

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени  
В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*На правах рукописи*

Григорова Юлия Николаевна

МАРИНОБУФАГЕНИН-ИНДУЦИРОВАННЫЙ ФИБРОЗ  
СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ  
И ВОЗМОЖНОСТИ ЕГО КОРРЕКЦИИ

14.01.05 - кардиология

14.03.03 - патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Багров А.Я., доктор медицинских наук

Галагудза М.М., доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН

Санкт-Петербург - 2017

## Содержание

Содержание .....	2
Введение .....	5
<b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....</b>	<b>14</b>
1.1 Жесткость сосудистой стенки .....	14
1.2 Механизмы увеличения жесткости сосудистой стенки .....	15
1.3 Эндогенные кардиотонические стероиды и концепция натрийуретического гормона .....	19
1.4 Кардиотонические стероиды и регуляция экскреции натрия .....	20
1.5 Эндогенный оуабаин и маринобуфагенин у Dahl соль-чувствительных крыс .....	23
1.6 Эндогенный оуабаин и парадигма адлдуцина .....	29
1.7 Маринобуфагенин: участие в развитии патологических состояний .....	31
1.8 Биосинтез маринобуфагенина .....	32
1.9 Маринобуфагенин и фиброз .....	34
1.10 Роль маринобуфагенина в патогенезе .....	38
хронической почечной недостаточности .....	38
1.11 Маринобуфагенин и преэклампсия .....	40
1.13 Иммунонейтрализация маринобуфагенина .....	41
1.14 Влияние ограничения потребления соли на маринобуфагенин .....	43
1.15 Маринобуфагенин и сахарный диабет .....	44
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>	<b>46</b>
2.1 Дизайн эксперимента “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке” .....	46
2.2 Метаболическое исследование .....	47

2.3 Измерение артериального давления с помощью хвостовой манжетки .....	48
2.4 Измерение активности $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах.....	48
2.5 Измерение маринобуфагенина в плазме.....	49
2.6 Исследование способности сосуда к вазорелаксации.....	50
2.7 Гистохимическое исследование .....	51
2.8 Дизайн эксперимента “Изучение действия маринобуфагенина и антагонистов альдостерона на степень фиброза в эксплантах аорты крыс” ....	51
2.9 Измерение активности почечной $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.....	53
2.10 Гистохимическое исследование .....	54
2.11 Белковый иммуноблот.....	54
2.12 Дизайн эксперимента “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке” .....	55
2.13 Глюкозотолерантный тест.....	57
2.14 Измерение маринобуфагенина в моче .....	57
2.15 Белковый иммуноблот.....	57
2.16 Статистический анализ.....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	59
3.1 Результаты исследования “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке” .....	59
3.2 Результаты эксперимента “Изучение действия маринобуфагенина и антагонистов альдостерона на степень фиброза в эксплантах аорты крыс, а также на их способность к расслаблению” .....	64
3.3 Результаты исследования “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке” .....	67
4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	73

4.1 Профибротический эффект маринобуфагенина и эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 у нормотензивных крыс на солевой нагрузке .....	73
4.2 Профибротический эффект маринобуфагенина и антагонистический эффект канренона .....	76
4.3 Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке .....	79
Заключение .....	84
Выводы .....	85
Практические рекомендации.....	86
Список сокращений .....	88
Список литературы .....	89

## Введение

### 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 [1-5]. 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 риск развития гипертрофии левого желудочка и ишемической болезни сердца [6-8].

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 [9,10]. На сегодняшний день предложено множество механизмов, объясняющих причины данного нарушения. Морфологические изменения сосудистой стенки могут быть результатом гемодинамических изменений [11,12], а также воздействия гормональных факторов [13,14]. Было показано, что повышенное потребление соли ассоциировано с увеличением сосудистой жесткости [14,15]. Известно, что при гиперволемической нагрузке стимулируется синтез эндогенного кардиотонического стероида (КТС) маринобуфагенина (МБГ), являющегося натриуретическим гормоном, который ингибирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу в проксимальном отделе почечных канальцев, тем самым стимулирует натрийурез [16]. 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 [17–22]. Механизм остается до конца неизученным. Предположительно, индуцирование профибротического пути осуществляется за счет связывания кардиотонического стероида с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, что запускает каскад реакций, ведущий к инактивации негативного регулятора промотора гена *Col1*, увеличению экспрессии гена *Col1* и, как результат, увеличению синтеза коллагена во внеклеточное пространство фибробластами и гладкомышечными клетками сосудов [17, 23, 24].

Повышенная продукция МБГ была обнаружена при сахарном диабете 2 типа [25-27]. У Dahl соль-чувствительных крыс на высокосолевого диете было показано увеличение продукции МБГ вместе с фиброзом миокарда [28]. Кроме того, в этом исследовании был описан профибротический сигнальный путь, сопровождающийся активацией TGF- $\beta$ 1. Известно, что TGF- $\beta$  является основным профибротическим фактором в развитии такого осложнения сахарного диабета, как диабетическая нефропатия [29-31]. 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 [16], а также был получен выраженный антифибротический эффект антител на миокардиальный фиброз на модели нефропатии у крыс [32]. Анти-МБГ антитела 3E9 инактивировали TGF- $\beta$  сигнальный путь, а также реверсировали фиброз миокарда и ремоделирование сердечно-сосудистой системы у Dahl соль-чувствительных крыс [28]. 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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой [33] позволяют предположить возможность антифибротического эффекта АА на фиброз сосудистой стенки.

Таким образом, эти обстоятельства обуславливают 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 сосудистой жесткости.

### **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, инициированный 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 [18], 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 3E9 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 3E9 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 отсутствие 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 3E9 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 3E9.
3. Демонстрация антифибротического эффекта антагонистов альдостерона в сосудистой стенке за счет антагонизма с маринобуфагенином позволяет расширить показания к их применению.
4. Показан механизм маринобуфагенин-индуцированного фиброза сосудистой стенки в условиях солевой нагрузки и сахарного диабета 2 типа в отсутствие гемодинамических изменений, и доказана его обратимость при устранении причинного фактора посредством связывания со специфичными антителами 3E9.

## Методология и методы исследования

Настоящая работа была выполнена на крысах линии Вистар. Ранее было показано, что животные этого стока не имеют гипертензивного ответа на солевую нагрузку в отличие от Dahl соль-чувствительных крыс [34]. У соль-чувствительных крыс МБГ проявляет себя как натрийуретик и вазоконстриктор, а также совсем недавно был открыт его профибротический эффект у этих животных на солевой нагрузке. У нормотензивных животных, не обладающих соль-чувствительностью, в таких же условиях наблюдался лишь натрийуретический эффект МБГ в отсутствии гипертензивного ответа. Ввиду растущих доказательств профибротического действия МБГ была предложена гипотеза о том, что в результате солевой нагрузки у нормотензивных животных увеличивается уровень циркулирующего МБГ, который помимо стимуляции натрийуреза оказывает профибротический эффект на сосудистую стенку. Так, для эксперимента были выбраны нормотензивные животные линии Вистар.

Основным стимулом для продукции МБГ является солевая нагрузка, поэтому в данном эксперименте животные находятся в течение 4-х недель на высокосолевого диете. Ранее было продемонстрировано, что интрагиппокампальное введение оуабаина, триггера синтеза МБГ, Dahl соль-чувствительным крысам имитирует эффекты солевой нагрузки, а введение анти-МБГ антител реверсировало эффект оуабаина [35]. На модели нефропатии, при которой наблюдалось повышение уровня МБГ в плазме крыс, был показан фиброз миокарда, развившийся в течение 4-х недель. Подобный эффект был достигнут с помощью инфузии МБГ [17]. Эти данные указывают на основную роль МБГ в развитии натрийуретического, прогипертензивного и профибротического эффектов при солевой нагрузке.

Для изучения МБГ-индуцированного профибротического сигнального пути в условиях сахарного диабета 2 типа новорожденные крысы линии Вистар были подвержены инициации диабета инъекцией стрептозотоцина. Далее выполнялся

глюкозотолерантный тест для подтверждения успешного развития модели экспериментального диабета 2 типа, а на 8-й неделе часть животных была переведена на высокосолевою диету.

У животных выполнялось измерение артериального давления на хвостовой артерии и оценка метаболических параметров до начала исследования, после солевой нагрузки, а также после лечения анти-МБГ антителами. По окончании эксперимента была собрана кровь для измерения уровня МБГ и активности эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, а также аорта для выполнения исследования способности сосуда расслабляться, белкового иммуноблота и гистохимического исследования.

Часть работы выполнена *ex vivo*, где кольца аорты, полученные от интактных нормотензивных 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 вазорелаксационному действию нитропруссид 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 отсутствие изменений артериального давления.
2. Маринобуфагенин индуцирует фиброз сосудистой стенки посредством связывания с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, что ведет к повышению количества коллагена в сосудистой стенке. Сосуды с повышенным 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:  $\text{PLC}\gamma$ - $\text{PKC}$ - $\delta$  – $\text{Fli-1}$  и  $\text{TGF-}\beta$ - $\text{SMADs}$ .

4. Моноклональные антитела к маринобуфагенину ослабляют его профибротический эффект.
5. Антагонист альдостерона, канренон, оказывает антифибротический эффект за счет антагонизма с маринобуфагенином.

### **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 опубликовано 4 печатные работы в отечественных и зарубежных 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. По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 1 – в отечественном рецензируемом издании, 3 - в зарубежных рецензируемых изданиях.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1 Жесткость сосудистой стенки

Увеличение жесткости сосудистой стенки в качестве признака старения упоминалось еще в древних медицинских рукописях, однако системная научная оценка жесткости сосудов, в особенности касающаяся центрального артериального русла (например, аорта и её центральные ветви), приобрела актуальность в последние несколько десятилетий. Повышение жесткости в крупных центральных артериях, таких как аорта и ее ветви, значительно способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) у пожилых индивидуумов, а также наблюдается при изолированной систолической гипертензии [2], ишемической болезни сердца, инсульте [36], хронической сердечной недостаточности [3] и фибрилляции предсердий [37]. На сегодняшний день известно, что увеличение жесткости центральных артерий является следствием процесса старения, и, как было показано, провоцирует проявление патологического фенотипа при таких заболеваниях, как диабет, атеросклероз, а также при заболеваниях почек [38]. Эти заболевания часто сопровождаются повышенным пульсовым давлением и изолированной систолической гипертензией [39-42].

По функциональному признаку артериальные сосуды могут быть разделены на два типа: (а) крупные эластические артерии (аорта, сонные артерии и подвздошные артерии), выполняющие амортизирующую функцию во время систолы, сглаживая перепад давления между систолой и диастолой, тем самым обеспечивая непрерывный ток крови, и (б) артерии мышечного типа (бедренная, подколенная), которые способны изменять тонус, тем самым модулируя скорость пульсовой волны, проходящей из более крупных сосудов [43]. Данное свойство сосудистой стенки необходимо для нормального функционирования. В результате сердечного сокращения распространяющаяся пульсовая волна взаимодействует с свойственным аорте низким сопротивлением, что производит относительно

низкую скорость пульсовой волны [44]. Дистальнее из-за отличающихся свойств сосудистой стенки и диаметра сосуда пульсовая волна проходит через участки, обладающие высоким сопротивлением, в результате чего увеличивается скорость распространяющейся волны, а также происходит отражение пульсовых волн. Отраженные волны формируют ретроградную пульсовую волну, которая возвращается к центральной аорте в диастолу, в результате чего создается повышенное диастолическое давление в восходящей аорте, что улучшает пропульсивную способность сердечно-сосудистой системы.

## **1.2 Механизмы увеличения жесткости сосудистой стенки**

Увеличение сосудистой жесткости является следствием комплексного взаимодействия между несколькими факторами. Так, увеличение жесткости сосудистой стенки связанное с возрастом является макроскопической манифестацией гемодинамических изменений [11], гормонального фона, повышенного потребления соли, индивидуального гликемического статуса, а также общих нарушений функционирования внутриклеточных систем [38, 45-47]. Увеличение жесткости сосудистой стенки в центральных сосудах ассоциировано не только с возрастом, но также является частью фенотипа при таких заболеваниях, как гипертензия и диабет, где комплекс клеточных механизмов нацелен на увеличение жесткости сосудистой стенки.

*Роль коллагена и эластина.* Комплаентность сосудистой стенки зависит от двух основных структурных протеинов: коллагена и эластина [38]. Процесс поддержания оптимального функционального состояния сосуда строго контролируется балансом между синтезом и деградацией этих двух протеинов. Нарушение баланса в данной регуляторной системе ведет к тому, что коллаген производится в избытке, в то время как синтез эластина нарушен [48]. Такая асимметрия способствует развитию фиброза и увеличению жесткости артериальной стенки. Кроме того, повышенное внутрисосудистое давление (при

гипертензии) благоприятствует продукции коллагена [49]. Гистологическое исследование артериальной ткани *post-mortem* показало, что в возрасте от 20 до 90 лет происходит утолщение меди в 2-3 раза [50, 51]. При обследовании жестких сосудов на микроскопическом уровне наблюдалось присутствие неорганизованного эндотелия, повышение уровня коллагена, фрагментированный и в малом количестве эластин, инфильтрация гладкомышечными клетками, макрофагами, мононуклеарными клетками, а также повышенная активность матричных металлопротеиназ [38, 52]. Кроме того, было замечено увеличение TGF- $\beta$ , ICAM и цитокинов в сосудистой стенке. Помимо утолщения стенки происходит постоянное увеличение диаметра сосуда с возрастом около 9% за 10 лет в возрасте от 20 до 60 лет в восходящей аорте [53].

*Роль матричных металлопротеиназ.* Внеклеточный матрикс сосудистой стенки состоит из коллагена, эластина, гликопротеинов и протеогликанов [38]. Соотношение коллагена и эластина регулируется катаболическими металлопротеиназами. Металлопротеиназы отвечают за деградацию экстраклеточного матрикса за счет продукции легко разрушаемого коллагена и изношенных эластиновых волокон. В результате воспалительного процесса полиморфонуклеарные нейтрофилы и макрофаги продуцируют ряд металлопротеиназ (ММП-1, -7, -8, -13) и эластаз. Хондроитин сульфат, гепаран сульфат и фибронектин также принимают участие в процессе изменения сосудистой жесткости, так как накопление этих молекул в сосудистой стенке ведет к ее утолщению и снижению комплаентности [54].

*Роль конечных продуктов гликирования.* Конечные продукты гликирования образуются за счет гликирования неэнзиматических протеинов, в результате чего формируются необратимые сшивки между волокнами в стабильных тканевых протеинах, например, таких, как коллаген [55, 56]. В результате образования дополнительных сшивок между тропоколлагеновыми волокнами коллаген становится более жестким [55-57]. Таким же образом, эластин подвержен процессу гликирования, в следствие чего количество этого протеина в стенке сосуда значительно уменьшается [58,59]. Известно, что конечные продукты



гликирования также оказывают влияние на эндотелиальную функцию за счет нейтрализации NO и увеличения продукции активных форм кислорода (АФК), особенно пероксинитрита [60]. Кроме того, все больше исследований деионстрируют, что конечные продукты гликирования стимулируют воспалительный процесс, в результате чего происходит повышение экспрессии p12(ras), NF-κB, стимуляция синтеза АФК, увеличение продукции цитокинов, ростовых факторов и ICAM, а все это в свою очередь опосредует увеличение сосудистой жесткости за счет увеличения активности металлопротеиназ и эндотелиальной дисфункции, при этом повреждение эндотелия стимулирует ангиогенез и способствует развитию атеросклероза [61-66].

*Роль эндотелиальной дисфункции.* Одна из клинических характеристик эндотелиальной дисфункции – нарушенный вазодилатационный ответ на воздействие ацетилхолином [67]. Исследования показали, что причинно-следственные отношения между эндотелиальной дисфункцией и жесткостью сосудистой стенки могут иметь противоположный характер, то есть повышенная сосудистая жесткость предшествует развитию эндотелиальной дисфункции. Таким образом, существует порочный круг, в котором повышенная сосудистая жесткость ведет к изменениям в эндотелии, а это в свою очередь усугубляет жесткость сосудистой стенки. Так, например, была показана стимуляция NO-синтазы в эндотелиальных клетках, растущих в эластичных силиконовых трубках, в то время как в клетках, растущих в жестких трубках, такого эффекта не наблюдалось [68]. Эти и многие другие исследования предлагают гипотезу о том, что ригидность сосудистой стенки может воздействовать на активность NO-синтазы, тем самым способствуя увеличению сосудистой жесткости [38].

*Роль нейроэндокринной системы и диеты.* Несколько гормонов также принимают участие в модуляции сосудистой жесткости. Так, например, ангиотензин II (АII) стимулирует формирование коллагена, запускает ремоделирование матрикса и гипертрофию сосудистой стенки, ингибирует NO-зависимый каскад, стимулирует продукцию АФК и отрицательно влияет на синтез эластина [38, 69]. Существует мнение о том, что альдостерон тоже

способствует увеличению сосудистой жесткости и участвует в повышении артериального давления за счет развития гипертрофии гладкомышечных клеток, фиброза и повышения экспрессии фибронектина [70,71]. Было показано, что потребление большого количества соли способствует увеличению сосудистой жесткости, особенно с возрастом. Так, низкосолевая диета у пожилых людей показала улучшение комплаентности сосудистой стенки [72,73]. Кроме того, известно, что потребление соли ассоциировано с генетической модуляцией рецепторов к ангиотензину 2 типа, синтеза NO и синтеза альдостерона [74-77]. Потребление большого количества соли также ухудшает эндотелиальную функцию в результате взаимодействия с NO-синтазной активностью и увеличения активности НАДФН-оксидазы [72].

*Роль глюкозы и инсулина.* Сахарный диабет и метаболический синдром сопровождается повышением артериальной жесткости во всех возрастных группах. Так, у детей, страдающих ожирением, с диагностированным метаболическим синдромом наблюдается раннее повышение артериальной жесткости [78]. Это указывает на то, что инсулинорезистентность положительно коррелирует с жесткостью сосудистой стенки и, таким образом, ассоциирована с ожирением и диабетом. Например, было показано, что хроническая гипергликемия и гиперинсулинемия стимулируют активность РААС, а также экспрессию рецепторов к ангиотензину 2 типа в сосудистой ткани, тем самым способствуя развитию гипертрофии сосудистой стенки и фиброзу [79, 80]. Известно, что нарушенная глюкозотолерантность способствует увеличению гликирования коллагена, тем самым влияя на упруго-эластические свойства васкулатуры. Повышение артериальной жесткости в дальнейшем обостряется эндотелиальной дисфункцией, инсулин-индуцированными нарушениями сосудистого тонуса и нарушенной функцией натрийуретического пептида [81-83].

*Роль генетических факторов.* Одно из самых выдающихся эпидемиологических исследований в области сердечно-сосудистой медицины, Framingham Heart Study, выявило несколько интересных аспектов генетического профиля, ассоциированных с сосудистой жесткостью. В анализе полностью

исследовался геном всех участников, в результате чего была подсчитана наследуемость хронически повышенного пульсового давления, равная 0.51-0.52, что говорит о связи умеренной силы между этими параметрами [84]. Кроме того, были идентифицированы несколько участков, предположительно, способствующих развитию высокого пульсового давления, включающие 122 сМ регион хромосомы 15, 164 сМ регион хромосомы 8 и 70сМ регион хромосомы 7 [85-87]. Взаимосвязь генотипа с патологией была показана на примере артериальной жесткости и полиморфизма гена ангиотензин-превращающего фермента или рецептора к ангиотензину, рецептора к эндотелину А и В, коллагена Ia1, фибриллина-1 и IGF-1 [88-91].

### **1.3 Эндогенные кардиотонические стероиды и концепция натрийуретического гормона**

Концепция натрийуретического гормона, выдвинутая de Wardener, заключается в существовании гуморального прогипертензивного фактора, являющегося эндогенным ингибитором  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и участвующего в патогенезе соль-чувствительной гипертензии [92-94]. Проведенные в прошлом столетии исследования в области изучения артериального давления и регуляции объема циркулирующей крови несомненно увеличили объем знаний и понимание о ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (РААС), вазопрессине, а также симпатической нервной системе. Однако, еще в 60-х годах было известно, что с помощью этих систем невозможно объяснить физиологию и патофизиологию, ассоциированную с острым и хроническим увеличением объема циркулирующей крови. Поэтому была сформулирована концепция натрийуретического гормона на основании результатов многочисленных экспериментов с животными в условиях высокого потребления соли, а также благодаря изучению влияния солевой нагрузки и объемзависимых форм гипертензии у людей [93, 94].  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза участвует в механизме активного транспорта натрия в почках [95], а поскольку

дигиталисные гликозиды являются специфическими лигандами  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, было высказано предположение (de Wardener) о наличии дигиталис-подобных свойств у в то время еще гипотетического натрийуретического гормона [93]. В соответствии с концепцией натрийуретического гормона основной ролью эндогенного дигиталисного фактора является стимуляция натрийуреза посредством ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в проксимальных почечных канальцах с последующим снижением реабсорбции натрия [93]. Однако, чрезмерная продукция дигиталис-подобных КТС способствует вазоконстрикции, так как ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  насоса в мембране гладкомышечных клеток связано с активацией  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  обменника [96]. Kojima и др. показали, что антитела к дигоксину снижают артериальное давление у крыс с ДОКА- солевой гипертензией. Все эти наблюдения инициировали дальнейшие исследования по идентификации "эндогенного дигиталиса". Позже Lichtstein и др. выявили наличие производных буфалина в хрусталике млекопитающих и предположили участие этих веществ в развитии катаракты [97]. В 1996 году Hilton масс-спектрометрически идентифицировал вещество буфадиенолидной природы в человеческой плаценте [98]. Впоследствии было показано, что основным претендентом на роль эндогенного дигиталисного фактора является буфадиенолид маринобуфагенин (МБГ) [99-101].

#### **1.4 Кардиотонические стероиды и регуляция экскреции натрия**

Кардиотонические стероиды (КТС) в низких, "физиологических", концентрациях способны ингибировать активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в почках, повышая таким образом натрийурез [102]. Циркулирующий в плазме МБГ ингибирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу в почках крыс при том, что  $\alpha 1$  субъединица у грызунов имеет пониженную чувствительность к большинству кардиотонических стероидов [103, 104]. У Dahl соль-чувствительных и у нормотензивных Спрег-Доули крыс, натрийуретический ответ на острую и хроническую солевую

нагрузку связан с существенным увеличением МБГ в плазме и моче [105, 106]. Более того, *in vivo* введение анти-МБГ антител вызвало снижение экскреции натрия и восстановлению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [105,106].  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, частично выделенная из почечных мембран в мягких условиях с добавкой небольшой концентрации додецилсульфата натрия [106], так же как и в случае выделения мембран-связанной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы без детергента, но с последующим добавлением ионофора аламетицина, показала бифазный ответ на ингибирование МБГ при том, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза в этом материале была представлена только  $\alpha 1$  изоформой. [104,106]. Важно, что в этих условиях почечная  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза имела высокую степень сродства как с МБГ, так и с эндогенным МБГ-иммунореактивным материалом, выделенным из мочи соль-чувствительных крыс [104]. Примечательно, что после воздействия постепенно увеличивающихся концентраций додецилсульфата натрия на интактные почечные мембраны, бифазная природа МБГ-ингибиторной кривой с высоко- и низкоафинными компонентами постепенно сменилась на монофазную, представляющую одиночную  $K_i$  (Федорова, неопубликованные наблюдения). Все эти наблюдения позволили предположить, что степень полимеризации  $\alpha 1$  субъединиц  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (димеров или тетрамеров) или наличие каких-либо других белков (например,  $\gamma$ -субъединицы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы) могут модулировать связывание  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с некоторыми КТС, включая МБГ. Кроме того, КТС могут взаимодействовать с другими натрийуретическими гормонами нестероидной природы. Так, предсердный натрийуретический пептид (ПНП) в низких концентрациях, индуцируя  $\text{cGMP}/\text{PKG}$ -зависимый механизм, увеличивает чувствительность почечной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы к МБГ, однако, в сосудах оказывает противоположный эффект на связывание МБГ с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, понижая чувствительность натриевого насоса в сосудистой сарколемме к кардиотоническому стероиду [107]. Потенциальная важность этого взаимодействия проиллюстрирована результатами эксперимента, в котором сравнивались артериальное давление, экскреция натрия, активность натриевого насоса в аорте и в мозговом слое почки, а также количество МБГ, ПНП, и  $\text{cGMP}$  у

Dahl соль-чувствительных и Спрег-Доули крыс на солевой нагрузке [34]. В этом эксперименте солевая нагрузка была ассоциирована с увеличением ПНП в плазме и повышением экскреции цГМФ у нормотензивных крыс, но не у соль-чувствительных. Солевая нагрузка привела к устойчивому увеличению экскреции МБГ и у соль-чувствительных, и у Спрег-Доули крыс. У Dahl соль-чувствительных крыс на солевой нагрузке повысилось систолическое артериальное давление, что сопровождалось ингибированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в аорте, тогда как у нормотензивных крыс артериальное давление и активность натриевого насоса не изменились. Спрег-Доули выводили в два раза больше натрия по сравнению с соль-чувствительными крысами, а почечная  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза у них была заингибирована в большей степени, чем у соль-чувствительных крыс. Таким образом, у нормотензивных и соль-чувствительных крыс после солевой нагрузки сопоставимое повышение уровня МБГ было связано с более выраженным ингибированием натриевого насоса в почках у нормотензивных крыс, а у Dahl соль-чувствительных - в гладкомышечных клетках сосудов [34]. В результате, у Спрег-Доули крыс наблюдалось усиление натрийуреза, а у соль-чувствительных - задержка натрия и подъем артериального давления [34]. Отсутствие ответа ПНП на солевую нагрузку у соль-чувствительных крыс является одним из факторов, лежащих в основе различных паттернов ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы у двух разных линий крыс в результате солевой нагрузки.

Другой механизм КТС-опосредованного натрийуреза заключается в активации КТС-индуцированного эндоцитоза  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в почках. У Спрег-Доули крыс на хронической солевой нагрузке почечная экскреция МБГ достоверно увеличилась, а анти-МБГ антитела уменьшили натрийурез и восстановили активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в корковом слое почки [103]. В том же исследовании было продемонстрировано, что в дополнение к прямому ингибированию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, МБГ способен вызывать натрийуретический эффект посредством интернализации натриевого насоса в проксимальных канальцах [103]. Было показано, что эндоцитоз  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в проксимальных

канальцах происходит в результате связывания  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с КТС с последующим образованием везикул, покрытых клатрином [108,109]. Для этого требуется активация фосфоинозитид-3-киназы, наличие натриевого насоса в составе кавеолы, а также запуск внутриклеточного каскада Src - EGFR [108,109]. Также было показано, что КТС могут отрицательно влиять на экспрессию одного из мембранных  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обменников, NHE3, в апикальной мембране клеток почечных канальцев [110,111]. Таким образом, увеличение циркулирующего МБГ при солевой нагрузке приводит к снижению транспорта натрия в базолатеральной и апикальной мембранах клеток проксимальных канальцев и, соответственно, уменьшает задержку натрия как посредством классического, или ионного сигнального механизма, так и описанным выше механизмом активации  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза-Src-EGFR каскада.

### **1.5 Эндогенный оубаин и маринобуфагенин у Dahl соль-чувствительных крыс**

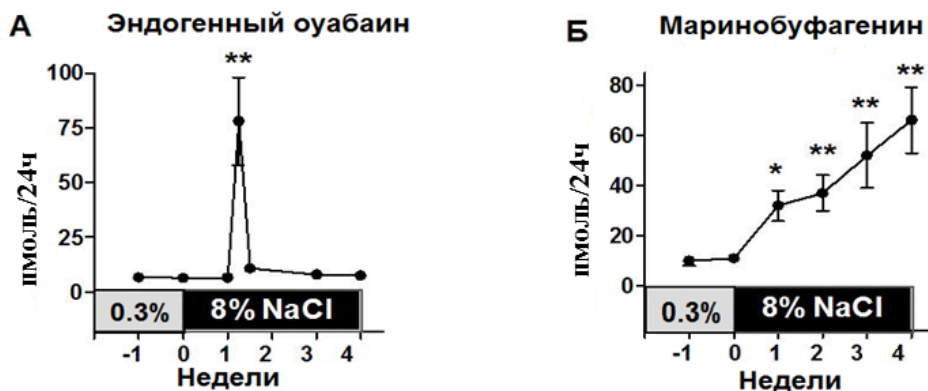
Эндогенный оубаин (ЭО) был первым КТС, обнаруженным в человеческой плазме [112,113], а позднее кора надпочечников и гипоталамус также были рассмотрены в качестве места продукции ЭО [114-116]. Однако, у человека ЭО не показал натрийуретического действия, а периферический уровень этого гормона оставался неизменным во время хронической солевой нагрузки [117]. Было показано, что у крыс оубаин имеет высокую аффинность к  $\alpha 2/\alpha 3$  изоформам  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [35], в то время как в клетках почечных канальцев, которые и являются мишенью для "натрийуретического гормона",  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза представлена в основном  $\alpha 1$  изоформой, которая практически не имеет чувствительности к ЭО [99]. Несмотря на то, что физиологические свойства ЭО не полностью соответствуют критериям гипотетического натрийуретического гормона, экспериментальные исследования указывают на несомненно важную роль ЭО в патогенезе соль-чувствительной гипертензии.

