

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Ишкараева Валентина Владимировна

РОЛЬ МАРИНОБУФАГЕНИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ГИПЕРТЕНЗИОННОГО  
СИНДРОМА ПРЕЭКЛАМПСИИ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Зазерская Ирина Евгеньевна - доктор  
медицинских наук

Багров Алексей Яковлевич - доктор  
медицинских наук

Санкт-Петербург – 2018

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Основные структурные изменения при физиологической беременности и осложненной преэклампсией.....	13
1.2 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФ-аза – универсальная сигнальная система.....	19
1.3 Кардиотонические стероиды и их роль в патогенезе преэклампсии.....	25
1.4 Возможности терапевтического влияния на патологические эффекты маринобуфагенина.....	31
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	37
2.1 Дизайн исследования.....	37
2.2 Методы исследования.....	43
2.2.1 Метод определения кардиотонических стероидов (маринобуфагенин, оубаин, дигоксин) в плазме крови беременных: иммунофлуорометрический метод DELFIA.....	43
2.2.2 Метод измерения активности Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФ-азы в эритроцитах.....	46
2.2.3 Методика эксперимента «Изучение иммунонейтрализующего действия поликлональных антител к дигоксину и моноклональных антител к маринобуфагенину на активность фермента Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФ-аза эритроцитов беременных с преэклампсией».....	47
2.2.4 Методика эксперимента «Изучение влияние сульфата магния на фармакологическую коррекцию активности фермента Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФ-азы эритроцитов беременных с преэклампсией».....	48
2.2.5 Определение коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины методом «Белковый иммуоблот» (Western-блот).....	49
2.2.6 Методика эксперимента «Влияние маринобуфагенина на уровень экспрессии транскрипционного фактора Fli-1 и уровень коллагена-1 в тканях плаценты».....	50

2.2.7 Методика эксперимента «Возможности фармакологической коррекции уровня коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины».....	50
2.2.8 Методика эксперимента «Функциональное исследование вазорелаксантной способности артерий пуповины при преэклампсии с фармакологической коррекцией производным альдостерона».....	51
2.2.9 Метод морфометрического анализа строения ворсин и сосудов плацентарной ткани.....	53
2.2.10 Методы статистической обработки материала.....	53
ГЛАВА 3. ОБЩАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН.....	55
3.1 Акушерско-гинекологический и экстрагенитальный статус обследованных групп.....	55
3.2 Характеристика основных клинических проявлений преэклампсии у беременных исследованных групп.....	59
3.3 Особенности течения родов у женщин исследованных групп.....	62
3.4 Состояние новорожденных у родильниц исследованных групп.....	64
ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	66
4.1 Концентрация маринобуфагенина в плазме крови и активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов исследованных групп.....	66
4.2 Фармакологическая коррекция влияния маринобуфагенина на активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза эритроцитов, ингибированного при преэклампсии.....	68
4.3 Влияние сульфата магния на активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза эритроцитов, ингибированного при преэклампсии .....	77
4.4 Влияние маринобуфагенина на фиброз тканей плаценты и артерий пуповины.....	81
4.4.1 Уровень коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины исследуемых групп.....	81
4.4.2 Эксперимент «Влияние маринобуфагенина на уровень экспрессии	

транскрипционного фактора Fli-1 и уровень коллагена-1 в тканях плаценты».....	83
4.4.3 Возможности фармакологической коррекции уровня коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины при преэклампсии.....	84
4.5 Изучение вазорелаксантных свойств артерий пуповины при преэклампсии.....	87
4.6 Морфометрический анализ строения ворсин и сосудов плацентарной ткани исследуемых групп.....	89
ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
ВЫВОДЫ.....	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	108

**Актуальность исследования**

Преэклампсия является одним из самых частых и опасных осложнений беременности, встречающихся в акушерской практике. Преэклампсия представляет собой одну из основных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности во всем мире [ВОЗ, 2018]. По данным методического письма "Аудит критических акушерских состояний в Российской Федерации в 2016 году" от 23 октября 2017 года N 15-4/10/2-7340 преэклампсия и ее осложнения занимают вторую строчку по частоте в структуре near-miss (32,1%) и пятую в структуре материнской смертности по Северо-Западному Федеральному округу (СЗФО). Таким образом, исследования, направленные на изучение патогенеза, доклинической диагностики, профилактики и лечения преэклампсии, сохраняют свою актуальность.

Несмотря на появившееся за последнее десятилетие большое количество научных публикаций и развитие представлений о патогенезе, возможности медикаментозного лечения преэклампсии остаются крайне ограниченными. Артериальная гипертензия (АГ) – важный клинический симптом преэклампсии. Одним из патогенетических звеньев развития гипертензии является фиброз сосудистой стенки. «Жесткость» артерий, как показывают исследования, является независимым предиктором сердечно-сосудистых заболеваний и смертности у здоровых людей вне беременности [Mitchell G.F. et al., 2010]. Однако подобные исследования при преэклампсии недостаточно освещены. Имеются данные о взаимосвязи морфометрического строения терминальных ворсин плаценты, а также содержания в них миофибробластов и степени гемодинамических нарушений в функциональной системе мать-плацента-плод, а также параметрами внутриплацентарного кровотока при преэклампсии [Закурина А.Н., 2011)]. По данным литературы наличие преэклампсии в анамнезе напрямую влияет на ухудшение показателей артериальной «жесткости» и является прогностически

неблагоприятным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний после родов [Рябоконе Н.Р. и соавт., 2016]. Этот процесс носит системный характер. Исследователи описывают повышенный фиброз печени [M. Frank Wolf et al., 2016; Стрижаков А.Н. и соавт., 2016; Федюнина И. А. и соавт., 2017] и левого желудочка сердца при преэклампсии [Orabona R. et al., 2017]. А с чем связана, повышенная выработка коллагена при данном заболевании, остается актуальным вопросом.

Известно, что развитие объемзависимой АГ, хронической почечной недостаточности, сахарного диабета, тяжелой преэклампсии сопровождается повышением концентраций кардиотонических стероидов (КТС) [Багров А.Я. и соавт., 2008, 2009]. Имеются немногочисленные данные, что повышение концентрации эндогенных КТС, в том числе бифадиенолида маринобуфагенина (МБГ), вносит вклад в патогенез преэклампсии посредством индукции ангиоспазма [Lopatin DA et al., 1999; Averina IV et al., 2006; Fedorova OV et al., 2008], васкулярного фиброза [Nikitina ER et al., 2011; Михайлов А.В. и соавт., 2009] и нарушения пролиферации и инвазии трофобласта [LaMarca HL et al., 2006; Uddin MN et al., 2008]. В экспериментальных и клинических исследованиях ранее доказано вовлечение МБГ в развитие фиброза в сердечно-сосудистой системе [Elkareh, J. et al., 2007; Kennedy, D.J. et al., 2006, 2008; Konradi, A.O. et al., 2012; Kubo, M. et al, 2003]. Однако, механизм формирования непосредственно фиброза при преэклампсии малоизучен и участие МБГ требует дальнейшего изучения.

В тоже время, имеются данные об успешном применении у беременных с преэклампсией поликлональных антител к дигоксину [Adair CD et al., 1996, 2009, 2010]. Также за последние несколько лет были разработаны моноклональные анти-МБГ антитела 3Е9 (МАТ к МБГ). Их гипотензивный эффект был продемонстрирован на модели соль-чувствительной гипертензии у животных [Fedorova O.V. et al., 2002]. Получен выраженный антифибротический эффект МАТ к МБГ на миокардиальный фиброз на экспериментальной модели нефропатии у крыс [Haller, S.T. et al., 2012]. Подобных исследований при

преэклампсии у беременных в доступной литературе не встречается. Имеются сведения о конкурентных отношениях КТС и антагонистов альдостерона (АА) за связывание с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой [Finotti, P. et al, 1981]. Это позволяет предположить возможность антифибротического эффекта АА на фиброз при преэклампсии.

Таким образом, дальнейшее изучение роли МБГ в формировании фиброза при преэклампсии является актуальной темой. А поиск медикаментозной возможности регуляции его патологического влияния, может дать начало разработке перспективных подходов эффективной патогенетической терапии преэклампсии.

### **Степень разработанности темы исследования**

Согласно данным поисковой системы Pubmed, существует не более 200 статей, посвященных изучению фиброза и сосудистой «жесткости» при преэклампсии.

В настоящей работе предложен механизм развития фиброза при преэклампсии с участием МБГ - эндогенного КТС. Всего существует около 200 работ, опубликованных на тему изучения его эффектов. Роль МБГ в развитии фиброза было описано в 2006 году [Kennedy, D.J. et al., 2006], что послужило основой для исследований, посвященных изучению профибротической функции МБГ. Недавно в экспериментальных исследованиях на соль-нечувствительных крысах показано, что 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 Fli-1 [Григорова Ю.Н., 2017]. Это приводит к увеличению количества коллагена в сосудистой стенке и влечет за собой нарушение способности сосуда расслабляться. В доступной литературе встречается порядка 30 статей роли КТС в патологии беременности. Развитию фиброза артерии пуповины с участием маринобуфагенина посвящены 2 статьи [Nikitina ER et al., 2011; Михайлов А.В. и

соавт., 2009]. Таким образом, изучение возможных механизмов коллагенообразования при преэклампсии является актуальной проблемой современного акушерства и имеет несомненную научную новизну за отсутствием достаточного количества информации о механизме развития фиброза при данной патологии.

**Цель исследования:** Изучить механизм формирования фиброза сосудов плаценты при гипертензионном синдроме преэклампсии для обоснования перспективной фармакологической мишени.

#### **Задачи исследования:**

1. Определить и сопоставить содержание коллагена-1 в плацентарной ткани и артериях пуповины у женщин, родивших в срок, с преэклампсией и физиологическим течением беременности
2. Оценить в эксперименте влияние маринобуфагенина на негативный регулятор промотора гена Col-1 Fli-1 в плацентарной ткани женщин со срочными родами при физиологической беременности
3. Оценить *in vitro* эффект поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ и производных альдостерона на фиброз плацентарной ткани и артерий пуповины у женщин со срочными родами при преэклампсии
4. Исследовать сократительные свойства артерий пуповины с индукторами эндотелин-1 и нитропруссид натрия с добавлением производного альдостерона у женщин с преэклампсией, родивших в срок
5. Оценить *in vitro* иммунонейтрализующий эффект поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ, ионов магния на активность фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза эритроцитов у беременных с преэклампсией на доношенном сроке



### **Научная новизна настоящей работы:**

Установлена роль МБГ в развитии фиброза плацентарной ткани и артерий пуповины посредством угнетения ядерного транскрипционного фактора Fli-1.

Показан антифибротический эффект поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ, производных альдостерона на фиброз плацентарной ткани и артерий пуповины.

Продемонстрирован иммунонейтрализующий эффект двух поликлональных антител к дигоксину и моноклональных антител к МБГ на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы и проведена их сравнительная иммунологическая характеристика при преэклампсии.

Доказано позитивное влияние производного альдостерона на вазорелаксацию артерий пуповины при преэклампсии путем восстановления активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы.

### **Теоретическая и практическая значимость работы:**

Показана роль МБГ в развитии фиброза плаценты и пупочных артерий при гипертензионном синдроме преэклампсии, что позволяет рассмотреть его в качестве мишени при лечении преэклампсии.

При изучении влияния поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ, производных альдостерона на плацентарной ткани и артериях пуповины женщин с преэклампсией продемонстрирован антифибротический эффект. А также, изучен эффект двух поликлональных антител к дигоксину и моноклональных антител к МБГ в восстановлении функционирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов при преэклампсии и проанализирована их иммунологическая характеристика, что позволяет рассматривать данные препараты в качестве перспективных лекарственных средств для лечения преэклампсии.

Расширено представление о вазодилатирующем действии сульфата магния посредством снижения чувствительности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы к МБГ при

преэклампсии, что является дополнительным доказательством использования данного препарата в патогенетической терапии.

Результаты исследования являются основанием для дальнейших клинических исследований у беременных по лечению гипертензионного синдрома преэклампсии и антифибротической терапии на основе применения поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ и производных альдостерона.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

Выполнено клинико-экспериментальное исследование «случай-контроль». В работе использованы клинические и лабораторные методы исследования. Объектом исследования явились женщины с физиологическим течением и преэклампсией на доношенном сроке беременности. Предмет исследования – плацентарная ткань, артерии пуповины, кровь. Результаты, полученные в ходе работы, проанализированы с применением методов статистического параметрического и непараметрического анализа, ANOVA.

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. В результате проведенного исследования установлено, что высокая концентрация МБГ при преэклампсии является патогенетической основой фиброза и нарушения упруго-эластических свойств сосудов. Фиброз плацентарной ткани и артерий пуповины обусловлен взаимодействием МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы. Профибротический эффект МБГ при преэклампсии реализуется посредством инактивации ядерного негативного регулятора синтеза коллагена-1 Fli-1, что позволяет рассматривать МБГ в качестве перспективной мишени при лечении преэклампсии
2. Доказано, что поликлональные антитела к дигоксину, моноклональные антитела к МБГ, производные альдостерона нейтрализуют патологическое влияние МБГ на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу, в результате чего нивелируется

профибротический эффект МБГ, и являются перспективными препаратами для разработки патогенетической терапии преэклампсии на их основе

### **Апробация работы**

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры акушерства и гинекологии института медицинского образования, в работу отделений перинатального центра клиники института перинатологии и педиатрии (отделение патологии беременности, родильное отделение) ФГБУ «Национального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 3 статьи в журналах рецензируемых ВАК и 5 статей - в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных: Scopus.

Основные результаты исследования представлены и доложены на СРР 2012, The 2nd International Congress on Cardiac Problems in Pregnancy May 17-20, 2012, Berlin, Germany; IV ежегодной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Санкт-Петербург, 22-23 марта 2012 года; XIII, XVIII Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» в Москве 2012, 2017; VII, XI Ежегодном Конгрессе специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технологии, качество» - Москва, 2012, 2016 гг.; VII, IX, X междисциплинарной конференции по акушерству, перинатологии, неонатологии «Здоровая женщина – здоровый новорожденный» 2012, 2016, 2017 гг.. Санкт-Петербург; II Общероссийской конференции с международным участием «Перинатальная медицина: от прегравидарной подготовки к здоровому материнству и детству, 2016 г. Санкт-Петербург; Международном конгрессе «Большие акушерские и неонатальные синдромы – патофизиология и клиническая практика» 14-16 декабря 2017 Санкт-Петербург.

### **Соответствие паспорту научных исследований**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 14.01.01 – Акушерство и гинекология, а также области исследования согласно п. 3 - Исследование эпидемиологии, этиологии, патогенеза гинекологических заболеваний; п. 4 - Разработка и усовершенствование методов диагностики и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний. Оптимизация диспансеризации беременных и гинекологических больных.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 131 странице машинописного текста, написана в классическом стиле и состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 18 рисунками и 19 таблицами. Список литературы включает 210 источников – 56 отечественных и 154 зарубежных.

### 1.1 Основные структурные изменения при физиологической беременности и осложненной преэклампсией

Преэклампсия является одним из самых частых и опасных осложнений беременности, встречающихся в акушерской практике. Преэклампсия представляет собой одну из основных причин материнской и перинатальной заболеваемости и смертности во всем мире [ВОЗ, 2018]. По данным методического письма "Аудит критических акушерских состояний в Российской Федерации в 2016 году" от 23 октября 2017 года N 15-4/10/2-7340 преэклампсия и ее осложнения занимают вторую строчку по частоте в структуре near-miss (32,1%) и пятую в структуре материнской смертности по СЗФО. Таким образом, исследования, направленные на изучение патогенеза, доклинической диагностики, профилактики и лечения преэклампсии, сохраняют свою актуальность.

Последствия перенесенной в анамнезе преэклампсии повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний, метаболических нарушений, заболеваний почек в последующей жизни женщины. Также достаточно высокая частота нарушений физического, психосоматического развития недоношенных детей [ВОЗ, 2018; Ходжаева З. С. и соавт., 2013; L. Bellamy et al., 2007; Murphy MS et al., 2016].

Общепринято, что пусковым механизмом преэклампсии являются нарушение цитотрофобластической инвазии, адаптации спиральных артерий к развивающейся беременности и повреждение эндотелия сосудов [Савельева Г.М. и соавт., 2000; Кулаков В.И. и соавт., 2008; Айламазян Э.К. и соавт., 2008; Сухих, Г. Т. И соавт., 2008; Roberts J.M. et al., 2013; Leeman L. et al., 2016]. Нарушение гестационной перестройки децидуального (5-7 нед) и миометриального (16-18 нед) сегментов спиральных артерий обуславливает сохранение мышечной оболочки,

эндотелия и эластичной мембраны, а главное узкого просвета артерий [Милованов А.П. и соавт., 2012]. Имеются данные о взаимосвязи морфометрического строения терминальных ворсин плаценты, а также содержания в них миофибробластов и степени гемодинамических нарушений в функциональной системе мать-плацента-плод, а также параметрами внутриплацентарного кровотока при преэклампсии [Закурина А.Н., 2011]. На фоне гипоперфузии формирующаяся плацента выделяет в системный кровоток матери ряд факторов, воздействующих на её организм. Происходит активация нейтрофилов, перекисного окисления липидов и окислительный стресс. Наблюдается дисбаланс про- и противоангиогенных факторов, активация факторов гемостаза [Кулаков В.И. и соавт., 2008; Айламазян Э.К. и соавт., 2008; Сидорова И.С. и соавт., 2010, 2016; Гуреев В.В., 2012; Радзинский, В. Е. и соавт., 2009; Фасса Т.А. et al., 2012; Naderi S. et al., 2017; Irani R.A., Xia Y., 2011]. Патологический процесс носит системный характер, приводящий к полиорганной недостаточности.

Несмотря на большое количество научных публикаций за последнее десятилетие и значительный вклад в изучение патогенеза преэклампсии, единственным патогенетическим подходом лечения является своевременное родоразрешение.

Изменения, происходящие в плацентарной ткани при преэклампсии, изучены достаточно подробно. При тяжелой преэклампсии увеличивается степень дистрофических изменений стромы хориальной пластинки и синцитиального покрова ворсин, объем незрелых ворсин без синцитиальных почек и ишемических инфарктов в сочетании с мелкоочаговым характером компенсаторно-приспособительных реакций в виде гиперплазии капилляров стромы и пролиферации синцитиальных почек, также отмечается повышенный фиброз ворсин (Милованов А.П. и соавт., 2010; Сюдюкова Е.Г. и соавт., 2016; Ducray JF. et al., 2011]. Факторы, влияющие на развитие фиброза при преэклампсии, изучены недостаточно.

Накопленные в мировой литературе данные позволяют рассматривать развитие преэклампсии как совокупность морфофункциональных нарушений различных органов и систем в организме беременной женщины.

Артериальная гипертензия (АГ) является важным симптомом преэклампсии. При физиологической беременности артериальное давление (АД) с первых недель снижается вследствие уменьшения сосудистого тонуса. Снижение тонуса артериол обусловлено вазодилатацией, которая связана с повышенным уровнем сосудорасширяющих субстанций (прогестерон, простагландины, оксида азота и др.). Во втором триместре беременности АД практически не меняется, оставаясь более низким, чем до наступления беременности. В третьем триместре АД увеличивается и к моменту родов достигает уровня, наблюдавшегося до беременности, или даже на 10-15 мм рт. ст. выше. Повышение АД в этом триместре обусловлено увеличением частоты сердечных сокращений (ЧСС) (на 10-20%), сердечного выброса (до 30-50% от исходного уровня), увеличением объема циркулирующей крови (ОЦК до 50% от исходного уровня) задержкой натрия, увеличением массы тела (на 10-14 кг) [Clapp J.F. et al, 1997; Longo S.A. et al., 2003]. По данным Шифмана Е.М. и коллег, во время физиологической беременности ударный объем (УО) играет ключевую роль не только в приросте, но и в регуляции минутного объема (МО), в то время как у небеременных МО больше зависит от изменения ЧСС [Шифман Е.М. и соавт., 2012]. Динамика увеличения преднагрузки и роста УО при сохранении ЧСС нуждается в увеличении скоростных показателей как систолического, так и диастолического движения стенок левого желудочка (ЛЖ), а также предъявляет повышенные требования к сократительной функции миокарда. Таким образом, развивается гиперкинетический тип кровообращения.

При преэклампсии, как правило, АД не отличается стабильностью в состоянии покоя, причем в зависимости от его колебаний меняется и циркадный биологический ритм [Ayala D.E., Hermida R.C., 1993]. Сначала происходит сбой в падении АД в ночное время суток, а в последствие, особенно в тяжелых случаях,

наблюдается обратная зависимость, когда давление начинает расти во время сна. При анализе данных суточного мониторирования артериального давления (СМАД) у пациенток с преэклампсией выявлена стойкая систолодиастолическая АГ, повышение суточного индекса, как для систолического, так и для диастолического АД. У 70% беременных с преэклампсией ночное снижение АД составило менее 10%, что является недостаточным, а у 30% отмечено устойчивое повышение АД в ночные часы [Макаров О.В., Ткачева О.Н., Волкова Е.В., 2010]. Имеет место ненормальное повышение восприимчивости к циркулирующему в крови адреналину и норадреналину. Если у здоровых беременных отмечается снижение чувствительности к ангиотензину II (обладающему потенциальными сосудосуживающими свойствами), то у больных с преэклампсией формируется повышенная восприимчивость к этому гормону [de Jng CLD, Dekker GA, Sibai VM, 1991; Chaiworapongsa T., et al., 2011].

По данным Макарова О.В. и коллег, выявлены кардинальные отличия в показателях центральной гемодинамики у беременных с гипертонической болезнью (ГБ) и преэклампсией [Макаров О.В., Ткачева О.Н., Волкова Е.В., 2010]. У больных с преэклампсией выявлено снижение минутного объема кровообращения (МО) и ударного объема крови (УО) на 48% и 53% соответственно по сравнению с беременными, страдающими ГБ. У них выявлено статистически достоверное снижение работы сердца на 48% по сравнению с беременными с ГБ. У больных с преэклампсией выявлено увеличение общего периферического сосудистого сопротивления (ОПСС) на 40%.

Одним из патогенетических звеньев развития гипертензии является фиброз сосудистой стенки. Нарушение процессов коллагенообразования негативно сказывается на параметрах, характеризующих «жесткость» сосудистой стенки. «Жесткость» артерий, как показывают исследования, является независимым предиктором сердечно-сосудистых заболеваний и смертности у здоровых людей вне беременности [Mitchell G. F. et al., 2010]. Однако подобные исследования при преэклампсии недостаточно освещены. В ряде исследований наблюдается



повышение «жесткости» сосудов при преэклампсии [Robb A. O. et al., 2009; Elvan-Taşpinar A. et al., 2011; Kaihura C. et al., 2009; Ronnback M, et al., 2005; Spasojevic M. et al., 2009; Khalil A. et al., 2010]. Наличие преэклампсии в анамнезе напрямую влияет на ухудшение показателей артериальной «жесткости», так же является прогностически неблагоприятным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний после родов [Рябоконе Н.Р. и др., 2016]. Повышенное коллагенообразование при преэклампсии имеет системный характер. Так, по данным различных авторов, отмечается повышенный фиброз печени [M. Frank Wolf et al., 2016; Стрижаков А.Н. и соавт., 2016; Федюнина И. А. и соавт., 2017] и левого желудочка сердца при преэклампсии [Orabona R. et al., 2017]. По данным Фиброскан теста печени, проведенного у женщин в послеродовом периоде (1-7 сутки), выявлен повышенный уровень фиброза у рожениц с преэклампсией по сравнению с физиологическим течением беременности, хотя значения принимают верхнюю границу нормы, а разницы в стеатозе не выявлено [M. Frank Wolf et al., 2016]. Результаты неинвазивной методики «Фибротест» [Федюнина И. А. и соавт., 2017] показали, что вовлечение печени в патологический процесс при преэклампсии характеризуется не только нарушением ее функции, но и морфоструктурными изменениями ее паренхимы, которые коррелирует с тяжестью течения заболевания. Rossana Orabona с коллегами, при использовании эхокардиографии сIBS у бессимптомных женщин, перенесших преэклампсию в анамнезе (6мес-4года), исследовали уровень фиброза миокарда [Orabona R. et al., 2017]. Таким образом, женщины с историей раннего развития преэклампсии показали фиброз левого желудочка в краткосрочной и среднесрочной перспективе после родов по сравнению с поздним началом преэклампсии или контролем. Фиброз ЛЖ связан со сроком гестации и средним значением пульсационного индекса маточной артерии при возникновении преэклампсии.

Изменения функции почек при нормальной беременности также вносят свой вклад в регуляцию функций сердечно-сосудистой системы. Они включают в себя увеличение почечного кровотока и гломерулярной фильтрации, более чем на

50% уже в первом триместре, и постепенное их снижение к уровню до беременности к началу родов [Hussein W., Lafayette R.A., 2014; Odutayo A., Hladunewich M., 2012]. Способствует увеличению функции почек и увеличение ОЦК - снижение плазменных концентраций мочевины, креатинина и мочевой кислоты [Barron W.M., Lindheimer M.D. 1984].

Тип протеинурии в случае преэклампсии не является избирательным. Повышенная проницаемость способствует пропорциональному повышению концентрации в моче белков с большим молекулярным весом, например трансферрина и глобулинов, что, собственно, и происходит при заболевании почек с изолированной протеинурией [Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy 2000]. У большинства женщин с преэклампсией наблюдается пониженная перфузия почек в легкой или средней форме, а также клубочковая фильтрация наряду с соответствующей повышенной концентрацией сывороточного креатинина. Отчасти причиной снижения клубочковой фильтрации оказывается набухание клубочков, сужение просвета гломерулярных капилляров и депонирование фибрина в эндотелиальных клетках (гломерулярно-капиллярный эндотелиоз) [Сидорова И. С и соавт., 2014; Фасса Т.А. et al., 2012; В.Н. Серов и соавт., 2008].

Отмечено, что изменения почечной гемодинамики при АГ коррелируют с нарушениями маточно-плацентарного кровотока, предшествуя им. Таким образом, повышение сосудистого сопротивления почечных сосудов отражает аналогичные изменения в сосудах плаценты, которые еще не проявляются клинически [Магомедова, Г.А., 2010].

Морфофункциональные изменения происходят на фоне выраженного сосудистого спазма, отражающего развитие гипертензионного синдрома при преэклампсии, который наблюдается практически во всех без исключения сосудах артериального русла, включая сосуды ногтевого ложа, глазного дна и коронарные артерии [Киселев А.Г., Айламазян Э.К., 1995; Bauer T.W., Moore G.W., Hutchins G.M., 1982]. Развивающаяся в ответ на спазм сосудов гипоксия приводит к

многочисленным патологическим изменениям тканевых структур и функции органов [Сидорова И.С. и соавт., 2016; Ходжаева З. С. и соавт., 2013; Милованов А.П., 2010; Зайнулина М.С., 1998; Roberts, J.M., 2013; Leeman, L., 2016; Moussa H.N., Arian\_S.E., Sibai\_V.M., 2014]. Многочисленные попытки объяснить патогенез сосудистого спазма и фиброза при преэклампсии до сих пор остаются безрезультатными. Свидетельство этому – отсутствие высокоспецифичных и эффективных методов лечения данной патологии.

## 1.2 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза – универсальная сигнальная система

Один из ключевых механизмов сердечно-сосудистого и водно-солевого гомеостаза в организме млекопитающих опосредован функцией мембрановстроенного фермента оубаин-чувствительной магнийзависимой натрий-калиевой аденозинтрифосфатазой ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой, NKA), открытой датским исследователем Скоу в 1957 году [Scou J.C. et al., 1957; 1992]. Функциональной активностью этого фермента обеспечиваются многие жизненно важные процессы в организме человека. Среди них - сокращение миокарда и натрийуретическая активность проксимальных отделов почечных канальцев, в которых происходит реабсорбция натрия и жидкости из первичной мочи [Brown J.W., McDonough A., 1987; Пальцев М.А. и соавт., 2003; Веренников А.А. и соавт., 1978; Болдырев А.А. и соавт., 1985, 1990].

Функциональная единица  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы представлена комплексом состоящим из трех полипептидов:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц [Lingrel J.B. et al., 1994].  $\alpha$ -субъединица NKA (~ 112 kDa) опосредует каталитические и транспортные свойства фермента и содержит участки связывания для катионов, АТФ, сердечных гликозидов и для эндогенных ингибиторов - эндогенного дигоксиподобного фактора (ЭДФ) [Blaustein M.P. et al., 1993; Lingrel J.B. et al., 1990; Mercer R.W. et al., 1993]. Существование изоформ  $\alpha$ -субъединицы натриевого насоса было доказано в результате экспериментов, выявивших

дифференциальную чувствительность НКА различного происхождения к препаратам дигиталиса [Blanco G. et al, 1998]. Идентифицировано четыре а-полипептида, ныне известных как а-1, а-2, а-3 и а-4 [Blanco G. et al, 1998]. b-субъединица НКА (40-60 kDa) обеспечивает модуляцию сродства фермента к ионам  $K^+$  и  $Na^+$  [Blanco G. et al, 1995]. b-субъединица представлена тремя изоформами. b-1 и b-2 найдены в различных тканях млекопитающих, в то время как b-3 изоформа была обнаружена у амфибий, грызунов и у человека [Blanco G. et al, 1998]. g-субъединица НКА (8-14 kDa) [Beguin P. et al, 1997; Forbush V. et al, 1978] сопряжена с а-субъединицей и проявляет высокую межвидовую гомологичность [Blanco G. et al, 1998].

Экспрессию как а-, так и b-изоформ НКА контролируют специфические гены [Lingrel J.V. et al, 1990, 1994]. а- и b-изоформы НКА обладают выраженной тканеспецифичностью. Так, а-1- и b-1-изоформы обнаружены практически во всех тканях млекопитающих, а-4-изоформа специфична для яичка [Blanco G. et al, 1998], а-2 преобладает в адипоцитах [Lytton J. et al, 1985], скелетной мышце [Hundal H.S. et al, 1992], кардиомиоцитах [Zahler R. et al, 1992] и головном мозге [Blanco G. et al, 1998], хрящевой и костной ткани [Mobasher et al., 2000] в то время как а-3 наиболее представлена в центральных и периферических нервных тканях [Blanco G. et al, 1998] и в проводящей системе сердца [Zahler R. et al, 1992].

