

Иммунонейтрализация эндогенных ингибиторов Na/K-АТФазы при преэклампсии

О.В. Федорова, В.А. Резник, Н.И. Тапильская, В.А. Кашкин, Е.В. Фролова, Е.Р. Никитина, А.Я. Багров

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург Национальный институт старения, Национальные институты здоровья, Балтимор, США
Кафедра акушерства и гинекологии Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии, Санкт-Петербург

Резюме

Преэклампсия является основной причиной материнской смертности при беременности, но патогенез этого заболевания изучен недостаточно. На основании антигипертензивного действия препарата Digibind (аффинно-очищенных антител к дигоксину) при преэклампсии, была высказана гипотеза о том, что эндогенные дигиталис-подобные ингибиторы Na/K-АТФазы играют роль в патогенезе преэклампсии. Мы предположили, что повышенный уровень эндогенного маринобуфагенина (МБГ), ингибитор Na/K-АТФазы и вазоконстриктора, вызывает угнетение Na/K-АТФазы при преэклампсии. В настоящей работе мы сравнили содержание МБГ в плаценте при преэклампсии и при неосложненной беременности и исследовали иммунологические свойства эндогенного МБГ, выделенного из плацент при преэклампсии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Уровень концентрации МБГ в плацентах у 6 беременных женщин с преэклампсией (29 ± 2 лет, срок беременности 37 ± 1 неделя, артериальное давление $165 \pm 9/105 \pm 5$ мм рт.ст.) был в 4 раза выше чем у 8 обследованных с неосложненной беременностью. При ВЭЖХ фракционировании хлороформного экстракта, полученного из плацент беременных женщин с преэклампсией, время элюции эндогенного МБГ было идентично времени элюции МБГ стандарта. Digibind взаимодействовал с хроматографическими фракциями, соответствующими МБГ и другим буфадиенолидам, но не эндогенному оубаину. Полученные данные свидетельствуют о том, что МБГ является одним из факторов патогенеза преэклампсии и что иммунонейтрализация МБГ может быть одним из подходов к лечению этого заболевания.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, преэклампсия.

Immunoneutralization of endogenous Na/K-ATPase inhibitors in preeclampsia

O.V. Fedorova, V.A. Reznik, N.I. Tapilskaya, V.A. Kashkin, E.V. Frolova, E.R. Nikitina, A.Y. Bagrov

Resume

Although preeclampsia (PE) is a major cause of maternal and fetal mortality, its pathogenesis is not fully understood. Endogenous digitalis-like cardiotonic steroids (CTS) are implicated in the pathophysiology of PE, as illustrated by clinical observations that Digibind, a digoxin antibody which binds CTS, lowers blood pressure in patients with PE. Recently we reported that plasma levels of marinobufagenin (MBG), a bufadienolide vasoconstrictor CTS, are increased four-fold in patients with severe PE. In the present study, we compared levels of MBG in normal and preeclamptic placentae, and tested whether antibodies against MBG, and against ouabain for their interaction with the material purified from preeclamptic placentae via high-performance liquid chromatography (HPLC). Levels of MBG, but not that of endogenous ouabain, exhibited a four-fold elevation in preeclamptic placentae. The elution time of endogenous placental MBG-like immunoreactive material from reverse-phase HPLC column was identical to that of authentic MBG. Immunoassay based on Digibind did not detect cross-reactivity with HPLC containing ouabain-like immunoreactive material, but cross-reacted with HPLC fractions having retention time similar to that of MBG and other bufadienolides. Our results demonstrate that levels of MBG are significantly elevated in preeclamptic placentae, and suggest that MBG is a potential target for immunoneutralization in patients with preeclampsia.

Key words: hypertension, preeclampsia.

Статья поступила в редакцию: 11.03.08. и принята к печати: 06.03.08.

Введение

Несмотря на то, что преэклампсия является основной причиной материнской смертности [1], специфические подходы к терапии этого синдрома отсутствуют, а механизмы патогенеза преэклампсии исследованы недостаточно [2]. Согласно одной из гипотез важную роль в патогенезе преэклампсии играют эндогенные дигиталис-подобные факторы

(ЭДФ) — стероидные натрийуретические ингибиторы Na/K-АТФазы [3].

