

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

Fli1 и маринобуфагенин в патогенезе преэклампсии

Ершов Иван Александрович

1.5.5. Физиология человека и животных
(Медицинские науки)

Научный руководитель
к.м.н. Резник Виталий Анатольевич

Санкт-Петербург
2023

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Гипертензивные расстройства во время беременности возникают в 5-10 % наблюдений, являясь одной из ведущих причин материнской смертности и в 20-25% случаев - перинатальной смертности. Особое место при этом занимает преэклампсия (ПЭ), частота которой во время беременности составляет 2-8 %. С ПЭ или эклампсией связывают 10-15% всех случаев материнской смертности в мире, или по меньшей мере 70000 смертей в год [1,2]. Раннее начало ПЭ (с дебютом до 34 недель беременности) является основным фактором, приводящим к материнской и перинатальной смертности [3,4]. Частота АГ среди беременных в Российской Федерации на 1000 родов в 2018 году составила 46.9; умеренной ПЭ – 27.4; тяжелой ПЭ – 8.4 и эклампсии – 0.12, соответственно. По данным Минздрава России, гипертензивные осложнения беременности занимают 4-е место в списке причин материнской смертности в течение последнего десятилетия [5].

Преэклампсия представляет собой тяжелое осложнение беременности, характеризующееся стабильной гипертензией, протеинурией и начальными симптомами отека головного мозга. Патогенез ПЭ не вполне ясен, но существующая в настоящее время теория развития ПЭ во время беременности предполагает две стадии процесса: на 1-й стадии происходит поверхностная инвазия трофобласта, что приводит к неадекватному ремоделированию спиральных артерий [6,7]. Предполагается, что это является причиной 2-й стадии, которая включает реакцию на дисфункцию эндотелия у матери и дисбаланс между ангиогенными и антиангиогенными факторами, которые приводят к появлению клинических признаков заболевания [6,7]. При позднем начале заболевания (с дебютом после 34 недель беременности) плацентация обычно происходит нормально, однако потребности фетоплацентарной системы превышают возможности кровоснабжения. Несмотря на то, что плацента, безусловно, играет важную роль в развитии ПЭ, появляется все больше доказательств того, что данное осложнение после 34 недель беременности развивается при участии сердечно-сосудистой системы и гемодинамических особенностей матери, влияющих на функцию плаценты [8].

Однако, несмотря на многолетние исследования, этиология этого заболевания остаётся мало понятной. Поэтому в настоящее время ведутся интенсивные работы по изучению патогенеза ПЭ и возможных путей коррекции этого состояния. В предыдущих работах было показано, что большую роль в развитии преэклампсии играют эндогенные кардиотонические стероиды, в частности, буфадиенолид маринобуфагенин (МБГ) [9,10]. Так, например, содержание МБГ в плазме крови рожениц с преэклампсией в 2 раза

превышало показатели, определяемые у женщин с нормально протекающей беременностью. Поскольку в настоящее время высказывается предположение о единых генотипических и фенотипических признаках, лежащих в основе развития преэклампсии и сердечно-сосудистых заболеваний [11, 12], мы предположили, что увеличение выработки МБГ играет важную роль и в патогенезе преэклампсии.

Ранее было показано, что при различных гипертензивных заболеваниях, например, артериальной гипертензии, хронической почечной недостаточности, застойной сердечной недостаточности, в тканях сердечно-сосудистой системы продукция МБГ сопровождается значительным снижением активности транскрипционного фактора Fli1 и избыточным синтезом коллагена [13]. Поэтому мы предположили, что подавление активности фактора Fli1 может быть причиной развития фиброза сосудов при ПЭ.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Целью исследования было идентифицировать некоторые молекулярные механизмы, лежащие в основе развития фиброза при преэклампсии.

Задачи исследования:

- 1) Сравнить экспрессию транскрипционного фактора Fli-1 и содержание коллагена-1 в тканях плацент и умбиликальных артерий женщин с нормально протекающей беременностью и пациенток с преэклампсией.
- 2) Изучить изменения экспрессии Fli1 и коллагена-1 в плацентах и грудных аортах крыс с экспериментальной преэклампсией, индуцированной избыточным потреблением соли.
- 3) Охарактеризовать уровни экспрессии ангиогенных факторов эндоглина и sFlt-1, а также цитокина TGF- β , в тканях пациенток с преэклампсией и крыс с преэклампсия-подобным состоянием.
- 4) Оценить способность поликлональных антител к маринобуфагенину облегчать симптомы ПЭ и восстанавливать уровень экспрессии изучаемых факторов фиброза и ангиогенных факторов в модельных экспериментах на крысах.
- 5) Сравнить экспрессию транскрипционного фактора Fli-1 и содержание коллагена-1 в эксплантатах умбиликальных артерий здоровых рожениц после обработки маринобуфагенином в экспериментах *in vitro*.
- 6) Показать прямую взаимосвязь между МБГ и активностью факторов фиброза с помощью иммунонейтрализации МБГ в экспериментах *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту

1. Развитие преэклампсии у беременных женщин сопровождается повышением артериального давления, коррелирующим с увеличением концентрации кардиотонического стероида маринобуфагенина (МБГ) в плазме крови.
2. На беременных крысах линии Sprague-Dawley протестирована экспериментальная модель преэклампсия-подобного состояния, индуцированная избыточным потреблением соли. Показано, что эта модель позволяет воспроизводить важнейшие клинические симптомы преэклампсии, такие как повышение артериального давления и возникновение значимой протеинурии.
3. На фоне развития преэклампсии у женщин наблюдается сочетанное повышение уровней экспрессии факторов фиброза (транскрипционного фактора Fli1 и коллагена-1) и содержания антиангиогенных факторов (эндоглина-1 и sFlt-1) в плаценте и умбиликальных артериях, что свидетельствует о комплексном характере патогенеза наблюдающихся симптомов. Полученные при клинических наблюдениях результаты полностью подтверждаются данными, полученными в ходе экспериментального исследования при моделировании преэклампсия-подобного состояния у крыс.
4. При введении крысам антител, подавляющих эффекты маринобуфагенина, обеспечивается восстановление экспрессии фактора Fli1, что является патогенетически обоснованным лечением артериальной гипертензии на фоне преэклампсии.
5. Антитела к маринобуфагенину эффективно устраняют его эффекты в экспериментах *in vitro*, что подтверждает важную роль этого стероида в индукции процессов фиброза при преэклампсии.

Научная новизна исследования

Впервые было проведено комплексное исследование внутриклеточных процессов, лежащих в основе развития про-фибротических процессов в тканях сердечно-сосудистой системы и плацентах при преэклампсии. В проекте впервые получены данные, характеризующие молекулярные механизмы патогенеза ПЭ, связанные с изменениями активности транскрипционного фактора Fli1 и избыточным синтезом коллагена в тканях. Впервые показана прямая роль кардиотонического стероида маринобуфагенина в индукции сигнальных каскадов про-фибротических процессов и возможность фармакологического облегчения симптомов ПЭ путём введения антител к маринобуфагенину.

Теоретическое и практическое значение работы

Разработана экспериментальная модель преэклампсия-подобного состояния у лабораторных животных. Доказано, что избыточная продукция маринобуфагенина индуцирует про-фибротические процессы в кровеносных сосудах как у беременных женщин с преэклампсией, так и в модельных экспериментах на крысах, что приводит к развитию артериальной гипертензии. Продемонстрировано, что в основе фиброзирования артерий пуповины у беременных с преэклампсией, приводящего к недостаточности маточно-плацентарно-плодового кровотока, лежат снижение экспрессии транскрипционного фактора Fli1 и избыточный синтез коллагена-1. Проведён анализ эффективности иммунонейтрализации эффектов маринобуфагенина для подавления активности про-фибротических факторов с помощью поликлональных антител. Продемонстрировано, что введение антител к маринобуфагенину может быть эффективным способом нейтрализации патологического действия этого эндогенного дигиталис-подобного фактора и основой для лечения артериальной гипертензии на фоне преэклампсии. Полученные данные позволяют выделить ключевые элементы, критичные в плане возникновения фиброза при гипертензивных заболеваниях во время беременности, а также могут быть полезны для выработки рекомендаций по поиску терапевтических стратегий для облегчения тяжести симптомов преэклампсии.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования неоднократно доложены и обсуждены на различных конгрессах:

- XXIV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье» Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 года
- V национальный конгресс с международным участием “Здоровые дети – будущее страны”. Санкт-Петербург, 26-28 мая 2021 г.
- Актуальные проблемы биомедицины-2022. Санкт-Петербург, 24-26 марта 2022 г.
- XXV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

Объекты исследования

Обследуемые группы пациенток

Протокол для проведения экспериментов был одобрен этическим комитетом ФГБВОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). Для исследования были отобраны 15 пациенток с преэклампсией и 12 женщин с нормально протекающей беременностью, которые соответствовали пациенткам с ПЭ по возрасту и гестационному периоду. Все беременные женщины были включены в исследование после подписания информированного согласия. Основные характеристики участниц исследования представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Общая характеристика пациенток, включённых в исследование

Показатель	Здоровые роженицы (n=12)	Пациентки с ПЭ (n=15)
Возраст	26 ± 1	28 ± 2
Срок гестации (недели)	37 ± 1	36 ± 1

Примечание: представлены средние данные ± SEM.

