated perfused rat heart subjected to global ischemia-reperfusion.

Materials and Methods. The study was performed on 38 male Wistar rats weighting 250–300 g. The following necroptosis inhibitors were tested: necrostatin-1 (Nec-1), necrostatin-5 (Nec-5), necrostatin-1s (Nec-1s), and necrosulfonamide (NSA). All tested substances were administered intraperitoneally (i.p.) 1 hour prior to heart perfusion. Control animals were treated either with the vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO) or with 0,9% sodium chloride solution (Controls). The dose of necroptosis inhibitors was calculated on the basis of effective concentration (EC50) data. One hour after i.p. injection, the animals were anesthetized, the hearts were rapidly excised, the aorta was cannulated and retrogradely perfused according to Langendorff. After stabilization, the perfusion was stopped for 35 minutes, which was followed by 2 hours of reperfusion. Prior to stabilization, fluid-filled polyethylene balloon was placed into the left ventricle for left ventricular pressure registration. Coronary flow was measured at baseline and during reperfusion by means of perfusate collection. The volume of necrotic myocardium was expressed as a percentage of triphenyltetrazolium chloride-negative tissue relative to the entire heart volume.

Results. The volume of myocardial necrosis and functional heart parameters were not different between Controls and DMSO group. All tested necroptosis inhibitors demonstrated infarct-limiting effect. However, there were no differences between the groups. The volume of necrotic myocardium was $(50,5 \pm 7,82)\%$, $(29,9 \pm 3,42)\%$, $(27,7 \pm 3,42)\%$, $(30,6 \pm 3,82)\%$, and $(34,7 \pm 5,82)\%$ in DMSO, Nec-1, Nec-5, Nec-1s, and NSA groups, respectively ($p < 0,01$ vs. DMSO group).

Nec-1s and NSA were shown to improve functional recovery of the heart after ischemia. In particular, left ventricular developed pressure and coronary flow rate were higher in Nec-1s and NSA groups ($p < 0,01$).

compared with Controls and DMSO), while end-diastolic pressure was lower in Nec-1s and NSA groups vs. Controls and DMSO ($p < 0,01$).

Conclusions. It has been shown that Nec-1, Nec-5, Nec-1s, and NSA administration prior to global ischemia-reperfusion results in comparable infarct size limitation. In addition to infarct size limitation, Nec-1s and NSA are able to improve postischemic left ventricular function. This fact, along with low toxicity and optimal EC50, makes Nec-1s and NSA perspective candidates for preclinical and clinical development as cardioprotective agents.

Key words: heart, ischemia-reperfusion injury, cardioprotection, necroptosis, necrostatins.

Received July 05.2017
Accepted November 08.2017

Dmitriev Yury V., Junior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Minasian Sarkis M., Senior Researcher, Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Bayrasheva Valentina K., Researcher, Institute of Endocrinology, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Demchenko Elena A., Head of the Rehabilitation Laboratory, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

Galagudza Mikhail M., Director of the Institute of Experimental Medicine, Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St.-Petersburg, Russian Federation.

(✉) **Dmitriev Yury V.**, e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com.