При объем-зависимых формах артериальной гипертензии выработка ЭДФ происходит с адаптивной целью — для снижения объема циркулирующей жидкости посредством натрийуреза, опосредованного угнетением Na/K-АТФазы в почечных канальцах [4]. При гипертензии чрезмерная продукция ЭДФ может вызывать

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].

Поскольку нормально протекающая беременность сопровождается задержкой жидкости и позитивным балансом натрия в организме [6, 7], интерес к ЭДФ при беременности возник вскоре после открытия эндогенных ингибиторов натриевого насоса. Graves и соавторы показали, что уровень содержания дигоксиноподобной иммунореактивности умеренно повышен при физиологической беременности и существенно повышен при гестационной гипертензии [3, 8]. На основании этих наблюдений авторами было высказано предположение о том, что ЭДФ может являться одним из факторов патогенеза преэклампсии. В течение нескольких последующих лет данные Graves и соавт. нашли подтверждение в работах других исследователей [9–12].

Результаты экспериментальных исследований также указывали на участие ЭДФ в патогенезе преэклампсии. Убедительные данные, свидетельствующие о вкладе ЭДФ в патогенез преэклампсии, основаны на экспериментальных и клинических исследованиях, проведенных с использованием препарата Digibind. Digibind представляет собой лиофилизированные Fab фрагменты аффинно-очищенных овечьих анти-дигоксиновых антител [13]. Было показано, что Digibind обладает перекрестной иммунореактивностью с ЭДФ [14] и вызывает снижение артериального давления у крыс с объем-зависимой гипертензией, сопровождающейся повышением концентрации ЭДФ в плазме крови [15].

Известно, что плацента является местом синтеза ЭДФ [16]. Di Grande и соавт. показали, что Digibind в концентрации 130 мкг/мл вызывал достоверное снижение тонуса сосудов в перфузируемых плацентах, полученных от беременных женщин с преэклампсией [17]. Armler и соавт. было показано, что развитие преэклампсии сопровождается существенным увеличением чувствительности плацентарной Na/K-АТФазы к препаратам дигиталиса [18]. Эти результаты явились основанием для исследований эффективности препарата Digibind у пациентов с преэклампсией.

В 1988 г. Goodlin сообщил о стойком снижении артериального давления у беременной с преэклампсией, развившейся на 26 неделе беременности, после двукратного внутривенного введения Digibind в дозе 0,087 мг/кг [19]. Adair и соавт. в 1996 добились снижения артериального давления у пациентки с преэклампсией на фоне комбинации внутривенного болюсного введения 5 мг Digibind и 24-часовой инфузии препарата (1 мг в час) [20]. Несколько позже в двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании эффективность Digibind была подтверждена на 13 больных с преэклампсией, развившейся *post partum* [21]. Примечательно, что ни в одном из перечисленных исследований Digibind не вызвал у пациентов никаких побочных эффектов. В декабре 2007 г. фирма Glaxo Smith Kline завершила многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности Digibind у больных с тяжелой преэклампсией [22].

С практической точки зрения важной задачей является определение молекулярной природы ЭДФ при

преэклампсии. Известно, что подобно препаратам дигиталиса, один из ЭДФ — эндогенный оубаин, имеет карденолидную природу [23]. В тканях млекопитающих также присутствуют ингибиторы Na/K-АТФазы буфадиинолидной природы, маринобуфагенин (МБГ) [24] и его вероятный предшественник телоцинобуфагин [25]. МБГ, селективно взаимодействуя с альфа-1 изоформой Na/K-АТФазы, основной формой этого фермента в сосудах и почках, является вазоконстриктором и обладает натрийуретической активностью [26, 27]. Содержание МБГ в плазме крови и почечная экскреция этого вещества возрастают при увеличении объема циркулирующей жидкости и при задержке натрия у больных эссенциальной гипертензией и хронической почечной недостаточностью [28], при застойной недостаточности кровообращения [29] и у крыс линии Dahl-S с соль-чувствительной гипертензией [20].

