

## РОЛЬ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СТЕРОИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЧЕК

Исачкина А.Н.<sup>1</sup>, Лобов Г.И.<sup>2</sup>, Шутов Е.В.<sup>3</sup>, Гурков А.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», г.Санкт-Петербург, [nisachkina@mail.ru](mailto:nisachkina@mail.ru);

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, г.Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ГБОУ ДПО «Российская Медицинская Академия последипломного образования» Минздрава России, г.Москва

Патогенез артериальной гипертензии у пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) недостаточно изучен. Цель настоящего исследования состояла в измерении миогенного тонуса сосудов микроциркуляторного русла и определении концентрации кардиотонических стероидов в плазме крови и активности Na/K-АТФ-азы эритроцитов у пациентов ХБП. Показано, что у пациентов с ХБП повышены все компоненты тонуса по сравнению с контролем, в том числе и миогенный тонус (на 33,1–47,0%). Уровни эндогенного оуабайна в плазме крови пациентов с ХБП и в контроле не отличалась. Концентрация муринобуфагенина (МБГ) у пациентов с ХБП была повышена (1,247±0,131 нМ/л) по сравнению с контролем (0,343±0,0367 нМ/л). Активность Na/K-АТФ-азы эритроцитов у пациентов с ХБП была снижена более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Корреляционная связь между уровнем МБГ и активностью Na/K-АТФ-азы была отрицательной ( $r = -0,383$ ), а между уровнем МБГ и миогенным тонусом микрососудов – положительной с высоким коэффициентом корреляции ( $r = +0,746$ ). Мы приходим к заключению, что у пациентов с ХБП повышенное диастолическое артериальное давление поддерживается преимущественно за счет высокого миогенного тонуса сосудов микроциркуляторного русла. МБГ не только ингибирует насосную функцию Na/K-АТФ-азы гладкомышечных клеток сосудов, но и активирует в них Na/K-АТФаза Src-EGFR-ERK-зависимый путь сигнализации, что приводит к сокращению гладкомышечных клеток и повышению тонуса сосудов.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, кардиотонические стероиды, муринобуфагенин, Na/K-АТФаза, гладкомышечные клетки

## THE ROLE OF CARDIOTONIC STEROIDS IN THE REGULATION OF BLOOD PRESSURE IN PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Isachkina A.N.<sup>1</sup>, Lobov G.I.<sup>2</sup>, Shutov E.V.<sup>3</sup>, Gurkov A.S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, [anisachkina@mail.ru](mailto:anisachkina@mail.ru);

<sup>2</sup>Pavlov Institute of Physiology RAS, Saint Petersburg;

<sup>3</sup>Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

The role of cardiotonic steroids in the regulation of blood pressure in patients with chronic kidney disease Isachkina A.N.<sup>1</sup>, Lobov G.I.<sup>2</sup>, Shutov E.V.<sup>3</sup>, Gurkov A.S.<sup>2</sup> 1 -North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, [anisachkina@mail.ru](mailto:anisachkina@mail.ru) 2 -Pavlov Institute of Physiology RAS, [gilobov@yandex.ru](mailto:gilobov@yandex.ru) 3- Russian Medical Academy of Postgraduate Education, [7430608@mail.ru](mailto:7430608@mail.ru) The pathogenesis of hypertension in patients with chronic kidney disease (CKD) is not sufficiently studied. The purpose of this study was to measure myogenic tone microvascular and determining the concentration of cardiotonic steroids in the blood plasma and the activity of Na/K-ATPase of erythrocyte in patients with CKD. It was shown that patients with CKD have increased all components vascular tone as compared with the control, including and myogenic tone (on 33.1 - 47.0%). Levels of endogenous ouabain in plasma of patients with CKD and the control did not differ. Concentration murinobufagenin (MBG) in patients with CKD was increased (1,247 ± 0.131 nM/L) compared with the control (0.343 ± 0.0367) nM/L). The activity of Na/K-ATPase erythrocytes in patients with CKD was decreased by more than 2-fold compared with the control. The correlation between the level of activity of MBG and Na/K-ATPase was negative ( $r = -0,383$ ), between the level of MBG and myogenic tone microvessels - positive with a high correlation coefficient ( $r = +0,746$ ). We conclude that increased diastolic blood pressure in patients with CKD is maintained mainly due to high myogenic tone microvascular. MBG not only inhibits the pumping function of the Na/K-ATPase vascular smooth muscle cells, but also activates Na/K-ATPase Src-EGFR-ERK-dependent pathway signaling, which leads to a contraction smooth muscles and increase vascular tone.

