

На правах рукописи

ГРИГОРОВА ЮЛИЯ НИКОЛАЕВНА

МАРИНОБУФАГЕНИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ФИБРОЗ
СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ
И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО КОРРЕКЦИИ.

14.01.05 - кардиология

14.03.03 - патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук **Багров Алексей Яковлевич**

доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН **Галагудза Михаил Михайлович**

Официальные оппоненты:

Хирманов Владимир Николаевич - доктор медицинских наук, профессор, ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины» имени А.М. Никифорова МЧС России, отдел сердечно-сосудистой патологии, заведующий

Николаев Валентин Иванович - доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, кафедра патологической физиологии, заведующий

Ведущая организация - ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны Российской Федерации

Защита состоится “_____” 2017 года в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 при ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, Аккуратова, д. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт-Петербург, Аккуратова, д. 2) и на сайте www.almazovcentre.ru.

Автореферат разослан “_____” 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

Д 208.054.04

Доктор медицинских наук, профессор

Недошивин Александр Олегович

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Изучение механизмов, лежащих в основе увеличения жесткости сосудистой стенки, на сегодняшний день является одним из перспективных направлений научных исследований. Повышенная артериальная жесткость является маркером повышенного риска таких сердечно-сосудистых заболеваний, как ишемическая болезнь сердца и хроническая сердечная недостаточность (Chae C.U. et al., 1999; Васюк Ю.А., Конради А.О. с соавт., 2016; Franklin S.S. et al., 2001). Изменение морфологии сосуда ведет к снижению его комплаентности; так, развитие фиброза в аорте способствует увеличению постнагрузки на левый желудочек и снижению диастолического коронарного кровотока, что влечет за собой развитие гипертрофии левого желудочка и ишемической болезни сердца (Кобалава Ж.Д. с соавт., 2014; Mitchell G.F., 2009).

Необходимые для нормального функционирования свойства сосудистой стенки, такие как прочность и упругость, определяются сбалансированным динамическим процессом продукции и деградации коллагена и эластина. Нарушение этого баланса ведет к излишней продукции коллагена и снижению количества эластина в сосудистой стенке (Кац Я.А. с соавт., 2013, Johnson C.P., 2001). На сегодняшний день предложено множество механизмов, объясняющих причины данного нарушения. Морфологические изменения сосудистой стенки могут быть результатом гемодинамических изменений (Wolinsky H., Glagov S., 1964, 1969), а также воздействия гормональных факторов (Иваненко В.В., Конради А.О., 2009). Было показано, что повышенное потребление соли ассоциировано с увеличением сосудистой жесткости (Bagrov A.Y., Lakatta E.G., 2004; Gates P.E. et al., 2004). Известно, что при гиперволемической нагрузке стимулируется синтез эндогенного кардиотонического стероида (КТС) маринобуфагенина (МБГ), являющегося натрийуретическим гормоном, который ингибитирует Na^+/K^+ -АТФазу в проксимальном отделе почечных канальцев, стимулируя натрийурез (Fedorova O.V. et al., 2002). При хроническом введении МБГ с помощью мини-помпы, на модели почечной недостаточности у крыс, а также при преэклампсии у человека было доказано вовлечение маринобуфагенина в развитие фиброза в сердечно-сосудистой системе (Konradi A.O. et al., 2012; Elkareh J. et al., 2007; Kennedy D.J. et al., 2006, 2008). Механизм остается до конца неизученным. Предположительно, индукция профибротического пути осуществляется за счет связывания стероида с Na^+/K^+ -АТФазой, что запускает каскад реакций, ведущий к инактивации негативного регулятора промоутера гена Col1, увеличению экспрессии гена Col1 и, как результат, увеличению синтеза коллагена во внеклеточное пространство фибробластами и гладкомышечными клетками сосудов (Elkareh J. et al., 2007, Kubo M. et al., 2003; Elkareh J. et al., 2009).

Повышенная продукция МБГ также была обнаружена при сахарном диабете 2 типа (Clerico A. et al., 1990; Chen S. et al., 1993). У Dahl соль-чувствительных крыс на высокосолевой диете было показано увеличение продукции МБГ вместе с фиброзом миокарда (Zhang Y., Fedorova O.V. et al., 2017). Кроме того, в этом исследовании был описан профибротический сигнальный путь, сопровождающийся активацией TGF- β 1. Известно, что TGF- β является основным профибротическим фактором в развитии такого осложнения сахарного диабета, как диабетическая нефропатия (Hong S.W. et al., 2001; Sharma, K. et al., 1996; Isono, M. Et al., 2002). Возможность активации данного сигнального пути в процессе развития МБГ-индуцированного фиброза в сосудистой стенке при сахарном диабете 2 типа остается неизученной.

Таким образом, МБГ может быть рассмотрен в качестве терапевтической мишени. За последние несколько лет были разработаны моноклональные анти-МБГ антитела 3E9. Их гипотензивный эффект был продемонстрирован на модели соль-чувствительной гипертензии у животных (Fedorova O.V. et al., 2002), а также был получен выраженный антифибротический эффект антител на миокардиальный фиброз на модели нефропатии у крыс (Haller, S.T. et al., 2012). Анти-МБГ антитела 3E9 инактивировали TGF- β сигнальный путь, а также реверсировали фиброз миокарда и ремоделирование сердечно-сосудистой системы у Dahl соль-чувствительных крыс (Zhang Y., Fedorova O.V. et al., 2017). Имеют ли моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 подобный эффект на фиброз сосудистой стенки?

Обнаруженные ранее конкурентные отношения КТС и антагонистов альдостерона (АА) за связывание с Na^+/K^+ -АТФазой (Finotti, P. et al., 1981) позволяют предположить возможность антифибротического эффекта АА на фиброз сосудистой стенки.

Таким образом, эти обстоятельства обусловливают актуальность изучения механизма действия МБГ в процессе развития фиброза в сердечно-сосудистой системе. Изучение возможностей обратного воздействия на этот патологический процесс может дать начало разработке новых терапевтических подходов с целью коррекции жесткости сосудистой стенки.

Степень разработанности темы исследования

Проблема фиброза сосудистой стенки и повышенной сосудистой жесткости приобрела актуальность несколько десятилетий назад. В настоящее время повышенная сосудистая жесткость все больше признается в качестве важного прогностического маркера и потенциальной терапевтической мишени у пациентов, страдающих гипертензией. Роль измерения артериальной жесткости в клинической практике была признана в Европейском обществе гипертензии в 2003 году. Вопрос механизма увеличения сосудистой жесткости интенсивно изучается. Согласно

данным поисковой системы PubMed, существует более 10 тысяч статей, посвященных изучению фиброза сосудистой стенки и сосудистой жесткости.

В настоящей работе предлагается механизм развития фиброза сосудистой стенки, инициированного кардиотоническим стероидом, маринобуфагенином. Всего существует около 200 работ, опубликованных на тему изучения эффектов маринобуфагенина. Участие МБГ в развитии фиброза в сердечно-сосудистой системе впервые было описано в 2004 году (Kennedy D.J. et al., 2004), что послужило основой для исследований, посвященных изучению профибротической функции МБГ в сердечно-сосудистой системе. В международных изданиях опубликовано 22 работы, описывающие профибротический эффект МБГ в сердечно-сосудистой системе. Ассоциация МБГ с сосудистой жесткостью и фиброзом описана в 4-х статьях и одном обзоре. Исследований об иммунонейтрализации МБГ было проведено всего 4, включая настоящую работу. Данные о внутриклеточном механизме стимуляции синтеза коллагена кардиотоническими стероидами, полученные разными исследователями, имеют противоречивый характер. Таким образом, изучение возможностей влияния на жесткость сосудистой стенки, а также изучение возможных механизмов фиброза является актуальной проблемой современной кардиологии и имеет несомненную научную новизну за отсутствием достаточного количества информации о механизме развития фиброза в сосудистой стенке.

Цель работы

Определить роль маринобуфагенина в механизме развития фиброза сосудистой стенки при повышенном потреблении соли и сахарном диабете 2 типа, а также обосновать возможность коррекции фиброза с помощью моноклональных антител к маринобуфагенину ЗЕ9 или антагонистов альдостерона.

Задачи исследования

1. Изучить возможные эффекты маринобуфагенина у нормотензивных животных.
2. Исследовать механизм маринобуфагенин - индуцированного фиброза сосудистой стенки крысы с выявлением ключевых участников внутриклеточного сигнального пути при сахарном диабете 2 типа.
3. Изучить эффект антагонистов альдостерона на маринобуфагенин - индуцированный фиброз сосудистой стенки.
4. Изучить эффект моноклональных антител к маринобуфагенину ЗЕ9 на маринобуфагенин - индуцированный фиброз сосудистой стенки.

