

*Αρτηριακή υπέρταση και ιατρική της ακριβείας – ο ρόλος της πρωτεωμικής ανάλυσης

Δ. Πολύζος¹
Σ. Δρογκάρης¹
Δ. Κωνσταντινίδης¹
Μ. Μακρυδάκης²
Α. Βλάχου²
Α. Μήλιου¹

Φ. Τατάκης¹
Π. Ηλιάκης¹
Κ. Θωμόπουλος³
Δ. Βλαχάκος^{2,4}
Κ. Τσιούφης¹

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ) αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνητότητα, ενώ περίπου το 40% των υπερτασικών ασθενών υπό φαρμακευτική αγωγή δεν έχει καταφέρει να επιτύχει ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης εντός των επιθυμητών ορίων. Η ιατρική της ακριβείας αποτελεί μια νέα προσέγγιση ιατρικής περίθαλψης που ενσωματώνει δεδομένα που διέπονται από ατομική μεταβλητότητα, όπως η γενετική διακύμανση και η περιβαλλοντική έκθεση, με σκοπό την επίτευξη στοχευμένης και εξατομικευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης. Σημαντικό ρόλο στην προσπάθεια για επίτευξη ιατρικής της ακριβείας διαδραματίζει η συνεχής ανάπτυξη της βιολογίας των συστημάτων και της βιοπληροφορικής. Προς αυτή την κατεύθυνση στοχεύει η πρωτεωμική, ένας εξελισσόμενος επιστημονικός κλάδος που αφορά τον προσδιορισμό και τη μελέτη του πρωτεώματος, δηλαδή του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται από ένα βιολογικό σύστημα, έχοντας ως αιχμή του δόρατος την τεχνολογία της φασματογραφίας μάζας. Οι στόχοι της πρωτεωμικής είναι η καλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΑΥ σε μοριακό επίπεδο και η καθιέρωση διαγνωστικών και θεραπευτικών αλγορίθμων για την αποτελεσματικότερη πρόληψη και θεραπεία της. Τα τελευταία χρόνια έχουν διεξαχθεί λίγες αλλά σημαντικές κλινικές μελέτες πρωτεωμικής ανάλυσης σε ανθρώπους στο φάσμα της ΑΥ, ιδιαίτερα της ιδιοπαθούς και της δευτεροπαθούς, αλλά και της προεκλαμψίας. Έχουν απομονωθεί σημαντικοί πρωτεϊνικοί βιοδείκτες με προβλεπτικό ρόλο στη διάγνωση, την πρόληψη και τη θεραπεία, οι οποίοι εμπλέκονται σε ρυθμιστικά ή παθοφυσιολογικά βιοχημικά μονοπάτια.

🔑 Λέξεις-κλειδιά: αρτηριακή υπέρταση, ιατρική της ακριβείας, πρωτεωμική ανάλυση, βιοδείκτες, φασματογραφία μάζας

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αρτηριακή υπέρταση (ΑΥ) έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως ο βασικός αναστρέψιμος παράγοντας κινδύνου για νοσηρότητα και θνησιμότητα, καθώς ευθύνεται για τον θάνατο περίπου 9 εκατομμυρίων ανθρώπων ετησίως^{1,2}. Εξάλλου, πληθώρα κλινικών και επιδημιολογικών μελετών έχει αναδείξει την ΑΥ ως ανεξάρτητο και γραμμικά συσχετιζόμενο παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, καρδιακής ανεπάρκειας, χρόνιας νεφρικής βλάβης και πρόωρου θανάτου^{3,4}. Τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα επισημαίνουν ότι 1.39 δισεκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από ΑΥ διεθνώς, αριθμός που

λογικών μελετών έχει αναδείξει την ΑΥ ως ανεξάρτητο και γραμμικά συσχετιζόμενο παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, καρδιακής ανεπάρκειας, χρόνιας νεφρικής βλάβης και πρόωρου θανάτου^{3,4}. Τα τελευταία επιδημιολογικά δεδομένα επισημαίνουν ότι 1.39 δισεκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από ΑΥ διεθνώς, αριθμός που

Η εργασία έχει χρηματοδοτηθεί από την Ελληνική Εταιρεία Υπέρτασης.

¹Α' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική ΕΚΠΑ, Ιπποκράτειο ΓΝΑ ²Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών ³Καρδιολογικό Τμήμα ΓΝΑ «Ελένα Βενιζέλου» ⁴Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

✉ **Αλληλογραφία:** Δημήτριος Πολύζος, Πόντου 76, 11527, Αθήνα • Τηλ./Fax: +30 6977 535 135 • E-mail: dim_polyzos@hotmail.com

αντιπροσωπεύει το 31.1% του συνολικού παγκόσμιου ενήλικου πληθυσμού. Ο επιπολασμός της ΑΥ αυξάνεται συνεχώς εξαιτίας της γήρανσης του πληθυσμού, αλλά και διαφόρων γενετικών, κοινωνικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου του σύγχρονου τρόπου ζωής, της διατροφής (δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε αλάτι και χαμηλής σε κάλιο) και της έλλειψης φυσικής άσκησης.

Παρότι η έρευνα στην ΑΥ και η ανάπτυξη αποτελεσματικών αντιυπερτασικών θεραπευτικών στρατηγικών ήταν από τις μεγαλύτερες επιτυχίες της ιατρικής στο δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, τα πρόσφατα στοιχεία αποκαλύπτουν υψηλά ποσοστά υπερτασικών ασθενών με αρρυθμική αρτηριακή πίεση (ΑΠ)². Πράγματι, μόνο το 35% των ασθενών έχει ρυθμίσει την ΑΠ του στο φάσμα <140/90 mmHg, ενώ οι τελευταίες κατευθυντήριες οδηγίες συστήνουν ακόμα χαμηλότερες τιμές-στόχους σε ορισμένες πληθυσμιακές ομάδες^{5,6}. Η δυσκολία που παρατηρείται στη ρύθμιση της ΑΠ είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, αποτέλεσμα διαφόρων συνιστωσών, μεταξύ των οποίων βρίσκεται η ιατρική αδράνεια, η πολυφαρμακία και η δυσκολία συμμόρφωσης των ασθενών στα πολύπλοκα θεραπευτικά σχήματα. Η χαμηλή συμμόρφωση συχνά οφείλεται στις ανεπιθύμητες ενέργειες των αντιυπερτασικών φαρμάκων, στην ασυμπτωματική φύση της ΑΥ, στο κόστος των αντιυπερτασικών δισκίων, καθώς και στη δυσκολία προσαρμογής της αγωγής στον καθημερινό τρόπο ζωής⁷. Οι διαφορετικές κατηγορίες αντιυπερτασικών φαρμάκων αλλά ακόμα και νεότερες θεραπευτικές παρεμβάσεις, όπως η νεφρική απονεύρωση, δεν εμφανίζουν την ίδια αποτελεσματικότητα σε όλους τους ασθενείς^{8,9}. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στα επίπεδα της ΑΠ και στην εμφάνιση βλαβών οργάνων-στόχων εμφανίζει ετερογένεια μεταξύ των ατόμων, εξαιτίας της διαφορετικής γενετικής διακύμανσης. Η περιβαλλοντική και γενετική διακύμανση επηρεάζει επίσης την απόκριση των ασθενών στις διάφορες διαγνωστικές και θεραπευτικές παρεμβάσεις. Επομένως, οποιαδήποτε μεμονωμένη μέθοδος διάγνωσης, θεραπείας και πρόληψης της ΑΥ και των επιπλοκών της, είναι απίθανο να είναι εξίσου αποτελεσματική σε όλους τους ασθενείς¹⁰.