Важность  $Na^+/K^+$ -АТФазы для клетки заключается в поддержании ионного гомеостаза, обеспечивающего ионный градиент по обе стороны мембраны.  $Na^+/K^+$ -АТФ-аза выступает в виде движущей силы в процессах возбуждения (натриевый насос) или вторично-активного транспорта и может регулировать содержание воды в цитоплазме, что обеспечивается меньшей гидрофобностью ионов натрия по сравнению с ионами калия [Модянов Н.Н. и соавт., 1994]. Функции основных ионов в клетке достаточно разнообразны. Ионы натрия регулируют осмотический гомеостаз организма, участвуют в поддержании кислотно-щелочного равновесия, стабилизируют структуру макромолекул и многие другие функции клетки. Ионы калия участвуют в регуляции процессов

возбуждения. Натриевый насос (молекулярной формой которого является  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза) контролирует многие функции клетки: объём клетки, теплообмен, мембранный потенциал, рН клеточной среды, концентрацию свободного кальция. В связи с этой функцией работа насоса строго регулируется концентрацией одновалентных ионов, АТФ и наличием эндогенных ингибиторов [Robinson J.D. et al, 1989; Петруняка В.В. и соавт., 1990; Панюшкина Е.А., 1994]. В результате многолетних исследований было установлено следующее:

- транспорт ионов натрия и ионов калия в процессе гидролиза АТФ тесно взаимосвязан (ни один из этих процессов не может осуществляться без другого);
- транспорт и гидролиз АТФ происходит лишь в том случае, если ионы натрия и АТФ присутствуют на внутренней поверхности мембраны, а ионы калия - с её наружной стороны. Это условие важно и в опытах *in vivo* и *in vitro*;
- оубаин (строфантин Е) ингибирует  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу только с наружной стороны мембраны, где и расположены рецепторы для него и для сердечных гликозидов;
- при гидролизе каждой молекулы АТФ три иона натрия выкачиваются наружу, а два иона калия закачиваются внутрь клетки; одна молекула фермента может гидролизовать 100 молекул АТФ в секунду [Болдырев А.А. и соавт., 1989, 1995; Фролова О.В. и соавт., 1996; Brown O.M. et al., 1983].

Дальнейшие исследования определили структурную организацию этого фермента, его кинетику и свойства.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза относится к АТФазам E1 и E2 типа, то есть к таким ферментам, которые затрачивают энергию АТФ на осуществление конформационных превращений, конечным результатом которых является перенос ионов через мембрану. В ряде исследований показано, что в присутствии ионов натрия фермент легко взаимодействует с АТФ, образуя фосфофермент (E - P, где E — обозначение молекулы белка фермента, а P - обозначение фосфорилированного остатка). Фосфофермент является промежуточным продуктом АТФазной реакции и может находиться в двух конформационных состояниях, условно обозначаемых как E1 и E2. Когда

фермент находится в состоянии E1, он способен взаимодействовать и с ионами натрия, и с АТФ с внутренней стороны мембраны. В результате фосфорилирования фермента образуется E1 - P, а АДФ высвобождается из активного центра и возвращается в цитоплазму. Фосфорилированный фермент переходит в состояние, при котором ионы натрия не способны высвободиться ни с внутренней, ни с внешней стороны мембраны, они становятся недоступными для обмена, то есть окклюзированными. Ионы магния активируют переход фермента в следующую стадию, которая заключается в переходе фосфорилированного фермента из конформации E1 в конформацию E2. Эта стадия отражает молекулярные перемещения белковой глобулы фермента, связанные с непосредственным переносом ионов натрия через мембрану. Таким образом, данный процесс осуществляется синхронно с конформационным переходом E1 - E2. Вследствие этого центр связывания ионов становится более гидрофобным, ионы натрия диссоциируют от молекулы фермента по другую сторону мембраны, где с этим же центром связываются ионы калия. Ионы калия подвергаются такой же окклюзии, как и ионы натрия, и в ходе этого процесса осуществляется перенос ионов калия через мембрану. Конформационная перестройка E1 - E2 обеспечивает перемещение центра связывания ионов внутрь мембраны. Это приводит к изменению сродства к переносимым ионам и одновременно делает ионный центр доступным для внешней или внутренней среды. Комплекс E2 - P отличается от своего предшественника тем, что окружение фосфатной группировки становится более гидрофильным. Вследствие этого происходит водный гидролиз комплекса E2- P (дефосфорилирование фосфофермента) и высвобождение неорганического фосфата во внутреннюю среду. После этого ионы калия диссоциируют от центра связывания, высвобождаясь в цитоплазму. Таким образом, за полный гидролитический цикл происходит выход из клетки 3 ионов натрия, обогащение цитоплазмы 2 ионами калия и гидролиз одной молекулы АТФ [Болдырев А.А. и соавт., 1989, 1985].

Предложены и другие схемы. Общим моментом для каждой из них является представление о том, что гидролиз АТФ, осуществляемый ферментом, трансформирует свободную энергию фосфорноэфирной связи в энергию конформационного напряжения молекулы, которая в свою очередь используется для трансмембранного переноса ионов [Cantly L.C., 1983; Пальцев М.А. и соавт., 2003; Модянов Н.Н. и соавт., 1994; Лопина О.Д. и соавт., 1999].

Есть данные в пользу существования альтернативной, или сигнальной, функции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Коллективом авторов было показано, что  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза участвует в клеточной передаче сигнала посредством взаимодействия с семейством Src-киназ и рецептором эпидермального фактора роста (EGFR), расположенных в кавеолах, в отсутствие активного транспорта натрия и калия [Liang M. et al., 2008]. Инкубация нескольких типов клеточных культур с КТС вызывает быстрое фосфорилирование EGFR, которое зависит от активации Src, и которое отчетливо отличается от аутофосфорилирования EGFR [Tian J. et al, 2003; Liu L. et al, 2003]. 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) [Kometiani P. et al., 1998; Liu J. et al., 2000, 2003, 2004; Tian J. et al., 2003, 2006; Mohammadi K. et al., 2001; Wang H. et al., 2004]. 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 [Tian J. et al., 2006]. 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 [Liu J. et al., 2002, 2004, 2005; Periyasamy S.M. et al., 2005]. Образование комплекса КТС с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой инициирует увеличение продукции внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), которое зависит от функции ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) [Priyadarshi S.

et al, 2003]. 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 [Graves S.W. et al, 1983; Priyadarshi S. et al, 2003, Liu J. et al, 2000; Kennedy D.J. et al., 2006].

Среди эндогенных неорганических веществ, способных влиять на активность этого фермента, известны комплексы ванадата  $\text{Va}^{3+}$  и  $\text{Va}^{5+}$ , концентрация которых особенно высока в почках и в сердце [Schwartz A., Adams R.J., 1980], и свободный внутриклеточный кальций [Brown O.M., Lew V.L., 1983]. Ингибирующее действие этих веществ на натрий-калиевый насос осуществляется с внутренней стороны клеточной мембраны [Лопина О.Д. и соавт., 1986]. Ионы магния ( $\text{Mg}^{+}$ ), напротив, увеличивают активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы [Страйер Л. И соавт., 1985]. Предполагается, что этот эффект обусловлен снижением способности фермента связываться с его эндогенными ингибиторами в присутствии магния [Shoemaker D.G., et al., 1983]. Среди органических соединений, модуляторами активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы являются различные гормоны, в том числе стероиды яичников и надпочечников, пептидные гормоны и нейротрансмиттеры и другие [Болдырев А.А. и соавт., 1985; Веренинов А.А. 1978; Doris P.A., 1996]. Инсулин, глюкагон [Weil E. et al., 1991], вазопрессин [Mendoza S.A., et al., 1980] непосредственно активируют  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу, увеличивая концентрацию внутриклеточного натрия. Тиреоидные гормоны и стероиды коры надпочечников влияют на биосинтез данного фермента [Karin N.J., Cook J.S., 1983].

Известными ингибиторами  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы являются вещества группы сердечных гликозидов, кардиоактивное действие которых было впервые показано Уильямом Уиттерингом в 1785 году при изучении действия наперстянки [Schwartz A., et al., 1975]. Кардиоактивные стероиды (сердечные гликозиды) – карденолиды и буфадииенолиды – состоят из агликона, или генина, имеющего стероидную структуру, и сахаристого компонента – гликона [Вотчал Б.Е., и



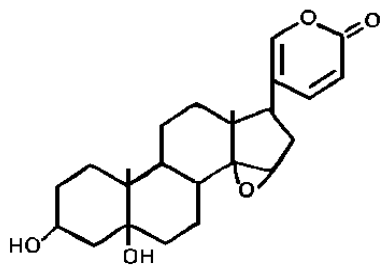
соавт., 1973]. Специфическим кардиотоническим действием обладает стероидный компонент вещества – генин. Хотя сахаристый остаток, агликон, не обладает специфическим кардиотоническим действием, от него существенно зависит сродство препарата к белкам плазмы и рецептору, а также быстрота его элиминации из организма. Высокая активность этих стероидов к рецепторам  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы и их химическое сродство со стероидными гормонами коры надпочечников позволили ряду исследователей предположить существование в организме млекопитающих эндогенного аналога сердечных гликозидов – эндогенного дигоксиноподобного фактора (ЭДФ).

Различность изоформ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы и их распределение по органам и тканям организма определяет разную чувствительность к КТС. Так, например,  $\alpha 1$ -изоформа расположенная в сосудах чувствительна к маринобуфагенину в низких концентрациях, и не чувствительна к оубаину, напротив  $\alpha 3$ -изоформа нервной ткани головного мозга чувствительна к оубаину в наномолярных концентрациях. В частности, есть свидетельства, что чрезвычайно низкие концентрации КТС, которые вряд ли ингибируют ферментативную функцию насоса натрия [Акімова ОА и соавт., 2005, 2008а; Orlov SN, Hamet P., 2006], способны инициировать сигнальные пути, которые могут быть чрезвычайно важны для различных клеточных функций.

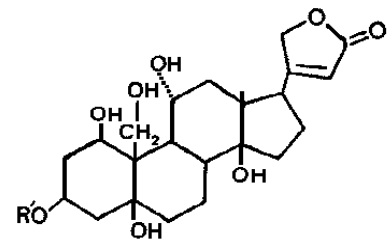
### **1.3 Кардиотонические стероиды и их роль в патогенезе преэклампсии**

На протяжении последних 50-60 лет внимание исследователей было уделено поиску «третьего фактора», обладающего свойствами дигиталисподобных веществ, ингибировать фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу. Значение и само существование этих веществ долгое время было предметом дискуссий [Kelly R.A. et al., 1992; Hansen O. et al., 2003]. Значимыми достижениями последних лет можно считать идентификацию отдельных эндогенных КТС [Hamlyn J.M. et al., 1991; Lichtstein D. et al., 1993; Bagrov A.Y. et al., 1998; Komiyama Y. et al., 2005],

разработку методов их определения и выяснение их роли в развитии ряда заболеваний [Schoner W. et al., 2007; Haddy F.J. et al., 2006; Orlov S.N., Hamet P., 2006; Pierre S.V. et al., 2006], а также открытие роли  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы в передаче клеточных сигналов [Nesher M. et al., 2007; Wasserstrom J.A., et al., 2005; Huang B.S. et al., 2006; Blaustein M.P. et al., 2006]. В настоящее время выявлено несколько эндогенных КТС, или дигиталис-подобных факторов, у человека. Оубаин, относящийся к классу карденолидов, и маринобуфагенин (МБГ) из класса буфадиенолидов, изучены наиболее подробно (Рисунок 1). В отличие от карденолидов, химическая структура которых представлена С-23 стероидами и содержит в боковой цепи ненасыщенное пятичленное лактонное кольцо, буфадиенолиды по своему химическому строению являются С-24 стероидами, имеющими ненасыщенное шестичленное лактонное кольцо [Bagrov A.Y. et al., 2009].



Буфадиенолид (маринобуфагенин)



Карденолид (оубаин)

Рисунок 1 — Строение кардиотонических стероидов на примере буфадиенолида и карденолида

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 [Siperstein M.D.

et al., 1957]. Однако, было показано, что прегненолон не включается в молекулу буфadiensолида [Siperstein M.D. et al., 1957; Payne A.H. et al., 2004]. На основании того, что МБГ синтезируется внепеченочно, а точнее в коре надпочечников и в плаценте [Murrell J.R. et al., 2005; Liu J. et al., 2004; Fedorova O.V. et al., 2002], а CYP7A1 экспрессируется исключительно в печени [Javitt N.B. et al., 1994], 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 буфadiensолидов, включая МБГ [Fedorova O.V. et al., 2015].

Физиологической функцией КТС является поддержание гомеостаза натрия и регуляция натрийуреза на уровне почек. Эндогенные КТС, связываясь с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азой, не только ингибируют трансмембранный транспорт моновалентных катионов, вызывая вазоконстрикцию, а также активируют Src-EGF-опосредованный путь клеточной сигнализации, что приводит к повышенной выработке коллагена и другим эффектам КТС. В настоящее время достаточно хорошо изучено участие КТС в патогенезе хронической почечной недостаточности, артериальной гипертензии, хронической сердечной недостаточности, сахарном диабете, а также преэклампсии.

Известно, что при преэклампсии у беременных на фоне снижения объёма циркулирующей крови развивается задержка жидкости, сопровождающаяся ретенцией натрия [Clark S.L. et al., 1991; Walters W.A. et al., 1970]. Одновременно происходит снижение клубочковой фильтрации, активности ренина и концентрации альдостерона в плазме крови. Ранее было показано, что повышение уровня ЭДФ в плазме крови также сопровождается снижением активности РААС

[Lindheimer M.D. et al., 1986; Weber M.A. et al., 2000]. В 1984 году американский исследователь Грейвс, сопоставив эти наблюдения с тем фактом, что задержка натрия и жидкости является стимулом для продукции ЭДФ, предположил, что между патогенезом объёмзависимой АГ и гипертензионным синдромом у беременных имеется определённое патогенетическое сходство, и что ЭДФ может играть существенную роль в генезе вазоконстрикции при преэклампсии [Graves S.W. et al., 1987]. В подтверждение этому в отдельных работах было показано, что уровень дигоксиподобной иммунореактивности в амниотической жидкости при беременности на фоне преэклампсии коррелирует с величиной АД [Adair CD. et al., 1996].

В 1996 году Hilton масс-спектрометрически идентифицировал вещество буфаденолидной природы в человеческой плаценте [Hilton P.J. et al., 1996]. Впоследствии было показано, что основным претендентом на роль эндогенного дигиталисного фактора является буфаденолид МБГ [Fedorova O. V. et al., 1997, 2005; Bagrov A. Y. et al., 1996].

Основным источником МБГ у беременных является плацента. Последние исследования, направленные на изучение синтеза МБГ, показали, что клетки человеческого трофобласта JEG-3 способны синтезировать МБГ [Fedorova O. V., 2015]. А при сравнении количества МБГ в плаценте пациенток, страдающих преэклампсией, с контрольной группой было продемонстрировано его четырехкратное увеличение [Nikitina E. R. et al., 2011].

Однако при нормально протекающей беременности увеличение продукции МБГ не сопровождается развитием артериальной гипертензии, что можно объяснить умеренным повышением уровня МБГ и даун-регуляцией рецепторов для МБГ в сарколемме сосудов. При физиологически протекающей беременности увеличение концентрации МБГ в плазме крови происходит уже в первом триместре беременности. Затем концентрация гормона непрерывно нарастает, и максимально высокие концентрации наблюдаются в третьем триместре беременности [Podjarny E. et al., 1999; Vu I.V. et al., 2005; Лопатин Д.А., 2001].

Коллективом авторов под руководством А.Я. Багрова в 1999 году доказано, что уровень МБГ в плазме крови у беременных с преэклампсией почти в 3 раза превышает показатели, определяемые при физиологическом течении беременности [Loratin D.A. et al., 1999]. В ходе проведенных экспериментов на сарколемме человеческих лёгочных и мезентериальных артерий авторы показали, что в «патофизиологическом» диапазоне концентраций (1-3 нмоль/л) МБГ вызывает 25% угнетение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в сарколемме человеческих легочных артерий и вызывает сокращения (20% от возможного максимума) мезентериальных артерий. Этими авторами получены убедительные доказательства того, что концентрации МБГ, существующие в плазме крови у беременных с преэклампсией, способны внести существенный вклад в развитие системной вазоконстрикции. Следовательно, МБГ является одним из вероятных патогенетических факторов развития гипертензионного синдрома при преэклампсии [Лопатин Д.А., 2001].

Так, в экспериментах на сосудах пуповины, МБГ повышает ее сократимость и нарушает эндотелий-независимые механизмы ее релаксации, а в свою очередь применения антител к КТС восстанавливает релаксирующие свойства [Nikitina E. R. et al., 2011].

Роль КТС в развитии преэклампсии была исследована и в эксперименте на животных. При замене питьевой воды на 1,8% раствор хлорида натрия в течение 14–20 дней беременности у крыс линии Sprague-Dawley привело к увеличению плазменной концентрации МБГ, без повышения уровня оубаина, к повышению АД, развитию протеинурии и снижению веса, роста и количества плодов [Fedorova O.V. et al., 2005]. А введение антител к МБГ привело к снижению АД и к восстановлению активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы в сосудах [Fedorova O.V. et al., 2005]. У беременных крыс с АГ, индуцированной путем введения ацетата дезоксикортикостерона и повышенного употребления соли, была выявлена повышенная чувствительность маточных артерий к сосудосуживающему действию МБГ, а антитела к МБГ обладали антигипертензивным действием [Vu H.V. et al., 2005].

В последнее время исследователи проявляют большой интерес к процессам инвазии и имплантации и адекватной плацентации в качестве залога успешной беременности. Существует гипотеза о «несовершенной плацентации» и развитии в последующем плацентопосредованных заболеваний у беременных, в том числе преэклампсии, задержки внутриутробного роста плода, невынашивания беременности.

Установлено, что МБГ нарушает процессы пролиферации, миграции и инвазии клеток цитотрофобласта (ЦТБ) [Uddin M.N. et al., 2008; LaMarca H.L. et al., 2006]. Это специализированные клетки производные плаценты, которые вторгаются в децидуальную оболочку матки [Nortwitz E.R. et al., 2001] и участвуют в ремоделировании спиральных артерий, где происходит преобразование артериол с высоким сопротивлением, малого диаметра на низкорезистентные сосуды с широким просветом [Pijnenbort R. et al., 1980]. Таким образом, МБГ оказывает пагубные последствия на клеточное функционирование ЦТБ человека [Uddin M.N. et al., 2008; LaMarca H.L. et al., 2006], что предполагает роль МБГ в патологической плацентации и нарушении функций, характеризующих преэклампсию. Так МБГ вызывает увеличение сигнализации апоптоза в культуре клеток ЦТБ [Uddin M.N. et al., 2008]. МБГ-индуцированный апоптоз клеток ЦТБ связан с потенцированием p38 и Jnk активностью и с повышенной секрецией интерлейкин-6 [Uddin M.N. et al., 2008]. Также исследовано влияние КТС на клетки трофобласта – КТС индуцируют антиангиогенный профиль: (I) увеличивают экспрессию рецептора ангиотензин-2; (II) снижают экспрессию рецепторов ангиотензин-1 и VEGF-1 рецептора; (III) увеличивают секрецию sFlt-1 и sEnd; и (IV) уменьшают секреции VEGF и PlGF [Ehrig J.C. et al., 2014]. Также изучено, что МБГ вызывает повышенную проницаемость сосудов на модели крыс [Uddin M.N. et al., 2009]. Таким образом, можно предположить, что МБГ играет роль в развитии «утечки» жидкости из сосудистого русла в интерстиций при преэклампсии, в первую очередь развитие отека мозга.

В литературе описано, что МБГ в наномолярных концентрациях стимулирует синтез коллагена в сердечно-сосудистых тканях и в почках, также в пупочной артерии [Kennedy D.J. et al., 2006; Elkareh J. et al., 2007; Nikitina E. R. et al., 2011]. Важно отметить, что профибротические эффекты МБГ вероятно проявляются в ингибировании транскрипционного фактора Fli-1, являющегося отрицательным регулятором синтеза коллагена-1 [Elkareh J. et al., 2009; Haller S.T. et al., 2012]. В исследовании на умбиликальных артериях, полученных от беременных женщин, страдавших преэклампсией, содержание коллагена повышено почти в 2 раза по сравнению с физиологической беременностью, а экспрессия Fli-1 резко снижена. А при исследовании сократительных свойств экспланты умбиликальных артерий продемонстрировали низкую чувствительность к вазорелаксантному эффекту нитропруссид натрия [Nikitina E. R. et al., 2011].

Таким образом, МБГ может представлять перспективную мишень для патогенетической терапии гипертензионного синдрома преэклампсии.

#### **1.4 Возможности терапевтического влияния на патологические эффекты маринобуфагенина**

*Иммунонейтрализация* КТС является перспективным терапевтическим подходом. В течение последних 30 лет в литературе описано достаточное количество случаев успешного использования препарата «Digibind» (Glaxo-Smith Kline, Research Triangle Park, North Carolina) в акушерских клиниках США у беременных с преэклампсией. «Digibind» представляет собой препарат очищенных поликлональных антител к дигоксину и был создан специально для лечения токсических передозировок сердечными гликозидами. За счет своей перекрестной иммунореактивности с эндогенными дигоксиноподобными факторами «Digibind» способен нейтрализовать подобные дигоксину стероиды, в том числе МБГ и оубаин, и приводить к снижению АД [Adair C.D. et al., 1996;

Goodlin R.C. et al., 1988]. В 2013 году в Американском журнале акушерства и гинекологии (AJOG) опубликовано двойное слепое плацебо-контролируемое исследование по применению препарата «Digibind» (DIF) у женщин с преэклампсией с высоким содержанием ЭДФ. Ученые сделали следующие выводы: 1. беременные, получавшие DIF – клиренс креатинина ниже по сравнению с плацебо ( $-4.5 \pm 12.9$  mL/min vs  $-53.2 \pm 12.6$  mL/min;  $P=0.005$ ); 2. антигипертензивный эффект недостоверный по сравнению с плацебо (41% vs 63%;  $P = 0.12$ ); 3. отек легких встречается реже (1/17 vs 6/19 плацебо;  $P=0.035$ ); 4. ниже частота неонатального ВЖК (DIF: 0/17 w. vs плацебо: 5/19 w;  $P = 0.015$ ). Также авторы заключили, что данное исследование требует проведения многоцентрового исследования [Lam G.K. et al., 2013]. По неизвестным нам причинам компания-производитель (Glaxo-Smith Kline, Research Triangle Park, North Carolina) перестала выпускать данный препарат («Digibind»). Единственным коммерческим препаратом поликлональных антител к дигоксину на рынке остался «Digifab» (BTG International Ltd., Великобритания), а исследований о его применении у беременных в доступной литературе не встречается.

В лаборатории под руководством А.Я. Багрова в ходе изучения характеристик и свойств МБГ разработано 2 клона специфичных моноклональный антител к МБГ – 3E9 и 4G4 [Fedorova O.V. et al., 2008]. На модели сольчувствительной гипертензии у беременных крыс на солевой диете оценен антигипертензивный эффект 3E9-антител и «Digibind». Как и «Digibind», 3E9 имели гипотензивное действие, однако эффект был более выраженным и стойким [Fedorova O.V. et al., 2008]. Кроме того, в эксперименте *ex vivo* 3E9 восстанавливали фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу эритроцитов, полученных от беременных женщин, страдающих преэклампсией, в то время как «Digibind» в высокой дозе (10мкг/мл) смог лишь частично восстановить активность натриевого насоса [Fedorova O. V. et al., 2008]. 4G4-антитела в настоящее время используются для количественной оценки МБГ в биологических жидкостях, так как иммунологический анализ на основе этих антител является



высокочувствительным [Fedorova O. V. et al., 2008]. Позже действие 3E9-антител в сравнении с «Digibind» было изучено на экспериментальной модели почечной недостаточности у крыс [Haller S.T. et al., 2012]. В эксперименте оценивался антигипертензивный эффект, а также способность устранять миокардиальный фиброз. В результате одной инъекции моноклональных 3E9 антител нефрэктомизированным крысам, развившим синдром уремической кардиомиопатии, удалось реверсировать миокардиальный фиброз. Кроме того, 3E9-антитела продемонстрировали выраженный и стойкий, длящийся в течение одной недели, антигипертензивный эффект. При этом после инъекции «Digibind» САД понизилось лишь временно, а через 24 часа гипотензивный эффект нейтрализовался полностью. В дополнение к антигипертензивному эффекту и 3E9 и «Digibind» в различной степени понизили уровень плазменного креатинина и восстановили его клиренс [Haller S.T. et al., 2012]. В недавних исследованиях при МБГ-индуцированном АД-независимом фиброзе стенки сосуда моноклональные антитела 3E9, блокируя связывание МБГ с Na/K-АТФ-азой, реверсируют фиброз, тем самым улучшают функциональные свойства сосуда [Grigорова Y. N. et al., 2016].

*Производные альдостерона.* Спиринолактон и его основной метаболит канренон (canrenone) также являются потенциальными антагонистами КТС на уровне их связывания с рецепторной частью натриевого насоса. В эксперименте как спинолактон, так и канренон препятствуют связыванию оубаина с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азой, а также предотвращают вызванное КТС угнетение натрий-калиевого насоса [Finotti P. et al., 1981]. Канренон снижает АД и восстанавливает активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы у крыс с объемзависимой АГ [de Mendonza M. et al., 1988]. Также, спинолактон, и канренон ослабляют индуцированное МБГ увеличение синтеза коллагена миокардиальными фибробластами [Tian J. et al., 2009], что было подтверждено *in vivo* отчетливым уменьшением кардиального фиброза, вызванного экспериментальной почечной недостаточностью у крыс, в результате лечения спинолактоном [Tian J. et al., 2009]. МБГ-индуцированный

фиброз эксплантов аорты крыс и культуры гладкомышечных клеток стенки сосуда реверсировался при лечении канреноном, также восстанавливалась нарушенная вазорелаксантность [Fedorova O.V. et al., 2015]. При добавлении к терапии пациентам с резистентной гипертензией и высоким уровнем маринобуфагенина препарата «Верошпирон» отмечалось снижение пульсовой волны и снижение АД, восстановление фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов, по сравнению с пациентами получающими плацебо [Fedorova O.V. et al., 2015].

Производя поиск новых лекарственных препаратов, привлек внимание гестаген IV поколения - дроспиренон. Оказалось, что при использовании данного вещества у женщин с артериальной гипертензией он обладает некоторым гипотензивным эффектом [Радзинский В.Е., Полина М.Л., 2011]. Дроспиренон был разработан на основе  $17\alpha$ -спиронолактона. Действует этот препарат по принципу антагонизма с альдостероном (подавляет активность РААС). Молекула дроспиренона отличается от спиронолактона лишь отсутствием SO-группы и этинильного радикала (Рисунок 2).

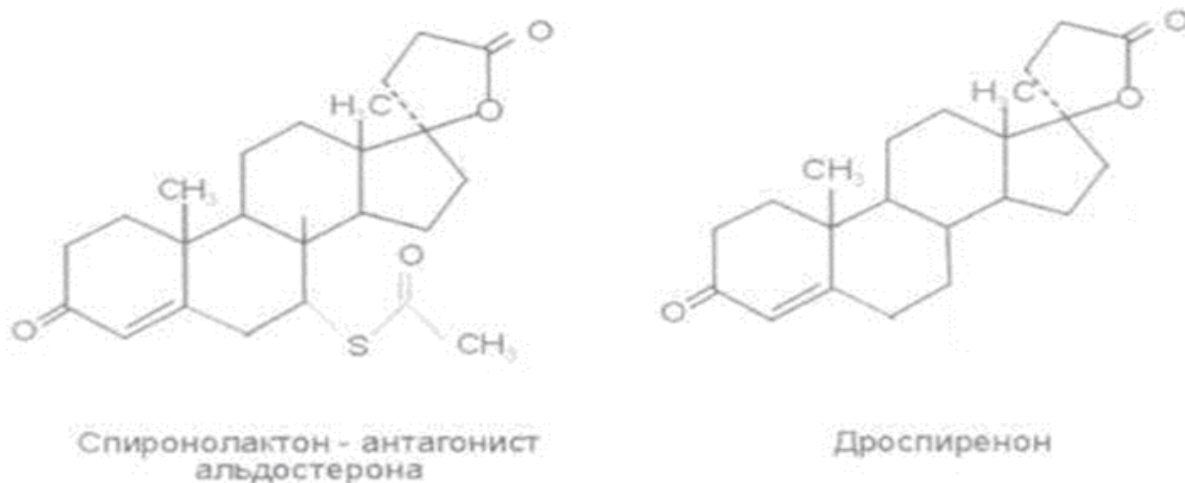


Рисунок 2 – Строение производных альдостерона на примере спиронолактона и дроспиренона

Такого незначительного «обрезания» вполне хватило для того, чтобы полностью изменить профиль действия вещества, превратив его из диуретика в

аналог прогестерона. Уникальный механизм действия дроспиренона помимо влияния на рецепторы собственно прогестерона обусловлен его мощным антиминералокортикоидным и антиандрогенным потенциалом. При этом дроспиренон лишён эстрогенной и глюкокортикоидной активности, высокоселективен как гестаген за счёт активации только прогестероновых рецепторов [Africander D. et al., 2011; Endrikat J.S. et al., 2009]. При этом молекула дроспиренона действительно оказалась инновационной: среди всех прогестагенов именно его максимальное биологическое сходство с эндогенным прогестероном (и в том числе антиминералокортикоидное действие) открывает перспективные лечебные и защитные возможности.

Дроспиренон конкурентно связывается с альдостероновыми рецепторами в 8 раз активнее своего предшественника спиронолактона (измерено по отношению экскреции  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ). Рецепторная сеть к минералокортикоидам довольно обширна, в том числе имеется в почках и головном мозге [Кузнецова И.В., Побединский Н.М., 2004].

Неоднократные клинические исследования доказали, что этот гестаген препятствует развитию эндотелиальной дисфункции, предупреждает сосудистый и миокардиальный фиброз посредством уменьшения толщины и повышения эластичности сосудистой стенки. Эти эффекты авторы связывают с активацией «депрессорной» системы эндотелия и выбросом сильнейшего вазодилататора — оксида азота [Preston R.A. et al., 2005; Meendering J.R. et al., 2010]. Однако, возможен антагонизм с КТС за связывание с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азой. Также, в лабораторных условиях в опыте с мышами, которым была произведена оварэктомия и односторонняя нефрэктомия и дополнительно вводили альдостерон на высокосолевой нагрузке, дроспиренон во всех проверенных дозировках давал большее благоприятное защитное действие на сердечную гипертрофию, сосудистое воспаление, эндотелиальную дисфункцию и экспрессию остеопонтина в условиях непропорциональной активации МР, чем медроксипрогестерона ацетат [Arias-Loza PA et al., 2006]. Таким образом, можно

предположить, что механизм действия дроспиренона также может быть связан с препятствием ингибирования КТС  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы.