Научная новизна

1. В результате проведенных исследований показано, что у нормотензивных животных на солевой нагрузке, а также на экспериментальной модели сахарного

диабета 2 типа маринобуфагенин вызывает фиброз сосудистой стенки в отсутствии подъема артериального давления.

2. Показан и объяснен механизм маринобуфагенин-индуцированного фиброза сосудистой стенки при сахарном диабете 2 типа.
3. Продемонстрирован антифибротический эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9 на фиброз сосудистой стенки.
4. Показан антифибротический эффект антагонистов альдостерона на маринобуфагенин-индуцированный фиброз сосудистой стенки.

Теоретическая и практическая значимость

1. Полученные данные позволяют рассмотреть маринобуфагенин в качестве маркера фиброза сосудистой стенки; таким образом, определение уровня маринобуфагенина в плазме и моче имеет диагностическое значение.
2. Показанный антифибротический эффект антител к маринобуфагенину является основанием для дальнейших исследований, направленных на разработку антифибротической терапии на основе моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9.
3. Демонстрация антифибротического эффекта антагонистов альдостерона в сосудистой стенке за счет антагонизма с маринобуфагенином допускает возможность расширения показаний к их применению.
4. Показан механизм маринобуфагенин-индуцированного фиброза сосудистой стенки в условиях солевой нагрузки и сахарного диабета 2 типа в отсутствии гемодинамических изменений, и доказана его обратимость посредством связывания со специфичными антителами 3Е9.

Методология и методы исследования

Использованные в работе экспериментальные процедуры на лабораторных животных были утверждены Этическим комитетом ФГБУ «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России. Методология исследования включала в себя выполнение солевой нагрузки и моделирование сахарного диабета 2 типа инъекцией стрептозотоцина на крысах линии Вистар. Экспериментальный протокол включал в себя оценку артериального давления, измерение веса, диуреза животных на протяжении эксперимента, а также измерение суточной экскреции электролитов, маринобуфагенина и уровня глюкозы в плазме. Лечение выполнялось с помощью введения моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9 внутрибрюшинно. По окончании эксперимента выполнялось исследование способности аорты расслабляться, гистохимическое исследование аорты крысы на предмет фиброза, а также проводилось измерение активности Na^+/K^+ -АТФазы в плазме. Ткани аорты использовалась для белкового иммуноблота с целью идентификации основных участников МБГ-индуцированного фиброза сосудистой стенки.

Часть работы выполнена *ex vivo*, где кольца аорты, полученные от интактных крыс, инкубировались в питательной среде в присутствии МБГ (для демонстрации его профибротического действия) и антагониста альдостерона, канренона, в качестве антифибротического агента. По завершении инкубации сосуды были использованы для определения чувствительности к вазорелаксантному действию нитропруссида натрия, а также иммуноблота и гистологического исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. Солевая нагрузка стимулирует продукцию маринобуфагенина, который в свою очередь способствует развитию фиброза сосудистой стенки, в отсутствии изменений артериального давления.
2. Маринобуфагенин индуцирует фиброз сосудистой стенки посредством связывания с Na^+/K^+ -АТФазой, что ведет к увеличению количества коллагена в сосудистой стенке. Сосуды с большим количеством коллагена имеют нарушенную способность расслабляться, то есть имеют повышенную жесткость.
3. Механизм профибротического действия маринобуфагенина в условиях сахарного диабета 2 типа осуществляется посредством активации 2-х сигнальных путей: $\text{PLC}\gamma\text{-PKC}\delta$ – Fli-1 и $\text{TGF-}\beta$ - SMADs.

Степень достоверности результатов

Всего в работе использовалось 66 животных. Количество животных в экспериментальных и контрольных группах составило не менее 8. Для анализа полученных результатов использовались адекватные статистические методы.

Апробация результатов

Материалы исследования были представлены в виде постерного доклада на ежегодной конференции Artery 12 (Vienna, Austria, 18–20 October 2012), IV Ежегодной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия, 2012), American Heart Association Scientific Sessions 2014 (15-19 ноября, 2014, Чикаго, США).

По материалам диссертации опубликованы 4 печатные работы в отечественных (1) и зарубежных (3) рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей Аттестационной Комиссией для публикации результатов диссертационных работ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 247 отечественных и зарубежных источников.

Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста, содержит 1 таблицу и 19 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные модели. Для изучения механизма профибротического эффекта МБГ в сосудистой стенке и возможности обратного воздействия на фиброз было поставлено три эксперимента на нормотензивных крысах, самцах линии Вистар.

В первом эксперименте крысы получали высокосолевую диету с целью стимуляции продукции МБГ надпочечниками. Согласно нашей гипотезе, у нормотензивных крыс чрезмерная продукция МБГ вызывает компенсаторный натрийурез и профибротический эффект в отсутствии изменения сосудистого тонуса. В настоящем эксперименте исследовалось влияние солевой нагрузки и, как следствие, чрезмерной продукции МБГ на морфофункциональное состояние стенки аорты крысы. Основной целью этого эксперимента являлось изучение влияния анти-МБГ антител 3E9 на артериальное давление и фиброз в аорте. В эксперименте использовались 24 крысы стока Вистар 5-ти месячного возраста. Все животные были разделены на три группы: контрольная группа (Ктр, n=8), состоящая из интактных животных, солевая нагрузка (Соль, n=8) и солевая нагрузка с последующим введением анти-МБГ антител 3E9 (Соль-АТ, n=8). Животные в группах Соль и Соль-АТ вместо воды получали раствор NaCl 2% на протяжении 4-х недель. На последней неделе солевой нагрузки животные из группы Соль получали 3 инъекции физиологического раствора интраперитонеально, а животные из группы Соль-АТ – анти-МБГ антитела 3E9 в дозе 50 мг/кг. В конце эксперимента измерялось артериальное давление на хвостовой артерии (ITC model 31; ITC Life Science, CA), проводилось метаболическое исследование. По завершении всех измерений проводился забор крови и аорты под анестезией нембуталом в дозе 50 мг/кг.

Второй эксперимент был поставлен с целью подтверждения профибротического действия МБГ в изолированных условиях и изучения воздействия АА, канренона, на МБГ-индуцированный фиброз. Работа была выполнена ex vivo на кольцах аорты и образцах крови и почки, полученных от нормотензивных крыс линии Вистар (n=18). Ткани инкубировались в присутствии МБГ (100 нмоль/л), канренона (10 мкмоль/Л)(Кан) и их комбинации (МБГ+Кан); контрольную группу составили образцы тканей, инкубированные в питательной среде (Ктр).

В третьем эксперименте у нормотензивных животных моделировался сахарный диабет 2 типа с последующей солевой нагрузкой. Как уже было упомянуто ранее высокосолевая диета необходима для инициации повышенной продукции МБГ. Однако, при сахарном диабете также обнаруживается повышенное количество МБГ, которое, предположительно, связано с диабетической нефропатией (Garay

R.P. et al., 1985, Bagrov A.Y. et al., 1995). Фиброзные изменения, происходящие в почках при сахарном диабете 2 типа, имеют множество объяснений, включая оксидативный стресс, активацию РААС, воспаление, высвобождение профибротических агентов, например, TGF-β. Повышенная продукция МБГ, обусловленная инсулин-зависимой задержкой натрия, а также высокосолевой диетой может способствовать развитию фиброза сосудистой стенки, что и является одной из гипотез данного эксперимента. Экспериментальный диабет был инициирован внутрибрюшинной инъекцией стрептозотоцина (65мг/кг) в возрасте 4-5 дней (СД2/Соль, n=8). Развитие толерантности к глюкозе оценивали по сахарной кривой на восьмой неделе эксперимента. За контрольную группу были приняты интактные самцы линии Вистар (Ктр, n=8). Развившие диабет животные вместо питьевой воды получали 2% раствор NaCl на протяжении 4-х недель. На четвертой неделе солевой нагрузки животным с сахарным диабетом на высокосолевой диете внутрибрюшинно вводились моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 в дозе 50 µг/кг (СД2/Соль+АТ, n=8). В конце эксперимента измерялось артериальное давление на хвостовой артерии, проводились метаболические измерения с последующим забором крови из аорты под анестезией нембуталом в дозе 50 мг/кг.