Έτσι, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι ένα σημαντικό ποσοστό υπερτασικών ασθενών δεν ωφελείται από τα τρέχοντα διαγνωστικά και θεραπευτικά πρωτόκολλα. Είναι ξεκάθαρο ότι χρειάζονται πιο ειδικές και ακριβείς στρατηγικές προσαρμο-

σμένες στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και φαινότυπους των ασθενών, οι οποίες θα λαμβάνουν υπ' όψιν γενετικούς και περιβαλλοντικούς μηχανισμούς για τη διάγνωση, τον έλεγχο και την πρόληψη της ΑΥ¹¹.

ΙΑΤΡΙΚΗ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ

Για δεκαετίες, η ιατρική μεθοδολογία περιελάμβανε την καταγραφή της σημειολογίας και συμπτωματολογίας του ασθενούς και την αντιστοίχιση αυτών με παθολογικές οντότητες, βασιζόμενη σε απλοποιημένες θεωρίες, ενώ και οι χορηγούμενες θεραπείες στηριζόντουσαν στην προσέγγιση “one size fits all”. Η αξιολόγηση άλλων παραμέτρων, όπως οι παραλλαγές στην αιτιολογία, η ετερογένεια στην παθοφυσιολογία της νόσου και η απόκριση στη θεραπεία, ήταν περιορισμένη. Μέχρι πρόσφατα οι αποφάσεις για τη χορήγηση των θεραπειών βασιζόντουσαν αποκλειστικά σε στατιστικές μεθόδους και αναγωγικές προσεγγίσεις δεδομένων που λαμβάνονταν από κλινικές μελέτες, θεωρώντας πως οι ασθενείς έχουν κοινούς κλινικούς φαινότυπους¹².

Τα τελευταία χρόνια μέσα από την εξέλιξη των μοριακών και βιοϊατρικών επιστημών αυτή η προσέγγιση τείνει να αλλάξει, ενσωματώνοντας την ιατρική της ακριβείας στην καθημερινή ιατρική πράξη. Παρότι ο ορισμός ποικίλλει ανάλογα με τον εκάστοτε συγγραφέα, θα περιγράψαμε την ιατρική της ακριβείας βασιζόμενοι σε ένα κοινό πλαίσιο, ως μια νέα στρατηγική ιατρικής περίθαλψης που στοχεύει στην πρόληψη και θεραπεία, λαμβάνοντας υπ' όψιν τους διαφορετικούς κλινικούς φαινότυπους των ασθενών, καθώς επίσης και δεδομένα από διάφορους επιστημονικούς κλάδους. Σε αυτό το μοντέλο οι αποφάσεις λαμβάνονται μέσα από ένα σύστημα ενσωμάτωσης πληροφοριών που προέρχονται από αναδυόμενες αναλυτικές μεθόδους, που μελετούν τον ρόλο των γενετικών και περιβαλλοντικών επιδράσεων στην εμφάνιση και εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων. Οι μέθοδοι αυτές αφορούν επιστήμες, όπως η βιολογία των συστημάτων, η οποία σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των εργαλείων της βιοπληροφορικής αποτελεί τον κεντρικό άξονα αυτής της στρατηγικής. Ιδιαίτερα οι εξελίξεις στο πεδίο των -ωμικών τεχνολογιών (γονιδιωματική, μεταγραφωμική, πρωτεωμική, μεταβολομική) έχουν δημιουργήσει νέες προοπτικές και προσδοκίες όσον αφορά τις εφαρμογές τους¹³. Στόχος της ιατρικής της ακριβείας είναι η βαθύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας και του ρόλου της, στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου, ενώ προς αυτή την κατεύθυνση δημιουργήθηκε το 2015 η Ομάδα Εργασίας της Ια-

τρικής της Ακριβείας των ΗΠΑ (Precision Medicine Initiative Working Group, PMI)¹⁴. Αυτή η εξελισσόμενη προσπάθεια μπορεί να οδηγήσει σε πιο ακριβείς διαγνώσεις, πιο ορθολογικές στρατηγικές πρόληψης, αποτελεσματικότερες και πιο εξατομικευμένες θεραπευτικές επιλογές, αλλά και ανάπτυξη νέων θεραπειών με στόχο μεμονωμένες ομάδες ασθενών^{12,13}.

Η εξέλιξη της Ιατρικής της ακριβείας στην ΑΥ

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ΑΥ είναι ανάμεσα στις πρώτες παθολογικές καταστάσεις στις οποίες έγινε προσπάθεια εφαρμογής της ιατρικής της ακριβείας.

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 ο Irvine Page περιέγραψε την παθοφυσιολογία της ΑΥ ως ένα μωσαϊκό ετερογενών μηχανισμών που συμβάλλουν στην αύξηση της ΑΠ¹⁵, ενώ οι Guyton και συνεργάτες διαμόρφωσαν το μοντέλο της πολλαπλότητας των φυσιολογικών και βιοχημικών συστημάτων που αλληλεπιδρούν στη ρύθμιση της ΑΠ^{16,17}. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων ΑΥ χαρακτηριζόταν ως ιδιοπαθής, ενώ οι υπόλοιπες περιπτώσεις διαπιστώθηκε πως απαιτούσαν διαφορετική διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση. Μέχρι τότε, ο βασικός διαγνωστικός έλεγχος ήταν περιορισμένος και αποσκοπούσε στη λήψη της απόφασης για την έναρξη θεραπείας και όχι στην επιλογή του κατάλληλου αντιυπερτασικού παράγοντα. Παρότι η απόκριση της ΑΠ στη φαρμακευτική αγωγή διέφερε μεταξύ των ασθενών, είχε καθιερωθεί μια τυποποιημένη θεραπευτική προσέγγιση σε όλους τους ασθενείς, έχοντας ως βασικό άξονα τα θειαζιδικά διουρητικά^{18,19}. Οι Lagagh και συνεργάτες πρότειναν μια εναλλακτική προσέγγιση στην παραπάνω θεωρία που επικρατούσε εκείνη την εποχή, μέσα από προσπάθειες διαστρωμάτωσης των υπερτασικών ασθενών σε φαινοτύπους, με βάση τα επίπεδα του νατρίου, της ρενίνης και του ενδαγγειακού όγκου και αντιστοιχώντας τους με την ανταπόκριση στη θεραπεία^{20,21}. Παρότι αυτά τα ερευνητικά εγχειρήματα δεν υιοθετήθηκαν πλήρως στην κλινική πράξη, αντιπροσωπεύουν μια αρχική προσέγγιση στον φαινοτυπισμό με βάση τη φυσιολογία και τη βιοχημεία και προετοίμασαν το έδαφος για τις σύγχρονες εφαρμογές της ιατρικής της ακριβείας.

Οι σημαντικές εξελίξεις στον τομέα της γονιδιωματικής τις τελευταίες δεκαετίες, όπως η καταγραφή της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) και χιλιάδων γενετικών πολυμορφισμών (HarMap Project), καθώς και ο

σχεδιασμός μελετών γενετικής συσχέτισης σε γονιδιωματική κλίμακα (Genome-Wide Association Studies, GWAS), δημιούργησαν νέες προδοκίες για εφαρμογή της ιατρικής της ακριβείας στην ΑΥ^{22,23}. Αξιοσημείωτες GWAS και μετα-ανάλυσεις αυτών έχουν δημοσιευθεί και προσδιορίζουν νέους γενετικούς τόπους που σχετίζονται με τη ρύθμιση της ΑΠ ή με τον κίνδυνο εμφάνισης ΑΥ, προσφέροντας νέες πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την παθοφυσιολογία της ΑΥ²⁴⁻²⁶. Ωστόσο, η μελέτη των αλληλουχιών του γονιδιώματος δεν υπολογίζει την επίπτωση της περιβαλλοντικής έκθεσης, του τρόπου ζωής και των ψυχοκοινωνικών παραμέτρων στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ΑΥ, ενώ η επίδραση των παραλλαγών του γονιδιώματος μπορεί να είναι μικρή και ο αριθμός των παραλλαγών σε κάθε άτομο μεγάλος²⁷.