*Ионы магния.* Взаимодействия между дигиталисом/КТС и их рецептором на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азе регулируются многими факторами, включая  $\text{Mg}^{2+}$  ионы [Skou J.C. et al., 1971; Akera T. et al., 1974]. В частности, *in vivo*  $\text{Mg}^{2+}$  ионы противодействуют вызванной дигиталисом токсичности, опосредованной подавлением фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы [Reisdorff E.J. et al., 1986]. Дефицит магния, напротив, повышает чувствительность миокарда к проаритмическому действию дигиталиса [Kelly R.A., Smith T.W., 1992]. Известно, что распространенность дефицита магния среди беременных женщин составляет 80,9% [Серов В.Н. и др., 2014]. Профилактический прием препаратов магния во время беременности снижает частоту диагностированных осложнений беременности по сравнению с группой сравнения [Сидорова И.С., Унанян А.Л., 2013]. При преэклампсии сульфат магния 25 % улучшает центральную артериальную комплаентность [Rogers D.T. et al., 2010]. Авторы показали, что этот эффект был наиболее выражен после 4 часов инфузии и оставался на протяжении 24 часов после завершения терапии  $\text{MgSO}_4$ , что указывало на либо устойчивый эффект артериального соответствия, либо разрешение сосудосуживающего эффекта преэклампсии. Принимая во внимание указанные выше сведения и тот факт, что сульфат магния оказывает положительное действие при преэклампсии [Karumanchi S.A., Lindheimer M.D., 2008], выдвинута гипотеза о том, что  $\text{MgSO}_4$  снижает чувствительность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы к воздействию КТС и усиливает действие антител к дигоксину на снижение АД при преэклампсии.

Таким образом, дальнейшее изучение роли кардиотонических стероидов в патогенезе преэклампсии является актуальной темой. А поиск медикаментозной возможности регуляции их патологического влияния, может дать начало разработке перспективных подходов эффективной патогенетической терапии преэклампсии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Дизайн исследования

Для выполнения поставленных задач проведено клинико-экспериментальное исследование, дизайн которого представляет собой «случай-контроль».

Методы данного исследования одобрены Этическим комитетом ФГБУ «Национальным медицинским исследовательским центром имени В.А. Алмазова» Минздрава РФ.

В исследование включено и обследовано 106 пациенток. Подбор, клиническое наблюдение беременных женщин и забор биологического материала проводился в ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Перинатальном центре клиники Института перинатологии и педиатрии в отделении патологии беременности и родильном отделении.

Все включенные в исследование беременные были разделены на 2 группы:

Основная группа – пациентки, чья беременность осложнилась преэклампсией (n = 59).

Группа сравнения – пациентки с физиологическим течением беременности (n = 47).

Критерии включения в основную группу:

1. срок гестации 37 - 41 неделя беременности
2. одноплодная беременность
3. наличие клинических симптомов преэклампсии (артериальная гипертензия, протеинурия) с оценкой по шкале тяжести >8 баллов
4. информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии включения в группу сравнения:

1. Срок гестации 37 – 41 неделя беременности
2. одноплодная беременность

3. физиологическое течение беременности
4. информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения в исследование для обеих групп:

1. прием препаратов влияющих на функционирование фермента натрий-калиевой аденозинтрифосфотазы (препараты дигиталиса, антагонисты альдостерона, препараты магния)
2. хроническая артериальная гипертензия
3. хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, осложненные сердечной недостаточностью
4. хронические заболевания почек с нарушением функции
5. хронические заболевания печени с нарушением функции
6. заболевания эндокринной системы (заболевания щитовидной железы, сахарный диабет, врожденная гиперплазия коры надпочечников, гиперальдостеронизм)
7. системные заболевания (системная красная волчанка, склеродермия, васкулиты и др.)
8. Ожирение 2-3 ст. в I триместре беременности
9. отказ от участия в исследовании.

Диагноз преэклампсия во время беременности устанавливали на основании жалоб пациентки, клинического обследования, данных соматического, акушерско-гинекологического анамнеза, анализа течения настоящей беременности, данных ультразвуковой фетометрии и доплерометрии.

Критерии постановки диагноза [SOGC Clinical Practice Guideline. No. 307, 2014; ACOG Practice Bulletin No. 125, 2012; РМОАГ, 2008]:

1) систолическое АД 140 мм рт. ст. и/или диастолическое АД 90 мм рт. ст., определенное как среднее в результате, как минимум, 2-х измерений, проведенных на одной руке через 15 минут

2) Протеинурия (экскреция белка с мочой составила более чем 0,3 г/24 ч или концентрация белка в моче – более чем 1 г/л, по крайней мере, в 2 случайных

пробах мочи, полученных с интервалом в 6 часов и более), при выраженной АГ и/или других симптомов преэклампсии может и не быть

3) начало регистрации симптомов после 20й недели беременности.

Диагноз формулировали в соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем, X пересмотра (МКБ-10) [<http://mkb-10.com/index.php?pid=14085>] (Таблица 1).

Таблица 1 - Классификация гипертензивных расстройств во время беременности МКБ-10

МКБ-10 Класс XV: беременность, роды и послеродовой период Блок O10-O16: отеки, протеинурия и гипертензивные расстройства во время беременности, родов и послеродовом периоде.		
O 10	Существовавшая ранее гипертензия, осложняющая беременность, роды и послеродовой период	Хроническая АГ
O 10.0	Существовавшая ранее эссенциальная гипертензия, осложняющая беременность, роды и послеродовой период	Хроническая АГ (ГБ)
O 10.4	Существовавшая ранее вторичная гипертензия, осложняющая беременность, роды и послеродовой период	Хроническая АГ (вторичная АГ)
O 11	Существовавшая ранее гипертензия с присоединившейся протеинурией	ПЭ на фоне хронической АГ
O12	Вызванные беременностью отеки и протеинурия без гипертензии	
O12.0	Вызванные беременностью отеки	
O12.1	Вызванная беременностью протеинурия	
O12.2	Вызванные беременностью отеки с протеинурией	
O13	Вызванные беременностью гипертензия без значительной протеинурии	Гестационная АГ
O14	Вызванные беременностью гипертензия со значительной протеинурией	Преэклампсия (ПЭ)
O14.0	Преэклампсия [нефропатия] средней тяжести	ПЭ умеренно выраженная
O14.1	Тяжелая преэклампсия	ПЭ тяжелая
O14.9	Преэклампсия [нефропатия] неуточненная	
O15	Эклампсия	Эклампсия
O15.0	Эклампсия во время беременности	Эклампсия во время беременности
O15.1	Эклампсия в родах	Эклампсия в родах
O15.2	Эклампсия в послеродовом периоде	Эклампсия в послеродовом периоде
O15.9	Эклампсия неуточненная по срокам	Эклампсия неуточненная по срокам
O16	гипертензия у матери неуточненная	

Для оценки степени тяжести преэклампсии использовались параметры согласно национальным рекомендациям по диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний при беременности, разработанные Комитетом экспертов Всероссийского научного общества кардиологов [Стрюк, Р.И. и соавт., 2018] (Таблица 2).

Таблица 2 – Критерии тяжести преэклампсии (Национальные рекомендации по диагностике и лечению сердечно-сосудистых заболеваний при беременности Всероссийского общества кардиологов – ВНОК)

Показатель	Умеренно выраженная	Тяжелая
Артериальная гипертензия	$\geq 140/90$ мм рт.ст.	$> 160/110$ мм рт.ст.
Протеинурия	$>0,3$ но $< 5$ г/сут	$> 5$ г/сут
Креатинин	норма	$> 90$ мкмоль/л
Олигурия	отсутствуют	$<500$ мл/сут
Нарушение функции печени	отсутствуют	повышение АлАТ, АсАТ
Тромбоциты	норма	$<100 \times 10^9$ /л
Гемолиз	отсутствует	+
Неврологические симптомы	отсутствуют	+
Задержка роста плода	- / +	+

Также использовались критерии оценки степени тяжести преэклампсии по протоколам Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, созданные на основании Российских рекомендаций «Диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний при беременности» (Таблица 3) [Зазерская, И.Е. и соавт., 2016].

Таблица 3 - Определение степени тяжести преэклампсии в модификации Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова»

	1	2	3
АД, мм.рт.ст.	130/90-150/90	151/91-160/110	$> 161/111$
Протеинурия, г/сут	0,3-1,0	1,1-5,0	$> 5,1$
Креатинин, мкмоль/л	норма	норма	$> 90,0$
Олигурия, мл/сутки	отсутствует	отсутствует	$< 500,0$
Нарушение функции печени	отсутствует	отсутствует	Повышение АлТ, АСТ
Тромбоциты	норма	норма	$<100 \times 10^9$ /л
Гемолиз	отсутствует	отсутствует	присутствует
Неврологический симптомы	отсутствуют	отсутствуют	присутствуют



Задержка внутриутробного развития плода	отсутствует	Отставание на 1-2 недели	Отставание на 3 недели и более
Срок беременности при котором впервые диагностирована преэклампсия, недели	36 0/7 – 40	30 0/7 – 35 6/7	20 1/7 – 29 6/7
Примечание: 3-11 баллов – умеренная преэклампсия, 12 и более баллов – тяжелая преэклампсия.			

(Продолжение Таблицы 3)

При поступлении в отделение патологии беременности или родильное отделение перинатального центра ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» у беременных, подходящих под критерии исследования, производился забор биологического материала (венозная кровь 10 мл в гепаринизированные пробирки). Забор крови производился в течение 3-6 часов после регистрации выраженного подъема артериального давления или на фоне выраженных симптомов преэклампсии - отеков и протеинурии. В группе беременных с физиологически протекающей беременностью забор крови производился в условиях дородового отделения в доношенном сроке беременности. После родоразрешения, включенных пациентов, производился забор частей последа (1/8 сектора плаценты и 10 см отрезок пуповины средней части помещались в транспортную среду).

Лечение преэклампсии проводили по стандартным протоколам, утвержденным научно-клиническим советом ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России Института перинатологии и педиатрии, которое включало: гипотензивную терапию, магниальную терапию, сохранение ОЦК, электролитного, белкового баланса, нормализация реологических и коагуляционных свойств крови [Зазерская, И.Е. и соавт., 2016].

В специально разработанную карту вносились анамнестические сведения, данные о возрасте, экстрагенитальных заболеваниях и акушерско-гинекологическом анамнезе. Ретроспективно изучены индивидуальные карты беременных и родильниц (форма 111/у) и история родов (форма 096/у). Срок

гестации устанавливали на основании совокупности следующих сведений: даты последней менструации, первой явки в женскую консультацию, первого шевеления плода, данных УЗИ плода в первом триместре, мнения беременной о сроке гестации. При оценке родового акта учитывался сроки и методы родоразрешения, осложнения родового акта, оказанные акушерские пособия в рода. При обследовании новорожденных особое внимание уделялось состоянию при рождении. Оценивались масса и длина тела при рождении, оценка по шкале Апгар на первой и пятой минутах жизни.

У всех пациенток проводили анализ анамнестических данных, объективного и специального акушерского исследований, консультативных заключений специалистов. Комплекс проведенных лабораторных исследований включал: клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, исследование суточной протеинурии, определение в сыворотке кардиотонических стероидов, исследование активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов, определение содержания коллагена-1 и Flt-1 в плацентарной ткани, морфометрическое исследование плацентарной ткани, изучение упруго-эластических свойств артерии пуповины. Лабораторно проведен ряд экспериментов по изучению возможности медикаментозной коррекции патологического влияния МБГ.

Базы проведения научного исследования:

1. ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Перинатальный центр клиники Института перинатологии и педиатрии, кафедра акушерства и гинекологии института медицинского образования.

ЦКДЛ под руководством Васильевой Е.Ю. (клинический и биохимический анализы крови, общий анализ мочи, исследование суточной протеинурии).

НИЛ патоморфологии под руководством д.м.н. Митрофановой Л.Б. (морфометрическое исследование эксплантов плацент).

2. ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, РАН, Санкт-Петербург. Лаборатория нейрофизиологии и патологии

поведения, заведующий д.м.н. Алексей Юрьевич Егоров, главный научный сотрудник, д.м.н. А.Я. Багров (исследование активности Na/K-АТФазы эритроцитов, определение уровней КТС в плазме, определение коллагена-1 и Fli-1 в плацентарной ткани и артерии пуповины, изучение упруго-эластичных свойств артерии пуповины, постановка экспериментов).

Для выполнения данного исследования заключено соглашение между исследовательскими центрами.

Работа выполнена в ходе государственного задания МЗ РФ тема НИР №25 «Поиск предикторов и терапевтических мишеней гестационных осложнений и заболеваний новорожденных и детей». Также исследования поддержаны федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (№ 14.740.11.0928).

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Метод определения кардиотонических стероидов (маринобуфагенин, оуабаин, дигоксин) в плазме крови беременных: иммунофлуорометрический метод DELFIA**

Аликвотные пробы (точно измеренная часть образца, которая сохраняет свойства основного образца) плазмы по 250 мкл пациенток с ПЭ и из контрольной группы были выделены при помощи обратнофазных микрохроматографических колонок SepPak C-18 (Waters, Milford, Massachusetts) и элюированы 80%-ым ацетонитрилом. В основе используемого метода хроматографического разделения маринобуфагенин-содержащих и оуабаин-содержащих фракций лежала различная степень полярности этих молекул.

Колонки промывали 10 мл дистиллированной воды и активировали 10 мл ацетонитрила. Затем колонки промывали 10 мл воды и на них наносили по 0,5 мл плазмы крови. Через 5 минут колонки промывали 10 мл воды и затем

последовательно 7,5 мл 32% ацетонитрила и 7,5 мл 80% ацетонитрила. Полученные экстракты каждого образца плазмы крови объединяли в одну пробирку.

Затем пробы лиофилизировали и непосредственно перед иммунологическим анализом растворяли в стандартном буфере, доводя объём до исходного уровня.

Концентрацию маринобуфагенин-подобной иммунореактивности в экстрагированных образцах плазмы измеряли способом, разработанным А.Я. Багровым и соавторами [Багров А.Я. и соавт., 1997] на основе иммунофлуориметрического метода DELFIA (dissociation enhanced anthanide fluoroimmunoassay). Отдельные пробы использовались для измерения КТС с применением сравнительного иммунофлуоресцентного анализа мышинных 4G4 МАТ к МБГ, поликлональных кроличьих антител к убаину Anti-OU-M-2005 и поликлональных кроличьих антител к дигоксину (Sigma Chemicals, St Louis, Missouri), что было детально описано в работах [Fedorova O.V. et al., 2008, 2005]. В основе данного метода лежит сравнение иммобилизованного антигена (МБГ-гликозид-тиреоглобулин) с МБГ, другими перекрестными реактантами или эндогенными КТС в пробе на предельное количество активных центров МАТ к МБГ. Перекрёстная иммунореактивность использованных в настоящем исследовании антител с различными эндогенными дигоксиноподобными факторами представлена в Таблице 4. Как следует из Таблицы 4 антитела к МБГ обладают очень высокой чувствительностью и специфичностью.

Таблица 4 — Перекрестная иммунореактивность использованных антител с различными КТС

Кроссреагенты	4G4 МАТ к МБГ %	Поликлональные анти-дигоксиновые антитела %	Anti-OU-M-2005 %
Маринобуфагенин	<b>100</b>	0,2	0,036
Маринобуфотоксин	43	-	0,06
Цинобуфоталин	40	-	-
Телоцинобуфагин	14	-	0,02
Резибуфагенин	0,5	-	0,15
Буфалин	0,08	0,01	0,1
Цинобуфагин	0,07	<0,01	0,02

Дигоксин	0,03	<b>100</b>	1,8
Оуабаин	0,005	<0,01	<b>100</b>
Оуабагенин	-	-	52
Дигоксигенин	0,004	-	-
Просцилларидин А	<0,001	-	0,03
Дигитоксин	<0,001	10	0,47
Альдостерон	<0,001	-	0,04
Прогестерон	<0,001	-	0,002
Преднизолон	<0,001	-	0,001
Кортикостерон	<0,001	-	-
Тиреоглобулин	<0,001	-	-

(Продолжение Таблицы 4)

Пробы плазмы по 250 мкл от каждой группы были смешаны, выделены с помощью патронов экстракции С-18, как указано выше, высушены, восстановлены в 10%-ом ацетонитриле и фракционировались на системе Agilent 1100 серии ВЭЖХ (HPLC) с применением Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Palo Alto, California), 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мк, колонка 80 Å, скорость истечения 1мл/мин, в градиентном режиме (10%-85,5%) ацетонитрила к 0,1% трифторуксусной кислоты в течение 45 минут. Тридцать 1,5-минутных фракций были получены и исследованы на иммунореактивность МБГ с помощью анализа на основе 4G4 МАТ к МБГ и 3E9 МАТ к МБГ, антитела, снижающего артериальное давление при экспериментальной гипертензии и *ex vivo* нейтрализующего ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы, вызванное ПЭ [Fedorova O.V. et al., 2008], и дигоксин-подобную иммунореактивность с помощью анализа на основе «Digibind» и «DigiFab». Для иммуноанализа на дигоксин мы поместили антитела: «Digibind» и «DigiFab» с помощью набора для маркирования европием Perkin-Elmer (Waltham, MA). Анализ основан на сравнении КТС в пробе и конъюгата дигоксина с бычьим сывороточным альбумином, иммобилизованного на нижней поверхности иммунопреципитационных пластин на предельное количество активных центров «Digibind» и «DigiFab». Чувствительность иммунологического анализа «Digibind» и «DigiFab» к дигокину составляет 0,01 нмоль/л.

Все химические вещества произведены компанией Сигма-Олдрич (St. Louis, MO). «Digibind» произведен компанией Glaxo-Smith Kline (Research Triangle Park, NC), а «DigiFab» – от компании BTG International Ltd (London, UK). Маринобуфагенин (>98% чувствительность ВЭЖХ) был выделен из секретиции околоушных желез жабы *Bufo marinus* [Bagrov A.Y. et al., 1993], МАТ к МБГ 4G4 и 3E9 были получены при иммунизации мышей МБГ, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином производства фирмы Sigma Chemicals (США) [Fedorova O.V. et al., 2008].

### **2.2.2 Метод измерения активности $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы в эритроцитах**

В течение первых суток после забора крови в 6 мл данного образца начинали определение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мембранах цельных эритроцитов крови. Для измерения активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы использовалось 0,5 мл цельной крови. Эритроциты отмывались 3 раза в изотоническом растворе (145 ммоль/л NaCl в 20ммоль/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 mmol/L; 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, этилендиаминтетраацетиловая кислота 0.5 ммоль/л, Tris 50 ммоль/л, АТФ 2ммоль/л (pH = 7.4, 37 °C) в конечном разведении 1:40. Реакция останавливалась добавлением трихлорацетиловой кислоты до конечной концентрации 7%. Общая активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы измерялась продукцией неорганического фосфата ( $\text{P}_i$ ). Разница между активностью  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы в присутствии и отсутствии 5 ммоль/л оуабаина была принята за активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы.

### **2.2.3 Методика эксперимента «Изучение иммунонейтрализующего действия поликлональных антител к дигоксину и моноклональных антител к маринобуфагенину на активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-аза эритроцитов беременных с преэклампсией»**

In vitro. определили по ранее описанной методике активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах у пациенток с преэклампсией. Для проведения эксперимента, помимо инкубации исследуемых эритроцитов в стандартных условиях (состав инкубационной среды в мМ:  $\text{NaCl}$  - 100;  $\text{KCl}$  - 10; Трис- $\text{HCl}$  (pH 7,6 при температуре  $37^\circ \text{C}$ ) - 50;  $\text{ATP2Na}$  - 2; ЭДТА - 0,5), проводили преинкубацию эритроцитов (в течение 60 минут при температуре  $22\text{-}24^\circ \text{C}$ ) с антителами, не изменяя состава остальных компонентов. Для инкубации использовались следующие антитела: 3Е9 МАТ к МБГ, либо «Digibind», либо «DigiFab». Объем «Digibind» и «DigiFab» для инкубирования ex vivo с кровью составил 10 мкг/мл, что соответствует дозе, применяемой клинически при ПЭ [Adair C.D. et al., 2009, 2009, 2010]. 3Е9 МАТ к МБГ использовались в концентрации, нейтрализующей половину максимальной ингибирующей концентрации ( $\text{IC}_{50}$ ), для ингибирования МБГ  $\alpha$ -1 НКА мозгового вещества почек крыс [Fedorova O.V. et al., 2008]. Перекрестная реактивность 3Е9 МАТ к МБГ в процентном соотношении выглядит следующим образом: МБГ – 100; маринобуфотоксин – 4; телочинобуфагин – 7; цинобуфоталин – 44; цинобуфагин – 1,4; резибуфагенин – 0,5; буфалин – 0,3; просцилларидин А – 3; убаин – 0,02; убагенин –  $<0,001$ ; дигоксин – 1,8; дигитоксин – 0,7; альдостерон –  $<0,01$ ; прогестерон –  $<0,01$  и преднизон –  $<0,001$ .

#### **2.2.4 Методика эксперимента «Изучение влияние сульфата магния на фармакологическую коррекцию активности фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов беременных с преэклампсией»**

По выше описанной методике, *in vitro* мы определяли активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах у пациенток с преэклампсией. Далее проводилось измерение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов данной группы в присутствии и в отсутствии поликлональных антител к дигоксину препарата «DigiFab», либо 3 ммоль/л  $\text{MgSO}_4$ , либо их комбинаций. Объем «DigiFab» для инкубирования *ex vivo* с кровью составил 1 мкг/мл, что соответствует нашим данным об его активности *ex vivo*, полученным недавно и дозе «Digibind», применяемой клинически при ПЭ [Adair C.D. et al., 2010]. Для этого, помимо инкубации исследуемых эритроцитов в стандартных условиях (состав инкубационной среды в мМ:  $\text{NaCl}$  - 100;  $\text{KCl}$  - 10; Трис- $\text{HCl}$  (рН 7,6 при температуре 37° С) - 50; АТФ2 $\text{Na}$  - 2; ЭДТА - 0,5), проводили преинкубацию эритроцитов (в течение 60 минут при температуре 22-24° С) с вышеуказанными антителами, не изменяя состава остальных компонентов.

Для изучения влияния сульфата магния на ингибирующее действие МБГ на фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, *in vitro*, на эритроцитах, полученных у беременных с физиологическим течением гестации, мы провели следующий эксперимент. С этой целью аликвоты цельной крови (0,5 мл) предварительно инкубированы при комнатной температуре в течение 30 минут с МБГ (нарастающая концентрация) в отсутствии и в присутствии  $\text{MgSO}_4$  (3.0 ммоль/л), также в комбинации  $\text{MgSO}_4$  с препаратом «DigiFab» (1.0 мкмоль/л). Эритроциты были трижды промыты в изотоническом растворе (145 ммоль/л  $\text{NaCl}$  в 20 ммоль/л Трис-буфера; рН при температуре 4°С). Активность  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы определялась так, как было подробно описано выше.



### 2.2.5 Определение коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины методом «Белковый иммуноблот» (Western-блот)

*Подготовка ткани плаценты и артерий пуповины.* Экспланты плацент и пупочные артерии, отделенные от окружающих тканей пуповины помещались в раствор, содержащий (в ммоль / л): NaCl 120; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 24; и глюкоза 5,6 (pH 7,4, T +4°C) для транспортировки. Далее ткани плацент и артерии пуповины измельчались и гомогенизировались с помощью гомогенизатора Polytron 20S (Kinematica, Швейцария) в RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) и хранились в жидком азоте для Western-блота.

Уровень белка коллаген-1 был определен в плацентарном гомогенате и гомогенате пупочных артерий. Солюбилизированные белки были разделены при помощи гель-электрофореза 10% Tris-Glycine полиакриламида (Life Technologies), перенесены на нитроцеллюлозную мембрану. Детекция проводилась хемилюминесцентным методом, в котором нитроцеллюлозная мембрана выдерживалась на Kodak SAR5 фотопленке 1-15 минут с последующей количественной оценкой в единицах оптической плотности. Коллаген-1 визуализирован с использованием специфических козьих антител к коллагену-1 (goat polyclonal antibody, Southern Biotechnology Birmingham, AL, USA; 1:200) с последующей инкубацией с антикозьей антисывороткой (secondary antigoat antibody from Santa Cruz Biotechnology, 1:1000). Для стандартизации уровня коллагена-1 против глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), с нитроцеллюлозной мембраны отмыли антитела, используя метод стриппинг, и вновь выдержали с кроличьими моноклональными анти-GAPDH антителами (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

### **2.2.6 Методика эксперимента «Влияние маринобуфагенина на уровень экспрессии транскрипционного фактора Fli-1 и уровень коллагена-1 в тканях плаценты»**

Для исследования влияния МБГ на уровень Fli-1 и коллагена-1 экспланты плацент родильниц с физиологическим течением беременности (группа сравнения) после забора (in vitro) помещены в модифицированный раствор Дульбекко (DMEM; Life Technologies, Карлсбад, Калифорния, США) с добавлением гентамицина (25 мг/л). Эксплантаты инкубировали в течение 24 ч в 5% атмосфере CO<sub>2</sub> при температуре 37C<sup>0</sup> в присутствии МБГ (10 нмоль/л). Далее ткань плацент измельчалась и гомогенизировалась с помощью гомогенизатора Polytron 20S (Kinematica, Швейцария) в RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA).

По выше описанному методу «белковый иммуноблот» были определены уровни коллагена-1 и Fli-1. Для измерения количества коллагена-1 использовались козы антигена к коллагену (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA; 1:200), с вторичными антикозьими антителами (Santa Cruz Biotechnology; 1:1000). Для измерения белка Fli-1 использовались кроличьи поликлональные анти-Fli1 (C19) антитела (Santa-Cruz Biotechnology; 1:100) и конъюгированная с пероксидазой антикроличья сыворотка (Life Technologies, 1:1000).

### **2.2.7 Методика эксперимента «Возможности фармакологической коррекции уровня коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины»**

С целью изучения возможности фармакологической коррекции фиброза плацентарной ткани и артерии пуповины при преэклампсии проведен следующий эксперимент.

Экспланты плацент родильниц с преэклампсией (группа сравнения) помещались в раствор, содержащий (в ммоль / л): NaCl 120; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 2,5;

MgCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 24; и глюкоза 5,6 (pH 7,4, T +4°C), и инкубировались в течение 24 ч в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере в 37,8С в присутствии транспортной среды (контроль), и с добавлением моноклональных антител к МБГ 3Е9 (МАТ к МБГ (0,85 мкг/мл), либо «Ddigifab» (10 мкг/мл), либо канренона (10 ммоль/л), либо дросперинона (10 ммоль / л). Экспланты пуповины родильниц основной группы также помещались в данный раствор и инкубировались при тех же условиях в течение 24 ч в присутствии транспортной среды (контроль) и с добавлением моноклональных антител к МБГ 3Е9 (МАТ к МБГ 0,85 мкг/мл). Далее препараты измельчались и гомогенизировались с помощью гомогенизатора Polytron 20S (Kinematica, Швейцария) в RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) и хранились в жидком азоте для Western-блота.

По выше описанному методу «белковый иммуноблот» были определены уровни коллагена-1. Для измерения его количества использовались козы антитела к коллагену (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA; 1:200), с вторичными антикозьими антителами (Santa Cruz Biotechnology; 1:000).

### **2.2.8 Методика эксперимента «Функциональное исследование вазорелаксантной способности артерий пуповины при преэклампсии с фармакологической коррекцией производным альдостерона»**

После родов беременных с преэклампсией пупочные артерии были отделены от окружающих тканей пуповины. Экспланты артерий пуповины помещались в раствор, содержащий (в ммоль / л): NaCl 120; KCl 4; CaCl<sub>2</sub> 2,5; MgCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,1; NaHCO<sub>3</sub> 24; и глюкоза 5,6 (pH 7,4, T +4°C), и инкубировались в течение 24 ч в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере в 37,8С в присутствии транспортной среды (контроль), и с дроспериноном (10 ммоль / л). Перед сократительными исследованиями экспланты промывали три раза в свежей инкубационной среде.

Эндотелий-оголенные кольца пупочной артерии (2,5- 4,0 мм шириной) суспендировали в напряжении покоя 3,0 г в термостатируемой камере объемом 15 мл (Ugo Basile, Italy) и орошали при 37 ° С модифицированным раствором Кребса (в 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 и глюкоза 5,4, газированным смесью 95% O<sub>2</sub> и 5% CO<sub>2</sub> (pH 7,45). 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 и выходил на плато, выполнялось последовательное введение в раствор возрастающих концентраций нитропрусида натрия (1 нмоль/л – 10 мкмоль/л). На Рисунке 3 изображена схема эксперимента.

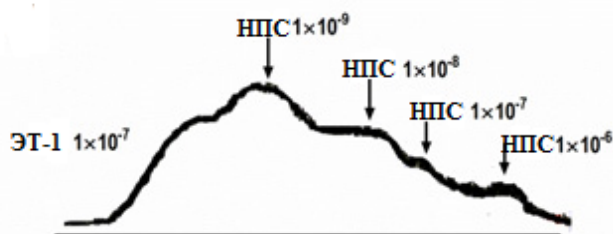


Рисунок 3 - Схема измерения чувствительности сосуда к вазорелаксационному действию нитропрусида натрия.

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

### **2.2.9 Метод морфометрического анализа строения ворсин и сосудов плацентарной ткани**

При наборе сырого материала плацентарной ткани для микроскопии руководствовались стандартным протоколом гистологического исследования. Образцы для патоморфологического исследования вырезались на всю толщ хориона, размерами приблизительно по 1,0x2,0x0,5см. Указанные образцы брали вне видимых макроскопически патологических очагов, т.е. в «рабочей части» плаценты. Фиксация материала проводилась по общепринятым гистологическим методикам с последующей заливкой в парафин. Окраску парафиновых срезов производили гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Исследование проводилось на микроскопе Leica, модель DM1000 с последующим морфометрическим анализом изображений (вычислением размеров и площади ворсин, а также диаметра и площади их сосудов) программами «Leica Application Suite V 4.5.0» и «ImageJ 1.48 v».

В каждом гистологическом препарате, в нескольких полях зрения, вычислялся вид и плотность ворсин, их площадь и степень васкуляризации (количество сосудов, их размеры и площадь).

### **2.2.10 Методы статистической обработки материала**

Для создания первичных баз данных и частичной обработки материала использовались программы Excel. Статистическая обработка полученных данных производилась с использованием статистического пакета STATISTICA 7 En. Данные представлены для качественных признаков в процентах, для количественных – в виде среднего и стандартного отклонения. При распределении, отличном от нормального и большом коэффициенте вариации (отношение стандартного отклонения к среднему) данные представлены в виде медиан с указанием максимального и минимального значений.

Для сравнения распределения качественных признаков использовался критерий  $\chi^2$  Пирсона или точный тест Фишера. Для сравнения количественных показателей в нескольких группах применялся тест ANOVA/MANOVA с последующей поправкой по Ньюману-Кюльсу или Бонферонни. Для оценки отличий количественных признаков между группами применялся критерий Стьюдента при распределении, приближенном к нормальному. При распределении, отличном от нормального, применялись методы непараметрической статистики: тест Манн-Уитней. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. ОБЩАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП ОБСЛЕДОВАННЫХ ЖЕНЩИН

Для выполнения поставленных задач обследовано 106 беременных женщин. Из них 59 пациенток основной группы, чья беременность осложнилась развитием преэклампсии и 47 беременных – группа сравнения, с физиологическим течением беременности.

#### 3.1 Акушерско-гинекологический и экстрагенитальный статус обследованных групп

Основные сведения о группах представлены в Таблице 5.