Keywords: chronic kidney disease, cardiotonic steroids, marinobufagenin, Na/K-ATPase, smooth muscle cells

Хроническая болезнь почек (ХБП) является одним из наиболее распространенных неинфекционных заболеваний. По данным American kidney fund ею страдают около 10% населения США [5]. При несвоевременной диагностике и лечении ХБП быстро прогрессирует, и на этом фоне развиваются различные осложнения, в частности артериальная гипертензия (АГ) и гипертрофия миокарда. ХБП и АГ тесно взаимосвязаны. С одной стороны, наличие заболеваний почек является одной из причин развития АГ, а с другой — высокое артериальное давление является ключевым патогенетическим фактором, способствующим снижению почечной функции [8].

Ранее нами было показано, что при ХБП у пациентов повышен не только нейрогенный тонус (НТ) сосудов микроциркуляторного русла (МЦР), но и его миогенный (МТ) и эндотелийзависимый (ЭЗТ) компоненты [2]. Принято считать, что в основе повышения НТ микрососудов у пациентов с ХБП лежит активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) как в отдельных структурах головного мозга, так и в крови. Стимуляция РААС в гипоталамусе и гипофизе в свою очередь активирует симпатическую нервную систему (СНС) [3]. Полагают, что активация СНС — одна из важных детерминант повышения АД при ХБП. На периферии ангиотензин II также способствует увеличению высвобождения норадреналина в симпатических терминалях и ингибирует его обратный захват [6].

Если механизм повышения нейрогенного тонуса сосудов при ХБП в большей или меньшей степени понятен, то причины увеличения миогенного тонуса микрососудов у больных ХБП не совсем ясны. Полагают, что одной из причин увеличения МТ при ХБП является ингибирование Na/K-АТФазы мембраны гладкомышечных клеток (ГМК) мелких артерий и артериол [6]. Снижение активности Na-K-насоса приводит к накоплению в цитоплазме миоцитов  $\text{Na}^+$ , а впоследствии и  $\text{Ca}^{2+}$ , что сопровождается возрастанием их напряжения, повышением тонуса микрососудов, увеличением общего периферического сопротивления и подъемом АД. Однако следует отметить, что прямых данных о степени снижении активности Na-K-АТФазы ГМК микрососудов при ХБП недостаточно. В экспериментах на животных получены данные о том, что субтотальная нефрэктомия и развивающаяся на этом фоне АГ сопровождаются увеличением в плазме крови концентрации эндогенных кардиотонических стероидов (КС), представляющих собой эндогенные лиганды Na/K-АТФазы [3]. Среди циркулирующих в крови КС наиболее значимыми и изученными являются эндогенный оубаин (ЭО) и маринобуфагенин (МБГ). Полагают, что ЭО и МБГ выступают в качестве физиологических регуляторов активности Na/K-АТФазы и участвуют в регуляции натрийуреза и сосудистого тонуса [4,6].

Данных о концентрации КС, вовлеченных в регуляторные процессы при ХПБ у человека, недостаточно, а имеющиеся зачастую противоречивы [7, 8]. Не полностью изучен механизм их действия на Na/K-АТФазу ГМК. Цель данного исследования состояла в определении уровня ЭО и МБГ в крови у пациентов с ХБП и механизмов их влияния на ГМК сосудов МЦР.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования были пациенты отделения диализа клиники Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова: 36 пациентов получали лечение гемодиализом (ГД) и 23 находились на хроническом амбулаторном перитонеальном диализе (ПД). Кроме них, в исследование были включены 22 добровольца (контрольная группа), не имеющих патологии со стороны почек и сердечно-сосудистой системы. Протокол исследования был одобрен этическим комитетом и клиническим Советом СЗГМУ им. И.И. Мечникова. Гемодиализные пациенты проходили лечение 3 раза в неделю. Режим перитонеального диализа предусматривал 4 обмена в сутки. Клинические характеристики пациентов и контрольной группы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов с ХБП-5д и контрольной группы