ΠΡΩΤΕΩΜΙΚΗ

Πρωτεΐνες – Πρωτέωμα

Η λέξη πρωτεΐνη προέρχεται από την αρχαία ελληνική λέξη *πρωτεῖος*, η οποία ερμηνεύεται ως «αυτός που κατέχει την πρώτη θέση». Ο δυναμικός ρόλος των πρωτεϊνών στην υποστήριξη της ζωής έχει τεκμηριωθεί από τα αρχικά στάδια της βιολογικής έρευνας και μάλιστα ο Σουηδός χημικός Berzelius το 1838 χρησιμοποίησε αυτόν τον όρο για να περιγράψει τον σημαντικό ρόλο που κατέχουν τα μόρια αυτά στη ρύθμιση των πολύπλοκων λειτουργιών των κυττάρων²⁸.

Πράγματι, οι πρωτεΐνες είναι τα βασικά δομικά και λειτουργικά συστατικά του οργανισμού και είναι το αποτέλεσμα της έκφρασης των γονιδίων, αποτελώντας τη λειτουργική πληροφορία που εμπεριέχεται στο γονιδίωμα. Μετά την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι ερευνητικές προσπάθειες έχουν εστιαστεί στη μελέτη και στον προσδιορισμό του πρωτεώματος. Ο όρος πρωτέωμα προέκυψε ως γλωσσικό ανάλογο του γονιδιώματος και αναφέρεται στο σύνολο των πρωτεϊνών που εκφράζεται από το γονιδίωμα ή στο σύνολο των πρωτεϊνών που παράγεται από ένα κύτταρο σε μια χρονική στιγμή. Οι πρωτεΐνες μπορούν να τροποποιηθούν μέσα στα κύτταρα με την προσθήκη σακχάρων και λιπιδίων, να μεταβληθούν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, να υποστούν κυτταρικές μεταθέσεις ή να συντεθούν/αποδομηθούν ως απάντηση σε εσωτερικά ή εξωτερικά ερεθίσματα και σήματα. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν το πρωτέωμα δυναμικό, αντανακλώντας το άμεσο περιβάλλον στο οποίο μελετάται, και περισσότερο

πολύπλοκο σε σύγκριση με το γονιδίωμα και το μόριο mRNA. Συνεπώς, το πρωτέωμα αποτελεί ένα «στιγμιότυπο» του περιβάλλοντος των πρωτεϊνών μια δεδομένη στιγμή, εμφανίζει χρονική και εξαρτώμενη από εξωτερικούς παράγοντες δυναμική, ενώ διαφέρει ποσοτικά και ποιοτικά ανάμεσα σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και μεταξύ παθολογικών και φυσιολογικών κυττάρων²⁹⁻³⁰.

Η μελέτη του πρωτεώματος συνίσταται στην καταγραφή του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγονται από έναν οργανισμό, καθώς και στη διερεύνηση των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Η διαδικασία αυτή σε γενικές γραμμές παρουσιάζει μεγαλύτερες δυσκολίες σε σύγκριση με την αποκρυπτογράφηση του γονιδιώματος, λόγω της προαναφερθείσας πολυπλοκότητας και δυναμικότητας του πρωτεώματος, αλλά και του γεγονότος ότι κάθε γονίδιο μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πολλών πρωτεϊνών. Έτσι, οι πληροφορίες που διαθέτουμε από την καταγραφή του ανθρώπινου γονιδιώματος δεν επαρκούν για τη διαλεύκανση των χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών, αφού ένα μεγάλο ποσοστό των πρωτεϊνών του ανθρώπου πιστεύεται πως δεν έχει ταυτοποιηθεί και επιτελεί άγνωστες λειτουργίες³¹.

Πρωτεωμική ανάλυση

Η ιδέα της καθολικής ανάλυσης των πρωτεϊνών, με στόχο τη δημιουργία του άπλαντα των πρωτεϊνών του ανθρώπου διατυπώθηκε πάνω από 50 έτη πριν, ωστόσο οι πρώτες ερευνητικές προσπάθειες στον τομέα αυτό ξεκίνησαν τη δεκαετία του 1990³². Ο γενετιστής Marc Wilkins ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο πρωτεωμική ανάλυση το 1996, αναφερόμενος στο ερευνητικό πεδίο που αφορούσε τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του πρωτεώματος³³.

Συγκεκριμένα, η πρωτεωμική αφορά τον αναδυόμενο επιστημονικό κλάδο που ασχολείται με την ανάλυση, τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών σε ευρεία κλίμακα, με σκοπό τη δημιουργία ενός τρισδιάστατου χάρτη ταυτοποίησης της θέσης τους. Στο ευρύτερο φάσμα της πρωτεωμικής ανάλυσης περιλαμβάνονται αρκετά διαφορετικά πεδία έρευνας. Αυτά περιλαμβάνουν τη σύγκριση των δομών, των αλληλεπιδράσεων και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών, καθώς επίσης των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων και τις τροποποιήσεις που υφίστανται ως αποτέλεσμα παθολογικών καταστάσεων ή περιβαλλοντικών παραγόντων³⁴. Στόχους της πρωτεω-

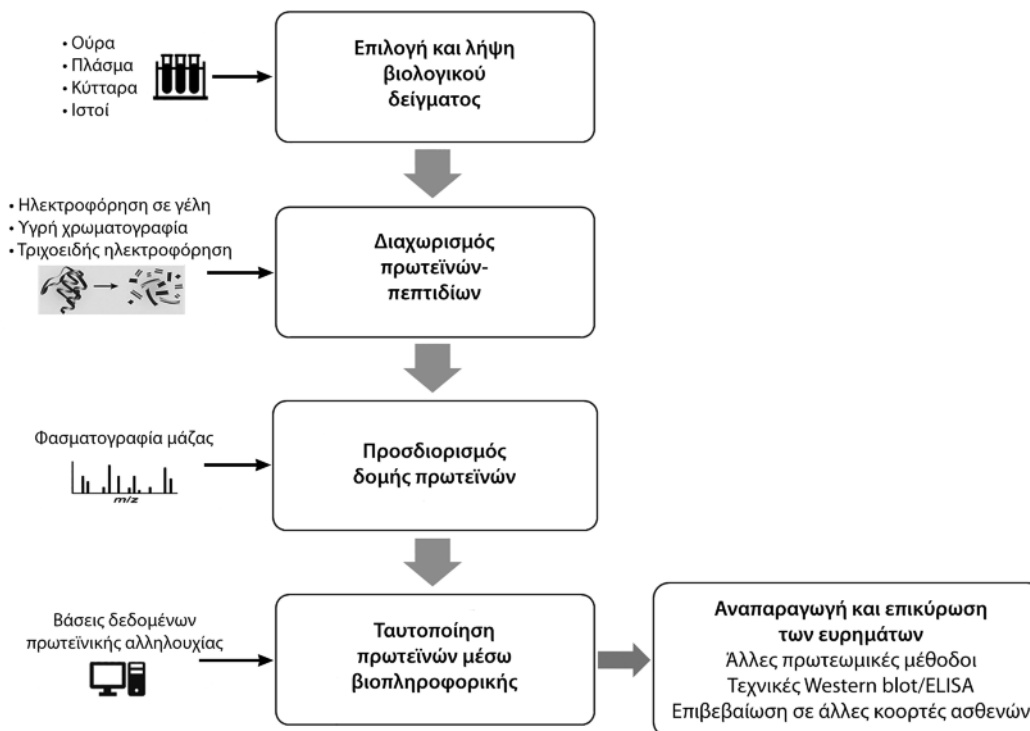
μικής αποτελούν η ανακάλυψη βιοδεικτών με προβλεπτική ικανότητα για διαγνωστικούς και προγνωστικούς σκοπούς και η χρησιμοποίηση των ευρημάτων σε μοριακό επίπεδο για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επιλογών, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και λιγότερες παρενέργειες³⁵.