Возраст беременных основной группы находился в пределах от 20 до 42 лет и составил в среднем  $30 \pm 4,9$  лет. Возраст беременных группы сравнения был в пределах от 22 до 40 лет, в среднем  $30 \pm 4,2$  лет ( $p > 0,05$ ). Таким образом, обследованные группы сопоставимы по возрасту.

Срок беременности на момент родоразрешения составил  $38,2 \pm 1,4$  нед. основной группы и  $39,0 \pm 1,2$  нед. группы сравнения ( $p < 0,05$ ).

Социально-бытовые условия всех пациенток были удовлетворительными.

Индекс массы тела (ИМТ) у беременных женщин с преэклампсией составил  $30,6 \pm 5,4$  кг/м<sup>2</sup>. ИМТ у беременных с физиологически протекающей беременностью составил  $27,1 \pm 3,2$  кг/м<sup>2</sup>, и был достоверно ниже, чем у беременных основной группы ( $p < 0,05$ ). Хотя этот параметр нельзя считать достоверным, поскольку в группы, согласно критериям невключения, не были включены беременные с ожирением 2-3 степени.

У большинства обследованных пациенток настоящая беременность была не первой (Таблица 5). Число женщин, которым предстояли первые и повторные роды в группах достоверно не различалось. В основной группе 37,1 % женщин были первобеременными первородящими, повторнобеременными

первородящими – 22,9 % и 40 % - повторнородящими. В группе сравнения 40,6 % женщин были первобеременными, 28,1 % - повторнобеременными первородящими и 31,3% - повторнородящими. Достоверных различий по паритету в группах не выявлено.

Таблица 5 - Клиническая характеристика беременных исследованных групп

Показатель	Группа сравнения n = 47	Основная группа n = 59	Достоверность различий (p)
Возраст, лет	30 ± 4,2	30 ± 4,9	p > 0,05
Срок гестации, нед.	39,0 ± 1,2	38,2 ± 1,4	p < 0,05
ИМТ, кг/м <sup>2</sup>	27,1 ± 3,2	30,6 ± 5,4	p < 0,05
Паритет:			
Первобеременные %	40,6	37,1	p > 0,05
Первородящие повторнобеременные %	28,1	22,9	p > 0,05
Повторнородящие %	31,3	40	p > 0,05

Анализ акушерско-гинекологического анамнеза показал, что менструальная функция обследованных беременных женщин без отклонений от нормы. Средний возраст менархе в основной группе составил 13,5 ± 0,5 года, в группе сравнения – 13,0 ± 0,7 (p > 0,05).

При сборе акушерско-гинекологического анамнеза особое внимание придавалось наличию у пациенток гинекологических заболеваний (Таблица 6).

Таблица 6 - Характеристика гинекологических заболеваний у беременных исследованных групп

Гинекологические заболевания	Группа сравнения (n=47)		Основная группа (n=59)		Критерий «Хи-квадрат» Пирсона	Точный критерий Фишера
	абс.	%	абс.	%		
Хронический сальпингоофорит	3	6.4	2	3.4	p > 0,05	p > 0,05
Эктопион шейки матки	6	12.8	4	6.8	p > 0,05	p > 0,05
Дисфункции яичников	2	4.3	7	11,9	p > 0,05	p > 0,05
ИППП*	11	23.4	13	22	p > 0,05	p > 0,05
Бесплодие	2	4.3	3	5.1	p > 0,05	p > 0,05



Аномалия развития матки	0	-	1	1.7	p > 0,05	p > 0,05
Миома матки	2	4.3	6	10.2	p > 0,05	p > 0,05
Эндометриоз	4	8.5	1	1.7	p > 0,05	p > 0,05

Примечание: \* ИППП – инфекции передаваемые половым путем

(Продолжение Таблицы 6)

У 23 (39 %) беременных группы с преэклампсией и у 23 (49 %) беременных группы контроля были выявлены различные гинекологические заболевания.

Как следует из Таблицы 6 в большинстве случаев гинекологическая патология обследуемых пациенток была представлена воспалительными и инфекционными заболеваниями гениталий, достоверных различий по встречаемости между группами не обнаружено ( $p > 0,05$ ). Достоверных отличий по частоте дисфункции яичников и миомы матки также не обнаружено ( $p > 0,05$ ). Бесплодие в анамнезе у пациенток обеих групп встречалось в равной мере ( $p > 0,05$ ), но данная беременность наступила в естественном цикле зачатия без применения методик экстракорпорального оплодотворения. Эндометриоз встречался в 8,5 % у беременных группы сравнения, но достоверных различий не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, исследованные группы сопоставимы по частоте и распределению гинекологических заболеваний.

Все обследованные пациентки не имели наследственных заболеваний. Из детских инфекций перенесли краснуху, ветряную оспу, корь, болели ОРВИ.

При оценке экстрагенитального анамнеза выявлено (Таблица 7), что сопутствующая соматическая патология имела у 85,7 % беременных основной группы и у 78,1 % беременных группы сравнения. Все хронические заболевания были в стадии ремиссии и во время беременности обострений не отмечалось.

Таблица 7 - Соматические заболевания у обследованных беременных

Заболевания (n, человек)	Группа сравнения n = 47		Основная группа n = 59		Критерий «Хи- квадрат» Пирсона	Точный критерий Фишера
	Абс.	%	Абс.	%		
Пороки сердца (в основном ПМК)	7	14.9	7	11.9	p > 0,05	p > 0,05
Нарушения ритма сердца	4	8.5	8	13.6	p > 0,05	p > 0,05
Варикозная болезнь нижних конечностей	2	4.3	7	11.9	p > 0,05	p > 0,05
Мочекаменная болезнь	2	4.3	5	8.5	p > 0,05	p > 0,05
Хронический пиелонефрит	4	8.5	13	22.0	p > 0,05	p > 0,05
Хронический цистит	5	10.6	7	11.9	p > 0,05	p > 0,05
Желчекаменная болезнь	0	0	3	5.1	p > 0,05	p > 0,05
Хронический холецистит	0	0	3	5.1	p > 0,05	p > 0,05
Заболевания щитовидной железы	2	4.3	8	13.6	p > 0,05	p > 0,05
Дискинезия желчевыводящих путей	5	10.6	0	0	p > 0,05	p > 0,05
Бронхиальная астма	0	0	2	3.4	p > 0,05	p > 0,05
Хронический гайморит	0	0	2	3.4	p > 0,05	p > 0,05
Хронический тонзилит	3	6.4	3	5.1	p > 0,05	p > 0,05
Хронический гастродуоденит	2	4.3	4	6.8	p > 0,05	p > 0,05
Хронический гастрит	5	10.6	8	13.6	p > 0,05	p > 0,05
Болезнь Крона	0	0	2	3.4	p > 0,05	p > 0,05
Язвенная болезнь 12-перстной кишки	0	0.0	2	3.4	p > 0,05	p > 0,05
Миопия	5	10.6	7	11.9	p > 0,05	p > 0,05
Аппендэктомия	4	8.5	5	8.5	p > 0,05	p > 0,05
Анемия	2	4.3	3	5.1	p > 0,05	p > 0,05

Как видно из Таблицы 7, в основной группе болезни мочевыделительной системы в 42,4 % против 23,4 % группы сравнения, но достоверных отличий не выявлено (p > 0,05). Хронический пиелонефрит, который сопутствовал в 2,5 раза чаще у беременных с преэклампсией, чем в группе сравнения (22,0 % против 8,5 % соответственно). Хронический цистит и мочекаменная болезнь встречались в равной степени. Хотя достоверных различий, используя критерии Пирсона и Фишера, не выявлено.

Заболевания сердечно-сосудистой системы встречается у каждой 2-3 пациентки с преэклампсией (37,4 %), а в группе сравнения у каждой 3-4 (27,7 %). Причем в структуре заболевания представляют собой пороки сердца (в основном это пролапс митрального клапана (ПМК)) и нарушения ритма сердца 11,9 % и 13,6 % у беременных с преэклампсией против 14,9 % и 8,5 % физиологического течения беременности, соответственно, но достоверных отличий групп не выявлено ( $p > 0,05$ ). В исследование не включались беременные с гипертензивным синдромом в анамнезе и тяжелой патологией сердечно-сосудистой системы. Варикозная болезнь вен нижних конечностей чаще отмечалась в основной группе (11,9 % против 4,3 % группы сравнения соответственно, но достоверных различий не выявлено  $p > 0,05$ ).

Заболевания печени и желчевыводящих путей при преэклампсии выявлялись у 10,2 % беременных в основном желчекаменная болезнь (ЖКБ) и хронический холецистит, а у беременных с физиологически протекающей беременностью в 10,6 % были представлены дискинезией желчевыводящих путей (ДЖВП). Достоверных различий не выявлено ( $p > 0,05$ ).

Также в анамнезе у беременных обеих групп были представлены болезни верхних дыхательных путей и пищеварительной системы (Таблица 7) сопоставимо в исследованных группах.

Таким образом, обе группы сопоставимы по гинекологическому и экстрагенитальному анамнезу.

### **3.2 Характеристика основных клинических проявлений преэклампсии у беременных исследованных групп**

Наличие и степень выраженности симптомов преэклампсии у обследованных беременных представлены в Таблице 8 и Таблице 9.

Таблица 8 - Средние показатели артериального давления, прибавки массы тела и сроков возникновения симптомов преэклампсии исследованных групп

	Группа сравнения n = 47		Основная группа n = 59		Достоверность различий (p)
	M ± m	ДИ 95%	M ± m	ДИ 95%	
Систолическое АД (мм рт. ст.)	110 ± 9	107–113	158 ± 17	152–163	p < 0,05
Диастолическое АД (мм рт. ст.)	69 ± 9	65–72	98 ± 8	95–101	p < 0,05
Среднее АД (мм рт. ст.)	82 ± 8	80–85	118 ± 10	115–121	p < 0,05
Пульсовое АД (мм рт. ст.)	42 ± 8	39–44	59 ± 13	55–64	p < 0,05
Сроки возникновения преэклампсии (нед.)	-	-	33,9 ± 1,3	-	-
Прибавка в весе (кг)	11,9 ± 1,9	-	15,1 ± 4,5	-	p < 0,05

Артериальная гипертензия выявлена у 100% беременных с преэклампсией. Все беременные отмечали повышение артериального давления впервые после 20 недели данной беременности.

Таким образом, величина систолического АД у беременных с преэклампсией колебалась от 140 до 220 мм рт. ст., в среднем составила  $158 \pm 17$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 152–163 мм рт. ст.), и была достоверно выше, чем у беременных с физиологически протекающей беременностью (от 90 до 120 мм рт. ст., в среднем составила  $110 \pm 9$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 107–113 мм рт. ст.) (p < 0,05).

Величина диастолического АД у беременных основной группы колебалась от 80 до 110 мм рт. ст., в среднем составила  $98 \pm 8$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 95–101 мм рт. ст.), и была достоверно выше группы сравнения (от 60 до 88 мм рт. ст., в среднем составила  $69 \pm 9$  мм рт. ст., ДИ 95 % 65–72 мм рт. ст.) (p < 0,05).

Среднее АД у женщин с преэклампсией составило  $118 \pm 10$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 115–121 мм рт. ст.), было достоверно выше, чем в группе беременных с физиологической гестацией –  $82 \pm 8$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 80–85 мм рт. ст.) (p < 0,05).

Пульсовое артериальное давление у беременных с преэклампсией составляло  $59 \pm 13$  мм рт. ст. (ДИ 95 % 55–64 мм рт. ст.), было достоверно выше, чем у беременных без преэклампсии  $42 \pm 8$  мм рт. ст. (95 % ДИ 39–44 мм рт. ст.) ( $p < 0,05$ ).

Длительность течения преэклампсии, является значимым показателем ее степени тяжести. Средний срок появления первых симптомов преэклампсии у беременных с преэклампсией составил  $33,9 \pm 1,3$  недели.

Результаты комплексного исследования наблюдаемых нами беременных показали, что общая прибавка веса (ОПВ) у беременных с преэклампсией составила  $15,1 \pm 4,5$  кг (95 % ДИ 13,4–16,7 кг) и была статистически достоверно выше ( $p < 0,05$ ) по сравнению с ОПВ у беременных с физиологически протекающей беременностью –  $11 \pm 4$  кг (95% ДИ 9,5–12,5 кг). ОПВ в основной группе носила неравномерный характер, в группе сравнения - равномерный характер.

При анализе частоты и степени выраженности отеков у беременных основной группы выявлено, что отеки различной по степени выраженности наблюдались у 91,3 % беременных. У большинства беременных с преэклампсией (78,4 %) выявлены отеки стоп, голеней, кистей рук; в 12,9 % случаев отеки распространялись на переднюю брюшную стенку. У беременных с физиологически протекающей беременностью отеки (голеней, стоп и/или кистей рук) наблюдались лишь в 17,3 % случаев ( $p < 0,05$ ).

Таблица 9 – Выраженность протеинурии у беременных исследованных групп

Показатель	Группа	n	Нет	Менее 0,132 г/л	0,132–1 г/л	Более 1 г/л
Протеинурия	Основная группа	59	5,7 % *	14,3 % *	57,1 % *	22,9 % *
	М ± m (г/л)			0,09 ± 0,02	0,56 ± 0,34	4,25 ± 2,9
	Группа сравнения	47	90,6 %	9,4%	–	–
	М±m (г/л)			0,07 ± 0,05		

Примечание: \* - Достоверность различий  $p < 0,05$  относительно группы сравнения

Протеинурия представлена в Таблице 9. У большинства беременных с физиологически протекающей беременностью протеинурия отсутствовала (90,6 %), лишь в 9,4 % случае отмечена протеинурия в пределах до 0,132 г/л ( $0,07 \pm 0,05$ ).

В то же время в группе беременных с преэклампсией в 94,3 % случаев отмечалась протеинурия, лишь у трех женщин протеинурия не выявлена (5,7 %). У беременных с преэклампсией в 14,3 % случаев отмечалась протеинурия в пределах до 0,132 г/л и в среднем составила  $0,09 \pm 0,02$  г/л; в 57,1% выявлена более выраженная протеинурия – от 0,132 до 1 г/л и составила  $0,56 \pm 0,34$  г/л; в 22,9 % случаев наблюдалась протеинурия более 1,0 г/л и составила  $4,25 \pm 2,9$  г/л (Таблица 9).

Степень тяжести преэклампсии при определении по шкале в модификации Института перинатологии и педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» в среднем составила  $9,7 \pm 1$  балл.

### 3.3 Особенности течения родов у женщин исследованных групп

При анализе исходов беременности все беременные родоразрешены в доношенный срок гестации (учитывая критерии включения). Средний срок родоразрешения у пациенток основной группы составил  $38,2 \pm 1,4$  нед. беременности, у пациенток группы сравнения –  $39,0 \pm 1,2$  нед. беременности (Таблица 10).

Таблица 10 – Исходы настоящей беременности у женщин исследованных групп

Показатель	Группа сравнения n = 47	Основная группа n = 59	Достоверность различий (p)
Средний срок гестации родоразрешения (нед.)	$39,0 \pm 1,2$	$38,2 \pm 1,4$	$p < 0.05$
<b>Способ родоразрешения:</b>			
Роды через естественные родовые пути	68,8 %	62,9 %	$p > 0.05^*$
Кесарево сечение	31,2 %	37,1 %	$p > 0.05^*$
Кесарево сечение	50 %	53,8 %	$p > 0.05^*$

в плановом порядке			
Кесарево сечение в экстренном порядке	50 %	46,2 %	$p > 0.05^*$

Примечание: \* - использовались Критерий «Хи-квадрат» Пирсона и Точный критерий Фишера

(Продолжение Таблицы 10)

По методу родоразрешения в основной группе беременные распределились следующим образом: роды через естественные родовые пути – 62,9 %, путем операции кесарево сечение – 37,1 %. Кесарево сечение в плановом порядке (вне родов) выполнено у 53,8 % беременных с преэклампсией, по сочетанным показаниям со стороны матери и плода и нарастании симптомов преэклампсии на фоне проводимого лечения. Кесарево сечение по экстренным показаниям у беременных с преэклампсией в 46,2 %, показания: отсутствие эффекта от родовозбуждения, первичная слабость родовой деятельности и острая гипоксия плода.

У пациенток группы сравнения 68,8 % роды закончены через естественные родовые пути, путем операции кесарево сечения – 31,2 %. В плановом порядке оперативно родоразрешены 50 % беременные и по экстренным показаниям также в 50 %. Основными показаниями для планового родоразрешения были: тазовое предлежание крупного по размерам плода мужского пола, медицинские показания со стороны зрения по рекомендации окулиста, наличие рубца на матке при категорическом отказе беременной от родов через естественные родовые пути. Для экстренного – отсутствие эффекта от родовозбуждения, клиническое несоответствие размеров головки плода размерам таза матери.

Таким образом, исследуемые группы по способу родоразрешения сопоставимы.

Из других оперативных пособий были ручное обследование полости матки, отделение и выделение задержавшейся части последа у 1 роженицы основной группы.

### 3.4 Состояние новорожденных у родильниц исследованных групп

Всего родилось 59 живых детей от матерей основной группы и 47 живых ребенка от матерей группы сравнения. У матерей с преэклампсией родилось 30 девочек (50,8 %) и 29 мальчиков (49,2 %), у матерей с физиологически протекающей беременностью родилось 16 девочек (34,0 %) и 31 мальчик (66,0 %) (Таблица 11).

Таблица 11 – Распределение новорожденных по полу в исследованных группах

Пол	Группа сравнения n = 47	Основная группа n = 59	Уровень значимости *
Женский	34,0%	50,8 %	p > 0,05
Мужской	66,0 %	49,2 %	P > 0,05
Примечание: * - использовались Критерий «Хи-квадрат» Пирсона и Точный критерий Фишера			

Средняя масса новорожденных родившихся от матерей с преэклампсией составила  $3202 \pm 580$  грамм и достоверно отличается от новорожденных родившихся от матерей без преэклампсии  $3647 \pm 382$  грамм ( $p < 0,05$ ). Длина тела детей в группе с преэклампсией составила  $51 \pm 2,6$  см, что меньше длины тела новорожденных группы сравнения  $52,6 \pm 1,4$  см ( $p < 0,05$ ) (Таблица 12).

Таблица 12 – Средние антропометрические показатели и оценка по шкале Апгар новорожденных детей исследованных групп

Показатель	Группа сравнения n = 47 M ± m	Основная группа n = 59 M ± m	Достоверность различий (p)
Масса новорожденных, гр	$3647 \pm 382$	$3202 \pm 580$	p < 0,05
Длина тела новорожденных, см	$52,6 \pm 1,4$	$51 \pm 2,6$	p < 0,05
Оценка по шкале Апгар на 1 минуте жизни, балл	$7,8 \pm 0,4$	$7,3 \pm 1,2$	p > 0,05
Оценка по шкале Апгар на 5 минуте жизни, балл	$8,8 \pm 0,4$	$8,5 \pm 1$	p > 0,05

Оценка по шкале Апгар на первой минуте жизни новорожденных основной группы составила  $7,3 \pm 1,2$  баллов, и достоверно не отличается от группы



сравнения  $7,8 \pm 0,4$  баллов ( $p > 0,05$ ) (Таблица 12). Наименьшая оценка по шкале Апгар на 1-й минуте жизни новорожденных от женщин с преэклампсией 3 балла, а при физиологической гестации – 7 баллов. Оценка по шкале Апгар на пятой минуте жизни новорожденных основной группы составила  $8,5 \pm 1$  баллов и также недостоверно ниже, чем в группе сравнения  $8,8 \pm 0,4$  баллов ( $p > 0,05$ ). Наименьшая оценка по шкале Апгар на 5-й минуте жизни новорожденных от женщин с преэклампсией 5 баллов, а в группе сравнения – 8 баллов.

## ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 4.1 Концентрация маринобуфагенина в плазме крови и активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов исследованных групп

У всех беременных определены уровень маринобуфагенина и активность фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов, как маркера активности циркулирующего МБГ. Используя методики, описанные в главе 2, мы получили нижеследующие данные.

У женщин основной группы ( $n = 59$ ), беременность которых осложнилась развитием преэклампсии, среднее значение АД составило  $158 \pm 5,7/99 \pm 2,6$  мм рт. ст.. У беременных с физиологическим течением гестации ( $n = 47$ ) средний уровень АД –  $110 \pm 3,1/69 \pm 3,1$  мм рт. ст. ( $p < 0,05$ ). Повышенное АД сопровождалось 3-кратным увеличением концентрации МБГ в плазме (Рисунок 4) по отношению к группе сравнения ( $1,58 \pm 0,45$  нмоль/л против  $0,51 \pm 0,15$  нмоль/л соответственно,  $p < 0,05$ ).

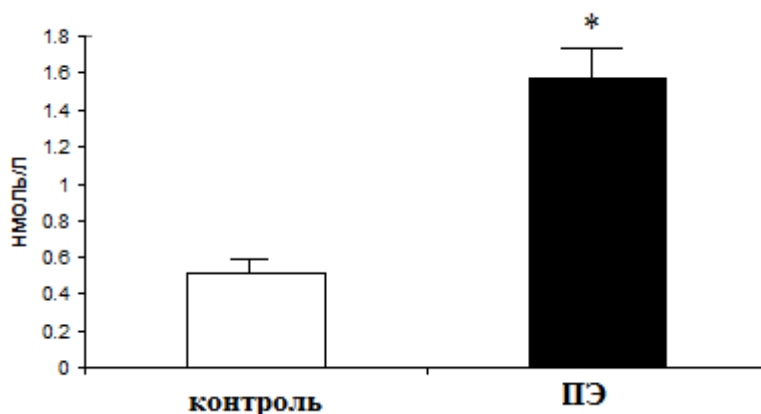


Рисунок 4 – Концентрация МБГ в плазме у пациенток с физиологическим течением беременности (контроль) и у пациенток с преэклампсией (ПЭ). \* $p < 0,05$  в сравнении с показателями пациенток с группы сравнения

При определении активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов, фермента маркера активности циркулирующего МБГ, получили следующие результаты. У женщин основной группы 3-кратное увеличение концентрации МБГ в плазме по отношению к группе сравнения сопровождалось 50% подавлением активности  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы в эритроцитах (Рисунок 5) ( $1,32 \pm 0,14$  по сравнению с  $2,73 \pm 0,18$  мкмоль  $\text{Фн}/\text{мл}/\text{ч}$  в контрольной группе,  $p < 0,01$ ).

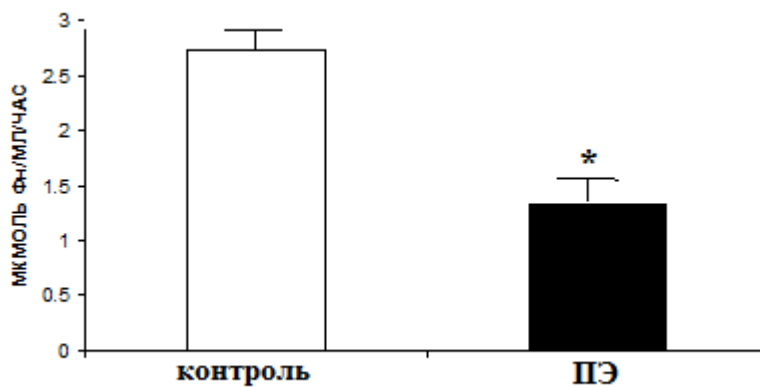


Рисунок 5 – Активность  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы в эритроцитах пациенток с физиологической беременностью (контроль) и беременных с преэклампсией (ПЭ), АНОВА и тест Ньюмана-Кюльса \*  $p < 0,01$  в сравнении с показателями пациенток с группы сравнения

Таким образом, повышенное содержание маринобуфагенина в плазме беременных с преэклампсией приводит к угнетению функции фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

## 4.2 Фармакологическая коррекция влияния маринобуфагенина на активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза эритроцитов, ингибированного при преэклампсии

Учитывая результаты, представленные выше, у пациенток с преэклампсией уровень МБГ в плазме резко увеличивается [Lopatin DA, 1999; Averina IV, 2006; Fedorova OV, 2008] и тем самым представляет собой потенциальную мишень для терапии. Иммунонейтрализация КТС признается новаторским подходом в лечении преэклампсии [Goodlin R.C., 1988]. За последние 30 лет сообщалось о нескольких успешных случаях лечения данного осложнения беременности посредством препарата поликлональных антител «Digibind» (Glaxo-Smith Kline, Research Triangle Park, North Carolina), также проведено пилотное исследование по его применению у беременных с преэклампсией «КТС-положительных» [Adair CD, и др., 1996, 2009, 2010]. «Digibind» представляет собой смесь Fab-фрагментов очищенных поликлональных антител к дигоксину. Антигипертензивное действие данного препарата основано на связывании КТС и нейтрализации ангиоспазма, а его назначение пациенткам с преэклампсией связано с восстановлением активности  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы, целевого фермента для КТС [Adair CD, 2009]. Таким образом, *ex vivo* моноклональные антитела (МАТ) к МБГ и «Digibind» также нейтрализуют вызванное преэклампсией ингибирование  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы эритроцитов [Averina IV, 2006; Fedorova OV, 2008]. Более того, у беременных крыс  $\text{NaCl}$ -индуцированной преэклампсией антигипертензивный эффект препарата «Digibind» и МАТ к МБГ был связан с восстановлением  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы в сосудистой системе [Goodlin R.C., 1987]. В 2011 году выпуск препарата «Digibind» был прекращен производителем, и «DigiFab» (BTG International Ltd, UK) оказался единственным доступным антителом к дигоксину, одобренным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США для назначения пациентам с целью нейтрализации токсичности дигоксина.

Для выполнения одной из поставленных задач в этом разделе проведено сравнение препаратов поликлональных антител «Digibind» и «DigiFab» в целях иммунонейтрализации КТС у пациенток с ПЭ. Для этого проведено сравнение данных препаратов в отношении их способности *ex vivo* нейтрализовать индуцированное преэклампсией ингибирование Na/K-АТФазы эритроцитов. В экспериментах также сравнено их действие с действием 3Е9 моноклональных антител (МАТ) к МБГ, которое нейтрализует ингибирование Na/K-АТФазы, вызванное преэклампсией [Fedorova OV et. al., 2008] и потенциально нейтрализует вредное воздействие КТС при хронической почечной недостаточности [Haller ST, 2012].

Для оценки фармакологической коррекции, ингибирующего влияния МБГ на активность фермента Na/K-АТФазы эритроцитов при преэклампсии, использованы методики описанные в главе 2. Пробы плазмы по 250 мкл от каждой группы были смешаны, выделены с помощью патронов экстракции С-18, как указано выше, высушены, восстановлены в 10%-ом ацетонитриле и фракционировались на системе Agilent 1100 серии методом обратно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies, Palo Alto, California), 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мк, колонка 80 Å, скорость истечения 1мл/мин, в градиентном режиме (10%-85,5%) ацетонитрила к 0,1% трифторуксусной кислоты в течение 45 минут. Тридцать 1,5-минутных фракций получены и исследованы на иммунореактивность МБГ с помощью анализа на основе 4G4 МАТ к МБГ и 3Е9 МАТ к МБГ, и дигоксин-подобную иммунореактивность с помощью анализа на основе двух поликлональных антител к дигоксину («Digibind» и «DigiFab»). Для иммуноанализа на дигоксин помечены 2 МАТ к МБГ и 2 поликлональных антитела к дигоксину с помощью набора для маркирования европием (Perkin Elmer, Wellesley, Massachusetts). Анализы основаны на сравнении КТС в пробе и конъюгата дигоксина с бычьим сывороточным альбумином, иммобилизованного на нижней поверхности иммунопреципитационных пластин на предельное

количество активных центров для «Digibind» и «DigiFab». Чувствительность иммунологического анализа «Digibind» и «DigiFab» к дигокину составляет 0,01 нмоль/л, данные о перекрестной реактивности «Digibind» и «DigiFab» представлены в Таблице 13.

Таблица 13 – Перекрестная иммуореактивность «Digibind» и «DigiFab»

Перекрестный реактант	% перекрестной реактивности	
	«Digibind»	«DigiFab»
Дигоксин	100	100
Дигитоксин	1,4	1,3
Дигоксигенин	76	100
Уабаин	0,4	0,14
Уабагенин	0,1	0,025
Маринобуфагенин	0,2	0,29
Маринобуфотоксин	0,06	0,02
Телоцинобуфагин	1,0	0,34
Буфалин	2,7	0,9
Цинобуфагин	0,02	0,03
Цинобуфоталин	0,2	0,01
Резибуфагенин	1	0,02
Просцилларидин А	1,46	0,2
Преднизон	<0,001	<0,001
Прогестерон	<0,001	<0,001

На данном этапе исследования обследовано 17 пациенток основной группы с преэклампсией и 16 беременных группы сравнения с физиологическим течением гестации (данные характеристики групп представлены в Таблице 14).

Таблица 14 – Характеристика обследуемых групп<sup>1</sup>

	Группа сравнения (n=16)	Основная группа (n=17)
Возраст матери, лет	28 ± 1	28 ± 2
Гестационных недель на момент родов	39,0 ± 0,4	39 ± 0,5

Артериальное систолическое давление (мм рт. ст.)	111 ± 2	156 ± 5 <sup>2</sup>
Артериальное диастолическое давление (мм рт. ст.)	73 ± 2	94 ± 2 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>значения выражены как обозначения  $m \pm$  стандартная ошибка среднего значения

<sup>2</sup> $P < 0,001$  в сравнении с испытуемыми с физиологической беременностью, двусторонний t-тест

(Продолжение Таблицы 14)

Данные по концентрации КТС в плазме и активности Na/K-АТФазы в эритроцитах у пациенток с преэклампсией и участниц группы сравнения обобщены в Рисунке 6. Повышенное артериальное давление у пациенток с основной группы сопровождалось значительным увеличением концентрации МБГ в плазме ( $1,83 \pm 0,25$  по сравнению  $0,67 \pm 0,1$  нмоль/л группы сравнения  $p = 0,03$ ) (Рисунок 6А). Также преэклампсия была связана со значимым ингибированием Na/K-АТФазы эритроцитов ( $1,47 \pm 0,17$  по сравнению с  $2,65 \pm 0,16$  мкмоль Фн/мл/ч в группе сравнения,  $p < 0,01$ ). (Рисунок 6Г).

Ex vivo, инкубация эритроцитов при концентрации 10 мкг/мл, что соответствует клинической дозе «Digibind», используемой для лечения преэклампсии, «Digibind» и «DigiFab», также как и МАТ к МБГ (0,5 мкг/мл), восстановила активность Na/K-АТФазы эритроцитов до 79%, 77% и 84% от уровня группы сравнения ( $2,1 \pm 0,2$ ;  $2,05 \pm 0,3$  и  $2,23 \pm 0,3$  мкмолФн/мл/час, соответственно,  $p < 0,01$ ) (Рисунок 6Г).