Измерение активности Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах. Для измерения активности Na^+/K^+ -АТФазы использовалось 0.5 мл цельной крови. Эритроциты отмывались 3 раза в изотоническом растворе (145 ммоль/л NaCl в 20 ммоль/л Tris буфера; pH = 7.6, 4 °C). Затем эритроциты преинкубировались с Tween-20 (0.5%) в сахарозе (250 ммоль/л) и Tris буфере (20 ммоль/л; pH = 7.4, 37 °C) в течение 30 минут с последующей 30-ти минутной инкубацией в среде, содержащей NaCl 100 ммоль/л, KCl 10 ммоль/л, MgCl₂ 3 ммоль/л, ЭДТА 0.5 ммоль/л, Tris 50 ммоль/л, АТФ 2 ммоль/л (pH = 7.4, 37,00 °C), в конечном разведении 1:40. Реакция останавливалась добавлением трихлорацетиловой кислоты до конечной концентрации 7%. Общая активность Na^+/K^+ -АТФазы измерялась продукцией неорганического фосфата (P_i). Разница между активностью Na^+/K^+ -АТФазы в присутствии и отсутствии 5 ммоль/л оуабаина была принята за активность Na^+/K^+ -АТФазы.

Измерение активности почечной Na^+/K^+ -АТФазы. Мозговое вещество почки гомогенизировалось в растворе, содержащем (ммоль/л) сахарозу 250, гистидин 30, имидазол 5, ЭДТА 1 (4°C; pH 7.4), а затем центрифугировалось (6,000 g, 15 мин, 4°C). Первичный супернатант центрифугировался в течение 30 мин при скорости 15,000 g и температуре 4°C, а конечный супернатант центрифугировался при 148,000 g в течение 90 мин при 4°C. Полученный осадок был суспензирован в среде для гомогенизирования, а затем нанесен на прерывистый градиент сахарозы, состоящий из 0.32 – 1.2 M слоев сахарозы в буфере, содержащем 30 mM гистидина и 5 mM имидазола (pH 7.4) и отцентрифугирован при 148,000 g в течение 90 минут. Фракция на уровне слоя 0.8 M была собрана пипеткой и осаждена центрифугированием при 148,000 g в течение 90 минут. Конечный осадок был ресуспензирован в среде для гомогенизирования в концентрации белка 3–4 мг/мл.

Активность натриевого насоса в супензии из наружного слоя мозгового вещества, в котором фрагменты толстого восходящего канальца петли Генле составляют $\approx 90\%$ массы ткани, была оценена с помощью измерения оуабаин-чувствительного захвата ^{86}Rb . Для этого 200 μl супензии инкубировали в течение одного часа в оксигенированном растворе в отсутствии и присутствии 5 ммоль/л оуабаина. Захват ^{86}Rb определялся после добавления 10 μl инкубационного раствора, содержащего $^{86}\text{RbCl}$ (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{образец}$; NEN Life Science Products), в течение 10 минут. Фрагменты канальцев затем отмывались в холодной среде, центрифугировались, и лизировались в 1% растворе дезоксихолата натрия. Радиоактивность измерялась методом жидкостной сцинтилляции. Количество белка измерялось по методу Лоури. Захват ^{86}Rb выражался в наномолях ^{86}Rb на миллиграмм протеина в минуту.

Измерение МБГ в плазме и моче. Каждый образец плазмы крови был экстрагирован с помощью C18 SepPak картриджей и высушен с последующим разведением в 10% ацетонитриле. Уровень МБГ определялся с использованием флюорометрического анализа (Dissociation Enhanced FluoroImmunoAssay (DELFIA)), основанного на кроличьих поликлональных анти-МБГ-Р антителах или моноклональных анти-МБГ антителах 4G4. Анализ основан на конкурентном взаимодействии между иммобилизованным антигеном и МБГ, другими кросс-реактантами или эндогенными КТС присутствующими в плазме за ограниченным количеством участков связывания на поликлональных анти-МБГ антителах. Вторичные антитела (козы, антикроличьи), меченные радиоактивным Европием, были получены из Perkin-Elmer (Waltham, MA). Чувствительность этого теста 0.05 нмоль/л, кросс-реактивность поликлональных анти-МБГ-Р антител, использованных в данном методе, с другими стероидами: МБГ -100, оуабаин-0.1, дигоксин -1.0, дигитоксин -3.0, буфалин -1.0, цинобуфагин -1.0, преднизон < 0.1, спиронолактон < 0.1, просциллардин < 1.0, прогестерон < 0.1, смесь буфадиенолидов полученных из яда жаб *Bufo marinus* за исключением МБГ < 5. Кросс-реактивность 4G4 антител с другими стероидными молекулами: МБГ - 100%, оуабаин – 0.005%, дигоксин – 0.03%, дигитоксин < 0.001%, буфалин – 0.08%, цинобуфагин – 0.07%, цинобуфоталин – 40%, преднизон, спиронолактон, альдостерон, просциллардин, и прогестерон < 0.001%.

Исследование способности сосуда к вазорелаксации. Очищенные от эндотелия кольца грудной аорты были подвешены под нагрузкой (1.5 г) в термостатируемые камеры (Ugo Basile, Italy), наполненные модифицированным раствором Кребса (ммоль/л): NaCl 130, KCl 4.0, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.0, NaH₂PO₄ 0.4, NaHCO₃ 19, глюкоза 5.4. В камеры подавалась смесь 95% O₂ и 5% CO₂. Сокращения колец сосудов регистрировались с помощью тензометрического датчика (AD Instruments, USA). Через 90 минут от начала эксперимента вызывалось сокращение колец аорты с помощью KCl (80 ммоль/л). После отмычки в камеры добавлялось 100 нмоль/л эндотелина-1 (ЭТ-1). По достижении плато выполнялось

последовательное введение в раствор нитропруссида натрия в возрастающей концентрации (1 нмоль/л – 10 мкмоль/л).

Гистохимическое исследование. Кольца аорты, 4-5 мм длиной, были зафиксированы в забуференном 4% растворе формалина (рН 7.2) в течение 12 часов и залиты в парафин. Окраска выполнялась с помощью специфичного к коллагену красителя Sirius Red/Fast Green Collagen Staining (Chondrex, Redmond, WA) или Sirius Red. Количественная оценка коллагена выполнялась с помощью программного обеспечения Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices, LLC, CA).

Белковый иммуноблот. Аорты были гомогенизированы в литическом RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Белки, выделенные из сарколеммы аорты, были разделены с помощью электрофореза в 10% Tris-Glycine полиакриламидном геле (Life Technologies) и перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. Детекция проводилась хемилюминесцентным методом, в котором нитроцеллюлозная мембрана выдерживалась на Kodak SAR5 фотопленке 1-5 минут, с последующей количественной оценкой в единицах оптической плотности. Для измерения количества коллагена-1 использовались козы антитела к коллагену (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) с вторичными антителами (анти-козы) из Santa Cruz Biotechnology. Для измерения белка Fli-1 использовались кроличьи поликлональные анти-Fli-1 (C19) антитела (Santa-Cruz Biotechnology; 1:100) и конъюгированная с пероксидазой антикроличья сыворотка (Life Technologies, 1:1000). Для измерения белка TGF-β использовались кроличьи поликлональные антитела (Cell Signaling, 1:500), SMAD 5 – козы поликлональные (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), фибронектина – мышиные моноклональные (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Протеиновые полосы были нормированы на глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH), для чего мембранны были отмыты и выдержаны с кроличьими моноклональными анти-GAPDH антителами (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

Статистический анализ. Результаты представлены в качестве среднего ± стандартная ошибка среднего и анализировались статистическим методом АНОВА с поправкой по Ньюману-Кюльсу или Бонферонни, а при сравнении 2-х групп использовался t-тест. Р менее 0.05 считалось статистически достоверным (Graph Pad Prism, Graph Pad Software, San Diego, CA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффект моноклональных анти-МБГ антител ЗЕ9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке

В данной работе было показано, что солевая нагрузка стимулирует продукцию МБГ, что согласуется с основной теорией, объясняющей функцию МБГ, как натрийуретического гормона (Bagrov A.Y. et.al., 2009). Данные представленные

ранее показали, что солевая нагрузка как у соль-чувствительных, так и у нормотензивных животных ассоциирована с повышенным уровнем МБГ в плазме, увеличенной экскрецией МБГ, а также ингибированием эритроцитарной и почечной Na^+/K^+ -АТФазы (Fedorova O.V. et al., 2001). В настоящем исследовании на фоне солевой нагрузки наблюдалось увеличение уровня МБГ в плазме, что сопровождалось ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы (Рисунок 1 Б, В), а также значительным увеличением суточного диуреза (27.4 ± 6.2 и 9.7 ± 1.5 мл в группе Соль и Ктр, соответственно).

