

УДК 616.12-008.331.1+615.22

Білки NP та NPR як предиктори відповіді на лікування спіронолактоном у пацієнтів із резистентною артеріальною гіпертензією

Резюме

На сьогодні, з огляду на значну поширеність артеріальної гіпертензії, в тому числі й резистентної, важливим є прогнозування відповіді пацієнтів із цим захворюванням на лікування спіронолактоном. У статті показано, що ідентифікація найбільш значущих білкових змін у сечі може допомогти спрогнозувати ефект спіронолактону при розвитку резистентної АГ.

Ключові слова: резистентна артеріальна гіпертензія, спіронолактон, прогнозування відповіді на терапію

Резистентна артеріальна гіпертензія (АГ) визначається як наявність артеріального тиску (АТ), що перевищує цільовий рівень, незважаючи на призначену терапію. Кількість пацієнтів із резистентною АГ невпинно зростає. Тривалий недостатній контроль АТ призводить до підвищення серцево-судинного ризику та пошкодження органів-мішеней. Серед різних антигіпертензивних засобів спіронолактон є оптимальним додатковим засобом для лікування резистентної АГ, коли потрібна терапія інгібітором ренін-ангіотензин-альдостеронової системи, блокатором кальцієвих каналів та діуретиком в адекватних дозах не дає результату. M. Martin-Lorenzo et al. провели дослідження, в якому аналізували зміни протеомного складу сечі, щоб визначити, чи можливо прогнозувати відповідь на терапію спіронолактоном в осіб з АГ. Отримані результати опубліковані у виданні *Hypertension* (2019; 73: 794-802).

Поширеність резистентної АГ, в тому числі псевдорезистентної, серед дорослих хворих складає близько 13 %, при цьому граничним є показник $\geq 140/90$ мм рт. ст. (Calhoun et al., 2008). Подальша частота розвитку серцево-судинних захворювань, термінальної хронічної ниркової недостатності та летальних наслідків зростає у 2–6 разів, порівняно із хворими на не резистентну АГ (Whelton et al., 2018). Ці дані підкреслюють важливість лікування резистентної АГ.

Спіронолактон – антагоніст альдостерону, який застосовують для лікування резистентної АГ, оскільки він здатний знижувати АТ на 22/10 і 9,8/1,0 мм рт. ст., за даними досліджень ASCOT та ASPIRANT відповідно (Charman et al., 2007; Vaclavik et al., 2011). Як свідчать наявні дані, спіронолактон продемонстрував ефективність як додатковий препарат до загальноприйнятої потрібної антигіпертензивної терапії. У випробуваннях ASCOT і ASPIRANT, та, згодом, у PATHWAY-2, спіронолактон виявився кращим, ніж плацебо або інші ліки для зниження АТ, а також найдієвішим засобом на додачу до потрібного лікування антигіпертензивними препаратами (Williams et al., 2015; Krieger et al., 2018).

Патофізіологія розвитку резистентної АГ достеменно не вивчена, а досліджень на молекулярному рівні бракує. Нещодавно, під час вивчення відповіді пацієнтів на різне фармакологічне лікування, було виявлено, що затримання солі в організмі є потенційним патофізіологічним станом, що зумовлює появу резистентної АГ. Це може пояснити позитивну дію спіронолактону через блокаду мінералокортикоїдних рецепторів (Pimenta et al., 2009; Williams et al., 2018).

M. Martin-Lorenzo et al. (2018) проаналізували метаболічні зміни у сечі, що лежать у основі резистентної АГ, перед використанням спіронолактону. Згідно з отриманими даними, цитратний цикл

змінювався найбільше, а за його доповнення специфічними метаболітами оксалоацетатом, малатом, цитратом та α -кетоглутаратом виявлено їх підвищений рівень у пацієнтів із резистентною АГ, які не відповіли на терапію (нереспондерів), порівняно з тими, хто відповів (респондерами). На додачу до отриманих результатів M. Martin-Lorenzo et al. (2019) дослідили молекулярні зміни при початковому зборі сечі (перед застосуванням препарату) на протеомному рівні з метою оцінити можливість прогнозування відповіді на лікування спіронолактоном у хворих на АГ.

Матеріали та методи дослідження

Вибірка пацієнтів

До проспективного дослідження було залучено 29 пацієнтів з АГ. Хворих на АГ вважали резистентними, якщо вони відповідали таким критеріям включення: вік ≥ 18 років та середні значення АТ за 24-годинного амбулаторного моніторингу $>130/80$ мм рт. ст. у разі приймання ≥ 3 препаратів в адекватних дозах. Особи із вторинною АГ були виключені з дослідження. Для визначення пацієнтів із резистентною АГ, які відповідатимуть на спіронолактон, проводили кількісний аналіз білків у зразках сечі, зібраних до лікування. Далі хворі отримували спіронолактон у дозуванні 25/50 мг/добу на додаток до попереднього антигіпертензивного лікування. Залежно від клінічної відповіді на спіронолактон з погляду контролю АТ пацієнтів класифікували на респондерів та нереспондерів.