Lewis Dahl предположил существование прогипертензивного натрийуретического гормона у крыс способных развивать прогрессирующую гипертензию на высокосолевого диете [118], которые были названы Dahl соль-чувствительными крысами (Dahl Salt-Sensitive). Изменения уровней КТС на модели соль-чувствительной гипертензии у этих крыс были детально изучены. Было показано, что на высокосолевого диете (8% NaCl) у этих животных наблюдалось преходящее увеличение концентрации ЭО в плазме с последующим прогрессирующим подъемом уровня МБГ в плазме и моче, а также с сопутствующим подъемом артериального давления [106]. Введение анти-МБГ антител соль-чувствительным крысам со стойкой гипертензией привело к снижению артериального давления, в то время как антитела к ЭО не произвели такого эффекта [106]. Следовательно, именно повышенный уровень МБГ поддерживает высокое артериальное давление у Dahl соль-чувствительных крыс.

При сравнении центрального и периферического уровней ЭО и МБГ у соль-чувствительных крыс в ответ как на хроническую, так и на острую солевую нагрузку, было показано, что временный подъем ЭО предшествовал продолжительному подъему уровня МБГ (Рисунок 1 А, Б) [35,106].



## Dahl соль-чувствительные крысы



## Нормотензивные пациенты

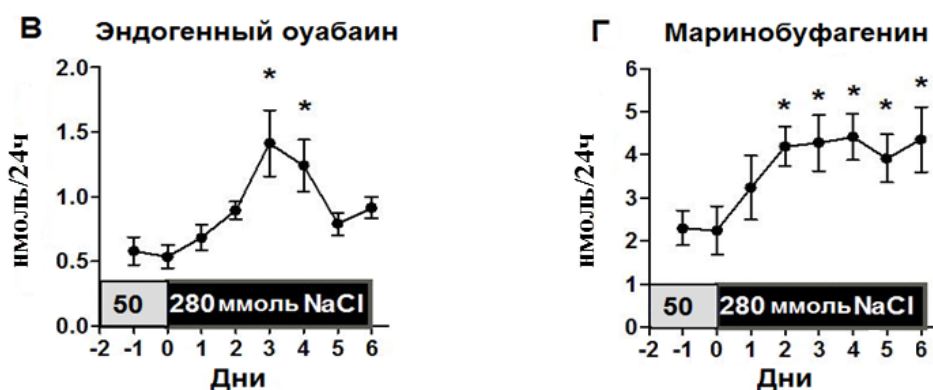


Рисунок 1. Пиковое увеличение эндогенного оуабайна, предшествующее стойкому увеличению экскреции МБГ, во время солевой нагрузки. На рисунке представлены похожие паттерны почечной экскреции эндогенных кардиотонических стероидов при солевой нагрузке у соль-чувствительных крыс (8% NaCl диета А и Б) и повышенном потреблении соли у нормотензивных субъектов (280 vs. 50 ммоль NaCl в день) (В и Г). Статистический анализ представлен однофакторным дисперсионным анализом с последующей поправкой по Ньюману-Кюльсу: \*-P<0.05; \*\*-P<0.01 vs. день 0. Адаптировано из источников 106 и 119.

Так, в ответ на солевую нагрузку уровень ЭО в некоторых зонах мозга (миндалины, гиппокамп, гипофиз), а также надпочечниках и плазме показал преходящий пиковый ответ, за которым следовал продолжительный подъем уровня МБГ в плазме и моче [120]. Согласно этому паттерну было предположено существование причинно-следственной связи между острым ответом ЭО и

стойким подъемом МБГ, то есть мозговой ЭО выполняет функцию триггера продукции МБГ. Согласно этой гипотезе, предварительное введение антител к МБГ крысам на острой солевой нагрузке не ослабило ответного увеличения уровня ЭО, но предотвратило NaCl-индуцированный подъем артериального давления [120]. В том же эксперименте, предварительное введение антител к ЭО в мозг (интрагиппокампально, 60 пг) соль-чувствительным крысам на высокосолевой диете значительно понизило NaCl-индуцированную экскрецию МБГ [120].

Takahashi и Leenen в своих работах продемонстрировали, что ответное действие мозгового оубаина на солевую нагрузку активирует ренин-ангиотензиновую систему [121, 122]. Позже было показано, что центральная PАС может выступать в качестве фактора связывающего центральный (ЭО) и периферический (МБГ) КТС. Эффекты острой солевой нагрузки на артериальное давление, центральный и периферический ЭО и ангиотензин II, а также на содержание норэпинефрина (НЭ), МБГ в плазме и активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  насоса в мозговом слое почки были исследованы на 10-ти недельных соль-чувствительных крысах [105]. Солевая нагрузка стимулировала преходящее пиковое увеличение ЭО в гиппокампе и гипофизе с последующим транзиторным увеличением продукции АП в гипофизе, увеличением концентрации НЭ в плазме и адренкортикального АП, а также стойким увеличением экскреции МБГ, угнетением активности сосудистого  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  насоса на 45% и подъемом артериального давления на 35 мм.рт.ст. [105, 120]. В этих же экспериментах, на фоне предварительного введения анти-ЭО или анти-МБГ поликлональных антител наблюдалась нейтрализация NaCl-индуцированного вазопрессорного ответа и угнетения активности почечной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Кроме того, центральное введение антител к ЭО до солевой нагрузки предотвратило увеличение АП в гипофизе и надпочечниках, а также понизило продукцию МБГ. Периферически введенные анти-МБГ антитела, напротив, не оказали никакого эффекта на уровень центрального ЭО и АП. В первичной культуре адренкортикальных клеток, полученных от Dahl соль-чувствительных крыс, 1

ммоль/л АП удвоил продукцию МБГ, а инкубация клеток с лозартаном в дополнение к АП предотвратила данный эффект [105]. Таким образом, можно заключить, что в ответ на солевую нагрузку мозговой ЭО стимулирует адренкортикальный МБГ посредством активации АТ1 рецепторов. МБГ в свою очередь ингибирует активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса в почках и увеличивает артериальное давление, то есть ведет себя как натрийуретический гормон [105]. Схематично механизм взаимосвязи центральных и периферических эффектов КТС изображен на Рисунке 2.

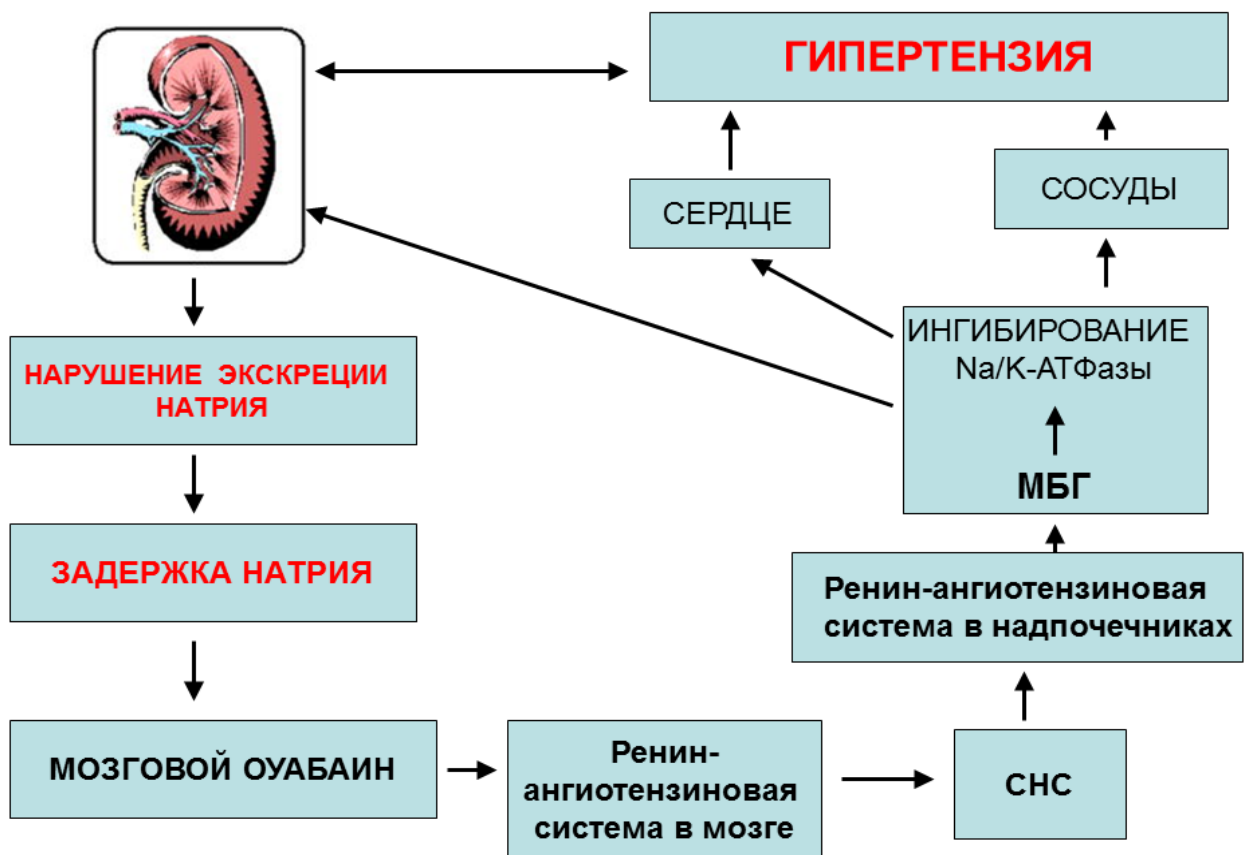


Рисунок 2. Взаимодействие между мозговым эндогенным оубаином, ренин-ангиотензиновой системой и маринобуфагенином в патогенезе соль-чувствительной гипертензии.

У соль-чувствительных крыс на солевой нагрузке при нарушенном транспорте натрия в почках задержка натрия стимулирует выработку эндогенного оубаина в гиппокампе, гипоталамусе и гипофизе. Мозговой эндогенный оубаин

стимулирует ренин-ангиотензиновую систему в гипоталамусе и гипофизе и активирует симпатическую нервную систему, а также ренин-ангиотензиновую систему в коре надпочечников, тем самым стимулируя продукцию МБГ надпочечниками. МБГ продуцируется с первичной адаптивной целью индуцировать натрийурез посредством ингибирования почечной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Избыточная продукция МБГ, однако, ведет к ингибированию натриевого насоса в гладкомышечных клетках с последующей вазоконстрикцией.

В дальнейшем было продемонстрировано, что интрагиппокампальная администрация оубаина в очень низких дозах соль-чувствительным крысам имитирует эффекты солевой нагрузки, включая активацию РАС в гипоталамусе и надпочечниках, увеличение количества МБГ в надпочечниках, ингибирование натриевого насоса в сосудах и почке, а также вазопрессорный и натрийуретический эффекты [120]. Важно отметить, что в этом же эксперименте *in vivo* периферическое введение анти-МБГ антител реверсировало вышеперечисленные эффекты оубаина [120].

Хотя релевантность такого сценария с патогенезом человеческой гипертензии все еще не доказана, у нормотензивных человеческих субъектов на солевой нагрузке почечная экскреция КТС имела схожий паттерн, который уже наблюдался у соль-чувствительных на солевой нагрузке, то есть пиковое увеличение почечной экскреции ЭО, предшествующее продолжительному увеличению экскреции МБГ (Рисунок 1) [119].

В нескольких исследованиях были проанализированы механизмы, которые могли бы связывать солевую нагрузку и задержку жидкости с активацией мозгового ЭО. Leenen и его сотрудники показали, что увеличение  $\text{NaCl}$  в цереброспинальной жидкости у крыс предшествует развитию гипертензии [123], и что ионы натрия в мозге входят во внутриклеточное пространство через эпителиальные натриевые каналы [124], работа которых модулируется центральными минералкортикоидными рецепторами [125]. Также Gabor и Leenen продемонстрировали, что иммунонейтрализация мозгового ЭО у крыс линии Вистар предотвращает потенцирующий эффект экзогенно введенного

альдостерона на вазопрессорный ответ, вызванный центральным введением хлорида натрия [126]. Согласно некоторым данным можно предположить, что специфические натриевые рецепторы вовлечены в этот процесс больше, чем эпителиальные натриевые каналы [127]. Существует предположение, что у соль-чувствительных крыс NaCl-зависимое увеличение концентрации натрия в цереброспинальной жидкости может зависеть от генетически измененной Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы в хороидном сплетении [128]. Таким образом, аномальная функция натриевого насоса у соль-чувствительных крыс проявляется не только в повышенной способности задерживать натрий и жидкость [129], но также является триггером в ЭО-зависимых центральных механизмах развития гипертензии, индуцированных солевой нагрузкой [124].

### **1.6 Эндогенный оубаин и парадигма аддуцина**

Несмотря на отсутствие доказательств натрийуретической активности ЭО, некоторые наблюдения позволяют предположить прогипертензивную роль ЭО, включая развитие гипертензии у животных, которым вводился оубаин [130,131], а также увеличение уровня ЭО у пациентов с эссенциальной гипертензией [132]. Также описаны два других механизма гипертензивной активности ЭО. В основе одного из этих механизмов лежит так называемая "парадигма аддуцина", а другой основывается на существовании высокочувствительных оубаин-связывающих рецепторов в гладкомышечных клетках, которые были предложены в качестве связи между периферическими эффектами ЭО и вазоконстрикцией в процессе развития гипертензии.

У миланских гипертензивных крыс был отмечен повышенный уровень ЭО, а также наличие мутации цитоскелетного протеина, аддуцина, которая ассоциирована с повышенной экспрессией и активностью Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы в ренотубулярном эпителии [133,134]. Повышение активности почечной Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы у миланских гипертензивных крыс основано на изменении времени

нахождения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в клеточной мембране в связи с изменением свойств аддуцина, при котором уменьшается эндоцитоз  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, что способствует повышению относительной активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы за счет увеличения количества натриевых насосов в клеточной мембране [134-136]. Хроническое введение низких доз ЭО нормотензивным крысам удвоило уровень ЭО в плазме, способствовало подъему артериального давления, а также привело к увеличению количества  $\alpha 1/\beta 1$  субъединиц  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, Src и EGFR в изолированных кавеоллярных мембранах вместе с активацией экстраклеточно-регулируемой протеинкиназы 1/2 (ERK1/2) [134]. Предполагается, что ЭО осуществляет эти эффекты посредством взаимодействия с фракцией оубаин-чувствительной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, локализованной в кавеолах ренотубулярных клеток [134]. В соответствии с этим, введение миланским гипертензивным крысам антагониста оубаина, ростафуроксина (PST2238), производного дигитоксина, понизило артериальное давление и нормализовало оубаин-индуцированную активацию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мозговом слое почки [134,137]. Согласно вышесказанному, у гипертензивных пациентов, имеющих полиморфизм гена аддуцина, реабсорбция натрия в почках изменена [138]. Manunta и др. продемонстрировали, что у гипертензивных пациентов, имеющих повышенный уровень ЭО в плазме и мутацию аддуцина, развивается задержка натрия в почках вследствие солевой нагрузки [139].

Повышенный уровень ЭО также может быть причиной подъема артериального давления посредством ингибирования оубаин-чувствительной  $\alpha 2$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, что в свою очередь инициирует вход  $\text{Ca}^{2+}$  через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -каналы в гладкомышечных клетках сосудистой стенки [131,140]. Этот механизм был продемонстрирован в эксперименте на трансгенных животных, у которых была экспрессирована оубаин-резистентная  $\alpha 2$  изоформа  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В отличие от контрольных мышей с оубаин-чувствительным натриевым насосом, у трансгенных мышей с оубаин-резистентной  $\alpha 2$   $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой хроническое введение оубаина не повлияло на уровень артериального давления [131], так как их гладкомышечные клетки оказались нечувствительными к вазопрессорному

эффекту оубаина [141]. Более того, трансгенные мыши с редуцированной экспрессией  $\alpha 2$  (но не  $\alpha 1$ )  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы имели тенденцию к развитию гипертензии, а в артериях этих трансгенных мышей *in vitro* был показан повышенный сосудистый тонус [140].

### **1.7 Маринобуфагенин: участие в развитии патологических состояний**

Буфадиенолид маринобуфагенин (МБГ) является одним из КТС обнаруженных в плазме млекопитающих [142]. Впервые МБГ был рассмотрен как потенциальный КТС на основании исследований *in vitro*, в которых было показано, что этот стероид в низких концентрациях вызывает вазоконстрикцию изолированных человеческих сосудов и имеет большее сродство к  $\alpha 1$  изоформе  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, которая является основной изоформой ренотубулярного эпителия [99-101], а также широко распространена в гладкомышечной сарколемме сосудов [101]. У людей с нормальным уровнем артериального давления при солевой нагрузке было обнаружено увеличение количества МБГ в плазме, а также повышенное суточное выведение этого стероида [119]. У нормотензивных крыс и у собак острая и хроническая солевая нагрузка также вызывала повышение уровня МБГ в плазме [143-145,103].

Увеличение продукции МБГ наблюдается при объем-зависимых формах гипертензии, таких как эссенциальная гипертензия, первичный альдостеронизм, хроническая почечная недостаточность [146], застойная сердечная недостаточность [147], а также беременность [148]. Кроме того, известно, что уровень МБГ в плазме и плаценте в случае развития преэклампсии существенно повышается [148, 149]. У гипертензивных соль-чувствительных крыс, а также у беременных крыс с гипертензией, вызванной солевой нагрузкой, введение моноклональных антител к МБГ привело к понижению артериального давления и

восстановлению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -насоса в сарколемме гладкомышечных волокон сосудистой стенки [150]. Komiyama и др., используя метод хроматографической очистки (HPLC), выделили из плазмы людей МБГ и телоцинобуфагин (ТЦБ), являющийся возможным предшественником МБГ [151]. Эти исследователи обнаружили, что уровни ТЦБ и МБГ достоверно повысились в плазме пациентов с уреимией [151]. Позднее, эта же группа ученых продемонстрировала, что мышечные адренкортикальные Y1 клетки вырабатывают МБГ и его конъюгированную форму, маринобуфотоксин [152]. Также было показано снижение количества дигоксин-подобного иммунореактивного материала [153] и МБГ у крыс при адренэктомии [154], что указывает на то, что МБГ и другие кардиотонические стероиды синтезируются в надпочечниках.

Большое количество буфадиенолидов содержится в коже и в околоушных железах некоторых видов амфибий. В древние времена буфадиенолиды, полученные из кожи амфибий, использовались в традиционной восточной медицине для лечения сердечной недостаточности [142], поэтому эти стероиды относятся к классу КТС. У амфибий кожа участвует в регуляции водно-электролитного баланса, таким образом,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза и буфадиенолиды представляют собой систему, отвечающую за регуляцию водно-солевого гомеостаза [155].

### **1.8 Биосинтез маринобуфагенина**

Несмотря на существенный прогресс в изучении структуры и механизма действия КТС, механизм биосинтеза буфадиенолидов остается малоизученным. Известно, что буфадиенолиды образуются из холестерина, что было продемонстрировано в экспериментах с  $^{14}\text{C}$  холестерином у жаб [156]. Однако, было показано, что прегненолон не включается в молекулу буфадиенолида [157]. Основываясь на том, что традиционный биосинтез биологически активных



стероидов начинается с отщепления боковой цепи холестерина ферментом CYP11A1 с последующим преобразованием в прегненолон [158, 159], было предположено, что синтез буфadiensolidов осуществляется альтернативным путем [160]. Помимо "традиционного" стероидогенеза существуют другие биосинтетические пути образования биологически активных стероидов, в которых преобразование холестерина регулируются ферментами CYP7A1 в печени [161] и CYP27A1 в остальных "внепеченочных" тканях, включая надпочечники [162-165]. На основании того, что МБГ синтезируется внепеченочно, а точнее в коре надпочечников и в плаценте [16,159,109], а CYP7A1 экспрессируется исключительно в печени [161], было предположено, что у млекопитающих синтез МБГ осуществляется в процессе окисления холестерина в желчные кислоты гидролазой CYP27A1. Для проверки данной гипотезы было изучено влияние подавления экспрессии гена CYP27A1 методом РНК-интерференции в адренкортикальных клетках соль-чувствительных крыс, что произвело существенное понижение количества МБГ. Таким образом, синтез МБГ осуществляется из холестерина и контролируется ферментом CYP27A1. CYP27A1 гидролаза инициирует "кислотный" путь преобразования холестерина в желчные кислоты, которые и являются предшественниками буфadiensolidов, включая МБГ [166].

Полученные данные согласуются с *in vivo* результатами на модели соль-чувствительной гипертензии. У гипертензивных соль-чувствительных самцов и самок после 4-х недель солевой нагрузки увеличилось количество МБГ в плазме, а также уровень адренкортикальной CYP27A1 иРНК и фермента CYP27A1 по сравнению с группой животных на низкосолевой диете [166].

Примечательно, что в начале эксперимента, до солевой нагрузки, у самок соль-чувствительных крыс количество циркулирующего МБГ оказалось в 2 раза ниже, чем у самцов, что сопровождалось более низким исходным систолическим артериальным давлением у самок, чем у самцов. Данное наблюдение, предположительно, объясняется тем, что низкий уровень циркулирующего МБГ у самок является адаптивным механизмом, так как во время беременности, как

было продемонстрировано ранее, в плаценте синтезируется дополнительный МБГ [149, 166].

### 1.9 Маринобуфагенин и фиброз

Появляется все больше и больше доказательств тому, что вклад КТС в патогенез гипертензии не ограничивается вазоконстрикцией и ухудшением экскреции натрия почками. Открытие сигнальной функции натриевого насоса, а также идентификация специфических механизмов, лежащих в основе эффектов низких доз КТС на клеточный рост, развитие и апоптоз, добавило новые аспекты в сфере изучения патофизиологической роли этих гормонов [142]. Множество исследований в последние годы указывает на вовлечение КТС в развитие фиброза. Существуют экспериментальные доказательства того, что классический "ионный механизм" может быть недостаточным для объяснения воздействия КТС на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу как *in vitro*, так и *in vivo*. Так, например, КТС воздействует на фосфорилирование ключевого сигнального протеина EGFR и активирует профибротический механизм в клеточной культуре, где концентрация натрия постоянна [167].

Одно из доказательств в пользу существования альтернативной, или сигнальной, функции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы было представлено в работе [168], в которой было показано, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза участвует в клеточной передаче сигнала посредством взаимодействия Src и EGFR, расположенных в кавеолах, в отсутствие активного транспорта натрия и калия [168]. Инкубация нескольких типов клеточных культур с КТС вызывает быстрое фосфорилирование EGFR, которое зависит от активации Src, и которое отчетливо отличается от аутофосфорилирования EGFR [171,172]. Помимо EGFR в этот сигнальный путь вовлечены и другие протеины, включая фосфолипазу C (PLC), TRP белки, фосфоинозитид-3 киназу (ФИЗК) и несколько изоформ протеинкиназы C (PKC) [109,167,169-174]. Кавеолярная  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, располагаясь рядом с Src,

поддерживает Src в неактивной форме, а связывание КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой приводит к изменению конформации молекулы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, что меняет взаиморасположение между  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой и Src, восстанавливая активность Src. Src в активной форме способен фосфорилировать и другие протеины [174]. Кроме того, было отмечено, что связывание КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой в плазмалемме индуцирует эндоцитоз КТС- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза-Src-EGFR функционального комплекса [103,108,109,175]. Образование комплекса КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой инициирует увеличение продукции внутриклеточных АФК, которое зависит от функции РААС [176]. Развившиеся в результате связывания КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой биохимические (например, активация ERK) и физиологические (например, увеличение ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле) процессы могут быть предотвращены с помощью антиоксидантов [18,170,176, 181].

Возможность участия КТС в механизме развития фиброза была предположена в результате нескольких экспериментов. В начале было обнаружено огромное количество миокардиального фиброза у грызунов с экспериментальной почечной недостаточностью [18,19,154]. У человека кардиомиопатия, ассоциированная с почечной недостаточностью, также осложнена фиброзом [178,179]. Активная иммунизация к МБГ с использованием конъюгированного альбумином МБГ, а так же адренэктомия, вызвавшая снижение уровня циркулирующего МБГ, предотвратили миокардиальный фиброз, развившийся в результате экспериментальной почечной недостаточности. Введение МБГ животным в том же количестве, что и было измерено в плазме животных с экспериментальной почечной недостаточностью, вызвало миокардиальный фиброз в подобном проявлении. [18,154]. Наряду с миокардиальным фиброзом наблюдалась активация сигнального пути опосредованного  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, что было подтверждено увеличением активного Src и фосфорилированием митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) в миокарде. [18,154]. Основываясь на вышеописанных *in vivo* результатах, было исследовано, влияет ли МБГ или другие КТС на рост фибробластов в клеточной культуре. Сначала было замечено, что и МБГ, и другие

КТС (например, оубаин, дигоксин) вызывают увеличение количества встроенных пролиновых остатков, а также повышают синтез коллагена в культуре фибробластов. Это наблюдение явилось еще одним доказательством наличия у комплекса  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза-КТС сигнальной функции, где наблюдалась активация Src и MAPK. При этом добавление в инкубационную среду антиоксидантов или ингибиторов Src предотвращало инкорпорацию пролина и синтез коллагена [154]. Так же было замечено увеличение количества иРНК коллагена после инкубации миокардиальных фибробластов с МБГ [154]. Интересно, что в этом эксперименте уровни TGF- $\beta$  и SMAD белков не изменились, но антагонист синтеза TGF- $\beta$ , SB421542, заблокировал МБГ-индуцированную стимуляцию синтеза коллагена [154]. Было показано, что в культуре нескольких типов фибробластов (миокардиальных, почечных и дермальных) экспрессия негативного регулятора промоутера синтеза коллагена-1 Fli-1 [24] зависит от МБГ-индуцированной сигнальной трансдукции [23]. Кроме того, снижение экспрессии Fli-1 является необходимым условием для МБГ-индуцированного увеличения синтеза коллагена [24]. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что МБГ является индуктором транслокации протеинкиназы C  $\delta$  (PKC $\delta$ ) из цитозоля в ядро PLC-зависимым способом, а также, что транслокация PKC $\delta$  способствует фосфорилированию и последующей деградации Fli-1 (Рисунок 3) [24].

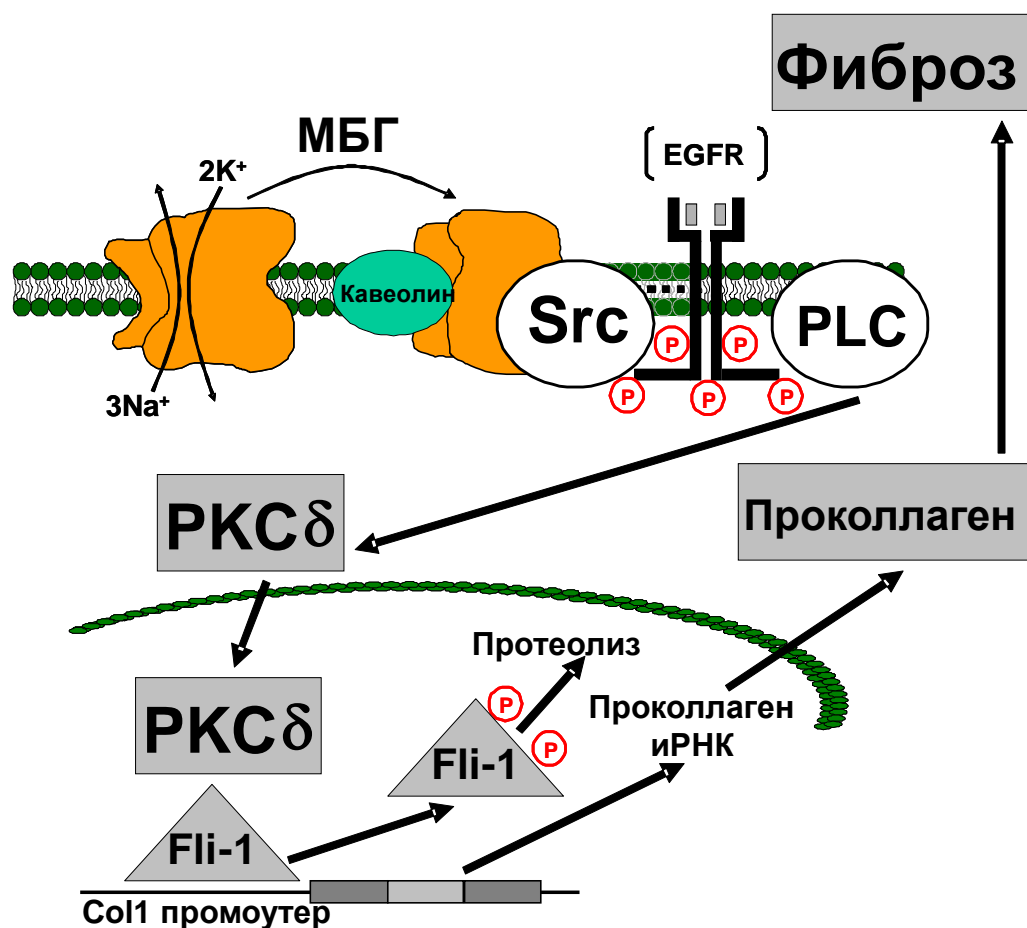


Рисунок 3. Схематичное описание механизма МБГ-индуцированного синтеза коллагена-1. Адаптировано и модифицировано из источника 24.