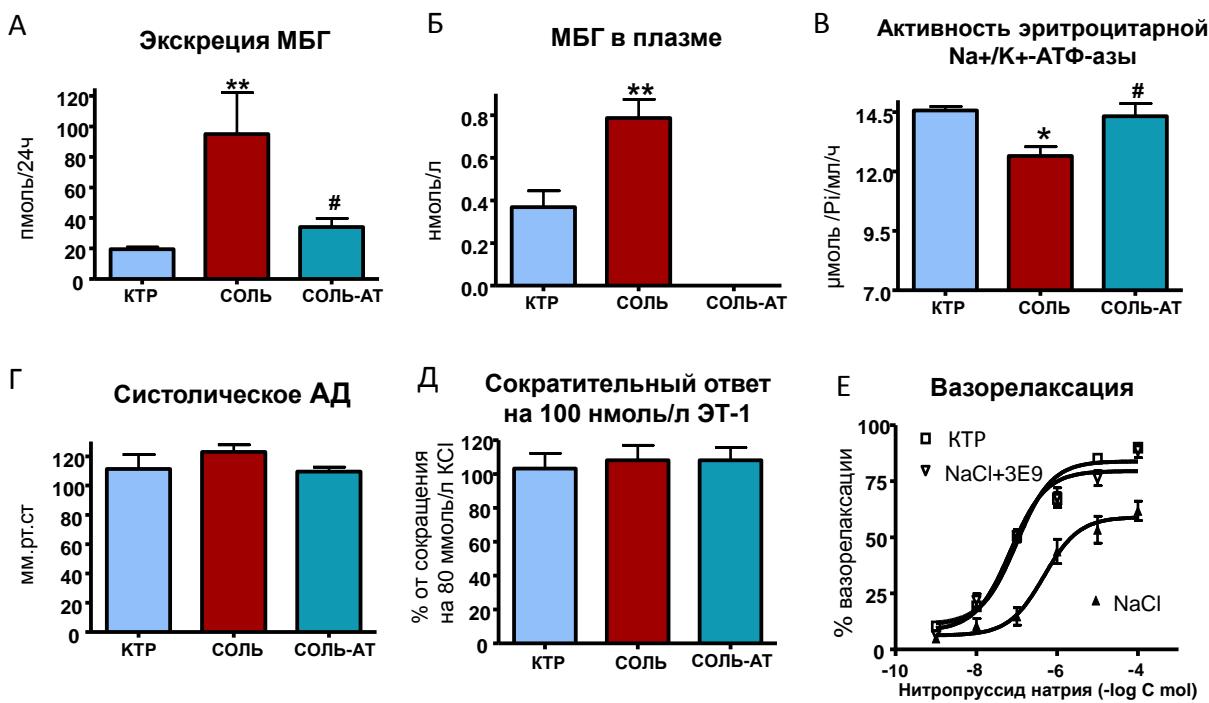


Рисунок 1. Влияние солевой нагрузки и лечения анти-МБГ антителами ЗЕ9 на экскрецию МБГ (А), уровень МБГ в плазме (Б), активность эритроцитарной Na^+/K^+ -АТФазы (В), систолическое АД (Г), сократительный ответ на ЭТ-1 (Д) и расслабление эксплантов аорты (Е). АНОВА и тест Ньюмана-Кюльса: * P < 0.05, ** P < 0.01, Соль vs. Ктр; # P < 0.05, Соль vs. Соль-АТ.

Снижение эффективности работы Na^+/K^+ -АТФазы под действием МБГ в почках способствует снижению реабсорбции натрия, тем самым провоцируется компенсаторный натрийурез (Bagrov A.Y. et al., 2009), что и было подтверждено десятикратным увеличением экскреции натрия (9.2 ± 2.9 и 0.6 ± 0.1 ммоль/24 часа в группе Соль и Ктр, соответственно). Ограничение потребления соли сопровождается снижением экскреции МБГ у человека (Jablonski K.L. et al., 2013), что еще раз указывает на причинно-следственную связь между потреблением соли и продукцией кардиотонического стероида.

Взаимодействие МБГ с Na^+/K^+ -АТФазой не ограничивается исключительно почками, специфическая для эндогенного лиганда субъединица также экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов (Fedorova O.V. et al., 1997). Связывание МБГ с Na^+/K^+ -АТФазой гладкомышечных клеток сосудистой стенки in

vitro вызывает вазоконстрикторный эффект (Bagrov A.Y. et al., 1996; Lopatin D.A. et al., 1999). А у соль-чувствительных животных продукция МБГ способствует развитию стойкого гипертензивного ответа в ответ на солевую нагрузку (Fedorova O.V. et al., 1997). Объясняется это наличием у соль-чувствительных животных мутированной α_1 субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, которая не способна эффективно производить Na^+/K^+ обмен, за чем и следует задержка жидкости и гипертензия (Fedorova O.V. et al., 1997). В настоящем исследовании нами было показано, что у нормотензивных крыс на солевой нагрузке увеличение уровня МБГ в плазме, а также его экскреции, происходит в отсутствии изменений артериального давления (Рисунок 1 Г). Ранее у нормотензивных животных на высокосолевой диете уже наблюдалось повышение экскреции МБГ и Na^+ почками без изменений артериального давления (Fedorova O.V. et al., 2001). Кроме того, в той же работе было отмечено, что в отсутствии изменений артериального давления солевая нагрузка была ассоциирована с увеличением массы миокарда и почек, что является одним из признаков ремоделирования органов. В настоящем исследовании наблюдался повышенный уровень МБГ при солевой нагрузке, который инициировал фиброз сердечно-сосудистой системы, в частности аорты. Количество коллагена в стенке аорты у животных на солевой нагрузке оказалось в 2.6 раза больше, чем в группе Контроль (Рисунок 2 А, Б), что сопровождалось ухудшением чувствительности к нитропруссиду натрия в группе Соль. Таким образом, данное наблюдение было названо АД-независимым профибротическим эффектом МБГ.

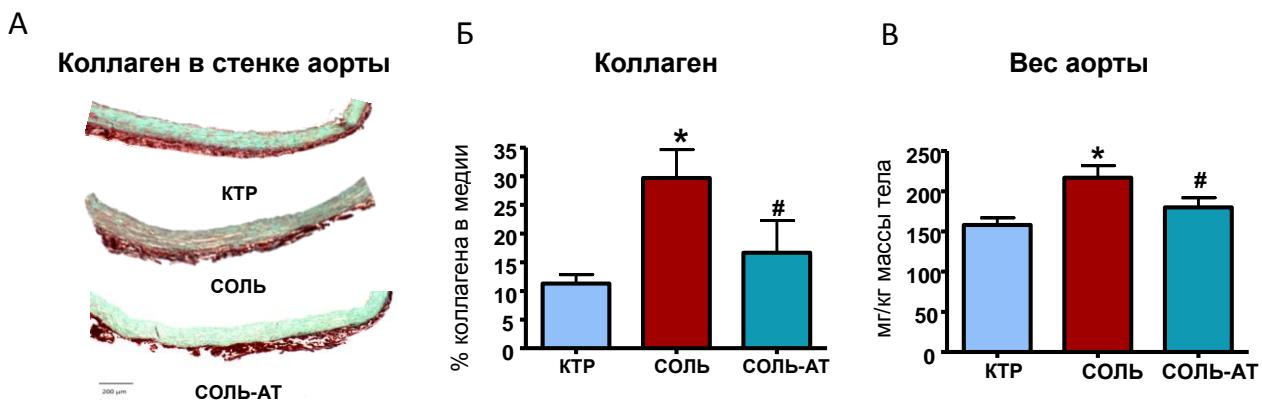


Рисунок 2. Эффект солевой нагрузки и иммунонейтрализации с помощью анти-МБГ антител 3Е9 на количество коллагена в стенке аорты (А, Б), вес аорт (В). АНОВА и тест Ньюмана-Кюльса: * $P < 0.05$, Соль vs. Ктр; # $P < 0.05$, Соль vs. Соль-АТ.