Как показано на Рисунке 6Б, уровень иммунореактивности уабаина в плазме у пациенток с преэклампсией не отличался в значительной степени от соответствующих показателей у группы сравнения ( $0,75 \pm 0,18$  по сравнению с  $0,53 \pm 0,09$  нмоль/л группы контроля,  $p = 0,35$ ), в то время как уровень дигоксин-подобной иммунореактивности демонстрировал заметное повышение ( $0,32 \pm 0,03$  по сравнению  $0,2 \pm 0,03$  нмоль/л группы сравнения,  $p = 0,02$ ) (Рисунок 6В).

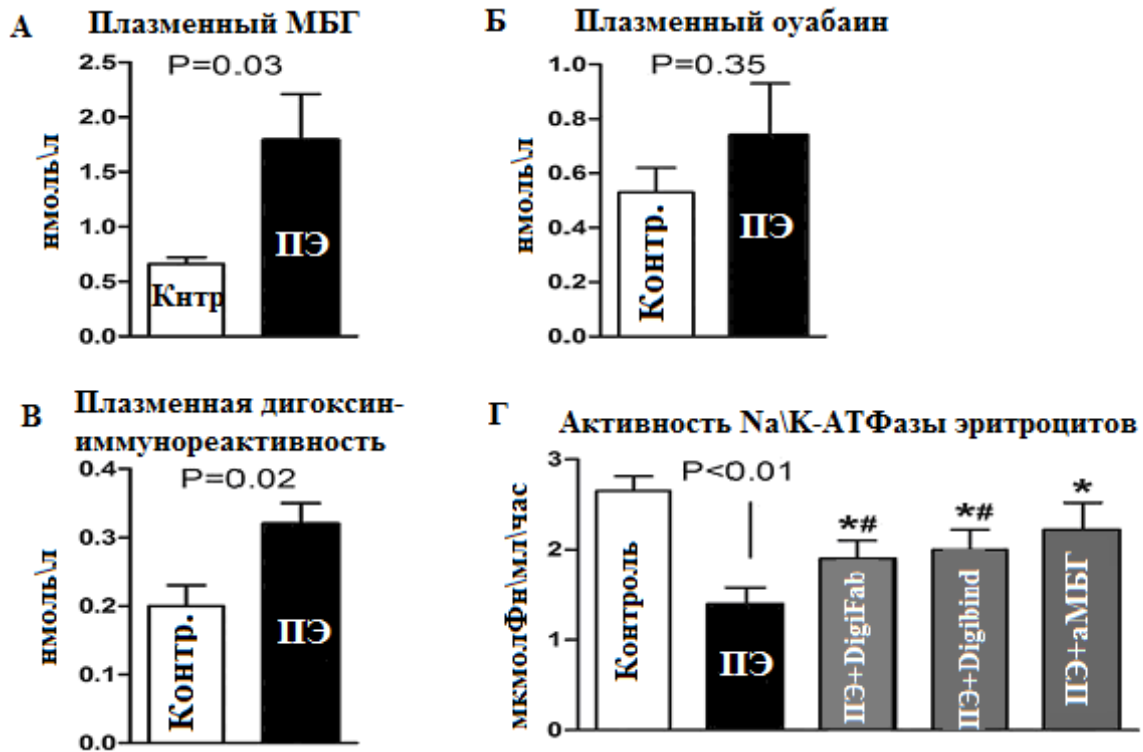


Рисунок 6 - Концентрация МБГ в плазме (А), эндогенного оубаина (Б) и дигоксин-подобной иммунореактивности (В) у нормотензиных пациенток (Контр – группа сравнения) и у пациенток с преэклампсией (ПЭ – основная группа). Г – активность Na/K-АТФазы в эритроцитах пациенток с преэклампсией (ПЭ) и группы сравнения (контроль), и эффект применения *ex vivo* «DigiFab», «DigiBind» и 3Е9 МАТ к МБГ (аМБГ) на Na/K-АТФазу эритроцитов. \*  $P < 0,01$  в сравнении с показателями пациенток основной группы (ПЭ); #  $P < 0,01$  в сравнении с показателями пациенток с группой сравнения методом однофакторного анализа повторных измерений (ANOVA) и теста Ньюмана-Кульса

Время удержания стандартов карденолидов и буфадиенолидов КТС на Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, колонка для ВЭЖХ, составило: оубаин – 8, 5 минут (фракция 6), дигоксин – 18,0 минут (фракция 13), телоцинобуфагин- 20,5 минут (фракция 14), МБГ – 22,6 минуты (фракция 16) и маринобуфотоксин – 22,7 минуты (фракция 16), цинобуфаталин – 22,9 минуты (фракция 16), буфалин – 24,5 минуты (фракция 17), и резibuфагенин – 27,7 минут (фракция 19). Как представлено на Рисунке 7, в результате ВЭЖХ фракционирования плазмы



пациенток с физиологически протекающей беременностью и осложненной преэклампсией максимальная иммунореактивность оуабаина совместно элюировалась со стандартом оуабаина. Уровень оуабаин-подобной иммунореактивности в ВЭЖХ фракциях плазмы контрольной группы не отличался значительно от соответствующего уровня у пациенток с преэклампсией (620 и 780 пмоль соответственно; Рисунок 7 В и Г).

Помимо измерения МБГ в пробах плазмы, полученных методом экстракции с помощью патронов С18 (Рисунок 6 А), уровень иммунореактивности МБГ определялся в ВЭЖХ фракциях плазмы пациенток из контрольной и основной групп методом иммунологического анализа на основе двух МАТ к МБГ: 4G4 – для измерения концентрации МБГ в плазме и 3E9 - потенциально нейтрализующих действие эндогенного МБГ *in vivo*. Данные представлены на Рисунке 7 А и Б (анализ на основе 4G4 МАТ к МБГ) и Рисунке 8 Д и Е (анализ на основе 3E9 МАТ к МБГ). Как показано на Рисунке 7 А, в результате ВЭЖХ фракционирования МБГ плазмы пациенток из группы сравнения иммунореактивное вещество элюировалось во фракциях 11-16. Иммунологический анализ на основе 4G4 МАТ выявил двукратный прирост МБГ в плазме пациенток основной группы с преэклампсией, фракционированной ВЭЖХ (648 в сравнении с 310 пмоль в ВЭЖХ фракциях, полученных от пациенток с физиологически протекающей беременностью), с максимумом иммунореактивности МБГ, элюировавшимся совместно со стандартом МБГ во фракции 16 (Рисунок 7 Б).

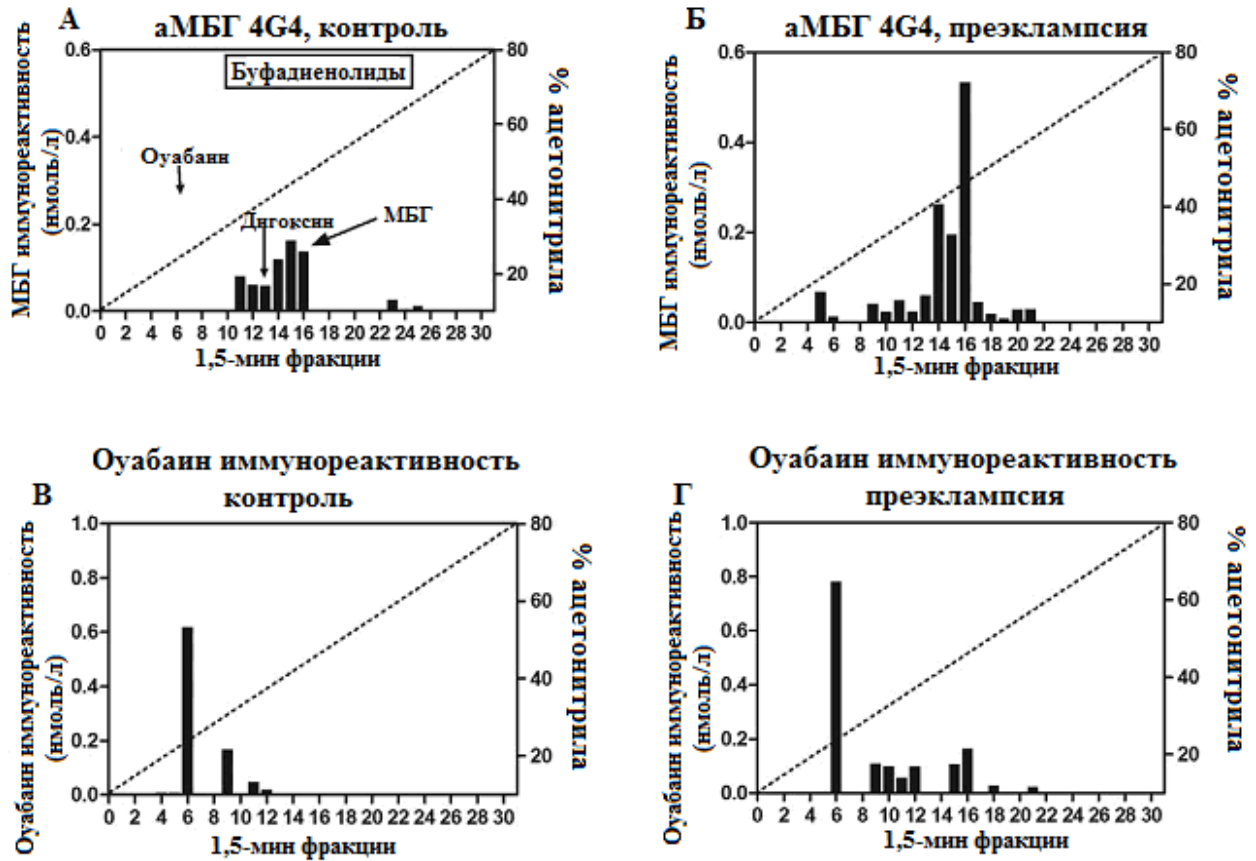


Рисунок 7 – Фракционирование эндогенных КТС в плазме пациенток с физиологически протекающей беременностью (контроль) и основной группы (преэклампсия) на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением патронов Zorbax Eclipse XDB-C18. **А** и **Б** - График элюции иммунореактивного материала эндогенного маринобуфагенина (МБГ), измеренной с помощью иммунологического анализа на основе 4G4 МАТ к МБГ (аМБГ 4G4). Время удержания стандартов МБГ, оуабайна, дигоксина указано стрелочками. **В** и **Г** - График элюции эндогенного оуабайн-иммунореактивного материала. Горизонтальное меню вверху панели «А» указывает время удержания стандартов буфадиенолидов

Рисунок 8 иллюстрирует данные по взаимодействию антител, используемых для нейтрализации ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, вызванного преэклампсией, «DigiFab», «Digibind» и 3E9 МАТ к МБГ с КТС в результате фракционирования плазмы пациенток с физиологически протекающей беременностью и преэклампсией на обратно-фазной ВЭЖХ колонке. Как показано на Рисунке 8 А,

В и Д, по результатам фракционирования плазмы группы сравнения анализ на основе «DigiFab», «Digibind» и 3E9 МАТ к МБГ выявил КТС во фракциях 14-18. В плазме пациенток основной группы с преэклампсией, фракционированной ВЭЖХ, вещество, измеряемое с помощью «DigiFab» и «Digibind», элюировалось во фракциях 17-22 с максимумом во фракции 18 (Рисунок 8 Б и Г). Маринобуфагенин-иммунореактивный материал плазмы пациенток с преэклампсией, измеренный с помощью 3E9 МАТ к МБГ, элюировался во фракциях 16-22 с максимумом элюирования во фракции 16 (Рисунок 8 Е). Общий объем МБГ-иммунореактивного материала, выявленный с помощью 3E9 МАТ к МБГ в ВЭЖХ фракциях в результате фракционирования плазмы пациенток с преэклампсией был двукратно больше, чем в пробах группы сравнения (1056 в сравнении с 421 пмоль; Рисунок 8 Д и Е). Прирост в КТС материале, связанный с преэклампсией, был выявлен «Digibind» (176 в сравнении с 75 пмоль; Рисунок 8 В и Г) и «DigiFab» (221 в сравнении с 70 пмоль; Рисунок 8 А и Б), а величина вызванного преэклампсией прироста в уровне дигоксин-подобной иммунореактивности в ВЭЖХ фракциях была подобна величине прироста в уровне МБГ.

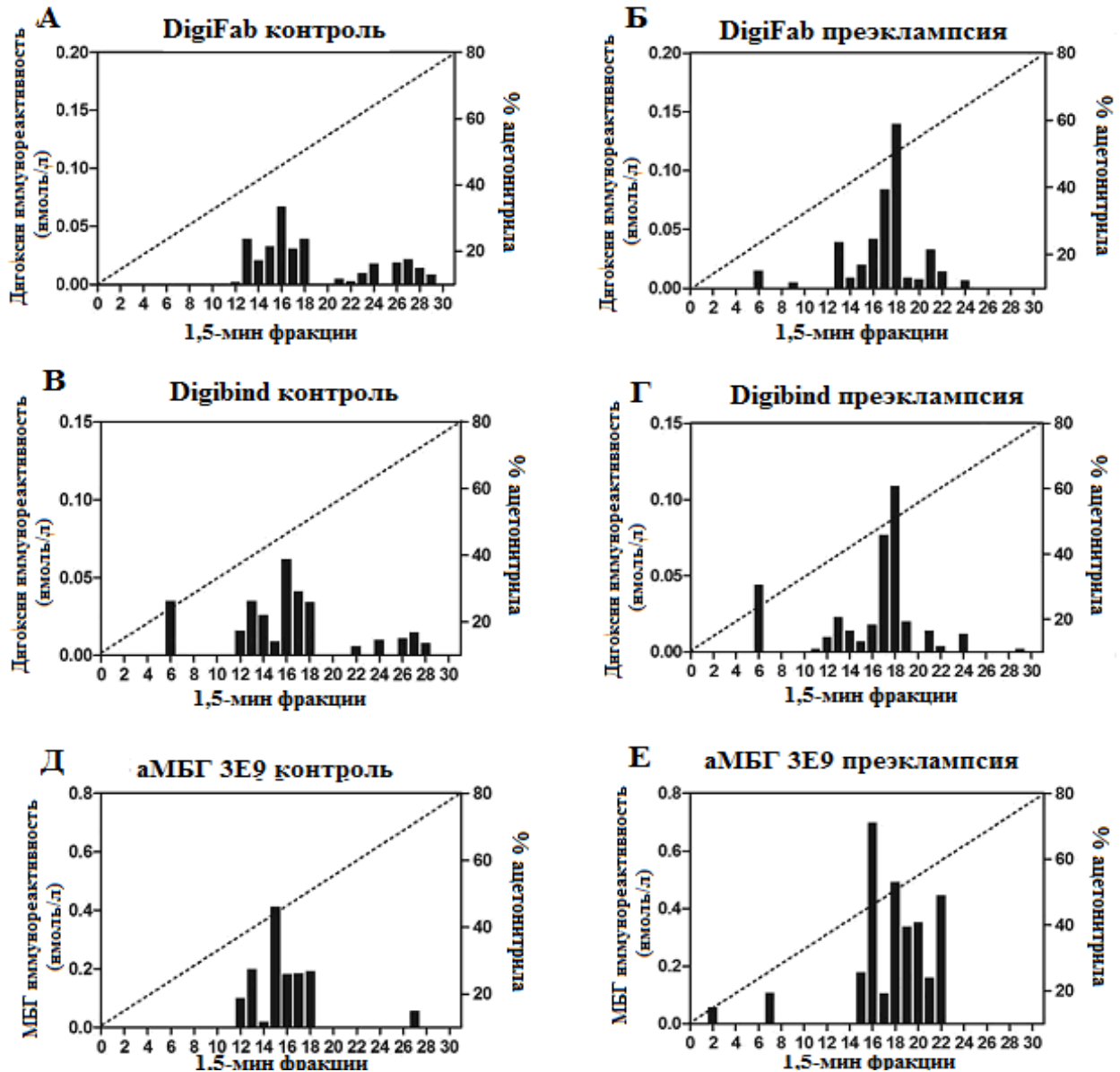


Рисунок 8 – Фракционирование эндогенных КТС в плазме пациенток с физиологически протекающей беременностью (контроль) и основной группы (преэклампсия) на системе высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением патронов Zorbax Eclipse XDB-C18. А-Г - Графики элюции дигоксин-иммунореактивного материала, измеренного с помощью анализов на основе «DigiFab» и «Digibind». Д и Е - Графики элюции иммунореактивности эндогенного маринобуфагенина (МБГ), измеренной с помощью иммунологического анализа на основе 3Е9 МАТ к МБГ.

Таким образом, подтверждено участие МБГ в патогенезе преэклампсии в большей степени, чем других известных КТС. Препараты двух поликлональных

антител к дигоксину имеют сравнимую кросс-реактивность с кардиотоническими стероидами. При жидкостной хроматографии плазмы пациенток с преэклампсией оба препарата поликлональных антител к дигоксину и моноклональные антитела к МБГ взаимодействовали с эндогенными буфاديенолидами, в том числе с МБГ, в большей степени, чем с эндогенным оубаином. В настоящем исследовании проведено сравнение эффекта трех антител, способных взаимодействовать с КТС, на активность Na/K-АТФазы при преэклампсии. Моноклональные антитела к МБГ обладали наиболее высокой активностью, поликлональные антитела к дигоксину также достоверным образом восстанавливали активность фермента, что свидетельствует о перспективной возможности применения данных препаратов для нейтрализации МБГ при терапии преэклампсии.

#### **4.3 Влияние сульфата магния на активность фермента $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза эритроцитов, ингибированного при преэклампсии**

В разделе 4.2 показано, что препарат поликлональных антител к дигоксину («DigiFab» (BTG International Ltd, UK)) *ex vivo* восстанавливает активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы при преэклампсии в эритроцитах. Для выполнения одной из поставленных задач, в целях проверки гипотезы изучено *ex vivo* действие магния сульфата и поликлональных антител к дигоксину на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы в эритроцитах у пациенток с преэклампсией в присутствии и в отсутствии 3 ммоль/л сульфата магния. А также провели эксперимент по воздействию МБГ в нарастающей концентрации на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов беременных с физиологическим течением беременности в присутствии и отсутствии магния сульфата 3 ммоль/л и в сочетании с поликлональными антителами к дигоксину.

На данном этапе включено в исследование 23 беременные женщины. Из них 11 - с физиологическим течением беременности (группа сравнения) и 12 – с осложненным течением беременности преэклампсией. Так основную группу

составило 12 беременных в возрасте  $30 \pm 1$  лет, срок гестации  $37,9 \pm 0,6$  недель, средний уровень АД  $159 \pm 5/99 \pm 3$  мм.рт.ст. (Таблица 15). Группа сравнения это 11 беременных в возрасте  $29 \pm 1$  год, срок гестации  $39 \pm 0,2$  недели, средний уровень АД  $111 \pm 2/73 \pm 2$  мм рт.ст..

Таблица 15 – Характеристика обследуемых групп

	Группа сравнения (n=11)	Основная группа (n=12)
Возраст матери, лет	$29 \pm 1$	$30 \pm 1$
Гестационных недель на момент родов	$39 \pm 0,2$	$37,9 \pm 0,6$
Артериальное систолическое давление (мм рт. ст.)	$111 \pm 2$	$159 \pm 5^*$
Артериальное диастолическое давление (мм рт. ст.)	$73 \pm 2$	$99 \pm 3^*$
Обозначения: $\pm$ стандартная ошибка среднего значения; (*) – $P < 0,01$ ; в сравнении с испытуемыми с нормальной беременностью, двусторонний t-тест.		

Данные по концентрации маринобуфагенина в плазме и активности фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов у пациенток основной группы с преэклампсией и участниц контрольной группы обобщены в Рисунке 9. Повышенное артериальное давление беременных основной группы сопровождалось 3,5-кратным увеличением концентрации МБГ в плазме ( $1,38 \pm 0,40$  по сравнению с  $0,38 \pm 0,10$  нмоль/л;  $p = 0,02$ ) (Рисунок 9А) и сопутствующим 61% ингибированием активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов ( $1,16 \pm 0,11$  по сравнению с  $2,80 \pm 0,20$  мкмольФн/мл/ч;  $p < 0,01$ ) (Рисунок 9Б). *Ex vivo*, сульфат магния 3 ммоль/л восстанавливает активность фермента основной группы до  $1,86 \pm 0,17$  мкмольФн/мл/ч ( $p < 0,01$ ); также поликлональные антитела к дигоксину (1 мкг/мл) восстанавливают активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы эритроцитов до  $1,72 \pm 0,13$  мкмольФн/мл/ч ( $p < 0,01$ ); а 3 ммоль/л сульфата магния усиливают их действие в 1,3 раза ( $2,30 \pm 0,20$  мкмольФн/мл/ч;  $p < 0,01$ ) (Рисунок 9Б). Исследование эритроцитов в сочетании препарата «DigiFab» и  $\text{MgSO}_4$  продемонстрировало более существенное увеличение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы, превысившее эффект каждого отдельного исследования ( $p < 0,05$ ).

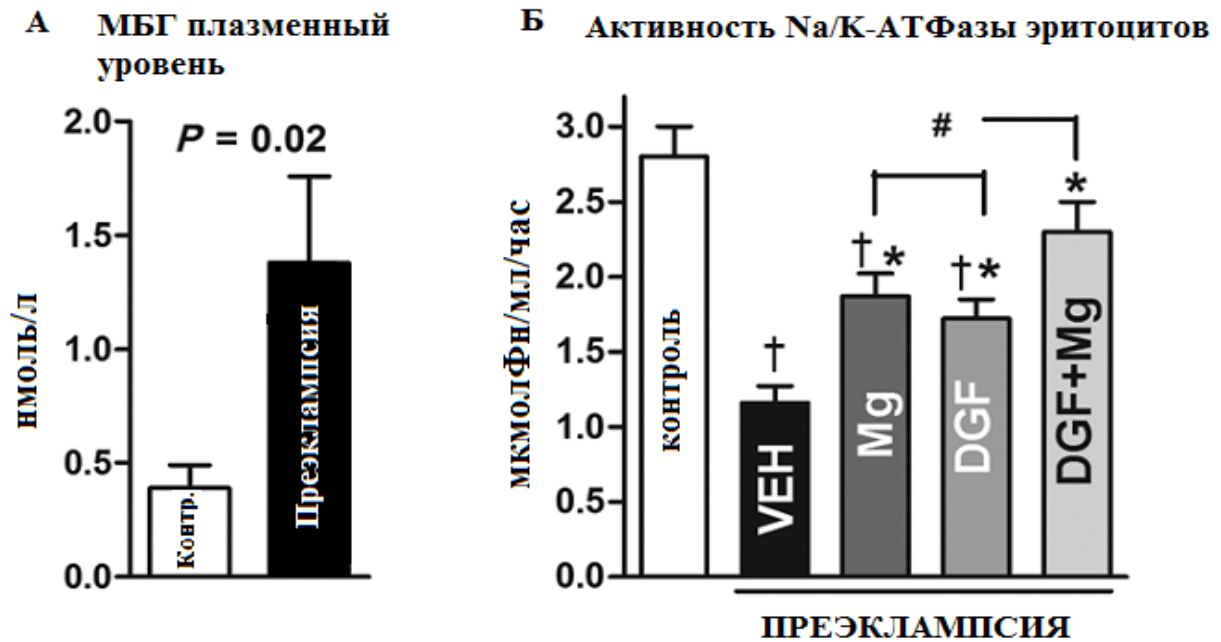


Рисунок 9 - (А) Уровень МБГ в плазме пациентов с физиологическим течением беременности (Контр.) и пациенток основной группы (преэклампсия) (двусторонний t-тест). (Б) Активность фермента Na/K-АТФ-азы в эритроцитах контрольной (контроль) группы и основной (преэклампсия) группы представленной в неизменном виде (VEH), с добавлением «DigiFab» (DGF, 1 мкг/мл),  $MgSO_4$  (Mg, 3 ммоль/л) и их комбинаций (DGF+Mg) с обозначениями +/- стандартная ошибка среднего значения. При помощи однофакторного анализа ANOVA и теста Ньюмана-Кульса: † –  $p < 0,01$  в сравнении с контролем. Методом однофакторного анализа повторных измерений (ANOVA) и теста Ньюмана-Кульса: \*  $p < 0,01$  в сравнении с VEH; # –  $p < 0,05$  по сравнению с DGF и Mg

В следующей серии экспериментов, *in vitro*, мы исследовали ингибирующее влияние нарастающей концентрации МБГ на активность фермента Na/K-АТФ-азы эритроцитов беременных с физиологическим течением. Далее проделали то же самое с добавлением в инкубационную среду сульфата магния и следующая серия – добавление в инкубационную среду сульфата магния в сочетании с поликлональными антителами к дигоксину. Как показано на Рисунке 10, МБГ подавлял активность  $Na^+/K^+$ -АТФ-азы в эритроцитах у испытуемых из группы сравнения в зависимости от концентрации. Сульфат магния не оказывал влияния

на активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы на исходном уровне, однако добавление в инкубационную среду 3 ммоль/л  $\text{MgSO}_4$  заметно сократило чувствительность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы к МБГ. Таким образом,  $\text{IC}_{50}$  в отношении ингибирующего действия МБГ на  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азу в отсутствие и в присутствии  $\text{MgSO}_4$  составило  $1,1 \pm 0,2$  мкмоль/л и  $40 \pm 10$  мкмоль/л соответственно ( $p < 0,01$ ). Добавление в инкубационную среду 1,0 мкмоль/л препарата поликлональных антител к дигоксину в дальнейшем сократило чувствительность  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФ-азы к МБГ ( $290 \pm 49$  мкмоль/л,  $p < 0,01$ ).

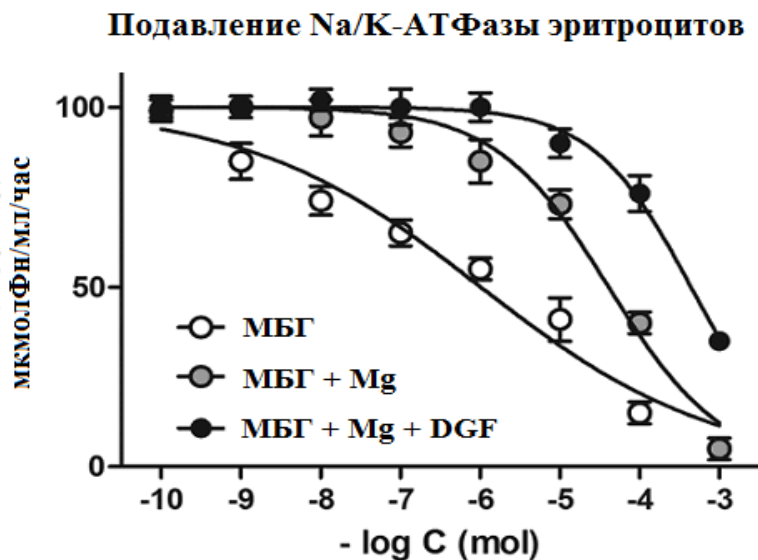


Рисунок 10 - Ингибирование фермента  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФ-азы в эритроцитах МБГ у беременных с физиологическим течением гестации (группа сравнения) в отсутствие и в присутствии 3 ммоль/л сульфата магния ( $\text{Mg}$ ) и сульфата магния и 1,0 мкмоль/л поликлональных антител к дигоксину ( $\text{DGF}$ ) с помощью однофакторного анализа повторных измерений ANOVA и теста Ньюмана-Кульса: МБГ в сравнении с МБГ+Mg и МБГ+Mg+DGF –  $p < 0,01$ ; МБГ+Mg в сравнении с МБГ+Mg+DGF –  $p < 0,05$

Основные результаты данного раздела говорят о том, что сульфат магния снижает чувствительность фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФ-азы для связывания с МБГ в 2 раза, а также усиливает действие поликлональных антител к дигоксину



(«DigiFab») в отношении восстановления этого фермента, ингибированного МБГ при преэклампсии. Таким образом, обоснован еще один патогенетический механизм использования магния сульфата при преэклампсии в качестве антигипертензивного средства, снижая чувствительность фермента в сосудистой стенке, приводит к вазодилатации.

#### 4.4 Влияние маринобуфагенина на фиброз тканей плаценты и артерий пуповины

##### 4.4.1 Уровень коллагена-1 в тканях плаценты и артерий пуповины исследуемых групп

Для выполнения одной из задач исследования оценен уровень коллагена-1 в плаценте и артериях пуповины, как проявление фиброза у больных с преэклампсией в сравнении с физиологически протекающей беременностью.

В исследование включены 21 беременная женщина после подписания согласия на исследование. Группа сравнения 10 женщин с физиологически протекающей беременностью без соматических заболеваний на доношенном сроке и основная - 11 беременных с преэклампсией на доношенном сроке беременности. Характеристика групп представлена в Таблице 16.

Таблица 16 – Общая характеристика исследуемых групп

	Группа сравнения (n=10)	Основная группа (n=11)
Средний возраст (лет)	28 ± 2	29 ± 2
Срок беременности (недель)	39 ± 0,4	39 ± 0,5
Среднее систолическое АД (мм рт. ст.)	112 ± 3	157 ± 5
Средне диастолическое АД (мм рт. ст.)	72 ± 2	94 ± 2
Экскреция белка с мочой (г/сут)	0	2,12 ± 0,46
Уровень МБГ (нмоль/л)	0,47 ± 0,10**	1,56 ± 0,41
Активность Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -АТФазы эритроцитов (мкмольФн/мл/час)	2,71 ± 0,19**	1,51 ± 0,18

Обозначения: ± стандартная ошибка среднего значения. (\*\*) – p <0,01; (\*) – p <0,05 в сравнении с испытуемыми с физиологической беременностью, двусторонний t-тест.

Используя методы исследования, описанные в главе 2, получены следующие результаты.

У пациенток с преэклампсией трехкратное увеличение уровня МБГ, сопровождается 2,5-кратным увеличением уровня коллагена-1 в плацентарной ткани по сравнению с физиологическим течением беременности (Рисунок 11).

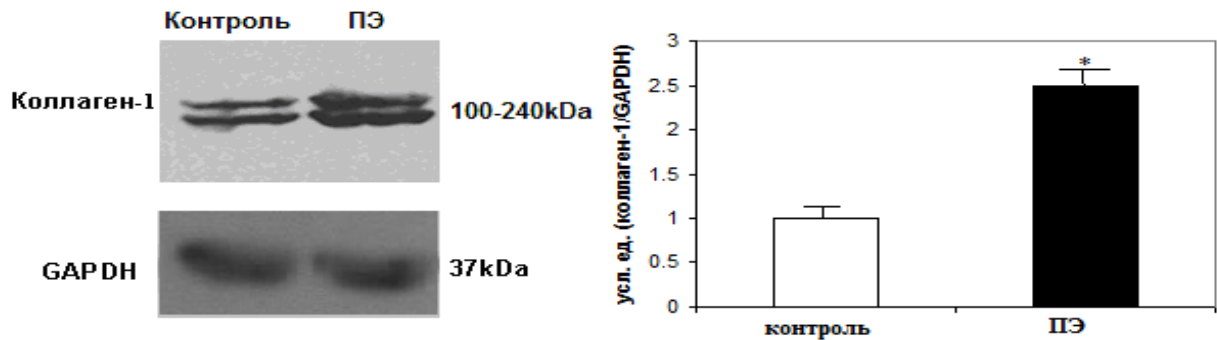


Рисунок 11 – Уровень Коллагена-1 в эксплантах плацент в группе сравнения (Контроль) и основной группе (ПЭ). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферони: \* -  $p < 0,01$

При преэклампсии в артерии пуповины уровень коллагена 1-го типа в 4,5 раза выше по сравнению с физиологическим течением беременности (Рисунок 12).