Диагноз преэклампсии (ПЭ) был поставлен исходя из критериев Американского колледжа акушерства и гинекологии [14]. Основными критериями для постановки диагноза служат повышение систолического артериального давления (АД) до 140 мм рт. ст. или диастолического АД до 90 мм рт. ст., протеинурия (содержание белка в моче более 0.3 г/сутки или более 1 г/л по крайней мере в двух образцах мочи, собранных в течение 6 часов или более друг от друга после 20-й недели беременности). Критериями включения в исследование были срок гестации 37 - 41 неделя беременности, одноплодная беременность, наличие клинических симптомов преэклампсии (АГ, протеинурия, отеки) с оценкой по шкале тяжести >8. Критериями исключения были: прием препаратов, влияющих на функционирование фермента натрий-калиевой АТФазы, хроническая артериальная гипертензия, хронические заболевания сердечно-сосудистой системы, хронические заболевания почек и печени с нарушением функции, заболевания эндокринной системы, ожирение 2-3 ст. в I триместре беременности, терапия MgSO₄. Биологические образцы (плаценты и пуповины) забирали сразу же после родов. Перед родами у женщин из обеих групп измеряли АД, брали кровь и оценивали уровень выделения белка с мочой.

Информация об уходе, содержании и эвтаназии животных

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия). Все эксперименты проведены в соответствии с требованиями Animal Welfare act (2006). Исследование проведено на 48 беременных самках крыс линии Sprague Dawley SPF статуса весом от 225 до 250 г., которые были получены из питомника лабораторных животных «Пушино» (Пушино, Московская область, Россия). Животные содержались в стандартных условиях при температуре 22 °С и длительности светового периода 12 часов, получали воду и обычную диету *ad libitum*. Перед началом экспериментов крыс случайным образом разделяли на 4 группы по 12 особей в каждой. Первая группа (контрольная) получала обычную питьевую воду. Остальные животные для моделирования преэклампсия-подобного состояния с 11 по 19 день беременности были переведены на воду, содержащую дополнительно 1.8 % NaCl. На 18 день гестации крыс помещали в метаболические клетки для определения объёма выпитой воды и сбора мочи. На 19 день беременности 12 животным однократно внутривентриально вводили пре-иммунную кроличью сыворотку в дозировке 50 мкг/кг. Еще 12 животным также однократно внутривентриально вводили раствор поликлональных антител к МБГ в дозировке 50 мкг/кг. Через 4 часа крысам из всех групп измеряли систолическое АД с помощью установки для неинвазивного измерения фирмы ADInstruments (Австралия). Затем животных вводили в наркоз изофлураном (Форан, Abbott, Великобритания), после чего производилось вскрытие брюшной полости для обеспечения доступа к брюшной аорте, после рассечения брюшной аорты собирали кровь для определения уровня МБГ.

Ткани

Биологические образцы рожениц (плаценты и пуповины пациенток с ПЭ и женщин с неосложнённой беременностью) немедленно доставляли в лабораторию ИЭФБ РАН. Из плацент отделяли кусочки, содержащие как материнскую, так и плодную части. Из пуповин извлекали умбиликальные артерии. Ткани немедленно замораживали для дальнейших исследований.

Часть артерий, полученных из пуповин женщин с нормально протекающей беременностью, сразу же помещали в физиологический раствор и разрезали на несколько кусочков шириной 2-3 мм для экспериментов *in vitro*. Такие фрагменты сосудов обрабатывали МБГ в различных концентрациях в течение 48 ч в отсутствие или в присутствии поликлональных антител к МБГ (1 : 1000). Несколько фрагментов артерий,

инкубированных в одинаковых условиях, соединяли и гомогенизировали для дальнейшего иммуноблоттинга.

У беременных крыс извлекали грудные аорты и сердца, собирали плаценты и плоды, измеряли их массу и количество. Образцы тканей сразу же замораживали для дальнейших исследований.

Приготовление гомогенатов тканей

Кусочки замороженных тканей гомогенизировали при 4° С в буфере RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Полученные гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин при 1000 g для осаждения ядерного материала и обрывков клеток. Супернатант собирали и центрифугировали в течение 15 минут при 11000 g. Вторичный супернатант замораживали при -80 °С для дальнейшего использования. Содержание общего белка в образцах определяли по методу Лоури.

Иммуноблоттинг

Белки в гомогенатах тканей денатурировали в буфере Лэммли при 90 °С в течение 10 минут. Солюбилизованные белки разделяли по молекулярной массе методом электрофореза в ПААГ (полиакриламидный гель) с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в 10 или 12 % геле в присутствии белкового маркера. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Health Care/Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) с помощью камеры omniBLOT mini (Cleaver Scientific Ltd., UK). Неспецифическое связывание мембраны блокировали с помощью 5%-го раствора обезжиренного молока в буфере Tris, содержащем 0.1 % Tween-20. Затем мембраны инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С с первичными антителами к Flt1 (Abcam, rabbit 1:500 или Santa-Cruz Biotechnologies, mouse 1 : 200), про-коллагену-I (Santa Cruz Biotechnology, mouse 1:200), коллагену-I (Santa Cruz Biotechnology, mouse 1 : 200), коллагену-IV (Abcam, rabbit 1 : 500), sFlt (Cell Signaling, rabbit 1 : 500), Endoglin (Cell Signaling, rabbit 1 : 500), TGF-beta (Cell Signaling, rabbit 1 : 500). После отмывки первичных антител мембраны инкубировали со вторичными HRP-конъюгированными антителами к кролику (GE Health Care/Life Sciences, 1:1000) или к мыши (1:2000). После отмывки иммунопозитивные полосы белков визуализировали на плёнке X-ray film (CEA, Göteborg, Sweden) с помощью реагентов Amersham ECL detection system (RPN2236). Для нормализации уровней экспрессии изучаемых белков использовали контрольный белок GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), для чего мембраны обрабатывали

первичными антитела мыши (Santa Cruz Biotechnology, USA; 1:1000), а затем вторичными антитела козы против мыши (1:2000). Оптическую плотность полос определяли денситометрическим методом с помощью программы Image Lab (BioRad, Hercules, CA, USA) и нормировали относительно GAPDH.

Измерение содержания маринобуфагенина в плазме крови

Кровь центрифугировали немедленно после забора в течение 15 минут при 3000 g для получения плазмы. Концентрацию МБГ в плазме крови пациенток измеряли иммуноферментным методом с помощью коммерческого набора реактивов (Cloud Clone Inc., США) согласно инструкции производителя.

Статистический анализ

Статистическая обработка экспериментальных результатов проводилась с помощью прикладных пакетов программ GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Сан Диего, Калифорния, США). Данные анализировались с использованием однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) (межгрупповой анализ) или путем повторных измерений ANOVA (внутригрупповой анализ), когда это было применимо, и апостериорных тестов Bonferroni или Dunnett. Результаты представлены как среднее \pm SEM. Различия считались значимыми при p менее 0.05.

Результаты

Клинические показатели преэклампсии у человека

Как показали клинические обследования женщин, включённых в исследование, развитие преэклампсии (ПЭ) сопровождалось значительным повышением как систолического, так и диастолического артериального давления (АД) по сравнению с нормально протекающей беременностью (Рис. 1). Если в группе женщин с физиологической беременностью систолическое АД составило 112 ± 3 мм рт. ст., в основной выборке пациенток с ПЭ его величина достигла 153 ± 4 мм рт. ст. Величина диастолического АД у женщин с нормальной беременностью была 72 ± 2 мм рт. ст., а при преэклампсии оно повышалась до 99 ± 3 мм рт. ст.

У пациенток с преэклампсией наблюдалась выраженная протеинурия - многократное увеличение содержания общего белка в моче (Рис. 1). Если у здоровых женщин белок в моче не обнаруживался вообще или его значения не достигали клинически значимых величин, у пациенток с ПЭ средний уровень выделения белка с мочой в сутки составил 2.12 ± 0.46 г/л.

Кроме того, развитие ПЭ сопровождалось достоверным повышением уровня кардиотонического стероида маринобуфагенина (МБГ) в плазме крови (Рис. 1). У женщин с нормально протекающей беременностью этот показатель составил 0.46 ± 0.06 нмоль/л, в то время как у пациенток с преэклампсией он достигал 1.52 ± 0.37 нмоль/л. Корреляционный анализ, проведенный с использованием непараметрического коэффициента Спирмена, выявил прямую достоверную связь между увеличением содержания МБГ в плазме крови и повышением как систолического ($r_s = 0.84$, $p < 0.05$), так и диастолического артериального давления ($r_s = 0.84$, $p < 0.05$).

