

Эндогенный ингибитор Na/K-АТФазы, маринобуфагенин, при преэклампсии

И.В. Аверина, В.А. Резник, Н.И. Тапильская, С.Н. Гайдук, Е.В. Фролова, О.В. Федорова, А.А. Багров.

Национальный институт старения, Национальные институты здоровья, Балтимор, США.

Кафедра акушерства и гинекологии Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, Санкт-Петербург.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург.

Резюме

Преэклампсия является основной причиной материнской смертности при беременности, однако патогенез этого заболевания изучен недостаточно. На основании антигипертензивного действия препарата DIGIBIND (аффинно-очищенных антител к дигоксину) при преэклампсии, было предположено, что эндогенные дигиталис-подобные ингибиторы Na/K-АТФазы играют роль в патогенезе преэклампсии. Мы предположили, что маринобуфагенин (МБГ), эндогенный ингибитор Na/K-АТФазы и вазоконстриктор, вызывает угнетение Na/K-АТФазы при преэклампсии. Уровень концентрации МБГ в плазме крови у 12 больных с преэклампсией средней тяжести (28 ± 2 лет, срок беременности 37 ± 1 недель, артериальное давление $149 \pm 3 / 93 \pm 3$ мм рт.ст.) был в 2 раза выше чем у 6 обследованных с неосложненной беременностью ($1,58 \pm 0,15$ и $0,80 \pm 0,11$ нмоль/л; $P < 0,01$). Повышение содержания МБГ в плазме крови сопровождалось 50% угнетением активности Na/K-АТФазы в эритроцитах. Инкубация эритроцитов в присутствии антител к оубаину не вызвала статистически достоверного восстановления активности фермента, эффект DIGIBIND имел пограничную достоверность, а антитела к МБГ вызвали восстановление активности Na/K-АТФазы до уровня контрольных значений. Полученные данные свидетельствуют о том, что МБГ является вероятным фактором патогенеза преэклампсии и что связывание циркулирующего МБГ специфическими антителами может быть одним из подходов к лечению этого заболевания.

Ключевые слова: преэклампсия, Na/K-АТФаза, вазоконстрикция, маринобуфагенин.

Resume

Marinobufagenin, an endogenous Na/K-ATPase inhibitor, in preeclampsia

I.V. Averina, V.A. Reznik, N.I. Tapilskaya, S.N. Gaidukov, E.V. Frolova, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov

Although preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and fetal mortality, its pathogenesis is not fully understood. Endogenous digitalis-like sodium pump ligands (SPLs) are believed to be involved in pathophysiology of PE, as illustrated by clinical observations that DIGIBIND, a digoxin antibody which binds SPLs, lowers blood pressure (BP) in PE. Recently we reported that plasma levels of marinobufagenin (MBG), a vasoconstrictor SPL, are increased four-fold in patients with severe PE. In the present study, we tested whether polyclonal antibodies to MBG, and ouabain, and DIGIBIND can reverse inhibition of erythrocyte Na/K-ATPase (NKA) from patients with mild PE. Development of PE was associated with two-fold rise in plasma MBG levels ($1,58 \pm 0,15$ vs. $0,80 \pm 0,11$ nmol/L; $P < 0,01$). The activity of erythrocyte NKA in 12 patients with PE (BP, $149 \pm 3 / 93 \pm 3$ mm Hg; 28 ± 2 years; gestational age, 37 ± 1 weeks) was lower, than in 6 normotensive gestational age-matched subjects ($1,56 \pm 0,18$ vs. $3,11 \pm 0,16$ μ mol Pi/ml/hr; $P < 0,001$). In vitro treatment of erythrocytes from PE patients with anti-MBG antibody fully restored the NKA activity ($3,26 \pm 0,41$ μ mol Pi/ml/hr; $P < 0,01$), the effects of DIGIBIND was marginally significant ($2,53 \pm 0,32$ μ mol Pi/ml/hr), while anti-ouabain antibody was not effective ($2,25 \pm 0,25$ μ mol Pi/ml/hr, $P > 0,5$) were less effective. Our present observations provide evidence for a role of MBG in pathogenesis of PE, and suggest that antibodies against MBG may be used to treat the syndrome.

Key words: Preeclampsia; Na/K-ATPase; vasoconstriction; marinobufagenin; DIGIBIND.