Следует отметить, что у Dahl соль-чувствительных крыс на высокосолевой диете повышенный уровень МБГ активирует профибротический TGF- $\beta$  - SMAD-зависимый сигнальный путь, а моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 реверсируют эту стимуляцию [28].

Совсем недавно был предложен еще один механизм действия КТС в отношении фиброза миокардиальной ткани на модели почечной недостаточности. Анализ экспрессии микроРНК в миокарде у крыс через 4 недели после нефрэктомии или инфузии МБГ выявил инактивацию 18 микроРНК, вовлеченных в регуляцию фиброобразования миокарда [182]. Ранее несколько исследований, сфокусированных на способности микроРНК-29b-3р регулировать процесс фиброобразования, выявили участие микроРНК-29b-3р в развитии фиброза в различных органах, включая сердце, легкие, печень, кожу и почки [183-187].

Drummond и др. продемонстрировал, что подавление экспрессии микроРНК-29b-3p, вызванное нефрэктомией или инфузией МБГ, ассоциировано с повышенным количеством коллагена-1 в миокарде [182]. Сходные результаты были получены *in vitro*, где МБГ и ЭО имели дозозависимый ингибирующий эффект на экспрессию микроРНК-29b-3p, в то время как трансфекция синтетической микроРНК-29b-3p в изолированные миокардиальные фибробласты нейтрализовала эффект КТС. Основываясь на вышеописанном механизме действия КТС посредством активации  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза-Src рецепторного комплекса, автор показал возможность блокировки этого сигнального пути с помощью pNaKtide, обладающим ингибиторной функцией по отношению к Src, тем самым успешно обратив фиброз как *in vitro*, так и *in vivo* [182].

### **1.10 Роль маринобуфагенина в патогенезе хронической почечной недостаточности**

Задолго до идентификации МБГ было известно о существовании гуморального фактора, компенсаторное увеличение которого случается при поражении почек с целью снижения ретенции натрия и жидкости посредством усиления натрийуреза [188]. Кроме того, Bricker говорил о возможности побочного воздействия этого гормона на другие органы и ткани, заключающегося в усугублении уремического синдрома, что было названо концепцией "trade off". Graves, тестируя метод определения дигоксина в человеческой плазме, заметил, что данный метод имел множественное количество ложноположительных результатов в плазме пациентов с уремией, не получающих дигоксин. Это наблюдение было объяснено результатом перекрестного иммунореагирования антител к дигоксину с эндогенными дигиталисподобными веществами и помогло определить природу гипотетического натрийуретического гормона [181].

Huot, работая на модели почечной недостаточности у крыс, подверженных нефрэктомии, обнаружил, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза в миокардиальных клетках

ингибируется неидентифицированным гуморальным фактором предположительно оубаин-подобной природы, который также причастен к развитию гипертензии в данном состоянии [189]. Позднее несколько авторов опубликовали данные о присутствии ЭО в плазме пациентов страдающих почечной недостаточностью [190,191], что создавало противоречие с представленной ранее теорией центрального триггерного действия оубаина с последующим развитием периферических эффектов МБГ [120]. Благодаря методу высокоэффективной жидкостной хроматографии и специфичных к ЭО и МБГ антител было выявлено повышенное количество МБГ в плазме уремических больных по сравнению со здоровыми пациентами [192]. При этом уровень оубаина в плазме здоровых пациентов и пациентов с почечной недостаточностью не отличался. Различия в наблюдениях могут быть объяснены разной специфичностью антител к оубаину, использовавшихся разными авторами [190-192].

В экспериментальном исследовании на модели уремиической кардиомиопатии была изучена роль МБГ в патогенезе данного состояния [18]. Было показано, что повышение уровня МБГ в плазме нефрэктомизированных крыс сопровождалось развитием гипертензии, а также гипертрофическим ремоделированием стенки левого желудочка, что обусловило диастолическую дисфункцию [18]. Для уточнения степени вовлечения МБГ в развитие кардиомиопатии была выполнена инфузия 10 мкг/кг МБГ в течении 4-х недель, что способствовало развитию гипертензивного эффекта, а также фиброзированию миокардиальной ткани [18]. Более того, предварительная иммунизация конъюгированным с альбумином МБГ оказала защитный эффект, ослабив профибротическое действие маринобуфагенина и предотвратив ремоделирование левого желудочка [18]. В то же время специфические моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 продемонстрировали более эффективное антифибротическое действие в миокарде при экспериментальной уремиической кардиомиопатии [32].

### 1.11 Маринобуфагенин и преэклампсия

Об участии КТС в развитии преэклампсии было известно еще около 40 лет назад, Graves уже тогда говорил об увеличении дигоксин-подобного материала в плазме беременных женщин по сравнению с контрольной группой, а также в плазме пациенток с гипертензией, индуцированной беременностью [193]. На основании данных о свойстве маринобуфагенина вызывать вазоконстрикцию при объемзависимой гипертензии, которая и случается при патологической беременности, была выдвинута гипотеза о вовлечении МБГ в патогенез преэклампсии [148]. В результате эксперимента было показано увеличение циркулирующего в плазме МБГ в три раза у пациенток с нормально протекающей беременностью и восьмикратное увеличение МБГ в случае преэклампсии [148]. В этом же исследовании был изучен вазоконстрикторный эффект МБГ, опосредованный ингибированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в умбиликальных артериях. В умбиликальных артериях *ex vivo* МБГ вызвал вазоконстрикцию в концентрации в три раза меньшей, чем в плазме пациенток с преэклампсией [148].

Таким образом, уровень циркулирующего МБГ при преэклампсии является достаточным для развития вазоконстрикторного эффекта в гладкомышечных клетках сосудистой стенки [148]. Последние исследования, направленные на изучение синтеза МБГ, показали, что клетки человеческого трофобласта JEG-3 способны синтезировать МБГ [166]. А при сравнении количества МБГ в плаценте пациенток, страдающих преэклампсией, с контрольной группой было продемонстрировано его четырехкратное увеличение [22]. Кроме того, многие авторы говорят о негативном воздействии МБГ на дифференцировку клеток трофобласта в первом триместре беременности, что приводит к его неполной инвазии. Таким образом, повышенная продукция МБГ в первом триместре может способствовать развитию преэклампсии в будущем [194,195].

Основываясь на результатах предыдущих исследований, в которых было продемонстрировано участие МБГ в развитии фиброза, вышеописанный механизм был показан на модели преэклампсии [22]. Умбиликальные артерии,



полученные от беременных женщин, страдавших преэклампсией, содержали большее количество коллагена, продемонстрировали сниженную экспрессию Fl-1, а также низкую чувствительность к вазорелаксантному эффекту нитропруссид натрия. В этом же эксперименте инкубация с высокоспецифичными антителами к МБГ восстановила активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы до уровня близкого к контрольному. А при сравнении эффективности специфичных антител с антидигоксиновыми (DigiFab) было показано, что моноклональные антитела восстанавливают активность заингибированной при преэклампсии  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах в большей степени, чем DigiFab, что позволяет предположить более значимое участие МБГ в патогенезе преэклампсии, чем остальных КТС [188].

### **1.13 Иммунонейтрализация маринобуфагенина**

За последние 10 лет были разработаны и апробированы на экспериментальной модели соль-чувствительной гипертензии и преэклампсии специфические моноклональные антитела к маринобуфагенину в качестве антигипертензивного агента. Изначально использовались поликлональные антитела к МБГ и ЭО для определения специфической роли как МБГ, так и ЭО в развитии натрийуретического ответа и повышения АД при солевой нагрузке на модели соль-чувствительной гипертензии [16]. В отличие от антител к ЭО, которые не повлияли ни на уровень артериального давления, ни на активность натриевого насоса, антитела к МБГ понизили давление у соль-чувствительных крыс на высокосолевого диете, а также восстановили активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы до контрольного уровня [16]. Это помогло объяснить центральное и периферическое действие этих КТС.

Задолго до того как МБГ был изучен в качестве причины развития преэклампсии, Goodlin опубликовал работу об использовании во врачебной практике антидигоксиновых антител (Digibind) в лечении эклампсии [196].

Digibind получил широкое распространение в терапевтической практике для облегчения симптомов преэклампсии [197-201], что возможно объясняется наличием перекрестной реактивности с КТС [149]. Позже были разработаны моноклональные антитела, два клона - 3E9 и 4G4 [150]. Моноклональные анти-МБГ антитела 3E9, несмотря на более низкую аффинность к МБГ, показали лучшую функциональную способность реверсировать эффекты МБГ, поэтому использовались в качестве лечения. В то же время анти-МБГ антитела 4G4, показав чувствительность 0,05 нмоль/л в иммунофлюоресцентном анализе, нашли свое применение в определении концентрации МБГ в биологических жидкостях.

Антигипертензивный эффект анти-МБГ антител 3E9 был сравнен с Digibind на модели соль-чувствительной гипертензии и у беременных крыс на солевой нагрузке. Как и Digibind, анти-МБГ антитела 3E9 оказали гипотензивное действие у соль-чувствительных крыс на 8% солевой диете, однако, эффект анти-МБГ антител 3E9 был более выраженным и продолжительным [150]. Кроме того, в эксперименте *ex vivo* анти-МБГ антитела 3E9 восстановили активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, подавленной на 50%, у беременных женщин, страдающих преэклампсией, в то время как Digibind в высокой дозе (10мкг/мл) смог лишь частично восстановить активность натриевого насоса [150].

Позже действие анти-МБГ антител 3E9 было изучено на экспериментальной модели почечной недостаточности в сравнении с Digibind [32]. В эксперименте оценивался антигипертензивный эффект, а также способность реверсировать миокардиальный фиброз. В результате однократной инъекции моноклональных анти-МБГ антител 3E9 нефрэктомизированным крысам, развившим синдром уремической кардиомиопатии, удалось реверсировать миокардиальный фиброз. Кроме того, анти-МБГ антитела 3E9 продемонстрировали выраженный и продолжительный, длящийся в течение одной недели, антигипертензивный эффект. При этом после инъекции Digibind артериальное давление понизилось лишь временно, а через 24 часа гипотензивный эффект нейтрализовался полностью. В дополнение к антигипертензивному эффекту и анти-МБГ антитела 3E9, и Digibind в различной

степени понизили уровень плазменного креатинина и восстановили его клиренс [32].

### **1.14 Влияние ограничения потребления соли на маринобуфагенин**

Важность количества потребляемой соли в развитии гипертензии была показана еще в начале 70-х годов, когда были опубликованы результаты исследования уровня артериального давления и других параметров, имеющих отношение к гипертензии, у индейцев племени Яномамо [200]. Было показано, что с возрастом у них не происходит развития гипертензии. Изолированная от цивилизации популяция не употребляла в пищу соль, а ежедневный рацион был насыщен продуктами с высоким содержанием калия, что и подтвердилось измерением электролитов в плазме крови и их экскреции. Кроме того, измерив альдостерон и активность ренина в плазме, исследователи увидели, что при отсутствии подъема артериального давления в данной популяции, РААС при этом была гиперстимулирована [200].

Множественные исследования на обычной популяции людей продемонстрировали повышение систолического артериального давления и соль-чувствительности в процессе старения [201-204]. В результате лонгитудинальных исследований была установлена последовательность одного из патогенетических звеньев развития гипертензии в процессе старения: увеличение жесткости сосудистой стенки крупных эластических сосудов предшествует развитию гипертензии [205,206]. Ограничение потребления соли с превентивной целью уже доказало свою эффективность не только результатом снижения артериального давления, но и улучшением эластических свойств крупных артерий [207,208]. Однако, механизм данных явлений все же остается малоизученным. МБГ, известный как натрийуретический гормон, вовлеченный в развитие соль-чувствительной гипертензии и фиброза сосудов, был рассмотрен в качестве предположительного участника данного механизма. Jablonski и др. показали, что

ограничение потребления соли снижает суточную экскрецию МБГ. Это наблюдение интерпретируется снижением продукции МБГ у пациентов находящихся на низкосолевой диете [209]. Кроме того, такие параметры, как систолическое артериальное давление и скорость распространения пульсовой волны у пациентов уже после 10-дневной низкосолевой диеты были достоверно ниже, чем у пациентов с нормальным содержанием соли в диете. Таким образом, результаты данного исследования предполагают связь между снижением экскреции МБГ и улучшением эластических свойств сосудистой стенки, как один из возможных механизмов, в котором МБГ выступает в качестве одной из причин развития гипертензии за счет увеличения сосудистой жесткости с возрастом. Ограничение количества соли в диете в качестве меры снижения продукции МБГ, как и иммунонейтрализация МБГ, представляет собой возможность улучшения морфологических свойств сосудов и предупреждения развития соль-чувствительной гипертензии.

### **1.15 Маринобуфагенин и сахарный диабет**

Повышенный уровень КТС, наряду с измененной функцией  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, был обнаружен как у пациентов, так и у животных с экспериментальным диабетом [25-27]. У пациентов, страдающих сахарным диабетом и сердечной недостаточностью, было замечено значительное увеличение глюкозы в плазме (12-18 ммоль/л) при терапии дигоксином, что требовало увеличения дозировки сахаропонижающих препаратов. Однако при отмене дигоксина тощаковый уровень глюкозы снижался до 5-8 ммоль/л и не увеличивался более, чем 10 ммоль/л. Основным механизмом действия дигоксина, как и остальных КТС, является ингибирующее действие на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу, что имеет противоположный инсулину эффект на внутриклеточный захват и метаболизм глюкозы [210].

Так как соль-чувствительная гипертензия часто сопровождается инсулинорезистентностью, была предложена гипотеза о том, что при диабете 2 типа концентрация КТС в плазме возрастает за счет инсулин-зависимой задержки натрия, а чрезмерная выработка КТС способствует развитию гипертензии [211,215]. Однако, результаты экспериментов на крысах с экспериментальным диабетом показали, что при инсулинчувствительном сахарном диабете продукция МБГ происходит значительно интенсивнее, чем при сахарном диабете 2 типа. Соответственно, активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы также была угнетена в большей степени у пациентов и у экспериментальных животных с сахарным диабетом 1 типа [213]. Эти данные указывают на то, что продукция МБГ может быть стимулирована не только лишь ретенцией натрия при сахарном диабете.

Известно, что угнетение  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в различных тканях ведет к активации ключевого фермента пентозафосфатного пути, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [214]. При сахарном диабете под действием гипергликемии активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы снижается, а у пациентов с генетически детерминированным дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы нарушена толерантность к глюкозе [214-216]. Иммунонейтрализация МБГ перед тестом на глюкозотолерантность у экспериментальных животных произвела большой подъем уровня глюкозы в плазме по сравнению с нелечеными животными. Таким образом, регуляция метаболизма глюкозы может быть одной из функций МБГ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Дизайн эксперимента “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке”

Данное исследование проводилось на нормотензивных крысах, которые получали высокосолевою диету с целью стимуляции повышения продукции МБГ надпочечниками. Согласно нашей гипотезе, у нормотензивных крыс чрезмерная продукция МБГ вызывает компенсаторный натрийурез и профибротический эффект в отсутствии вазоконстрикции. В настоящем эксперименте исследовалось влияние солевой нагрузки и, как следствие, чрезмерной продукции МБГ на морфофункциональное состояние стенки аорты крысы.

В эксперименте использовались 24 крысы стока Вистар 5-ти месячного возраста. У всех животных была измерена масса тела, проведено метаболическое исследование и измерено артериальное давление с помощью хвостовой манжетки (ИТС model 31; ИТС Life Science, CA). Все животные были разделены на три группы: контрольная группа (Ктр, n=8), состоящая из интактных животных, группа на солевой нагрузке (Соль, n=8) и группа на солевой нагрузке с последующим введением моноклональных 3E9 анти-МБГ антител (Соль-АТ, n=8). В контрольной группе изменений в условиях не вводилось, в то время как группы Соль и Соль-АТ получали вместо воды раствор 2% NaCl 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 50µг/кг (Рисунок 4).

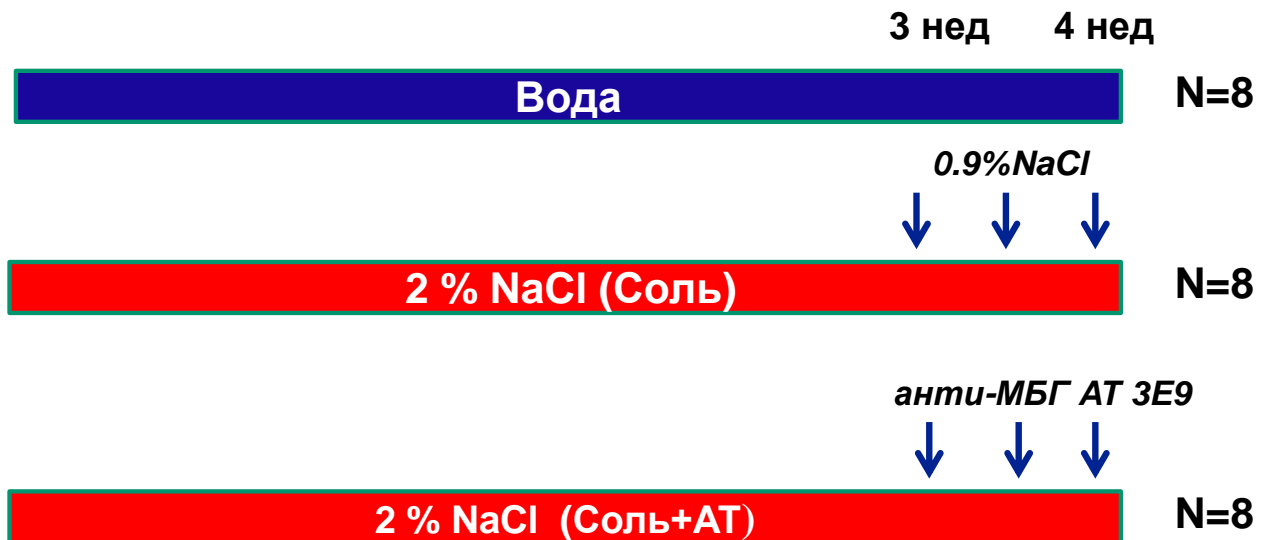


Рисунок 4. Схема эксперимента “Эффект моноклональных анти-МБГ антител 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке”.

В конце эксперимента измерялось артериальное давление на хвостовой артерии, проводилось метаболическое исследование, измерялся вес животных. По завершении всех измерений животные были наркотизированы интраперитонеальной инъекцией нембутала в дозе 50 мг/кг. Для измерения активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и уровня МБГ в плазме была собрана кровь. Аорта была взвешена и разделена на 2 части для измерения способности сосуда к расслаблению нитропруссидом натрия, а также для гистохимического исследования.

## 2.2 Метаболическое исследование

Метаболическое исследование включает в себя измерение массы тела животного, измерение количества мочи, выделенной за 24 часа, количество потребленной воды за 24 часа, сбор мочи для определения 24-х часовой экскреции МБГ и электролитов. Для этого животные помещаются в метаболические клетки с достаточным количеством корма и питьевой воды на 24 часа. При расчете

количества МБГ и электролитов, выделенных за 24 часа, проводится перерасчет на массу тела каждого животного с целью нормализации показателя.

### **2.3 Измерение артериального давления с помощью хвостовой манжетки**

Перед измерением артериального давления животные должны привыкнуть к условиям проведения измерения для исключения влияния такого фактора, как стресс на результат. Для этого проводилась предварительная тренировка животных. Тренировка заключалась в процедуре измерения давления без записи результатов. Настоящее измерение проводилось через 1-2 дня. Животное помещалось в пластиковый цилиндр, диаметр которого соответствует весовой категории животного. Цилиндр необходим для фиксации животного во время измерения. Цилиндр устанавливается на подогреваемую платформу для соблюдения температурного режима необходимого для измерения давления (34°C). На хвост надевается манжетка, в которую накачивается воздух, и с помощью встроенного в манжетку высокочувствительного фотоэлектрического датчика детектируется систолическое и диастолическое артериальное давление, а также частота сердечных сокращений. Всего выполняется 5 последовательных измерений с интервалом в 1 минуту. Из пяти измерений вычисляется среднее арифметическое, что и является результатом.

### **2.4 Измерение активности $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах**

Для измерения активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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, MgCl<sub>2</sub> 3



ммоль/л, ЭДТА 0.5 ммоль/л, Tris 50 ммоль/л, АТФ 2ммоль/л (рН = 7.4, 37 °С), в конечном разведении 1:40. Реакция останавливалась добавлением трихлорацетиловой кислоты до конечной концентрации 7%. Общая активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы измерялась продукцией неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ). Разница между активностью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в присутствии и отсутствии 5 ммоль/л оубаина была принята за активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

## 2.5 Измерение маринобуфагенина в плазме

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 (DELFIА)), основанного на кроличьих поликлональных анти-МБГ-Р антителах. Этот анализ основан на конкурентном взаимодействии между иммобилизированным антигеном (МБГ-гликозид-тироглобулин) и МБГ, другими кросс-реактантами или эндогенными КТС, присутствующими в плазме, за ограниченным количеством участков связывания на поликлональных анти-МБГ антителах. Вторичные антитела (козьи, 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, оубаин-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.

## 2.6 Исследование способности сосуда к вазорелаксации

Очищенные от эндотелия кольца грудной аорты были подвешены под нагрузкой (1.5г) в термостатируемые камеры (Ugo Basile, Italy), наполненные модифицированным раствором Кребса (ммоль/л): NaCl 130, KCl 4.0, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.4, NaHCO<sub>3</sub> 19, глюкоза 5.4. В камеры подавалась смесь 95% O<sub>2</sub> и 5%CO<sub>2</sub>. Сокращения колец сосудов регистрировались с помощью тензометрического датчика (AD Instruments, USA). Через 90 минут от начала эксперимента вызывалось сокращение колец аорты посредством добавления в камеру KCl в концентрации 80 ммоль/л. После регистрации сокращений сосуды отмывались от KCl и оставались в течение 60 минут в покое для полного расслабления. Через 60 минут в камеры добавлялся вазоконстриктор эндотелин-1 (ЭТ-1) (100 нмоль/л). Когда сократительный ответ на ЭТ-1 достигал максимума с последующим формированием плато, выполнялось последовательное введение в раствор нитропрусида натрия в возрастающей концентрации (1 нмоль/л – 10 μмоль/л). На рисунке 5 изображена схема эксперимента.

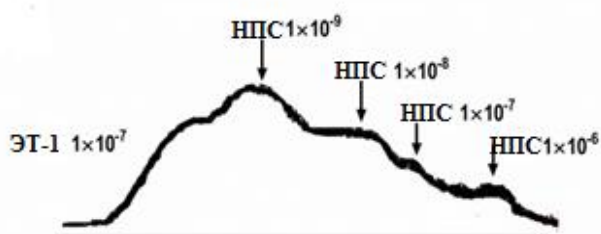


Рисунок 5. Схема измерения чувствительности сосуда к вазорелаксантному действию нитропрусида натрия.

Сила сокращения колец рассчитывалась в процентах от максимального сокращения в ответ на KCl. Процент вазорелаксации рассчитывался относительно максимального сократительного ответа на ЭТ-1.

Пониженная чувствительность сосуда к нитропрусиду натрия отражает нарушение функции сосуда. Повышенное количество коллагена в стенке аорты

является определением повышенной сосудистой жесткости. Более жесткий сосуд при воздействии на него вазорелаксанта из-за нарушенной способности к расслаблению демонстрирует меньшее расслабление относительно сокращения на ЭТ-1, чем здоровый сосуд.

## **2.7 Гистохимическое исследование**

Кольца аорты, 4-5 мм длиной, были зафиксированы в забуференном 4% растворе формалина (рН 7.2) в течение 12 часов с последующей дегидратацией в этаноле в концентрации по возрастающей от 70% до 100% и заливкой в парафин. Ткани были разрезаны на сегменты 5  $\mu$ м толщиной с помощью микротомы и окрашены с помощью специфичного к коллагену красителя Sirius Red/Fast Green Collagen Staining (Chondrex, Redmond, WA). Количество коллагена было посчитано с помощью программного обеспечения Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software (Molecular Devices, LLC, CA).

## **2.8 Дизайн эксперимента “Изучение действия маринобуфагенина и антагонистов альдостерона на степень фиброза в эксплантах аорты крыс”**

Данная часть работы выполнена *ex vivo* на кольцах аорты, полученных от нормотензивных крыс. Экспланты аорты инкубировались в присутствии МБГ с целью подтверждения профибротического эффекта МБГ в изолированных условиях. Основываясь на существовании доказательств антагонистического эффекта антагониста альдостерона, канренона, на взаимодействие МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, была предложена гипотеза об улучшении упруго-эластических свойств аорты при воздействии канренона на МБГ-индуцированный фиброз. Для этого в эксперименте использовались крысы линии Вистар 5-ти месячного возраста ( $n=18$ ). Животные были анестезированы путем интраперитонеальной инъекции нембутала в дозе 50 мг/кг. Диссекция проводилась с целью забора крови, грудной

части аорты и почки. Кровь собиралась в пробирки с гепарином натрия и далее использовалась для измерения активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с предварительной инкубацией эритроцитов в присутствии МБГ (100 нмоль/л), канренона (10  $\mu\text{моль/л}$ ) и их комбинации в течение 1 часа. Почка использовалась для измерения активности натриевого насоса в мозговом веществе почки. Аорта от каждого животного была очищена от окружающей жировой ткани, разделена на кольца длиной 2-3 мм и помещена в питательную среду Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Life Technologies, Karlsbad, CA, USA) с добавлением гентамицина 25 мг/л. Экспланты грудной аорты инкубировались в течение 24-х часов в 5%  $\text{CO}_2$  атмосфере при  $37^\circ\text{C}$  в питательной среде в присутствии МБГ (100 нмоль/л) (МБГ), канренона (10  $\mu\text{моль/л}$ )(Кан) и их комбинации (МБГ+Кан); контрольную группу составили экспланты аорты, инкубированные в питательной среде (Ктр) (Рисунок 6).

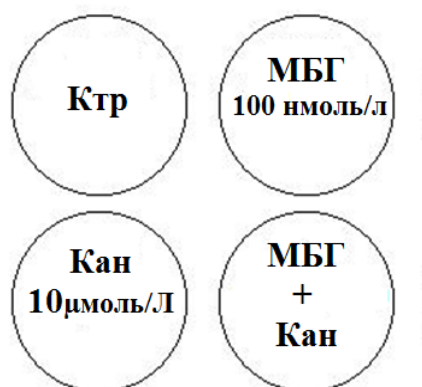


Рисунок 6. Схема инкубации колец аорты с МБГ и канреноном. При добавлении комбинации МБГ и канренона в среду использовались те же концентрации препаратов, т.е. 100 нмоль/л МБГ и 10  $\mu\text{моль/л}$  канренона.

После 24-х часовой инкубации кольца аорты использовались для исследования чувствительности к вазорелаксантному эффекту нитропруссид натрия, демонстрирующего способность сосудов к расслаблению. Затем выполнялось гистохимическое исследование для визуализации коллагена в стенке аорты с последующей количественной оценкой.

Кроме того, одной из целей этого эксперимента было показать возможный механизм профибротического действия МБГ. Ранее было показано, что МБГ-индуцированный фиброз миокарда при уремической кардиомиопатии, сопровождается инактивацией Fli-1, негативного регулятора промотора гена коллагена-1. В настоящей работе была проверена гипотеза об увеличении синтеза коллагена-1 гладкомышечными клетками посредством выключения Fli-1. Для этого выполнялся белковый иммуноблот с последующим сравнением экспрессии Fli-1 в аортах после инкубации с МБГ, канреноном и их комбинации.

## 2.9 Измерение активности почечной $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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 (мембраны) был суспензирован в среде для гомогенизирования, нанесен на прерывистый градиент сахарозы, состоящий из 0.32 – 1.2 М слоев сахарозы в буфере, содержащем 30 мМ гистидина и 5 мМ имидазола (pH 7.4), и процентрифугирован при 148,000 g в течение 90 минут. Фракция на уровне слоя 0.8 М 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 суспензии из наружного слоя мозгового вещества, в котором фрагменты толстого восходящего канальца петли Генле составляют  $\approx 90\%$  массы ткани, была оценена с помощью измерения оубаин-чувствительного захвата  $^{86}\text{Rb}$ . Для этого 200  $\mu\text{л}$  суспензии инкубировали в течение одного часа в оксигенированном растворе в отсутствии и присутствии 5 ммоль/л оубаина. Захват  $^{86}\text{Rb}$  определялся после добавления 10  $\mu\text{л}$

инкубационного раствора, содержащего  $^{86}\text{RbCl}$  (0.1  $\mu\text{Ci}$ /образец; NEN Life Science Products) в течение 10 минут. Фрагменты канальцев затем отмывались в холодной среде, центрифугировались и были подвержены лизированию в 1% растворе дезоксихолата натрия. Радиоактивность измерялась методом жидкостной сцинтилляции. Количество белка измерялось по методу Лоури. Захват  $^{86}\text{Rb}$  выражался в наномолях  $^{86}\text{Rb}$  на миллиграмм протеина в минуту.

## 2.10 Гистохимическое исследование

Кольца аорты были зафиксированы в забуференном 4% растворе формалина (pH 7.2) в течение 20 часов с последующей дегидратацией в этаноле в концентрации по возрастающей от 70% до 100%. Ткани были залиты в парафин и разрезаны на сегменты 6  $\mu\text{m}$  толщиной с помощью микротомы. Для визуализации волокон коллагена типа 1 и 3 использовалась окраска Сириус ред (American MasterTech Scientific Inc, Lodi, CA).