Показатель	Пациенты на ГД	Пациенты на ПД	Контрольная группа
Количество (м/ж)	36 (21/15)	23 (8/14)	22 (10/12)
Возраст (лет)	47,7±3,8	51,3±4,9	45,4±3,7
Вес (кг)	67±3,1	69±3,6	73±3,4
САД (мм рт. ст.)	131±5,2	129±4,4	126±3,2
ДАД (мм рт. ст.)	81±3,6	79±3,9	77±3,7

Исследование кровотока в сосудах МЦР кожи подушечки второго пальца руки (на этом участке кожи представлены все виды регуляции сосудистого тонуса) проводили с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М (исполнение 2) (ЛАЗМА, Россия). У пациентов, получающих лечение ГД, измерение проводили на руке, на которой не было функционирующей артериовенозной фистулы. Кровоток в сосудах МЦР измеряли на протяжении 8 мин. Для обработки ЛДФ-грамм применяли прилагаемое к аппарату стандартное программное обеспечение версии 3.0.2.376, работающее в операционной системе Windows. Величину НТ, МТ и ЭЗТ микрососудов рассчитывали в соответствии с рекомендациями разработчиков диагностического комплекса [1]. При каждом обследовании у пациентов измеряли артериальное давление тонометром Omron SpotArm™ i-Q142 (Omron Healthcare Co., Япония).

После записи ЛДФ-граммы у каждого исследуемого забирали 10 мл венозной крови. Часть крови использовали для определения уровня ЭО и МБГ, другая часть предназначалась для определения активности Na/K-АТФазы эритроцитов. Концентрацию КС в плазме крови определяли методом конкурентного иммунофлуоресцентного анализа с применением антител к маринобуфагенину и оуабаину. Активность Na/K-АТФазы эритроцитов определяли спектрофотометрическим методом [9].

#### Статистический анализ

Обработку полученных результатов проводили с использованием среднего арифметического (M) и стандартного отклонения ( $\pm SD$ ). Для оценки различий применяли t-критерий Стьюдента и (в случае необходимости) критерий Манна—Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Патогенез АГ при ХБП достаточно сложен, повышение артериального давления при этом обусловлено несколькими причинами, в том числе повышением общего периферического сопротивления, формирующегося под влиянием: 1) симпатической нервной системы, 2) вазоконстрикторов и вазодилататоров, продуцируемых эндотелием, и 3) миогенного механизма регуляции. МТ сосудов МЦР при ХБП, в отличие от их НТ и ЭЗТ, изучен недостаточно. В определенной степени это связано со сложностью методических приемов. Сравнительно недавно внедренный в клинику метод ЛДФ позволяет непосредственно измерять величину среднего потока крови в исследуемом объеме ткани (перфузию) и амплитуды колебаний микрокровотока с распределением их на несколько диапазонов (в том числе нейрогенный, эндотелийзависимый и миогенный). Последние в дальнейшем используются для расчета НТ, ЭЗТ и МТ сосудов МЦР.

При первичном анализе ЛДФ-грамм, полученных в процессе исследования, было установлено, что показатель микроциркуляции (ПМ), характеризующий перфузию в коже второго пальца руки у пациентов с ХБП, был меньше по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе (табл. 2). При этом были также показаны достоверные различия между величинами ПМ у пациентов, получающих лечение ГД, и пациентов, находящихся на лечении ПД. Проведенные в последующем расчеты позволили выявить различия в величинах НТ, МТ и ЭЗТ сосудов МЦР исследуемой области у пациентов с ХБП и здоровых добровольцев.