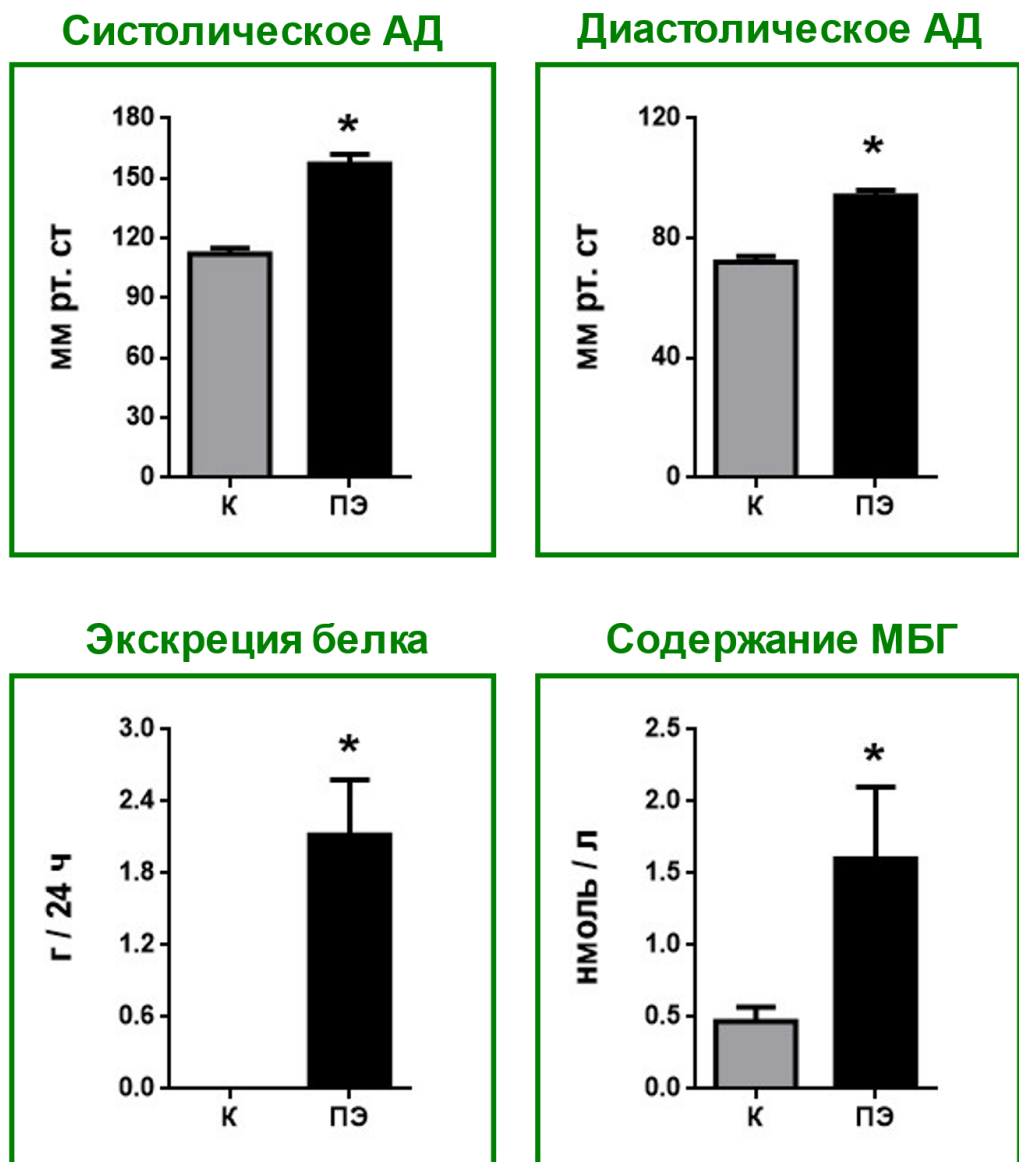


Рисунок 1. Развитие преэклампсии у беременных женщин сопровождается значительным повышением АД, протеинурией и увеличением содержания МБГ в плазме крови. Представлены средние значения \pm SEM ($n = 12-15$). One-way ANOVA (Bonferroni test): $*P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Экспрессия факторов фиброза в тканях пациенток с преэклампсией

Как показано на рисунке 2, в тканях плаценты пациенток с ПЭ наблюдалось статистически достоверное снижение экспрессии одного из ключевых факторов развития фиброза – транскрипционного фактора Fli1, который является негативным регулятором гена промотера коллагена-1.

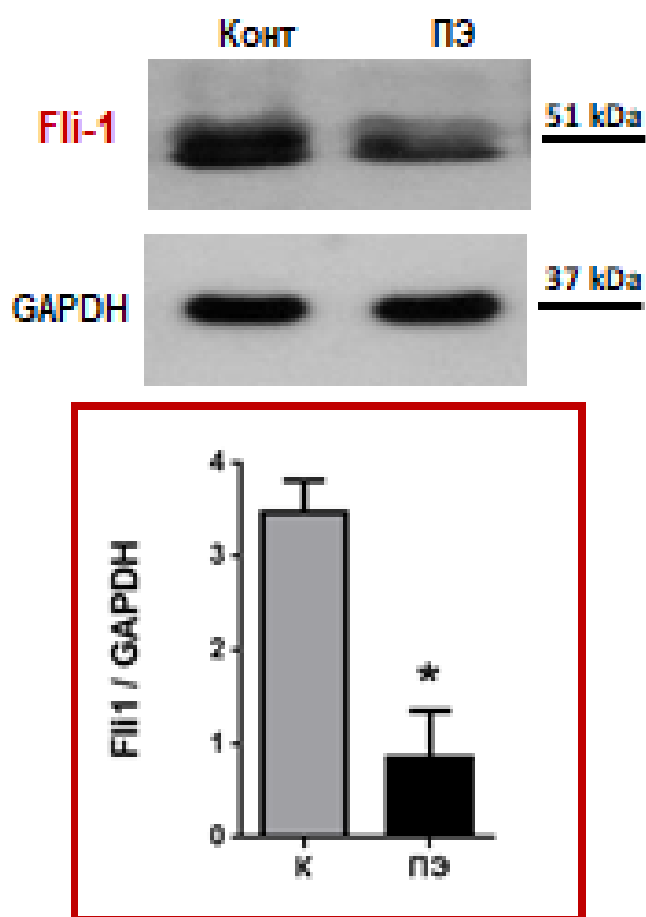


Рисунок 2. Экспрессия транскрипционного фактора Fli1 в плацентах пациенток с ПЭ. Представлен типичный пример иммуноблота и среднее значение \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA (Bonferroni test): $**p < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Содержание Fli1 в артериях пуповины, полученных от пациенток с ПЭ, также значительно уменьшалось (Рис. 3). Кроме того, развитие преэклампсии сопровождалось 2-кратным увеличением уровня коллагена-1 в umbilical артериях пациенток с ПЭ по сравнению с сосудами женщин с нормально протекающей беременностью (Рис. 3).