## 2.11 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 антигена к коллагену (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) с вторичными антикозными антителами из Santa Cruz Biotechnology. Для измерения белка Fli-1 использовались кроличьи поликлональные анти-Fli1 (C19) антитела (Santa-Cruz Biotechnology; 1:100) и

конъюгированная с пероксидазой антикриоличья сыворотка (Life Technologies, 1:1000).

## **2.12 Дизайн эксперимента “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке”**

В данном 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. Фиброзные изменения, происходящие в почках при сахарном диабете 2 типа, имеют множество объяснений, включая оксидативный стресс, активацию РААС, воспаление, высвобождение профибротических агентов, например, TGF- $\beta$ . Повышенная продукция МБГ, обусловленная инсулин-зависимой задержкой натрия, а также высокосолевой диетой, может так же способствовать развитию фиброза сосудистой стенки, что и является одной из гипотез данного эксперимента. За контрольную группу были приняты интактные самцы линии Вистар (Ктр, n=8). Животные из экспериментальной группы были подвержены индукции экспериментального сахарного диабета с последующей солевой нагрузкой (СД2/Соль, n=8). Экспериментальный диабет был инициирован внутривентральной инъекцией стрептозотоцина (65 мг/кг) в возрасте 4-5 дней. Развитие толерантности к глюкозе оценивали по сахарной кривой на восьмой неделе эксперимента, определяя уровень гликемии натощак и через 15, 30, 60, 120 минут после введения глюкозы (2 г/кг веса). Затем развившие диабет животные вместо питьевой воды получали раствор 2% NaCl на протяжении 4-х недель. На четвертой неделе солевой нагрузки животным с сахарным диабетом на

высокосолевого диете внутрибрюшинно вводились анти-МБГ антитела в дозе 50  $\mu\text{г}/\text{кг}$  (СД2/Соль+АТ,  $n=8$ ). (Рисунок 7).

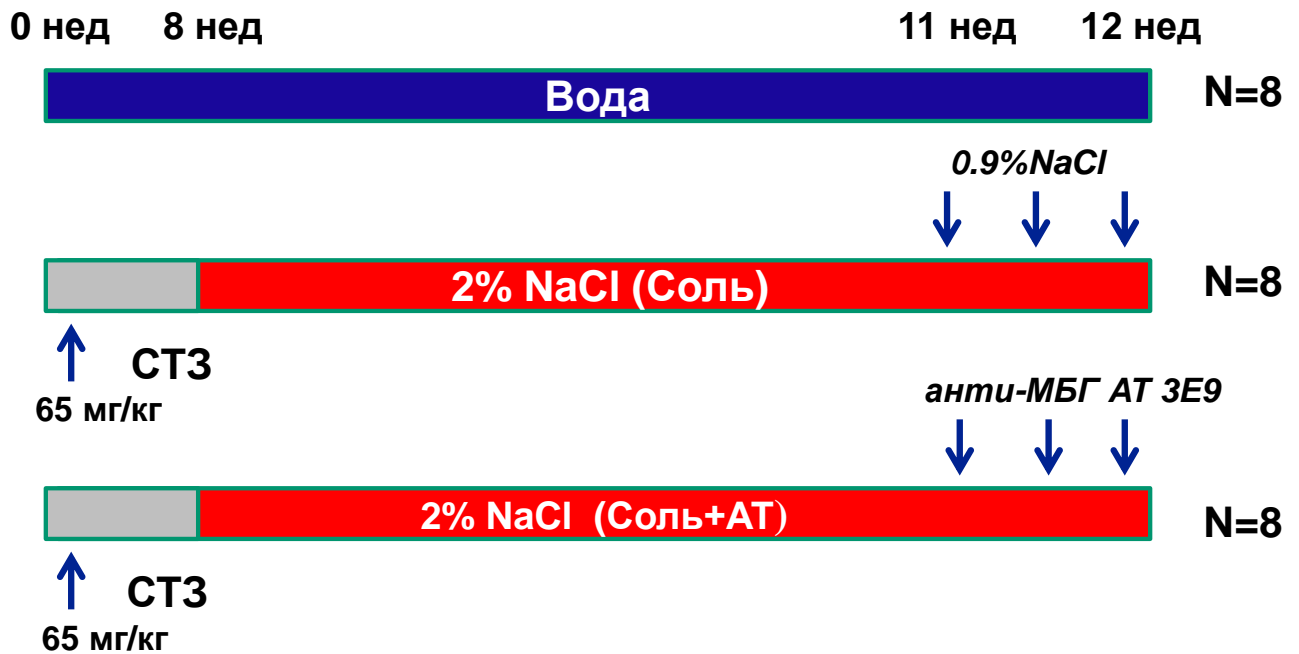


Рисунок 7. Схема эксперимента “Эффект моноклональных анти-МБГ антител 3Е9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке”.

В конце эксперимента измерялось артериальное давление на хвостовой артерии, проводились метаболические измерения. Затем все животные были анестезированы внутрибрюшинной инъекцией нембутала в дозе 50  $\text{мг}/\text{кг}$ . Для измерения активности натриевого насоса была собрана кровь. Аорта использовалась для изучения чувствительности к вазорелаксантному эффекту нитропрусида натрия. Кроме того, одной из задач работы является изучение механизма профибротического действия МБГ, для этого выполнялось измерение экспрессии основных белков, участвующих в МБГ-индуцированном профибротическом механизме, методом белкового иммуноблота. Методика измерения артериального давления, активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и



чувствительности сосудов к вазорелаксантному эффекту нитропрусида натрия описана ранее и в данном эксперименте выполнялись подобным образом.

### **2.13 Глюкозотолерантный тест**

Глюкозотолерантный тест был представлен на крысах в возрасте 8-ми недель натошак. Раствор глюкозы вводился перорально болюсно в дозе 2.0 г/кг веса. Кровь собиралась из хвостовой вены на 0, 30, 60, и 120 минуте для определения концентрации глюкозы крови. Измерение уровня глюкозы выполнялось с помощью глюкометра Ассу-Check и тест-полосок.

### **2.14 Измерение маринобуфагенина в моче**

Уровень МБГ определялся методом флюорометрического анализа (Dissociation Enhanced FluoroImmunoAssay (DELFLIA)), основанного на моноклональных анти-МБГ антителах 4G4. 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%.

### **2.15 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- $\beta$  использовались кроличьи поликлональные антитела (Cell Signaling, 1:500), SMAD 5 – козы поликлональные (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), фибронектина – мышинные моноклональные (Santa Cruz Biotechnology, 1:200). Для детекции использовались ECL и ECL плюс (Life Technologies). Протеиновые полосы были нормированы на глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (GAPDH), для чего мембраны были отмыты и выдержаны с кроличьими моноклональными анти-GAPDH антителами (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

## **2.16 Статистический анализ**

Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартная ошибка среднего и анализировались статистическим методом АНОВА с последующей поправкой по Ньюману-Кюльсу или Бонферонни. P менее 0.05 считалось статистически достоверным (Graph Pad Prism, Graph Pad Software, San Diego, CA).

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ**

### **3.1 Результаты исследования “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс на солевой нагрузке”**

У животных, находящихся на солевой нагрузке в течение 4-х недель, был значительно увеличен суточный диурез и натрийурез при отсутствии подъема артериального давления (Таблица 1 и Рисунок 8).

Таблица 1. Эффект солевой нагрузки и анти-МБГ антител 3Е9 на измеряемые параметры. АНОВА и тест Ньюмана-Кьюльса: \*  $P < 0.05$ , Соль и Соль-АТ vs. Ктр; #  $P < 0.05$ , Соль-АТ vs. Соль.

Изменяемые параметры	Ктр	Соль	Соль-АТ
Вес животного, г	356±12	338±14	347±13
САД, мм.рт.ст.	114±7.6	115±16.3	108.9±8.16
ДАД, мм.рт.ст.	73±7	79±3	69±3
Na <sup>+</sup> в плазме, ммоль/л	145.9±0.8	148.9±1.9	150.1±1.5
K <sup>+</sup> в плазме, ммоль/л	4.22±0.18	4.34±0.12	4.05±0.11
МБГ в плазме, нмоль/л	0.37±0.08	0.79±0.09*	
Активность эритроцитарной Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФазы, ммоль /Рi/мл/ч	14.2±0.35	12.6±0.3 *	13.93±0.54 #
Суточный диурез, мл	9.7±1.5	27.4±6.2*	41.7±8.8 #
Экскреция Na <sup>+</sup> , ммоль/24 ч	0.6±0.14	9.2±2.96*	18.9±2.4 #
Экскреция K <sup>+</sup> , ммоль/24ч	1.19±0.11	2.23±0.12*	1.94±0.09#
Экскреция МБГ, пмоль/24 ч	19.6±16.2	95.0±272.5 *	34.1±54.4 #
Вес аорты, мг/кг массы тела	158±9	217±15 *	180±12 #
Толщина стенки аорты, мкм	67.2±4.0	72.7±3.5	68.3±2.9
Коллаген в стенке аорты, %	11.37±1.56	29.7±4.93 *	16.7±5.62 #
ЕС50 вазорелаксантного эффекта нитропрусида Na <sup>+</sup> , нмоль/л	99 ±2.0	167±19.3 *	70±1.5#

САД – систолическое артериальное давление;

ДАД – диастолическое артериальное давление.

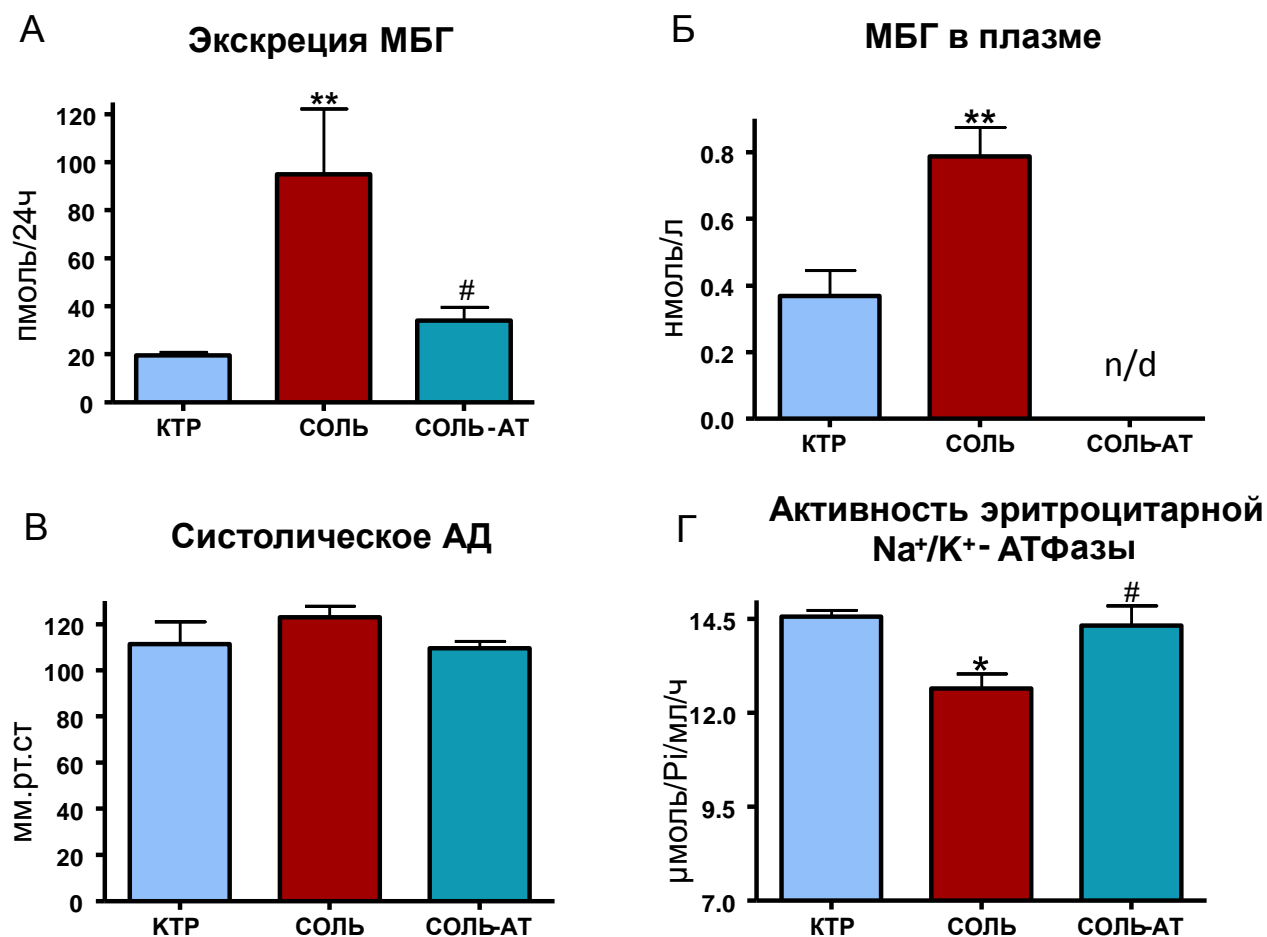


Рисунок 8. Влияние соли и лечения моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 на экскрецию МБГ (А), уровень МБГ в плазме (Б), систолическое артериальное давление (В) и активность эритроцитарной Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы (Г). АНОВА и тест Ньюмана-Кьюльса: \*  $P < 0.05$ , Соль vs. Ктр; #  $P < 0.05$ , Соль vs. Соль-АТ.

Однако, уровень МБГ в плазме, как и его экскреция, был повышен по сравнению с контрольной группой. Кроме того, активность Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы в группе Соль была мягко заингибирована, а уровень Na<sup>+</sup> в моче достиг 15-ти кратного увеличения по сравнению с контрольной группой (Рисунок 8 и Таблица 1). Администрация анти-МБГ антител 3Е9 не повлияла на уровень артериального давления, но способствовала понижению количества МБГ в моче, а также восстановлению активности Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы до контрольного уровня.

Результаты исследования способности сосудов к расслаблению обобщены на рисунке 9.

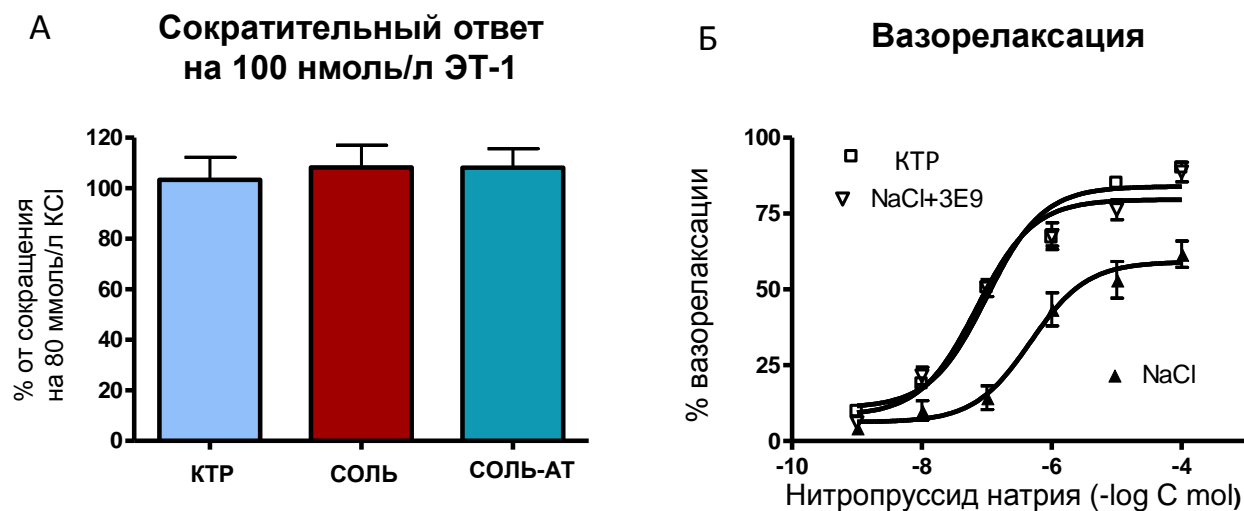


Рисунок 9. Влияние солевой нагрузки и лечение анти-МБГ антителами 3Е9 на сокращение, вызванное 100 нмоль/л ЭТ-1 (А) и на расслабление нитропруссидом натрия (Б).

При подобном сократительном ответе на эндотелин-1, кольца аорты из группы Соль продемонстрировали значительное ухудшение чувствительности к нитропруссиду. Способность к расслаблению была полностью восстановлена в группе, пролеченной моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9.

Толщина медики осталась неизменной по сравнению с контрольной группой (Таблица 1). В то же время количество коллагена в стенке аорты у животных на солевой нагрузке оказалось в 2.6 раза больше, чем в группе Контроль (Рисунок 10 А, В и Таблица 1).

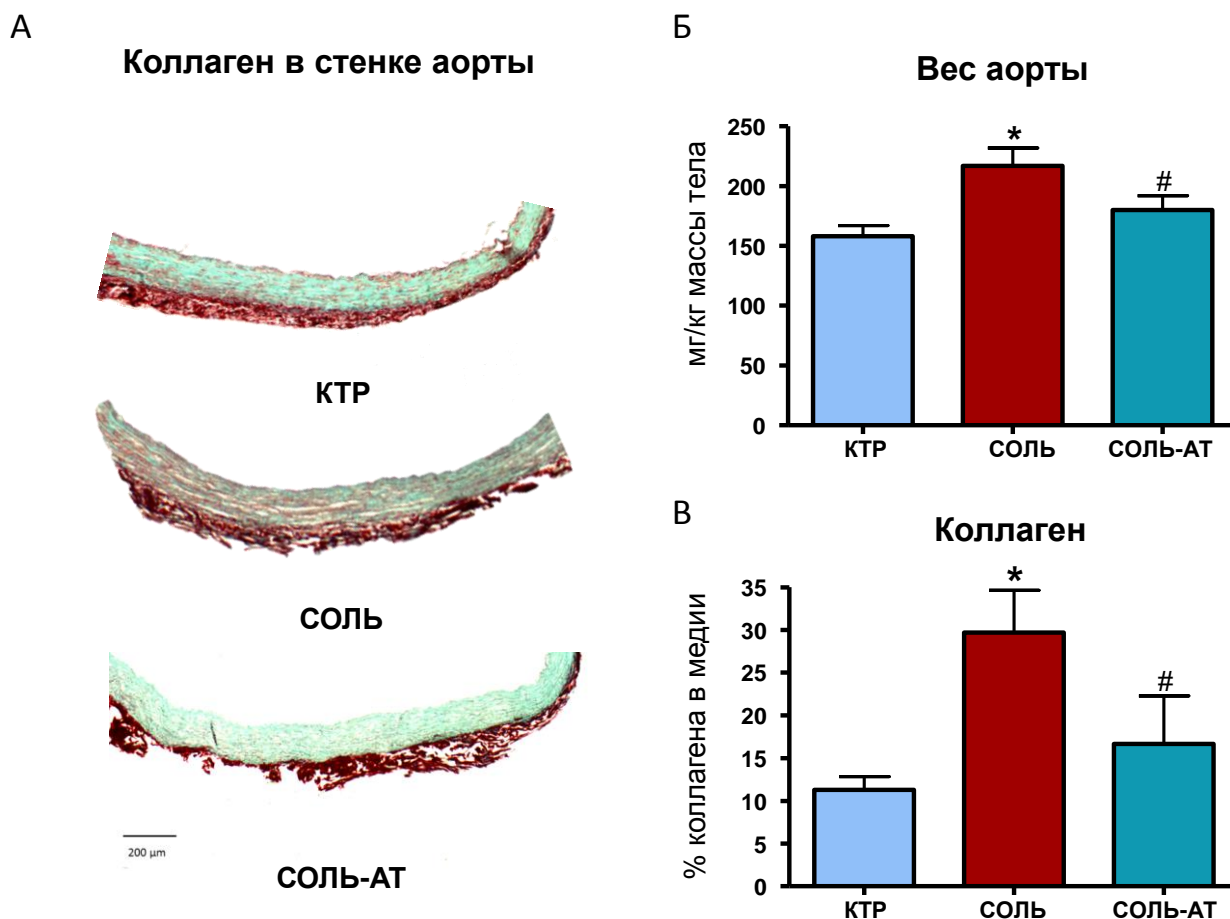


Рисунок 10. Эффект солевой нагрузки и иммунонейтрализации с помощью анти-МБГ антител 3Е9 на количество коллагена в стенке аорты (А) (окраска Picro Sirius Red/Fast Green, красный = коллаген), вес аорт (Б). Содержание коллагена в стенке аорты, полученное с помощью программного обеспечения Metamorph Microscopy Automation and Image Analysis Software (В). АНОВА и тест Ньюмана-Кьюльса: \*  $P < 0.05$ , Соль vs. Ктр; #  $P < 0.05$ , Соль vs. Соль-АТ.

Иммунонейтрализация МБГ (группа Соль-АТ) оказала обратный эффект на избыточное количество коллагена в сосудистой стенке по сравнению с группой Соль, кроме того отмечалось понижение веса аорт после лечения моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 (Рисунок 10).

### 3.2 Результаты эксперимента “Изучение действия маринобуфагенина и антагонистов альдостерона на степень фиброза в эксплантах аорты крыс, а также на их способность к расслаблению”

На рисунке 11 В и Г проиллюстрирован эффект активного метаболита сипронолактона, канренона, на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, подавленную МБГ.

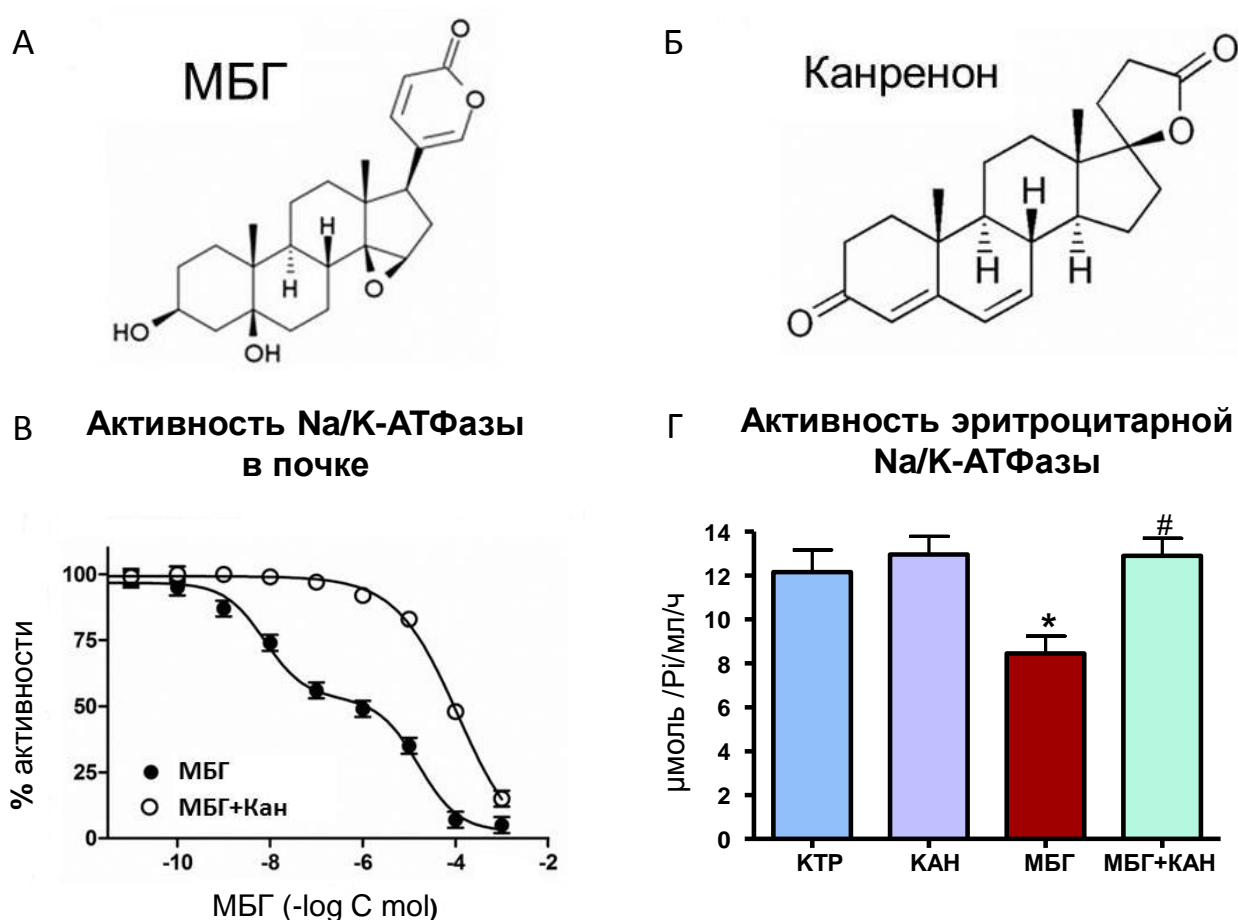


Рисунок 11. Структура маринобуфагенина (МБГ) (А) и канренона (КАН) (Б). Эффект канренона (10  $\mu\text{моль}/\text{л}$ ) на МБГ-индуцированное подавление активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мозговом слое почки (В). Восстановление активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, подавленной МБГ (100 нмоль/л), с помощью канренона (10  $\mu\text{моль}/\text{л}$ ) (Г). Статистический анализ представлен АНОВА с поправкой по Бонферони: \* -  $P < 0.01$  vs. Контроль (КТР); # -  $P < 0.01$  vs. МБГ.



МБГ заингибировал  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу в мозговом слое почки крысы в дозозависимой манере, а добавление 10  $\mu\text{моль/л}$  канренона в инкубационную среду значительно понизило чувствительность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы к МБГ ( $\text{IC}_{50} = 1.9 \pm 0.5 \mu\text{моль/л}$  and  $113 \pm 11 \mu\text{моль/л}$ , соответственно; Рисунок 11 В). Так как активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы является маркером циркулирующего МБГ, было проверено влияние канренона на ингибирующий эффект МБГ. Канренон, активный метаболит спиронолактона, продемонстрировал способность восстанавливать активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в присутствии МБГ, и в то же время не оказал никакого действия на  $\text{Na}^+$  насос в отсутствие данного кардиотонического стероида (Рисунок 11 Г).

На рисунке 12 А и Б проиллюстрированы результаты исследования способности колец аорты к расслаблению.

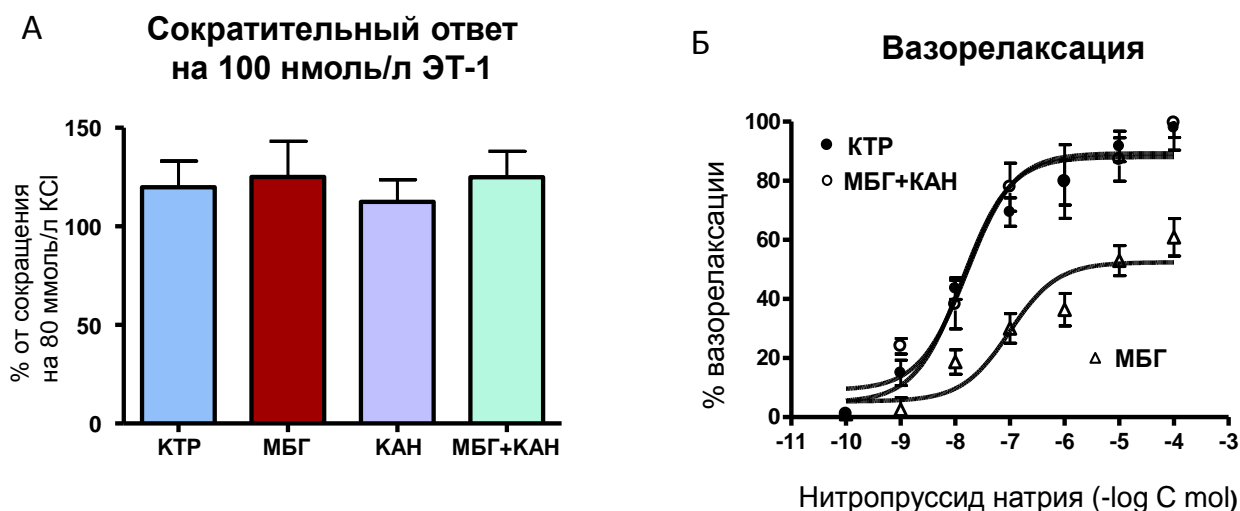


Рисунок 12. Влияние МБГ, канренона и результат их взаимодействия на сократительную способность колец аорты (А) и способность к расслаблению нитропруссидом натрия (Б).

Кольца аорты, предварительно проинкубированные в присутствии МБГ, канренона, и их комбинации, показали похожие по величине сокращения в ответ на эндотелин-1 (ЭТ-1) (Рисунок 12 А). Способность колец аорты к расслаблению была заметно нарушена в группе МБГ (Рисунок 12 Б). Кроме того, помимо снижения способности к расслаблению, гистохимическое исследование показало

значительное увеличение количества коллагена в стенке аорты в результате инкубации с МБГ (Рисунок 13 А, Б).

