

ДМИТРИЕВ Ю. В.¹, МИНАСЯН С. М.^{1,2},
ДЕМЧЕНКО Е. А.¹, БАЙРАШЕВА В. К.^{1,2},
ГАЛАГУДЗА М. М.^{1,2}

Исследование кардиопротективных эффектов новых ингибиторов некроптоза — некрсульфонамида и некростатина-1s на модели перфузии изолированного сердца у крыс

¹ Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com

Реферат

Минимизация необратимого повреждения миокарда после эпизода ишемии-реперфузии остается актуальной и до конца нерешенной проблемой. Среди множества фармакологических агентов, показавших свою эффективность в экспериментальных исследованиях, только единицы находят подтверждение своей эффективности в клинических исследованиях. В последние годы интерес исследователей прикован к механизмам развития программируемого некроза или некроптоза, имеющего молекулярные мишени для подавления. В настоящей работе нами на модели глобальной ишемии-реперфузии миокарда у крыс исследованы кардиопротективные эффекты высокоактивных и низкотоксичных ингибиторов некроптоза — некрсульфонамида и некростатина-1s. Продемонстрирован инфаркт-лимитирующий эффект данных соединений, а также лучшие параметры внутрисердечной гемодинамики после эпизода глобальной ишемии-реперфузии. Данные соединения могут представлять интерес для дальнейших доклинических исследований.

Ключевые слова: кардиопротекция, ишемическое и реперфузионное повреждение миокарда, некроптоз, некрсульфонамид, некростатин-1s.

Введение

Ишемия-реперфузия миокарда приводит к наступлению необратимого повреждения кардиомиоцитов и формированию постинфарктного рубца. Одним из наиболее активно исследуемых направлений кардиопротекции является модуляция различных вариантов программируемой клеточной гибели. К настоящему времени накоплен большой опыт применения модуляторов апоптоза при различных патологических процессах, в частности, при ишемическом и реперфузионном повреждении (ИРП) миокарда. В последние годы пристальное внимание исследователей привлекает некроптоз, который характеризуется морфологическими признаками некроза и активацией аутофагии, но, в отличие от некроза, имеет точки приложения для фармакологической модуляции. Ингибиторы некроптоза — некростатины (Nec) — показали свою способность уменьшать объем необратимого ИРП головного мозга и миокарда в условиях как кратковременной нормотермической глобальной ишемии миокарда, так и длительной холодовой глобальной ишемии, а также предотвращать постинфарктное ремоделирование миокарда левого желудочка и улучшать его функциональное

состояние. В настоящем исследовании нами впервые на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного сердца крысы изучены кардиопротективные эффекты у ингибитора некроптоза некрсульфонамида (NSA), осуществляющего “дистальную” блокаду некроптоза посредством подавления MLKL (mixed lineage kinase domain-like) псевдокиназы, а также кардиопротективные эффекты стабильного аналога Nec-1 — Nec-1s.

Цель исследования — оценка кардиопротективных эффектов NSA и Nec-1s на модели глобальной ишемии-реперфузии изолированного, перфузируемого по Лангендорфу сердца крысы.