Вимірювання АТ

Офісний АТ вимірювали за допомогою напівавтоматичного осцилометричного приладу після 5-хвилинного відпочинку в положенні сидячи. Показники АТ оцінювали як середнє значення трьох вимірювань. Далі 24-годинний амбулаторний моніторинг АТ виконували із застосуванням автоматичного неінвазивного осцилометричного пристрою, який реєстрував АТ через 20-хвилинні інтервали вдень та 30-хвилинні – вночі. Більшість вимірювань проводили у робочі дні, тож пацієнти мали підтримувати звичну щоденну активність і наступного ранку повертатися для зняття приладу. Денний та нічний періоди визначали індивідуально за повідомленнями хворих.

Визначення змін концентрації білків

Ідентифікацію білків та протеомний аналіз зразків сечі проводили за допомогою рідинної хроматографії – тандемною мас-спектроме-

трії (LC-MS/MS) із використанням ізобаричного маркування. Пептидний аналіз виконували методом обернено-фазової хроматографії LC-MS/MS із використанням ацетонітрилу в умовах градієнтного елюювання. Для ідентифікації білків використовували базу даних UniProt, що містить інформацію про послідовності протеїнів та дані щодо їхніх функцій, а також відношення правдоподібностей. Рівень помилково позитивних результатів (FDR) розраховували за допомогою інвертованих баз даних та вдосконаленого методу з додатковою фільтрацією (Navarro et al., 2009; Bonzon-Kulichenko et al., 2015).

Для підтвердження змін концентрації білків в усіх пацієнтів із резистентною АГ проводили цільовий аналіз методом ELISA та контроль селективних реакцій за допомогою LC-MS/MS (Gonzalez-Calejo et al., 2016; Martin-Lorenzo et al., 2017). Білки із позитивною регуляцією вивчали за допомогою аналізу збагачення за функціональною належністю FatiGO в обох групах. Також було проведено функціональну анотацію в термінах генної онтології (GO). Білки із FDR <0,05 розглядали як показники з високою концентрацією (Alonso et al., 2015; Smoot et al., 2011).

Статистичний аналіз

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми GraphPad Prism 6 (версія 6.01). Також був використаний непараметричний критерій Манна – Уїтні (95 % довірчий інтервал), а для визначення змін білків між групами – багатофакторний аналіз для оцінки можливості прогнозування відповіді на лікування (Xia et al., 2016).

Результати та їх обговорення

Прогнозування відповіді пацієнтів із резистентною АГ на лікування спіронолактоном

Згідно з отриманими даними, у групі респондерів після приймання спіронолактону 24-годинний амбулаторний систолічний АТ знизився на ≥ 20 мм рт. ст. (або досяг рівня ≤ 130 мм рт. ст.), порівняно з нереспондерами (зниження на 2,6 мм рт. ст.).

На першому етапі дослідження при аналізі зразків сечі за допомогою методу LC-MS/MS із використанням ізобаричного маркування серед 3310 ідентифікованих білків найзначніші зміни були виявлені для гаптоглобіну (HP) та білка, який кодується однойменним геном (HPR). Це свідчило про підвищення показників у зразках сечі, зібраних до лікування, у групі нереспондерів, порівняно із респондерами. Позитивну кореляцію зі співвідношенням альбуміну/креатиніну було виявлено як для HP ($r=0,3735$), так і для HPR ($r=0,5684$).

Зміни концентрацій білків HP та HPR у сечі пацієнтів з резистентною АГ, які відповідали та не відповідали на терапію спіронолактоном, залежно від проведених аналізів, представлені на рисунку 1 та у таблиці 1.

За допомогою тандемної LC-MS/MS вміст білка оцінювали через середні значення Zq. За допомогою методу ELISA визначали концентрацію відносно креатиніну.

Зміни білків у зразках сечі пацієнтів із резистентною АГ

Зміни білків із позитивною регуляцією у респондерів та нереспондерів оцінювали за допомогою аналізу FatiGO. Відповідно до аналізу, у групі респондерів мали місце такі значущі біологічні процеси як клітинна відповідь на окиснювальний стрес, метаболізм нікотинамідаденідинуклеотидфосфату, хронічна запальна

реакція, катаболізм глюкози, регулювання фактора транскрипції NF- κ B тощо. Також спостерігалася зміна білків анексину A1, каталази, α / β -субодиниці гемоглобіну, мієлопероксидази, 6-фосфоглюконатдегідрогенази, фосфоліпази A2, пероксиредоксину 2, S100-A12, S100A7, S100A8, S100A8, S100A9, S100A8, S100A9, S100A8, S100A9 та тіоальдоксинази.