Данные клинических исследований свидетельствуют в пользу того, что МБГ является фактором патогенеза преэклампсии. Так, Lopatin и соавт. показали, что у беременных женщин с тяжелой преэклампсией (артериальное давление $161 \pm 5 / 104 \pm 3$ мм рт ст) концентрация МБГ в плазме крови была повышена в 5 раз по сравнению с обследованными с неосложненной беременностью [31]. В том же исследовании уровень эндогенного оубаина у беременных с преэклампсией был повышен в 2 раза. Позже было показано, что развитие преэклампсии средней тяжести (артериальное давление $149 \pm 3 / 93 \pm 3$ мм рт ст) сопровождалось двукратным увеличением уровня МБГ в плазме крови, в то время как концентрация эндогенного оубаина существенно не изменялась [32]. Увеличение концентрации МБГ при преэклампсии средней тяжести сопровождалось 50% угнетением активности Na/K-АТФазы в эритроцитах, а антитела к МБГ, в отличие от антител к оубаину, *ex vivo* восстанавливали активность фермента [32]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что МБГ является фактором, “ответственным” за угнетение Na/K-АТФазы при преэклампсии и маркером тяжести преэклампсии.

Регуляторная система ЭДФ-Na/K-АТФаза была исследована при экспериментальной преэклампсии. В 2005 г. Fedorova и соавт. показали, что повышенное потребление хлорида натрия беременными крысами сопровождается развитием у животных основных симптомов преэклампсии — гипертензией, протеинурией и задержкой роста плодов [33]. Наряду с развитием симптомов преэклампсии у животных существенно увеличивалась экскреция МБГ и содержания этого гормона в плазме крови. Введение антител к МБГ животным с экспериментальной преэклампсией приводило к снижению артериального давления и к восстановлению активности натриевого насоса в гладкой мускулатуре сосудов [33]. Аналогичные результаты были получены Vu и соавт., показавшими, что повышенная продукция МБГ сопровождается развитием гипертензии у беременных крыс на фоне солевой нагрузки в сочетании с деоксикортикостероном ацетатом [34]. В том же исследовании было показано, что развитие гипертензии у беременных крыс сопровождалось более чем десятикратным увеличением чувствительности маточных артерий к вазоконстрикторному эффекту МБГ, а антитела к МБГ *in vivo* вызывали стойкое снижение артериального давления [34].

Исходя из того обстоятельства, что основным источником биосинтеза ЭДФ при беременности является плацента [16], можно предположить, помимо МБГ при преэклампсии может содержать другие ЭДФ, являющиеся как предшественниками, как и продуктами деградации МБГ. Для определения иммунологической природы ЭДФ, содержащихся в плаценте при преэклампсии, мы выделили МБГ-иммунореактивный материал методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и сравнили его хроматографические свойства с МБГ стандартом [24].

Методы

Плаценты были получены от 6 женщин в результате родоразрешения с диагнозом тяжелая преэклампсия (29 ± 2 года, срок беременности 31 ± 1 недель) и от 8 обследованных с нормально протекающей беременностью (26 ± 1 лет). Плаценты перфузировали раствором Рингера и гомогенизировали. Гомогенизированный материал экстрагировали хлороформом и лиофилизировали. Лيوфилизированный экстракт повторно экстрагировали на С-18 обратно-фазных картриджах 80% ацетонитрилом. Содержание МБГ и эндогенного оуабайна в индивидуальных образцах определяли иммунофлуориметрическим методом, как описано ранее [30]. Далее материал, полученный от беременных с преэклампсией и от обследуемых женщин с неосложненной беременностью, объединяли и фракционировали методом ВЭЖХ с использованием системы Agilent 1100 на аналитических колонках Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 ($4,6 \times 150$ мм, $5 \mu\text{m}$, $80 \text{ \AA}$) в линейном градиенте ацетонитрила (1 мл/мин, 10%–85,5%, 45 мин).