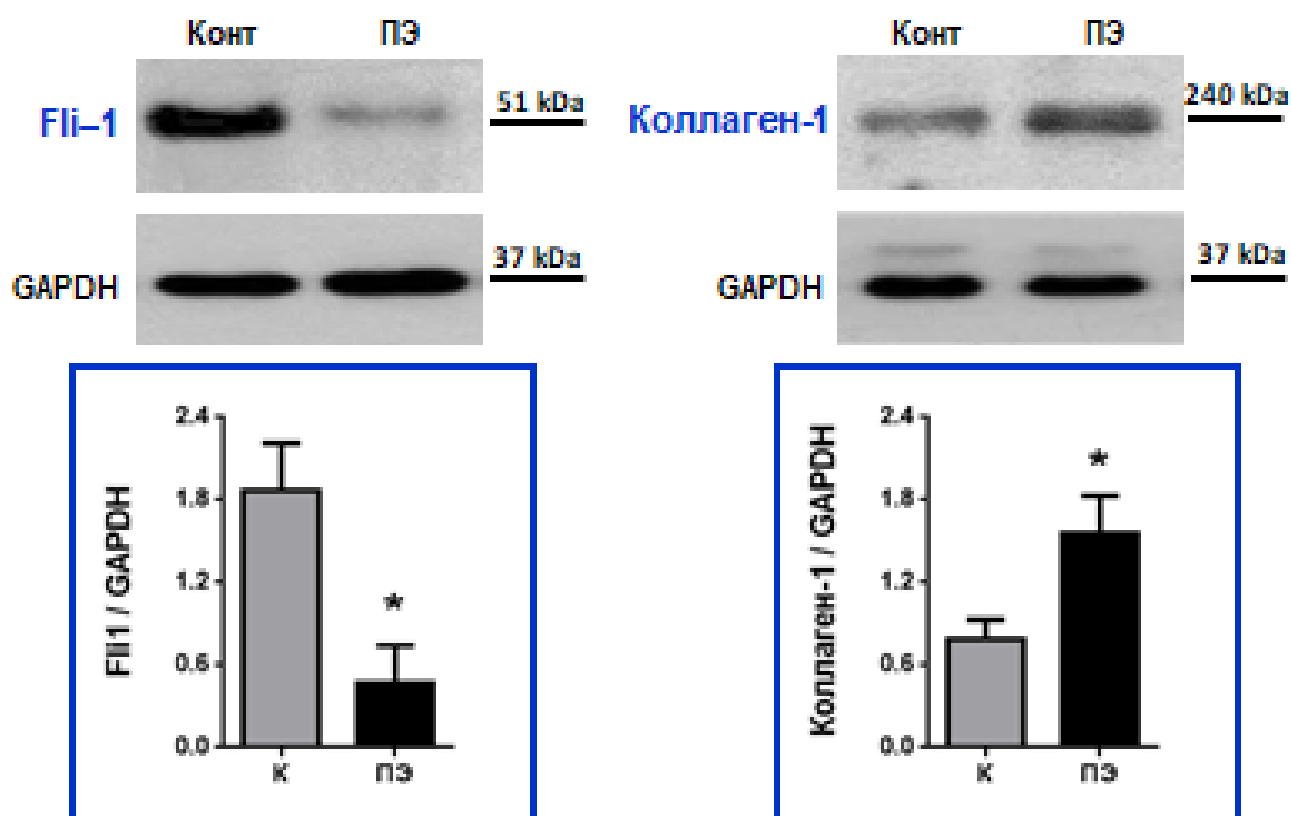


Рисунок 3. Экспрессия транскрипционного фактора Fli1 и коллагена-1 в умбиликальных артериях пациенток с ПЭ. Представлены типичные примеры иммуноблотов и средние значения \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA (Bonferroni test): * $p < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Уровни антиангиогенных факторов в тканях пациенток с преэклампсией

В тканях плацент пациенток с преэклампсией на фоне формирования этого патологического состояния было выявлено значительное повышение содержания одного из антиангиогенных факторов – эндоглина (Рис. 4).

В тканях умбиликальных артерий, выделенных из пуповин пациенток с ПЭ, экспрессия эндоглина не увеличивалась по сравнению с его уровнем в сосудах здоровых рожениц (Рис. 5). Однако развитие преэклампсии сопровождалось избыточным синтезом в артериях другого антиангиогенного фактора - sFlt-1 (Рис. 5). В то же время содержание в артериях другого про-фибротического фактора – цитокина TGF- β не изменялось (Рис. 5).

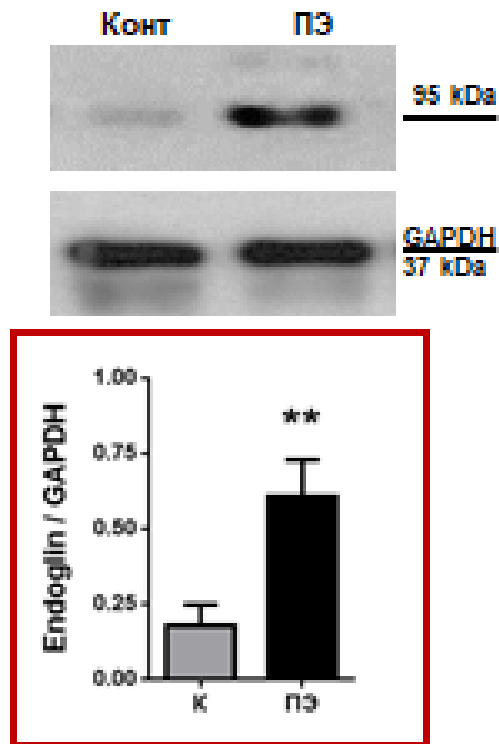


Рисунок 4. Экспрессия антиангиогенного фактора эндоглина в плацентах пациенток с ПЭ. Представлен типичный пример иммуноблота и среднее значение \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA (Bonferroni test): $**P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

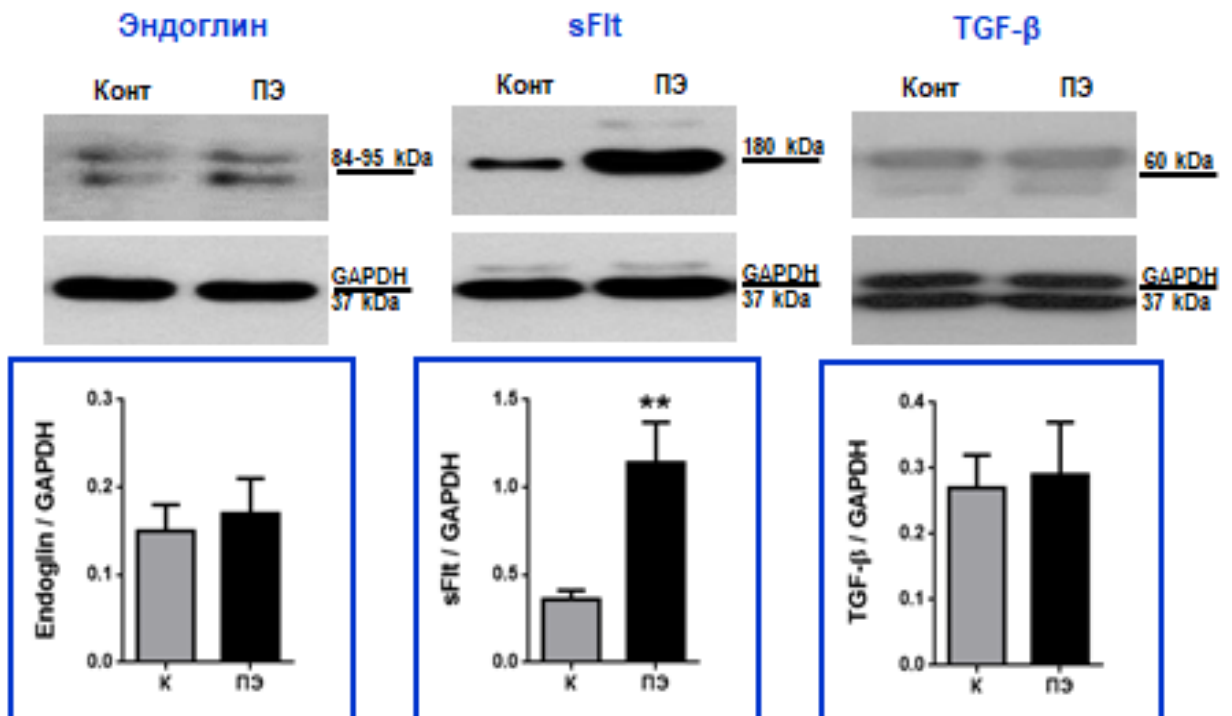


Рисунок 5. Экспрессия антиангиогенных факторов эндоглина и sFlt-1, а также фактора фиброза TGF-β, в умбиликальных артериях пациенток с ПЭ. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA (Bonferroni test): $**P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Такое повышение уровней антиангиогенных факторов может провоцировать развитие ишемической плацентарной недостаточности из-за нарушения процесса инвазии трофобласта в материнские сосуды и их неполноценного ремоделирования.

Экспериментальная ПЭ у крыс

Для подтверждения важной роли МБГ и Flil1 в развитии фиброза при преэклампсии нами была протестирована экспериментальная модель развития преэклампсия-подобного состояния у беременных крыс, индуцированного избыточным потреблением соли. Для этого беременных крыс на 11 день беременности переводили на воду с 1.8 % NaCl. Через 8 дней у животных измеряли давление, объём выпитой воды и объём мочи, определяли вес плацент, подсчитывали число плодов и их вес. В Таблице 2 представлены данные, полученные в этих экспериментах. Как видно, потребление избытка соли в воде привело к снижению веса тела крыс и массы плацент по сравнению с таковыми у контрольных беременных крыс, не получавших NaCl. Изменялось общее число плодов и их масса, часть плодов была недоразвитой.

Таблица 2. Параметры беременных крыс и плодов после потребления избыточного количества соли

	Контроль	1.8 % NaCl
Вес тела (г)	346 ± 7	240 ± 8**
Потребление воды (мл / 24 ч)	49 ± 3	83 ± 8**
Объём мочи (мл / 24 ч)	22 ± 2	65 ± 2**
Экскреция Na (мМ / 24 ч)	24 ± 9	104 ± 12**
Вес плацент (г)	6.2 ± 0.4	4.7 ± 0.5*
Число плодов	12.4 ± 0.3	8.5 ± 1.2*
Вес плодов (г)	33 ± 5	22 ± 3*

Примечание: Данные получены на 19 день гестации и представлены как средние значения ± SEM. One-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

После потребления избытка соли во время беременности у крыс статистически достоверно увеличивался уровень систолического артериального давления, что подтверждает развитие преэклампсия-подобного состояния (Рис. 6). Подобно тому, как это происходит при ПЭ у человека, у крыс на фоне солевой нагрузки почти в два раза увеличивалась экскреция общего белка в моче (Рис. 6). Кроме того, формирование

экспериментального преэклампсия-подобного состояния сопровождалось двукратным увеличением уровня МБГ в плазме крови животных (Рис. 6). Таким образом, у животных наблюдались классические проявления симптомов ПЭ, типичные для человека.