Администрация анти-МБГ антител 3Е9 способствовала снижению количества МБГ в моче, восстановлению активности Na^+/K^+ -АТФазы, а также оказала обратный эффект на избыточное количество коллагена в сосудистой стенке по сравнению с группой Соль. Кроме того было отмечено снижение веса аорт в результате лечения анти-МБГ антителами 3Е9 (Рисунок 2 В). Моноклональные анти-МБГ антитела 3Е9, блокируя МБГ- Na^+/K^+ -АТФаза взаимодействие,

предотвращают запуск внутриклеточного каскада, ведущего к увеличению количества коллагена-1. Ранее был показан антифибротический эффект анти-МБГ антител в миокарде на модели почечной недостаточности (Haller S.T. et al., 2012) и у Dahl соль-чувствительных крыс (Zhang Y., Fedorova O.V. et al., 2017). Новизной этого исследования является антифибротический эффект моноклональных антител в сосудистой стенке. Кроме того, повлияв на морфологическую структуру сосудистой стенки, анти-МБГ антитела ЗЕ9 улучшили способность сосуда к расслаблению, то есть восстановили комплаентность сосуда. Таким образом, моноклональные анти-МБГ антитела ЗЕ9 являются одним из способов коррекции фиброза сосудистой стенки.

Изучение действия маринобуфагенина и антагонистов альдостерона на фиброз в эксплантах аорты крыс

Как показано на рисунке 3, МБГ заингибировал Na^+/K^+ -АТФазу в мозговом слое почки крысы в дозозависимой манере, а добавление канренона в инкубационную среду значительно понизило чувствительность Na^+/K^+ -АТФазы к МБГ ($\text{IC}_{50} = 1.9 \pm 0.5 \mu\text{моль}/\text{л}$ и $113 \pm 11 \mu\text{моль}/\text{л}$, соответственно; Рисунок 3А).

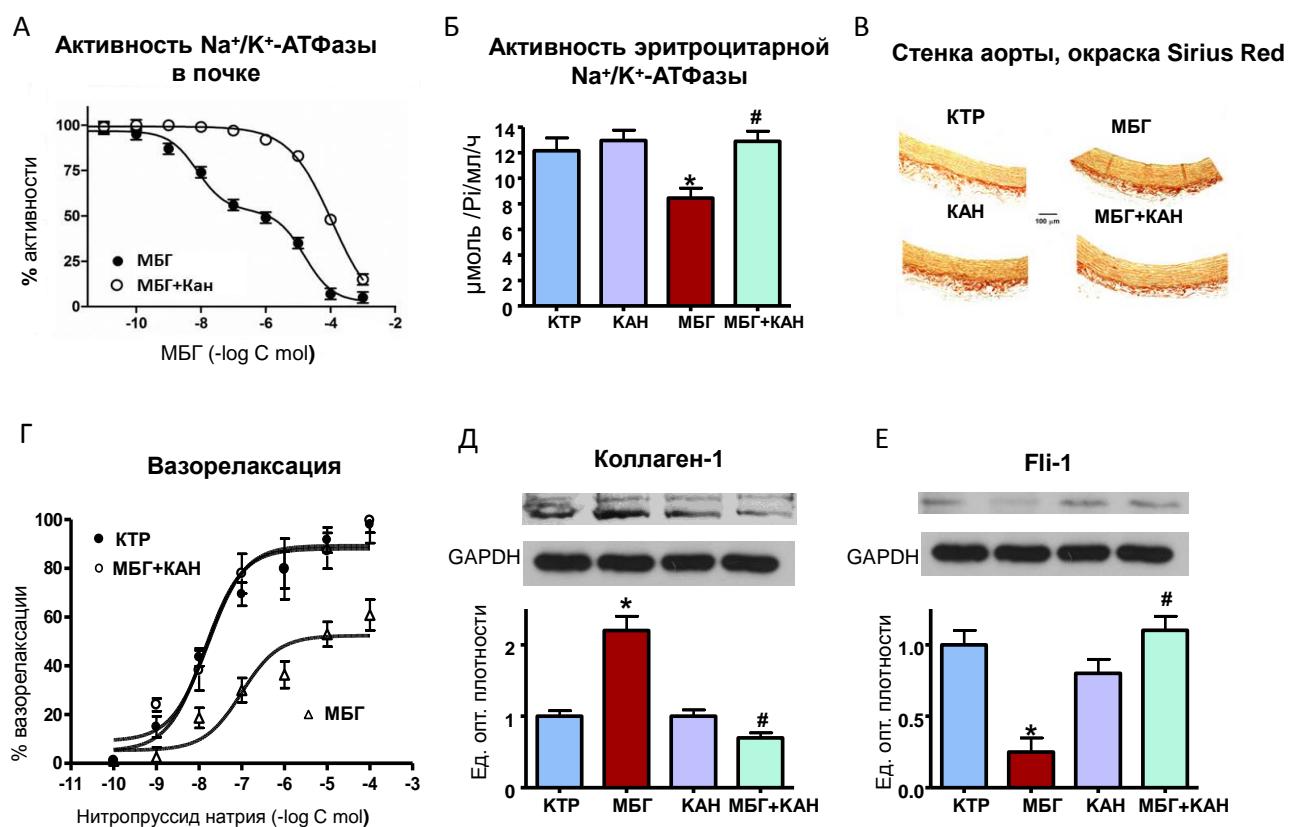


Рисунок 3. Эффект МБГ и канренона на активность Na^+/K^+ -АТФазы в мозговом слое почки (А) и в эритроцитах(Б); эффект канренона на МБГ-индуцированный фиброз аорты (В); влияние МБГ и канренона на способность к вазорелаксации (Г), уровень коллагена-1 (Д) и Fli-1 (Е). АНОВА с поправкой по Бонферонни: * - $P < 0.01$ vs. Контроль (КТР); # - $P < 0.01$ vs. МБГ.

Так как активность эритроцитарной Na^+/K^+ -АТФазы является маркером циркулирующего МБГ, было проверено влияние канренона на ингибирующий эффект МБГ. Канренон продемонстрировал способность восстанавливать активность эритроцитарной Na^+/K^+ -АТФазы в присутствии МБГ (Рисунок 2 Б).

Главным наблюдением данного эксперимента является антагонистическое воздействие антагониста альдостерона, канренона, на МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки (Рисунок 3). Ранее была продемонстрирована способность канренона подавлять миокардиальный фиброз у крыс (Elkareh J. et al., 2007). В настоящем исследовании впервые было показано, что активный метаболит спиронолактона, канренон, снижает количество коллагена в сосудистой стенке, а также улучшает способность сосудов к расслаблению, что говорит об улучшении комплаентности сосуда (Рисунок 3). В настоящей работе было показано, что антагонист минералокортикоидных рецепторов, канренон, восстанавливает МБГ-индуцированное нарушение вазорелаксации. МБГ-индуцированное ухудшение вазорелаксации может объясняться как дисрегуляцией цГМФ-зависимого внутриклеточного каскада (Bagrov A.Y. et al., 1995), так и измененной морфологией сосуда, т.е. повышенным содержанием коллагена в стенке сосуда, что делает сосуд менее комплаентным (London G.M., 1995). Активный метаболит спиронолактона, канренон, блокируя действие МБГ, предотвращает нарушение функции сосуда. Эти данные также согласуются с результатами измерения скорости распространения пульсовой волны у пациентов, страдающих резистентной гипертензией, где была продемонстрирована взаимосвязь между повышенным уровнем МБГ в плазме и увеличением скорости распространения пульсовой волны, а лечение спиронолактоном, способствовало улучшению упруго-эластических свойств сосудистой стенки и восстановлению активности натриевого насоса (Fedorova O.V., Konradi A.O. et al., 2015).

Механизм, отвечающий за инициацию синтеза коллагена в случае МБГ-опосредованного фиброза, остается малоизученным. Одним из механизмов, предложенным в данном исследовании является инактивация Fli-1. Friend leukemia integration-1 (Fli-1), фактор транскрипции семейства ETS, является негативным регулятором промоутера гена проколлагена-1 (Czuwara-Ladykowska J. et al., 2001). Известно, что у Fli-1 нокаутных мышей повышенная продукция коллагена-1 ведет к развитию миокардиального фиброза (Elkareh J. et al., 2009). Кроме того, было продемонстрировано, что фосфорилирование РКС δ ведет к деградации Fli-1, тем самым прекращает его лимитирующее действие на синтез проколлагена (Jinnin M. Et al., 2005). Ранее упомянутый МБГ- Na^+/K^+ -АТФаза-опосредованный механизм, где МБГ индуцирует PLC-опосредованную транслокацию РКС δ в ядро клетки, с последующей инактивацией Fli-1 и снижению его эффективности, согласуется с данными, полученными в настоящем исследовании. Таким образом, МБГ послужил причиной повышенного количества коллагена-1 посредством инактивации Fli-1 в клетках аорты нормотензивных крыс (Рисунок 3 Д, Е). Канренон, связавшийся с

Na^+/K^+ -АТФазой, предотвратил запуск МБГ- Na^+/K^+ -АТФаза внутриклеточного каскада, что было подтверждено увеличением экспрессии Fli-1 и доказано снижением количества коллагена в стенке сосуда (Рисунок 3 Д, Е).

