

Эндогенный дигиталис и нарушение вазорелаксации при преэклампсии

Е.Р. Никитина¹, Е.С. Никандрова³, Е.В. Фролова¹, А.В. Фадеев^{1,4}, В.В. Шман³, О.В. Федорова⁵,
А.В. Михайлов^{2,3}, А.Я. Багров⁵

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, медицинский факультет, Санкт-Петербург, Россия

³ СПбГУЗ «Родильный дом № 17», Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, факультет медицинской физики и биоинженерии, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Национальный институт старения, Национальные институты здоровья, Балтимор, Мериленд, США

Никитина Е.Р. — к.б.н., старший научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (ИЭФиБ РАН); Никандрова Е.С. — врач СПбГУЗ «Родильный дом № 17»; Фролова Е.В. — научный сотрудник ИЭФиБ РАН; Фадеев А.В. — студент факультета медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета; Шман В.В. — заведующий родильным отделением СПбГУЗ «Родильный дом № 17»; Федорова О.В. — к.б.н., научный сотрудник группы артериальной гипертензии, Национального института старения, Национальных институтов здоровья, Мериленд США; Михайлов А.В. — главный врач СПбГУЗ «Родильный дом № 17», профессор кафедры педиатрии медицинского факультета СПбГУ, профессор кафедры акушерства, гинекологии и перинатологии СПбГМА им. И.И. Мечникова; Багров А.Я. — д.м.н., руководитель группы артериальной гипертензии Национального института старения, Национальных институтов здоровья, Мериленд США.

Контактная информация: СПбГУЗ «Родильный дом № 17», ул. Леснозаводская, д. 4/1, 193174, Санкт-Петербург, Россия. Факс: +7 (812) 262-04-85. E-mail: amikhailov@am2697.spb.edu (Михайлов Антон Валерьевич).

Резюме

Показано, что эндогенные кардиотонические стероиды (КС) вносят вклад в патогенез преэклампсии (ПЭ) и иммунонейтрализация КС препаратом Digibind (**Fab фрагменты антител к дигоксину**) при ПЭ вызывает гипотензивный эффект. Маринобуфагенин (МБГ), КС буфадиенолидной природы, стимулирует синтез коллагена в органах сердечно-сосудистой системы. Поскольку содержание МБГ в плазме крови при ПЭ существенно возрастает, мы предположили, что при ПЭ МБГ вызывает фиброз фето-плацентарных сосудов, что приводит к уменьшению эластичности сосудистой стенки и к нарушению ее релаксации. Исследовали 18 пациенток с ПЭ (возраст — 29 ± 2 лет, среднее АД 123 ± 2 мм рт. ст., срок беременности — 36 ± 1 нед.). 12 женщин с нормально протекающей беременностью (среднее АД 92 ± 2 мм рт. ст., срок беременности — 37 ± 1 нед.) составили контрольную группу. Развитие ПЭ сопровождалось двукратным увеличением содержания МБГ в плаценте и двукратным увеличением содержания коллагена-1 и проколлагена-1 в гладкомышечных клетках артерий пуповины. На изолированных кольцах артерий пуповины, полученных от пациенток с ПЭ, выявлено существенное по сравнению с контролем снижение релаксирующего эффекта нитропруссид натрия на фоне вызванных 10 нМ эндотелина-1 сокращений ($EC_{50} = 141$ и 0,9 нМ соответственно, $p < 0,001$). Таким образом, при ПЭ повышение продукции МБГ сопровождается стимуляцией синтеза коллагена, развитием фиброза артерий пуповины и расстройством вазорелаксации.

Ключевые слова: преэклампсия, кардиотонические стероиды, вазорелаксация.