Рисунок 6. Экспериментальная ПЭ у беременных крыс сопровождалась значительным повышением АД, протеинурией и увеличением содержания МБГ в плазме крови. Представлены средние значения \pm SEM (n = 12-15). One-way ANOVA (Bonferroni test): ** $P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Экспрессия маркеров фиброза в тканях крыс с экспериментальной преэклампсией

Как и в плацентах пациенток с преэклампсией, у крыс, получавших избыток соли с водой, в тканях плаценты почти в 3 раза снижался уровень экспрессии транскрипционного фактора Fli1 (Рис. 7).

Уровень экспрессии Fli1 в грудных аортах крыс беременных крыс при развитии преэклампсия-подобного состояния также снижался (Рис. 8). Содержание коллагена-1 в этих сосудах у крыс, потреблявших избыточное количество соли, наоборот, почти в 2 раза увеличивалось (Рис. 8). Эти результаты свидетельствуют о развитии про-фибротических процессов в тканях сердечно-сосудистой системы беременных крыс. Таким образом, подавление активности Fli1 может запускать процессы, индуцирующие избыточный синтез коллагена и ремоделирование спиральных маточных артерий по пути фиброза.

В целом, наши эксперименты подтвердили, что солевая нагрузка беременных крыс является хорошей моделью для изучения процессов фиброза сосудов при ПЭ у человека, поскольку в основе развития этого патологического состояния лежат одни и те же молекулярные механизмы.

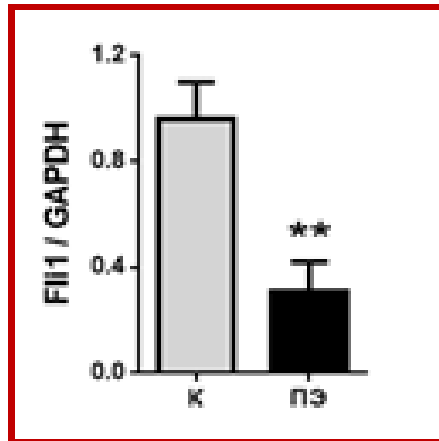
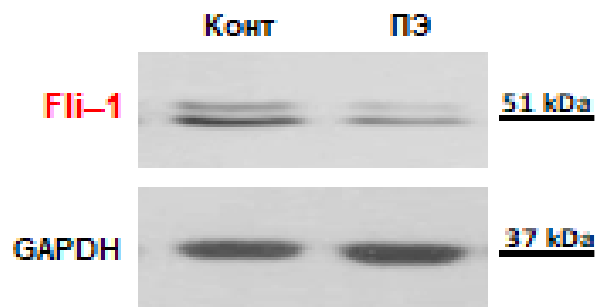


Рисунок 7. Экспрессия транскрипционного фактора Fli1 в плацентах беременных крыс с экспериментально индуцированной ПЭ. Представлен типичный иммуноблот и среднее значение \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA (Bonferroni test): $**P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

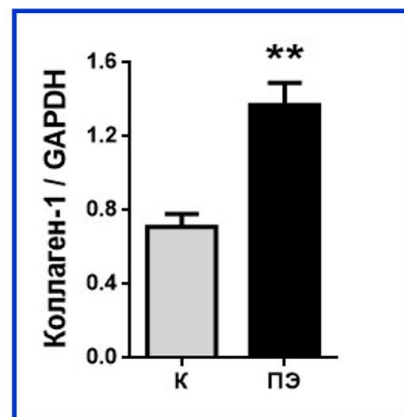
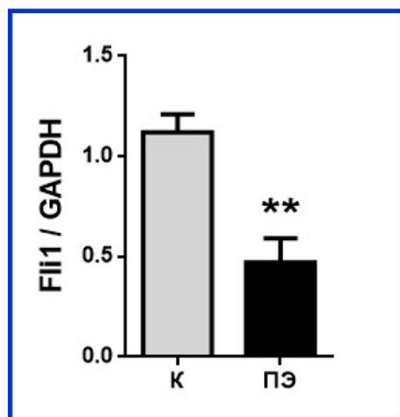
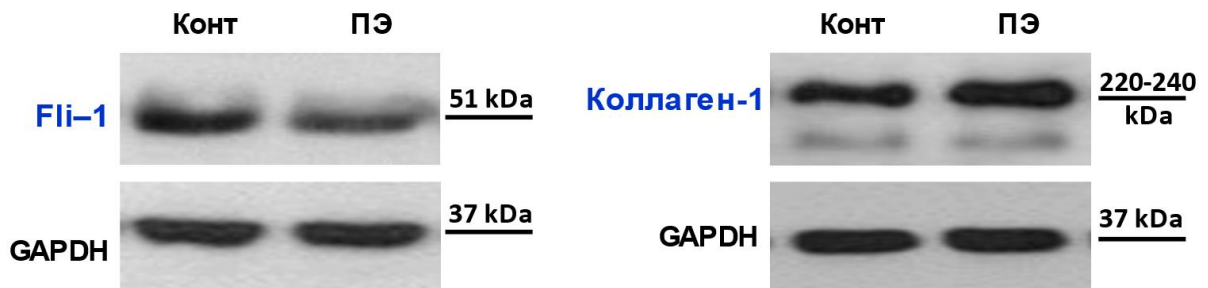


Рисунок 8. Экспрессия транскрипционного фактора Fli1 и коллагена-1 в грудных аортах беременных крыс с экспериментально индуцированной ПЭ. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA: $**P < 0.01$ по сравнению с контролем (К).

Иммунонейтрализация МБГ как способ снижения тяжести симптомов преэклампсии

Одной из важнейших задач работы было оценить способность антител к МБГ снижать тяжесть ПЭ и восстанавливать уровень экспрессии изучаемых про-фибротических факторов. Для этого беременным крысам, получавшим избыточное количество соли, на 19 день гестации на 4 часа внутривентриально вводили поликлональные антитела против МБГ.

Результаты этих экспериментов показали, что введение антител к МБГ привело к статистически значимому снижению систолического артериального давления у крыс на высоко-солевой диете (Рис. 9), но не оказывало влияния на остальные параметры – объём мочи, экскрецию натрия и уровень выделения белка с мочой (не показано).

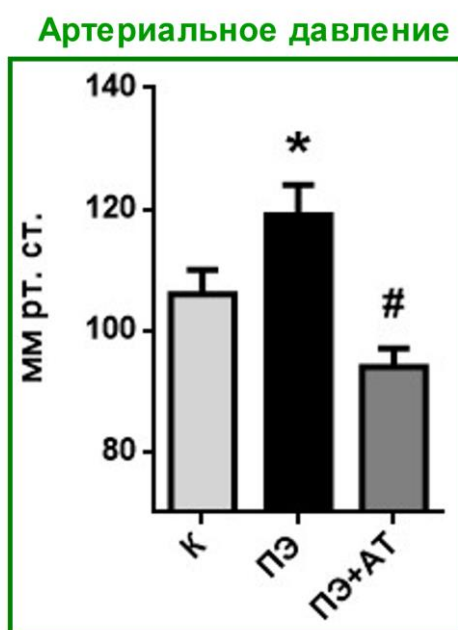


Рисунок 9. Введение антител к МБГ крысам с преэклампсия-подобным состоянием приводит к снижению АД. Представлены средние значения \pm SEM ($n = 6-7$). One-way ANOVA: * $P < 0.05$ по сравнению с контролем (К), # $P < 0.01$ по сравнению с преэклампсией (ПЭ). АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

Анализ экспрессии маркеров фиброза в тканях беременных крыс с экспериментальной преэклампсией, получавших антитела к МБГ, показал, что иммунонейтрализация МБГ приводит к практически полному восстановлению уровня транскрипционного фактора Fli1, но не способна снижать содержание коллагена-1 в грудных аортах (Рисунок 10). Таким образом, краткосрочного введения антител (на 4 часа) достаточно для того, чтобы оказать влияние на процессы, инициирующие развитие фиброза, но недостаточно для снижения синтеза коллагена. В отличие от коллагена-1, экспрессия коллагена другого типа – IV, в грудных аортах крыс на фоне высоко-солевой диеты не изменялась (Рис. 10)