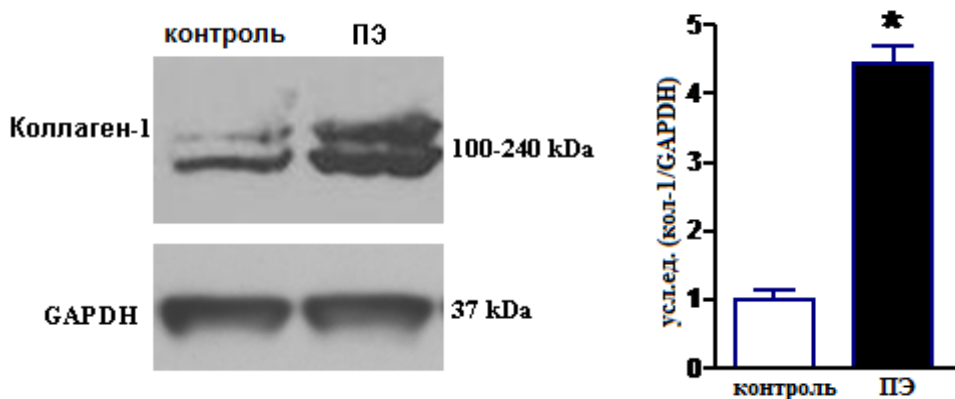


Рисунок 12 – Уровень коллагена-1 во внеклеточном матриксе эксплантов пупочных артерий в группе контроля (контроль) и основной группе (ПЭ).

Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферони \* -  $p < 0,01$

Таким образом, при преэклампсии повышается уровень коллагена-1 в тканях плаценты и артериях пуповины, что подтверждает развитие фиброза у беременных с преэклампсией.

#### **4.4.2 Эксперимент «Влияние маринобуфагенина на уровень экспрессии транскрипционного фактора Fli-1 и уровень коллагена-1 в тканях плаценты»**

Для экспериментального изучения влияния МБГ на экспрессию транскрипционного фактора Fli-1 и уровень коллагена-1 использовали экспланты плацент беременных с физиологическим течением гестации.

Характеристика беременных описана в разделе 4.4.1. Методика эксперимента детально описана во главе 2.

Оценивались уровни экспрессии транскрипционного фактора Fli-1, являющегося отрицательным регулятором промотора гена коллагена 1 типа, и непосредственно сам уровень коллагена 1 типа. Таким образом, при инкубировании эксплантов плацент в среде в присутствии МБГ (10 нмоль/л) уровень белка Fli-1 снизился в 3,5 раза по сравнению с исходным (Рисунок 13А). Снижение количества негативного регулятора промотора гена Col-1 Fli-1 ассоциировалось с 2,5-кратным повышением уровня коллагена 1-го типа относительно исходного (Рисунок 13Б).

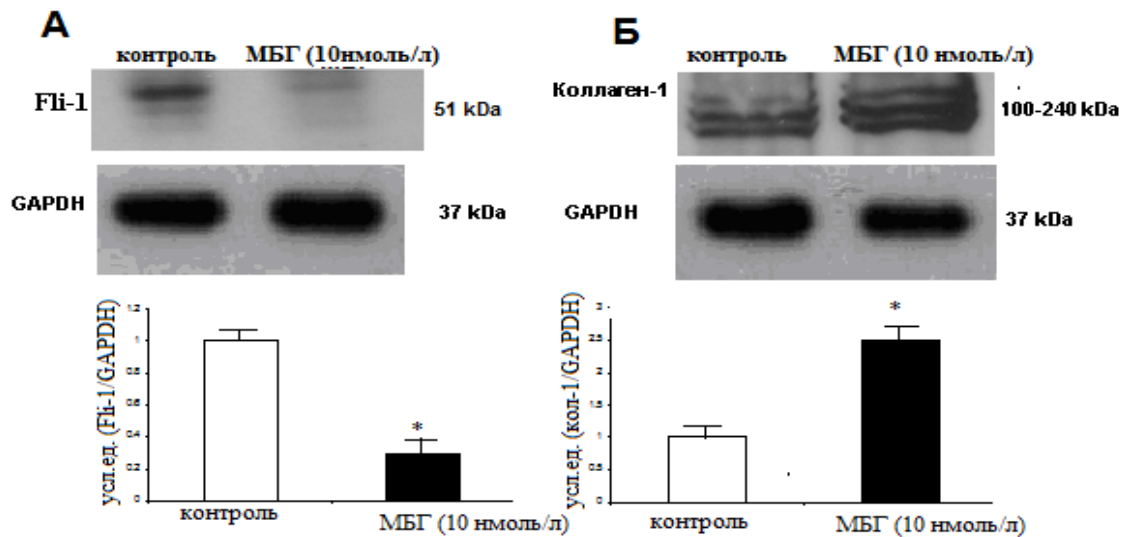


Рисунок 13 – **А** - Уровень белка Fli-1 в эксплантах плацент группы сравнения инкубированных в присутствии и отсутствии МБГ (10 нмоль/л). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферонни: \* -  $p < 0,01$ . **Б** - Уровень коллагена 1 типа в эксплантах плацент группы сравнения инкубированных в присутствии и отсутствии МБГ (10 нмоль/л). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферонни \* -  $p < 0,01$

Таким образом, МБГ, влияя на плацентарные фибробласты, угнетает экспрессию транскрипционного фактора Fli-1, являющегося отрицательным регулятором синтеза коллагена-1, увеличивает синтез коллагена 1 типа, что приводит к фиброзу.

#### 4.4.3 Возможности фармакологической коррекции уровня коллагена-1 в тканях плаценты и артерии пуповины при преэклампсии

Задача данного исследования экспериментальное изучение терапевтического действия поликлональных антител к дигоксину («DigiFab»), производных альдостерона (Дросперинон, Канренон), а также моноклональных антител к МБГ на уровень коллагена-1 в плацентарной ткани беременных с

преэклампсией и моноклональных антител к МБГ на уровень коллагена-1 артерии пуповины при преэклампсии, *in vitro*.

Характеристика групп описана в разделе 4.4.1. Используя методики, описанные в главе 2, получены следующие результаты.

Для изучения возможности терапии фиброза часть плацент основной группы после родов была помещена в транспортную среду и инкубирована в течение 24 ч в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере в 37,8С<sup>0</sup> в присутствии одного из препаратов: моноклональные антитела к МБГ 3Е9 (0,85 мкг/мл), «Digifab» (10 мкг/мл), канренон (10 ммоль/л), дроспиренон (10 ммоль /л).

Из Рисунка 14 виден терапевтический эффект исследуемых веществ на экспланты плацент при преэклампсии, *in vitro*, уровень коллагена-1 снижается при добавлении поликлональных антител к дигоксину в 1,5 раза, а при воздействии дроспиренона, канренона и моноклональных антител к МБГ - в 2,5 раза относительно исходного, что практически соответствует уровню коллагена-1 при физиологической беременности.

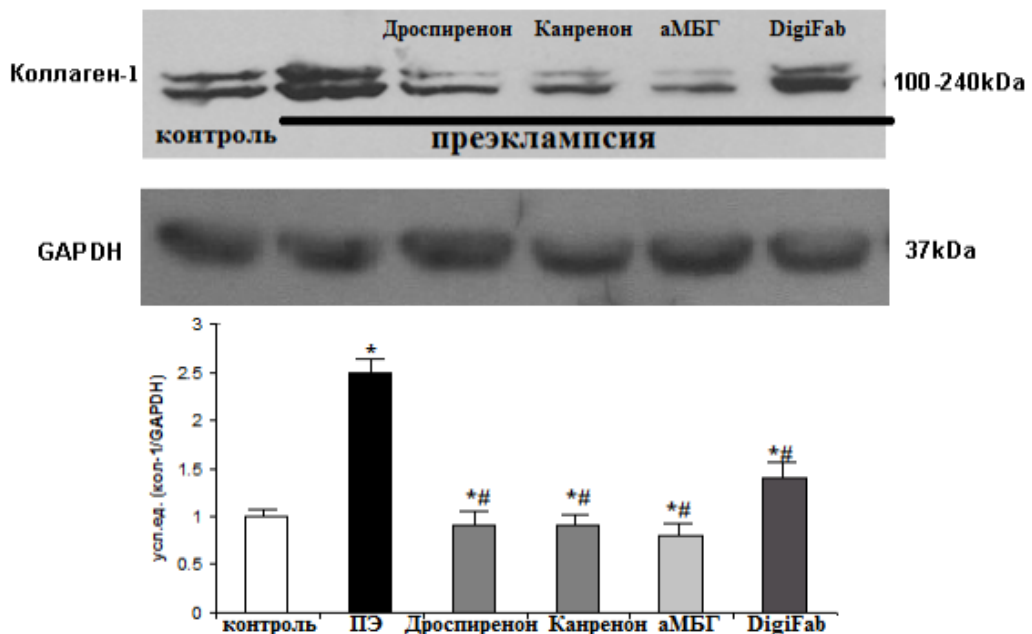


Рисунок 14 - Уровень Коллагена-1 в эксплантах плацент в группах сравнения (Контроль) и основной группы (ПЭ) и плацент ПЭ инкубированных с Дроспиреноном (10 ммоль/л), Канреноном (10ммоль/л), МАТ к МБГ (аМБГ 0,85

мкг/мл) и «Digifab» (10 мкг/мл). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферонни: \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с основной группой (ПЭ)

Из Рисунка 15 видно, что при инкубации эксплантов артерий пуповины от женщин с преэклампсией в течение суток в присутствии МАТ к МБГ (0,85 мкг/мл) уровень коллагена-1 также снижается в 2,5 раза.

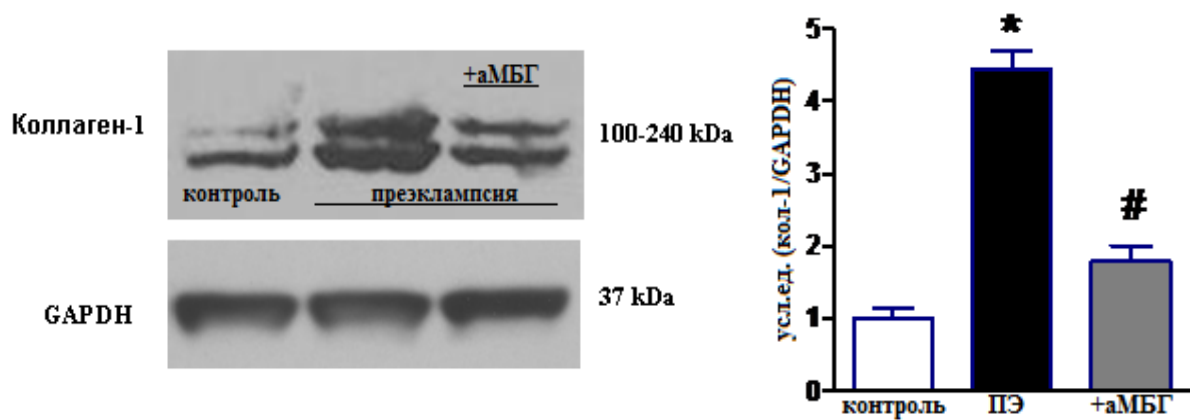


Рисунок 15 - Уровень коллагена-1 во внеклеточном матриксе эксплантов пупочных артерий в группах контроля (Контроль) и основной группе (преэклампсия) и эксплантов инкубированных с МАТ к МБГ 3Е9 (аМБГ 0,85 мкг/мл). Статистический анализ проводился с использованием АНОВА с поправкой по Бонферонни: \* -  $p < 0,01$  по сравнению с контролем, # -  $p < 0,05$  по сравнению с основной группой (ПЭ)

Таким образом, поликлональные антитела к дигоксину, моноклональные антитела к МБГ и производные спиронолактона обладают антифиброзным эффектом в плацентарной ткани и артериях пуповины у беременных с преэклампсией, что является перспективным для использования при терапии преэклампсии.

#### 4.5 Изучение вазорелаксантных свойств артерий пуповины при преэклампсии

На данном этапе оценено как гестаген с антиминиралкортикоидным действием, производное спиронолактона (дроспиренон), влияет на сократительные свойства пуповины беременных с преэклампсией. Известно, что при преэклампсии нарушается расслабляющий эффект на нитропруссид натрия.

В данном исследовании приняло участи 9 беременных женщин с клиническими проявлениями преэклампсии. Общая характеристика представлена в Таблице 17.

Таблица 17 – Характеристика беременных с преэклампсией

	Основная группа (n=9)
Средний возраст (лет)	30 ± 2
Срок беременности (недель)	38 ± 0,5
Среднее систолическое АД (мм рт. ст.)	156 ± 4
Средне диастолическое АД (мм рт. ст.)	97 ± 3
Экскреция белка с мочой (г/сут)	1,96 ± 0,38
Уровень маринобуфагенина (нмоль/л)	1,63 ± 0,34
Активность Na/K-АТФазы эритроцитов (мкмольФн/мл/час)	1,28 ± 0,12

При уровне МБГ 1,63 ± 0,34 нмоль/л активность Na/K-АТФазы эритроцитов составила 1,28 ± 0,12 мкмольФн/мл/час. При инкубации эритроцитов с производным спиронолактона (10 ммоль/л) активность фермента увеличилась в 1,4 раза по сравнению с исходным (1,76±0,2 мкмольФн/мл/час, p < 0.05; Рисунок 16).

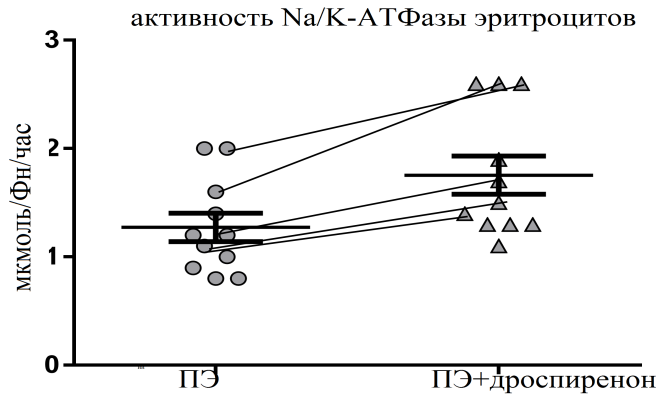


Рисунок 16 – Активность фермента Na/K-АТФ-азы в эритроцитах основной группы исходная (ПЭ) и измеренная после инкубации с добавлением производного альдостерона (дроспиренон, 10 ммоль/л). Двусторонний t-тест –  $p < 0,05$

Используя методику, описанную в главе 2, исследована эндотелий-независимая вазорелаксация артерий пуповины беременных с преэклампсией, *in vitro*. Далее эндотелий-оголенные кольца пупочных артерий инкубированы с дроспиреноном (10 ммоль/л) и также проведены тензометрические исследования (Рисунок 17).

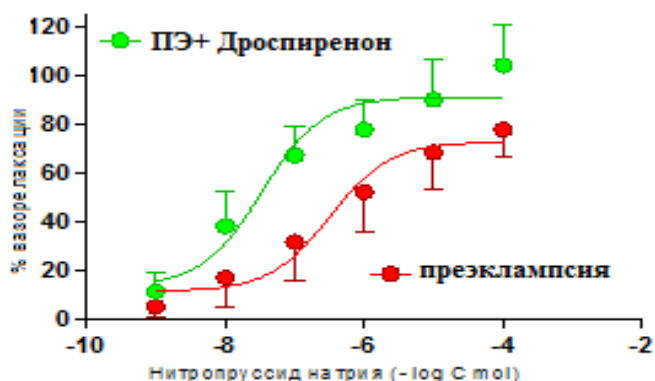


Рисунок 17 - Влияние Дросперинона на эндотелий-независимую вазорелаксацию артерии пуповины нитропруссидом натрия при преэклампсии. Двусторонний t-тест -  $p < 0,05$



Из Рисунка 17 видно, что на фоне воздействия производного альдостерона (дросперинона) повышается релаксирующая способность сосуда относительно исходного беременных с преэклампсией на 25%.

Таким образом, производное альдостерона (дроспиренон) восстанавливает активность Na/K-АТФазы и улучшает релаксацию сосуда на 25% относительно исходного. Эти данные подтверждают благоприятный эффект действия гестагена на сосуды при гипертензивном синдроме, применяемом у небеременных женщин.

#### **4.6 Морфометрический анализ строения ворсин и сосудов плацентарной ткани исследуемых групп**

Для морфометрического изучения плацентарных ворсин и сосудов мы включили две группы испытуемых. Основная группа – 10 женщин, беременность которых осложнилась развитием преэклампсии. Группа сравнения – 10 беременных с физиологическим течением гестационного процесса. Сравнительная характеристика данных групп представлена в Таблице 18.

Таблица 18 - Данные об испытуемых и уровнях артериального давления

	Группа сравнения (n=10)	Основная группа (n=10)
Возраст матери (лет)	27 ± 3	28 ± 1,5
Гестационных недель на момент родов	39 ± 1	39 ± 2
Вес новорожденного (в гр)	3832 ± 429	3310 ± 726
Артериальное систолическое давление (мм рт. ст.)	114 ± 5	158 ± 15
Артериальное диастолическое давление (мм рт. ст.)	72 ± 6	96 ± 6
Плазменный МБГ (нмоль/л)	0,48±0,14	1,53±0,37
Активность Na/K-АТФазы эритроцитов (мкмоль Фн/мл/ч)	2,84 ± 0,2	1,29 ± 0,13

В данном исследовании проведен морфометрический анализ сосудов ворсин плацентарной ткани при физиологическом течении беременности и осложненном преэклампсией. Задача данного исследования изучить соотношение ворсин и сосудов плацентарной ткани при осложнении беременности преэклампсией и при физиологическом её течении, а также оценить морфометрическое строение сосуда.

Обобщенные данные исследования представлены в Таблице 19.

Таблица 19 – Морфометрия ворсин и сосудов плацентарной ткани

	Стволовая ворсина		Зрелая промежуточная ворсина		Терминальная ворсина	
	Контр.	ПЭ	Контр.	ПЭ	Контр.	ПЭ
Ср. ширина ворсины	168,06 ± 73,48	192,51 ± 47,56	103,95 ± 50,39	110,58 ± 46,99	63,5 ± 23,75	60,54 ± 24,01
Ср. длина ворсины	152,48 ± 65,17	119,08 ± 59,25	129,27 ± 57,53	101,25 ± 6,45	90,37 ± 33,41	77,5 ± 28,74
Ср. кол-во ворсин	6 ± 1,2 (28,6%)	5,6 ± 0,5 (23,1%)	6,8 ± 1,3* (32,4%)	11,8 ± 2,1* (48,8%)	8,2 ± 0,8* (39,1%)	6,8 ± 0,4* (28,1%)
Ср. кол-во сосудов	34,8 ± 6,5* (41,3%)	21,4 ± 2,2* (24,5%)	28 ± 7,0 * (33,3%)	45 ± 8,6 * (51,6%)	21,4 ± 3,5 (25,4%)	20,8 ± 2,6 (23,9%)
Ср. кол-во сосудов в 1 ворсине	5,8 ± 0,5 *	3,9 ± 0,3 *	4,1 ± 0,4	3,8 ± 0,3	2,6 ± 0,5	3,1 ± 0,2
Площадь сосуда (µm <sup>2</sup> )	713,01 ± 114,06 *	1084,58 ± 247,99 *	684,65 ± 100,47 *	1255,11 ± 405,75 *	433,23 ± 80,26 *	569,08 ± 87,58 *
Площадь просвета сосуда (µm <sup>2</sup> )	469,33 ± 83,01 (66%)	395,58 ± 117,94 (36%)	436,21 ± 67,68 (64%)	484,12 ± 116,55 (39%)	254,70 ± 52,41 (59%)	217,81 ± 52,01 (38%)
Площадь стенки сосуда (µm <sup>2</sup> )	243,68 ± 33,37 * (34%)	689,0 ± 148,89 * (64%)	248,44 ± 34,74 * (36%)	770,99 ± 326,40 * (61%)	178,53 ± 29,14 * (41%)	351,27 ± 41,36 * (62%)

Примечание: обозначения средние значения, ± стандартная ошибка среднего значения, тест Манна Уитней U \* - p < 0,05

Из Таблицы 19 видно, что соотношение ворсин в плацентарной ткани различается при преэклампсии и физиологическом течении беременности. Так

при преэклампсии преобладают зрелые промежуточные ворсины (48,8 % против 32,4 %;  $p < 0,05$ ), когда при физиологической беременности 39,1 % составляют терминальные ворсины против 28,1 % группы с преэклампсией ( $p < 0,05$ ). Количество стволовых ворсин в обеих группах достоверно не различается (23,1 % против 28,6 % при физиологическом течении беременности).

Размеры ворсин в исследуемых препаратах достоверно не различались (Таблица 19).

Соотношение сосудов в препарате выглядит следующим образом. При преэклампсии сосудов также больше в зрелых промежуточных ворсинах (51,6 %), когда в стволовых и терминальных ворсинах практически одинаково (24,5 % и 23,9 % соответственно), а при физиологическом течении беременности сосуды преобладают в стволовых ворсинах (41,3 %), а в зрелых промежуточных и терминальных по убыванию (33,3 % и 25,4 % соответственно).

При пересчете количества сосудов на одну ворсину получены следующие данные. В стволовой ворсине при физиологическом течении беременности сосудов в 1,5 раза больше, чем в основной группе ( $5,8 \pm 0,5$  против  $3,9 \pm 0,3$  при преэклампсии,  $p < 0,05$ ). В зрелой промежуточной и терминальной ворсинах достоверных различий в количестве сосудов между группами сравнения не выявлено (в зрелой промежуточной ворсине: группа сравнения  $4,1 \pm 0,4$  против  $3,8 \pm 0,3$  основной; в терминальной -  $2,6 \pm 0,5$  против  $3,1 \pm 0,2$  соответственно;  $p > 0,05$ ).

При измерении площади сосуда и площади просвета сосуда, получены следующие данные (Таблица 19, Рисунок 18). Площадь сосуда стволовой ворсины в 1,5 раза больше при преэклампсии, чем при физиологическом течении беременности ( $1084,58 \pm 247,99 \mu\text{m}^2$ , против  $713,01 \pm 114,06 \mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$ ). Причем, у основной группы площадь стенки сосуда в 2,8 раза превышает площадь стенки сосуда при физиологической гестации ( $689,0 \pm 148,89 \mu\text{m}^2$ ,  $243,68 \pm 33,37 \mu\text{m}^2$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Площадь просвета в обеих группах достоверно не различается (основная группа -  $395,58 \pm 117,94 \mu\text{m}^2$ , группа сравнения  $469,33 \pm$

83,01  $\mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,05$ ). Интересно соотношение площадей просвета сосуда и стенки сосуда к общей площади сосуда в процентном соотношении. У беременных основной группы 64 % составляет площадь стенки сосуда и 36 % - просвет сосуда. Однако в группе сравнения соотношение площадей следующее: 34 % - занимает площадь стенки сосуда, а 66 % - принадлежит просвету.

В зрелой промежуточной ворсине также площадь сосуда при преэклампсии в 1,8 раза превышает таковую группы сравнения ( $1255,11 \pm 405,75 \mu\text{m}^2$ ,  $684,65 \pm 100,47 \mu\text{m}^2$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Площадь стенки сосуда основной группы также в 3,1 раза превышает площадь стенки сосуда при физиологическом течение беременности ( $770,99 \pm 326,40 \mu\text{m}^2$ ,  $248,44 \pm 34,74 \mu\text{m}^2$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Площадь просвета в обеих группах также достоверно не различается (основная группа -  $484,12 \pm 116,55 \mu\text{m}^2$ , группа сравнения -  $436,21 \pm 67,68 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,05$ ). А соотношение площади стенки и просвета сосуда также в пользу площади стенки сосуда – 61% против 39%. А в группе сравнения данное соотношение противоположно – 36% площадь стенки и 64% площади занимает просвет сосуда.

В терминальных ворсинах площадь сосуда в группе преэклампсии в 1,3 раза больше площади группы сравнения ( $569,07 \pm 87,58 \mu\text{m}^2$  против  $433,23 \pm 80,26 \mu\text{m}^2$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Площадь стенки сосуда основной группы также в 2 раза превышает площадь стенки сосуда при физиологическом течение беременности ( $351,27 \pm 41,36 \mu\text{m}^2$ ,  $178,53 \pm 29,14 \mu\text{m}^2$  соответственно,  $p < 0,05$ ). Площадь просвета в обеих группах также достоверно не различается (основная группа -  $217,81 \pm 52,01 \mu\text{m}^2$ ,  $254,70 \pm 52,41 \mu\text{m}^2$ ,  $p > 0,05$ ). И в данном случае площадь стенки сосуда в основной группе превышает площадь просвета сосуда, 62% против 38%. А в группе контроля данное соотношение противоположно: 41% - площадь стенки сосуда и 59% площади занимает просвет сосуда.

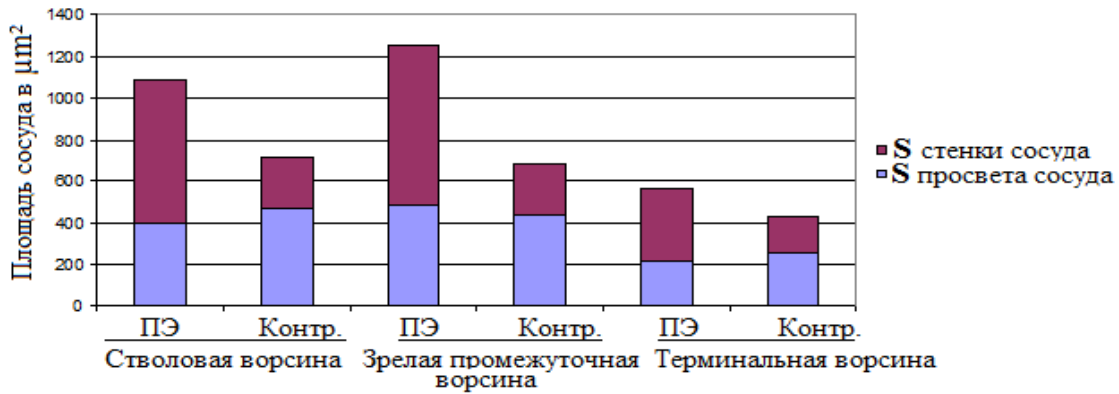


Рисунок 18 – Средняя площадь сосуда в ворсинах основной группы (ПЭ) и группы сравнения (Контр.) и соотношение площадей стенки и просвета сосуда.

Таким образом, при осложненном течении беременности преэклампсией нарушаются процессы дифференцировки ворсин хориона. Также нарушено развитие сосудистой сети. В отношении строения сосудов, то при преэклампсии сосуды увеличены по площади, но просвет сосудов составляет всего 1/3 площади, а 2/3 занимает стенка сосуда. Когда при физиологическом течении беременности это соотношение противоположно, несмотря на то, что просвет сосуда в обеих группах достоверно не различался. Таким образом, утолщение стенки сосуда вероятнее всего связано с повышенной выработкой коллагена. А в стенке сосуда преобладает коллаген 1 типа, количество которого контролируется транскрипционным фактором Fli-1, на который негативно влияет маринобуфагенин.

## ГЛАВА 5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование посвящено изучению роли кардиотонических стероидов, в частности маринобуфагенина, в патогенезе гипертензионного синдрома преэклампсии, а также поиску перспективных методов патогенетической терапии данного осложнения. Работа основана на сравнительном изучении концентраций КТС в плазме крови у женщин с физиологическим течением беременности и у беременных, гестация которых осложнилась преэклампсией, исследовании взаимосвязи МБГ-Fli-1-коллаген-1 в тканях плаценты, изучении вазоконстрикторного действия маринобуфагенина при преэклампсии, а также поиске перспективных методов фармакологической коррекции патологического влияния маринобуфагенина.

Изучена активность фермента для КТС и концентрация маринобуфагенина в плазме крови при физиологически протекающей беременности и осложненной преэклампсией, в клинике которой на первый план выходил гипертензионный синдром. Проведена сравнительная характеристика перспективных иммунонейтрализующих фармакологических средств по ингибирующему влиянию маринобуфагенина при преэклампсии на активность фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Исследовано влияние ионов магния (сульфата магния) на ингибирующее действие КТС, в частности маринобуфагенина, на фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза эритроцитов при преэклампсии и в эксперименте. Показана взаимосвязь МБГ-Fli-1-коллаген-1 в плаценте, а также перспективные пути фармакологической коррекции фиброза при преэклампсии. Исследования проведены в клинике и экспериментально, с использованием стандартных физикальных, лабораторных, инструментальных и комплексных биохимических и иммунологических методов оценки состояния беременных женщин и изучаемых параметров.

Для выполнения данного исследования набрано две группы испытуемых. Первую – основную группу составили беременные с преэклампсией, на

доношенном сроке беременности, основным синдромом выступала артериальная гипертензия. Вторую группу сравнения – беременные с физиологическим течением гестации. По остальным признакам группы были равноправны.

Полученные данные о повышении маринобуфагенина в 3-4 раза при преэклампсии по сравнению с физиологическим течением беременности, а также сопровождающееся 50% подавление фермента  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов согласуется с данными других исследователей [Lopatin DA et al., 1999; Averina IV et al., 2006].

Дигиталисподобные КТС действуют как эндогенные лиганды  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и оказывают эффекты, опосредованные насосным и сигнальным эффектами данного фермента [Bagrov AY et al., 2008, 2009]. В соответствии с представлением о натрийуретическом гормоне КТС производятся с адаптивной целью, для регуляции экскреции натрия посредством ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в почечных канальцах [Bagrov AY et al., 2008]. У пациентов с солечувствительной гипертонией чрезмерно увеличенный КТС-ответ производит ингибирование натриевого насоса в сосудистой системе, что приводит к ангиоспазму [Bagrov AY et al., 2008, 2009]. Кроме того, возрастающее количество данных свидетельствует о том, что КТС связываются с  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазой и вызывают реакции в клеточной сигнальной системе, что приводит в оксидативному стрессу, гипертрофическому росту и фиброзу, апоптозу, а также клеточной дифференцировке [Bagrov AY et al., 2008]. Предшествующие исследования продемонстрировали, что уровень КТС, в том числе МБГ и эндогенный убаин, в плазме млекопитающих умеренно повышен в период беременности, что указывает на то, что данные гормоны вовлечены в физиологию беременности [Lopatin DA et al., 1999; Averina IV et al., 2006; Fedorova OV et al., 2008; Goodlin RC. et al., 1987]. Однако, при преэклампсии уровень КТС, и особенно МБГ, в плазме и плаценте существенно увеличивается и сопровождается повышенным артериальным давлением и ингибированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах [Lopatin DA et al., 1999; Averina IV et al., 2006;

Fedorova OV et al., 2008; Goodlin R.C. et al, 1987]. Более того, при преэклампсии плацентарное сосудистое русло проявляет повышенную чувствительность к ангиоспазму, вызываемому КТС [Armler E et al., 1994]. Новейшие данные указывают на то, что вклад КТС в патогенез преэклампсии не ограничивается только ангиоспазмом. Было установлено, что маринобуфагенин при преэклампсии способствует ухудшению релаксации сосудов, вызывая фиброз их стенки посредством ингибирования Fli-1, нуклеарного фактора транскрипции и известного как негативный регулятор синтеза коллагена [Nikitina ER et al., 2011]. Кроме того, МБГ, действуя посредством активации Jnk, p38 и Src, приводит к увеличению апоптоза и секреции фактора дифференцировки В-клеток (IL 6), что, по сведениям, ухудшает пролиферацию, миграцию и инвазию клеточного трофобласта [LaMarca HL et al., 2006; Uddin MN et al., 2010]. Было показано, что повышенный уровень МБГ сопровождался уменьшением числа нефронов у потомства получавших NaCl беременных крыс, что, как известно, является фактором, провоцирующим последующее развитие гипертензии [Koleganova N et al., 2011].