Endogenous digitalis and impairment of vasorelaxation in preeclampsia

E.R. Nikitina¹, E.S. Nikandrova³, E.V. Frolova¹, A.V. Fadeev^{1,4}, V.V. Shman³, O.V. Fedorova⁵,
A.V. Mikhailov^{2,3}, A.Y. Bagrov⁵

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Science, St Petersburg, Russia

² St Petersburg State University, Medical Faculty, St Petersburg, Russia

³ Maternity Hospital nr. 17, St Petersburg, Russia

⁴ St Petersburg State Polytechnical University, Faculty of Medical Physics and Bio-engineering, St Petersburg, Russia

⁵ National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD

Corresponding author: Laboratory of Cardiovascular Science, National Institute on Aging, NIH, 5600 Nathan Shock Drive, Baltimore, MD 21224, USA. Fax: 1-(410)-558-8150. E-mail: BagrovA@mail.nih.gov (Dr. Alexei Y. Bagrov).

Abstract

Previous studies implicated endogenous cardiotonic steroids (CTS) in the pathogenesis of preeclampsia (PE) and demonstrated that in PE, immunoneutralization of CTS by Digibind, Fab fragments of digoxin antibody, produces

antihypertensive and renoprotective effects. Marinobufagenin (MBG) a bufadienolide CTS, induces vascular fibrosis in vivo and in vitro. Because levels of MBG in PE are markedly increased, anti-MBG monoclonal antibody reduces blood pressure (BP) in a rat model of PE, and MBG exerts profibrotic effects, we hypothesized that in PE, elevated placental MBG levels would be associated with development of fibrosis in fetoplacental circulation, and with impairment of vascular relaxation. We studied 18 patients with PE (mean BP = 123 ± 2 mmHg; 29 ± 2 years, 36 weeks gest. age) and 12 gestational age-matched normal pregnant subjects (mean BP = 92 ± 2 mmHg). PE was associated with a two-fold rise in the levels of MBG in placentae, and with a 2-fold increase in the level procollagen-1 in the umbilical arteries. As compared to control vessels, isolated rings of umbilical arteries from subjects with PE, in the presence of unaltered responsiveness to endothelin-1 ($EC_{50} = 20$ and 33 nmol/L), exhibited markedly impaired response to the relaxant effect of sodium nitroprusside ($EC_{50} = 141$ vs. 0.9 nmol/L $p < 0.001$). These results demonstrate that in PE, elevated levels of MBG are associated with vascular fibrosis, and impairment of vasorelaxation, and suggest that MBG represents a potential target for therapy.

Key words: preeclampsia, endogenous cardiotonic steroids, vasorelaxation.

Статья поступила в редакцию: 26.08.09. и принята к печати: 28.08.09.

Введение

Несмотря на то, что преэклампсия является при беременности одной из основных причин материнской смертности, патогенез этого синдрома остается малоизученным, а подходы к его терапии не претерпели существенных изменений за последние десятилетия [1]. Повышение артериального давления, эндотелиальная дисфункция, гломерулярный эндотелиоз, расстройства плацентарной циркуляции и замедление развития плода являются наиболее клинически значимыми проявлениями при преэклампсии [1–2]. Ключевую роль в патогенезе преэклампсии играет плацента, что, по крайней мере отчасти, опосредовано дисбалансом между плацентарной продукцией вазоконстрикторов и вазодилататоров [3]. Важную роль в патогенезе гипертензивного синдрома при преэклампсии играют эндогенные дигиталис-подобные кардиотонические стероиды (КТС), вызывающие угнетение Na/K-АТФазы [4]. Так, введение препарата Digibind, фаб-фрагментов аффинно-очищенных антител к дигоксину, обладающих способностью связывать КТС, пациенткам с преэклампсией вызывало антигипертензивный эффект [5–6]. Ранее нами было показано, что в плазме крови и в плаценте у больных с преэклампсией возрастает содержание маринобуфагенина, КТС, являющегося вазоконстриктором [7–8]. У крыс с экспериментальной преэклампсией антитела к МБГ вызывали снижение артериального давления и восстанавливали активность Na/K-АТФазы [9–10].