Введение

Преэклампсия (синдром, включающий в себя гипертензию, протеинурию, отеки и задержку в развитии плода) является основной причиной смертности при беременности (1). Тем не менее, специфические механизмы, приводящие к развитию гипертензии при преэклампсии остаются малоизученными. Соответственно, отсутствуют специфические и патогенетически обоснованные подходы к фармакологической терапии преэклампсии и к профилактике этого опасного осложнения беременности (2). Согласно одной из гипотез ключевую роль в патогенезе преэклампсии играют эндогенные дигиталис-

подобные факторы (ЭДФ) – стероидные натрийуретические ингибиторы Na/K-АТФазы (3).

При объем-зависимой артериальной гипертензии выработка ЭДФ происходит с адаптивной целью, уменьшить объем циркулирующей жидкости посредством натрийуреза, обусловленного угнетением Na/K-АТФазы в почечных канальцах (4). При гипертензии чрезмерная продукция ЭДФ вызывает угнетение Na/K-АТФазы в мембране гладкомышечных клеток сосудов, увеличение внутриклеточной концентрации натрия приводит к активации $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$ обмена и усугубляет вазоконстрикцию (5).

Подобно препаратам дигиталиса один из ЭДФ, эндогенный оуабайн, имеет карденолидную природу (5). В тканях млекопитающих также присутствует ингибитор Na/K-АТФазы буфадисеполидной природы, маринобуфогенин (МБГ) (6). МБГ, селективно взаимодействуя с альфа-1 изоформой Na/K-АТФазы, основной формой этого фермента в почках и сосудах, является вазоконстриктором и обладает натрийуретической активностью (7,8). Содержание МБГ в плазме крови и почечная экскреция этого вещества существенно возрастают при увеличении объема циркулирующей жидкости и при задержке натрия – у больных эссенциальной гипертензией и хронической почечной недостаточностью (9), при застойной недостаточности кровообращения (10), и у крыс линии Dahl-S с солевой-чувствительной гипертензией (11).

Беременность сопровождается задержкой жидкости и натрия в организме (12), что является стимулом для продукции МБГ (13). Однако, при нормальной беременности увеличение продукции МБГ не сопровождается развитием артериальной гипертензии (13,14), что можно объяснить умеренным повышением уровня продукции гормона и даун-регуляцией рецепторов для МБГ в сарколемме сосудов (13). У больных преэклампсией уровень МБГ в плазме крови существенно возрастает (14), а у крыс с гестационной гипертензией повышенной продукции МБГ сопровождается сенсибилизацией Na/K-АТФазы к этому гормону (15). Введение беременным гипертензивным крысам антител к МБГ вызывает снижение артериального давления и сопровождается увеличением активности Na/K-АТФазы в гладких мышцах сосудов (13,15).

В течение 20 последних лет описано 15 случаев успешного применения препарата DIGIBIND при преэклампсии (16-18). Антигипертензивная активность DIGIBIND (фаб-фрагментов аффинно-очищенных поликлональных антител к дигоксину) обусловлена реверсией вызванной ЭДФ вазоконстрикции. В 2005 г. было показано, что выделенный из мочи беременных гипертензивных крыс эндогенный ингибитор Na/K-АТФазы, взаимодействует с DIGIBIND и с антителами к МБГ в большей степени чем с антителами к оуабайну (13).

Целью настоящего исследования была дальнейшая проверка гипотезы, согласно которой повышение концентрации МБГ в плазме крови при преэклампсии вызывает угнетение Na/K-АТФазы.

Материал и методы

Обследовано 12 больных преэклампсией умеренной тяжести (возраст 28 ± 2 лет, срок беременности 37 ± 1 неделя, систолическое артериальное давление 149 ± 3 мм рт.ст., диастолическое артериальное давление 93 ± 3 мм рт.ст.). Пациенты были обследованы в течение первых 3-6 часов после госпитализации. Критериями исключения были: артериальная гипертензия и хронические сердечно-сосудистые заболевания в анамнезе, хронические заболевания почек и печени, эндокринная патология, ожирение 3 ст. Контрольную группу составили 6 здоровых нормотензивных беременных (возраст 25 ± 1 лет, срок беременности 38 ± 1 неделя).

После осмотра обследуемых 10 мл венозной крови забирали в гепаринизированные пробирки. 4 мл крови центрифугировали (1,500 g; 15 минут) и полученную

плазму замораживали и хранили при -20°C для иммунофлуорометрического определения содержания МБГ по ранее описанному методу (7,11).