Выше перечисленные свойства делают МБГ важной мишенью в терапии преэклампсии, но интерференция с МБГ на уровне системы клеточных сигналов может создавать помехи для других сигнальных путей, вовлеченных в физиологию беременности [Uzumcu M et al., 2002; Kita N, et al., 2003]. Таким образом, иммунонейтрализация при преэклампсии представляется перспективным подходом к МБГ антагонизму. Так как КТС обладают общими с дигиталисом и дигоксином антигенными свойствами, а индуцированные к ним антитела применялись для лечения преэклампсии у людей, возникла идея иммунонейтрализации КТС с помощью поликлональных антител к дигоксину («Digibind» (Goodlin RC. 1987)). Гудлин (Goodlin) первым сообщил об успешном применении «Digibind» у пациенток с преэклампсией [Goodlin RC, 1988]. После сообщений о единичных случаях применения [Adair CD et al., 1996, 2009], было объявлено о том, что «Digibind» снижал артериальное давление у группы



участников эксперимента с послеродовой преэклампсией [Adair CD et al., 2009]. Данные недавнего рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования фазы II В «Digibind» с женщинами с тяжелой формой дородовой преэклампсии дают основания предполагать, что вызванные КТС отклонения от нормы могут быть нейтрализованы «Digibind» [Adair CD et al., 2010]. Тот факт, что в настоящем исследовании, ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах при преэклампсии было *in vivo* нейтрализовано иммунонейтрализацией КТС, свидетельствует о том, что при преэклампсии существует причинно-следственная связь между высокими уровнями эндогенного дигиталиса и ингибированием натриевого насоса. В 2011 году производство «Digibind» было прекращено, и в настоящее время «DigiFab» остается единственным антителом к дигоксину, разрешенным для назначения людям. Полученные данные в настоящем исследовании дают основания предположить, что «DigiFab» может также использовать в отношении нейтрализации ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы у беременных с преэклампсией.

Так как некоторые карденолиды и буфадиенолиды КТС существуют в тканях млекопитающих, возникает вопрос, связанный с определением мишеней для поликлональных антител к дигоксину при преэклампсии. В настоящем исследовании два поликлональных антитела, также как и МАТ к МБГ не выявили прироста в уровне материала, элюирующегося с убаином (ВЭЖХ фракция 6). Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее, что буфадиенолид МБГ более эндогенного убаина вовлечен в патогенез преэклампсии [Fedorova OV et al., 2008; Nikitina ER et al., 2011].

В сравнительном иммунологическом анализе, оба поликлональных антитела к дигоксину выявили существенный прирост в уровне КТС в ВЭЖХ фракциях [Adair CD, et al., 2009, 2010, 2009; Haller ST et al., 2012; Fedorova OV, et al., 2005]. В то время как 4G4 МАТ выявили возросший уровень МБГ, в основном в ВЭЖХ фракциях [Adair CD, et al., 2009], 3E9 МАТ к МБГ было способно выявить вызванное преэклампсией увеличение КТС в ВЭЖХ фракциях [Adair CD, et al.,

2009, 2010, 2009; Haller ST et al., 2012; Fedorova OV, et al., 2005], что захватывает материал, выявленный с помощью анализов на основе «DigiFab» и «Digibind». Таким образом, оба поликлональных антитела к дигоксину дают перекрестную реакцию с МБГ-иммунореактивным материалом, элюирующемся во фракциях 18-22 и соответствует времени элюции некоторых других буфадиенолидов, буфалина, резибуфагенина и цинобуфагина. Данный график обнаруживает близкое сходство с картиной, наблюдаемой в исследовании, посвященном взаимодействиям «Digibind» с КТС преэкламптической плаценты [Fedorova OV, et al., 2010]. В исследовании в результате ВЭЖХ фракционирования хлороформного извлечения преэкламптической плаценты 3Е9 МАТ наряду с МБГ в чистом виде дают перекрестную реакцию с более водостойким материалом, показывающим большее время удержания, чем МБГ. В настоящем исследовании вызванное преэклампсией увеличение в уровне КТС в ВЭЖХ фракциях, элюирующихся позже МБГ, было выявлено 3Е9 МАТ, «DigiFab» и «Digibind» [Fedorova OV, et al., 2010]. Таким образом, предыдущие экспериментальные данные и наши настоящие сведения оправдывают поиск ещё неидентифицированных водостойких буфадиенолидов КТС. Тот факт, что 3Е9 МАТ дают перекрестную реакцию с ЖХВР фракциями из плазмы пациенток с преэклампсией, по крайней мере, частично объясняет очень высокую специфическую активность данного антитела. Так, у крыс с хронической почечной недостаточностью единичная инъекция 3Е9 МАТ вызывала гипотензивный эффект продолжительностью 7 дней и уменьшала уровень оксидативного стресса и фиброза в миокарде [Haller ST et al., 2012].

Подводя итог, следует отметить, что наши результаты говорят о том, что, оба поликлональных антитела к дигоксину выявляют идентичные КТС в плазме при преэклампсии, демонстрируют сопоставимую перекрестную реактивность с КТС и обнаруживают схожую способность *ex vivo* нейтрализовать ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, вызванное преэклампсией. Так как «DigiFab» оказался клинически схожим с «Digibind» по способности иммунологически

нейтрализовать КТС, он перспективен в лечении преэклампсии и прочих состояний, при которых КТС проявляют патологическое воздействие, в том числе церебральный синдром потери соли [Menezes JC, et al., 2003] и хроническую болезнь почек [Haller ST et al., 1012; Kolmakova EV et al., 2011].

Учитывая, что фермент  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза является магнийзависимым, проведенные исследования говорят о том, что сульфат магния усиливает действие поликлональных антител к дигоксину в отношении ингибирования  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы при преэклампсии посредством эндогенных КТС, в частности МБГ. При преэклампсии повышение концентрации МБГ демонстрирует прогипертензивный эффект вследствие ингибирования васкулярной  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы [Lopatin DA et al., 1999].  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза эритроцитов чувствительная к эндогенным КТС, и изменения в ее активности могут служить маркером, характеризующим интенсивность КТС-зависимых эффектов [Fedorova OV et al., 2008]. Соответственно, в настоящем исследовании повышенная концентрация МБГ у пациенток с преэклампсией была связана с существенным ингибированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов, в то время как *ex vivo* инкубация крови пациенток с преэклампсией в присутствии КТС-нейтрализующих антител, «DigiFab», восстанавливала активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. В настоящем исследовании «DigiFab» *ex vivo* восстанавливал активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, а увеличение концентрации  $\text{Mg}^{2+}$  ионов в инкубационной среде усиливало действие «DigiFab». Соответственно, *in vitro* МБГ сильно ингибировал  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазу в эритроцитах у контрольной группы, а  $\text{Mg}^{2+}$  сокращал чувствительность  $\text{Na}/\text{K}$ -АТФазы к МБГ. Полученные результаты согласуются с клиническими данными предыдущих исследований, продемонстрировавших, что  $\text{MgSO}_4$  способен нивелировать вредный для сердечной деятельности эффект чрезмерной дозы дигиталиса [Reisdorff EJ et al., 1986], а  $\text{Mg}^{2+}$  ионы способны к изменению конформации  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы. Полученные результаты данного исследования дают основания полагать, что  $\text{MgSO}_4$  способен увеличивать эффективность осуществляемой «DigiFab» иммунонейтрализации ингибирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы при МБГ-

патологических состояниях, когда концентрация КТС повышается. Так же обосновывает гипотензивный эффект самостоятельного применения сульфата магния 25% в терапии преэклампсии.

Результаты наших исследований подтверждают тот факт, что маринобуфагенин играет немаловажную роль в развитии плацентарного фиброза и фиброза артерий пуповины при преэклампсии. Адекватное формирование плаценты определяет течение всей беременности и развитие плода. Описано влияние маринобуфагенина на процессы миграции, инвазии и дифференциации экстравиллозного цитотрофобласта [LaMarca HL et al., 2006; Uddin M.N et al., 2008], также влияние маринобуфагенина на ангиогенный и пролиферативный баланс [J.C. Ehrig et al., 2014]. По данным проведенного исследования при преэклампсии повышается уровень коллагена-1 в 2,5 – 4,5 раза по сравнению с физиологическим течением беременности. В данном исследовании, продемонстрировано развитие фиброза плаценты в эксперименте. При инкубации плацентарной ткани физиологической беременности с добавлением в среду МБГ (10 нмоль/л) повышается уровень коллагена-1 на фоне сниженного ядерного фактора транскрипции Fli-1, по сравнению с исходным значением, что также согласуется с экспериментальными данными фиброза на крысах [Elkareh J et al., 2009; Haller ST et al., 2012; Fedorova OV et al., 2015]. Можно сделать вывод, что МБГ-индуцированный синтез коллагена-1 в плаценте осуществляется посредством инактивации ядерного фактора транскрипции Fli-1. При морфометрическом анализе сосудов ворсин плаценты отмечено значительное утолщение их стенки у беременных с преэклампсией, что может свидетельствовать о их фиброзе. В работе посвященной плацентарной недостаточности в том числе и при преэклампсии выявлены прямые зависимости количества миофибробластов и внутриплацентарных гемодинамических нарушений в 36 недель беременности. Следовательно, чем большее количество миофибробластов выявлялось в строме крупных ворсин плаценты, тем более интенсивный кровоток наблюдался в центральной и парацентральной зонах плаценты [Закурина А.Н., 2011]. Автор в

своем исследовании сделал следующий вывод: При плацентарной недостаточности в III триместре беременности активность Na/K-АТФ-азы в эритроцитах крови пациенток обратно коррелирует с наличием гипотрофии плода; активность этого фермента в эритроцитах пуповинной крови прямо коррелирует со степенью гемодинамических нарушений в функциональной системе мать-плацента-плод и наличием гипотрофии плода, а также количеством миофибробластов в строме крупных ворсин плаценты [Закурина АН., 2011].

Таким образом, снижение перфузии в плаценте при преэклампсии формируется на фоне неадекватной трансформации спиральных артерий, вазоконстрикции и повышенной выработки коллагена. Поскольку известно терапевтическое влияние поликлональных антител к дигоксину, МАТ к МБГ на восстановление активности Na/K-АТФазы, а также канренона и дроспиренена на снижение фиброза, исследовано, как они влияют на уровень коллагена-1 и в плацентарных эксплантах. Что подтвердило их терапевтическое действие. Вопрос о применении антител к маринобуфагенину в качестве терапии преэклампсии открыт. Опубликовано двойное слепое исследование применения препарата «Digibind» (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC) у беременных с тяжелой преэклампсией с позитивным ЭДПФ статусом [Lam GK et al., 2013]. Где отмечен положительный эффект применения препарата, но требуется проведение большого рандомизированного исследования. Однако выпуск данного препарата компанией прекращен. Также антитела к маринобуфагенину в Российской Федерации не зарегистрированы. Дроспиренон, как гестаген с антиминиралкортикоидной активностью, так же показал эффект снижения плацентарного фиброза и улучшения вазорелаксации артерий пуповины. Данные результаты подтверждают выводы других исследователей, что этот гестаген предупреждает сосудистый и миокардиальный фиброз [Preston R.A. et al., 2005; Meendering J.R. et al., 2010]. Этот факт обосновывает возможность использовать дроспиренон и канренон (спиронолактон) у женщин, перенесших тяжелую преэклампсию с высоким

уровнем МБГ, для снижения сосудистой жесткости и риска сердечно-сосудистых заболеваний.

В литературе описано нарушение сократительных свойств артерии пуповины при преэклампсии и показано участие маринобуфагенина в этом процессе. Учитывая данные успешного применения препаратов с дроспиреноном у небеременных женщин с гипертензивным синдромом [Archer DF et al., 2005; White WB et al., 2005], изучено, как данный гестаген влияет на сократительную активность при гипертензивном синдроме преэклампсии на сосуд. И такой моделью доступна с этической точки зрения артерия пуповины у беременных женщин с преэклампсией, где гипертензивный синдром занимает одно из важных мест. В результате исследования выявлено нарушение эндотелий-независимого расслабления артерии пуповины при преэклампсии на воздействие нитропруссидом натрия, а инкубация их с дроспиреноном улучшает процессы релаксации.

Таким образом, кардиотонические стероиды, в частности маринобуфагенин, играют важную патогенетическую роль в развитии гипертензионного синдрома и фиброза при преэклампсии. Иммунонейтрализация и антагонизм в связывании с ферментом являются перспективными подходами в терапии данного заболевания. Также обосновано еще одно терапевтическое действие сульфата магния, широко применяемого при преэклампсии.

**ВЫВОДЫ**

1. У беременных с преэклампсией увеличение плазменной концентрации маринобуфагенина сочетается с увеличением в плацентарной ткани и артериях пуповины коллагена-1: при трехкратном увеличении в 2,5 и 4,5 раза соответственно по сравнению с физиологическим течением беременности ( $p < 0,01$ )
2. При инкубации плацент с маринобуфагенином доказан в эксперименте механизм формирования МБГ-индуцированного фиброза: при взаимодействии МБГ и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в 3,5 раза снижается уровень негативного регулятора промоутера гена Col-1 Fli-1 и увеличивается в 2,5 раза уровень коллагена-1 в плацентарной ткани женщин со срочными родами при физиологическом течении беременности ( $p < 0,01$ )
3. Установлено *in vitro* антифибротическое влияние поликлональных антител к дигоксину, моноклональных антител к МБГ, производных альдостерона на МБГ-индуцированный фиброз в плаценте и артериях пуповины женщин с преэклампсией: поликлональные антитела к дигоксину снижают уровень коллагена-1 в 1,5 раза, моноклональные антитела к МБГ и производные альдостерона в 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), что позволяет рассматривать данные препараты как перспективные для лечения гипертензионного синдрома преэклампсии
4. Установлено в эксперименте на артериях пуповины женщин со срочными родами с преэклампсией, что производное альдостерона восстанавливает активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и улучшает на 25% релаксацию сосуда относительно исходного ( $p < 0,05$ )
5. Показан иммунонейтрализующий эффект по способности восстанавливать активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов у беременных доношенного срока с преэклампсией двух поликлональных антител к дигоксину и моноклональных антител к МБГ до 79%, 77%, 84%

соответственно относительно физиологической беременности ( $p < 0,01$ ), что позволяет рассматривать данные препараты в качестве перспективных лекарственных средств для лечения гипертензионного синдрома преэклампсии. Ионы магния *in vitro* снижают чувствительность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы к ингибирующему влиянию маринобуфагенина в 2 раза.



**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

- Полученные данные могут являться основанием для разработки и дальнейшего внедрения в практику измерения маринобуфагенина и активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в качестве маркера фиброза при гипертензионном синдроме преэклампсии
- Полученные результаты обосновывают необходимость разработки препаратов антигипертензивного и антифибротического свойства на основе иммунонейтрализации маринобуфагенина и антагонизма производных альдостерона и маринобуфагенина для лечения беременных с преэклампсией
- Полученные результаты патогенетически обосновывают клиническое применение магния сульфата 25 % у беременных с преэклампсией, как антигипертензивного средства

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АА – антагонисты альдостерона  
АГ – артериальная гипертензия  
АД – артериальное давление  
АДФ – аденозиндифосфорная кислота  
АТ II - ангиотензин II  
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота  
АФК – активные формы кислорода  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГБ - гипертоническая болезнь  
ДЖВП – дискинезия желчевыводящих путей  
ЖКБ – желчекаменная болезнь  
ИМТ – индекс массы тела  
ИППП – инфекции передаваемые половым путем  
КТС - кардиотонические стероиды  
ЛЖ - левый желудочек  
МАТ к МБГ – моноклональные антитела к маринобуфагенина  
МАТ к МБГ – моноклональные антитела к маринобуфагенину  
МБГ - маринобуфагенин  
МКБ-10 – международная классификация болезней 10-го пересмотра  
Мм рт. ст. - миллиметр ртутного столба  
МО - минутный объем  
ОПВ – общая прибавка веса  
ОПСС - общее периферическое сосудистое сопротивление  
ОЦК - объём циркулирующей крови  
ПМК – пролапс митрального клапана  
ПЭ – преэклампсия  
РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система  
САД – систолическое артериальное давление  
СЗФО – Северо-Западный Федеральный округ  
СМАД - суточное мониторирование артериального давления  
УО – ударный объем

ФИЗК - фосфоинозитид-3 киназа

ЦТБ – цитотрофобласт

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭДФ – эндогенный дигоксиподобный фактор

Эхокардиография с IBS – методика, основанная на откалиброванном интегрированном обратном рассеянии

EGFR - рецептор эпидермального фактора роста

Fli-1 – негативный регулятор промоутера гена коллагена-1

JEG-3 – клетки человеческого трофобласта

Jnk (c-Jun N-terminal kinase) - семейство митоген-активированных протеинкиназ, которые реагируют на стрессовые стимулы, такие как цитокины, ультрафиолетовое облучение, тепловой шок, осмотический шок, участвуют в дифференциации Т-клеток и пути клеточного апоптоза

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФаза = НКА – оубаин-чувствительная магнийзависимая натрий-калиевая аденозинтрифосфотаза

p38 — семейство митоген-активированные протеинкиназы, которые реагируют на стрессовые стимулы, такие как цитокины, ультрафиолетовое облучение, тепловой шок, осмотический шок, участвуют в клеточной дифференциации, апоптозе, аутофагии

PKC – протеинкиназы С

PlGF — плацентаный фактор роста

PLC – фосфолипаза С

sEnd — растворимый эндоглин

Src – не связанная с клеточным рецептором тирозинкиназа, участвующая в процессах эмбрионального развития и клеточного роста

Src-семейство киназ — нерцепторные протеинкиназы млекопитающих, схожие по структуре с Src

sFlt-1 - растворимая fms-подобная тирозинкиназа-1

TRP белки – промоторы, активируемые в клетках опухолей

VEGF - сосудистый эндотелиальный фактор роста

VEGF-1 — рецептор 1 сосудистого эндотелиального фактора роста

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айламазян, Э. К. Гестоз : теория и практика / Э. К. Айламазян, Е. В. Мозговая. – М. : МЕДпресс-информ, 2008. – 272 с.
2. Акушерство : национальное руководство / под ред. В. И. Кулакова, Э. К. Айламазяна, В. Е. Радзинского. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 1200 с.
3. Акушерство : учебник / Г. М. Савельева [и др.]; под общ. ред. Г. М. Савельевой. – М. : Медицина, 2000. – 816 с.
4. Акушерство : учебник для медицинских вузов / Э. К. Айламазян, Б. Н. Новиков, М. С. Зайнулина [и др.] – 6-е изд. – СПб. : СпецЛит, 2007. – 528 с.
5. Багров, А. Я. Буфадиенолидная природа эндогенного ингибитора человеческой Na/K-АТФазы / А. Я. Багров, И. Я. Георгиев, В. М. Шпен, Р. Ю. Дмитриева // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1997. – Т. 33, № 3. – С. 355-363.
6. Болдырев, А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М. : МГУ, 1985. – 208 с.
7. Болдырев, А. А. Введение в мембранологию. – М. : МГУ, 1990. – 208 с.
8. Болдырев, А. А. Влияние лигандов на вращательную подвижность Na/K-АТФазы / А. А. Болдырев, А. М. Рубцов // Биохимия. – 1995. – Т. 60, Вып. 7. – С. 1171-1179.
9. Болдырев, А. А. Роль структуры субстрата в функционировании Na/K-АТФазы / А. А. Болдырев, А. Д. Лопина, И. А. Свинухова // Биохимия. – 1989. – Т. 54, Вып. 6. – С. 34-38.
10. Болдырев, А. А. Транспортные АТФазы / А. А. Болдырев, В. И. Мельгунов // Итоги науки и техники, серия «Биофизика» : Сб. науч. тр. – М. : 1985. – Т. 17. – С. 244.
11. Болдырев, А. А. Эндогенные ингибиторы Na,K-АТФазы и биохимические маркеры гипертонии / А. А. Болдырев, Е. А. Рогаева // Биол. Науки. – 1985. – № 12. – С. 56-59.

12. Веренинов, А. А. Транспорт ионов через клеточную мембрану. Анализ потоков. – Л. : Наука, 1978. – 262 с.
13. Вотчал, Б. Е., Сердечные гликозиды. / Б. Е. Вотчал, М. Е. Слуцкий – М. : Медицина, 1973. – 197 с.
14. Гестаген IV поколения дроспиренон : новое явление в современной гинекологии? Клиническая лекция. / В. Е. Радзинский, М. Л. Полина. – М. : Редакция журнала StatusPraesens, 2011, – 20 с.
15. Гестоз – принципы снижения материнской, перинатальной заболеваемости и смертности / В. Н. Серов, А. В. Пырегов, О. О Заварзина и др. // Журнал РОАГ. – 2008. – №3 (спецвып.). – С. 12-17.
16. Гипертензия во время беременности, родов и послеродового периода. Преэклампсия. Эклампсия : клинич. протокол / Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова, Институт здоровья семья, Проект «Мать и Дитя» ; рук. рабочей группы Г. Т. Сухих, Н. В. Вартапетова. – М. : – 2016. – 73 с.
17. Григорова, Ю. Н. Маринобуфагенин-индуцированный фиброз сосудистой стенки и возможности его коррекции : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.05, 14.03.03 / Григорова Юлия Николаевна. - Спб., 2017. - 22 с.
18. Гуреев, В. В. Эндотелиальная дисфункция – центральное звено в патогенезе гестоза / В. В. Гуреев // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 4(123), 17/1. – С. 5-12.
19. Зазерская, И. Е. Клинические протоколы ведения пациентов. По специальности акушерство и гинекология. Часть 2 / И. Е. Зазерская. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : Эко-Вектор, 2016. – 342 с.
20. Зайнулина, М. С. К вопросу о маркерах повреждения сосудистой стенки при позднем гестозе / М. С. Зайнулина, Н. Н. Петрищев, Э. К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. – 1998. – № 1. – С.19-23.

21. Закурина, А. Н. Плацентарная недостаточность – функциональные и морфологические критерии диагностики : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.01 / Закурина Анна Николаевна. – СПб., 2011. – 24 с.

22. Киселев, А. Г. Айламазян, Э. К. Адаптация внешнего дыхания и центральной гемодинамики после кесарева сечения у родильниц, перенесших при беременности поздний токсикоз / А. Г. Киселев, Э. К. Айламазян // 2-й нац. Конгресс по профилактической медицине. – СПб., 1995. – С. 6-7

23. Кузнецова, И. В., Побединский Н. М. Новый оральный контрацептив : один из многих или препарат с уникальными свойствами? / И. В. Кузнецова, Н. М. Побединский // Трудный пациент, 2004. – Т. 2. – С. 11-14.

24. Лопатин, Д. А. Роль эндогенного дигоксиноподобного фактора - маринобуфогенина в патогенезе гестоза : дис. ... канд. мед. наук. : 14.00.01, 14.00.16 / Лопатин Денис Александрович. – СПб., 2001. – 160 с.

25. Лопина, О. Д. Na/K-АТФаза : структура, механизм и регуляция активности // Биологические мембраны. 1999. – Т. 16, № 6. – С. 584-600.

26. Лопина, О. Д. Эндогенные убаиноподобные вещества в тканях животных / О. Д. Лопина, С. Ю. Талаева, Н. У. Стецюк, [и др.] // Укр. биохим. журнал.–1986.– Т. 58, № 6. – С. 74-84.

27. Магомедова, Г. А. Гемостаз и почечная гемодинамика у беременных с гестозом / Г. А. Магомедова // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII, № 4. – С. 73-75.

28. Макаров, О. В. Преэклампсия и хроническая артериальная гипертензия у беременных / О. В. Макаров, О. Н. Ткачева, Е. В. Волкова // : Руководство для врачей, 2010. – 131 с.

29. Милованов, А. П. Преэклампсия: руководство / А. П. Милованов. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 576 с.

30. МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ПИСЬМО от 23 октября 2017 года N 15-4/10/2-7340 [О направлении

методического письма "Аудит критических акушерских состояний в Российской Федерации в 2016 году"]

31. 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.

32. МКБ-10 – Краткий адаптированный вариант Международной статистической классификации болезней и проблем, связанных со здоровьем, 10-го пересмотра, принятой 43-ей Всемирной Ассамблеей Здравоохранения: [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://mkb-10.com/index.php?pid=14085>.

33. Модянов, Н. Н. Трансмембранная организация Na/K-АТФазы : анализ вторичной структуры гидрофильных и гидрофобных участков альфа- и бета-субъединиц методами спектроскопии / Н. Н. Модянов, Е. А. Аристархова, Н. М. Арзамазова // Биологические мембраны. – 1994. – Т. 4. – С. 1244-1253.

34. Пальцев, М. А. Межклеточные взаимодействия. / М. А. Пальцев, А. А. Иванов, С. Е. Северин // М. : Медицина, 2003. – 288 с.

35. Панюшкина, Е. А. Эндогенный кальций-зависимый ингибитор Na/K-АТФазы эритроцитов изменяет чувствительность фермента к убаину // Биологические мембраны. – 1994. – Т. 1., Вып. 7. – С. 112-113.

36. Петруняка, В. В. Активация и ингибирование Na/K-АТФазы мембран эритроцитов эндогенным кальций-зависимыми регуляторами, кальций-зависимое действие убаина на Na/K-АТФазу / В. В. Петруняка, В. В. Панюшкина, Е. П. Северина // Биологические мембраны. – 1990. – № 4. – С. 352.

37. Преждевременные роды [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. – 2018. Режим доступа: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/preterm-birth>

38. Радзинский, В. Е. Ранние сроки беременности / В. Е. Радзинский, А. А. Оразмурадов. – 2-е изд. – М. : StatusPresens, 2009. – 480 с.

39. РМОАГ. Диагностика и лечение артериальной гипертонии. Рекомендации Российского медицинского общества по артериальной гипертонии и Всероссийского научного общества кардиологов, 2008. – 32 с.

40. Рябоконт, Н. Р. Особенности жесткости сосудов при преэклампсии и после родов / Н. Р. Рябоконт, И. Е. Зазерская, О. О. Большакова // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т. 65, № 5. – С. 49-55.

41. Серов, В. Н. Результаты исследования распространенности дефицита магния у беременных / В. Н. Серов, Д. В. Блинов, У. В. Зимовина, Э. М. Джобава // Акушерство и гинекология. – 2014. – № 6. – С. 33-40.

42. Сидорова, И. С. Комплексная профилактика преэклампсии у беременных группы высокого риска с применением органических солей магния в сочетании с пиридоксином / И. С. Сидорова, А. Л. Унанян // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2013. – Т. 13, № 4. – С. 74-78.

43. Сидорова, И. С. Патоморфологические особенности изменений в почках при тяжелой преэклампсии / И. С. Сидорова, А. П. Милованов, Н. А. Никитина, А. А. Рзаева // Журнал : Российский вестник акушера-гинеколога. – 2014. – №14(1) – С. 4-9

44. Сидорова, И. С. Поздний токсикоз / И. С. Сидорова. – М. : Арктоус, 1996. – 223 с.

45. Сидорова, И. С. Преэклампсия / И. С. Сидорова. – Москва : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство, 2016. – 528с.

46. Страйер, Л. Биохимия : в 3-х томах / Ред. С. Е.Северин. – М. : Мир, 1985.

47. Стрижаков, А. Н. Угнетение функции печени у беременных с преэклампсией / А. Н. Стрижаков, И. В. Игнатко, И. А. Федюнина // Материалы X Юбилейного Международного конгресса по репродуктивной медицине. – М., 2016. – С. 181-182

48. Стрюк, Р. И. Диагностика и лечение сердечно-сосудистых заболеваний при беременности 2018. Национальные рекомендации / Р. И. Стрюк, Ю. А. Бунин, В.



М. Гурьева [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2018. – № 3 (155). – С. 91-134

49. Сухих, Г. Т. Преэклампсия / Г. Т. Сухих, Л. Е. Мурашко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 576 с.

50. Сундюкова, Е. Г. Клинико-морфологическая характеристика фетоплацентарного комплекса при преэклампсии [Электронный ресурс] / Е. Г. Сундюкова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 3. – Режим доступа:<http://science-education.ru/ru/article/view?id=24604>

51. Федюнина, И. А. Состояние печеночного и маточно-плодово-плацентарного кровотока у беременных с нарушением функции печени / И. А. Федюнина, А. Н. Стрижаков, А. Г. Асланов, И. В. Игнатко // Материалы XI Международного конгресса по репродуктивной медицине. – М., 2017. – С. 343-345

52. Фролова, О. В. Механизмы внутриклеточной регуляции активности К-АТФазы эритроцитов млекопитающих / О. В. Фролова, А. Д. Шалабодов // Сб. науч. трудов Томского гос. Ун-та. – 1996. – С. 112-118.

53. Ходжаева, З. С. Ранняя и поздняя преэклампсия: парадигмы патофизиологии и клиническая практика / З. С. Ходжаева, А. М. Холин, Е. М. Вихляева // Акушерство и гинекология. – 2013. – № 10. – С. 4-11.

54. Шехтман, М. М. «Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных». Издание четвертое. – М. : «Триада-Х», 2007. – 816 с.

55. Шифман, Е. М. Изменения функции сердца во время беременности / Е. М. Шифман, Н. В. Храменко, Г. П. Тихова // Анестезиология и реаниматология. – 2012. – № 6. – С. 4-9.

56. Эндотелиальная дисфункция в генезе перинатальной патологии / Г. Т. Сухих [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2008. – № 5. – С. 3-7.

57. Якорные ворсины – источники цитотрофобластической инвазии во II триместре физиологической беременности / А. П. Милованов, И. М. Расстригина, Т. В. Фокина // Архив патологии. – 2012. – Т. 74. № 2. – С. 26-28.