Τεχνικές πρωτεωμικής ανάλυσης

Η πρωτεωμική ανάλυση περιλαμβάνει μία σειρά από βήματα και αναλυτικές τεχνικές με εξαιρετική ικανότητα στη μελέτη της λειτουργίας των πρωτεϊνών σε μεγάλη κλίμακα. Αυτά είναι: 1) η επιλογή και λήψη του υπό μελέτη βιολογικού δείγματος, 2) ο διαχωρισμός και η απομόνωση των πρωτεϊνών, 3) ο προσδιορισμός της δομής της πρωτεΐνης με σκοπό την ταυτοποίησή της και 4) η ανάλυση των δεδομένων με τη χρήση βάσεων δεδομένων βιοπληροφορικής^{34,36-40} (εικ. 1).

Πιο αναλυτικά, στο πρώτο στάδιο της διαδικασίας, τα δείγματα που επιλέγονται προς ανάλυση είναι συνήθως βιολογικά υγρά, κύτταρα και ιστοί, με τα ούρα και το πλάσμα να είναι αυτά που επιλέγονται συχνότερα, λόγω των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους που τα καθιστούν ιδανικά. Τα ούρα δεν απαιτούν επεμβατική δειγματοληψία, περιέχουν χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες που μπορούν να αναλυθούν χωρίς επιπλέον χειρισμούς, εμφανίζουν μεγάλη βιολογική σταθερότητα και δυνατότητα να φυλάσσονται αναλλοίωτα για μεγάλο χρονικό διάστημα, ωστόσο παρουσιάζουν μικρή συγκέντρωση πρωτεϊνών. Αντιθέτως, το πλάσμα παρουσιάζει μεγάλο εύρος συγκέντρωσης πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται είτε ελεύθερες είτε δεσμευμένες με αλβουμίνη, ωστόσο το μόριο αυτό είναι απαραίτητο να αφαιρεθεί πριν την ανάλυση, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη απώλεια πρωτεϊνών χαμηλής συγκέντρωσης (κυτοκίνες, πεπτιδικές ορμόνες, λιποπρωτεΐνες) από το δείγμα³⁴.

Στο στάδιο του διαχωρισμού των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι με σκοπό τη διάσπαση των πρωτεϊνικών συμπλόκων σε μεμονωμένα τμήματα, τη μετατροπή τους σε πεπτίδια με τη βοήθεια ενζύμων και τον καθαρισμό των πεπτιδίων. Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν την κλασική δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE), την υγρή χρωματογραφία (liquid chromatography, LC), την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (capillary electrophoresis, CE), καθώς και έναν συνδυασμό τεχνικών όπως η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.



Εικόνα 1. Τα στάδια της πρωτεωμικής ανάλυσης.

Η 2D-PAGE ήταν από τις πρώτες μεθόδους διαχωρισμού των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε και ήταν αυτή που συνέβαλε στη χαρτογράφηση των πρωτεϊνών του βακτηρίου *Escherichia coli*. Οι τεχνολογικές εξελίξεις και οι σημαντικοί περιορισμοί της μεθόδου στο εύρος ανίχνευσης πρωτεϊνών και ποσοτικοποίησής τους, είχε ως αποτέλεσμα την ανάδειξη νέων τεχνικών πρωτεϊνικού διαχωρισμού ηλεκτροφόρησης σε γέλη (DIGE, SDS-PAGE) και ηλεκτροφόρησης σε διάλυμα (CE και κυρίως η LC). Ειδικότερα, η CE και η LC μπορούν άμεσα να συνδυαστούν με φασματομετρία μάζας (CE-MS και LC/MS αντίστοιχα) για την ανίχνευση πεπτιδίων και πρωτεϊνών και την ταυτοποίησή τους μέσω βάσεων δεδομένων βιοπληροφορικής^{36,37}.

Μια από τις σημαντικότερες εξελίξεις στην τεχνολογία της πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η ανάπτυξη της φασματομετρίας μάζας (mass spectrometry, MS), η οποία συνέβαλε στον προσδιορισμό της δομής των πρωτεϊνών με σκοπό την περαιτέρω ταυτοποίησή τους σε ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων. Πρόκειται για μια ιδιαίτερα ευαίσθητη και μεγάλης ακρίβειας τεχνική ανάλυσης της μάζας και της χημικής δομής των πρωτεϊνών, η οποία επιτρέπει μεγάλης κλίμακας και υψηλής απόδοσης αναλύσεις για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και λειτουργική διερεύνηση του πρω-

τεώματος. Ο φασματογράφος μάζας αναλύει κάθε δείγμα βάσει του μοριακού βάρους και του ηλεκτρικού φορτίου (m/z ratio) και αποτελείται από 3 κύρια μέρη: την πηγή ιονισμού, τον αναλυτή μάζας που υπολογίζει το m/z ratio και τον ανιχνευτή, ο οποίος μετατρέπει τους ιονισμένους αναλύτες σε ηλεκτρικό σήμα, καθιστώντας δυνατή τη γραφική απεικόνιση του δείγματος. Οι συνηθέστερες τεχνικές ιονισμού είναι ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI) και ο ιονισμός με λέιζερ υποβοηθούμενος από υπόστρωμα (matrix assisted laser desorption ionization, MALDI), με την πρώτη τεχνική να συνδυάζεται εύκολα με τεχνολογίες υγρής χρωματογραφίας, οι οποίες προτιμώνται για ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Ο αναλυτής μάζας αποτελεί το κεντρικό τμήμα του φασματογράφου με τα συνηθέστερα είδη να είναι οι αναλυτές παγίδας ιόντων (ion trap, IT), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (time-of-flight, TOF), οι τετράπολοι αναλυτές (quadrupole, Q) και τα κύκλοτρον μετασχηματισμού Fourier (Fourier transform ion cyclotron, FT). Οι αναλυτές παγίδας ιόντων χαρακτηρίζονται από χαμηλό κόστος, αλλά μειωμένη ακρίβεια στον υπολογισμό μάζας, ενώ τα κύκλοτρον μετασχηματισμού Fourier χαρακτηρίζονται από μεγάλη ακρίβεια και δυναμικό εύρος, ωστόσο το υψηλό κόστος και η εξειδικευμένη

γνώση που απαιτείται για τη χρήση τους τα καθιστούν απαγορευτικά για πολλά εργαστήρια. Οι αναλυτές μάζας μπορούν επίσης να συνδυαστούν μεταξύ τους, ώστε να πραγματοποιηθεί φασματομετρία μάζας σε σειρά (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), μια τεχνική αρκετά διαδεδομένη πλέον, λόγω της υψηλής ακρίβειας που προσφέρει. Συνδυασμοί μεθόδων διαχωρισμού πρωτεϊνών με φασματομετρικές τεχνικές, έχουν καταστήσει δυνατή την ακριβή ταυτοποίηση μορίων σε χαμηλή συγκέντρωση, καθώς και την πρωτεωμική ανάλυση μικρών δειγμάτων. Η αναγνώριση των πρωτεϊνών μέσω της φασματομετρίας μάζας έδωσε μεγάλη ώθηση στην πρωτεωμική, σε τέτοιο βαθμό ώστε σήμερα αυτή να θεωρείται αλληλένδετη με τη φασματομετρία μάζας^{38,39}.