Эффект моноклональных анти -МБГ антител 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке

Как показано на рисунке 4 А, через 8 недель от момента инъекции стрептозотоцина толерантность к глюкозе у этих животных была нарушена.

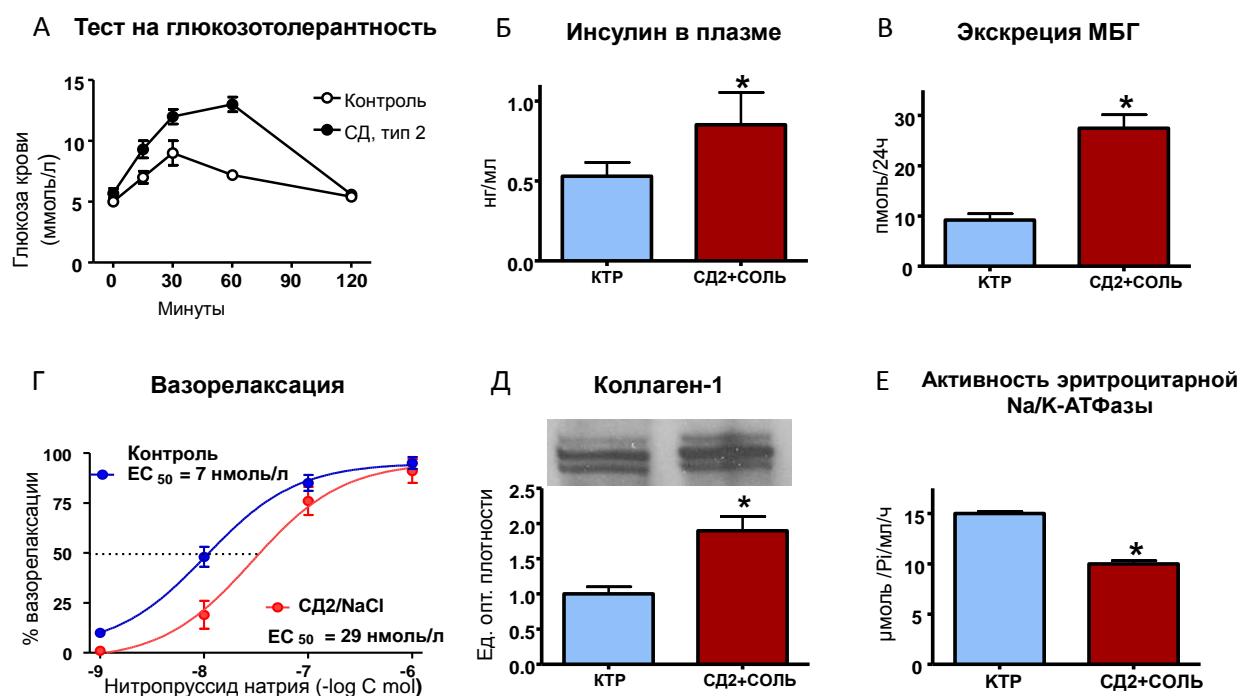


Рисунок 4. Сахарная кривая (А), уровень инсулина в плазме крови (Б), суточная экскреция МБГ (В), чувствительность сосуда к нитропруссиду натрия (Г), количество коллагена-1 в аорте крыс (Д), и активность Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах (Е). t-тест: * $P < 0.01$, СД2+Соль vs. КТР.

Ухудшение толерантности к глюкозе в сочетании с солевой нагрузкой сопровождалось двукратным увеличением экскреции МБГ, а также угнетением эритроцитарной Na^+/K^+ -АТФазы (Рисунок 4 В, Е). Увеличение экскреции МБГ у диабетических крыс на солевой нагрузке ассоциировалось с увеличением веса аорты (0.5 г/кг массы тела в группе СД2+Соль и 0.36 г/кг массы тела в контрольной группе, $p < 0.01$ СД2+Соль vs. КТР), что сопровождалось увеличением количества коллагена-1 (Рисунок 4 Д), а также пониженной чувствительностью колец аорты к вазорелаксантному действию нитропруссида натрия (Рисунок 4 Г).

Лечение моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 способствовало восстановлению активности натриевого насоса (Рисунок 5).

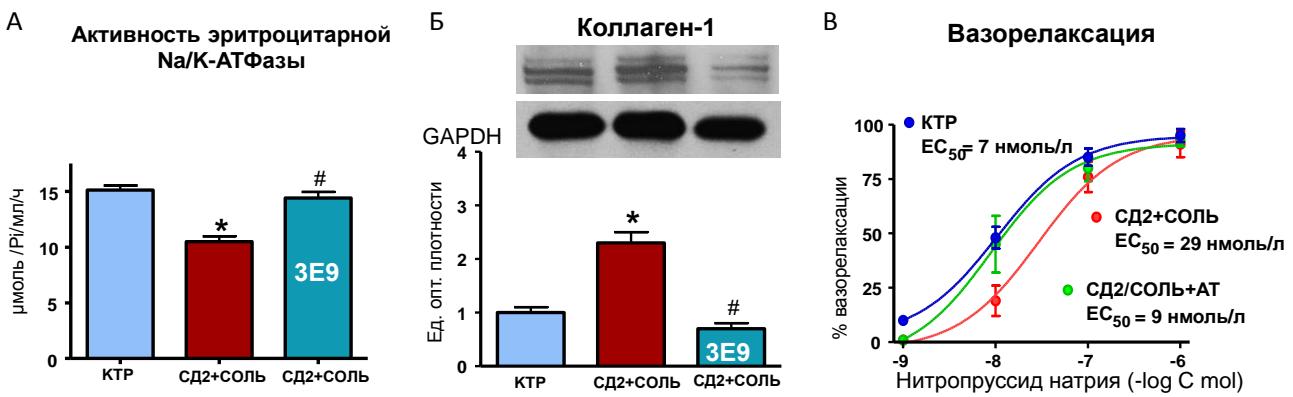


Рисунок 5. Восстановление активности натриевого насоса (А), чувствительности колец аорты к нитропруссиду натрия (В) и снижение количества коллагена-1 в результате иммунонейтрализации. АНОВА с последующим тестом Ньюмана-Кюльса: * - P<0.01 vs. контроль (KTP) # - P<0.01 vs. МБГ.

Способность сосуда к вазорелаксации была восстановлена, что сопровождалось уменьшением веса аорты (0.42 г/кг массы тела в группе СД2/Соль+АТ и 0.5 г/кг массы тела в группе СД2+Соль, p<0.05), а также количества коллагена-1 (Рисунок 5 Б), коллагена-5 и фибронектина в стенке аорты (Рисунок 6 Г, Е).