В 6 мл крови по ранее описанной методике определяли активность Na/K-АТФазы в эритроцитах в присутствии и в отсутствие поликлональных антител к МБГ, поликлональных антител к оуабайну и антител к дигоксину (DIGIBIND). DIGIBIND использовали в концентрации 10 мкг/мл, приблизительно соответствующей дозе этого препарата применяемой у больных преэклампсией (16-18). Антитела к МБГ и оуабайну использовали в концентрации, реверсирующей IC_{50} по угнетению Na/K-АТФазы из мозгового вещества почек крыс линии Sprague-Dawley (альфа-1 изоформа) МБГ и Na/K-АТФазы из коры больших полушарий новорожденных крыс линии Sprague-Dawley (альфа-3 изоформа) оуабайном, как было описано ранее.

Поликлональные антитела к МБГ (сыворотка anti-MBG-P) и оуабайну (сыворотка anti-ouabain-SPB05) были получены при иммунизации кроликов МБГ и оуабайном, конъюгированными с бычьим сывороточным альбумином производства фирмы Sigma Chemicals (США). Препарат DIGIBIND (фирма Glaxo Smith Kline) был получен на коммерческой основе.

Результаты обрабатывали статистически (программа GraphPad Prism 3) с использованием однофакторного дисперсионного анализа (repeated measures ANOVA) с последующим post hoc анализом (test Bonferroni). Для парного сравнения использовали t-test.

Результаты и обсуждение

Как показано на рис. 1А, развитие преэклампсии сопровождалось двукратным увеличением уровня содержания МБГ в плазме крови по сравнению с концентрацией этого гормона в крови обследованных с неосложненной беременностью ($1,58 \pm 0,15$ и $0,80 \pm 0,11$ нмоль/л; $P < 0,01$). Активность Na/K-АТФазы в эритроцитах, полученных от нормотензивных беременных составила $3,11 \pm 0,16$ мкмоль Фн/мл/час. Повышение содержания МБГ в плазме крови при преэклампсии сопровождалось 50% угнетением активности Na/K-АТФазы в эритроцитах ($1,56 \pm 0,18$ мкмоль Фн/мл/час) (рис. 2А). Достоверность эффекта антител DIGIBIND имела пограничный характер ($P = 0,03$ при использовании t-теста и $P > 0,05$ при использовании однофакторного дисперсионного анализа). Инкубация эритроцитов в присутствии антител к оуабайну не вызывала статистически достоверного восстановления активности фермента, в то время как антитела к МБГ вызывали восстановление активности Na/K-АТФазы до уровня контрольных значений.

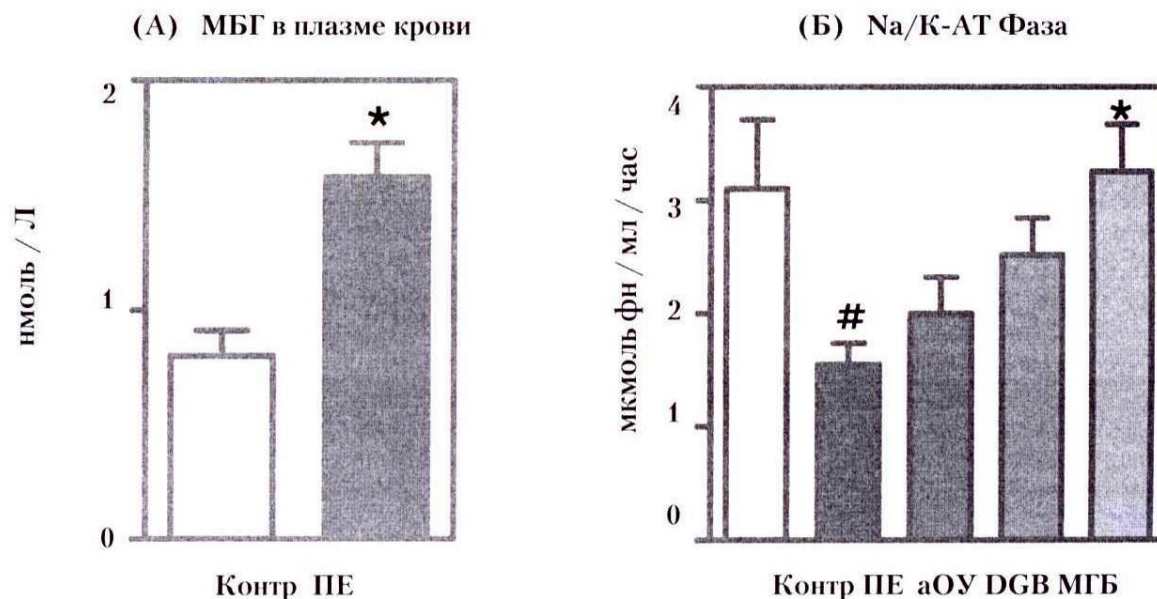
Полученные данные подтверждают ранее опубликованные нами результаты (14), согласно которым развитие преэклампсии сопровождается повышением концентрации МБГ в плазме крови. Так, ранее было показано, что у больных с тяжелой преэклампсией и артериальным давлением $161 \pm 5/104 \pm 3$ мм рт.ст. концентрация МБГ в плазме крови составила $2,63 \pm 0,01$ нмоль/л (14). В настоящем исследовании на фоне более умеренного повышения артериального давления содержание МБГ в плазме крови было меньшим, чем в предыдущем исследовании и составило $1,68 \pm 0,15$ нмоль/л. Концентрации гормона в плазме крови при неосложненной бере-