Таблица 2

Параметры микрокровотока в коже подушечки второго пальца руки у пациентов с ХБП, получающих лечение гемодиализом и перитонеальным диализом, и в контрольной группе

Показатель	Пациенты на ГД	Пациенты на ПД	Контроль
ПМ (пф. ед)	15,8±1,86	17,2±1,94*	21,2±2,03
δ (пф. ед)	1,8±0,16	2,0±0,19*	2,5 ±0,23
НТ (отн.ед)	8,69±0,74	8,33±0,77	6,67±0,51
МТ (отн.ед)	12,01±1,37	10,88±1,35*	8,17±0,97
ЭЗТ (отн.ед)	13,07±1,29	12,18±1,27*	9,92±0,99

Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Все показатели у пациентов с ХБП достоверно отличаются от соответствующих показателей в контрольной группе,  $p < 0,05$ . \* — показаны достоверные различия между показателями в двух группах пациентов, получающих лечение ГД и ПД,  $p < 0,05$ .

При анализе тонуса микрососудов видно, что у пациентов с ХБП повышены все составляющие тонуса по сравнению с контролем, в том числе и МТ (у пациентов, получающих лечение ПД, прирост составил +33,1%, а у находящихся на лечении ГД — +47,0%). Из литературных данных известно, что одной из причин, приводящих к повышению тонуса мелких артерий и артериол при ХБП, является ингибирование Na/K-АТФазы на мембране ГМК. В миоцитах кровеносных сосудов представлены преимущественно  $\alpha$ -1 и  $\alpha$ -2 изоформы Na/K-АТФазы, обладающие высокой чувствительностью к КС [10]. Удобным объектом для исследования свойств  $\alpha$ -1 изоформы Na/K-АТФазы являются эритроциты [9]. Мы провели оценку активности Na/K-АТФазы эритроцитов пациентов с ХБП и в контрольной группе. Активность Na/K-АТФазы эритроцитов пациентов с ХБП оказалась в 2 раза ниже по сравнению с контролем (рис. 1).

Поскольку имеются данные о том, что одной из причин угнетения насосной функции Na/K-АТФы у пациентов с ХБП является повышение содержания в крови эндогенных КС [5, 10], мы провели исследование содержания ЭО и МБГ в плазме крови пациентов с ХБП и в контрольной группе. Концентрация ЭО в плазме крови пациентов с ХБП составила от 0,278 до 0,493 (в среднем  $0,302 \pm 0,0343$ ) нМ/л, в то время как в плазме добровольцев диапазон колебаний концентрации ЭО был от 0,163 до 0,364 (в среднем  $0,279 \pm 0,0302$ ) нМ/л. Концентрация МБГ в плазме крови пациентов с ХБП составила от 0,612 до 4,193 (в среднем  $1,247 \pm 0,131$ ) нМ/л, а в контроле — от 0,194 до 0,681 (в среднем  $0,343 \pm 0,0367$ ) нМ/л. Таким образом, было показано, что концентрации ЭО в плазме крови в обеих группах практически не отличались, в то время как содержание МБГ в плазме крови пациентов с ХБП в 3,6 раза превышало таковую в контроле (рис. 2).

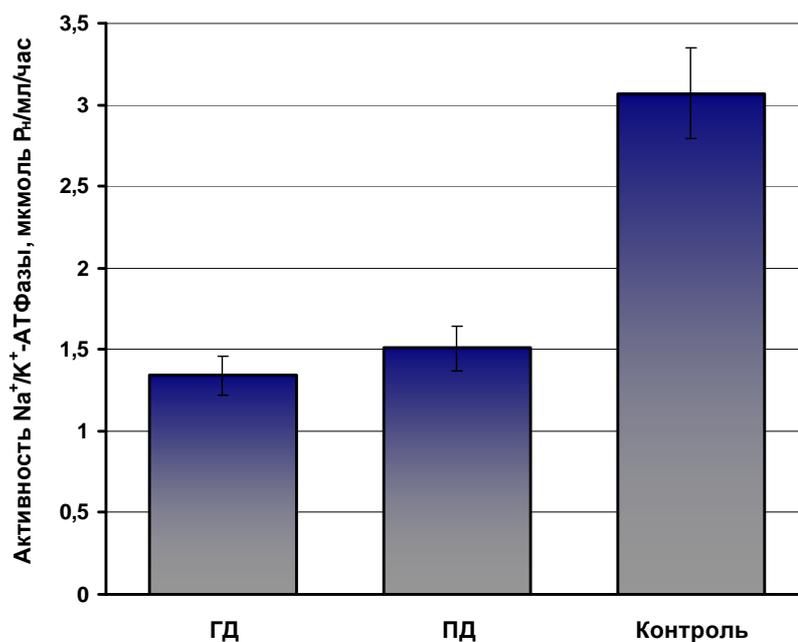


Рис. 1. Активность Na/K-АТФазы эритроцитов пациентов с ХБП, получающих лечение ГД и ПД, и в контрольной группе