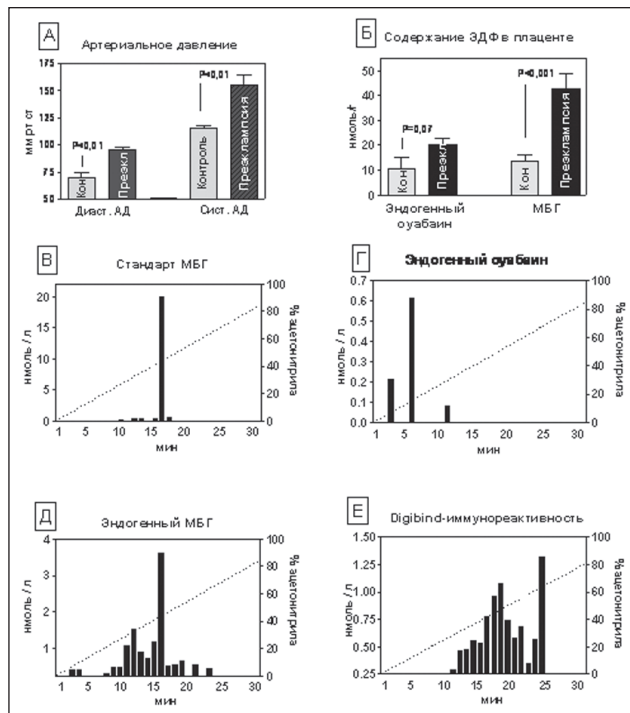
Уровень МБГ и эндогенного оуабайна определяли в полученных фракциях по ранее описанным методикам [30]. Перекрестную иммунореактивность хроматографических фракций с антителами Digibind определяли по ранее описанному методу с использованием меченого нерадиоактивным европием Digibind [33]. Поликлональные 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). Для парного сравнения использовали t-test.

Результаты и обсуждение

Как представлено на рисунке 1А, систолическое и диастолическое артериальное давление у беременных женщин с преэклампсией было существенно повышено по сравнению с обследованными с неосложненной беременностью. Уровень содержания МБГ в плацентах, полученных от пациенток с преэклампсией значительно превышал таковой в контрольных плацентах, в то время как достоверность повышения содержания эндогенного оуабайна была пограничной ($P=0,07$) (рис. 1В). В соответствие с ранее полученными нами данными, элюция МБГ стандарта и МБГ-иммунореактивного материала с хроматографической колонки происходила позже и на

Рис. 1 Артериальное давление (А) и уровень содержания МБГ в плаценте у обследованных с нормально протекающей беременностью (контроль) и беременных женщин с преэклампсией. Профиль элюции стандарта МБГ (В) и эндогенного материала из плацент беременных женщин с преэклампсией: (Г) — эндогенного оуабайна, (Д) — эндогенного МБГ, (Е) — материала, взаимодействующего с Digibind.



фоне большей концентрации ацетонитрила чем сходжение оуабайнового стандарта и оуабайн-иммунореактивного материала (Рис. 1 В и Г). Тот факт, что время элюции максимума МБГ-иммунореактивности (16 минут) из экстрагированных преэкламптических полностью совпало с таковым МБГ стандарта, свидетельствует об идентичности эндогенного МБГ-иммунореактивного материала МБГ стандарта. Примечательно, что количество МБГ-иммунореактивного материала в ВЭЖХ фракциях существенно превышало уровень материала, взаимодействовавшего с антителами к оуабайну, и что фракции, взаимодействующие с Digibind не “перекрывались” с зоной оуабайн-подобной иммунореактивности. Максимум иммунореактивности с Digibind определялся во фракции, соответствующей МБГ, а также во фракции сошедшей с хроматографической колонки на 23 минуте, что соответствует буфадиинолиду цинобуфагину, стероиду, очень близкому к МБГ по структуре.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при преэклампсии содержание МБГ в плаценте существенно возрастает. Учитывая то обстоятельство, что МБГ является вазоконстриктором и в низких концентрациях вызывает прессорный эффект [31, 34], можно предположить, что при преэклампсии МБГ является потенциальной мишенью для терапии и, в частности, для иммунонейтрализации. В течение последнего десятилетия использование терапевтических антител к кардиологической практике расширяется [35, 36]. Иммунонейтрализация при преэклампсии представляется особо привлекательным подходом к терапии, так как терапевтические антитела, вызывая связывания анти-