менности в настоящем и предыдущем исследовании достоверно не отличались друг от друга и составили $0,80 \pm 0,11$ нмоль/л и $0,63 \pm 0,08$ нмоль/л, соответственно. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что уровень содержания МБГ в плазме крови может быть маркером тяжести преэклампсии.

В «патофизиологическом» диапазоне концентраций (1-3 нмоль/л) МБГ *in vitro* вызывает 25% угнетение активности Na/K-АТФазы в сарколемме человеческих легочных артерий (19) и вызывает сокращения (20% максимума) изолированных мезентериальных артерий (20). Следовательно, концентрации МБГ присутствующие в плазме крови при преэклампсии, способны внести существенный вклад в развитие системной вазоконстрикции. Таким образом, МБГ является не только маркером, но и вероятным патогенетическим фактором преэклампсии.

В настоящем исследовании мы сравнили эффект трех антител, способных взаимодействовать с ЭДФ, на активность Na/K-АТФазы в эритроцитах. Наименьшей активностью обладали антитела к оуабанну, достоверность эффекта DIGIBIND была пограничной, а антитела к МБГ восстанавливали активность Na/K-АТФазы до

контрольного уровня. Эти наблюдения находятся в соответствии с ранее полученными нами клиническими и экспериментальными данными. Так, у пациентов с тяжелой преэклампсией уровень МБГ возрастал в 8 раз (2,63 нмоль/л) по сравнению с концентрацией этого гормона при неосложненной беременности (14), в то время как уровень содержания эндогенного оуабанна повышался лишь в 2,5 раза составлял 0,697 нмоль/л. У крыс с экспериментальной гестационной гипертензией, вызванной повышенным потреблением хлористого натрия, почечная экскреция МБГ удваивалась по сравнению с нормотензивными беременными животными, а экскреция эндогенного оуабанна возрастала менее, чем на 25% (13). В том же эксперименте введение крысам с гестационной гипертензией антител к МБГ вызывало снижение артериального давления (13,15) и сопровождалось увеличением активности Na/K-АТФазы в аорте (13). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что МБГ является фактором патогенеза преэклампсии и что связывание циркулирующего МБГ специфическими антителами может быть одним из подходов к лечению этого заболевания.



Аверина и соавт., Эндогенный ингибитор Na/K-АТФазы, маринбуфагенин, при преэклампсии; 2006

Рисунок 1:

(А) – Концентрация МБГ в плазме крови у 6 обследованных с неосложненной беременностью (КОНТР) и у 12 больных с преэклампсией (ПЭ). М ± м. (*) – $P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой (t-тест).

(Б) – Активность Na/K-АТФазы в эритроцитах 6 обследованных с неосложненной беременностью (КОНТР) и 12 больных с преэклампсией (ПЭ). аОУ, аМБГ и DGB – активность Na/K-АТФазы в эритроцитах больных с преэклампсией в присутствии антител к оуабанну, маринбуфагенину и DIGIBIND, соответственно. М ± м; (#) – $P < 0,01$ по сравнению с контрольной группой; (*) – $P < 0,01$ по сравнению с активностью в интактных эритроцитах больных с преэклампсией (однотакторный дисперсионный анализ).