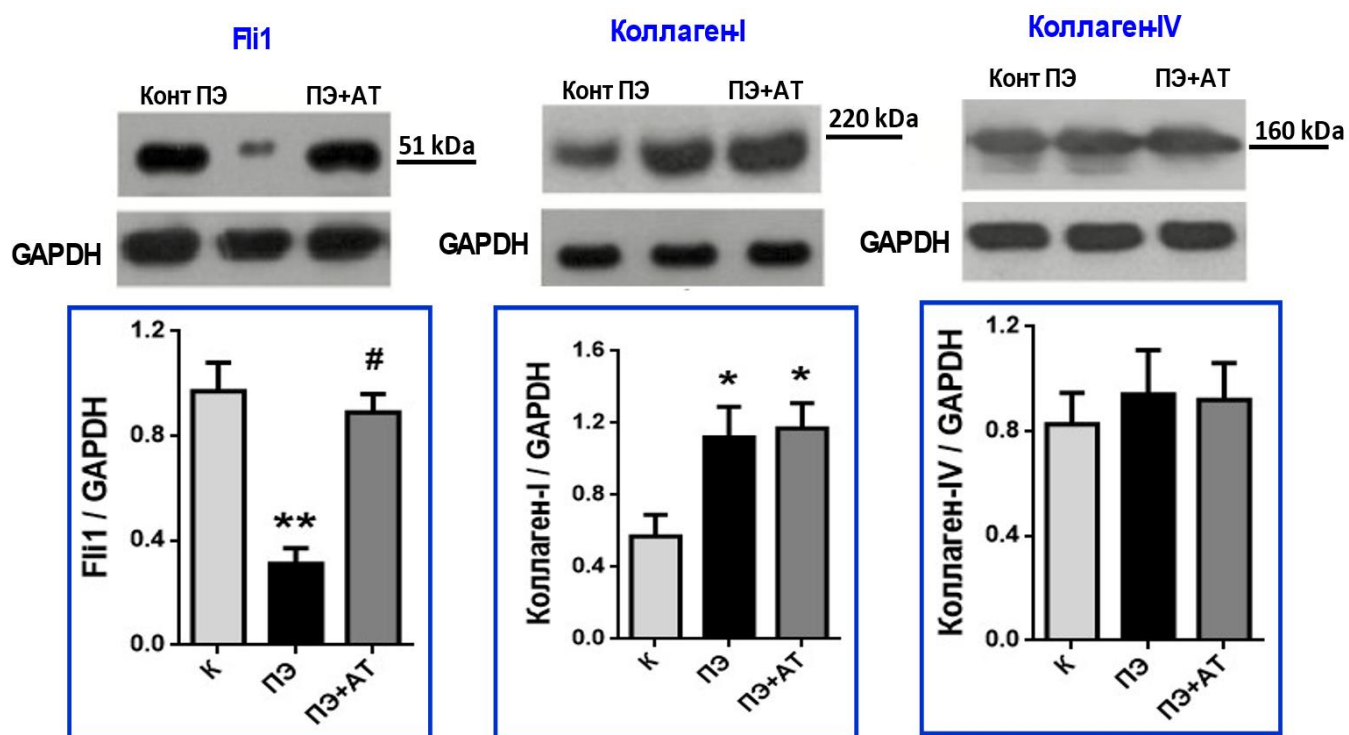


Рисунок 10. Влияние введения поликлональных антител к МБГ беременным крысам с экспериментальной ПЭ на уровни экспрессии факторов фиброза. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM ($n = 6-7$). One-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (К), # $P < 0.01$ по сравнению с преэклампсией (ПЭ). АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

В плаценте крыс при развитии преэклампсия-подобного состояния также наблюдалось значительное увеличение экспрессии обоих анти-ангиогенных факторов - и эндоглина, и sFlt-1 (Рис. 11). Однако в аортах животных увеличивается только содержание sFlt-1 (Рис. 12). При этом краткосрочное введение крысам антител к маринобуфагенину не оказывало влияния на уровень экспрессии этих факторов. Содержание цитокина TGF- β в аортах не изменялось ни у животных после развития ПЭ состояния, ни у животных, которые получили антитела к МБГ. Это доказывает, что про-фибротические сигнальные пути МБГ не связаны с избыточным синтезом анти-ангиогенных факторов и активацией TGF- β , в отличие от транскрипционного фактора Fli1.

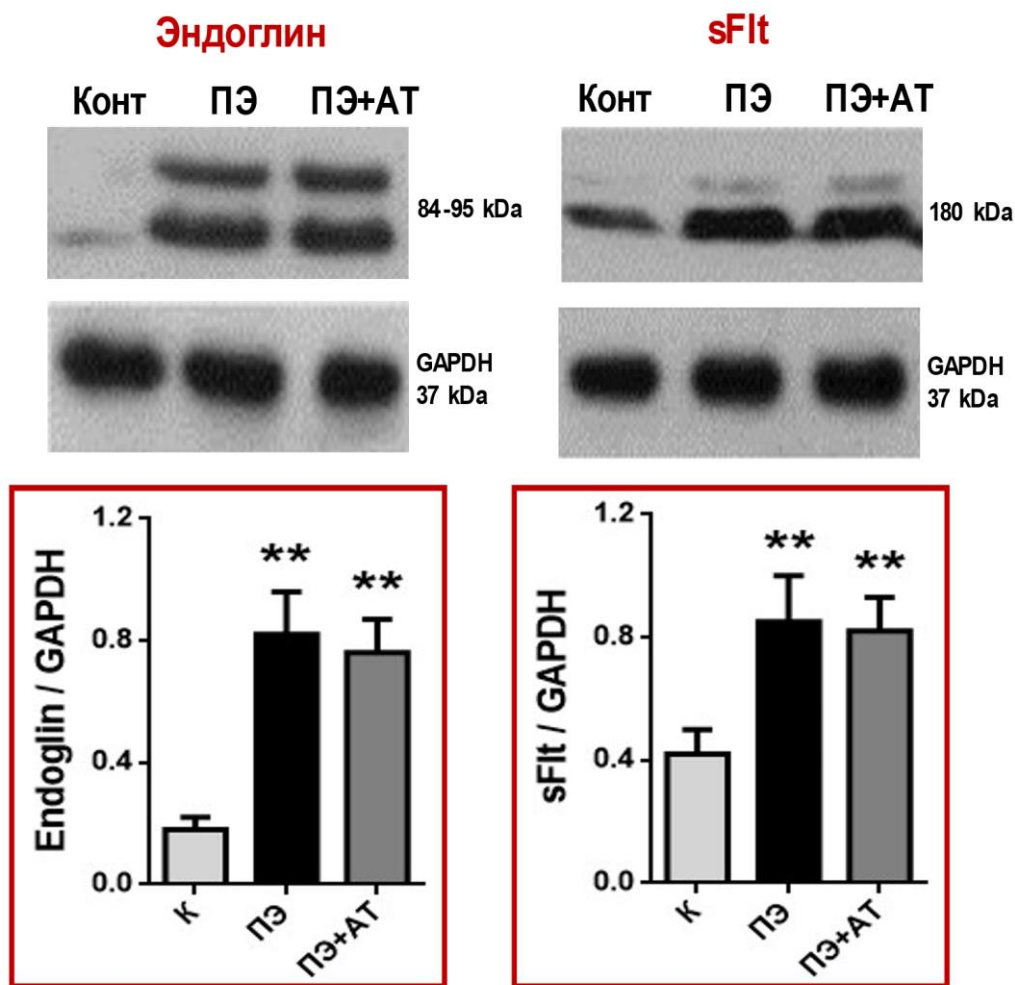


Рисунок 11. Влияние введения поликлональных антител к МБГ беременным крысам с экспериментальной ПЭ на уровни экспрессии антиангиогенных факторов в плацентах. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM ($n = 6-7$). One-way ANOVA: ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (К). АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