гена, в отличие от традиционных антигипертензивных средств, не оказывают действие на клеточные рецепторы и пути клеточной сигнализации. Это обстоятельство и обусловило интерес к иммуонейтрализации ЭДФ и, особенно МБГ, при преэклампсии.

Помимо вазоконстрикции, МБГ может вызывать целый ряд других эффектов способных внести вклад в патогенез преэклампсии. Известно, что окислительный стресс в плаценте является важной составляющей патогенеза преэклампсии [37]. Недавно было показано, что низкие, “физиологически реальные” концентрации МБГ индуцируют окислительный стресс [38, 39]. Примечательно, что у гипертензивных крыс с хронической почечной недостаточностью активная иммунизация МБГ приводило к снижению уровня маркеров оксидативного стресса и к снижению артериального давления [38]. Puschett и соавт. показали, что МБГ вызывает нарушения дифференцирования клеток цитотрофобласта и угнетает инвазию цитотрофобласта, вызванную ростовыми факторами [40, 41]. Таким образом, фармакологический антагонизм МБГ может оказывать благотворное влияние не только на артериальное давление, но и на процессы, лежащие в основе патогенеза преэклампсии.

Исследования поддержаны интрамуральной программой Национального института старения США и грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований (06-04-489-56).

Литература

- MacKay AP, Berg CJ, Atrash HK. Pregnancy-related mortality from preeclampsia and eclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2001; 97:533–538.
- Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2005; 365: 785–799.
- Graves SW. The possible role of digitalislike factors in pregnancy-induced hypertension. *Hypertension* 1987; 10: 184–186.
- de Wardener HE, Clarkson EM. Concept of natriuretic hormone. *Physiol Rev.* 1985; 65: 658–759.
- Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain — control of intracellular Ca-2+ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993; 264: C1367–C1387.
- Gallery EDM, Hunyor 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.
- Masilamani S, Baylis C. Pregnant rats are refractory to the natriuretic actions of ANP. *Am J Physiol.* 1994; 267: R1611–R1616.
- Graves SW, Valdes R Jr, Brown BA, Knight AB, Craig HR. Endogenous digoxin-immunoreactive substance in human pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 58: 748–751.
- Poston L, Morris JF, Wolfe CD, Hilton PJ. Serum digoxin-like substances in pregnancy-induced hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1989; 77: 189–194.
- Gilson GJ, Graves SW, Qualls CR, Curet LB. Digoxin-like immunoreactive substance and sodium-potassium-adenosine triphosphatase inhibition in normal pregnancy: a longitudinal study. *Obstet Gynecol.* 1997; 89: 743–746.
- Shrivastav P, Gill DS, D'Souza V, O'Brien PM, Dandona P. Secretion of atrial natriuretic peptide and digoxin-like immunoreactive substance during pregnancy. *Clin Chem.* 1988; 34: 977–980.
- Kaminski K, Rechberger T. Concentration of digoxin-like immunoreactive substance in patients with preeclampsia and its relation to severity of pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165: 733–736.
- Ujhelyi MR, Robert S, Cummings DM, Colucci RD, Green PJ, Sailstad J, Vlasses PH, Zarowitz BJ. Influence of digoxin immune Fab therapy and renal dysfunction on the disposition of total and free digoxin. *Ann Intern Med.* 1993; 119: 273–277.
- Yamada K, Goto A, Hui C, Yagi N, Sugimoto T. Effects of the Fab fragment of digoxin antibody on the natriuresis and increase in blood pressure induced by intracerebroventricular infusion of hypertonic saline solution in rats. *Clin Sci (Lond).* 1992; 82: 625–630.
- Krep H, Price DA, Soszynski P, Tao QF, Graves SW, Hollenberg NK. Volume sensitive hypertension and the digoxin-like factor. Reversal by a Fab directed against digoxin in DOCA-salt hypertensive rats. *Am J Hypertens.* 1995; 8: 921–927.
- Morris JF, Poston L, Wolfe CD, Hilton PJ. A comparison of endogenous digoxin-like immunoreactivity and sodium transport inhibitory activity in umbilical arterial and venous serum. *Clin Sci (Lond).* 1988; 75: 577–579.
- Di Grande A, Boura AL, Read MA, Malatino LS, Walters WA. Release of a substance from the human placenta having digoxin-like immunoreactivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1993; 20: 603–607.
- Armler E, Cester N, Salvolini E, Staffolani R, Burkhard M, Mazzanti L, Kotyk A, Romanini C. Human hypertensive placenta contains an increased amount of Na,K-ATPase with higher affinity for cardiac glycosides. *Cell Biol Int.* 1994; 18: 723–727.
- Goodlin RC. Antidigoxin antibodies in eclampsia. *New Engl J Med.* 1988; 318: 518–519.
- 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.
- 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.
- Efficacy study of Digibind for treatment of severe preeclampsia. <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00158743>
- Ludens JH, Clark MA, DuCharme DW, Harris DW, Lutzke BS, Mandel F, Mathews WR, Sutter DM, Hamlyn JM. Purification of an endogenous digitalislike factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension.* 1991; 17: 923–929.
- 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.
- Komiyama Y, Dong XH, Nishimura N, Masaki H, Yoshika M, Masuda M, Takahashi H. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure. *Clin Biochem.* 2005; 38: 36–45.
- Fedorova OV, Bagrov AY. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms. *Am J Hypertens.* 1997; 10: 929–935.
- 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.
- 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.
- 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