Список литературы

1. MacKay A.P., Berg C.J., Atrash H.K. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2001; 97:533-538.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365: 785-799.
3. Graves SW. The possible role of digitalislike factors in pregnancy-induced hypertension. *Hypertension* 1987; 10: 184-186.
4. de Wardener HE, Clarkson EM. Concept of natriuretic hormone. *Physiol Rev.* 1985; 65: 658-759.
5. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain – control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993; 264: C. 1367-1387.
6. Bagrov AY, Fedorova OV, Dmitrieva RI, Howald WN, Hunter AP, Kuznetsova EA, Shpen VM. Bufodienolide nature of endogenous inhibitor of Na/K ATPase in the urine from patients with acute myocardial infarction. *Hypertension*, 1998; 31: 1097-1103.

7. Fedorova OV, Lakatta EG, Bagrov AY. Differential effects of acute NaCl loading on endogenous ouabain-like and marinobufagenin-like ligands of the sodium pump in Dahl hypertensive rats. *Circulation*. 2000; 102: 3009-3014.
8. Fedorova OV, Agalakova NI, Talan MI, Lakatta EG, Bagrov AY. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signalling in NaCl loaded Dahl-S rats. *J Hypertens* 2005; 23: 1515-1523.
9. Gonick HC, Y Ding, Vaziri ND, Bagrov AY, Fedorova OV. Simultaneous measurement of marinobufagenin, ouabain and hypertension-associated protein in various disease state. *Clin Exp Hypertens* 1998; 20: 617-627.
10. Fridman AI, Matveev SA, Agalakova NI, Fedorova OV, Lakatta EG, Bagrov AY. Marinobufagenin, an endogenous ligand of α -1 Na/K-ATPase, is a marker of congestive heart failure severity. *J Hypertension*. 2002; 20: 1189-1194.
11. Fedorova OV, Talan MI, Agalakova NI, Lakatta EG, Bagrov AY. An endogenous ligand of α -1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride dependent hypertension. *Circulation*. 2002; 105: 1122-1127.
12. Gallery EDM, Hungor SM, Gyory AZ. Plasma volume concentration: a significant factor in both pregnancy-associated hypertension (pre-eclampsia) and chronic hypertension in pregnancy. *Q J Med* 1979; 192: 593-602.
13. Fedorova OV, Kolodkin NI, Agalakova NI, Namikas AR, Bzhelyansky A, St-Louis J, Lakatta EG, Bagrov AY. Antibody to marinobufagenin lowers blood pressure in pregnant rats on a high NaCl intake. *J Hypertens* 2005; 23: 835-842.
14. Lopatin DA, Ailamazian EK, Dmitrieva RI, Shpen VM, Fedorova OV, Doris PA, Bagrov AY. Circulating bufadienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. *J Hypertension*. 1999; 17: 1179-1187.
15. Vu HU, Iamasi-Irimie MR, Pridjian CA, Whitbred JM, Durst JM, Bagrov AY, Fedorova OV, Pridjian FG, Puschett JB. The involvement of marinobufagenin in a rat model of human preeclampsia. *Am J Nephrol* 2005; 25: 520-528.
16. Goodlin RC. Antidigoxin antibodies in eclampsia. *New Engl J Med* 1988; 318: 518-519.
17. Adair CD, Buckalew V, Taylor K, Ernest JM, Frye AH, Evans C, Veille JC. Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin. *Am J Nephrol* 1996; 16: 529-531.
18. Adair D, Hinshaw A, Russell G, Rose J, Veille J, Buckalew V. Effects of Fab digoxin-specific antibodies on mean arterial pressure in severe preeclampsia. *Am J Hypertens* 1997; 10: 11A.
19. Bagrov AY, Dmitrieva RI, Fedorova OV, Kazakov GP, Roukoyatkina NI, Shpen VM. Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive substance: A possible endogenous Na,K-ATPase inhibitor with vasoconstrictor activity. *Am J Hypertens*. 1996; 9: 982-990.
20. Bagrov AY, Fedorova OV. Effects of two putative endogenous digitalis-like factors, marinobufagenin and ouabain, on the Na/K pump in human mesenteric arteries. *J Hypertension*. 1998; 16: 1953-1958.