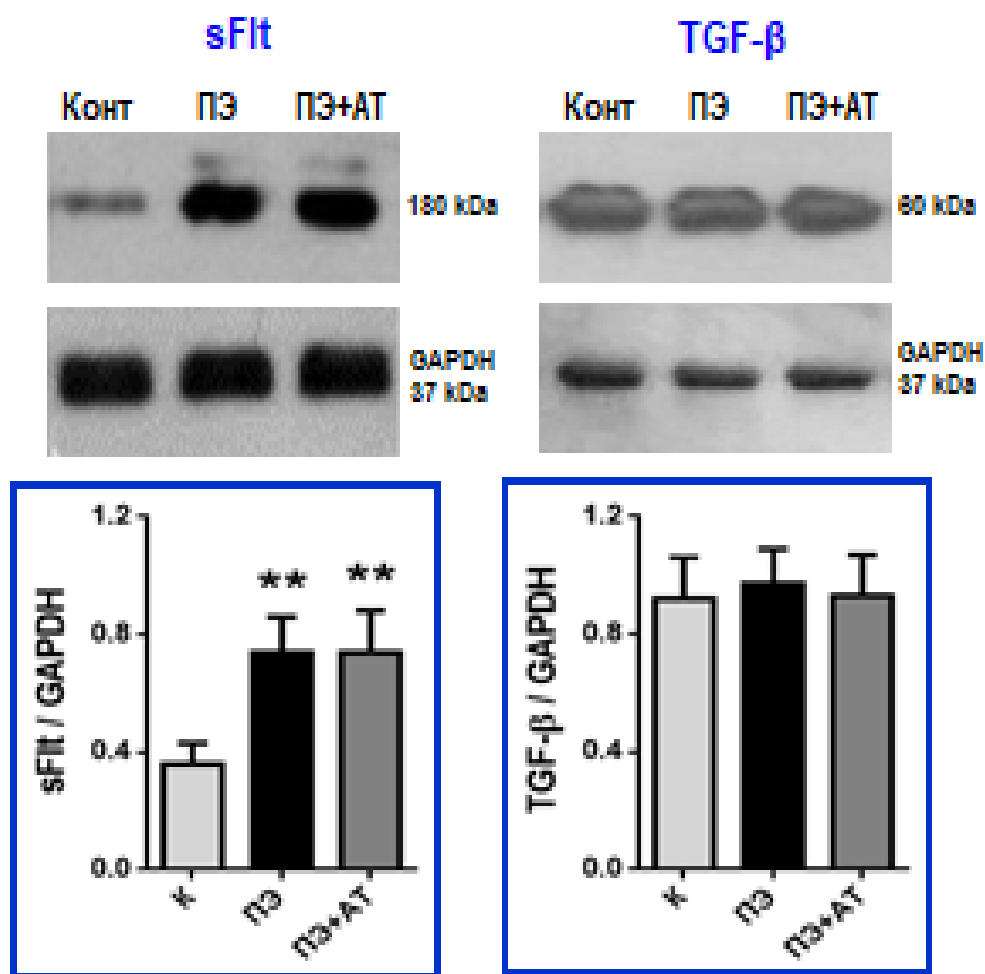


Рисунок 12. Влияние введения поликлональных антител к МБГ беременным крысам с экспериментальной ПЭ на уровни экспрессии антиангиогенного фактора sFlt-1 и фактора фиброза TGF-β в грудных аортах. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения ± SEM (n = 6-7). One-way ANOVA: **p < 0.01 по сравнению с контролем (К). АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

Влияние иммунонейтрализации маринобуфагенина на экспрессию маркеров фиброза в umbilical arteries человека в экспериментах *in vitro*

В отдельной серии экспериментов была сделана попытка доказать прямую взаимосвязь между избыточным синтезом МБГ и активностью маркеров фиброза при развитии преэклампсия-подобного состояния. Для этого фрагменты umbilical arteries, полученных из пуповин здоровых рожениц, инкубировали в течение 48 часов с увеличивающимися концентрациями маринобуфагенина в экспериментах *in vitro*. Такая обработка фрагментов сосудов привела к значительному дозо-зависимому снижению экспрессии транскрипционного фактора Flil в тканях (Рис. 13). Одновременно в тканях артерий увеличивалось содержание коллагена-1. Таким образом, как в сосудах пациенток с

преэклампсией, так и модельных экспериментах *in vitro* в umbilical arteries здоровых женщин избыток МБГ индуцирует одинаковые процессы, а именно увеличивает синтез коллагена, что приводит к развитию фиброза.

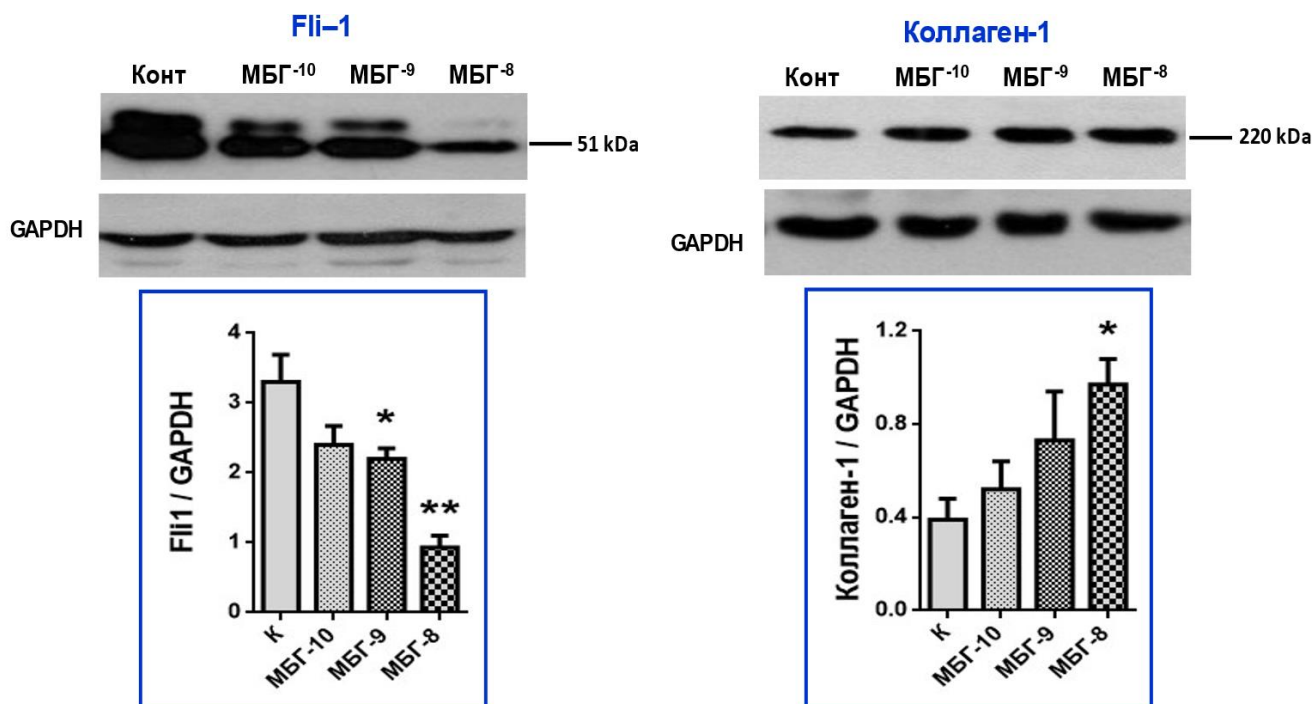


Рисунок 13. Влияние различных концентраций МБГ на уровни экспрессии факторов фиброза в изолированных фрагментах umbilical arteries здоровых рожениц. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM ($n = 6-7$). One-way ANOVA: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (К). АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

Инкубация фрагментов umbilical arteries с МБГ в комбинации с поликлональными антителами к этому стероиду практически полностью восстанавливала уровень экспрессии фактора Fli1, но лишь частично, только при низких концентрациях МБГ, снижала степень синтеза коллагена-1 (Рис. 14). Это доказывает, что транскрипционный фактор Fli1 является непосредственным эффектором МБГ, а избыточная продукция МБГ приводит к подавлению активности Fli1 и индуцирует процессы развития фиброза в тканях при преэклампсии.

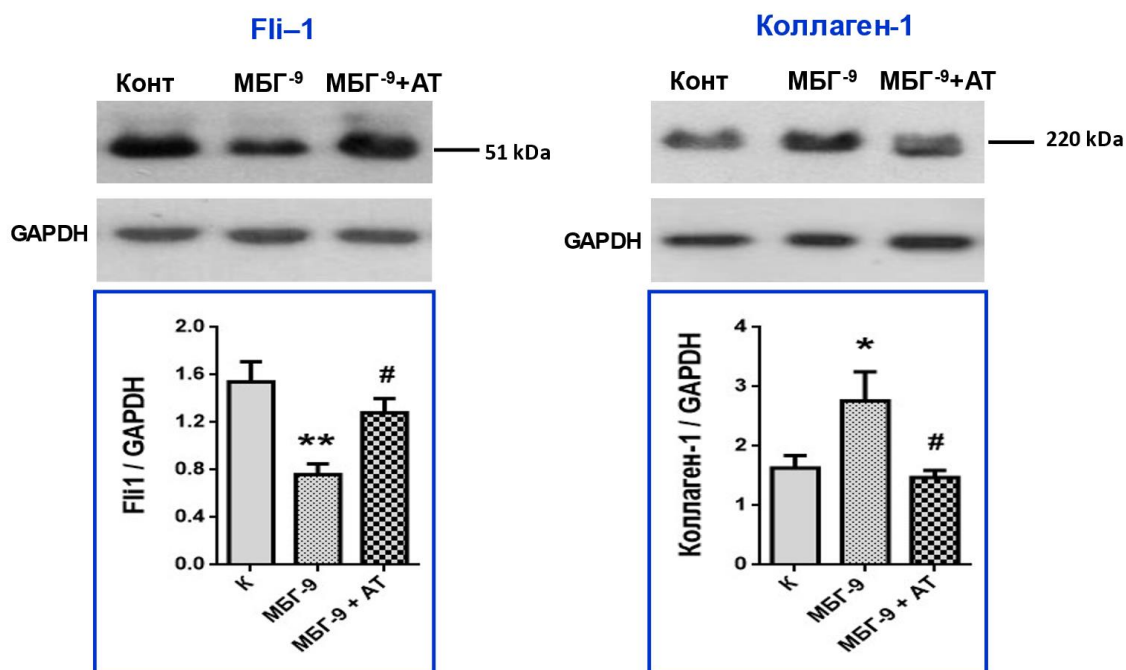


Рисунок 14. Влияние иммунонейтрализации МБГ на уровни экспрессии факторов фиброза в изолированных фрагментах умбиликальных артерий здоровых рожениц. Представлены типичные иммуноблоты и средние значения \pm SEM (n = 6-7). One-way ANOVA: *p < 0.05, **p < 0.01 по сравнению с контролем (К), # p < 0.05 по сравнению с МБГ. АТ – поликлональные антитела к маринобуфагенину.