Известно, что плацента является местом продукции КТС [11–12] и что сосуды плаценты и пуповины являются мишенью эндогенных ингибиторов Na/K-АТФазы [12]. Недавно было показано, что МБГ является индуктором синтеза коллагена и способствует развитию фиброза в органах сердечно-сосудистой системы и в почках [13]. Целью нашего исследования явилась проверка гипотезы, согласно которой вклад МБГ в патогенез преэклампсии опосредован стимуляцией фиброза, увеличением жесткости сосудов и нарушением механизмов их расслабления.

Материалы и методы

Исследованы плаценты от 18 пациенток, родоразрешенных на фоне развития тяжелой преэклампсии (29 ± 2 года, срок беременности 37 ± 1 недель), и от 12 плацент от пациенток при нормально протекающей бере-

менности (26 ± 1 лет, срок беременности 37 ± 1 недель), которые составили группу контроля. Оценка степени тяжести преэклампсии проводилась на основании критериев Американского общества акушерства и гинекологии (**American College of Obstetrics and Gynecology**) [14]. Плаценты перфузировали раствором Рингера и гомогенизировали. Гомогенизированный материал экстрагировали хлороформом и лиофилизировали. Лиофилизированный экстракт повторно экстрагировали на С-18 обратно-фазных картриджах 80 % ацетонитрилом. Содержание МБГ и в образцах плаценты определяли иммунофлуориметрическим методом, как описано ранее [10].

Артерии пуповины использовали для функциональных исследований, а также для определения уровня проколлагена-1 и коллагена-1. Кольца артерий пуповины (2,5–3,0 мм в диаметре) подвешивали под нагрузкой (3 г) в термостатируемые (37°C) камеры объемом 15 мл (Ugo Basile, Италия), содержащие модифицированный раствор Кребса (ммоль/л): 130 NaCl, $4,0$ KCl, $1,8$ CaCl₂, $1,0$ MgCl₂, $0,4$ NaH₂PO₄, 19 NaHCO₃, $5,4$ глюкоза, — через который пропускали смесь 95 % кислорода и 5 % CO₂. Сокращения колец сосудов регистрировали в изометрическом режиме, используя оригинальный датчик. Через 90 мин. после помещения колец сосудов в камеру сокращения вызывали 80 ммоль/л KCl. После отмывания и полного расслабления колец кумулятивно вводили возрастающие концентрации эндотелина-1. В параллельном эксперименте сокращения колец артерий пуповины вводили 10 нмоль/л эндотелина-1 и на фоне плато сократительного ответа кумулятивно вводили возрастающие концентрации нитропруссид натрия. Силу сокращения колец сосудов оценивали в процентах максимального сократительного ответа на 80 % KCl. Процент расслабления рассчитывали относительно плато сократительного ответа на эндотелин-1. Выделение мембранной фракции из артерий пуповины, полученных от здоровых обследованных и пациенток с преэклампсией и определение уровня проколлагена-1 и коллагена-1 методом Western blotting производили по ранее описанной методике [15] с использованием антител к проколлагену-1 (Santa Cruz Biotech, США) и коллагену-1 (Southern Biotech, США).

Активность Na/K-АТФазы определяли по ранее описанному методу [16]: образцы крови собирали в пробирки, содержащие гепарин, и эритроциты отделяли от плазмы центрифугированием ($300 \times g$, 10 минут). Эрит-