Материал и методы исследования

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 крысах-самцах стока Wistar массой 250–350 г, наркотизированных хло-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ралгидратом в дозе 450 мг/кг. Животные были разделены на 4 группы: 1) группа контроля (Кон) (n=5); 2) группа диметилсульфоксида (ДМСО) (n=5); 3) группа некросульфонида (NSA) (n=8); 4) группа некростатина-1s (Nec-1s) (n=5). Все животные за 1 час до эксперимента получили внутривенную инъекцию физиологического раствора (группа контроля), либо диметилсульфоксида (группа ДМСО), либо NSA или Nec-1s в ДМСО (группы NSA или Nec-1s, соответственно). NSA и Nec-1s вводились в дозе 1,65 мг/кг. После изъятия сердца из грудной полости его подключали к модифицированному аппарату Лангендорфа [1]. По окончании 10-минутного стабилизационного периода вызывали 35-минутную глобальную ишемию путем прерывания ретроградной перфузии сердца оксигенированным раствором Кребса-Хенселейта. По окончании периода ишемии возобновляли перфузию в течение 120 мин. при температуре раствора 37°C. Для оценки параметров внутрисердечной гемодинамики проводилось измерение скорости коронарного потока (СКП), а также непрерывная регистрация внутрижелудочкового давления (ВЖД). Во время 35-минутной глобальной ишемии регистрировалось среднее ВЖД (СВЖД); в стабилизационном периоде и во время реперфузии - диастолическое и пульсовое ВЖД (ДВЖД и ПВЖД, соответственно). Регистрация ВЖД проводилось с помощью программно-аппаратного комплекса PhysExp (ООО «Кардиопротект»). По окончании периода реперфузии сердца нарезались на 5 равных по толщине поперечных срезов и в течение 15 минут окрашивались трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ). Затем получали цифровые фотографии срезов. Размер инфаркта рассчитывался 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 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 достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии выраженного инфаркт-лимитирующего эффекта как у NSA, так и у Nec-1s. Так в группе NSA размер некроза миокарда составил $32,2 \pm 14$ %, что достоверно ниже, чем в группах Кон и ДМСО ($57,2 \pm 6,6$ и $59,2 \pm 5,6$ %; $p = 0,016$ и $p = 0,038$, соответственно). В группе Nec-1s размер некроза миокарда составил $36 \pm 10,2$ % и также был достоверно меньшим, чем в группах Кон и ДМСО ($p = 0,02$ по сравнению с группами Кон и ДМСО). Размер некроза миокарда в экспериментальных группах представлены на рисунке 1.

По результатам проведенных экспериментов

наблюдались достоверно лучшие функциональные показатели миокарда экспериментальных животных в группах NSA и Nec-1s, по сравнению с группами Кон и ДМСО. Так, СКП в группе NSA была достоверно более высокой, чем в группах Кон и ДМСО ($p = 0,004$ и $p = 0,008$, соответственно). В группе Nec-1s СКП также была достоверно выше, чем в группах сравнения ($p = 0,009$ по сравнению с Кон и $p = 0,014$ по сравнению с группой ДМСО). Значения ПВЖД были достоверно более высокими ($p < 0,01$), а ДВЖД достоверно более низкими ($p < 0,01$) в группах ингибиторов некроптоза по сравнению с группами Кон и ДМСО. Нами не было выявлено достоверных различий в динамике нарастания СВЖД между экспериментальными группами. Параметры внутрисердечной гемодинамики представлены на рисунках 2–4.

Обсуждение результатов исследования

В настоящее время активно исследуется предотвращение ИРП миокарда с помощью модуляторов программируемой клеточной гибели. Среди всех типов программируемой клеточной гибели наиболее изученным является апоптоз. Однако изолированное подавление апоптоза не сопровождается уменьшением ИРП миокарда. Более того, существуют работы, показывающие, 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 [13]. В 2005 г. сотрудниками Гарвардской медицинской школы был открыт новый тип клеточной гибели - некроптоз, который характеризуется морфологическими признаками некроза и активацией аутофагии, но, в отличие от некроза, имеет точки приложения для фармакологической модуляции. В результате скрининга порядка 15000 химических соединений с потенциальной способностью подавлять некротическую гибель человеческих моноцитов, были найдены несколько соединений, способных ее предотвращать. Названные некростатинами, эти вещества показали инфаркт-лимитирующую активность на модели фокальной ишемии головного мозга у мышей [3]. В 2008 г. А. Degterev и соавт. выявили один из механизмов действия некростатинов — специфическое ингибирование RIP-1 киназы [4]. В 2007 г. С. Smith и соавт. опубликовали первые результаты применения Nec-1 в качестве кардиопротектора. На модели изолированного сердца по Лангендорфу в условиях глобальной ишемии-реперфузии миокарда Nec-1 показал способность уменьшать объем некроза миокарда [10]. На модели регионарной ишемии-реперфузии миокарда у мышей *in vivo* была показана способность Nec-1 уменьшать объем некроза миокарда. Также была отмечена способность Nec-1 уменьшать конечно-диастолический объем и увеличивать фракцию выброса левого желудочка после экспериментального инфаркта [8]. В 2013 г. нами впервые была продемонстрирована способность Nec-5 уменьшать объем необратимого повреждения миокарда при глобальной ишемии-реперфузии, а также было продемонстрировано наличие положительного