Выводы

1. Развитие преэклампсии у беременных женщин сопровождается избыточным синтезом кардиотонического стероида маринобуфагенина (МБГ) и изменениями экспрессии факторов фиброза в плацентах и умбиликальных артериях - подавлением экспрессии транскрипционного фактора Fli1 и избыточным синтезом коллагена-1.
2. Моделирование преэклампсии путём солевой нагрузки беременных крыс приводит к появлению симптомов, типичных для этого синдрома у человека, в частности к увеличению продукции МБГ, подавлению активности транскрипционного фактора Fli1 и избыточному синтезу коллагена-1 в грудных аортах.
3. Формирование преэклампсии у беременных женщин и преэклампсия-подобного состояния у крыс сопровождается увеличением экспрессии анти-ангиогенных факторов эндоглина и sFlt в плацентах и сосудах, что подтверждает единые механизмы развития этого синдрома.
4. Краткосрочное введение крысам поликлональных антител к маринобуфагенину снижает артериальное давление и восстанавливает экспрессию фактора Fli1, что указывает на важную роль этого стероида в патогенезе преэклампсии и может быть основой для разработки новых терапевтических стратегий.
5. Обработка маринобуфагенином (МБГ) эксплантов умбиликальных артерий, полученных от женщин с нормально протекающей беременностью, подавляет экспрессию фактора Fli1 и приводит к избыточному синтезу коллагена-1, что полностью повторяет процессы, наблюдающиеся в сосудах при преэклампсии.
6. Иммунонейтрализация МБГ с помощью поликлональных антител частично нейтрализует активность про-фибротических факторов, что указывает на ключевую роль этого стероида в развитии фиброза сосудов при ПЭ.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи:

1. Агалакова Н.И., Резник В.А., Надей О.В., **Ершов И.А.**, Рассоха О.С., Васютина М.Л., Тапильская Н.И., Рухляда Н.Н., Галагудза М.М., Багров А.Я. Эндогенные кардиотонические стероиды и фиброз сосудов при преэклампсии. *Артериальная гипертензия*. 2018;24(6): 684-692. <https://doi.org/10.18705/1607-419X-2018-24-6-684-692>
2. Резник В.А., Иванов Д.О., Рухляда Н.Н., Тапильская Н.И., **Ершов И.А.** Значение антиангиогенных веществ эндоглина и sFLT-1, а также эндогенного дигиталис-подобного фактора маринобуфагенина в патогенезе преэклампсии // Педиатр. - 2020. - Т. 11. - №1. - С. 5-12. doi: 10.17816/PED1115-12
3. Natalia I Agalakova, Vitaly A Reznik, Olga V Nadei, **Ivan A Ershov**, Olga S Rassokha, Marina L Vasyutina, Dmitry O Ivanov, C David Adair, Michael M Galagudza, Alexei Y Bagrov. Antibody against Na/K-ATPase Inhibitor Lowers Blood Pressure and Increases Vascular Fli1 in Experimental Preeclampsia, *American Journal of Hypertension*, Volume 33, Issue 6, June 2020, Pages 514–519, <https://doi.org/10.1093/ajh/hpz180>
4. Agalakova, N.I.; Grigorova, Y.N.; **Ershov, I.A.**; Reznik, V.A.; Mikhailova, E.V.; Nadei, O.V.; Samuilovskaya, L.; Romanova, L.A.; Adair, C.D.; Romanova, I.V.; et al. Canrenone Restores Vasorelaxation Impaired by Marinobufagenin in Human Preeclampsia. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3336. <https://doi.org/10.3390/ijms23063336>
5. Agalakova NI, Reznik VA, **Ershov IA**, Lupanova EA, Nadei OV, Ivanov DO, David Adair C, Bagrov AY. Silencing of Fli1 Gene Mimics Effects of Preeclampsia and Induces Collagen Synthesis in Human Umbilical Arteries. *Am J Hypertens.* 2022 Sep 1;35(9):828-832. doi: 10.1093/ajh/hpac065. PMID: 35569064.

Тезисы

1. Ершов И.А., Рассоха О.С., Надей О.В. Роль эндогенных кардиотонических стероидов в развитии сосудистого фиброза при преэклампсии. Сборник тезисов XXVI Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2020». Санкт-Петербург. Издательство: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. С. 73-74
2. XXIV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». «Нейтрализация маринобуфагенина активизирует Fli1 и снижает фиброз артерий пуповины в экспериментах in vitro», Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 года – С. 536-537
3. XXIV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». «Сайленсинг транскрипционного фактора Fli1 как новый метод изучения механизмов развития сосудистого фиброза при преэклампсии», Санкт-Петербург, 24 апреля 2021 года – С.628-629
4. Ершов И.А., Надей О.В. Маринобуфагенин и Fli-1 в патогенезе преэклампсии. Сборник тезисов XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины-2022». Санкт-Петербург. Издательство: Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова. С. 62-63
5. Надей О.В., Ершов И.А. XXV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая

медицина. Человек и его здоровье». «Избыточная продукция кардиотонического стероида маринобуфагенина — основной фактор развития фиброза сосудов при преэклампсии», Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 года – С. 172-173

- б. Надей О.В., Ершов И.А., Михайлова Е.В. XXV Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье». «Роль маринобуфагенина в развитии фиброза сосудов при хронической почечной недостаточности и его иммунонейтрализация как новый терапевтический подход», Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 года – С. 276-277

Список цитируемой литературы

1. Lo J.O., Mission J.F., Caughey A.B. Hypertensive disease of pregnancy and maternal mortality. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 2013, 25(2):124-132. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835e0ef5. PMID: 23403779.
2. Knight M., Nair M., Tuffnell D., Kenyon S., Judy S., Brocklehurst P., et al. Saving Lives, Improving Mothers' Care: Surveillance of maternal deaths in the UK 2012–14 and lessons learned to inform maternity care from the UK and Ireland Confidential Enquiries into Maternal Deaths and Morbidity 2009–14 [Internet]. Oxford: National Perinatal Epidemiology Unit. 2016. 1–102 p.
3. Jim B., Karumanchi S.A. Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Semin. Nephrol.* 2017, 37(4):386–397.
4. Lisonkova S., Joseph K.S. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2013, 209(6):544.
5. Основные показатели здоровья матери и ребенка, деятельность службы охраны детства и родовспоможения в Российской Федерации. 2018.
6. Jim B., Karumanchi S.A. Preeclampsia: Pathogenesis, Prevention, and Long-Term Complications. *Semin. Nephrol.* 2017, 37(4):386–397.
7. Chaiworapongsa T., Chaemsathong P., Yeo L., Romero R. Preeclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat. Rev. Nephrol.* 2014, 10(8):466–480.
8. Thilaganathan B. Preeclampsia and the cardiovascular-placental axis. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2018, 51(6):714–7.
9. Agalakova N.I., Kolodkin N.I., Adair C.D., Trashkov A.P., Bagrov A.Y. Preeclampsia: Cardiotonic Steroids, Fibrosis, Fli1 and Hint to Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 16;22(4):1941.
10. Reznik V.A., Kashkin V.A., Agalakova N.I., Adair C.D., Bagrov A.Y. Endogenous Bufadienolides, Fibrosis and Preeclampsia. *Cardiol. Res. Pract.* 2019, 2019:5019287.
11. Haller S.T., Kennedy D.J., Shidyak A., Budny G.V., Malhotra D., Fedorova O.V., Shapiro J.I., Bagrov A.Y. Monoclonal antibody against marinobufagenin reverses cardiac fibrosis in rats with chronic renal failure. *Am. J. Hypertens.* 2012, 25(6):690-696.
12. Fedorova O.V., Fadeev A.V., Grigorova Y.N., Marshall C.A., Zernetkina V., Kolodkin N.I., Agalakova N.I., Konradi A.O., Lakatta E.G., Bagrov A.Y. Cardiotonic Steroids Induce Vascular Fibrosis Via Pressure-Independent Mechanism in NaCl-Loaded Diabetic Rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2019, 74(5):436-442.
13. Mikhailova E.V., Romanova I.V., Bagrov A.Y., Agalakova N.I. Fli1 and Tissue Fibrosis in Various Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24(3):1881.
14. National Institutes of Health Working Group on Hypertension in Pregnancy. Classification of hypertensive disorders of pregnancy. Bethesda, MD, US Dept. of Health and Human Services, 1991.