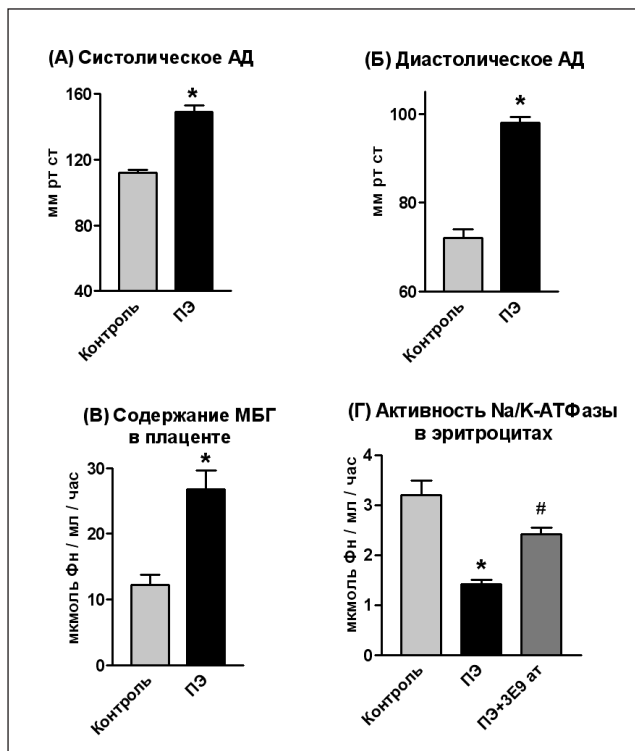
роцитарную массу промывали трижды в изотонической среде, содержащей (в ммоль/л): NaCl 145, Tris HCl буфер 0,02, pH 7,6, при 25°C. Эритроциты инкубировали в течение 40 мин. при 37°C в среде (мМ): NaCl 100, KCl 10, MgCl₂ 3, EDTA 0,5, Tris 50, АТФ 2. Реакцию останавливали путем добавления 0,2 мл 20 % трихлоруксусной кислоты. Общую активность АТФ-азы измеряли с помощью получения неорганического фосфата (Фн) и активность Na/K-АТФ-азы оценивали как разницу между общей активностью АТФ-азы в присутствии и отсутствии 1 мМ убаина. Активность фермента выражали в ммоль Р_i произведенного за 1 час одним мл эритроцитов. Количество Фн в образцах определялось спектрофотометрически. Определение активности Na/K-АТФазы производили в присутствии и в отсутствие моноклональных антител к МБГ (3Е9 Mab) по ранее описанному методу (10).

Статистическую обработку результатов производили при помощи программы GraphPad Prism (США).

Результаты и обсуждение

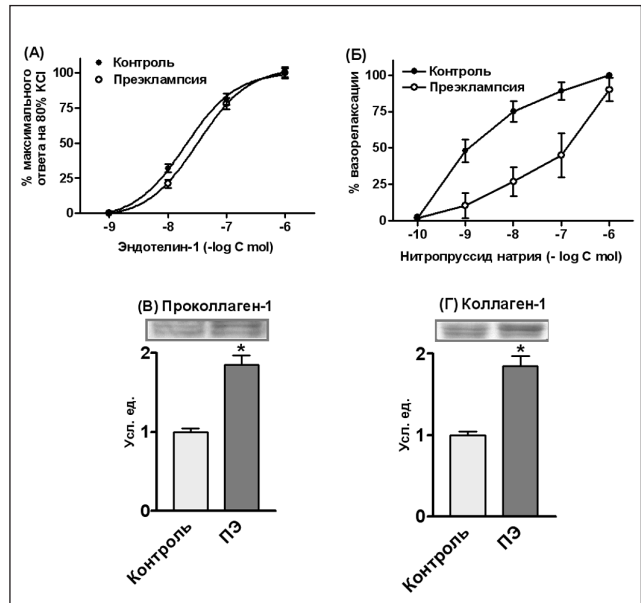
Как представлено на рисунке 1, у пациенток с преэклампсией уровень систолического и диастолического артериального давления существенно превышал тако-

Рисунок 1. Систолическое (А) и диастолическое (Б) артериальное давление и уровень содержания маринобуфагенина в плаценте у обследованных с нормально протекающей беременностью (контроль) и у пациенток с преэклампсией. Г — угнетение активности Na/K⁺-АТФазы в эритроцитах при преэклампсии и восстановление активности фермента моноклональными антителами к маринобуфагенину (3Е9ат) (М ± м)



Примечания: АД — артериальная гипертензия; МБГ — маринобуфагенин; ПЭ — преэклампсия; (*) — $p < 0,01$ по сравнению с контролем; (#) — $p < 0,01$ по сравнению с активностью Na/K-АТФазы в эритроцитах при преэклампсии. (А-В): t-тест; (Г) — АНОВА и тест Ньюмена-Кульса.

Рисунок 2. Сократительный эффект эндотелина-1 (А) и вазорелаксирующий эффект нитропрусида натрия (Б) на изолированных кольцах артерии пуповины, полученных от обследованных с нормально протекающей беременностью (контроль) и от пациенток с преэклампсией. Уровень содержания проколлагена-1 (В) и коллагена-1 (Г) в артериях пуповины, полученных от обследованных с нормально протекающей беременностью и от пациенток с преэклампсией (Western blotting) (М ± м)



Примечания: ПЭ — преэклампсия. (Б): ПЭ по сравнению с контролем — $p < 0,01$ (АНОВА и тест Ньюмена-Кульса); (В) и (Г): * — $p < 0,01$, t-тест.

вой у обследованных с неосложненной беременностью. Уровень содержания МБГ в плацентах, полученных от пациенток с преэклампсией, превышал таковой в контрольных плацентах более чем вдвое, что сопровождалось двукратным угнетением активности Na/K-АТФазы в эритроцитах. Ex vivo инкубация крови пациенток с преэклампсией в присутствии моноклональных антител к МБГ приводило к восстановлению активности фермента, что свидетельствует о том, что при преэклампсии МБГ является фактором, «ответственным» за угнетение Na/K-АТФазы.

Как представлено на рисунке 2А, эндотелин-1 дозозависимым образом вызывал сокращения изолированных колец артерий пуповины. Примечательно, что сосуды, полученные от пациенток с преэклампсией и от здоровых обследованных, обладали одинаковой чувствительностью к эндотелину-1 (EC_{50} составила 20 ± 4 и 33 ± 6 нмоль/л соответственно). На рисунке 2Б представлены кривые «концентрация-эффект», характеризующие способность сосудов к вызванному нитропруссидом натрия расслаблению на фоне сокращений индуцированных 10 нмоль/л эндотелина-1 (EC_{75}). Развитие преэклампсии сопровождалось значительным снижением чувствительности артерий пуповины к вызванному нитропруссидом натрия расслаблению. Так, EC_{50} нитропрусида натрия в экспериментах на сосудах, полученных от здоровых обследованных и от пациенток с преэклампсией, составила 0,89 и 137 нмоль/л соответственно.

Таким образом, развитие преэклампсии сопровождается снижением способности артерий пуповины к расслаблению. Механизм этого явления может быть опосредован как дисрегуляцией цГМФ-зависимой клеточной сигнализации в гладкомышечных клетках [16], так и снижением эластичности сосудистой стенки [17]. Поскольку МБГ стимулирует синтез коллагена, а при преэклампсии уровень этого стероида в плаценте существенно возрастает, мы определили уровень маркеров фиброза, проколлагена-1 и коллагена-1 во фракции сарколеммы, полученной из артерий пуповины. Как показано на рисунке 2 В и Г, уровень содержания как проколлагена-1, так и коллагена-1 в артериях пуповины, полученных от пациенток с преэклампсией, превышал таковой в сосудах, полученных от здоровых обследованных, в два раза.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что развитие преэклампсии сопровождается повышением продукции МБГ, являющегося индуктором фиброза, и увеличением синтеза коллагена в артериях пуповины.

Заключение

Вклад эндогенных КТС в патогенез сосудистых расстройств при преэклампсии не обязательно может сводиться к вазоконстрикции, но может опосредоваться нарушением механизмов расслабления сосудов вследствие развития фиброза.

Значительный интерес представляют молекулярные механизмы, связывающие избыточную продукцию КТС и развитие фиброза. В настоящее время описано два механизма: во-первых, КТС способны инициировать эпителиально-мезенхимальную трансформацию [18], а во-вторых, вызывать супрессию Fli-1 (Friend leukemia insertion 1 protein), нуклеарного фактора транскрипции, являющегося ингибитором синтеза коллагена [19]. Дальнейшее изучение этих механизмов может привести к разработке новых подходов к фармакологическому антагонизму КТС.

Исследования, проведенные А.Я. Багровым и О.В. Федоровой, поддержаны интрамуральной научной программой Национального института старения (Национальные институты здоровья США).

Литература

- Sibai B., Dekker G., Kupferminc M. Preeclampsia // *Lancet*. — 2005. — Vol. 365. — P. 785–799.
- Karumanchi S.A., Maynard S.E., Stillman I.E. et al. Preeclampsia: a renal perspective // *Kidney Int*. — 2005. — Vol. 67. — P. 2101–2113.
- Wang A., Rana S., Karumanchi S.A. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis // *Physiology (Bethesda)*. — 2009. — Vol. 24. — P. 147–158.
- Федорова О.В., Коростовцева Л.С., Шапиро Д.И., Багров А.Я. Эндогенные кардиотонические стероиды: клинические перспективы // *Артериальная гипертензия*. — 2008. — Т. 14, № 3. — С. 220–232.
- Goodlin R.C. Antidigoxin antibodies in eclampsia // *N. Engl. J. Med*. — 1988. — Vol. 318. — P. 518–519.
- Adair C.D., Buckalew V., Taylor K. et al. Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin-binding immunoglobulin // *Am. J. Nephrol*. — 1996. — Vol. 16. — P. 529–531.
- Lopatin D.A., Ailamazian E.K., Dmitrieva R.I. et al. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia // *J. Hypertens*. — 1999. — Vol. 17. — P. 1179–1187.
- Федорова О.В., Резник В.А., Тапильская Н.И. и др. Иммунонейтрализация эндогенных ингибиторов Na/K⁺-АТФазы при преэклампсии // *Артериальная гипертензия*. — 2008. — Т. 14, № 1. — С. 44–48.
- Fedorova O.V., Kolodkin N.I., Agalakova N.I. et al. Antibody to marinobufagenin lowers blood pressure in pregnant rats on a high NaCl intake // *J. Hypertens*. — 2005. — Vol. 23. — P. 835–842.
- Fedorova O.V., Simbirtsev A.S., Kolodkin N.I. et al. Monoclonal antibody to an endogenous bufodienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition in lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension // *J. Hypertens*. — 2008. — Vol. 26. — P. 2414–2425.
- Hilton P.J., White R.W., Lord G.A. et al. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta // *Lancet*. — 1996. — Vol. 348. — P. 303–305.
- Di Grande A., Boura A.L., Read M.A. et al. Release of a substance from the human placenta having digoxin-like immunoreactivity // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. — 1993. — Vol. 20. — P. 603–607.
- Elkareh J., Kennedy D.J., Yashaswi B. et al. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy // *Hypertension*. — 2007. — Vol. 49. — P. 215–224.
- National Institutes of Health Working Group on Hypertension in Pregnancy. Classification of hypertensive disorders of pregnancy. Bethesda, Maryland: US Department of Health and Human Services; 1991.
- Fedorova O.B., Agalakova N.I., Morrell C.H. et al. ANP differentially modulates marinobufagenin-induced sodium pump inhibition in kidney and aorta // *Hypertension*. — 2006. — Vol. 48. — P. 1160–1168.
- Bagrov A.Y., Fedorova O.V., Austin J.L. et al. Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive factor and Na,K-ATPase inhibition during voluntary hypoventilation // *Hypertension*. — 1995. — Vol. 26. — P. 781–788.
- London G.M. Large artery function and alterations in hypertension // *J. Hypertens. Suppl*. — 1995. — Vol. 13, № 2. — P. S35–S38.
- Fedorova L., Raju V., Mr. El-Okdi N. et al. Cardiotonic steroid hormone marinobufagenin induces renal fibrosis. Implication of epithelial to mesenchymal transition // *Am. J. Physiol. Renal Electrolyte*. — 2009. — Vol. 96. — P. F1219–F1226.
- Elkareh J., Periyasamy S.M., Shidyak A. et al. Marinobufagenin induces increases in procollagen expression in a process involving protein kinase C and Fli-1: Implications for uremic cardiomyopathy // *Am. J. Physiol. Renal Electrolyte*. — 2009. — Vol. 296. — P. F922–F934.