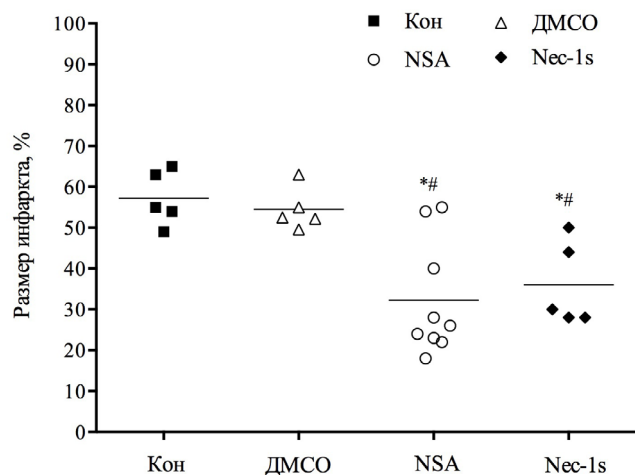


Рис. 1. Размер инфаркта миокарда в экспериментальных группах. * — $p < 0.05$ по ср. с Кон, # — $p < 0.05$ по ср. с ДМСО

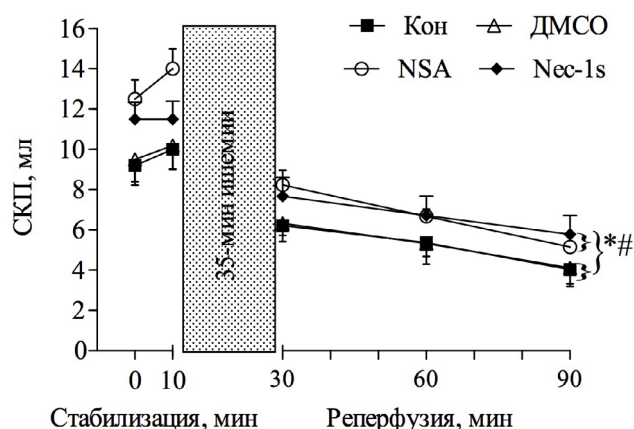


Рис. 2. Скорость коронарного потока в экспериментальных группах. * — $p < 0.05$ по сравнению с контролем, # — $p < 0.05$ по сравнению с ДМСО

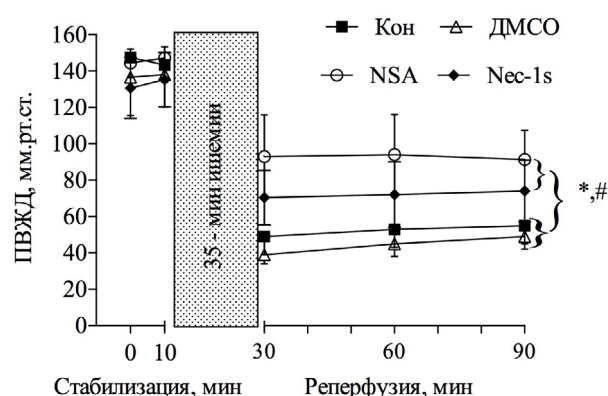


Рис. 3. Пульсовое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии. * — $p < 0.01$ по ср. с Кон, # — $p < 0.01$ по ср. ДМСО

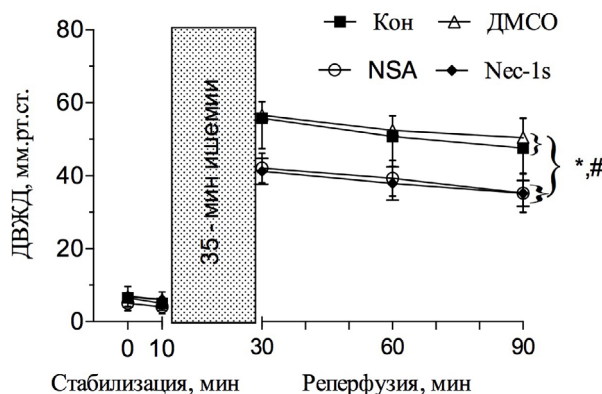


Рис. 4. Диастолическое внутрижелудочковое давление в стабилизационном периоде и во время реперфузии. * — $p < 0.01$ по ср. с Кон, # — $p < 0.01$ по ср. ДМСО

инотропного эффекта у Nec-1 [5]. В дальнейшем нами были обнаружены кардиопротективные эффекты Nec-7, проявляющиеся в уменьшении объема и длины рубца и уменьшении постишемической дисфункции миокарда через 21 день после перевязки левой коронарной артерии у крыс [6]. Кроме того, на модели длительной холодной консервации изолированного сердца крысы нашей группой обнаружено усиление кардиопротективных эффектов кардиopleгического раствора Кустодиол при добавлении в него ингибитора некроптоза Nec-1 [2].