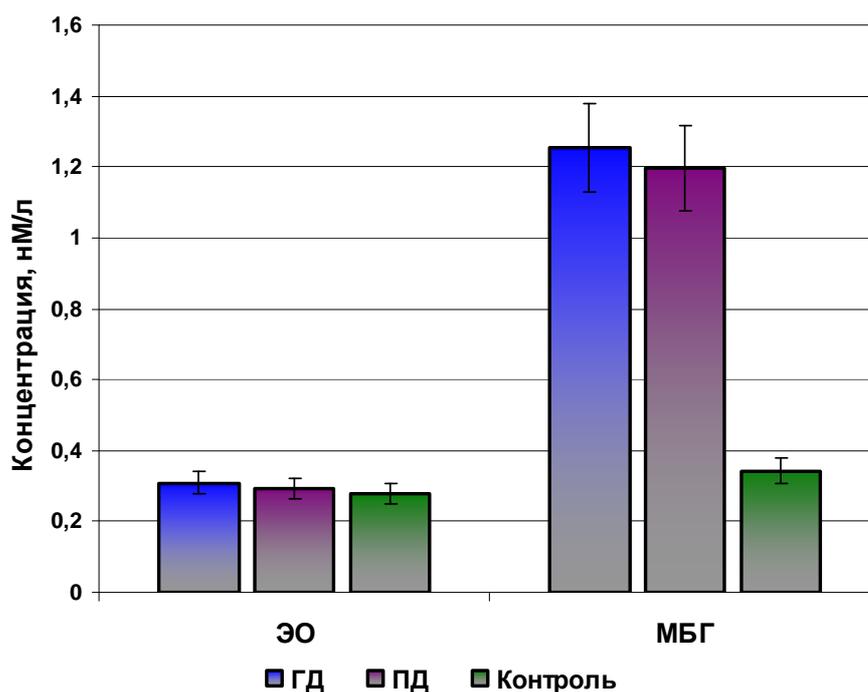


Рис. 2. Концентрация эндогенного оубаина (ЭО) и маринобуфагенина (МБГ) в плазме крови пациентов с ХБП, находящихся на лечении ГД и ПД, и в контрольной группе

В последующем мы провели расчеты корреляционной связи между концентрацией МБГ в плазме крови и активностью Na/K-АТФазы эритроцитов. Связь оказалась отрицательной с коэффициентом корреляции 0,383. Затем была рассчитана корреляционная связь между концентрацией МБГ и диастолическим артериальным давлением (ДАД) у

пациентов с ХБП. Связь между этими двумя показателями оказалась положительной с коэффициентом корреляции 0,648 (рис. 3).