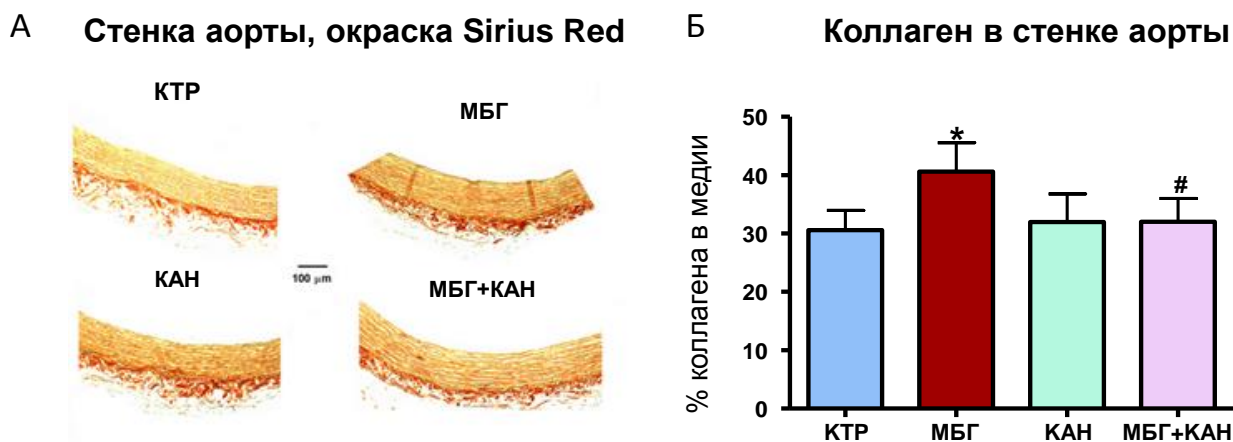


Рисунок 13. А - Репрезентативные изображения гистохимического исследования, демонстрирующие эффект канренона на фиброз сосудистой стенки, вызванный 24-х часовой инкубацией с МБГ. Окраска Sirius Red позволяет визуализировать волокна коллагена-1 и коллагена-3 (красные волокна). Средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего из 6-7 изображений в каждой группе. Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферонни: \* -  $P < 0.01$  vs. контроль (КТР); # -  $P < 0.01$  vs. МБГ.

Канренон в свою очередь восстановил способность к расслаблению сосудов, преинкубированных в присутствии МБГ до уровня, соответствующего контрольной группе (Рисунок 12 Б), что было ассоциировано с заметным снижением количества коллагена в стенке сосуда (Рисунок 13). Инкубация эксплантов аорты в присутствии только канренона не оказала какого-либо эффекта ни на способность к расслаблению, ни на количество коллагена по сравнению с контрольной группой.

Согласно результатам белкового иммуоблота, инкубация эксплантов аорты с МБГ привела к снижению количества белка Fli-1 в аорте, что сопровождалось повышением количества коллагена-1 (Рисунок 14), что также было подтверждено визуализацией фиброза с помощью специфичной окраски Sirius Red (Рисунок 13).

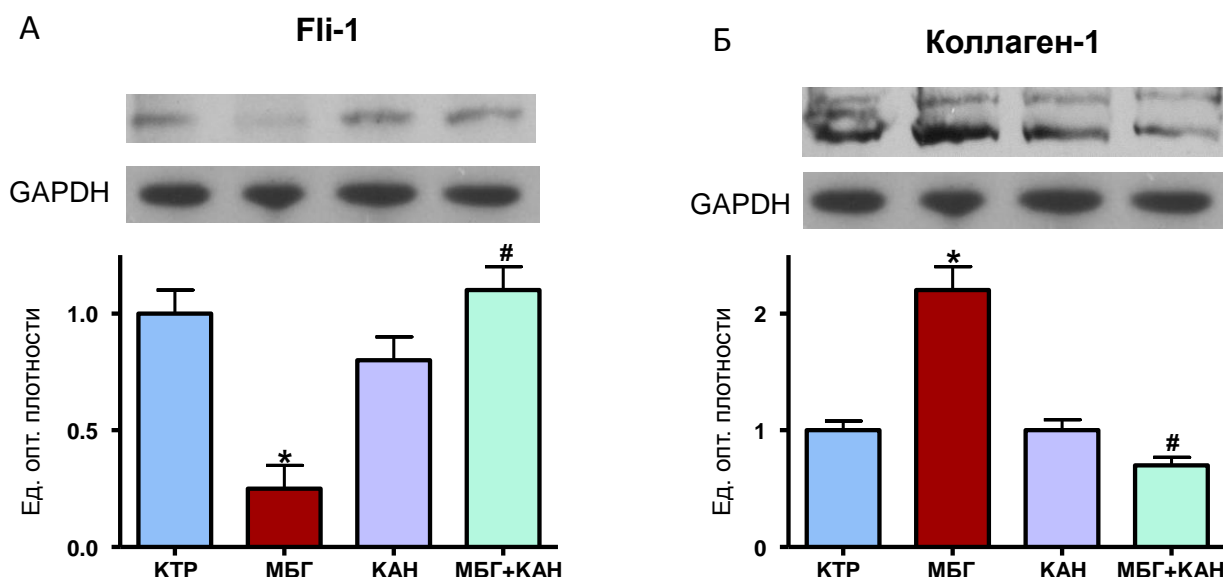


Рисунок 14. Эффект 24-х часовой инкубации колец аорты в присутствии канренона, МБГ и их комбинации на уровень Fli-1(А) и коллагена-1(Б). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферони: \* -  $P < 0.01$  vs. контроль (КТР); # -  $P < 0.01$  vs. МБГ.

Однако, в присутствии канренона МБГ не оказал блокирующего действия в отношении Fli-1, а количество коллагена-1 не превышало величины соответствующей контрольной группе (Рисунок 14).

### 3.3 Результаты исследования “Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке”

Как показано на рисунке 15 А, через 8 недель от момента инъекции стрептозотоцина толерантность к глюкозе у этих животных была нарушена.

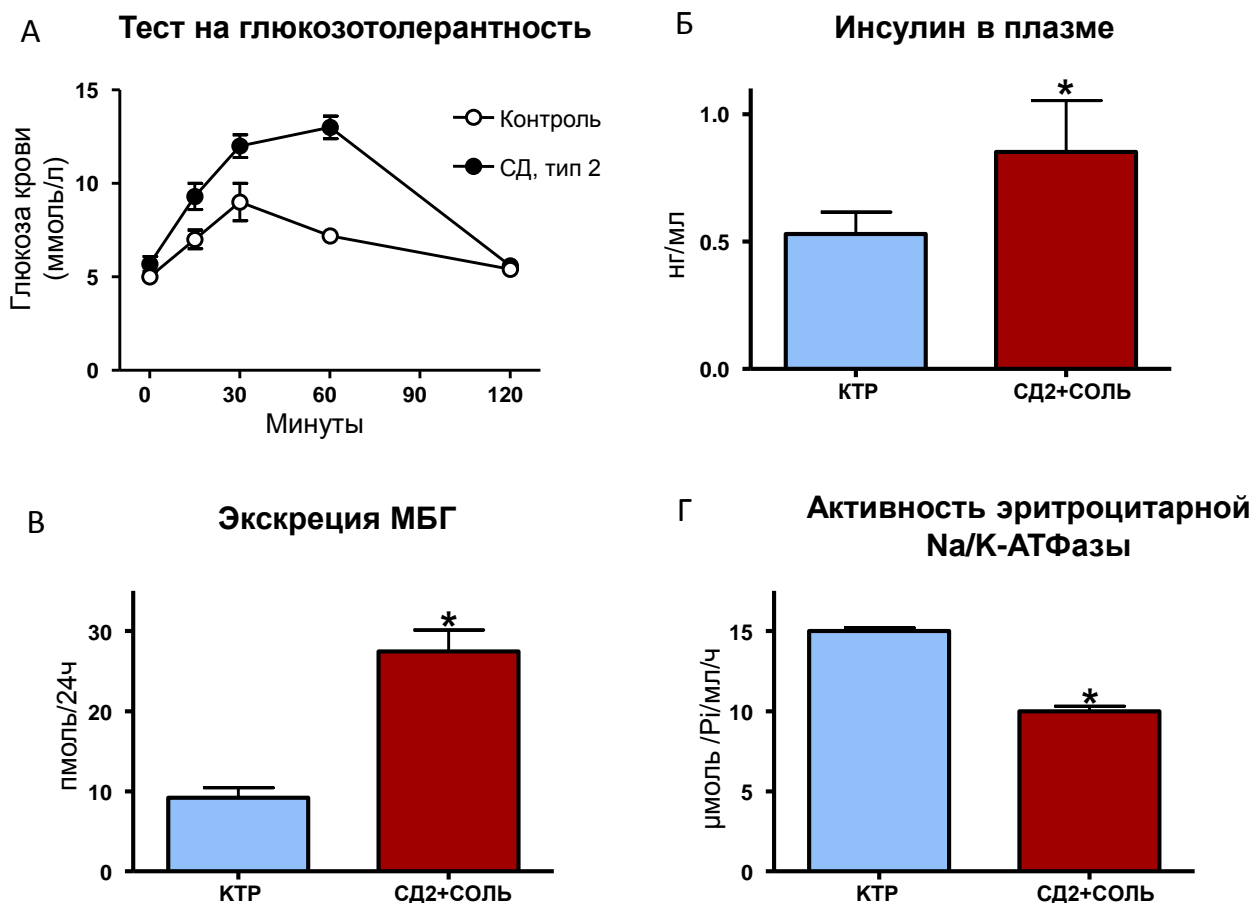


Рисунок 15. Сахарная кривая, иллюстрирующая уровень гликемии натощак и через 15, 30, 60, 120 минут после перорального введения глюкозы (А), уровень инсулина в плазме крови (Б), суточная экскреция МБГ (В) и активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах (Г). t-тест: \*  $P < 0.01$ , СД2+Соль vs. КТР.

Нарушение толерантности к глюкозе в сочетании с солевой нагрузкой сопровождалось двухкратным увеличением экскреции МБГ, а также угнетением эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы (Рисунок 15 Б, В).

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,  $p < 0.01$ ), что сопровождалось увеличением количества коллагена-1 (Рисунок 16 А) и инактивацией Fli-1 (Рисунок 16 Б), а также пониженной чувствительностью колец аорты к вазорелаксационному действию нитропрусида натрия (Рисунок 16 В).

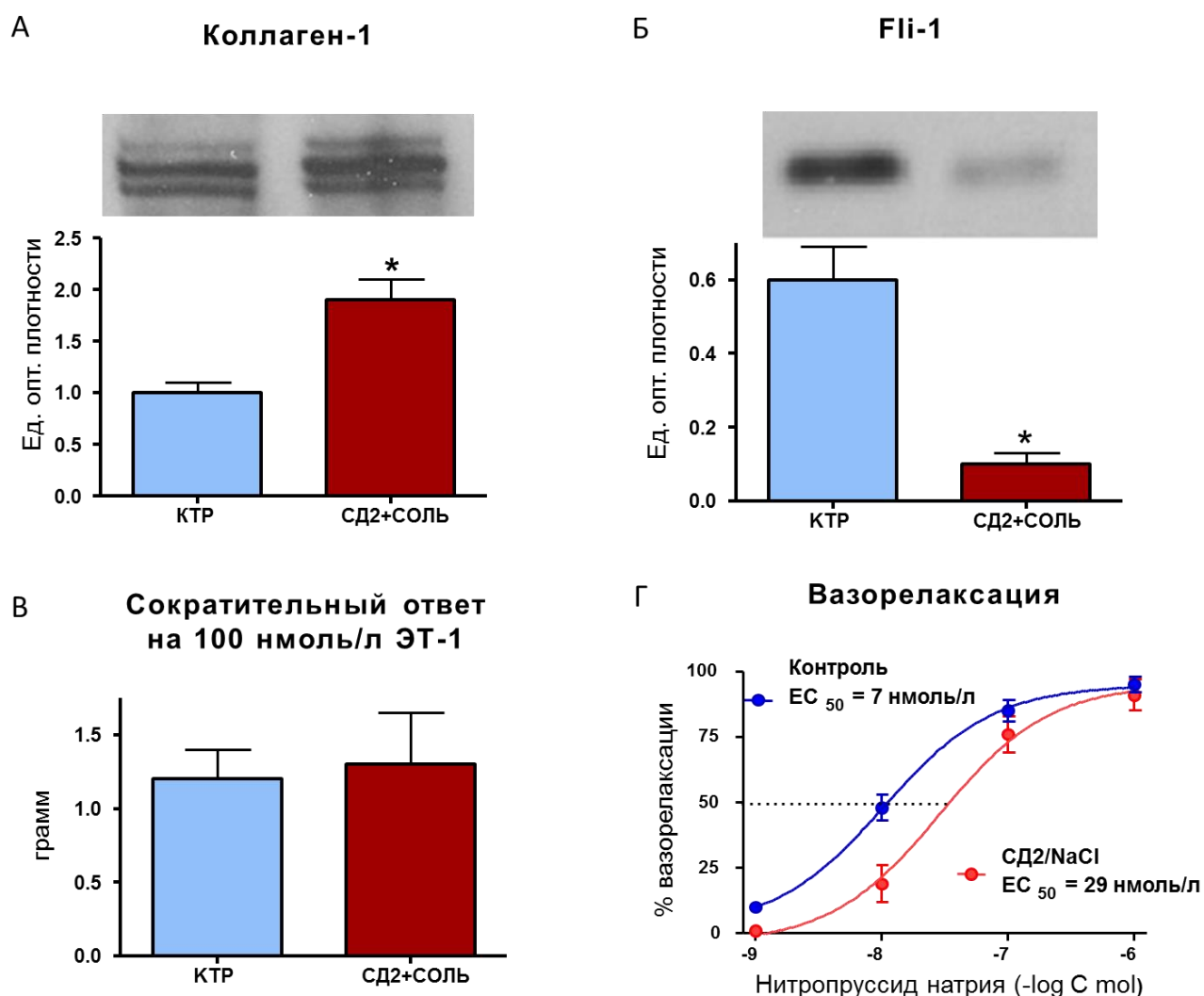


Рисунок 16. Увеличение количества коллагена-1 и снижение экспрессии Fli-1 в аорте крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке (А, Б); снижение чувствительности сосуда к нитропруссиду натрия (В, Г). t-тест: \*  $P < 0.01$ , СД2+Соль vs. Ктр.

Лечение моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 способствовало восстановлению активности натриевого насоса (Рисунок 17 А).

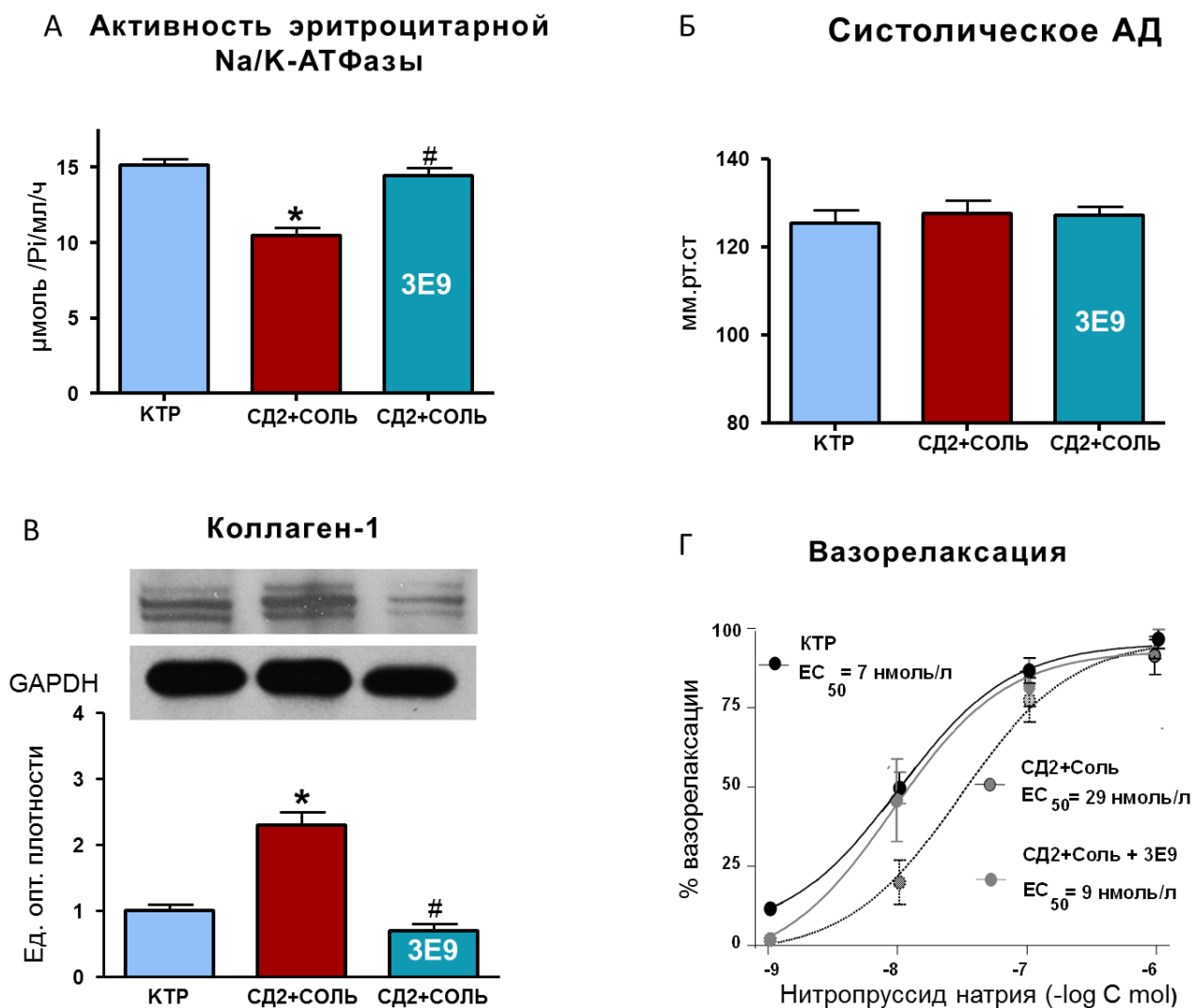


Рисунок 17. Восстановление активности натриевого насоса (А), чувствительности колец аорты к нитропруссиду натрия (В) и снижение количества коллагена-1 в результате иммунонейтрализации. Отсутствие изменений уровня артериального давления при солевой нагрузке (Б). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с последующим тестом Ньюмана-Кьюльса: \* -  $P < 0.01$  vs. контроль (КТР); # -  $P < 0.01$  vs. МБГ.

Способность сосуда к вазорелаксации также была восстановлена (Рисунок 17 В), 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 17 В), коллагена-5 и фибронектина в стенке аорты (Рисунок 18 Г, Е).

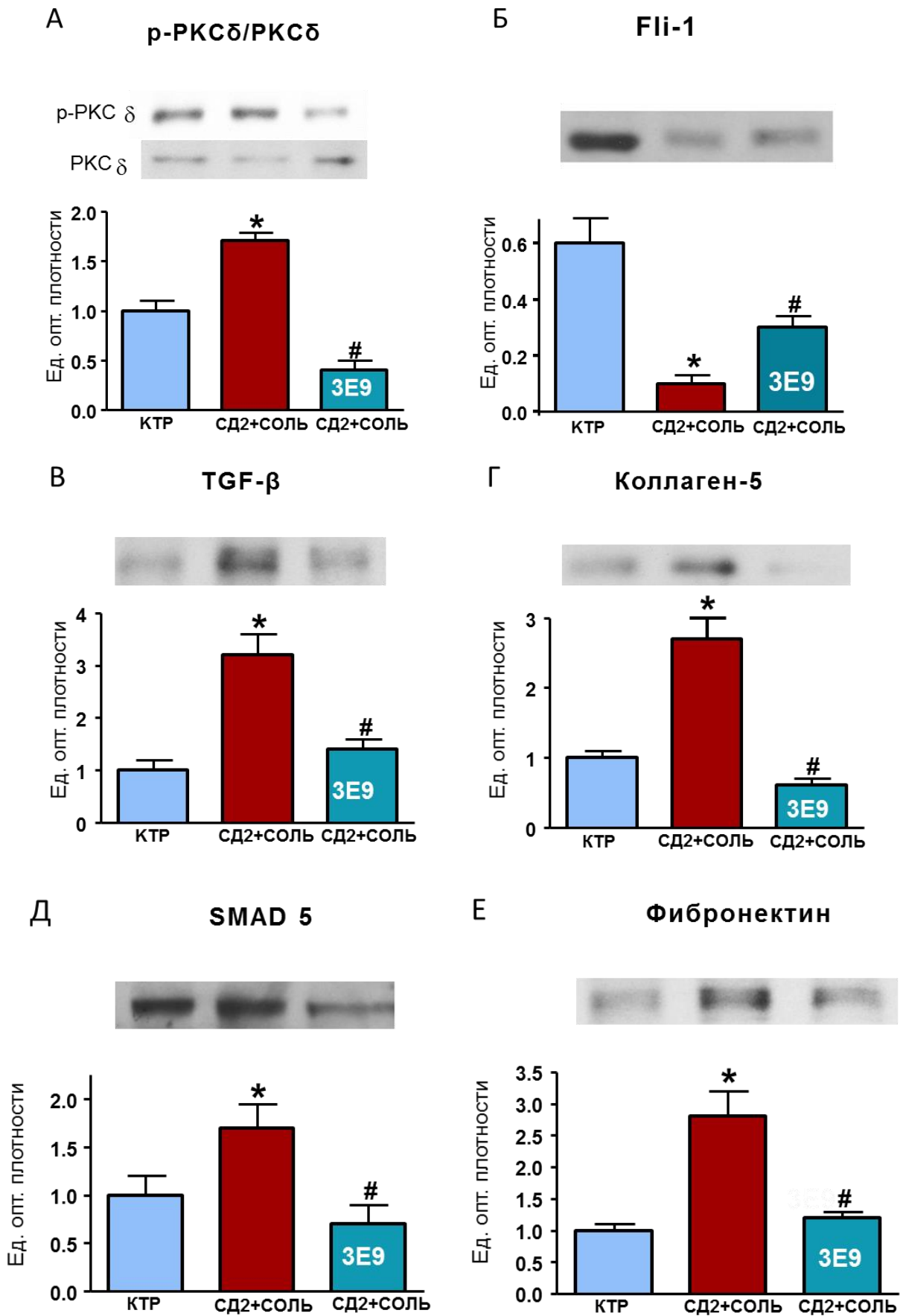


Рисунок 18. Эффект МБГ и моноклональных анти-МБГ антител 3Е9 на фосфорилирование PKC $\delta$  (А), Fli-1 (Б), TGF- $\beta$  (В), коллагена-5 (Г), SMAD 5 (Д) и фибронектина (Е) в аорте крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке. Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с последующим тестом Ньюмана-Кьюльса: \* -  $P < 0.01$  vs. контроль (КТР); # -  $P < 0.01$  vs. МБГ.

Кроме того, в результате лечения антителами 3Е9 произошло восстановление экспрессии Fli-1 в аорте (Рисунок 18 Б). Систолическое артериальное давление оставалось без изменений как во время солевой нагрузки, так и после лечения моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 (Рисунок 17 Б).

У животных с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке было отмечено увеличение коллагена-1 (Рисунок 17 В) и коллагена-5 (Рисунок 18 Г), а также фибронектина (Рисунок 18 Е) в аорте. Также наблюдалось увеличение уровня основных белковых молекул, участвующих в механизме развития фиброза сосудистой стенки при диабете, таких как TGF- $\beta$  (Рисунок 18 В), SMAD 5 (Рисунок 18 Д), а также фосфорилированной PKC $\delta$  и Fli-1 (Рисунок 18 А, Б). Иммунонейтрализация МБГ была ассоциирована с заметным понижением количества коллагена-1, коллагена-5 и фибронектина, что сопровождалось снижением экспрессии TGF- $\beta$ , PKC $\delta$ , SMAD-5 и увеличением Fli-1 в аорте (Рисунок 18).



## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Профибротический эффект маринобуфагенина и эффект моноклональных антител к маринобуфагенину ЗЕ9 у нормотензивных крыс на солевой нагрузке

В результате данного исследования было показано, что повышенный уровень МБГ в плазме нормотензивных животных, вызванный солевой нагрузкой, сопровождался фиброзом аорты в отсутствие подъема артериального давления. Иммунонейтрализация маринобуфагенина во время солевой нагрузки способствовала снижению степени фиброза в аорте.

В данной работе было показано, что солевая нагрузка стимулирует продукцию МБГ, что согласуется с основной теорией, объясняющей функцию МБГ, как натрийуретического гормона [142]. Данные, представленные ранее, показали, что солевая нагрузка как у соль-чувствительных, так и у нормотензивных животных сопровождается повышением уровня МБГ в плазме, увеличением экскреции МБГ, а также ингибированием эритроцитарной и почечной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [104]. В настоящем исследовании на фоне солевой нагрузки наблюдалось увеличение уровня МБГ в плазме, что сопровождалось ингибированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, а также значительным увеличением суточного диуреза. Снижение эффективности работы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в почках способствует снижению реабсорбции натрия, тем самым провоцируется натрийурез [142]. При измерении данного электролита в моче было показано десятикратное увеличение его концентрации. Таким образом, солевая нагрузка стимулирует продукцию МБГ с компенсаторной целью выведения излишнего количества натрия для предотвращения нарушений электролитного баланса. Данная теория также согласуется с тем, что ограничение потребления соли сопровождается снижением экскреции МБГ у человека [209], что еще раз указывает на причинно-следственную связь между потреблением соли и продукцией этого кардиотонического стероида.

Взаимодействие МБГ с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой не ограничивается исключительно почечной тканью, специфическая для эндогенного лиганда субъединица также экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов [101]. Связывание МБГ с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой гладкомышечных клеток сосудистой стенки *in vitro* вызывает вазоконстрикторный эффект [100, 148]. А у соль-чувствительных животных продукция МБГ способствует развитию стойкого гипертензивного ответа в ответ на солевую нагрузку [101]. Объясняется это наличием у соль-чувствительных животных мутированной  $\alpha 1$  субъединицы  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, которая не способна эффективно производить  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  обмен, за чем и следует задержка жидкости и гипертензия [101]. У нормотензивных животных, не обладающих соль-чувствительностью, как показано в настоящем исследовании, солевая нагрузка сопровождалась натрийуретическим эффектом МБГ в отсутствии подъема артериального давления. Данное наблюдение не отличается новизной, так как было замечено ранее. Так, у нормотензивных животных на высокосолевой диете наблюдалось повышение экскреции МБГ и  $\text{Na}^+$  почками в отсутствии подъема артериального давления [145]. 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 так же наблюдался повышенный уровень МБГ при солевой нагрузке, который инициировал фиброз сердечно-сосудистой системы, в частности аорты. Таким образом, данное наблюдение было названо АД-независимым профибротическим эффектом МБГ.

Данные о фиброзе аорты в отсутствии изменений артериального давления позволяют исключить компенсаторное увеличение фиброза сосудистой стенки в ответ на подъем артериального давления. Жесткость крупных артерий увеличивается с возрастом даже у здоровых субъектов, не страдающих сердечно-сосудистыми заболеваниями [217]. Известно, что увеличение периферического сопротивления сосудов в сочетании с повышенной жесткостью ведет к развитию изолированной артериальной гипертензии [96]. Кроме того, изолированная

гипертензия, увеличенное пульсовое давление, а также повышенная скорость распространения пульсовой волны являются факторами риска развития инсульта, инфаркта миокарда, сердечной недостаточности и смертности в общем у пожилых людей [218-227]. Возможность улучшить комплаентность сосудистой стенки с превентивной целью является важной задачей в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний, а также одной из целей антигипертензивной терапии.

В настоящей работе была продемонстрирована возможность снижения степени фиброза в стенке аорты иммунонейтрализацией МБГ. Моноклональные анти-МБГ антитела 3E9, блокируя МБГ- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза взаимодействие, предотвращают запуск внутриклеточного каскада, ведущего к увеличению количества коллагена-1. Ранее был показан антигипертензивный эффект моноклональных антител у соль-чувствительных крыс на солевой нагрузке [150]. Гипотензивный эффект был ассоциирован со снижением экскреции этого кардиотонического стероида, а также восстановлением активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В нашей работе моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 не оказали гипотензивного эффекта за отсутствием гипертензии. Ранее был показан их антифибротический эффект в миокарде на модели почечной недостаточности [32] и у Dahl соль-чувствительных крыс [28]. В настоящем исследовании был продемонстрирован антифибротический эффект моноклональных антител в сосудистой стенке. Повлияв на морфологическую структуру сосудистой стенки, анти-МБГ антитела 3E9 улучшили способность сосуда к расслаблению, то есть восстановили комплаентность сосуда. Таким образом, моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 являются одним из способов снижения степени фиброза сосудистой стенки.

В заключении, у нормотензивных животных в ответ на высокое потребление соли повышенный уровень МБГ в плазме индуцировал фиброз сосудистой стенки, а также ухудшил вазорелаксацию колец аорты в отсутствии подъема артериального давления. Иммунонейтрализация МБГ понизила степень фиброза сосудистой стенки и улучшила ее способность к расслаблению. Так, высокосолевая диета инициировала МБГ-опосредованный сосудистый фиброз в

АД-независимой манере, и это ремоделирование было остановлено иммунонейтрализацией.