Το τελευταίο στάδιο της πρωτεωμικής ανάλυσης αφορά τη συγκέντρωση των πεπτιδίων που προσδιορίστηκαν από τις φασματομετρικές τεχνικές, με σκοπό την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών μέσω της τεχνολογίας της βιοπληροφορικής. Ένα μεγάλο μέρος της σύγχρονης βιοπληροφορικής ανάλυσης αφορά τις πρωτεΐνες, καθώς οι αλληλουχίες αμινοξέων των πρωτεϊνών παρουσιάζουν, πέρα από τη σημαντικότητά τους, μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στη δομή όσο και στη λειτουργία τους. Πλέον, υπάρχουν αρκετές βάσεις δεδομένων πρωτεϊνικών αλληλουχιών, όπως η UniProtKB (UniProt Knowledgebase), που περιέχουν εκτεταμένο κατάλογο πρωτεϊνικών αλληλουχιών, οι οποίες έχουν προκύψει από αυτόματη μετάφραση γονιδιωματικών αλληλουχιών ή από πειραματική αλληλούχιση πρωτεϊνών. Έτσι, είναι δυνατή η σύγκριση της μετρούμενης μάζας των πεπτιδίων που απομονώθηκαν με αντίστοιχες που είναι καταγεγραμμένες στη βάση δεδομένων, με σκοπό την ταυτοποίηση της πιο πιθανής πρωτεΐνης από την οποία προέρχονται τα συγκεκριμένα πεπτίδια. Οι βάσεις πρωτεϊνικών αλληλουχιών παρέχουν πληθώρα πληροφοριών σχετικά με τις πρωτεΐνες, που αφορούν τη δευτεροταγή δομή, τον βιολογικό ρόλο, τα βιοχημικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται, τους ιστούς στους οποίους εκφράζονται, τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, καθώς και συμπληρωματικά σχόλια όπως βιβλιογραφικές αναφορές⁴⁰.

Η πρωτεωμική στην ΑΥ

Μέχρι πρόσφατα αρκετοί ερευνητές είχαν μελετήσει τους παθογενετικούς μηχανισμούς της ΑΥ με τη βοήθεια των τεχνολογιών της γονιδιωματικής και της μεταβολομικής, ωστόσο η πρωτεωμική που αποτελεί τον ενδιάμεσο σύνδεσμο μεταξύ των δύο αυ-

τών επιστημών δεν έχει αξιοποιηθεί επαρκώς σε αυτή την προσπάθεια⁴¹. Οι περισσότερες ερευνητικές δραστηριότητες της πρωτεωμικής ανάλυσης στο πεδίο της ΑΥ έχουν γίνει σε πειραματικά ζωικά μοντέλα, ωστόσο τα τελευταία χρόνια, παράλληλα με την αλματώδη πρόοδο της τεχνολογίας οργάνων αυτοματοποιημένης ανάλυσης, έχουν αρχίσει να σχεδιάζονται κλινικές μελέτες πρωτεωμικής στον άνθρωπο⁴²⁻⁵⁶ (πίν. 1).

Η πλειοψηφία των μελετών πρωτεωμικής ανάλυσης στο φάσμα της ΑΥ αφορά την προεκλαμψία, καθώς είναι η πρώτη υπερτασική διαταραχή που μελετήθηκε με αυτή την τεχνολογία και για την οποία σχεδιάστηκαν κλινικές μελέτες⁴⁶⁻⁵². Η προεκλαμψία αποτελεί βασική αιτία μητρικού θανάτου κατά την εγκυμοσύνη και κύρια αιτία υποχρεωτικού πρόωρου τοκετού, ενώ παράλληλα η παθοφυσιολογία της παραμένει σε μεγάλο βαθμό προσδιοριστή και η διάγνωσή της μπορεί να είναι δυσχερής. Έτσι, η ανακάλυψη βιοδεικτών με προβλεπτική ικανότητα στη διάγνωση και στη διάκριση της προεκλαμψίας από άλλες υπερτασικές διαταραχές της κύησης, καθώς και στην παρακολούθηση της νόσου παραμένει ζωτικής σημασίας⁵⁷. Οι Buhimschi και συν. πραγματοποίησαν πρωτεωμική ανάλυση ούρων σε 284 γυναίκες, με σκοπό την ανάδειξη βιοδεικτών ικανών να διαγνώσουν την εμφάνιση προεκλαμψίας σε πρώιμο στάδιο. Αρχικά, μελέτησαν το πρωτόωμα 59 γυναικών με προεκλαμψία και στη συνέχεια επεδίωξαν να επικυρώσουν τα ευρήματα από το μοντέλο που δημιούργησαν προοπτικά σε 225 γυναίκες, με διαφορετικά επίπεδα κινδύνου για ανάπτυξη αυτής της κατάστασης. Διαπιστώθηκε πως οι γυναίκες με προεκλαμψία παρουσίαζαν ένα μοναδικό πρωτεωμικό αποτύπωμα στα ούρα τουλάχιστον 10 εβδομάδες πριν την εμφάνιση της διαταραχής, το οποίο αποτελούνταν από τμήματα των πρωτεϊνών Serine Protease Inhibitor A1 (SERPINA1) και αλβουμίνη. Το συγκεκριμένο πρωτεωμικό προφίλ μπορούσε να προβλέψει με μεγάλη ακρίβεια την εμφάνιση της διαταραχής και την ανάγκη για πρόωρο τοκετό, και επιπροσθέτως να τη διακρίνει από λοιπές υπερτασικές ή πρωτεϊνουρικές διαταραχές της κύησης. Η SERPINA1 έχει αντι-πρωτεολυτική δράση, ενώ έχει φανεί πως ακόμα και μικρές αυξήσεις στα επίπεδά της συνδέονται με ανάπτυξη ΑΥ, πιθανά μέσω αναστολής του συστήματος καλλιкреΐνης-κινίνης (KK) και ενεργοποίησης του συστήματος ρενίνης-αγγειοστενσίνης-αλδοστερόνης (PAA)⁴⁶. Σε άλλη μελέτη με σχεδιασμό ασθενών-μαρτύρων, προσδιορίστηκαν δύο πρωτεΐνες με προβλεπτική ακρίβεια >90%

Πίνακας 1. Ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά κλινικών μελετών πρωτεωμικής ανάλυσης στο φάσμα της ΑΥ

Συγγραφείς, Έτος δημοσίευσης	Σχεδιασμός μελέτης	Ερευνητικό πεδίο	Μέθοδος	Αριθμός συμμετεχόντων	Βιολογικό υλικό	Μελέτη επιτύχωσης	Επιλεγμένοι Βιοδείκτες
Matafoia και συν., 2014 ⁴²	Ασθενών-μαστούρων	Ιδιοπαθής ΑΥ	LC-MS/MS	74	Ούρα	+	Uromodulin, Nephritin 1
Gajjala και συν., 2017 ⁴³	Ασθενών-μαστούρων	Ιδιοπαθής ΑΥ	LC-MS	203	Πλάσμα	-	Phospholamban, Sarcophilin, Osteocalcin, Humanin, Nexilin, Palladin
Xu και συν., 2017 ⁴⁴	Ασθενών-μαστούρων	Ιδιοπαθής ΑΥ	LC-MS/MS	94	Πλάσμα	+	Cathepsin G, Transforming growth factor beta-1, Hyaluronidase-1, Kininogen-1
Martin-Lorenzo, 2019 ⁴⁵	Προοπτική	Ανθεκτική υπέρταση	LC-MS/MS	29	Ούρα	-	Haptoglobin, Haptoglobin-related protein
Buhimschi και συν., 2008 ⁴⁶	Προοπτική	Προεζλαμψία	SELDI-MS/MS	284	Ούρα	+	SERPINA1 fragments, Albumin fragments
Blumenstein και συν., 2009 ⁴⁷	Ασθενών-μαστούρων	Προεζλαμψία	LC-MS/MS	96	Πλάσμα	-	Fibrinogen γ chain, α-1-Antitrypsin (SERPINA3)
Carty και συν., 2011 ⁴⁸	Προοπτική	Προεζλαμψία	CE-MS	265	Ούρα	+	Fibrinogen alpha chain, Collagen alpha chain, Uromodulin fragments
Myers και συν., 2013 ⁴⁹	Προοπτική	Προεζλαμψία	MALDI-MS/MS	619	Πλάσμα	+	IGFALS, MCAM, Selenoprotein P, SPINT1, PIGF, sEng
Wang και συν., 2014 ⁵⁰	Ασθενών-μαστούρων	Προεζλαμψία	C Series 4000 protein array	324	Ούρα	+	Adipsin
Ciampa και συν., 2018 ⁵¹	Ασθενών-μαστούρων	Προεζλαμψία	SOMAscan assay	27	ENY	-	Activin A, Follistatin-related protein 3, tissue-type Plasminogen activator, Trypsin
Ding και συν., 2019 ⁵²	Ασθενών-μαστούρων	Προεζλαμψία	LC-MS/MS	28	Ούρα	+	Serotransferrin, Complement factor B, Paraoxonase/arylesterase 1
Araki και συν., 2011 ⁵³	Ασθενών-μαστούρων	Υπέρταση της ζήσης	LC-MALDI MS/MS	24	Πλάσμα	-	Kininogen-1, Fibrinogen-α, Complement component C4-A/B, α-2-HS-glycoprotein, inter-α-Trypsin inhibitor heavy chain H4
Guo και συν., 2019 ⁵⁴	Ασθενών-μαστούρων	Προεζλαμψία/ Υπέρταση της ζήσης	MALDI-TOF/ TOF MS	240	Ούρα	+	Albumin, α 1 Antitrypsin / L-PGDS, Perlecan
Kuznetsova και συν., 2012 ⁵⁵	Ασθενών-μαστούρων	Υπερτασική ΔΔΑΚ απειρογίας	CE-MS	70	Ούρα	+	Collagen alpha-1 (V), WW domain-binding protein 11, Collagen alpha-1 (XXXVI)
Swierczynska και συν., 2019 ⁵⁶	Ασθενών-μαστούρων	Προσπαθής υπερτασοερευνησιμότητας	MS	6	Ιστός	-	HSD3B2, CYP21A2, CYP11B2, RhoC, LSR, mTORC1

Συντομογραφίες: CE: Τυχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis), HSD3B2: 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta 5, IGFALS: Insulin-like Growth Factor binding protein Acid Labile Subunit, LC: Υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography), L-PGDS: Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase, LSR: Lipolysis-stimulated lipoprotein Receptor, MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MCAM: Melanoma cell adhesion molecule, MS: φασματογραφία μάζας (Mass Spectrometry), MS/MS: Tandem Mass Spectrometry, mTORC1: mammalian Target Of Rapamycin Complex 1, PIGF: Placental Growth Factor, RhoC: Rho-related GTP-binding protein, SELDI: Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization, SERPINA: SERPine Protease Inhibitor A1, SPINT1: Serine Peptidase Inhibitor Kunitz type 1, ΔΔΑΚ: Διαστολική Αυτολεπτογία Αριστερής Κοιλίας.

στην ταξινόμηση των γυναικών ως υψηλού κινδύνου για εμφάνιση προεκλαμψίας⁴⁷, ενώ οι Ding και συν. ανέδειξαν διαφορετικά εκφραζόμενες πρωτεΐνες ανάμεσα σε προεκλαμπτικές και νορμοτασικές έγκυες γυναίκες⁵². Οι πρωτεΐνες αυτές εμπλέκονται σε κοινούς παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, όπως η πήξη, τα ρυθμιστικά μονοπάτια του συμπληρώματος, το σύστημα PAA και η αναστολή της δράσης των πρωτεασών^{47,52}.

Τα τελευταία χρόνια, ακολουθώντας την ανάγκη για μεγαλύτερη κατανόηση της παθοφυσιολογίας της ΑΥ και τις συνεχείς τεχνολογικές εξελίξεις στις τεχνικές της πρωτεωμικής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκαν ορισμένες σημαντικές μελέτες στο πεδίο της ιδιοπαθούς, της δευτεροπαθούς και της ανθεκτικής ΑΥ^{42-45,55,56}. Οι Martin-Lorenzo και συν. διερεύνησαν τον ρόλο της πρωτεωμικής ανάλυσης ούρων στην ανάδειξη βιοδεικτών με προβλεπτική ικανότητα σε ασθενείς με ανθεκτική ΑΥ στους οποίους προστέθηκε σπειρονολακτόνη στην υπάρχουσα αντιυπερτασική αγωγή. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 29 ασθενείς οι οποίοι παρακολούθηθηκαν προοπτικά και ταξινομήθηκαν σε δύο ομάδες, βάσει της απόκρισης της ΑΠ μετά τη χορήγηση σπειρονολακτόνης. Μελετήθηκαν οι διαφορές του πρωτεώματος στα ούρα που συλλέχθηκαν πριν τη φαρμακευτική παρέμβαση, ενώ η ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με την τεχνολογία της υγρής χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας (LC-MS/MS) και η επικύρωσή τους με τη χρήση ELISA. Μεταξύ των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν, η Haptoglobin (HP) και η Haptoglobin-related protein (HPR) παρουσίασαν την πιο σημαντική διακύμανση ανάμεσα στις δύο ομάδες ασθενών, με αυξημένα επίπεδα αυτών να παρατηρούνται σε αυτούς που δεν ανταποκρίθηκαν στη χορήγηση της σπειρονολακτόνης. Η HP αποτελεί γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συμβάλλει στη δέσμευση της ελεύθερης Hb στο πλάσμα και εξουδετερώνει τις οξειδωτικές βλάβες, ενώ παρόμοιες δράσεις εμφανίζει και η HPR. Η HP ως πρωτεΐνη οξειάς φάσης έχει βρεθεί σε αυξημένα επίπεδα στη στεφανιαία νόσο, ενώ τα επίπεδά της στα ούρα έχει βρεθεί ότι μπορεί να προβλέψουν την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας πριν την εμφάνιση μακροάλβουμιουρίας, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II⁴⁵. Στη μελέτη των Gajjala και συν. πραγματοποιήθηκε συγκριτική ανάλυση σε μοριακό επίπεδο μεταξύ υπερτασικών ασθενών και υγιών μαρτύρων, με την εφαρμογή πρωτεωμικής ανάλυσης στο πλάσμα 203 ατόμων. Προσδιορίστηκαν συνολικά 27 μόρια με προβλεπτική ικανότητα στην εμφάνιση ΑΥ, εκ των

οποίων ταυτοποιήθηκαν 18 πρωτεΐνες με γνωστό ρόλο σε μηχανισμούς ρύθμισης της ΑΠ και με συμμετοχή σε παθογενετικά μοριακά μονοπάτια. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες Phospholamban και Sarcophilin σχετίζονται με τον μεταβολισμό του ασβεστίου και τον μηχανισμό της αγγειοσυστολής, οι Osteocalcin και Humanin εμπλέκονται στην αθηρογένεση και οι Nexilin και Palladin συμμετέχουν στην οργάνωση και ρύθμιση του κυτταροσκελετού⁴³. Μια πιλοτική μελέτη ανέδειξε διαφορές μεταξύ υπερτασικών ασθενών και νορμοτασικών στην έκφραση μιας σειράς πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται στους ορμονικούς άξονες PAA και ΚΚ ως ενδιάμεσα ή πρόδρομα μόρια. Συγκεκριμένα, βρέθηκε αύξηση της έκφρασης των πρωτεϊνών Cathepsin G, Transforming growth factor beta-1 και Hyaluronidase-1 στους υπερτασικούς σε σχέση με τους νορμοτασικούς. Αντίθετα, διαπιστώθηκε μείωση της συγκέντρωσης της Kininogen-1 στους υπερτασικούς, πρωτεΐνη η οποία αποτελεί πρόδρομο μόριο της βραδυκίνης⁴⁴. Πρωτεωμική ανάλυση σε ιστούς επινεφριδιακών αδενωμάτων ασθενών με πρωτοπαθή υπεραλδοστερονισμό, την πιο συχνή αιτία ενδοκρινικής ΑΥ, ανέδειξε αυξημένη παραγωγή ενζύμων και πρωτεϊνών που εμπλέκονται στους μηχανισμούς σύνθεσης των στεροειδών, στην πρόσληψη της χοληστερόλης, στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνας και σε άλλες μεταβολικές διεργασίες⁵⁶.