Вместе с тем, существует ряд ограничений для проведения клинических исследований Nec-1, в особенности, его узкая терапевтическая широта и низкая стабильность. В отличие от него, существует активный аналог Nec-1 – Nec-1s, обладающий низкой токсичностью и высокой активностью.

Работы, посвященные изучению возможной протективной активности Nec-1s при ишемии-реперфузии миокарда до настоящего времени отсутствовали.

Другим, перспективным, с нашей точки зрения, ингибитором некроптоза является NSA, подавляющий активность MLKL, которая фосфорилируется с участием RIP3 киназы и является компонентом так называемого некротомного комплекса и запускает финальную стадию некроптоза [7,14]. Активация этого спирального белка приводит к его встраиванию в клеточную мембрану, повышению ее проницаемости и, в конечном итоге, приводит к гибели клетки [9]. В исследованиях была продемонстрирована роль MLKL при самой разнообразной патологии, в особенности сопровождающейся развитием воспалительного ответа. Так, в работе J. Wu и соавт. на линии нокаутных по MLKL мышей была продемон-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

стрирована значимость MLKL в развитии клеточного повреждения при экспериментальном панкреатите, вызванном введением церулеина [12]. На культуре клеток линии HeLa была продемонстрирована эффективность NSA в подавлении некроптоза, а также подтверждена роль MLKL псевдокиназы в качестве специфической мишени NSA [11].

Литература

1. Минасян С.М., Галагудза М.М., Сонин Д.Л. и соавт. Методика перфузии изолированного сердца крысы // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. Т. 8. № 4. С. 54-59.
2. Ю.В.Дмитриев, С.М.Минасян, Л.В.Васина и соавт. Влияние ингибиторов некроптоза и аутофагии на морфофункциональное состояние миокарда при холодовой консервации донорского сердца крысы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159. № 6. С. 773-778.
3. Degterev A, Huang Z, Boyce M. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential in ischemic brain injury // *Nat. Chem. Biol.* 2005. Vol. 1. № 2. P. 116-119.
4. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M. et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins // *Nat.Chem.Biol.* 2008. Vol. 4. № 5. P. 313-321.
5. Dmitriev Y, Minasian S, Demchenko E. et al. Necrostatin-5 limits infarct size in isolated rat heart // *European Heart Journal.* 2013. Vol. 34. Abstract Supplement.
6. Dmitriev Y, Minasian S, Dracheva A. et al. Necrostatin 7 Limits Myocardial Infarct Size and Reduces Cardiac Remodeling After Permanent Coronary Occlusion in Rats // *Circulation.* 2014. Vol. 130. A17348.
7. Linkermann A, Green A. Necroptosis // *N Engl J Med.* 2014. Vol. 370. P. 455-65.

Выводы

Таким образом, по результатам проведенного исследования, можно утверждать о наличии у некросульфонида и некростатина-1s эффектов, проявляющихся в их способности уменьшать размер инфаркта миокарда и улучшать внутрисердечную гемодинамику в условиях глобальной ишемии-реперфузии миокарда.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 15-04-018138.

8. Oerlemans M, Liu J, Arslan f. et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo // *Basic Res. Cardiol.* 2012. Vol. 107. P. 270.
9. Shin Y, Kim J, Yang Y. Switch for the necroptotic permeation pore // *Structure.* 2014. Vol. 22. №10. P. 1374-1376.
10. Smith C, Davidson S, Lim S. et al. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2007. Vol. 21. P. 227-233.
11. Sun L, Wang H, Wang Z. et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase // *Cell.* 2012. Vol. 148. P. 213-227.
12. Wu J, Huang Z, Ren J. et al. Mlkl knockout mice demonstrate the indispensable role of Mlkl in necroptosis // *Cell Res.* 2013. Vol. 23. P. 994-1006.
13. Zhang Y, Kohler K, Xu J. et al. 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.
14. Zhao J, Jitkaewa S, Caia Z. et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis // *PNAS.* 2012. Vol.109. №14. P. 5322- 5327.