30. 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.

31. Lopatin DA, Ailamazian EK, Dmitrieva RI, Shpen VM, Fedorova OV, Doris PA, Bagrov AY. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia. *J Hypertension*. 1999; 17: 1179–1187.

32. Averina IV, Tapilskaya NI, Reznik VA, Frolova EV, Fedorova OV, Lakatta EG, Bagrov AY. Endogenous Na/K-ATPase inhibitors in patients with preeclampsia. *Cell Mol Biol*. 2006; 52:19–23.

33. 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.

34. Vu HU, Ianosi-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.

35. Mitka M. Vaccine takes aim at hypertension. *JAMA*. 2007; 298: 2854–2855.

36. Waldmann TA. Immunotherapy; past, present and future. *Nature Medicine* 2003; 9: 269–277.

37. Poston L. Endothelial dysfunction in pre-eclampsia. *Pharmacol Rep*. 2006; 58 Suppl: 69–74.

38. Elareh J, Kennedy DJ, Yashaswi B, Vetteth S, Shidyak A, Kim EG, Smaili S, Periyasamy SM, Hariri IM, Fedorova L, Liu J, Wu L, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Fedorova OV, Kashkin VA, Bagrov AY, Shapiro JI. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension*. 2007; 49: 215–224.

39. Kennedy DJ, Vetteth S, Periyasamy SM, Kanj M, Fedorova L, Khouri S, Kahaleh MB, Xie Z, Malhotra D, Kolodkin NI, Lakatta EG, Fedorova OV, Bagrov AY, Shapiro JI. Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension*. 2006; 47: 488–495.

40. LaMarca HL, Morris CA, Pettit GR, Nagowa T, Puschett JB. Marinobufagenin impairs first trimester cytotrophoblast differentiation. *Placenta*. 2006; 7: 984–988.

41. Uddin MN, Horvat D, Glaser SS, Danchuk S, Mitchell BM, Sullivan DE, Morris CA, Puschett JB. Marinobufagenin inhibits proliferation and migration of cytotrophoblast and CHO cells. *Placenta*. 2008; 29: 266–273.