#### **4.2 Профибротический эффект маринобуфагина и антагонистический эффект канренона**

Главным наблюдением данного эксперимента является антагонистическое воздействие антагониста альдостерона, канренона, на МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки. Ранее была продемонстрирована способность канренона подавлять миокардиальный фиброз у крыс [8]. 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. Нарушение способности сосуда расслабляться является одной из характеристик сосудистой жесткости.

На основе результатов этого эксперимента было проведено пилотное исследование, в котором спиронолактон был добавлен к основной антигипертензивной терапии с целью улучшения упруго-эластических свойств сосудов у пациентов с резистентной артериальной гипертензией [228]. У пациентов с резистентной артериальной гипертензией наблюдалось повышенное систолическое и диастолическое артериальное давление, скорость распространения пульсовой волны, высокий уровень креатинина в плазме, пониженная скорость клубочковой фильтрации, более высокий уровень циркулирующего МБГ и подавленная активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы по сравнению с группой контроля, куда входили нормотензивные пациенты той же возрастной категории. В результате дополнительной терапии спиронолактоном в дозе 50 мг в день в течение полугода у пациентов с резистентной гипертензией отмечалось восстановление активности натриевого насоса, что было ассоциировано со снижением скорости распространения пульсовой волны [228].

Идея об антагонизме между спиронолактоном и кардиотоническими стероидами зародилась задолго до идентификации МБГ. Селье в своих работах сообщал об ослаблении экспериментальной дигиталисной токсичности у крыс после лечения спиронолактоном [229]. Позже было показано, что канренон взаимодействует с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой в том же месте связывания, где и КТС [33], а также способен ослаблять ингибиторный эффект дигиталис-подобных веществ на активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [168]. Таким образом, пониженная активность эритроцитарной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы является маркером циркуляции МБГ [16,150]. В настоящей работе проводилось измерение активности эритроцитарной и почечной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в присутствии МБГ и канренона, в результате чего был подтвержден факт ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы маринобуфагенином и продемонстрировано отсутствие ингибиторного эффекта канренона на активность натриевого насоса (Рисунок 11 В, Г). Однако, канренон восстановил активность заингибированной маринобуфагенином  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы до нормального уровня, что говорит о конкурентном отношении МБГ и канренона за связывание с натриевым насосом.

В настоящей работе впервые было показано, что антагонист минералокортикоидных рецепторов, канренон, восстанавливает МБГ-индуцированное нарушение вазорелаксации. МБГ-индуцированное нарушение вазорелаксации может объясняться как дисрегуляцией цГМФ-зависимого внутриклеточного каскада [231], так и измененной морфологией сосуда, т.е. повышенным содержанием коллагена в стенке сосуда, что делает сосуд менее комплаентным [232]. Активный метаболит спиронолактона, канренон, блокируя действие МБГ предотвращает нарушение функции сосуда. Эти данные также согласуются с результатами измерения скорости распространения пульсовой волны у пациентов, 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 [228].

Интересно отметить, что наличие огромного количества публикаций о профибротическом эффекте альдостерона [233-236] входит в противоречие с показанным эффектом спиронолактона на МБГ-индуцированный фиброз. Однако, Tian и др. для дифференцировки данных механизмов провели исследование, в котором у животных выполнялась частичная нефрэктомия, что стимулировало подъем артериального давления, повышение уровня альдостерона, а также ремоделирование миокарда [237]. Лечение спиронолактоном способствовало понижению уровня артериального давления, фиброза миокарда, а также улучшению диастолической функции. Параллельно другая группа животных была подвержена инфузии МБГ, в результате чего произошло ремоделирование миокарда в отсутствие изменения уровня альдостерона. В то же время, лечение спиронолактоном, ослабило фиброз и восстановило диастолическую функцию в данной группе, также как и в группе нефрэктомии. Кроме того, было показано, что солевая нагрузка способствует снижению экспрессии альдостерон-синтазы CYP11b2 в *zona glomerulosa* надпочечников у крыс, а также понижает количество альдостерона в плазме, в то время как недостаток соли стимулирует продукцию альдостерона [237]. Ранее было описано явление отсутствия потребления соли у людей, что также сопровождалось активацией РААС [200]. Согласно природе КТС, их продукция стимулируется высоким потреблением соли. Таким образом, фиброз, вызванный солевой нагрузкой, не вовлекает РААС, и опосредован продукцией МБГ и одним из его эффектов. Спинонолактон, конкурируя за связывание с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, местом связывания с МБГ, ослабляет его профибротический эффект. Таким образом, спиронолактон имеет анти-фибротическое действие, выступая в качестве антагониста МБГ.

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 промотора гена проколлагена-1 [235]. Известно, что у Fli-1 нокаутных мышей повышенная продукция коллагена-1 ведет к развитию

миокардиального фиброза [24]. Кроме того, было продемонстрировано, что фосфорилирование PKC $\delta$  ведет к деградации Fli-1, тем самым прекращая его лимитирующее действие на синтез проколлагена [240]. Ранее упомянутый МБГ- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза-опосредованный механизм, где МБГ индуцирует PLC-опосредованную транслокацию PKC $\delta$  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. Канренон, связавшись с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, предотвратил активацию МБГ- $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза внутриклеточного каскада, что было подтверждено увеличением экспрессии Fli-1 и доказано снижением количества коллагена в стенке сосуда, проинкубированного в присутствии МБГ и канренона одновременно.

Таким образом, в данном эксперименте было продемонстрировано, что антагонист альдостерона, канренон, имеет обратный эффект на МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки, что восстановило упруго-эластические свойства сосуда. Так, МБГ и МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки являются потенциальной терапевтической мишенью для антагонистов минералокортикоидных рецепторов.

#### **4.3 Эффект моноклональных антител к маринобуфагенину 3E9 на фиброз сосудистой стенки у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке**

Основным наблюдением в данном эксперименте было увеличение продукции МБГ при диабете 2 типа и солевой нагрузке, что ассоциировалось с фиброзом стенки аорты посредством активации профибротического сигнального пути, индуцированного МБГ, в отсутствии изменений артериального давления. При этом моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 понизили степень фиброза

сосудистой стенки, что сопровождалось инактивацией ключевых участников профибротического внутриклеточного каскада, таких как PKC $\delta$ , TGF- $\beta$  и SMAD 5, а также восстановлением активности Fli-1.

Ранее было продемонстрировано, что у гипертензивных Dahl соль-чувствительных крыс повышенный уровень МБГ сопровождается активацией профибротического TGF- $\beta$  SMAD-зависимого сигнального пути, а моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 способны реверсировать эту стимуляцию [28]. Также было показано, что у крыс с экспериментальным сахарным диабетом возрастает продукция именно МБГ, а не других эндогенных кардиотонических стероидов [213]. Гиперпродукция МБГ, селективного ингибитора  $\alpha_1$  Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы, преимущественно присутствующей в почечных канальцах, представляется компенсаторным ответом на ассоциированную с сахарным диабетом задержку натрия. В предыдущих исследованиях была продемонстрирована различная степень увеличения продукции МБГ при инсулинчувствительном и инсулинрезистентном диабете, где при сахарном диабете 1 типа продукция МБГ увеличилась более чем в 3 раза, а при сахарном диабете 2 типа лишь на 60% [23]. В результате нашего эксперимента, у крыс с индуцированным стрептозотоцином экспериментальным диабетом 2 типа на солевой нагрузке продукция МБГ возросла в 2.8 раз. Такое значительное увеличение продукции МБГ объясняется дополнением к сахарному диабету солевой нагрузки, которая сама по себе стимулирует продукцию натрийуретика МБГ.

Подобно результатам, полученным в вышеописанном эксперименте, у нормотензивных крыс с экспериментальным диабетом 2 типа на солевой нагрузке наблюдалось АД-независимое увеличение степени фиброза сосудистой стенки, ассоциированное с гиперпродукцией МБГ. Количество коллагена-1, коллагена-5 и фибронектина было значительно увеличено в аорте животных с экспериментальным диабетом на солевой нагрузке. При этом фиброз сосудистой стенки сопровождался нарушением способности сосуда к расслаблению. 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. Иммунонейтрализация, как способ устранения МБГ из циркуляции, еще раз доказывает ключевую роль МБГ в развитии фиброза аорты в данных условиях.

Кроме того, в нашей работе повторно были получены данные об участии Fli-1 в профибротическом пути, инициированном взаимодействием МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В случае солевой нагрузки в условиях сахарного диабета 2 типа деградация Fli-1 привела к увеличению синтеза коллагена-1, что было также показано при гистохимическом исследовании в виде увеличения фиброза в сосудистой стенке. Данный механизм вовлекает участие PKC $\delta$ , которая фосфорилирует Fli-1, что ведет к его транслокации в цитоплазму с последующей деградацией [24].

В настоящем эксперименте было показано увеличение количества основных белков, предположительно принимающих участие в профибротическом сигнальном пути при диабете, таких как TGF- $\beta$ , SMAD 5 и PKC $\delta$  в аорте животных с экспериментальным диабетом на высокосолевого диете. На основании полученных результатов и литературных данных, включая данные Федоровой О.В., был предложен следующий механизм (Рисунок 19).

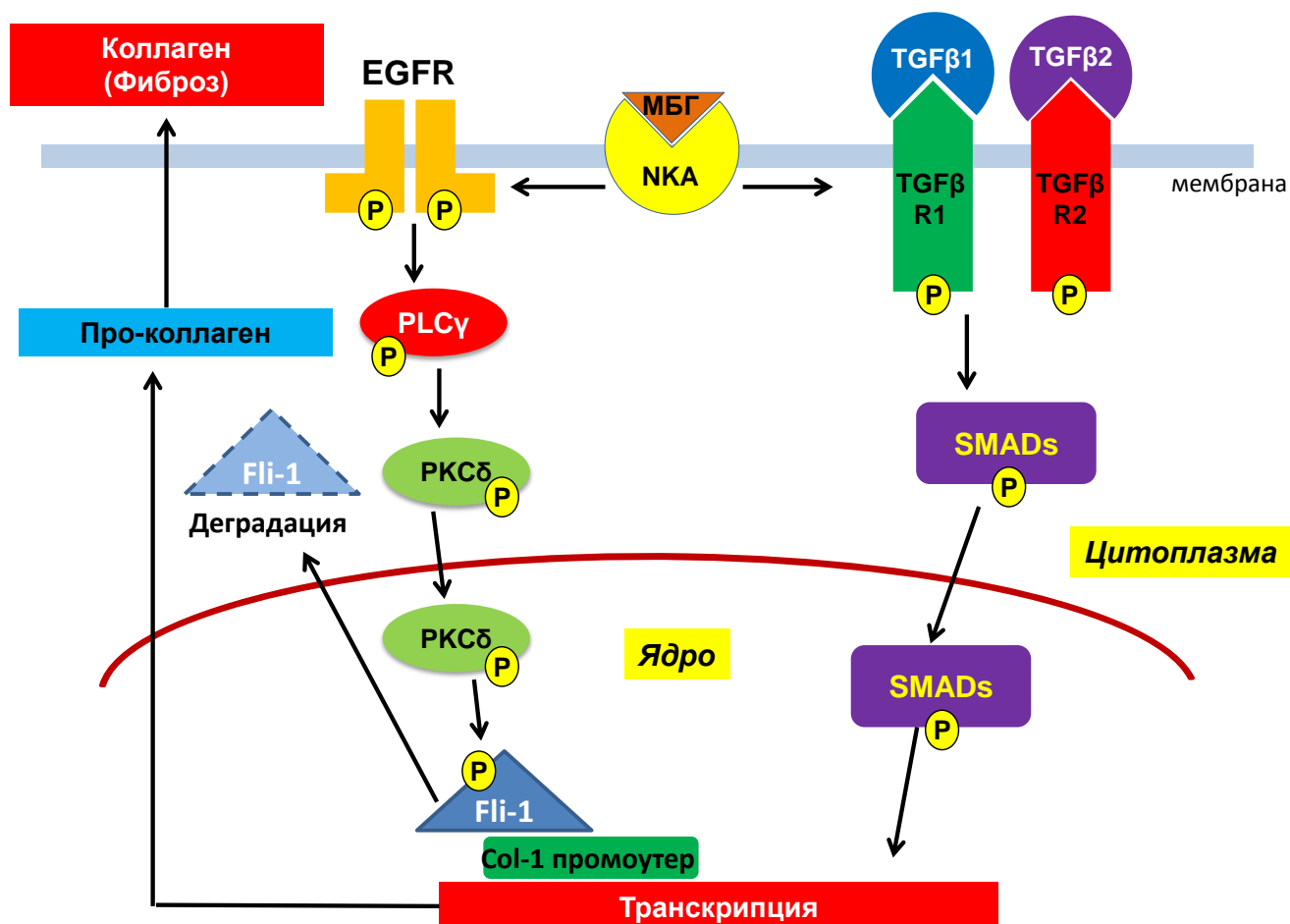


Рисунок 19. Механизм активации профибротического пути при сахарном диабете 2 типа посредством связывания МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

Связывание КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой способно не только ингибировать насосную функцию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, но также имеет независимую сигнальную функцию. Так,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза вместе с Src способна образовывать функциональный сигнальный комплекс. Взаимодействие КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой приводит к определенным конформационным изменениям, которые в свою очередь активируют Src [241]. Активированный Src взаимодействует с EGFR и фосфорилирует его в месте отличном от основного места аутофосфорилирования рецептора [243]. Однако, существуют доказательства того, что при связывании МБГ с натриевым насосом у соль-чувствительных крыс фосфорилирование EGFR происходит независимо от Src [28]. Активация EGFR запускает PLC $\gamma$ -PKC $\delta$  сигнальный путь, в результате чего PKC $\delta$  транслоцируется в ядро клетки [246]. В ядре активированная PKC $\delta$  фосфорилирует Fli-1, фосфорилированный Fli-1

транслоцируется из ядра в цитоплазму клетки и разрушается [24]. Отсутствие ингибирующего влияния Fli-1 на промотор гена Col1 ведет к увеличению его экспрессии и продукции. Повышение фосфорилированной PKC $\delta$  и реципрокная инактивация Fli-1 у диабетических крыс на солевой нагрузке наблюдались в нашей работе вместе с фиброзом и обратным развитием под действием антител.

Повышенная экспрессия TGF- $\beta$  в почке была найдена у мышей с экспериментальным сахарным диабетом 2 типа [29]. Позже было показано, что гипертрофия почки и гломерулосклероз при диабетической нефропатии также ассоциированы с повышенной активностью TGF- $\beta$ , а иммунонейтрализация способствует понижению количества коллагена и фибронектина [30]. На экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа было показано, что ключевым моментом в профибротическом механизме в почке является чрезмерная экспрессия SMAD 3, которая синергически увеличивает экспрессию фибронектина [247]. Таким образом, роль TGF- $\beta$  в развитии фиброза несомненна. В настоящей работе мы показали, что повышенная экспрессия TGF- $\beta$  индуцируется посредством связывания МБГ и Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы, что в свою очередь запускает SMADs сигнальный путь посредством активации SMAD 5. Иммунонейтрализация анти-МБГ антителами 3E9 показала снижение количества коллагена в стенке аорты, что также сопровождалось инактивацией SMAD 5 и TGF- $\beta$ .

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 $\gamma$ -PKC $\delta$ -Fli-1 и TGF- $\beta$  – SMADs в отсутствии изменений артериального давления. Моноклональные анти-МБГ антитела 3E9 оказали антифибротический эффект, что сопровождалось инактивацией ключевых участников профибротического пути, TGF- $\beta$ , SMAD 5, PKC $\delta$ . Результаты данного эксперимента позволили прояснить основные этапы внутриклеточного каскада осуществляющего МБГ-опосредованный фиброз сосудистой стенки в условиях сахарного диабета 2 типа. Моноклональные анти-

МБГ антитела оставляют за собой место антифибротического агента при сердечно-сосудистых заболеваниях.

### Заключение

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

Антагонист альдостерона, канренон, имеет обратный эффект на МБГ-индуцированный фиброз сосудистой стенки, что сопровождается восстановлением способности 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 сахарного диабета 2 типа осуществляется посредством связывания МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с последующей активацией 2-х сигнальных путей:  $\text{PLC}\gamma$ - $\text{PKC}\delta$ - $\text{Fli-1}$  и  $\text{TGF-}\beta$  –  $\text{SMADs}$ . Введение моноклональных анти-МБГ антител 3Е9 предотвратило связывание МБГ с натриевым насосом, инактивировав профибротические сигнальные пути.

## Выводы

1. Солевая нагрузка у нормотензивных крыс инициирует продукцию МБГ, который оказывает АД-независимый профибротический эффект и отрицательно влияет на упруго-эластические свойства сосудистой стенки.
2. В результате солевой нагрузки взаимодействие МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы запускает каскад внутриклеточных реакций, ведущих к инактивации негативного регулятора промоутера гена коллагена-1  $\text{Fli-1}$ , тем самым служит причиной увеличения количества коллагена в сосудистой стенке, что влечет за собой нарушение способности сосуда расслабляться.
3. Иммунонейтрализация моноклональными анти-МБГ антителами 3Е9 ослабляет профибротический эффект МБГ и восстанавливает упруго-эластические свойства сосуда.
4. Антагонист альдостерона, канренон, выступает в роли антагониста МБГ, блокируя место связывания МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, тем самым оказывает антифибротический эффект и восстанавливает способность сосуда расслабляться.
5. Профибротическое действие МБГ на экспериментальной модели сахарного диабета 2 типа осуществляется посредством активации 2-х сигнальных путей:  $\text{PLC}\gamma$ - $\text{PKC}\delta$ - $\text{Fli-1}$  и  $\text{TGF-}\beta$  -  $\text{SMADs}$ .
6. С помощью моноклональных анти-МБГ антител 3Е9 было показано устранение фиброза сосудистой стенки, а также подавление экспрессии ключевых участников МБГ-индуцированного профибротического механизма сосудистой стенки при инсулин-независимом 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 антагонизма антагонистов альдостерона и маринобуфагенина.

## **Благодарность**

Выражаю огромную благодарность моей коллеге, доктору Федоровой Ольге Васильевне (Лаборатория по изучению сердечно-сосудистых заболеваний, NIA, NIH, Baltimore, USA), за оказанную помощь в моей работе, а также за возможность воспользоваться её неопубликованными данными при обсуждении результатов.

## Список сокращений

КТС – кардиотонические стероиды

МБГ – маринобуфагенин

АА - антагонисты альдостерона

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

TGF- $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор бета

ММР - металлопротеиназа

ПНП – предсердный натриуретический пептид

ДОКА - дезоксикортикостерон ацетат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

PKG – протеинкиназа G

PKC $\delta$  – протеинкиназа C дельта

PLC – фосфолипаза C

НЭ – норэпинефрин

АП – ангиотензин II

AT1 – AT1 подтип рецептора ангиотензина II

ТЦБ – телоцинобуфагин

АФК – активные формы кислорода

ЭТ-1 – эндотелин-1



## Список литературы

1. Chae, C.U. Increased pulse pressure and risk of heart failure in the elderly / C.U. Chae, M.A. Pfeffer, R.J. Glynn, G.F. Mitchell, J.O. Taylor, C.H. Hennekens // JAMA. - 1999. - Vol. 281, N7. - P.634–639.
2. Franklin, S.S. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study / S.S. Franklin, M.G. Larson, S.A. Khan, N.D. Wong, F.P. Leip, W.B. Kannel, D. Levy // Circulation. - 2001. - Vol. 103. - P.1245–1249.
3. Васюк, Ю.А. Согласованное мнение российских экспертов по оценке артериальной жесткости в клинической практике / Ю.А. Васюк, С.В. Иванова, Е.Л. Школьник, Ю.В. Котовская, В.А. Милягин, В.Э. Олейников, Я.А. Орлова, А.Н. Сумин, А.А. Баранов, С.А. Бойцов, А.С. Галявич, Ж.Д. Кобалава, О.В. Кожевникова, А.О. Конради, Ю.М. Лопатин, В.Ю. Мареев, Д.С. Новикова, Р.Г. Оганов, А.Н. Рогоза, О.П. Ротарь, Н.В. Сергацкая, В.В. Скибицкий // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2016. – Т.15 № 2. – С. 4 – 19.
4. Mitchell, G.F. Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function / G.F. Mitchell, M.A. Pfeffer, E. Braunwald, J.L. Rouleau, V. Bernstein, E.M. Geltman, G.C. Flaker // Circulation. - 1997. - Vol. 96. - P. 4254–4260.
5. Кошелева, Н.А. Факторы риска развития сердечно-сосудистых осложнений у больных хронической сердечной недостаточностью: фокус на артериальную жесткость / Н.А. Кошелева, А. П. Ребров // Журнал Сердечная Недостаточность. – 2011. – Т.12 №3. – С.136-141.

6. Кобалава, Ж.Д. Артериальная жесткость и хроническая болезнь почек: причины и последствия / Ж.Д. Кобалава, Ю.В. Котовская, С.В. Виллевалде, А.Е. Соловьева, И.М. Амирбегишвили // РФК. - 2014. - №1. - С. 83-91.
7. Cavalcante, J.L. Aortic stiffness: current understanding and future directions/ J.L. Cavalcante, J.A. Lima, A. Redheuil, M.H. Al-Mallah // Journal of the American College of Cardiology. - 2011. - Vol. 57, N 14. - P.1511-1522.
8. Mitchell, G.F. Arterial stiffness and wave reflection: biomarkers of cardiovascular risk / G.F. Mitchell // Artery Research. - 2009. Vol. 3, N 2. - P. 56-64.
9. Johnson, C.P. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma / C.P. Johnson, R. Baugh, C.A. Wilson, J. Burns // Journal of Clinical Pathology. - 2001.- Vol. 54. - P.139–145.
10. Кац, Я.А. Жесткость сосудистой стенки с позиции повреждения соединительной ткани при сердечно-сосудистых заболеваниях / Я.А. Кац, Е.В. Пархонюк, Н.С. Акимова // Фундаментальные исследования. - 2013. – Т.5, №1.- С.189-195.
11. Wolinsky, H. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media / H. Wolinsky, S. Glagov // Circulation Research. - 1964. - V.14. - P. 400–413.
12. Wolinsky, H. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern / H. Wolinsky, S. Glagov // Circulation Research. - 1969. - Vol. 25. - P. 677–686.
13. Иваненко, В.В. Взаимосвязь показателей жесткости сосудистой стенки с различными сердечно-сосудистыми факторами риска / В.В. Иваненко, О.П. Ротарь, А.О. Конради // Артериальная Гипертензия. - 2009. - №3 - С. 290-295.
14. Gates, P.E. Dietary sodium restriction rapidly improves large elastic artery compliance in older adults with systolic hypertension / P.E. Gates, H. Tanaka, W.R. Hiatt, D.R. Seals // Hypertension. - 2004. -Vol. 44. - P. 35–41.

15. Bagrov, A.Y. The dietary sodium-blood pressure plot “stiffens” / A.Y. Bagrov, E.G. Lakatta // *Hypertension*. - 2004. - Vol. 44. - P. 22–24.
16. Fedorova, O.V. An endogenous ligand of alpha-1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride dependent hypertension / O.V. Fedorova, M.I. Talan, N.I. Agalakova, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Circulation*. - 2002. - Vol. 105. - P. 1122-1127.
17. Elkareh, J. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy / J. Elkareh, D.J. Kennedy, B. Yashaswi, A. Shidyak, E.G. Kim, S. Smaili, S.M. Periyasamy, I.M. Hariri, L. Fedorova, J. Liu, L. Wu, M.B. Kahaleh, Z. Xie, D. Malhotra, O.V. Fedorova, V.A. Kashkin, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *Hypertension*. - 2007. - Vol. 49. - P. 215 – 224.
18. Kennedy, D.J. Central role for the cardiotoxic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy / D.J. Kennedy, S. Vetteth, S.M. Periyasamy, M. Kanj, L. Fedorova, S. Khouri, M.B. Kahaleh, Z. Xie, D. Malhotra, N.I. Kolodkin, E.G. Lakatta, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *Hypertension*. - 2006. - Vol. 47. - P. 488 – 495.
19. Kennedy, D.J. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse / D.J. Kennedy, J. Elkareh, A. Shidyak, A.P. Shapiro, S. Smaili, K. Mutgi, S. Gupta, J. Tian, E. Morgan, S. Khouri, C.J. Cooper, S.M. Periyasamy, Z. Xie, D. Malhotra, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *American Journal of Physiology Renal Physiology*. - 2008. - Vol. 294. - P. 450 – 454.
20. Konradi, A.O. The endogenous Na, K-ATPase ligand, marinobufagenin, induces vascular fibrosis via a pressure-independent mechanism in NaCl-loaded diabetic rats / A.O. Konradi, Y.N. Grigорова, A.V. Fadeev, K.A. Bagrov, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // *Artery research*. - 2012. - Vol. 614. - P. 145.
21. Михайлов, А.В. Эндогенный дигиталис и нарушение вазорелаксации при преэклампсии / А.В. Михайлов, О.В. Федорова, А.Я. Багров, Е.В. Фролова, Е.Р.

Никитина, Е.С. Никандрова, А.В. Фадеев, В.В. Шман // Артериальная гипертензия. – 2009. - № 4. – С.454 – 457.

22. Nikitina, E.R. In preeclampsia, endogenous cardiotoxic steroids induce vascular fibrosis and impair vasorelaxation of umbilical arteries / E.R. Nikitina, A.V. Mikhailov, E.S. Nikandrova, E.V. Frolova, A.V. Fadeev, V.V. Shman, V.Y. Shilova, N.I. Tapil'skaya, J.I. Shapiro, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // Journal of Hypertension. - 2011. - Vol. 29 N4. - P. 769-776.

23. Kubo, M. Persistent down-regulation of Fli-1, a suppressor of collagen transcription, in fibrotic scleroderma skin / M. Kubo, J. Czuwara-Ladykowska, O. Moussa, M. Markiewicz, E. Smith, R.M. Silver, S. Jablonska, M. Blaszczyk, D.K. Watson, M. Trojanowska // American Journal of Pathology. - 2003. - Vol.163. - P. 571 – 581.

24. Elkareh, J. Marinobufagenin induces increases in procollagen expression in a process involving protein kinase C and Fli-1: implications for uremic cardiomyopathy / J. Elkareh, S.M. Periyasamy, A. Shidyak, S. Vetteth, J. Schroeder, V. Raju, I.M. Hariri, N. El-Okdi, S. Gupta, L. Fedorova, J. Liu, O.V. Fedorova, M.B. Kahaleh, Z. Xie, D. Malhotra, D.K. Watson, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // American Journal of Physiology. Renal Physiology. - 2009. - Vol. 296, N 5. - P. 1219-1226.

25. Clerico, A. Is the endogenous digitalis-like factor the link between hypertension and metabolic disorders as diabetes mellitus, obesity and acromegaly? / A. Clerico, O. Giampietro // Clinical Physiology and Biochemistry. - 1990. - Vol. 8, N 3. - P. 153-168.

26. Chen, S. Role of digitalis-like substance in the hypertension of streptozotocin-induced diabetes in reduced renal mass rats / S. Chen, C. Yuan, D. Clough, J. Schooley, F.J. Haddy, M.B. Pamnani // American Journal of Hypertension. - 1993. - Vol. 6, N5. - P. 397- 406.

27. Straub, R.H. Atrial natriuretic factor and digoxin-like immunoreactive factor in diabetic patients: their interrelation and the influence of the autonomic nervous system /

R.H. Straub, C. Hall, B.K. Krämer, R. Elbracht, K.D. Palitzsch, B. Lang, J. Schölmerich // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. - 1996. - Vol. 81, N. 9. - P. 3385-3389.

28. Zhang, Y. A monoclonal antibody to marinobufagenin reverses cardiovascular remodeling and reduces expression of genes participating in TGF-beta profibrotic signaling in Dahl salt-sensitive hypertension / Y. Zhang, V. Shilova, V. Zernetkina, R. McPherson, W. Wei, C.A. Marshall, N. Petrashevskaya, E. Lehrmann, K.G. Becker, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov, O.V. Fedorova // *Hypertension* (Under review).

29. Hong, S.W. Increased glomerular and tubular expression of transforming growth factor-beta1, its type II receptor, and activation of the Smad signaling pathway in the db/db mouse // S.W. Hong, M. Isono, S. Chen, M.C. Iglesias-De La Cruz, D.C. Han, F.N. Ziyadeh // *American Journal of Pathology*. - 2001. - Vol.158, N 5. - P. 1653-1663.

30. Sharma, K. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice / K. Sharma, Y. Jin, J. Guo, F.N. Ziyadeh // *Diabetes*. - 1996. - Vol. 45, N 4. - P. 522-530.

31. Isono, M. Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells / M. Isono, S. Chen, S.W. Hong, M.C. Iglesias-de la Cruz, F.N. Ziyadeh // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2002. - Vol. 296, N 5. - P. 1356-1365.

32. Haller, S.T. Monoclonal antibody against marinobufagenin reverses cardiac fibrosis in rats with chronic renal failure / S.T. Haller, D.J. Kennedy, A. Shidyak, G.V. Budny, D. Malhotra, O.V. Fedorova, J.I. Shapiro, A.Y. Bagrov // *American Journal of Hypertension*. - 2012. - Vol.25 N 6. - P. 690 - 696.

33. Finotti, P. Canrenone as a partial agonist at the digitalis receptor site of sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase / P. Finotti, P. Palatini // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. - 1981. - Vol. 217, N 3. - P. 784-790.