Μέσα από τις μελέτες πρωτεωμικής ανάλυσης έχουν ταυτοποιηθεί αρκετοί πρωτεϊνικοί βιοδείκτες οι οποίοι γνωρίζουμε πως σχετίζονται με διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς, όπως τα συστήματα PAA και ΚΚ, ο μεταβολισμός των λιπιδίων και άλλοι. Προοπτική επικύρωση των βιοδεικτών σε άλλες κοορτές είναι απαραίτητη ώστε να συμβάλλουν με αξιοπιστία στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών, στην ακριβέστερη θεραπεία και στην αποτελεσματικότερη παρακολούθηση ασθενών με υπερτασικές διαταραχές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κεντρικό ρόλο στην προσπάθεια για επίτευξη ιατρικής της ακριβείας διαδραματίζει η πρωτεωμική, ένας εξελισσόμενος επιστημονικός κλάδος που ασχολείται με τον προσδιορισμό και τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών που παράγεται από ένα βιολογικό σύστημα. Στόχος της είναι η ανεύρεση πρωτεϊνικών δεικτών με διαγνωστική ή προβλεπτική ικανότητα, σε βιολογικά υλικά ασθενών με υπερτασικές διαταραχές. Πέρα από τις αρχικές μελέτες σε ζωικά μοντέλα, τα τελευταία χρόνια έχουν πραγ-

ματοποιηθεί πιλοτικές, αλλά και ορισμένες μεγαλύτερης κλίμακας κλινικές μελέτες πρωτεωμικής ανάλυσης σε ασθενείς στο φάσμα της ΑΥ με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ιδιαίτερα στην προεκλαμψία, έχουν απομονωθεί αρκετές πρωτεΐνες που προέβλεψαν σε πρώιμο στάδιο την εμφάνιση προεκλαμψίας και την ανάγκη για πρόωρο τοκετό, αρκετές εκ των οποίων εμπλέκονται στους ορμονικούς άξονες ρύθμισης της ΑΠ. Αντίστοιχα, στην ιδιοπαθή και δευτεροπαθή ΑΥ προσδιορίστηκαν πρωτεϊνικοί δείκτες με ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές μεταξύ υπερτασικών και νορμοτασικών, με γνωστό ρόλο σε φυσιολογικούς και παθογενετικούς μηχανισμούς.

Η πρωτεωμική έχει δημιουργήσει νέες προοπτικές και προσδοκίες, ωστόσο η γνώση σχετικά με τον ρόλο της στη διερεύνηση της παθοφυσιολογίας, της διάγνωσης και της θεραπείας της ΑΥ είναι ακόμα αποσπασματική, συχνά αντιφατική και σε μεγάλο βαθμό ανεξερεύνητη. Τα αρχικά ευρήματα από τις κλινικές μελέτες είναι ενθαρρυντικά, ωστόσο η μετάφραση στην κλινική πράξη βρίσκεται σε πρώιμα στάδια και θα απαιτήσει προσέγγιση και συνεργασία μεταξύ διεπιστημονικών ομάδων με εξειδίκευση στην εργαστηριακή, κλινική και πληθυσμιακή έρευνα, καθώς και σε μεθόδους υπολογισμού και μοντελοποίησης. Περισσότερα δεδομένα από καλά σχεδιασμένες κλινικές μελέτες θα χρειαστούν, καθώς και επικύρωσή τους με διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης πρωτεϊνών και σε μεγαλύτερες κορτές ασθενών.

ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η Μονάδα Υπέρτασης της Α΄ Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ εδράζεται στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Ιπποκράτειο και αποτελεί αναγνωρισμένο «Κέντρο Αριστείας στην Υπέρταση» (Hypertension Excellence Center) από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Υπέρτασης (ESH). Στο πλαίσιο της πολυσχιδούς ερευνητικής της δραστηριότητας και με γνώμονα την επίτευξη ιατρικής της ακριβείας, έχει οργανώσει κλινικές μελέτες πρωτεωμικής, σε συνεργασία με την Ερευνητική Μονάδα Πρωτεωμικής του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ). Ειδικότερα, πραγματοποιούνται πρωτοποριακές μελέτες πρωτεωμικής ανάλυσης στο πεδίο της νεφρικής απονεύρωσης (renal denervation, RDN) για την ανάδειξη βιοδεικτών με προβλεπτική ικανότητα στην απόκριση της ΑΠ, με σκοπό την ακριβέστερη επιλογή των ασθενών που θα υποβληθούν σε RDN και επίτευξη βέλτιστων θεραπευτικών

αποτελεσμάτων. Επίσης, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διεξαγωγή μελέτης διερεύνησης του προβλεπτικού ρόλου της πρωτεωμικής σύρων στην απόκριση της ΑΠ σε διάφορες κατηγορίες αντιυπερτασικών φαρμάκων.

SUMMARY

D. Polyzos, S. Drozkaris, D. Konstantinidis, M. Makridakis, A. Vlahou, A. Miliou, F. Tatakis, P. Iliakis, C. Thomopoulos, D. Vlahakos, C. Tsioufis

Hypertension and precision medicine – the role of proteomics

Arterial Hypertension 2022; 31: 40-50.

Hypertension (HTN) is the most prevalent modifiable risk factor associated with cardiovascular morbidity and mortality, while its prevalence is rising globally, approaching to 40% of adults age 25 or older. Despite the availability of safe and effective antihypertensive medication, blood pressure control to guideline-recommended targets is not achieved in about 40% of treated patients. Precision medicine is an evolving medical model for disease prevention and tailored treatment that incorporates individual, genetic, environmental and experiential variability. Recent advances in omics technologies and bioinformatics, determine a key role to precision medicine strategy. The dynamic role of proteins to support life is documented since the initial stages of biological research, while the proteome can be defined as the overall protein content of a biological system. Proteomics is the large-scale study of the proteome, as well as the identification and quantification of these proteins, while the mass spectrometry is the core technology in proteomics. The ultimate goal of proteomics is to better comprehend the molecular complexity, while establishing diagnostic and therapeutic healthcare algorithms for the prevention and treatment of diseases and risk factors like HTN. A few proteomic studies in humans have been conducted the last decade in HTN field, including essential and secondary HTN, as well as preeclampsia. Several biomarkers with predictive role in prevention, diagnosis and treatment of hypertensive disorders have been emerged with known contribution in physiological and pathophysiological mechanisms.

Key-words: hypertension, precision medicine, proteomic analysis, biomarkers, mass spectrometry

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kitt J, Fox R, Tucker KL, McManus RJ. New Approaches in Hypertension Management: a Review of Current and Developing Technologies and Their Potential Impact on Hypertension Care. *Curr Hypertens Rep* 2019 Apr 25; 21(6): 44.
2. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* 2020 Apr; 16(4): 223-37.

3. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 2002 Dec 14; 360(9349): 1903-13.
4. Anderson AH, Yang W, Townsend RR, et al. Time-updated systolic blood pressure and the progression of chronic kidney disease: a cohort study. *Ann Intern Med* 2015 Feb 17; 162(4): 258-65.
5. Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. *JAMA* 2013 Sep 4; 310(9): 959-68.
6. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 2018 Oct; 36(10): 1953-2041.
7. Ng FL, Saxena M, Mahfoud F, Pathak A, Lobo MD. Device-based Therapy for Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2016 Aug; 18(8): 61.
8. Townsend RR, Mahfoud F, Kandzari DE, et al. Catheter-based renal denervation in patients with uncontrolled hypertension in the absence of antihypertensive medications (SPYRAL HTN-OFF MED): a randomised, sham-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet* 2017 Nov 11; 390(10108): 2160-70.
9. Azizi M, Schmieder RE, Mahfoud F, et al. Endovascular ultrasound renal denervation to treat hypertension (RADIANCE-HTN SOLO): a multicentre, international, single-blind, randomised, sham-controlled trial. *Lancet* 2018 Jun 9; 391(10137): 2335-45.
10. Turner ST, Schwartz GL, Boerwinkle E. Personalized medicine for high blood pressure. *Hypertension* 2007 Jul; 50(1): 1-5.
11. Loscalzo J. Precision Medicine. *Circ Res* 2019; 124(7): 987-9.
12. Antman EM, Loscalzo J. Precision medicine in cardiology. *Nat Rev Cardiol* 2016 Oct; 13(10): 591-602.
13. Leopold JA, Loscalzo J. Emerging Role of Precision Medicine in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2018 Apr 27; 122(9): 1302-15.
14. Sankar PL, Parker LS. The Precision Medicine Initiative's All of Us Research Program: an agenda for research on its ethical, legal, and social issues. *Genet Med* 2017 Jul; 19(7): 743-50.
15. Page IH. The mosaic theory of arterial hypertension — its interpretation. *Perspect Biol Med* 1967 Spring; 10(3): 325-33.
16. Guyton AC, Coleman TG, Granger HJ. Circulation: overall regulation. *Annu Rev Physiol* 1972; 34: 13-46.
17. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW Jr, Liard JF, Norman RA Jr, Manning RD Jr. Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension. *Ann Biomed Eng* 1972 Dec; 1(2): 254-81.
18. Report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. A cooperative study. *JAMA* 1977 Jan 17; 237(3): 255-61.
19. Freis ED. Reminiscences of the Veterans Administration trial of the treatment of hypertension. *Hypertension* 1990 Oct; 16(4): 472-5.
20. Laragh JH, Baer L, Brunner HR, Buhler FR, Sealey JE, Vaughan ED Jr. Renin, angiotensin and aldosterone system in pathogenesis and management of hypertensive vascular disease. *Am J Med* 1972 May; 52(5): 633-52.
21. Laragh JH. Vasoconstriction-volume analysis for understanding and treating hypertension: the use of renin and aldosterone profiles. *Am J Med* 1973 Sep; 55(3): 261-74.
22. Collins FS. Shattuck lecture — medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med* 1999 Jul 1; 341(1): 28-37.
23. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature* 2005 Oct 27; 437(7063): 1299-320.
24. Surendran P, Drenos F, Young R, et al. Trans-ancestry meta-analyses identify rare and common variants associated with blood pressure and hypertension. *Nat Genet* 2016 Oct; 48(10): 1151-61.
25. Ehret GB, Ferreira T, Chasman DI, et al. The genetics of blood pressure regulation and its target organs from association studies in 342,415 individuals. *Nat Genet* 2016 Oct; 48(10): 1171-84.
26. Liu C, Kraja AT, Smith JA, et al. Meta-analysis identifies common and rare variants influencing blood pressure and overlapping with metabolic trait loci. *Nat Genet* 2016 Oct; 48(10): 1162-70.
27. Kotchen TA, Cowley AW Jr, Liang M. Ushering Hypertension Into a New Era of Precision Medicine. *JAMA* 2016 Jan 26; 315(4): 343-4.
28. Hartley H. Origin of the word 'protein'. *Nature* 1951 Aug 11; 168(4267): 244.
29. Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH. Proteomics: Technologies and Their Applications. *J Chromatogr Sci* 2017 Feb; 55(2): 182-96.
30. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 2004 May 15; 103(10): 3624-34.
31. Altaelaar AF, Munoz J, Heck AJ. Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet* 2013 Jan; 14(1): 35-48.
32. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995 Jul; 16(7): 1090-4.
33. Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996; 13: 19-50.
34. Chandramouli K, Qian PY. Proteomics: challenges, techniques and possibilities to overcome biological sample complexity. *Hum Genomics Proteomics* 2009 Dec 8; 2009: 239204.

35. Lam MP, Ping P, Murphy E. Proteomics Research in Cardiovascular Medicine and Biomarker Discovery. *J Am Coll Cardiol* 2016 Dec 27; 68(25): 2819-30.
36. Carty DM, Schiffer E, Delles C. Proteomics in hypertension. *J Hum Hypertens* 2013 Apr; 27(4): 211-6.
37. Delles C, Carrick E, Graham D, Nicklin SA. Utilizing proteomics to understand and define hypertension: where are we and where do we go? *Expert Rev Proteomics* 2018 Jul; 15(7): 581-92.
38. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003 Mar 13; 422(6928): 198-207.
39. Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006 Feb; 4(4): 295-320.
40. Schmidt A, Forne I, Imhof A. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC Syst Biol* 2014; 8 Suppl 2(Suppl 2): S3.
41. Arnett DK, Claas SA. Omics of Blood Pressure and Hypertension. *Circ Res* 2018 May 11; 122(10): 1409-19.
42. Matafora V, Zagato L, Ferrandi M, et al. Quantitative proteomics reveals novel therapeutic and diagnostic markers in hypertension. *BBA Clin* 2014 Oct 22; 2: 79-87.
43. Gajjala PR, Jankowski V, Heinze G, et al. Proteomic-Biostatistic Integrated Approach for Finding the Underlying Molecular Determinants of Hypertension in Human Plasma. *Hypertension* 2017 Aug; 70(2): 412-9.
44. Xu JW, Li YL, Zhang SJ, Yang WQ, Nie WT, Jiang HQ. Quantitative Serum Proteomic Analysis of Essential Hypertension Using iTRAQ Technique. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 6761549.
45. Martin-Lorenzo M, Martinez PJ, Baldan-Martin M, et al. Urine Haptoglobin and Haptoglobin-Related Protein Predict Response to Spironolactone in Patients With Resistant Hypertension. *Hypertension* 2019 Apr; 73(4): 794-802.
46. Buhimschi IA, Zhao G, Funai EF, et al. Proteomic profiling of urine identifies specific fragments of SERPINA1 and albumin as biomarkers of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Nov; 199(5): 551.e1-16.
47. Blumenstein M, McMaster MT, Black MA, et al. A proteomic approach identifies early pregnancy biomarkers for preeclampsia: novel linkages between a predisposition to preeclampsia and cardiovascular disease. *Proteomics* 2009 Jun; 9(11): 2929-45.
48. Carty DM, Siwy J, Brennand JE, et al. Urinary proteomics for prediction of preeclampsia. *Hypertension* 2011 Mar; 57(3): 561-9.
49. Myers JE, Tuytten R, Thomas G, et al. Integrated proteomics pipeline yields novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Hypertension* 2013 Jun; 61(6): 1281-8.
50. Wang T, Zhou R, Gao L, et al. Elevation of urinary adipisin in preeclampsia: correlation with urine protein concentration and the potential use for a rapid diagnostic test. *Hypertension* 2014 Oct; 64(4): 846-51.
51. Ciampa E, Li Y, Dillon S, et al. Cerebrospinal Fluid Protein Changes in Preeclampsia. *Hypertension* 2018 Jul; 72(1): 219-26.
52. Ding W, Qiu B, Cram DS, et al. Isobaric tag for relative and absolute quantitation based quantitative proteomics reveals unique urinary protein profiles in patients with preeclampsia. *J Cell Mol Med* 2019 Aug; 23(8): 5822-6.
53. Araki Y, Nonaka D, Tajima A, et al. Quantitative peptidomic analysis by a newly developed one-step direct transfer technology without depletion of major blood proteins: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in pregnancy-induced hypertension. *Proteomics* 2011 Jul; 11(13): 2727-37.
54. Guo HX, Zhu YB, Wu CP, Zhong M, Hu SW. Potential urine biomarkers for gestational hypertension and preeclampsia. *Mol Med Rep* 2019 Apr; 19(4): 2463-70.
55. Kuznetsova T, Mischak H, Mullen W, Staessen JA. Urinary proteome analysis in hypertensive patients with left ventricular diastolic dysfunction. *Eur Heart J* 2012 Sep; 33(18): 2342-50.
56. Swierczynska MM, Betz MJ, Colombi M, et al. Proteomic Landscape of Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension* 2019 Feb; 73(2): 469-80.
57. Rana S, Lemoine E, Granger JP, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res* 2019 Mar 29; 124(7): 1094-112.