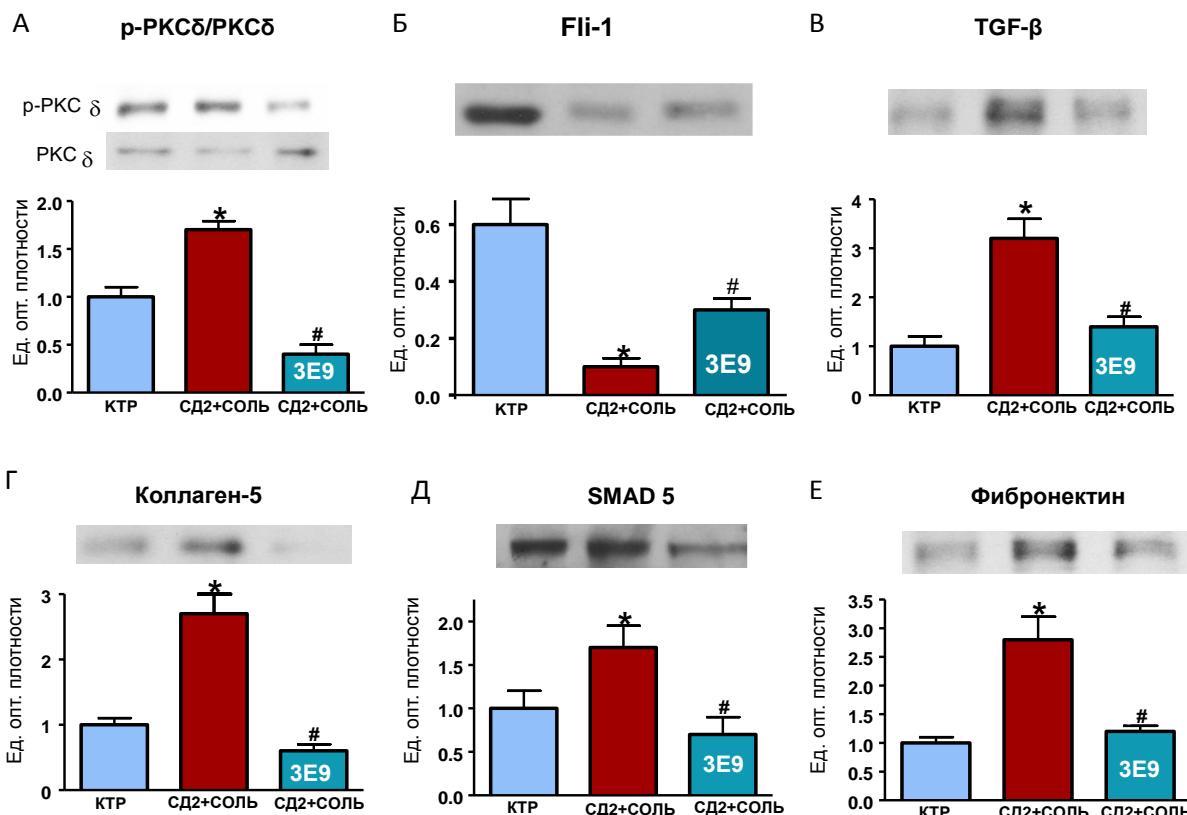


Рисунок 6. Эффект МБГ и моноклональных антител 3E9 на фосфорилирование PKCδ (А), экспрессию Fli-1(Б), TGF-β (В), коллагена-5 (Г), SMAD 5 (Д) и фибронектина (Е) в аорте крыс с экспериментальным диабетом на

солевой нагрузке. Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с тестом Ньюмана-Кюльса: * - $P < 0.01$ vs. контроль (КТР); # - $P < 0.01$ vs. МБГ.

Систолическое артериальное давление оставалось без изменений как во время солевой нагрузки, так и после лечения моноклональными анти-МБГ антителами ЗЕ9 (125 ± 3 , 128 ± 3 и 127 ± 2 мм.рт.ст. в группах КТР, СД2+Соль и СД2/Соль+АТ, соответственно). Фиброз сосудистой стенки сопровождался ухудшением способности сосуда к расслаблению. Кроме того, наблюдалось увеличение уровня основных белковых молекул участвующих в механизме фиброза сосудистой стенки при диабете, таких как TGF- β , SMAD 5, а также фосфорилированной РКС δ с инактивацией Fli-1 (Рисунок 6 А, В, Д). Иммунонейтрализация МБГ произвела антифибротический эффект, продемонстрировав понижение количества коллагена-1 и коллагена-5, а также фибронектина в аорте до уровня интактных животных, что также сопровождалось восстановлением упруго-эластических свойств аорты. Лечение анти-МБГ антителами ЗЕ9 было ассоциировано с заметным понижением количества коллагена-1, коллагена-5 и фибронектина, что сопровождалось снижением экспрессии TGF- β , РКС δ и SMAD-5 в аорте и восстановлением экспрессии Fli-1 (Рисунок 6). Иммунонейтрализация, как способ устранения МБГ из циркуляции, еще раз доказывает ключевую роль МБГ в развитии фиброза аорты в данных условиях.

Ранее было продемонстрировано, что у гипертензивных Dahl соль-чувствительных крыс повышенный уровень МБГ сопровождался активацией профибротического TGF- β - SMADs сигнального пути, а анти-МБГ ЗЕ9 антитела реверсировали эту стимуляцию (Zhang Y., Fedorova O.V. et al., 2017). Также было показано, что у крыс с экспериментальным сахарным диабетом возрастает продукция именно МБГ, а не других эндогенных кардиотонических стероидов (Bagrov Y.Y. et al., 2005).

Связывание КТС с Na^+/K^+ -АТФазой способно не только ингибировать насосную функцию Na^+/K^+ -АТФазы, но также имеет независимую сигнальную функцию. Так, Na^+/K^+ -АТФаза вместе с Src способна образовывать функциональный сигнальный комплекс. Взаимодействие КТС с Na^+/K^+ -АТФазой приводит к определенным конформационным изменениям, которые в свою очередь активируют Src (Tian J. et al., 2006). Активированный Src взаимодействует с EGFR и фосфорилирует его в месте отличном от основного места аутофосфорилирования рецептора (Haas M. Et al., 2000). Однако, существуют доказательства того, что при связывании МБГ с натриевым насосом у соль-чувствительных крыс фосфорилирование EGFR происходит независимо от Src (Zhang Y., Fedorova O.V. et al., 2017). Активация EGFR запускает PLC γ -РКС δ сигнальный путь, в результате чего РКС δ транслоцируется в ядро клетки (Iwabu A. Et al., 2004). В ядре клетки активированная РКС δ фосфорилирует Fli-1, что ведет к его последующей деградации и прекращению его лимитирующей функции в регуляции экспрессии гена Col-1. Повышение фосфорилированной РКС δ и реципрокная инактивация Fli-

у диабетических крыс на солевой нагрузке наблюдались в данной работе вместе с фиброзом и его обратным развитием под действием анти-МБГ антител ЗЕ9.

Повышенная экспрессия TGF- β в почке была найдена у мышей с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа (Hong S.W. et al., 2001). Позже было показано, что гипертрофия почки и гломерулосклероз при диабетической нефропатии также ассоциированы с повышенной активностью TGF- β , а иммунонейтрализация способствует понижению количества коллагена и фибронектина (Sharma K. et al., 1996). Кроме того, на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа было показано, что ключевым моментом в профибротическом механизме в почке является активация SMAD сигнального пути, которая синергически увеличивает экспрессию фибронектина (Isono M. et al., 2002). Таким образом, роль TGF- β в развитии фиброза несомненна. В настоящей работе мы показали, что повышение экспрессии TGF- β индуцируется за счет связывания МБГ с Na^+/K^+ -АТФазой, что в свою очередь запускает SMAD сигнальный путь, а иммунонейтрализация анти-МБГ антителами ЗЕ9 показала снижение количества коллагена в стенке аорты, что также сопровождалось инактивацией SMAD 5 и TGF- β .

Таким образом, в нашем эксперименте было показано, что МБГ индуцирует фиброз сосудистой стенки у диабетических крыс на солевой нагрузке посредством активации 2-х сигнальных путей - PLC γ -PKC δ -Fli-1 и TGF- β – SMADs в отсутствии изменений артериального давления. Моноклональные анти-МБГ антитела ЗЕ9 оказали антифибротический эффект, что сопровождалось инактивацией ключевых участников профибротических путей, таких как TGF- β , SMAD 5, PKC δ и восстановлением активности Fli-1.

Заключение

У нормотензивных животных потребление высокосолевой диеты стимулирует продукцию МБГ в плазме, который в свою очередь индуцирует развитие фиброза сосудистой стенки, а также способствует ухудшению упруго-эластических свойств аорты в отсутствии подъема артериального давления, что также наблюдалось в условиях сахарного диабета 2 типа. Иммунонейтрализация МБГ способствует снижению степени фиброза сосудистой стенки и восстанавливает способность сосуда к расслаблению. Так, высокосолевая диета инициирует МБГ-опосредованный сосудистый фиброз в АД-независимой манере, который может быть реверсирован иммунонейтрализацией.

Антагонист альдостерона, канренон, также имеет обратный эффект на МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки, что улучшает способность сосуда к вазорелаксации. Так, МБГ и МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки являются потенциальной терапевтической мишенью для антагонистов минералокортикоидных рецепторов.

Фиброз аорты у нормотензивных животных в условиях диабета осуществляется посредством связывания МБГ и Na^+/K^+ -АТФазы с последующей активацией 2-х сигнальных путей: $\text{PLC}\gamma$ - $\text{PKC}\delta$ - Fli-1 и $\text{TGF-}\beta$ – SMADs (Рисунок 7).