У нереспондерів був виявлений підвищений рівень білків, як-от α_2 -глікопротеїн, альбумін, компоненти C8, C9 і фактор В системи комплементу, легкий ланцюг феритину, HP, гемопексин, гістидин-багатий глікопротеїн, фактор росту ендотелію судин 2-го типу, афадин, муцин-6, напсин A, α_1 -кислий глікопротеїн 1, ORM2, індукований пролактином білок, плазміноген, α_1 -антитрипсин та серотрансферин. Це вказувало на виражені патофізіологічні процеси, такі як регуляція згортання крові, активація комплементу, гостра запальна імунна відповідь, сигнальний шлях фактора росту ендотелію судин, гомеостаз заліза та регуляція фокальних спайок, що відбувалися у даній групі.

У процесі дослідження концентрація білків HP та HPR змінювалася найбільшою мірою, що вказувало на міжгрупові відмінності у зразках сечі до лікування спіронолактоном. Було вперше показано додаткову цінність співвідношення HP та креатиніну в прогнозуванні відповіді пацієнтів із резистентною АГ на спіронолактон. HP та HPR мають високу спорідненість до вільного гемоглобіну (Hb), внаслідок чого формуються комплекси HP-Hb та HPR-Hb. Однак HP-Hb демонструє високу афінність до рецептора поглиначів CD163, тоді як HPR-Hb – до часток ліпопротеїнів високої щільності (Nielsen et al., 2006). Ці процеси по-різному сприяють імунній відповіді, зокрема, у даному випробуванні її активацію показано у хворих на резистентну АГ.

Патологічне вивільнення Hb у крові призводить до запального та оксидативного пошкодження. У кількох дослідженнях продемонстровано позитивну кореляцію між рівнем Hb та АГ як у чоловіків, так і жінок (Atsma et al., 2012; Lee et al., 2015). HP завдяки своїм властивостям усуває вільний Hb та нейтралізує оксидативне пошкодження (Maskellar et al., 2016; Levy et al., 2010).

Подібно до альбуміну, підвищена проникність клубочків може зумовлювати вищий рівень HP у сечі хворих, які не відповідають на спіронолактон. У цьому контексті HP і HPR позитивно корелюють зі співвідношенням альбуміну та креатиніну. Це вказує на те, що у хворих, які не відповідають на лікування спіронолактоном, спосте-

Таблиця 1. Зміни концентрації білків HP та HPR на етапах виявлення та підтвердження

	РАГр	РАГнр	Значення ΔZq	Значення p
Виявлення				
Середнє значення Zq				
HP	-2,59	3,39	5,98	0,00279
HPR	-3,65	4,17	7,83	0,00009
Підтвердження				
Концентрація (мкг/г креатиніну)				
HP	163,6	430,4		0,0046
HPR	8,51	34,47		0,0051

Примітки: РАГр – респондери, РАГнр – нереспондери, Zq – логарифмічне співвідношення білків (\log_2), виражене як стандартизовані змінні.