UDK [616.127-005.8]

Dmitriev Yu. V.¹, Minasian S. M.^{1,2}, Demchenko E. A.¹, Bayrasheva V. K.^{1,2}
Galagudza M. M.^{1,2}

The investigation of cardioprotective effects of novel necroptosis inhibitors – necrosulfonamide and necrostatin-1s in the rat model of isolated perfused rat heart

¹ Federal Almazov North-West Medical Research Centre
197341, St-Petersburg, Akkuratova str., 2

² First I.P. Pavlov Federal Medical University
197022, St-Petersburg, Lev Tolstoy str., 6/8
e-mail: yury.v.dmitriev@gmail.com

Abstract

Minimization of irreversible myocardial damage after ischemia-reperfusion episode remains valid and unsolved problem. Among of many pharmacological agents have been effective in experimental studies, only a few of them are evidence of its efficacy in clinical trials. This is largely explained by the mechanism of action of these compounds, aimed primarily at preventing reperfusion injury, and do not affect myocardial cells subjected to prolonged ischemia without reperfusion. In recent years, the interest of researchers confined to the mechanisms of programmed necrosis or necroptosis, which morphologically has no different to necrosis, but has molecular targets for suppression. In this paper, on the model of global ischemia-reperfusion in rats we have studied cardioprotective effects of high-activity and low-toxicity necroptosis inhibitors — necrosulfonamide and necrostatin-1s. We demonstrated the infarct-limiting effect of these compounds, as well as the best parameters of intracardiac hemodynamics after an episode of global ischemia-reperfusion. We believe these compounds are interesting for further preclinical studies.

Keywords: cardioprotection, myocardial ischemia-reperfusion injury, preservation solutions.

References

1. Minasjan S.M., Galagudza M.M., Sonin D.L. et al. Metodika perfuzii izolirovannogo serdca krysy [Technique of the isolated rat's heart perfusion] // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija [Regional hemodynamics and microcirculation]. 2009. V. 8. N. 4. P. 54-59. [In Russian].
2. Ju.V.Dmitriev, S.M.Minasjan, L.V.Vasina i soavt. Vlijanie ingibitorov nekroptoza i autofagii na morfofunkcional'noe sostojanie miokarda pri holodovoj konservacii donorskogo serdca krysy // Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2015. T. 159. № 6. S. 773-778. In Russian].
3. Degterev A, Huang Z, Boyce M. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential in ischemic brain injury // Nat. Chem. Biol. 2005. Vol. 1. № 2. P. 116-119.
4. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M. et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins // Nat.Chem.Biol. 2008. Vol. 4. № 5. P. 313-321.
5. Dmitriev Y, Minasian S, Demchenko E. et al. Necrostatin -5 limits infarct size in isolated rat heart // European Heart Journal. 2013. Vol. 34. Abstract Supplement.
6. Dmitriev Y, Minasian S, Dracheva A. et al. Necrostatin 7 Limits Myocardial Infarct Size and Reduces Cardiac Remodeling After Permanent Coronary Occlusion in Rats // Circulation. 2014. Vol. 130. A17348.
7. Linkermann A, Green A. Necroptosis // N Engl J Med. 2014. Vol. 370. P. 455-65.
8. Oerlemans M, Liu J, Arslan f. et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo // Basic Res. Cardiol. 2012. Vol. 107. P. 270.
9. Shin Y, Kim J, Yang Y. Switch for the necroptotic permeation pore // Structure. 2014. Vol. 22. №10. P. 1374-1376.
10. Smith C, Davidson S, Lim S. et al. Necrostatin: A Potentially Novel Cardioprotective Agent? // Cardiovasc. Drugs Ther. 2007. Vol. 21. P. 227-233.
11. Sun L, Wang H, Wang Z. et al. Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 Kinase // Cell. 2012. Vol. 148. P. 213-227.
12. Wu J, Huang Z, Ren J. et al. Mkl knockout mice demonstrat the indispensable role of Mkl in necroptosis // Cell Res. 2013. Vol. 23. P. 994-1006.
13. Zhang Y, Kohler K, Xu J. et al. 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.
14. Zhaoa J, Jitkaewa S, Caia Z. et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis // PNAS. 2012. Vol.109. №14. P. 5322- 5327.