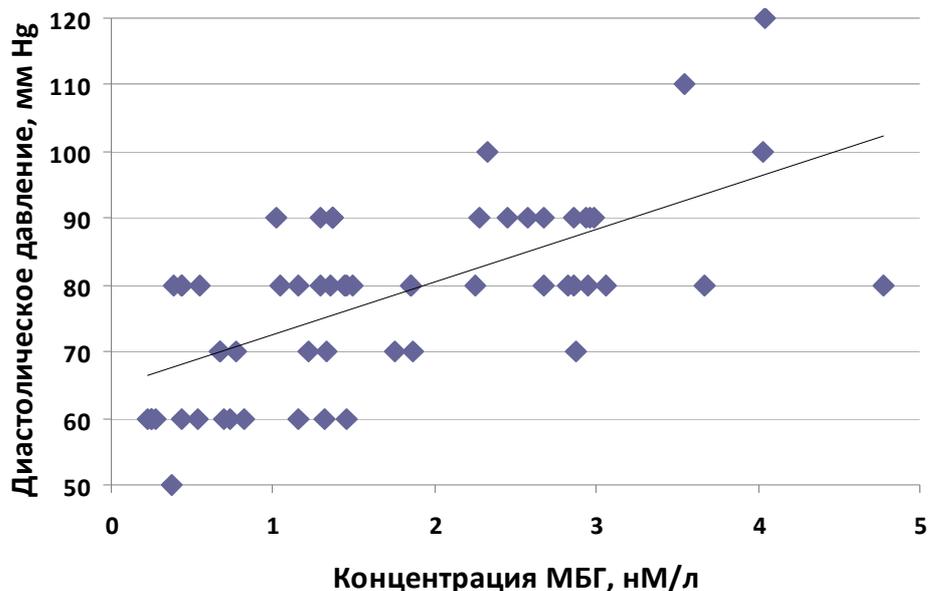
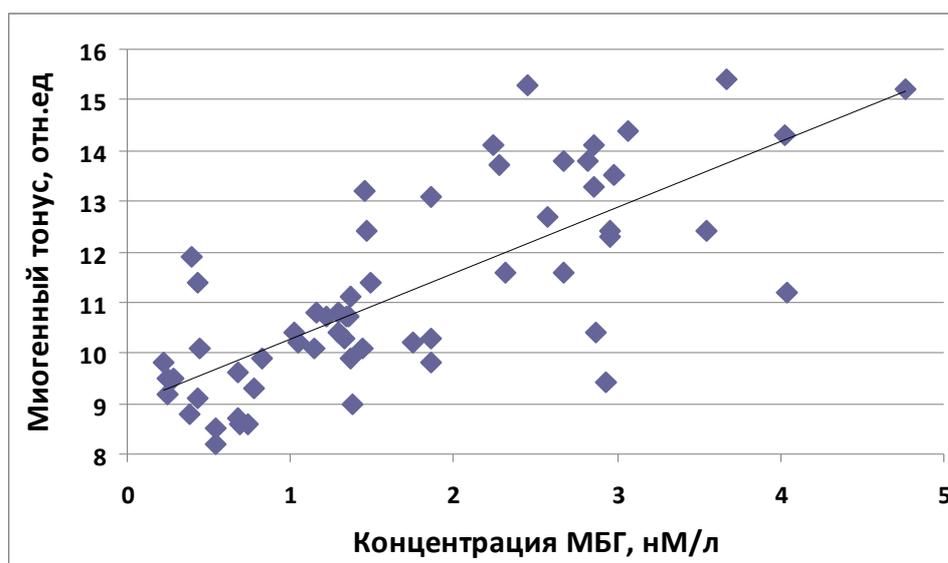


Рис. 3. Корреляция между уровнем МБГ в плазме крови и диастолическим артериальным давлением у пациентов с ХБП

На заключительном этапе мы сопоставили концентрации МБГ в плазме крови пациентов с ХБП и величины зарегистрированного у них МТ микрососудов. Между этими показателями была выявлена высокая положительная корреляционная связь с коэффициентом корреляции 0,746 (рис. 4).

Таким образом, в процессе исследования было показано, что у больных ХБП содержание МБГ в плазме крови было в 3,6 раза выше по сравнению с контрольной группой. Концентрация МБГ в плазме крови пациентов с ХБП коррелировала с величиной диастолического артериального давления у этих больных (средняя корреляция). Более того, была установлена сильная положительная корреляционная связь между концентрацией МБГ в плазме крови больных ХБП и величиной МТ микрососудов у них.



*Рис. 4. Корреляция между уровнем МБГ в плазме крови и миогенным тонусом сосудов микроциркуляторного русла у пациентов с ХБП*

Ранее *in vitro* было показано, что МБГ в концентрациях, сопоставимых с уровнем этого стероида в плазме крови *in vivo*, вызывает вазоконстрикторный эффект, а также ингибирование оубаин-резистентной  $\alpha$ 1-Na/K-АТФ-азы в аорте [7]. Мы предположили, что у больных ХБП высокая концентрация МБГ в плазме крови может повышать миогенный тонус микрососудов и артериальное давление путем ингибирования транспортной функции  $\alpha$ -1 Na/K-АТФ-азы в ГМК, что способствует входу  $\text{Na}^+$  внутрь клеток, деполяризации клеточной мембраны, стимуляции  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  противообмена и активации сократительного аппарата миоцитов.