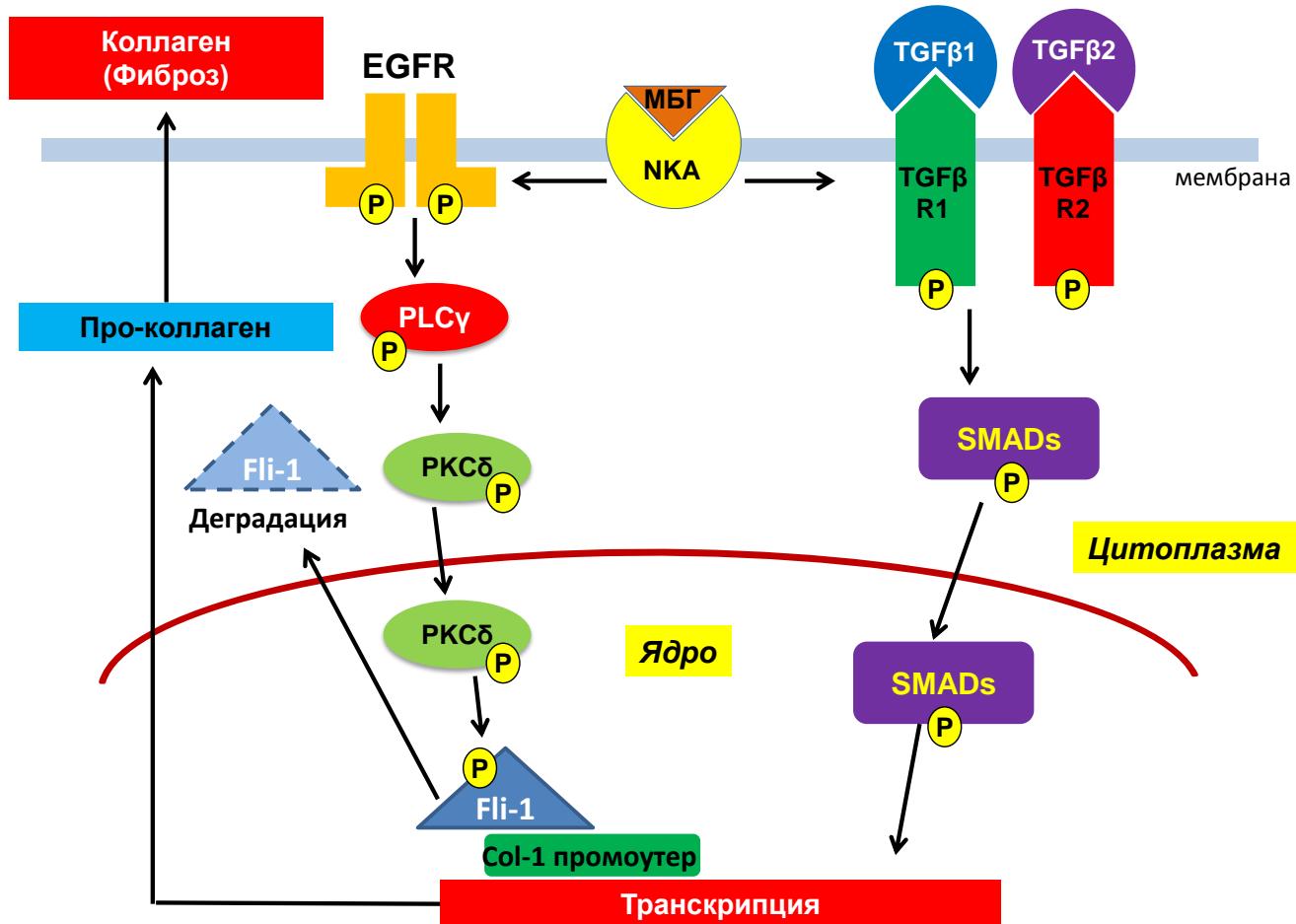


Рисунок 7. Механизм активации профибротических путей при сахарном диабете 2 типа посредством связывания МБГ и Na^+/K^+ -АТФазы.

ВЫВОДЫ

- Солевая нагрузка у нормотензивных крыс инициирует продукцию МБГ, который провоцирует АД-независимый профибротический эффект и отрицательно влияет на упруго-эластические свойства сосудистой стенки.
- Иммунонейтрализация моноклональными антителами 3E9 ослабляет профибротический эффект МБГ и восстанавливает способность сосудов расслабляться.
- Взаимодействие МБГ и Na^+/K^+ -АТФазы запускает каскад внутриклеточных реакций, ведущих к инактивации негативного регулятора промоутера гена

коллагена-1 Fli-1, тем самым служит причиной увеличения количества коллагена в сосудистой стенке, что влечет за собой нарушение способности расслабляться.

4. Антагонист альдостерона, канренон, выступает в роли антагониста МБГ, блокируя место связывания МБГ и Na^+/K^+ -АТФазы, тем самым оказывает антифибротический эффект и восстанавливает упруго-эластические свойства сосудов.

5. Профибротическое действие МБГ на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа осуществляется посредством активации 2-х сигнальных путей: PLC γ -PKC δ -Fli-1 и TGF- β – SMADs.

6. С помощью анти-МБГ антител было показано устранение фиброза сосудистой стенки, а также подавление экспрессии ключевых участников МБГ-индуцированного профибротического механизма сосудистой стенки при инсулиннезависимом сахарном диабете.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты могут являться основанием для разработки и дальнейшего внедрения в практику измерения маринобуфагенина в плазме и моче в качестве маркера повышенной сосудистой жесткости.

Полученные результаты могут являться основанием для разработки препаратов для антифибротической терапии на основе иммунонейтрализации маринобуфагенина.

Полученные результаты могут являться основанием для разработки препаратов для антифибротической терапии на основе antagonизма антагонистов альдостерона и маринобуфагенина.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Grigorova, Y. A monoclonal antibody to an endogenous sodium pump inhibitor marinobufagenin reverses aortic remodeling and stiffness in normotensive rats on a high salt intake / Y. Grigorova, O. Juhasz, V. Zernetkina, K. Fishbein, E.G. Lakatta, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // American Journal of Hypertension. - 2016 - Vol. 29 N 5. - P. 641-646.
2. Fedorova, O.V. Marinobufagenin-induced vascular fibrosis is a likely target for mineralocorticoid antagonists / O.V. Fedorova, I.V. Emelianov, K.A. Bagrov, Y.N. Grigorova, W. Wei, O. Juhasz, E.V. Frolova, C.A. Marshall, E.G. Lakatta, A.O. Konradi, A.Y. Bagrov // Journal of Hypertension. - 2015. - Vol. 33 N 8. - P. 1602-1610.
3. Zazerskaya, I.E. Magnesium sulfate potentiates effect of Digifab on Marinobufagenin-induced Na/K -ATPase inhibition / I.E. Zazerskaya, V.V. Ishkaraeva, E.V. Frolova, N.G. Solodovnikova, Y.N. Grigorova, C.D. Adair, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // American Journal of Hypertension. - 2013. - Vol. 26 N 11. - P. 1269-1272.

4. **Григорова, Ю.Н.** Кардиотонические стероиды: основные эффекты, терапевтические подходы / Ю.Н. Григорова, А.Я. Багров, О.В. Федорова // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. - 2016. - №1 (57). - С. 11-26.

Тезисы докладов:

1. **Grigorova, Y.** A monoclonal antibody to a sodium pump inhibitor marinobufagenin reversed aortic remodeling and stiffness in normotensive rats on high salt intake / Y. Grigorova, W. Wei, V. Zernetkina, O. Juhasz, E.G. Lakatta, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // American Heart Association Annual Meeting, Chicago, IL, November 15-19, 2014.
2. **Grigorova, Y.N.** The endogenous Na,K-ATPase ligand, marinobufagenin, induces vascular fibrosis via a pressure-independent mechanism in NaCl-loaded diabetic rats / Y. N. Grigorova, A.V. Fadeev, K.A. Bagrov, E.V. Frolova, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // Artery 12, Vienna, Austria, October 18-20, 2012.
3. Konradi, A.O. Aldosterone antagonists reverse effects of cardiotonic steroids on vascular elasticity and collagen synthesis / A.O. Konradi, **Y.N. Grigorova**, K.A. Bagrov, A.V. Fadeev, I.V. Emelianov, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // Artery 12, Vienna, Austria, October 18-20, 2012.
4. **Григорова, Ю.Н.** Маринобуфагенин вызывает не связанное с изменением давления увеличение сосудистой жесткости у крыс с сахарным диабетом 2 типа на фоне солевой нагрузки / Ю.Н. Григорова, К.А. Багров, А.В. Фадеев // IV Ежегодная научно-практическая конференция молодых ученых специалистов ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова», Санкт-Петербург, 2012 год.