58. ACOG Practice Bulletin No. 125: Chronic hypertension in pregnancy. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol.* 2012 Feb; 119(2 Pt 1): 396-407. doi: 10.1097/AOG.0b013e318249ff06.

59. Adair, C .D. Repeated dosing of digoxin-fragmented antibody in preterm eclampsia / C .D. Adair, V. M. Buckalew, J. Kipikasa, C. Torres, S. P. Stallings, C. M. Briery // *J. Perinatol.* – 2009. – Vol. 29, № 2. – P. 163-165.

60. Adair, C. D. Digoxin immune fab treatment for severe preeclampsia / C. D. Adair, V. M. Buckalew, S. W. Graves, G. K. Lam, D. D. Johnson, G. Saade, D. F. Lewis, C. Robinson, T. M. Danoff, N. Chauhan, M. Hopoate-Sitake, K. B. Porter, R. G. Humphrey, K. F. Trofatter, E. Amon, S. Ward, L. Kennedy, L. Mason, J. A. Johnston // *Am. J. Perinatol.* – 2010. – Vol. 27, № 8. – P. 655-662.

61. 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 [et al.] // *Am. J. Nephrol.* – 1996. – Vol. 16, №6. – P. 529-531.

62. Adair, C. D. Erythrocyte sodium / potassium ATPase activity in severe preeclampsia / C. D. Adair, G. T. Hauptert, H. P. Jr Koh, Y. Wang, J. C. Veille, V. Buckalew // *J. Perinatol.* – 2009. – Vol. 29, № 4. – P. 280-283.

63. 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. M. Buckalew // *J. Perinatol.* – 2009. – Vol. 29, № 4. – P. 284-289.

64. Africander, D. Molecular mechanisms of steroid receptor-mediated actions by synthetic progestins used in HRT and contraception / D. Africander, N. Verhoog, J. P. Hapgood // *Steroids.* – 2011. – Vol. 76, №7. – P. 636–652.

65. Akimova, O. A. Cardiotoxic steroids differentially affect intracellular Na<sup>+</sup> and [Na<sup>+</sup>]/[K<sup>+</sup>]-independent signaling in C7-MDCK cells / O. A. Akimova, A. Y. Bagrov, O. D. Lopina, A. V. Kamernitsky, J. Tremblay, P. Hamet, S. N. Orlov // *J. Biol Chem.* – 2005. – № 280. – P. 832-839.

66. Akimova, O. A. The death of ouabain-treated renal epithelial cells: evidence against anoikis occurrence / O. A. Akimova, M. Poirier, S. V. Kotelevtsev, P. Hamet, S. N. Orlov // *Apoptosis*. – 2008. – № 13 – P. 670-680.

67. Archer, D. F. Long-term safety of drospirenone-estradiol for hormone therapy: a randomized, double-blind, multicenter trial / D. F. Archer, I. H. Thorneycroft, M. Foegh, V. Hanes, M. D. Glant, P. Bitterman, R. L. Kempson // *Menopause*. – 2005. – № 12. – P. 716-727.

68. Arias-Loza, P. A. Medroxyprogesterone acetate but not drospirenone ablates the protective function of 17 beta-estradiol in aldosterone salt-treated rats. / P. A. Arias-Loza, K. Hu, A. Schäfer, J. Bauersachs, T. Quaschnig, J. Galle, V. Jazbutyte, L. Neyses, G. Ertl, K. H. Fritzemeier, C. Hegele-Hartung, T. Pelzer // *Hypertension*. – 2006. – Vol. 48, №5. – P. 994-1001.

69. Armler, E. Human hypertensive placenta contains an increased amount of Na, K-ATPase with higher affinity for cardiac glycosides / E. Armler, N. Cester, E. Salvolini, et al. // *Cell Biol Int*. – 1994. – Vol. 18, №7. – P. 723-727.

70. Averina, I. V. Endogenous Na/K-ATPase inhibitors in patients with preeclampsia / I. V. Averina, N. I. Tapilskaya, V. A. Reznik, E. V. Frolova, O. V. Fedorova, E. G. Lakatta, A. Y. Bagrov // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. – 2006. – № 52. – P. 19-23.

71. Ayala, D. E. Circadian time structure of cardiovascular characteristics in human pregnancy / D. E. Ayala, R. C. Hermida // *Chronobiol. Int*. – 1993. – № 4. – P. 128-136.

72. Bagrov, A. Y. Characterization of a urinary bufodienolide Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction / A. Y. Bagrov, O. V. Fedorova, R. I. Dmitrieva, W. N. Howald, A. P. Hunter, E. A. Kuznetsova, V. M. Shpen // *Hypertension*. – 1998. – Vol. 31, № 5. – P. 1097–1103.

73. Bagrov, A. Y. Digitalislike and vasoconstrictor properties of endogenous digoxin-like factor from *Bufo marinus* toad / A. Y. Bagrov, O. V. Fedorova, N. I. Roukoyatkina, M. V. Ukhanova, E. P. Zhabko // *Eur J. Pharmacol*. – 1993. – № 234. – P. 165-172.

74. Bagrov, A. Y. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets / A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro, O.V. Fedorova // *Pharmacol. Rev.* –2009. – Vol. 61, № 1. – P. 9-38.

75. Bagrov, A. Y. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications / A. Y. Bagrov, J. I. Shapiro // *Nat Clin Pract Nephrol.* – 2008. – Vol. 4, №7. –378-392.

76. 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, [et al.] // *Am. J. Hypertens.* –1996. – № 9. – P. 982–990.

77. Barron, W. M. Renal sodium and water handling in pregnancy / W. M. Barron, M. D. Lindheimer // *Obstet Gynecol Annu.* – 1984. – Vol. 13. – P. 35-69

78. Bauer, T. W. Morphologic evidence for coronary artery spasm in eclampsia / T. W. Bauer, G. W. Moore, G. M. Hutchins // *Circulation.* – 1982. – Vol. 65, № 2. – P. 255-259.

79. Beguin, P. The gamma subunit is a specific component of the Na/K ATPase and modulates its transport function / P. Beguin, X. Wang, D. Firsov, [et al.] // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 1. – P. 4250–4260.

80. Blanco, G. Isozymes of the Na/K ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function / G. Blanco, R. W. Mercer // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 275, № 44. – P. 633–650.

81. Blanco, G. Kinetic properties of the 21 and 22 isozymes of the Na/K-ATPase / G. Blanco, J. C. Koster, G. Sanchez, R. W. Mercer // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34. – P. 319–325.

82. Blaustein, M. P. How does salt retention raise blood pressure? / M. P. Blaustein, J. Zhang, L. Chen, B. P. Hamilton // *Am. J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2006. – Vol. 290, № 3. – P. 514-523.

83. Blaustein, M. P. Physiological effects of endogenous ouabain – control of intracellular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol. 264. – P. 1367-1387.

84. Brown, J. W. Pretranslational regulation of the Na,K-ATPase in cultured canine kidney cells by low  $K^+$  / J. W. Brown, A. McDonouh // *Am. J. Physiol.* – 1987. – № 252. – P. 179-189.

85. Brown, O. M. Inhibition of Na pump by cytoplasmic calcium in intact red cell / O. M. Brown, V. L. Lew // *Curr. Top. Membr. Transp.* – 1983. – Vol. 19. – P. 1017-1021.

86. Chaiworapongsa, T. Maternal plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia / T. Chaiworapongsa, R. Romero, Z. A. Savasan, J. P. Kusanovic, G. Ogge, E. Soto, Z. Dong, A. Tarca, B. Gaurav, S. Hassan // *J. Matern Fetal Neonatal Med.* – 2011 – Vol. 24, № 10. – P 1187-1207.

87. Clapp, J. F. Cardiovascular function before, during and after first and subsequent pregnancies / J. F. Clapp, E. Capeless // *Am. J. Cardiol.* – 1997. – Vol. 80. – P. 1469-1473.

88. Clark, S. L. Position change and central hemodynamic profile during normal third-trimester pregnancy and post partum / S. L. Clark, D. B. Cotton, J. M. Pivarnik, W. Lee et al. // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 1991. – Vol. 164, № 3. – P. 883-887.

89. Conformational changes of Na,K-ATPase necessary for transport / L. C. Cantly, C. N. Carilli, R. L. Smith, D. Perelman // *Curr. Top. Membr. Transp.* – 1983. – Vol. 19. – P. 315-322.

90. de Jong, CLD The renin-angiotensin-aldosterone system in pre-eclampsia. Hypertension and pregnancy / CLD de Jong, G. A. Dekker, B. M. Sibai // *Clinics in Perinatology.* – 1991. – № 18 – P. 683-711.

91. de Mendonça, M. Antihypertensive effect of canrenone in a model where endogenous ouabainlike factors are present / M. de Mendonça, M. L. Grichois, M. G.

Pernollet, I. Wauquier, B. Trouillet-Thormann, P. Meyer, M. A. Devynck, R. Garay, // *J. Cardiovasc Pharmacol.* – 1988. – Vol. 11, № 1 – P. 75-83.

92. Diagnosis, Evaluation, and Management of the Hypertensive Disorders of Pregnancy: SOGC Clinical Practice Guideline. – № 307, May 2014 (Replaces №. 206, March 2008).

93. Doris, P. A. Endogenous inhibitors of the Na,K pump // *Miner. Electrolyte. Metab.* – 1996. – Vol. 22, № 5-6. – P. 303-310.

94. Ducray, J. F. Pilot study of comparative placental morphometry in pre-eclamptic and normotensive pregnancies suggests possible maladaptations of the fetal component of the placenta. / J. F. Ducray, T. Naicker, J. Moodley // *Eur J. Obstet Gynecol Reprod Biol.* - 2011 – May ; 156(1) - P. 29-34.

95. Ehrig, J. C. Cardiotoxic steroids induce anti-angiogenic and anti-proliferative profiles in first trimester extravillous cytotrophoblast cells / J. C. Ehrig, D. Horvat, S. R. Allen, R. O. Jones, T. J. Kuehl, M. N. Uddin. // *Placenta* – 2014 - 35 - P. 932 - 936 [Электронный ресурс] Режим доступа [www.elsevier.com/locate/placenta](http://www.elsevier.com/locate/placenta)

96. 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. 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, № 5. – P. 1219-1226.

97. 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.

98. Elvan-Taspinar, A. Arterial stiffness and fetal growth in normotensive pregnancy / A. Elvan-Taspinar, A. Franx, M. L. Bots, [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2005. – Vol. 18(3). – P. 337- 41.

99. Endrikat, J. S. Bleeding pattern, tolerance and patient satisfaction with a drospirenone-containing oral contraceptive evaluated in 3488 women in Europe, the Middle East and Canada / J. S. Endrikat, N. P. Milchev, A. Kapamadzija [et al.] // *Contraception*. – 2009. – Vol. 79, №6. – P. 428–432.

100. Facca, T. A. Preeclampsia (marker of chronic kidney disease): from genesis to future risks / T. A. Facca, G. M. Kirsztain, N. Sass // *J. Bras. Nefrol.* – 2012. – Vol. 34, № 1. – P. 87-93.

101. 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.

102. Fedorova, O. V. Antibody to marinobufagenin lowers blood pressure in pregnant rats on a high NaCl intake / O. V. Fedorova, N. I. Kolodkin, N. I. Agalakova, A. R. Namikas, A. Bzhelyansky, J. St-Louis [et al.] // *J. Hypertens.* – 2005. – Vol. 23, № 4. – P. 835-842.

103. Fedorova, O. V. Endogenous cardenolide and bufadienolides Na/K-ATPase inhibitors. How they work together in NaCl-sensitive hypertension / O. V. Fedorova, A. Y. Bagrov // *Front. Biosci.* – 2005. – № 10. – P. 2250-2256.

104. Fedorova, O. V. Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two endogenous Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin. Evidence of interaction with different alpha-subunit isoforms / O. V. Fedorova, A. Y. Bagrov // *Am. J. Hypertens.* – 1997. – № 10. – P. 929-935.

105. Fedorova, O. V. Interaction of Digibind with endogenous cardiotoxic steroids from preeclamptic placentae / O. V. Fedorova, N. I. Tapilskaya, A. M. Bzhelyansky [et al.] // *J. Hypertens.* – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 361-366.

106. 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. Grigороva, 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, № 8. – P. 1602-1610.

107. Fedorova, O. V. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and 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. V. Frolova, E. R. Nikitina, G. V. Budny, D. L. Longo, E. G. Lakatta, A. Y. Bagrov // *J. Hypertens.* – 2008. – Vol. 26. – P. 24-25.

108. 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.

109. 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, № 3. – P. 784-790.

110. Forbush, B. Characterization of a new photoaffinity derivative of ouabain: labeling of the large polypeptide and of a proteolipid component of the Na/K ATPase / B. Forbush, J. H. Kaplan, J. F. Hoffman // *Biochemistry*. – 1978. – Vol. 17. – P. 3667-3676.

111. Goodlin, R. C. Antidigoxin antibodies in eclampsia / R. C. Goodlin // *N. Engl. J. Med.* – 1988. – Vol. 318, № 8. – P. 518-559.

112. Goodlin, R. C. Will treatment with digoxin antibody benefit pregnant patients with toxemia and elevated digoxin like factor? / R. C. Goodlin // *Med Hypotheses*. 1987. – Vol. 24, № 1. – P. 107-110.

113. 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.



114. Graves, S. W. The possible role of digitalis-like factors in pregnancy-induced hypertension / S. W. Graves // *Hypertension*. – 1987. – Vol. 10, № 5, Pt. 2. – P. 184-186.
115. Grigorova, Y. N. Aortic fibrosis, induced by high salt intake in the absence of hypertensive response, is reduced by a monoclonal antibody to marinobufagenin / Y. N. Grigorova, O. Juhasz, V. Zernetkina, K. W. Fishbein, E. G. Lakatta, O. V. Fedorova, A.Y. Bagrov // *Am. J. Hypertens.* – 2016. - Vol. 29 № 5. P. 641 -6
116. Haddy, F. J. Role of dietary salt in hypertension // *Life Sci.* – 2006. – Vol. 79. – P. 1585-1592.
117. 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 № 6. – P. 690-696.
118. Hamlyn, J. M. Identification and characterization of an ouabain-like compound from human plasma / J. M. Hamlyn, M. P. Blaustein, S. Bova, D. W. DuCharme, D. W. Harris, F. Mandel [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1991. – Vol. 88, № 14. – P. 6259-6263.
119. Hansen, O. No evidence for a role in signal transduction of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase interaction with putative endogenous ouabain. // *Eur. J. Biochem.* – 2003. – Vol. 270. – P. 1916-1919.
120. Hilton, P. J. White, R. W. Lord, G. A. et al. An inhibitor of the sodium pump obtained from human placenta / P. J. Hilton, R. W. White, G. A. Lord [et al.] // *Lancet*. – 1996. – № 348. – P. 303-305.
121. Huang, B. S. The central role of the brain in salt-sensitive hypertension / B. S. Huang, M. S. Amin, F. H. Leenen, // *Curr Opin Cardiol*. – 2006. – Vol. 21. – P. 295-304.
122. Hundal, H. S. Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na, K ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in

mammalian skeletal muscle / H. S. Hundal, A. Marette, Y. Mitsumoto [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 5040-5043.

123. Hussein, W. Renal function in normal and disordered pregnancy / W. Hussein, R. A. Lafayette // *Curr. Opin. Nephrol Hypertens.* – 2014. – Vol. 23, № 1. – P. 46-53.

124. Irani, R. A. Renin angiotensin signaling in normal pregnancy and preeclampsia / R. A. Irani, Y. Xia // *Semin Nephrol.* – 2011. – Vol. 31, №1. – P. 47-58.

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

126. Kaihura, C. Arterial Stiffness in Women Who Subsequently Develop Preeclampsia / C. Kaihura, M. D. Savvidou, J. M. Anderson, K. H. Nicolaides // *PLoS One.* - 2011. 6(5) – e18703. doi: 10.1371/journal.pone.0018703.

127. Karin, N. J. Regulation of Na,K-ATPase by its biosynthesis and turnover / N. J. Karin, J. S. Cook, // *Curr. Top. Membr. Transp.* – 1983. – Vol. 19. – P. 713-751.

128. Kelly, R. A. Is ouabain the endogenous digitalis? / R. A. Kelly, T. W. Smith // *Circulation.* – Vol. 1992. – 86. – P. 694-697.

129. 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.

130. 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.

131. Khalil A, Pulse wave analysis in normal pregnancy: A prospective longitudinal study. / A Khalil, E Jauniaux, D Cooper, K Harrington // *PLoS One.* - 2009 – 4(7) : e6134.

132. Kita, N. Expression and activation of MAP kinases, ERK1/2, in the human villous trophoblasts / N. Kita, J. Mitsushita, S. Ohira [et al.] // *Placenta*. – 2003. – Vol. 24, № 2-3. – P. 164-172.
133. Koleganova, N. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring / N. Koleganova, G. Piecha, E. Ritz [et al.] // *Am. J. Physiol Renal Physiol*. – 2011. – Vol. 301, № 2. – P. F344-F354.
134. Kolmakova, E. V. Endogenous cardiotonic steroids in chronic renal failure / E. V. Kolmakova, S. T. Haller, D. J Kennedy [et al.] // *Nephrol Dial Transplant*. – 2011. – Vol. 26 № 9. – P. 2912-2919.
135. 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.
136. 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 // *Clin. Biochem*. – 2005 – Vol. 38, № 1. – P. 36-45.
137. 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. Grigороva, A. V. Fadeev, K. A. Bagrov, O. V. Fedorova, A. Y. Bagrov // *Artery research*. – 2012. – Vol. 614. – P. 145.
138. 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.
139. Lam, G. K. Digoxin antibody fragment, antigen binding (Fab), treatment of preeclampsia in women with endogenous digitalis-like factor: a secondary analysis of

the DEEP Trial / G. K. Lam, M. Hopoate-Sitake, C. D. Adair [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 209. – 119.e1-6.

140. 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, № 9-10. – P. 984-988.

141. Leeman, L. Hypertensive disorders of pregnancy / L. Leeman, L.T. Dresang, P. Fontaine // *Am. Fam. Physician.* – 2016. – Vol. 93, № 2. – P. 121-127.

142. 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.

143. Lichtstein, D. Identification of digitalislike compounds in human cataractous lenses / D. Lichtstein, I. Gati, S. Samuelov, D. Berson, Y. Rozenman, L. Landau, J. Deutsch // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 216, № 1. – P. 261-268.

144. Lindheimer, M. D. Water homeostasis and vasopressin secretion during gestation / M. D. Lindheimer, W. M. Barron, J. M. Davison, J. Durr // *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* – 1986. – Vol. 15. – P. 1-24.

145. Lingrel, J. B. Molecular genetics of Na,K-ATPase / J. B. Lingrel, J. Orłowski, M. M. Shull, E. M. Price // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 1990. – Vol. 38. – P. 37-89.

146. Lingrel, J. B. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase / J. B. Lingrel, T. Kuntzweiler // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 19659-19662.

147. 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.

148. 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.

149. 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.
150. 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.
151. Liu, L. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.
152. Longo, S. A. Preeclampsia and eclampsia revisited / S. A. Longo, C. P. Dola, G. Pridjian // *South Med. J.* – 2003. – Vol. 96, № 9. – P. 891-899.
153. Lopatin, D. A. Circulating bufadienolide and cardenolide sodium pump inhibitors in preeclampsia / D. A. Lopatin, E. K. Ailamazian, R. I. Dmitrieva, O. V. Fedorova, A. Y. Bagrov // *J. Hypertens.* – 1999. – Vol. 17, № 8. – P. 1179-1187.
154. Lytton, J. The catalytic subunits of the (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)!ATPase and (+) isozymes are the products of different genes / J. Lytton // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1985. – Vol. 132. – P. 764–769.
155. Maternal mortality [Электронный ресурс] // World Health Organization. - 2018. Режим доступа: <http://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/maternal-mortality>.
156. Meendering, J. R. A combined oral contraceptive containing 30 mcg ethinyl estradiol and 3.0 mg drospirenone does not impair endothelium-dependent vasodilation / J. R. Meendering, B. N. Torgrimson, N. P. Miller [et al.] // *Contraception*. – 2010. – Vol. 82, №4. – P. 366–372.
157. Mendoza, S. A. Vasopressin rapidly stimulates Na entry and Na-K pump activity in quiescent cultures of mouse 3T3 cells / S. A. Mendoza, N. M. Wigglesworth, E. Rozengurt // *J. Cell. Physiol.* – 1980. – Vol. 105, № 1. – P. 153-162.

158. Menezes, J. C. Digoxin antibody decreases natriuresis and diuresis in cerebral hemorrhage / J. C. Menezes, E. J. Troster, V. Dichtchekian // *Intensive Care Med.* – 2003. – Vol. 29, № 12. – P. 2291-2296.
159. Mercer, R. W. Structure of the Na/K-ATPase / R. W. Mercer // *Int. Rev. Cytol.* – 1993. – Vol. 137. – P. 139-168.
160. Mitchell, G. F. Arterial stiffness and cardiovascular events, the Framingham Heart Study / G. F. Mitchell [et al.] // *Circulation.* – 2010. – Vol. 121, №4. – P. 505-509.
161. Mohammadi, K. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase to ERK1/2 / K. Mohammadi, P. Kometiani, Z. Xie, A. Askari // *Journal of Biological Chemistry.* – 2001. – Vol. 276. – P. 42050-42056.
162. Moussa, H. N. Management of hypertensive disorders in pregnancy. / H. N. Moussa, S. E. Arian, B. M. Sibai // *Womens Health (Lond).* – 2014 Jul. - 10(4) – P. 385-404. doi: 10.2217/whe.14.32.
163. Murphy, M. S. Pre-eclampsia and Cardiovascular Disease Risk Assessment in Women. / M. S. Murphy, G. N. Smith // *Am. J. Perinatol.* – 2016 Jul. – Vol. 33, № 8 – P. 723-31. doi: 10.1055/s-0036-1572536. Epub 2016 Mar 31.
164. 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, № 9. – P. 1301-1318.
165. National Institutes of Health Working Group on Hypertension in Pregnancy. Classification of Hypertensive Disorders of Pregnancy. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Services; 1991.
166. Nesher, M. The digitalis-like steroid hormones: new mechanisms of action and biological significance / M. Nesher, U. Shpolansky, H. Rosen, D. Lichtstein // *Life Sci.* – 2007. – Vol. 80. – P. 2093-2107.
167. Nikitina, E. R. In preeclampsia, endogenous cardiotonic 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. Tapilskaya, J. I. Shapiro, O. V. Fedorova, A. Y. Bagrov // *Journal of Hypertension*. – 2011. – Vol. 29, №4. – P. 769-776.

168. Nortwitz, E. R. Implantation and the survival of early pregnancy / E. R. Nortwitz, D. J. Schust, S. J. Fisher // *N Eng J. Med.* – 2001.– Vol. 345. – P. 1400–8.

169. Odutayo, A. Hladunewich, M. Obstetric nephrology: renal hemodynamic and metabolic physiology in normal pregnancy / A. Odutayo, M. Hladunewich // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2012. –Vol. 7, № 12. – P. 2073-2080.

170. Orabona, R. Ultrasound evaluation of left ventricular and aortic fibrosis after pre-eclampsia. / R. Orabona, E. Sciatti, E. Vizzardì, I. Bonadei, F. Prefumo, A. Valcamonico, M. Metra, T.Frusca // *Ultrasound Obstet Gynecol.* - 2017 Aug.7. doi: 10.1002/uog.18825.

171. Orlov, S. N. Intracellular monovalent ions as second messengers. / S. N. Orlov, P. J. Hamet // *Membr Biol.* – 2006. – Vol. 210. P. –161-172.

172. Orlov, S. N. The death of cardiotoxic steroid-treated cells: evidence of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-independent H<sup>+</sup>-sensitive signaling / S. N. Orlov, P. Hamet // *Acta. Physiol. (Oxf).* – 2006. – Vol. 187. – P. 231-240.

173. 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, № 6. – P. 947-970.

174. Periyasamy, S. M. Salt loading induces redistribution of the plasmalemmal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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.

175. Pierre, S. V. The Na/K-ATPase receptor complex: its organization and membership / S. V. Pierre, Z. Xie // *Cell. Biochem. Biophys.* – 2006. – Vol. 46, № 3 – P. 303-316.

176. Pijnenbort, R. Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy / R. Pijnenbort, G. Dixon, W. B. Robertson, I. Brosens // *Placenta*. – 1980. – Vol. 1. – P. 3-19.
177. Podjarny, E. Animal models of preeclampsia / E. Podjarny, C. Baylis, G. Losonczy // *Semin. Perinatol.* – 1999. – Vol. 23, № 1. – P. 2-13.
178. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis / L. Bellamy [et al.] // *Br. Med. J.* – 2007. – Vol. 10, № 335 (7627). – P. 974
179. Preston, R. A. Additive effect of Drospirenone/17 $\beta$ -Estradiol in hypertensive postmenopausal women receiving Enalapril / R.A. Preston, A. Alonso, P. Darlene [et al.] // *Am. J. Hypertens.* – 2005. – Vol.18. – P. 797–804.
180. 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.
181. Reisdorff, E. J. Acute digitalis poisoning: the role of intravenous magnesium sulfate. / E.J. Reisdorff, M.R. Clark, B.L. Walters // *J Emerg Med* – 1986 - 4 – P. 463–469.
182. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2000 Jul. – Vol. 183, № 1. – P. S1-S22.
183. Robb, A. O. Mills, N. L. Din, J. N. Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical. 2009.
184. Roberts, J. M. If we know so much about preeclampsia. Why haven't we cured the disease? / J.M. Roberts, M.J. Bell // *J. Reprod. Immunol.* – 2013. – Vol. 99, № 1-2. – P. 1-9.
185. Robinson, J. D. Kinetic analysis and reaction mechanism of the Na,K-ATPase // *Cur. Top. Membr. Transp.* – 1989. – Vol. 19. – P. 485-512.



186. Rogers, D. T. Effects of magnesium on central arterial compliance in preeclampsia. / D. T. Rogers, M. Colon, C. Gambala, I. Wilkins, J. U. Hibbard // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2010 May. – Vol. 202, № 5. – P. 448.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2010.03.049.

187. Schoner, W. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* –2007. – Vol. 293. – P. C509-C536.

188. Schwartz, A. Studies on the digitalis receptor / A. Schwartz, R. J. Adams // *Circ. Res.* –1980. – Vol.46, № 6, Suppl. 1. – P. i156 – i160.

189. Schwartz, A. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects / A. Schwartz, G. E. Lindenmayer, J. C. Allen // *Pharmacol. Rev.* – 1975. – Vol. 27, № 1. – P. 3-134.

190. Scou, J. C. The influence of some cations on an adenosine thriphosphatase from peripheral nerves / J. C. Scou // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1957. – Vol. 23, №3. – P. 394-401.

191. Scou, J. C. The Na,K-ATPase / J. C. Scou, M. Esmann, // *J. Bioenerg. Biomembr.* –1992. – Vol. 24, № 3. – P. 249-261.

192. Shoemaker, D. G. [3H]Ouabain binding and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in resealed human red cell ghosts / D. G. Shoemaker, P. K. Lauf // *J. Gen. Physiol.* – 1983. – Vol.81, № 3. –P. 401-420.

193. 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.

194. Spasojevic, M. Gallery Peripheral arterial pulse wave analysis in women with pre-eclampsia and gestational hypertension. / M.Spasojevic, S. A. Smith, J. M. Morris, D. M. Eileen // *BJOG.* - 2005. - 112(11) – P. 1475-8. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00701.

195. 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. – P. 317-326.
196. 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<sup>+</sup>(ATP) channels / J. Tian, J. Liu, K.D. Garlid, J.I. Shapiro, Z. Xie // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2003. – Vol. 242. – P. 181-187.
197. Tian, J. Spironolactone attenuates experimental uremic cardiomyopathy by antagonizing marinobufagenin / J. Tian, A. Shidyak, S. M. Periyasamy [et al.] // *Hypertension*. – 2009. – № 54. – P. 1313-1320.
198. Uddin, M. N. Marinobufagenin Inhibits Proliferation and Migration of Cytotrophoblast and CHO Cells / M. N. Uddin, D. Horvat, S. S. Glaser, S. Danchuk, B. M. Mitchell, D. E. Sullivan, C. A. Morris, J. B. Puschett // *Placenta*. – 2008. – Vol. 29. – P. 266-273.
199. Uddin, M.N. Examination of the cellular mechanisms by which marinobufagenin inhibits cytotrophoblast function / M.N. Uddin, D. Horvat, S. S. Glaser, B. M. Mitchell, J. B. Puschett // *J. Biol. Chem.* – 2008 – Vol. 283. – P. 17946-17953.
200. Uddin, M.N. Vascular leak in a rat model of pre-eclampsia / M.N. Uddin, L. B. McLean, F. A. Hunter [et al.] // *Am. J. Nephrol.* – 2009. – Vol. 30. – P. 26-33.
201. Uzun, M. Embryonic testis cord formation and mesonephric cell migration requires the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway / M. Uzun, S. D. Westfall, K. A. Dirks, M. K. Skinner, // *Biol. Reprod.* – 2002. – Vol. 67, № 6. – P. 1927-1935.
202. Vu, I.V. Involment of marinobufagenin in a rat model of human preeclampsia / I. V. Vu, M. R. Ianosi-Irimie, C. A. Pridjian, J. M. Whitbred [et. al.] // *Am. J. Nephrol.* – 2005. – Vol. 25, № 5. – P. 520-528.

203. Walters, W. A. Changes in the maternal cardiovascular system during human pregnancy / W. A. Walters, Y. L. Lim // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1970. – Vol. 131, № 4. – P. 765-784.
204. 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.
205. Wasserstrom, J. A. Digitalis: new actions for an old drug / J. A. Wasserstrom, G. L. Aistrup // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2005. – Vol. 289. – P. H1781-H1793.
206. Weber, M. A. Angiotensin II receptor blockers // *Hypertension* [Ed. by S. Oparil, M.A. Weber] // Philadelphia: WB Saunders. – 2000. – P. 377-378.
207. Weil, E. Mechanism of insulin-induced activation of Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase in isolated rat soleus muscle / E. Weil, S. Sasson, Y. Gutman // *Am. J. Physiol.* – 1991. – Vol. 261, № 2, Pt1. – P. c224-c230.
208. White, W.B. Antihypertensive effects of drospirenone with 17beta-estradiol, a novel hormone treatment in postmenopausal women with stage 1 hypertension / W.B. White, B. Pitt, R. A. Preston, V. Hanes // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112. – P. 1979-1984.
209. Wolf, M. F. Correlation between changes in liver stiffness and preeclampsia as shown by transient elastography / M. Frank Wolf, D. Peleg, N. Kariv Silberstein, N. Assy, A. Djibre, I. Ben-Shachar // *Hypertension in Pregnancy.* – 2016. – Vol. 35, № 4. – P. 536-541.
210. Zahler, R. The cardiac conduction system in the rat expresses the alpha 2 and alpha 3 isoforms of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase / R. Zahler, M. Brines, M. Kashgarian [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89. – P. 99-103.