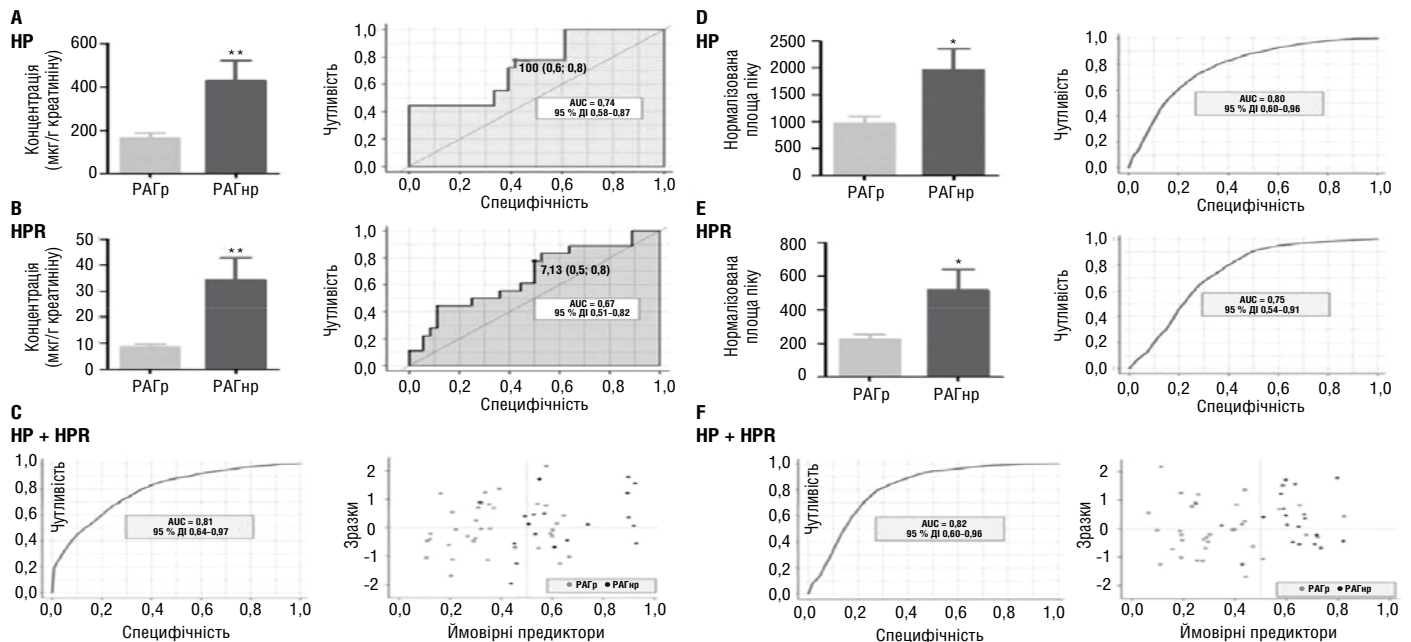


Рис. 1. Зміни білків HP та HPR у сечі пацієнтів із резистентною АГ, які відповіли та не відповіли на терапію спіронолактоном

Примітки: РАГр – респондери; РАГнр – нереспондери; AUC – площа під кривою; SRM – контроль селективних реакцій; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

A) Визначення рівня HP за допомогою аналізу ELISA та робочої характеристики приймача (ROC). B) Визначення рівня HPR за допомогою аналізу ELISA та ROC-кривої. C) Комбінована ROC-крива та графік ймовірних білків-предикторів за даними ELISA, що вказує на значну різницю між РАГр і РАГнр. D) Визначення рівня HP за допомогою SRM-LC/MS/MS та ROC-кривої. E) Визначення рівня HPR за допомогою SRM-LC/MS/MS та ROC-кривої. F) Комбінована ROC-крива та графік ймовірних білків-предикторів за даними SRM-LC/MS/MS, що вказує на значну різницю між РАГр і РАГнр. Усі аналізи проводили на зразках сечі, взятих до лікування.

рігається раннє пошкодження функції нирок, а саме підвищена проникність гломерулярного бар'єра. Своєю чергою це асоційовано з поганою відповіддю АТ на спіронолактон в осіб із резистентною АГ (Ruilore, 2011).

Висновки

У дослідженні M. Martin-Lorenzo et al. (2019) були вперше виявлені зміни концентрації білків у сечі пацієнтів з резистентною АГ. Дане випробування не мало рандомізованого контрольованого дизайну, але представляло рутинну клінічну практику ведення пацієнтів із резистентною АГ відповідно до сучасних рекомендацій. Протеомний аналіз та мас-спектрометрія забезпечили

неупереджений підхід до кількісного виявлення найбільш значущих білкових змін у сечі як відображення патофізіології резистентної АГ у хворих, що відповіли на лікування спіронолактоном. Серед ідентифікованих білків HP та HPR продемонстрували найбільші зміни у початкових зразках сечі хворих, що відповіли на терапію спіронолактоном, порівняно з тими, хто не відповів на неї. Завдяки цьому було показано здатність даних показників прогнозувати ефект спіронолактону при розвитку резистентної АГ. Отримані висновки мають чимале значення у контролі таких пацієнтів та відкривають нові горизонти для досліджень методів лікування резистентної АГ.

Список літератури знаходиться в редакції

Резюме

Белки HP и HPR как предикторы ответа на лечение спиронолактоном у пациентов с резистентной артериальной гипертензией

На сегодня, учитывая значительную распространенность артериальной гипертензии, в том числе и резистентной, важным является прогнозирование ответа пациентов с этим заболеванием на лечение спиронолактоном. В статье показано, что идентификация наиболее значимых белковых изменений в моче может помочь спрогнозировать эффект спиронолактона при развитии резистентной АГ.

Ключевые слова: резистентная артериальная гипертензия, спиронолактон, прогнозирование ответа на терапию

Summary

HP and HPR proteins as predictors of response to spironolactone treatment in patients with resistant hypertension

Today, given the high prevalence of hypertension, including resistant hypertension, it is important to predict the response of patients with this disease to treatment with spironolactone.

Key words: resistant hypertension, spironolactone, prediction of response to therapy

Підготовлено ТОВ «Медікс груп»