34. Bagrov, A.Y. Endogenous cardiogenic steroids and differential patterns of sodium pump inhibition in NaCl-loaded salt-sensitive and normotensive rats / A.Y. Bagrov, N.I. Agalakova, V.A. Kashkin, O.V. Fedorova // *American Journal of Hypertension*. - 2009. - Vol. 22. - P. 559–563.
35. Blanco, G. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function / G. Bianco, R.W. Mercer // *American Journal of Physiology*. - 1988. - Vol. 275. - P. 633–650.
36. Sutton-Tyrrell, K. Elevated aortic pulse wave velocity, a marker of arterial stiffness, predicts cardiovascular events in well-functioning older adults / K. Sutton-Tyrrell, S.S. Najjar, R.M. Boudreau, L. Venkitachalam, V. Kupelian, E.M. Simonsick // *Circulation*. - 2005. - Vol. 111. - P. 3384–3390.
37. Mitchell, G.F. Pulse pressure and risk of new-onset atrial fibrillation / G.F. Mitchell, R.S. Vasan, M.J. Keyes, H. Parise, T.J. Wang, M.G. Larson // *JAMA*. - 2007. - Vol. 297. - P. 709–715.
38. Ziemann, S.J. Mechanisms, pathophysiology, and therapy of arterial stiffness / S.J. Ziemann, V. Melenovsky, D.A. Kass // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. - 2005. - Vol. 25. - P. 932–943.
39. Collins, A.J. Chronic kidney disease and cardiovascular disease in the medicare population / A.J. Collins, S. Li, D.T. Gilbertson, J. Liu, S.C. Chen, C.A. Herzog // *Kidney International Supplement*. - 2003. - Vol. 87. P. 24–31.
40. Scuteri, A. Metabolic syndrome amplifies the age-associated increases in vascular thickness and stiffness / A. Scuteri, S.S. Najjar, D.C. Muller, R. Andres, H. Hougaku, E.J. Metter // *Journal of the American College Cardiology*. - 2004. - Vol. 43. - P. 1388–1395.
41. Dart, A.M. Pulse pressure — a review of mechanisms and clinical relevance / A.M. Dart, B.A. Kingwell // *Journal of the American College Cardiology*. - 2001. - Vol. 37. - P. 975–984.

42. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease / E.G. Lakatta, D. Levy // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107. - P. 346–354.
43. Gkaliagkousi, E. The pathogenesis of arterial stiffness and its prognostic value in essential hypertension and cardiovascular diseases / E. Gkaliagkousi, S. Douma // *Hippokratia*. – 2009. – Vol. 13. – P. 70–75.
44. Mitchell, G.F. Effects of central arterial aging on the structure and function of the peripheral vasculature: implications for end-organ damage / G.F. Mitchell // *Journal of Applied Physiology*. – 2008. – Vol. 105. – P. 1652–1660.
45. Galis, Z.S. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly / Z.S. Galis, J.J. Khatri // *Circulation Research*. – 2002. – Vol. 90. – P. 251–262.
46. Beattie, D. Mechanical analysis of heterogeneous, atherosclerotic human aorta / D. Beattie, C. Xu, R. Vito, S. Glagov, M.C. Whang // *Journal of Biomechanical Engineering*. – 1998. – Vol. 120. – P. 602.
47. Bassiouny, H.S. Hemodynamic stress and experimental aortoiliac atherosclerosis / H.S. Bassiouny, C.K. Zarins, M.H. Kadowaki, S. Glagov // *Journal of Vascular Surgery*. – 1994. – Vol. 19. – P. 426–434.
48. Johnson, C.P. Age related changes in the tunica media of the vertebral artery: implications for the assessment of vessels injured by trauma / C.P. Johnson, R. Baugh, C.A. Wilson, J. Burns // *Journal of Clinical Pathology*. – 2001. – Vol. 54. – P. 139–145.
49. Xu, C. Hypercholesterolemia superimposed by experimental hypertension induces differential distribution of collagen and elastin / C. Xu, C.K. Zarins, P.S. Pannaraj, H.S. Bassiouny, S. Glagov // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2000. – Vol. 20. – P. 2566–2572.

50. Nagai, Y. Increased carotid artery intimal-medial thickness: risk factor for exercise-induced myocardial ischemia in asymptomatic older individuals / Y. Nagai, E.J. Metter, J.L. Fleg - *Vascular Medicine*. – 1999. – Vol. 4. – P. 181–186.
51. O’Leary, D.H. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults / D.H. O’Leary, J.F. Polak, R.A. Kronmal, T.A. Manolio, G.L. Burke, S.K. Wolfson Jr // *New England Journal of Medicine*. – 1999. – Vol. 340. - P. 14–22.
52. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardio-vascular disease enterprises: Part III: cellular and molecular clues to heart and arterial aging / E.G. Lakatta // *Circulation*. – 2003. – Vol. 107. – P. 490–497.
53. Watanabe, M. Age-related alteration of cross-linking amino acids of elastin in human aorta / M. Watanabe, T. Sawai, H. Nagura, K. Suyama // *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. – 1996. – Vol. 180. – P. 115–130.
54. Lakatta, E.G. Cardiovascular regulatory mechanisms in advanced age / E.G. Lakatta // *Physiological Reviews*. – 1993. – Vol. 73. – P. 413–467.
55. Lee, A.T. Role of glycation in aging / A.T. Lee, A. Cerami // *Annals of the New York Academy of Science*. – 1992. – Vol. 663. – P. 63–70.
56. Bailey, A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues / A.J. Bailey // *Mechanism of Ageing and Development*. – 2001. – Vol. 122. – P. 735–755.
57. Verzijl, N. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products / N. Verzijl, J. DeGroot, S.R. Thorpe, R.A. Bank, J.N. Shaw, T.J. Lyons // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275. – P. 39027–39031.
58. Winlove, C.P. Interactions of elastin and aorta with sugars *in vitro* and their effects on biochemical and physical properties / C.P. Winlove, K.H. Parker, N.C. Avery, A.J. Bailey // *Diabetologia*. – 1996. – Vol. 39. – P. 1131–1139.



59. Konova, E. Age-related changes in the glycation of human aortic elastin / E. Konova, S.S. Baydanoff, M. Atanasova, A. Velkova // *Experimental Gerontology*. – 2004. – Vol.39. – P. 249–254.
60. Rojas, A. Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products / A. Rojas, S. Romay, D. Gonzalez, B. Herrera, R. Delgado, K. Otero // *Circulation Research*. – 2000. – Vol. 86. – P. 50–54.
61. Yan, S.D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins / S.D. Yan, A.M. Schmidt, G.M. Anderson, J. Zhang, J. Brett, Y.S. Zou // *Journal of Biological Chemistry*. – 1994. – Vol. 269. – P. 9889–9897.
62. Throckmorton, D.C. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products / D.C. Throckmorton, A.P. Brogden, B. Min, H. Rasmussen, M. Kashgarian // *Kidney International*. – 1995. – Vol. 48. – P. 111–117.
- 63 Kuzuya, M. Glycation cross-links inhibit matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells cultured on collagen lattice / M. Kuzuya, T. Asai, S. Kanda, K. Maeda, X. W. Cheng, A. Iguchi // *Diabetologia*. – 2001. – Vol. 44. – P. 433–446.
64. Wendt, T. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and vascular inflammation: insights into the pathogenesis of macrovascular complications in diabetes / T. Wendt, L. Bucciarelli, W. Qu, Y. Lu, S.F. Yan, D.M. Stern // *Current Atherosclerosis Reports*. – 2002. – Vol. 4. – P. 228–237.
65. Stern, D.M. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes / D.M. Stern, S.D. Yan, S.F. Yan, A.M. Schmidt // *Ageing Research Reviews*. – 2002. – Vol. 1. – Vol.1–15.
66. Schmidt, A.M. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection / A.M. Schmidt, D. Stern // *Current Atherosclerosis Report*. – 2000. – Vol. 2. – P. 430–436.

67. Taddei, S. Aging and endothelial function in normotensive subjects and patients with essential hypertension / A. Viridis, P. Mattei, L. Ghiadoni, A. Gennari, C.B. Fasolo // *Circulation*. – 1995. – Vol. 91. – P. 1981–1987.
68. Peng, X. Wall stiffness suppresses Akt/eNOS and cytoprotection in pulse-perfused endothelium / X. Peng, S. Haldar, S. Deshpande, K. Irani, D.A. Kass // *Hypertension*. – 2003. – Vol. 41. – P. 378–381.
69. Dzau, V.J. Significance of the vascular renin-angiotensin pathway / V.J. Dzau // *Hypertension*. – 1986. – Vol. 8. – P. 553–559.
70. Lacolley, P. Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone / P. Lacolley, C. Labat, A. Pujol, C. Delcayre, A. Benetos, M. Safar // *Circulation*. – 2002. – Vol. 106. – P. 2848–2853.
71. Blacher, J. Association between increased plasma levels of aldosterone and decreased systemic arterial compliance in subjects with essential hypertension / J. Blacher, G. Amah, X. Girerd, A. Kheder, H. Ben Mais, G.M. London // *American Journal of Hypertension*. – 1997. – Vol. 10. – P. 1326–1334.
72. Bagrov, A.Y. The dietary sodium-blood pressure plot "stiffens" / A.Y. Bagrov, E.G. Lakatta // *Hypertension*. – 2004. – Vol. 44. – P. 22–24.
73. Gu, J.W. Sodium induces hypertrophy of cultured myocardial myoblasts and vascular smooth muscle cells / J.W. Gu, V. Anand, E.W. Shek, M.C. Moore, A.L. Brady, W.C. Kelly // *Hypertension*. – 1998. – Vol. 31. – P. 1083–1087.
74. Pojoga, L. Genetic determination of plasma aldosterone levels in essential hypertension / L. Pojoga, S. Gautier, H. Blanc, T.T. Guyene, O. Poirier, F. Cambien // *American Journal of Hypertension*. – 1998. – Vol. 11. – P. 856–860.
75. Benetos, A. Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitrendipine on arterial stiffness in hypertensive

individuals / A. Benetos, F. Cambien, S. Gautier, S. Ricard, M. Safar, S. Laurent // *Hypertension*. – 1996. – Vol. 28. – P. 1081–1084.

76. Benetos, A. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients / A. Benetos, S. Gautier, S. Ricard, J. Topouchian, R. Asmar, O. Poirier // *Circulation*. – 1996. – Vol. 94. – P. 698–703.

77. Lacolley, P. Nitric oxide synthase gene polymorphisms, blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects / P. Lacolley, S. Gautier, O. Poirier, B. Pannier, F. Cambien, A. Benetos // *Journal of Hypertension*. – 1998. – Vol. 16. – P. 31–35.

78. Tounian, P. Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study / P. Tounian, Y. Aggoun, B. Dubern, V. Varille, B. Guy-Grand, D. Sidi // *Lancet*. – 2001. – Vol. 358. – P. 1400–1404.

79. Jesmin, S. Role of angiotensin II in altered expression of molecules responsible for coronary matrix remodeling in insulin-resistant diabetic rats / S. Jesmin, I. Sakuma, Y. Hattori, A. Kitabatake // *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology*. – 2003. – Vol. 23. – P. 2021–2026.

80. Nickenig, G. sulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms / G. Nickenig, J. Roling, K. Strehlow, P. Schnabel, M. Bohm // *Circulation*. – 1998. – Vol. 98. – P. 2453–2460.

81. Steinberg, H.O. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation / H.O. Steinberg, M. Tarshoby, R. Monestel, G. Hook, J. Cronin, A. Johnson // *Journal of Clinical Investigation*. – 1997. – Vol. 100. – P. 1230–1239.

82. Matsuzawa, Y. Adiponectin and metabolic syndrome / Y. Matsuzawa, T. Funahashi, S. Kihara, I. Shimomura // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2004. – Vol. 24. – P. 29–33.
83. Wang, T.J. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels / T.J. Wang, M.G. Larson, D. Levy, E.J. Benjamin, E.P. Leip, P.W. Wilson // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109. – P. 594–600.
84. Levy, D. Evidence for a gene influencing blood pressure on chromosome 17. Genome scan linkage results for longitudinal blood pressure phenotypes in subjects from the framingham heart study / D. Levy, A.L. DeStefano, M.G. Larson, C.J. O'Donnell, R.P. Lifton, H. Gavras // *Hypertension*. – 2000. – Vol. 364. – P. 77–83.
85. Xu, X. Mapping of a blood pressure quantitative trait locus to chromosome 15q in a Chinese population / X. Xu, J. Yang, J. Rogus, C. Chen, N. Schork // *Human Molecular Genetics*. – 1999. – Vol. 8. – P. 2551–2255.
86. Atwood, L.D. Genome-wide linkage analysis of blood pressure in Mexican Americans / L.D. Atwood, P.B. Samollow, J.E. Hixson, M.P. Stern, J.W. MacCluer // *Genetic Epidemiology*. – 2001. – Vol. 20. – P. 373–382.
87. Camp, N.J. Genome-wide multipoint parametric linkage analysis of pulse pressure in large, extended Utah pedigrees / N.J. Camp, P.N. Hopkins, S.J. Hasstedt, H. Coon, A. Malhotra, R.M. Cawthon // *Hypertension*. – 2003. – Vol. 42. – P. 322–328.
88. Cambien, F. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction / F. Cambien, O. Costerousse, L. Tiret, O. Poirier, L. Lecerf, M.F. Gonzales // *Circulation*. – 1994. – Vol. 90. – P. 669–676.
89. Lajemi, M. Endothelin gene variants and aortic and cardiac structure in never-treated hypertensives / M. Lajemi, S. Gautier, O. Poirier, J.P. Baguet, A. Mimran, P. Gosse // *American Journal of Hypertension*. – 2001. – Vol. 14. – P. 755–760.
- 90 Brull, D.J. Effect of a COL1A1 Sp1 binding site polymorphism on arterial pulse wave velocity: an index of compliance / D.J. Brull, L.J. Murray, C.A. Boreham, S.H.

Ralston, H.E. Montgomery, A.M. Gallagher // *Hypertension*. – 2001. – Vol. 38. – P. 444–448.

91. Schut, A.F. Polymorphism in the promoter region of the insulin-like growth factor I gene is related to carotid intima-media thickness and aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension / A.F. Schut, J.A. Janssen, J. Deinum, J.M. Vergeer, A. Hofman, S.W. Lamberts [et al.] // *Stroke*. – 2003. – Vol. 34. – P. 1623–1627.

92. Folkow, B. Physiological aspects of primary hypertension / B. Folkow // *Physiological Reviews*. - 1992. - Vol. 62. - P. 347–504.

93. DeWardener, H.E. Concept of natriuretic hormone / H.E. DeWardener, E.M. Clarkson // *Physiological Reviews*. - 1985. - Vol. 65. - P. 658–759.

94. Dahl, L.K. Humoral transmission of hypertension: Evidence from parabiosis / K.D. Knudsen, J. Iwai // *Circulation Research*. - 1969. - Vol. 24. - P. 21–33.

95. Katz, A.L. Renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase: its role in tubular sodium and potassium transport / A.L. Katz // *American Journal of Physiology*. - 1982. - Vol. 242, N 3. - P. 207-219.

96. Blaustein, M.P. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: A reassessment and a hypothesis / M.P. Blaustein // *American Journal Physiology*. - 1977. - Vol. 232. - P. 167 – 173.

97. Lichtstein, D. Identification of digitalis-like compounds in human cataractous lenses / D. Lichtstein, I. Gati, S. Samuelov, D. Berson, Y. Rosenman, L. Landau, J. Deutsch // *European Journal of Biochemistry*. - 1993. - Vol. 216. - P. 261–268.

98. Hilton, P.J. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta / P.J. Hilton, R.W. White, G.A. Lord, G.V. Garner, D.B. Gordon, M.J. Hilton, L.G. Forni, W. McKinnon, F.M. Ismail, M. Keenan, K. Jones, W.E. Morden // *Lancet*. - 1996. - Vol. 348. - P. 303–305.

99. Fedorova, O.V. Endogenous cardenolide and bufadienolides  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibitors. How they work together in NaCl-sensitive hypertension / O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // *Frontiers in Bioscience*. - 2005. - Vol.10. - P. 2250–2256.
100. Bagrov, A.Y. Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive substance. A possible endogenous Na, K-ATPase inhibitor with vasoconstrictor activity / A.Y. Bagrov, R.I. Dmitrieva, O.V. Fedorova, G.P. Kazakov, N.I. Roukoyatkina, V.M. Shpen // *American Journal of Hypertension*. - 1996. - Vol. 9.- P. 982–990.
101. Fedorova, O.V. Inhibition of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms / O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // *American Journal of Hypertension*. - 1997. - Vol.10. - P. 929–935.
102. Hillyard, S.D. Further characterization of the natriuretic factor derived from kidney tissue of volume-expanded rats. Effects on short-circuit current and sodium-potassium-adenosine triphosphatase activity / S.D. Hillyard, E. Lu, H.C. Gonick // *Circulation Reserach*. - 1976. - Vol. 38. - P. 250–255.
103. Periyasamy, S.M. Salt loading induces redistribution of the plasmalemmal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in proximal tubule cells / S.M. Periyasamy, J. Liu, F. Tanta, B. Kabak, B. Wakefield, D. Malhotra, D.J. Kennedy, A. Nadoor, O.V. Fedorova, W. Gunning, Z. Xie, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *Kidney International*. - 2005. - Vol. 67. - P. 1868–1877.
104. Fedorova, O.V. Marinobufagenin, an endogenous alpha-1 sodium pump ligand, in hypertensive Dahl salt-sensitive rats / O.V. Fedorova, N.I. Kolodkin, N.I. Agalakova, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Hypertension*. - 2001. - Vol. 37. - P. 462–466.
105. Fedorova, O.V. Brain ouabain stimulates peripheral marinobufagenin via angiotensin II signalling in NaCl loaded Dahl-S rats / O.V. Fedorova, N.I. Agalakova, M.I. Talan, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. - 2005. - Vol. 23. - P. 1515–1523.

106. Fedorova, O.V. Differential effects of acute NaCl loading on endogenous ouabain-like and marinobufagenin-like ligands of the sodium pump in Dahl hypertensive rats / O.V. Fedorova, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Circulation*. - 2000. - Vol.102. - P. 3009–3014.
107. Fedorova, O.V. ANP differentially modulates marinobufagenin-induced sodium pump inhibition in kidney and aorta / O.V. Fedorova, N.I. Agalakova, C.H. Morrell, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Hypertension*. - 2006. - Vol. 48. - P. 1160–1168.
108. Liu, J. Ouabain-induced endocytosis of the plasmalemmal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in LLC-PK1 cells requires caveolin-1 / J. Liu, M. Liang, L. Liu, D. Malhotra, Z. Xie, J.I. Shapiro // *Kidney International*. - 2005. - Vol. 67. - P. 1844–1854.
109. Liu, J. Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism / J. Liu, R. Kesiry, S.M. Periyasamy, D. Malhotra, Z. Xie, J.I. Shapiro // *Kidney International*. - 2004. - Vol. 66. - P. 227–241.
110. Oweis, S. Cardiac glycoside downregulates NHE3 activity and expression in LLC-PK1 cells / S. Oweis, L. Wu, P.R. Kiela, H. Zhao, D. Malhotra, F.K. Ghishan, Z. Xie, J.I. Shapiro, J. Liu // *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. - 2006. - Vol. 290. - P. 997–1008.
111. Liu, J. Regulation of sodium pump endocytosis by cardiotonic steroids: Molecular mechanisms and physiological implications / J. Liu, J.I. Shapiro // *Pathophysiology*. - 2007. - Vol.14. - P. 171–181.
112. Hamlyn, J.M. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma / J.M. Hamlyn, M.P. Blaustein, S. Bova, D.W. DuCharme, D.W. Harris, F. Mandel, W.R. Mathews, J.H. Ludens // *Proceedings of the National Academy of Science*. - 1991. - Vol.88. - P. 6259–6563.
113. Schneider, R. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump / R. Schneider, V. Wray, M. Nimtz, W.D. Lehmann, U. Kirch, R.

Antolovic, W. Schoner // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1998. - Vol. 273. - P. 784–792.

114. Komiyama, Y. Identification of endogenous ouabain in culture supernatant of PC12 cells / Y. Komiyama, N. Nishimura, M. Munakata, T. Mori, K. Okuda, N. Nishino, S. Hirose, C. Kosaka, M. Masuda, H. Takahashi // *Journal of Hypertension*. - 2001. - Vol. 19. - P. 229-236.

115. el-Masri, M.A. Human adrenal cells in culture produce both ouabain-like and dihydroouabain-like factors / M.A. el-Masri, B.J. Clark, H.M. Qazzaz, R. Valdes Jr // *Clinical Chemistry*. - 2012. - Vol. 48. - P. 1720-1730.

116. Murrell, J.R. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal / J.R. Murrell, J.D. Randall, J. Rosoff, J.L. Zhao, R.V. Jensen, S.R. Gullans, G.T. Haupt Jr // *Circulation*. - 2005. - Vol. 112. - P. 1301-1308.

117. Manunta, P. Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension / P. Manunta, E. Messaggio, C. Ballabeni, M.T. Sciarrone, C. Lanzani, M. Ferrandi, J.M. Hamlyn, D. Cusi, F. Galletti, G. Bianchi // *Hypertension*. - 2001. - Vol. 38. - P. 198–203.

118. Iwai, J. Genetic influence on the development of renal hypertension in parabiotic rats. Evidence for a humoral factor / J. Iwai, K.D. Knudsen, L.K. Dahl, M. Heine, G. Leitl // *The Journal of Experimental Medicine*. - 1969. - Vol. 129. - P. 507–522.

119. Anderson, D.E. Endogenous sodium pump inhibitors and age-associated increases in salt sensitivity of blood pressure in normotensives / D.E. Anderson, O.V. Fedorova, C.H. Morrell, D.L. Longo, V.A. Kashkin, J.D. Metzler, A.Y. Bagrov, E.G. Lakatta // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2008. - Vol. 294. - P. 1248–1254.

120. Fedorova, O.V. Intrahippocampal microinjection of an exquisitely low dose of ouabain mimics NaCl loading and stimulates a bufadienolide Na/K-ATPase inhibitor



O.V. Fedorova, I.A. Zhuravin, N.I. Agalakova, L.A. Yamova, M.I. Talan, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. - 2007. - Vol. 25. - P. 1834–1844.

121. Takahashi, H. Brain renin-angiotensin system and the hypothalamic, digitalis-like  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibitor in rats / H. Takahashi, M. Matsusawa, I. Ikegaki, M. Nishimura, M. Yoshimura, H. Yamada, Y. Sano // *Clinical and Experimental Hypertension*. - 1988. - Vol. 10. - P. 1285–1287.

122. Leenen, F.H.H. The brain and salt-sensitive hypertension / F.H.H. Leenen, M. Ruzicka, B.S. Huang // *Current Hypertension Report*. - 2002. - Vol. 4. - P. 129–135.

123. Huang, B.S. Increases in CSF  $[\text{Na}^+]$  precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet / B.S. Huang, B.N. Van Vliet, F.H. Leenen // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. - 2004. - Vol. 287. - P. 1160–1166.

124. Wang, H. Brain sodium channels and central sodium-induced increases in brain ouabain-like compound and blood pressure / H. Wang, F.H. Leenen // *Journal of Hypertension*. - 2003. - Vol. 21. - P. 1519–1524.

125. Amin, M.S. Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain / M.S. Amin, H.W. Wang, E. Reza, S.C. Whitman, B.S. Tuana, F.H. Leenen // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2005. - Vol. 289. - P. 1787–1797.

126. Gabor, A. Mechanisms in the PVN mediating local and central sodium-induced hypertension in Wistar rats / A. Gabor, F.H. Leenen // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2009. - Vol. 296. - P. 618–630.

127. Orlov, S.N. Salt-sensing mechanisms in blood pressure regulation and hypertension / S.N. Orlov, A.A. Mongin // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2007. - Vol. 293. - P. 2039–2053.

128. Amin, M.S. Sodium transport in the choroid plexus and salt-sensitive hypertension / M.S. Amin, E. Reza, H. Wang, F.H. Leenen // *Hypertension*. - 2009. - Vol. 54. - P. 860–867.
129. Orosz, D.E. Pathophysiological consequences of changes in the coupling ration of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase for renal sodium reabsorption and its implications for hypertension / D.E. Orosz, U. Hopfer // *Hypertension*. - 1996. - Vol. 27. - P. 219–227.
130. Briones, A.M. Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats / A.M. Briones, F.E. Xavier, S.M. Arribas, M.C. Gonzalez, L.V. Rossoni, M.J. Alonso, M. Salaices // *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 2006. - Vol. 291. - P. 193–201.
131. Dostanic-Larson, I. Physiological role of the  $\alpha 1$ - and  $\alpha 2$ -isoforms of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and biological significance of their cardiac glycoside binding site / I. Dostanic-Larson, J.N. Lorenz, J.W. Van Huysse, J.C. Neumann, A.E. Moseley, J.B. Lingrel // *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. - 2006. - Vol. 290. - P. 524–528.
132. Hamlyn, J.M. Ouabain, digitalis-like factors and hypertension / J.M. Hamlyn, P. Manunta // *Journal of Hypertension Supplement*. - 1992. - Vol. 10. - P. 99–111.
133. Bianchi, G. Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation / G. Bianchi, G. Tripodi, G. Casari, S. Salardi, B.R. Barber, R. Garcia, P. Leoni, L. Torielli, D. Cusi, M. Ferrandi // *Proceedings of the National Academy of Science*. - 1994. - Vol. 26. - P. 3999–4003.
134. Ferrandi, M. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238 / M. Ferrandi, I. Molinari, P. Barassi, E. Minotti, G. Bianchi, P. Ferrari // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2004. - Vol. 279. - P. 33306–33314.
135. Efendiev, R. Hypertension-linked mutation in the adducin alpha-subunit leads to higher AP2-mu2 phosphorylation and impaired  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase trafficking in response

to GPCR signals and intracellular sodium / R. Efendiev, R.T. Krmar, G. Ogimoto, J. Zwiller, G. Tripodi, A.I. Katz, G. Bianchi, C.H. Pedemonte, A.M. Bertorello // *Circulation Research*. - 1994. - Vol. 95. - P. 1100–1108.

136. Torielli, L. alpha-Adducin mutations increase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump activity in renal cells by affecting constitutive endocytosis: implications for tubular Na<sup>+</sup> reabsorption / L. Torielli, S. Tivodar, R.C. Montella, R. Iacone, G. Padoani, P. Tarsini, O. Russo, D. Sarnataro, P. Strazzullo, P. Ferrari, G. Bianchi, C. Zurzolo // *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. - 2008. - Vol. 295. - P. 478–487.

137. Ferrari, P. PST 2238: a new antihypertensive compound that modulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in genetic hypertension / P. Ferrari, M. Ferrandi, G. Tripodi, L. Torielli, G. Padoani, E. Minotti, P. Melloni, G.J. Bianchi // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic*. - 1999. - Vol. 288. - P. 1074–1083.

138. Wang, J.G. Salt, endogenous ouabain and blood pressure interactions in the general population / J.G. Wang, J.A. Staessen, E. Messaggio, T. Nawrot, R. Fagard, J.M. Hamlyn, G. Bianchi, P. Manunta // *Journal of Hypertension*. - 2003. - Vol. 21. - P. 1475–1481.

139. Manunta, P. Relationships among endogenous ouabain, alpha-adducin polymorphisms and renal sodium handling in primary hypertension / P. Manunta, M. Maillard, C. Tantardini, M. Simonini, C. Lanzani, L. Citterio, P. Stella, N. Casamassima, M. Burnier, J.M. Hamlyn // *Journal of Hypertension*. - 2008. - Vol. 26. - P. 914–920.

140. Zhang, J. Sodium pump alpha2 subunits control myogenic tone and blood pressure in mice / J. Zhang, M.Y. Lee, M. Cavalli, L. Chen, R. Berra-Romani, C.W. Balke, G. Bianchi, P. Ferrari, J.M. Hamlyn, T. Iwamoto // *The Journal of Physiology*. - 2005. - Vol. 569. - P. 243–256.

141. Dostanic-Larson, I. The highly conserved cardiac glycoside binding site of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase plays a role in blood pressure regulation / I. Dostanic-Larson, J.W. Van

Huysse, J.N. Lorenz, J.B. Lingrel // Proceedings of the National Academy of Science. - 2005. - Vol. 102. - P. 15845–15850.

142. Bagrov, A.Y. Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets / A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, O.V. Fedorova // Pharmacological Reviews. - 2009. - Vol. 61. - P. 9–38.

143. Bagrov, A.Y. Plasma marinobufagenin-like and ouabain-like immunoreactivity during saline volume expansion in anesthetized dogs / A.Y. Bagrov, O.V. Fedorova, R.I. Dmitrieva, A.W. French, D.E. Anderson // Cardiovascular Research. - 1996. - Vol. 31. - P. 296–305.

144. Fedorova, O.V. Endogenous marinobufagenin-like factor in acute plasma volume expansion / O.V. Fedorova, P.A. Doris, A.Y. Bagrov // Clinical and Experimental Hypertension. - 1998. - Vol. 20. - P. 581–591.

145. Fedorova, O.V. Interaction of high sodium chloride intake and psychosocial stress on endogenous ligands of the sodium pump and blood pressure in normotensive rats / O.V. Fedorova, D.E. Anderson, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // American Journal of Physiology. - 2001. - Vol. 281. - P. 352–358.

146. Gonick, H.C. Simultaneous measurement of marinobufagenin, ouabain and hypertension-associated protein in various disease state / H.C. Gonick, Y. Ding, N.D. Vaziri, A.Y. Bagrov, O.V. Fedorova // Clinical and Experimental Hypertension. - 1998. - Vol. 20. - P. 617–627.

147. Fridman, A.I. Marinobufagenin, an endogenous ligand of  $\alpha$ -1 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, is a marker of congestive heart failure severity / A.I. Fridman, S.A. Matveev, N.I. Agalakova, O.V. Fedorova, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // Journal of Hypertension. - 2002. - Vol. 20. - P. 1189–1194.

148. Lopatin, D.A. Circulating bufodienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia / D.A. Lopatin, E.K. Ailamazian, R.I. Dmitrieva, V.M. Shpen, O.V.

Fedorova, P.A. Doris, A.Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. - 1999. - Vol. 17. - P. 1179–1187.

149. Fedorova, O.V. Interaction of Digibind with endogenous cardiotonic steroids from preeclamptic placentae / O.V. Fedorova, N.I. Tapilskaya, A.M. Bzhelyansky, E.V. Frolova, E.R. Nikitina, V.A. Reznik, V.A. Kashkin, A.Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. - 2010. - Vol. 28. - P. 361–366.

150. Fedorova, O.V. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase inhibition in lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension / O.V. Fedorova, A.S. Simbirtsev, N.I. Kolodkin, A.Y. Kotov, N.I. Agalakova, V.A. Kashkin, N.I. Tapilskaya, A.M. Bzhelyansky, V.A. Reznik, E.R. Nikitina, E.V. Frolova, G.V. Budny, D.L. Longo, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. - 2008. - Vol. 26. - P. 2414–2425.

151. Komiyama, Y. A novel endogenous digitalis, telocinobufagin, exhibits elevated plasma levels in patients with terminal renal failure / Y. Komiyama, X.H. Dong, N. Nishimura, H. Masaki, M. Yoshika, M. Masuda, H. Takahashi // *Clinical Biochemistry*. - 2005. - Vol. 38. - P. 36–45.

152. Yoshika, M. Novel digitalis-like factor, marinobufotoxin, isolated from cultured Y-1 cells, and its hypertensive effect in rats / M. Yoshika, Y. Komiyama, M. Konishi, T. Akizawa, T. Kobayashi, M. Date, S. Kobatake, M. Masuda, H. Masaki, H. Takahashi // *Hypertension*. - 2007. - Vol. 49. - P. 209–214.

153. Doris, P.A. Immunological evidence that the adrenal gland is a source of an endogenous digitalis-like factor / P.A. Doris // *Endocrinology*. - 1988. - Vol. 123, N 5. - P. 2440-2444.

154. Elkareh, J. Marinobufagenin stimulates fibroblast collagen production and causes fibrosis in experimental uremic cardiomyopathy / J. Elkareh, D.J. Kennedy, B. Yashaswi, S. Vetteth, A. Shidyak, E.G. Kim, S. Smaili, S.M. Periyasamy, I.M. Hariri,

L. Fedorova, J. Liu, L. Wu, M.B. Kahaleh, Z. Xie, D. Malhotra, O.V. Fedorova, V.A. Kashkin, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *Hypertension*. - 2007. - Vol. 49. - P. 215–224.

155. Flier, J.S. Endogenous digitalis-like activity in the plasma of the toad *Bufo marinus* / J.S. Flier, E. Maratos-Flier, J.A. Pallota, D. McIsaac // *Nature*. - 1979. - Vol. 279. - P. 341–343.

156. Siperstein, M.D. Biosynthesis of cardiotonic sterols from cholesterol in the toad, *Bufo marinus* / M.D. Siperstein, A.W. Murray, E. Titus // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 1957. - Vol. 67. - P. 154-160.

157. Siperstein, M.D. Biosynthesis of cardiotonic sterols from cholesterol in the toad, *Bufo marinus* / M.D. Siperstein, A.W. Murray, E. Titus // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 1957. - Vol. 67. - P. 154-160.

158. Payne, A.H. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones / A.H. Payne, D.B. Hales // *Endocrine Reviews*. - 2004. - Vol. 25, N 6. - P. 947-970.

159. Murrell, J.R. Endogenous ouabain: upregulation of steroidogenic genes in hypertensive hypothalamus but not adrenal / J.R. Murrell, J.D. Randall, J. Rosoff, J.L. Zhao, R.V. Jensen, S.R. Gullans, G.T. Haupt Jr // *Circulation*. - 2005. - Vol. 112, N 9. - P. 1301-1318.

160. Dmitrieva, R.I. Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway, which is independent of cholesterol side-chain cleavage / R.I. Dmitrieva, A.Y. Bagrov, E. Lalli, P. Sassone-Corsi, D.M. Stocco, P.A. Doris // *Hypertension*. - 2000. - Vol. 36. - P. 442-448.

161. Javitt, N.B. Bile acid synthesis from cholesterol: regulatory and auxiliary pathways / N.B. Javitt // *FASEB Journal*. - 1994. - Vol. 8. - P. 1308-1311.

162. Pikuleva, I.A. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis / I.A. Pikuleva // *Pharmacology and Therapeutics*. - 2006. - Vol. 112 N 3. - P. 761-773.

163. Li, J. De novo synthesis of steroids and oxysterols in adipocytes / J. Li, E. Daly, E. Campioli, M. Wabitsch, V. Papadopoulos // *Journal of Biological Chemistry*. - 2014. - Vol. 289, N 2. - P. 747-764.
164. Nelson, E.R. 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology / E.R. Nelson, S.E. Wardell, J.S. Jasper, S. Park, S. Suchindran, M.K. Howe, N.J. Carver, R.V. Pillai, P.M. Sullivan, V. Sondhi, M. Umetani, J. Geradts, D.P. McDonnell // *Science*. - 2013. - Vol. 342. - P. 1094-1098.
165. Uno, Y. Identification and analysis of CYP7A1, CYP17A1, CYP20A1 and CYP51A1 in *Cynomolgus* Macaques / Y. Uno, S. Hosaka, H. Yamazaki // *The Journal of Veterinary Medical Science*. - 2014. - Vol. 76, N 12. - P. 1647-1650.
166. Fedorova, O.V. Synthesis of an endogenous steroidal Na pump- inhibitor marinobufagenin, implicated in human cardiovascular diseases, is initiated by CYP27A1 via bile acid pathway / O.V. Fedorova, V.Z. Zernetkina, V.Y. Shilova, Y.N. Grigorova, O. Juhasz, W. Wei, C.A. Marshall, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. - 2015. - Vol. 8. - P. 736-745.
167. Wang, H. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase / H. Wang, M. Haas, M. Liang, T. Cai, J. Tian, S. Li, Z. Xie // *Journal of Biological Chemistry*. - 2004. - Vol. 279. - P. 17250-17529.
168. Liang, M. Identification of a pool of non-pumping Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase / M. Liang, J. Tian, L. Liu, S. Pierre, J. Liu, J.I. Shapiro, Z.J. Xie // *Journal of Biological Chemistry*. - 2007. - Vol. 282. - P. 10585-10593.
169. Kometiani, P. Multiple signal transduction pathways link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases / P. Kometiani, J. Li, L. Gnudi, B.B. Kahn, A. Askari, Z. Xie // *Journal of Biological Chemistry*. - 1998. - Vol. 273. - P. 15249-15256.
170. Liu, J. Ouabain interaction with cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> concentrations / J. Liu, J. Tian, M.

Haas, J.I. Shapiro, A. Askari, Z. Xie. // *Journal of Biological Chemistry*. - 2000. - Vol. 275. - P. 27838-27844.

171. Tian, J. Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial  $K^+$ (ATP) channels / J. Tian, J. Liu, K.D. Garlid, J.I. Shapiro, Z. Xie // *Molecular and Cellular Biochemistry*. - 2003. - Vol. 242. - P. 181–187.

172. Liu, L. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac  $Na^+/K^+$ -ATPase / L. Liu, K. Mohammadi, B. Aynafshar, H. Wang, D. Li, J. Liu, A.V. Ivanov, Z. Xie, A. Askari // *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. - 2003. - Vol. 284. - P. 1550–1560.

173. Mohammadi, K. Role of protein kinase C in the signal pathways that link  $Na^+/K^+$ -ATPase to ERK1/2 / K. Mohammadi, P. Kometiani, Z. Xie, A. Askari // *Journal of Biological Chemistry*. - 2001. - Vol. 276. - P. 42050-42056.

174. Tian, J. Binding of Src to  $Na^+/K^+$ -ATPase forms a functional signaling complex / J. Tian, T. Cai, Z. Yuan, H. Wang, L. Liu, M. Haas, E. Maksimova, X.Y. Huang, Z.J. Xie // *Molecular Biology of the Cell*. - 2006. - Vol. 17. - P. 317–326.

175. Liu, J. Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells / J. Liu, S.M. Periyasamy, W. Gunning, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov, D. Malhotra, Z. Xie, J.I. Shapiro // *Kidney International*. - 2002. - Vol. 62. - P. 2118–21125.

176. Priyadarshi, S. Effect of green tea extract on cardiac hypertrophy following 5/6 nephrectomy in the rat / S. Priyadarshi, B. Valentine, C. Han, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov, J. Liu, S.M. Periyasamy, D. Kennedy, D. Malhotra, Z. Xie, J.I. Shapiro // *Kidney International*. - 2003. - Vol. 63. - P. 1785–1790.

177. Xie, Z.  $Na^+/K^+$ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function / Z. Xie, T. Cai // *Molecular Intervention*. - 2003. - Vol. 3. - P. 157–168.



178. London, G.M. Cardiovascular Disease in Chronic Renal Failure: Pathophysiologic Aspects / G.M. London // *Seminar Dialysis*. - 2003. - Vol. 16. - P. 85-94.
179. Mall, G. Diffuse intermyocardiocytic fibrosis in uremic patients / G. Mall, W. Huther, J. Schneider, P. Lundin, E. Ritz // *Nephrology Dialysis Transplantation*. - 1990. - Vol. 5, N 1. - P. 39-44.
180. Bricker, N.S. On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the “Trade off Hypothesis” / N.S. Bricker // *New England Journal of Medicine*. - 1972. - Vol. 286. - P. 1093-1099.
181. Graves, S.W. An endogenous digoxin-like substance in patients with renal impairment / S.W. Graves, B. Brown, R. Valdes // *Annals of Internal Medicine*. - 1983. - Vol. 99. - P. 604-608.
182. Drummond, C.A. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase signaling regulates collagen synthesis through microRNA-29b-3p in cardiac fibroblasts / C.A. Drummond, M.C. Hill, H. Shi, X. Fan, J.X. Xie, S.T. Haller, D.J. Kennedy, J. Liu, M.R. Garrett, Z. Xie, C.J. Cooper, J.I. Shapiro, J. Tian // *Physiological Genomics*. - 2016. - Vol 48. - P. 220–229.
183. Qin, W. TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29 / W. Qin, A.C. Chung, X.R. Huang, X.M. Meng, D.S. Hui, C.M. Yu, J.J. Sung, H.Y. Lan // *Journal of the American Society of Nephrology*. - 2011. - Vol. 22. - P. 1462–1474.
184. Ramdas, V. Canonical transforming growth factor-beta signaling regulates disintegrin metalloprotease expression in experimental renal fibrosis via miR-29 / V. Ramdas, M. McBride, L. Denby, A.H. Baker // *American Journal of Pathology*. - 2013. - Vol.183. - P. 1885–1896.
185. Tu, X. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF-beta signalling pathway / X. Tu, H. Zhang, J. Zhang, S. Zhao, X. Zheng, Z. Zhang, J. Zhu, J. Chen, L. Dong, Y. Zang, J. Zhang // *Journal of Pathology*. - 2014. - Vol. 234. - P. 46 – 59.

186. van Rooij, E. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis / E. van Rooij, L.B. Sutherland, J.E. Thatcher, J.M. DiMaio, R.H. Naseem, W.S. Marshall, J.A. Hill, E.N. Olson // *Proceedings of the National Academy of Science*. - 2008. - Vol.105 - P. 13027–13032.
187. Zhu, J.N. Smad 3 inactivation and miR-29b upregulation mediate the effect of carvedilol on attenuating the acute myocardium infarction-induced myocardial fibrosis in rat / J.N. Zhu, R. Chen, Y.H. Fu, Q.X. Lin, S. Huang, L.L. Guo, M.Z. Zhang, C.Y. Deng, X. Zou, S.L. Zhong, M. Yang, J. Zhuang, X.Y. Yu, Z.X. Shan // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8, N 9. - P. 75557.
188. Ishkaraeva-Yakovleva, V.V. DigiFab interacts with endogenous cardiotonic steroids and reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition / V.V. Ishkaraeva-Yakovleva, O.V. Fedorova, N.G. Solodovnikova, E.V. Frolova, A.M. Bzhelyansky, I.V. Emelyanov, D.C. Adair, I.E. Zazerskaya, A.Y. Bagrov // *Reproductive Science*. - 2012. - Vol. 19, N 12. - P. 1260-1267.
189. Hout, S.J. The role of sodium intake, the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and an ouabain-like humoral agent in the genesis of reduced renal mass hypertension / S.J. Hout, M.B. Pamnani, D.L. Clough // *American Journal of Nephrology*. - 1983. - Vol. 3. - P. 92-99.
190. Naruse, K. Does plasma immunoreactive ouabain originate from the adrenal gland? / K. Naruse, M. Naruse, A. Tanabe // *Hypertension*. - 1994. - Vol. 20. - P. 617-627.
191. Stella, P. Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients / P. Stella, P. Manunta, F. Mallamaci // *Journal of Internal Medicine*. - 2008. - Vol. 263. - P. 274-280.
192. Kolmakova, E.V. Endogenous cardiotonic steroids in chronic renal failure / E.V. Kolmakova, S.T. Haller, D.J. Kennedy, A.N. Isachkina, G.V. Budny, E.V. Frolova, G. Piecha, E.R. Nikitina, D. Malhotra, O.V. Fedorova, J.I. Shapiro, A.Y. Bagrov // *Nephrology Dialysis Transplantation*. - 2011. - Vol. 26. - P. 2912-2919.

193. Graves, S.W. Endogenous digoxin-immunoreactive substance in human pregnancies / S.W. Graves, R. Valdes Jr, B.A. Brown, A.B. Knight, H.R. Craig // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. - 1984. - Vol. 58, N 4. - P. 748-751.
194. LaMarca, H.L. Marinobufagenin impairs first trimester cytotrophoblast differentiation / H.L. LaMarca, C.A. Morris, G.R. Pettit, T. Nagowa, J.B. Puschett // *Placenta*. - 2006. - Vol. 27. - P. 984-988.
195. Puschett, J.B. Marinobufagenin, resibufogenin and preeclampsia / J.B. Puschett, E. Agunanne, M.N. Uddin // *Arterial Hypertension*. - 2010. - Vol. 1802, N 12. - P. 1246.
196. Goodlin, R.C. Antidigoxin antibodies in eclampsia / R.C. Goodlin // *New England Journal of Medicine*. - 1988. - Vol. 31. - P. 1097-1103.
197. Adair, C.D. Elevated endoxin-like factor complicating a multifetal second trimester pregnancy: treatment with digoxin binding immunoglobulin / C.D. Adair, V. Buckalew, K. Taylor, J.M. Ernest, A.H. Frye, C. Evans, J.C. Veille // *American Journal of Nephrology*. - 1996. - Vol. 16. - P. 529-531.
198. Adair, C.D. The hemodynamic effects of intravenous digoxin-binding fab immunoglobulin in severe preeclampsia: a double-blind, randomized, clinical trial / C.D. Adair, A. Luper, J.C. Rose, G. Russell, J.C. Veille, V. Buckalew // *Journal of Perinatology*. - 2009. - Vol. 29. - P. 284-289.
199. Lam, G. Antepartum administration of a digoxin immune Fab (Digibind®) improves renal function in patients with severe preeclampsia / G. Lam, D. Johnson, C. Robinson, G. Saade, D. Lewis, K. Porter, R. Humphrey, C. Adair, V. Buckalew, T. Danoff // *XVI Congress of International Society for the Study of hypertension in pregnancy*. - 2008. - Vol. 44. - P. 60.
200. Oliver, W.J. Blood pressure, sodium intake, and sodium related hormones in the Yanomamo Indians, a "No-salt" culture / W.J. Oliver, E.L. Cohen, J.V. Neel // *Circulation*. - 1975. - Vol. 52. - P. 146-151.

201. Weinberger, M.H. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance / M.H. Weinberger, J.Z. Miller, F.C. Luft, C.E. Grim, N.S. Fineberg // *Hypertension*. - 1986. - Vol. 8. - P. 127–134.
202. Overlack, A. Divergent hemodynamic and hormonal responses to varying salt intake in normotensive subjects / A. Overlack, M. Ruppert, R. Kolloch, B. Gobel, K. Kraft, J. Diehl, W. Schmitt, K.O. Stumpe // *Hypertension*. - 1993. - Vol. 22. - P. 331–338.
203. Lakatta, E.G. Arterial and cardiac aging: Major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: Aging arteries: A “set up” for vascular disease / E.G. Lakatta, D. Levy // *Circulation*. - 2003. - Vol. 107. - P. 139–146.
204. Franklin, S.S. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study / S.S. Franklin, W. Gustin 4th, N.D. Wong, M.G. Larson, M.A. Weber, W.B. Kannel, D. Levy // *Circulation*. - 1997. - Vol. 96. - P. 308–315.
205. Kaess, B.M. Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension / B.M. Kaess, J. Rong, M.G. Larson, N.M. Hamburg, J.A. Vita, D. Levy, E.J. Benjamin, R.S. Vasan, G.F. Mitchell // *JAMA*. - 2012. - Vol. 308. - P. 875–881.
206. Najjar, S.S. Pulse wave velocity is an independent predictor of the longitudinal increase in systolic blood pressure and of incident hypertension in the Baltimore Longitudinal Study of Aging / S.S. Najjar, A. Scuteri, V. Shetty, J.G. Wright, D.C. Muller, J.L. Fleg, H.P. Spurgeon, L. Ferrucci, E.G. Lakatta // *Journal of the American College of Cardiology*. - 2008. - Vol. 51. - P. 1377–1383.
207. Gates, P.E. Dietary sodium restriction rapidly improves large elastic artery compliance in older adults with systolic hypertension / P.E. Gates, H. Tanaka, W.R. Hiatt, D.R. Seals // *Hypertension*. - 2004. - Vol. 44. - P. 35–41.
208. Seals, D.R. Blood pressure reductions with exercise and sodium restriction in postmenopausal women with elevated systolic pressure: Role of arterial stiffness / D.R. Seals, H. Tanaka, C.M. Clevenger, K.D. Monahan, M.J. Reiling, W.R. Hiatt, K.P.

Davy, C.A. DeSouza // *Journal of the American College of Cardiology*. - 2001. - Vol. 38. - P. 506–513.

209. Jablonski, K.L. Dietary sodium restriction and association with urinary marinobufagenin, blood pressure, and aortic stiffness / K.L. Jablonski, O.V. Fedorova, M.L. Racine, C.J. Geolfos, P.E. Gates, M. Chonchol, B.S. Fleenor, E.G. Lakatta, A.Y. Bagrov, D.R. Seals // *Clinical of Journal of the American Society of Nephrology*. - 2013. - Vol. 8. - P. 1952–1959.

210. Spigset, O. Increased glucose intolerance related to digoxin treatment in patients with type 2 diabetes mellitus / O. Spigset, T. Mjörndal // *Journal of Internal Medicine*. - 1999. - Vol. 246 N 4. - P. 419-422.

211. Chen, S. Role of digitalis-like substance in the hypertension of streptozotocin-induced diabetes in reduced renal mass rats / S. Chen, C. Yuan, D. Clough, J. Schooley, F.J. Haddy, M.B. Pamnani // *American Journal of Hypertension*. - 1993. - Vol. 6 N 5. - P. 397- 406.

212 Martinka, E. Endogenous digoxin-like immunoactivity and diabetes mellitus: facts and hypotheses / E. Martinka, P. Galajada, M. Ochodnický, B. Lichardus, S. Straka, M. Mokaň // *Medical Hypotheses*. - 1997. - Vol. 49, N 3. - P. 271-275.

213. Bagrov, Y.Y. Endogenous digitalis-like ligands and Na/K-ATPase inhibition in experimental diabetes mellitus / Y.Y. Bagrov, N.B. Manusova, I.A. Egorova, O.V. Fedorova, A.Y. Bagrov // *Frontiers in Bioscience*. - 2005. - Vol.10. - P. 2257-2262.

214. de Wardener, H.E. From a third factor to a glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulator / H.E. de Wardener // *Contributions to Nephrology*. - 1992. - Vol.100. - P. 172-187.

215. Gaskin, R.S. G6PD deficiency: its role in the high prevalence of hypertension and diabetes mellitus / R.S. Gaskin, D. Estwick, R. Peddi // *Ethnicity and Disease*. - 2001. - Vol. 11 N 4. - P. 749-754.

216. Monte Alegre, S. Insulin secretion in patients deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase / S. Monte Alegre, S.T. Saad, E. Delatre, M.J. Saad // *Hormone and Metabolic Research*. - 1991. - Vol. 23, N 4. - P. 171-173.
217. Vaitkevicius, P.V. Effects of age and aerobic capacity on arterial stiffness in healthy adults / P.V. Vaitkevicius, J.L. Fleg, J.H. Engel, F.C. O'Connor, J.G. Wright, L.E. Lakatta, F.C. Yin, E.G. Lakatta // *Circulation*. - 1993. - Vol. 88, N 4. - P. 1456-1462.
218. Chae, C.U. Increased pulse pressure and risk of heart failure in the elderly / C.U. Chae, M.A. Pfeffer, R.J. Glynn, G.F. Mitchell, J.O. Taylor, C.H. Hennekens // *JAMA*. - 1999. - Vol. 281, N 7. - P. 34-39.
219. Mitchell, G.F. Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function / G.F. Mitchell, L.A. Moyé, E. Braunwald, J.L. Rouleau, V. Bernstein, E.M. Geltman, G.C. Flaker, M.A. Pfeffer // *Circulation*. - 1997. - Vol. 96, N 12. - P. 4254- 4260.
220. Vaccarino, V. Pulse pressure and risk of cardiovascular events in the systolic hypertension in the elderly program / V. Vaccarino, A.K. Berger, J. Abramson, H.R. Black, J.F. Setaro, J.A. Davey, H.M. Krumholz // *American Journal of Cardiology*. - 2001. - Vol. 88, N 9. - P. 980-986.
221. Kostis, J.B. Association of increased pulse pressure with the development of heart failure in SHEP / J.B. Kostis, J. Lawrence-Nelson, R. Ranjan, A.C. Wilson, W.J. Kostis, C.R. Lacy // *American Journal of Hypertension*. - 2001. - Vol. 14, N 8. - P. 798-803.
222. Benetos, A. Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population / A. Benetos, M. Safar, A. Rudnichi, H. Smulyan, J.L. Richard, P. Ducimetière, L. Guize // *Hypertension*. - 1997. - Vol. 30, N 6. - P. 1410-1415.

223. Franklin, S.S. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart disease? The Framingham heart study / S.S. Franklin, S.A. Khan, N.D. Wong, M.G. Larson, D. Levy // *Circulation*. - 1999. - Vol. 100, N 4. - P. 354-360.
224. O'Donnell, C.J. Hypertension and borderline isolated systolic hypertension increase risks of cardiovascular disease and mortality in male physicians / C.J. O'Donnell, P.M. Ridker, R.J. Glynn, K. Berger, U. Ajani, J.E. Manson, C.H. Hennekens // *Circulation*. - 1997. - Vol. 95, N 5. - P. 1132-1137.
225. Vaccarino, V. Pulse pressure and risk for myocardial infarction and heart failure in the elderly / V. Vaccarino, T.R. Holford, H.M. Krumholz // *Journal of the American College of Cardiology*. - 2000. - Vol. 36. - P. 130–138.
226. Domanski, M.J. Isolated systolic hypertension: prognostic information provided by pulse pressure / M.J. Domanski, B.R. Davis, M.A. Pfeffer, M. Kastantin, G.F. Mitchell // *Hypertension*. - 1999. - Vol. 34, N 3. - P. 375-380.
227. Meaume, S. Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in subjects > 70 years of age / S. Meaume, A. Benetos, O.F. Henry, A. Rudnichi, M.E. Safar // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. - 2000. - Vol. 21, N 12. - P. 2046-2050.
228. 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.
229. Selye, H. Digitoxin poisoning: prevention by spironolactone / H. Selye, M. Krajny, L. Savoie // *Science*. - 1969. - Vol. 164. - P. 842–843.
230. Garay, R.P. The interaction of canrenone with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in human red blood cells / R.P. Garay, J. Diez, C. Nazaret, G. Dagher, J.P. Abitbol // *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. - 1985. - Vol. 329. - P. 311–315.

231. Bagrov, A.Y. Endogenous marinobufagenin-like immunoreactive factor and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition during voluntary hypoventilation / A.Y. Bagrov, O.V. Fedorova, J.L. Austin-Lane, R.I. Dmitrieva, D.E. Anderson // *Journal of Hypertension. Supplement.* - 1995. - Vol. 26, N 5. - P. 781-788.
232. London, G.M. Large artery function and alterations in hypertension / G.M. London // *Journal of Hypertension. Supplement.* - 1995. - Vol. 13, N 2. - P. 35-38.
233. Brilla, C.G. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone / C.G. Brilla, G. Zhou, L. Matsubara, K.T. Weber // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* - 1994. - Vol. 26, N 7. - P. 809-820.
234. Lijnen, P. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone / P. Lijnen, V. Petrov // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* - 2000. - Vol. 32. - P. 865-879.
235. Young, M.J. Mineralocorticoid receptors and pathophysiological roles for aldosterone in the cardiovascular system / M.J. Young, J.W. Funder // *Journal of Hypertension.* - 2002. - Vol. 20. - P. 1465–1468.
236. Funder, J.W. Minireview: aldosterone and the cardiovascular system: genomic and nongenomic effects / J.W. Funder // *Endocrinology.* - 2006. - Vol. 147. - P. 5564–5567.
237. Tian, J. Spironolactone attenuates experimental uremic cardiomyopathy by antagonizing marinobufagenin / J. Tian, A. Shidyak, S.M. Periyasamy, S. Haller, M. Taleb, N. El-Okdi, J. Elkareh, S. Gupta, S. Gohara, O.V. Fedorova, C.J. Cooper, Z. Xie, D. Malhotra, A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro // *Hypertension.* - 2009. - Vol. 54, N 6. - P. 1313-1320.
238. Nishimoto, K. Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression / K. Nishimoto, R.B. Harris, W.E. Rainey, T. Seki // *Endocrinology.* - 2014. - Vol. 155, N 4. - P. 1363-1372.
239. Czuwara-Ladykowska, J. Fli-1 inhibits collagen type I production in dermal fibroblasts via an Sp1-dependent pathway / J. Czuwara-Ladykowska, F. Shirasaki, P.



Jackers, D.K. Watson, M. Trojanowska // *Journal of Biological Chemistry*. - 2001. - Vol. 276, N 24. - P. 20839-20848.

239. Jinnin, M. Alpha2(I) collagen gene regulation by protein kinase C signaling in human dermal fibroblasts / M. Jinnin, H. Ihn, K. Yamane, Y. Mimura, Y. Asano, K. Tamaki // *Nucleic Acids Research*. - 2005. - Vol. 33, N 4. - P. 1337-1351.

240. Tian, J. Binding of Src to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase forms a functional signaling complex / J. Tian, T. Cai, Z. Yuan, H. Wang, L. Liu, M. Haas, E. Maksimova, X.Y. Huang, Z.J. Xie // *Molecular Biology of the Cell*. - 2006. - Vol. 17, N 1. - P. 317-326.

241. Aydemir-Koksoy, A. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation / A. Aydemir-Koksoy, J. Abramowitz, J.C. Allen // *Journal of Biological Chemistry*. - 2001. - Vol. 276, N 49. - P. 46605-46611.

242. Haas, M. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase / M. Haas, A. Askari, Z. Xie // *Journal of Biological Chemistry*. - 2000. - Vol. 275, N 36. - P. 27832-27837.

243. Shah, B.H. Roles of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation / B.H. Shah, M.P. Farshori, A. Jambusaria, K.J. Catt // *Journal of Biological Chemistry*. - 2003. - Vol. 278, N 21. - P. 19118-19126.

245. Asano, Y. Phosphorylation of Fli1 at threonine 312 by protein kinase C delta promotes its interaction with p300/CREB-binding protein-associated factor and subsequent acetylation in response to transforming growth factor beta / Y. Asano, M. Trojanowska // *Molecular and Cell Biology*. - 2009. - Vol. 29, N 7. - P. 1882-1894.

246. Iwabu, A. Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway / A. Iwabu, K. Smith, F.D. Allen, D.A. Lauffenburger, A. Wells // *Journal of Biological Chemistry*. - 2004. - Vol. 279, N 15. - P. 14551-14560.

247. Meng, X.M. TGF- $\beta$ /Smad signaling in renal fibrosis / X.M. Meng, P. Ming-Kuen Tang, J. Li, H.Y. Lan // *Frontiers in Physiology*. - 2015. - Vol. 6. - P. 82.