Однако корреляционная связь между уровнем МБГ в плазме крови и активностью Na/K-АТФазы оказалось слабой, что не позволяет объяснить повышение МТ микрососудов только ингибированием насосной функции Na/K-АТФазы. Ранее в экспериментах на животных было показано, что эндогенные КС наряду с ингибированием насосной функции Na/K-АТФазы и трансмембранного транспорта моновалентных катионов способны также активировать ее сигнальную (трансдукторную) функцию [4, 8]. Сигнальная функция опосредованного Na/K-АТФ-азой регуляторного каскада практически не зависит от ингибирования КС транспорта ионов, а запускается при связывании последних с Na/K-АТФ-азой в присутствии киназ семейства Src. Это приводит к активации рецепторов эпидермального фактора роста и фосфолипазы C с последующей активацией протеинкиназы C. На миокарде были получены прямые доказательства активации КС инициированного Na/K-АТФазой Src-EGFR-ERK-зависимого пути сигнализации [8].

Мы приходим к заключению, что высокая концентрация МБГ в плазме крови больных ХБП приводит не только к ингибированию насосной функции Na/K-АТФазы в ГМК сосудов, но и к активации в этих клетках трансдукторной функции опосредованного Na/K-АТФ-азой сигнального каскада. Результатом запущенной каскадной реакции являются активация протеинкиназы С, фосфорилирование ею киназы легкой цепи миозина и развитие сокращения ГМК, что приводит к вазоконстрикции, возрастанию МТ и повышению артериального давления. Полученные данные позволяют полагать, что второй механизм действия МБГ на ГМК сосудов является преобладающим.

### Список литературы

1. Крупаткин А.И., Сидоров В. В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем (Руководство для врачей). – М.: Либроком, 2013. – 496 с.
2. Лобов Г.И. Микроциркуляторный кровоток в коже кисти у пациентов с артериовенозной фистулой, находящихся на лечении программным гемодиализом / Г.И. Лобов, А.С. Гурков, Д.П. Дворецкий // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – № 1(41). – С. 35–44.
3. Bagrov A.Y. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications/ A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro// Nat. Clin. Pract. Nephrol. – 2008/ — Vol. 4. — P. 378–392.
4. Bagrov A.Y. Endogenous Cardiotonic 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.
5. Collins A.J. United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States/ A.F. Collins, R.N. Foley, B. Chavers B.// Am J Kidney Dis. – 2012. – Vol. 59(1 Suppl 1):A7. — P. e1-e420.
6. Huang B.S. Sympathoexcitatory and pressor responses to increased brain sodium and ouabain are mediated via brain ANG II/ B.S. Huang, F.N. Leenen// Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 270. — № 1 (Pt 2). – P. H275–H280.
7. Fedorova O.V. An endogenous ligand of  $\alpha$ -1 sodium pump, marinobufagenin, is a novel mediator of sodium chloride dependent hypertension. Fedorova OV, Talan MI, Agalakova NI, Circulation 2002;105(9):1122–1127.
8. Kennedy D.J. Partial nephrectomy as a model for uremic cardiomyopathy in the mouse/ D.J. Kennedy, J. Elkareh, A. Shidyak et al.// Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2008. – Vol. 294. — № 2. — P. F450–F454.

9. Kolmakova E.V. Endogenous cardiotoxic 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.
10. Stella P. Endogenous ouabain and cardiomyopathy in dialysis patients/ P. Stella, P. Manunta, F. Mallamaci et al.// J. Intern. Med. – 2008. – Vol. 263. – P. 274–280.

**Рецензенты:**

Чурина С.К., д.м.н., профессор, заведующая лабораторией экспериментальной и клинической кардиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург;

Пантелеев С.С., д.б.н., заведующий лабораторией кортико-висцеральной физиологии Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург.