

КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ПИЛОТНОЕ ПАНОРАМНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕОМА МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАЗЛИЧНЫМИ МРТ-ТИПАМИ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ МИКРОАНГИОПАТИИ

А.А. Гейнц^{1*}, П.С. Шлапакова¹, Л.А. Добрынина¹, Е.И. Кремнева¹, Е.В. Хряпова², В.Г. Згода², О.В. Тихонова²

¹Российский центр неврологии и нейронаук,

125367, Москва, Волоколамское шоссе, 80; *эл. почта: gejnts.a.a@neurology.ru

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10

Возраст-зависимая церебральная микроангиопатия (ЦМА), ассоциированная с сосудистыми факторами риска, является одной из основных причин когнитивных расстройств и инсультов. Сложности изучения ЦМА обусловлены ограничениями в визуализации мелких сосудов, диагностикой на основании МРТ-признаков поражения вещества головного мозга (гиперинтенсивность белого вещества, лакуны, микрокровоизлияния и др.). Проведённая нами ранее оценка каждого из МРТ-признака ЦМА по четырёхбалльной системе выраженности и распределению по отделам мозга при кластерном анализе установила существование двух МРТ-типов, не отличающихся по выраженности сосудистых факторов риска, но имеющих различия в тяжести клинических проявлений и уровне циркулирующих биомаркеров плазмы крови. В данной работе проведено пилотное панорамное исследование протеома мононуклеаров периферической крови для пациентов с первым и вторым МРТ-типами ЦМА, а также здоровых добровольцев. У пациентов с ЦМА выявлена тенденция к снижению уровня белков, ассоциированных с везикулярным трафиком и ремоделированию внеклеточного матрикса (ВКМ), относительно нормы. У пациентов с первым МРТ-типом ЦМА выявлены тенденции к недостаточной активации защитных белков (аргиназа-1, тиоредоксин, регуляторы аутофагии и белкового стресса) при чрезмерной активации тромбоцитарных белков и регуляторов ремоделирования сосудистой стенки (таких как профилин-1) по сравнению со вторым МРТ-типом. Полученные результаты указывают на необходимость изучения микроструктуры базальной мембраны, ВКМ сосудистой стенки и периваскулярных пространств для церебральных мелких сосудов.

Ключевые слова: церебральная микроангиопатия; болезнь мелких сосудов головного мозга; протеомные исследования; магнитно-резонансная томография; STRIVE-критерии; масс-спектрометрия белков

DOI: 10.18097/PBMCR1643

ВВЕДЕНИЕ

Церебральная микроангиопатия (ЦМА, син. церебральная болезнь мелких сосудов, англ. cerebral small vessel disease) является причиной более чем 25% ишемических инсультов, большинства спонтанных внутримозговых кровоизлияний, до 45% случаев деменции, а также нарушений ходьбы и эмоциональных расстройств в старшем и пожилом возрасте [1–6].

Развитие ЦМА связано с поражением мелких сосудов головного мозга — перфорирующих артериол, венул и капилляров, участвующих в формировании НВЕ и ГЭБ. Классические представления о ЦМА основываются на ведущей патогенетической роли АГ, приводящей к артериолосклерозу и ишемии головного мозга [7–13]. Однако терапевтическая стратегия, направленная на контроль АГ, показала

сомнительные преимущества в отсроченном поражении мозга при ЦМА [12]. Наблюдается рост числа случаев ЦМА без АГ и смешанных с нейродегенерацией форм [14–17].

В 2013 году были предложены диагностические МРТ-критерии STRIVE (STAndards for ReportIng Vascular changes on nEuroimaging, стандарты для описания сосудистых изменений на нейровизуализации), соответствующие основным патоморфологическим признакам поражения мелких сосудов головного мозга при ЦМА (ГИБВ, малые субкортикальные инфаркты, лакуны, расширенные периваскулярные пространства, церебральные микрокровоизлияния и атрофия головного мозга) [2]. STRIVE-критерии открыли возможности для проспективных исследований ЦМА на популяционном уровне, но не продемонстрировали корреляции с тяжестью клинических проявлений [18].

Принятые сокращения: ARSA – арилсульфатаза А; GALNS – N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза; IGF – J-цепь иммуноглобулинов; LFQ – label-free quantification; LRG1 – богатый лейцином альфа-2-гликопротеин; SORL1 – сортилин-родственный рецептор; SYTL4 – синаптоагмин-подобный белок 4; TIMP2 – ингибитор металлопротеиназ 2; TXN – тиоредоксин; АГ – артериальная гипертензия; ВКМ – внеклеточный матрикс; ГИБВ – гиперинтенсивность белого вещества; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НВЕ – нейроваскулярная единица; ЦМА – церебральная микроангиопатия.



© 2026 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

Эти наблюдения стимулировали научное сообщество продолжить изучение патогенеза ЦМА с использованием современных молекулярно-генетических методов. За последнее десятилетие для большинства STRIVE-критериев проведены популяционные исследования генетических полиморфизмов и паттернов экспрессии генов [19]. Подробно изучены функции по меньшей мере 15 генов, ассоциированных с наследственными формами ЦМА (до 5% случаев) [20]. Продемонстрированы доказательства высокого значения в развитии ЦМА неишемических механизмов, сопряжённых с нарушением работы НВЕ — эндотелиальной дисфункции, повышенной проницаемости ГЭБ, нейровоспаления, глимфатической дисфункции и нейродегенерации, изменения молекулярного состава и архитектоники ВКМ [21, 22]. Эти процессы также активно вовлечены в развитие когнитивных расстройств [6, 23, 24]. Однако уточнённые патогенетические механизмы не привели к разработке патогенетической терапии ЦМА [25].

Мультиомиксные технологии, такие как массивное параллельное секвенирование нуклеиновых кислот и масс-спектрометрия белков, используют для изучения возраст-зависимой ЦМА в несправедливой степени меньше, чем для нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Секвенирование РНК отдельных клеток позволило выявить у пациентов с развернутыми стадиями ЦМА уникальную популяцию эндотелиальных клеток с фенотипом преждевременного старения, причём как в поражённом, так и в неизменённом белом веществе [26]. Установлена корреляция между объёмом ГИБВ и скоростью биологического старения, рассчитанного по профилю метилирования CpG-островков генома [27, 28].

Протеомные исследования ЦМА носят единичный характер. Анализ профиля экспрессии плазменных белков у более чем 800 пациентов с ЦМА выявил изменение экспрессии белков, преимущественно обладающих пептидазной активностью, локализованных в ВКМ или везикулах, вовлечённых в воспаление, гемостаз, транспорт и метаболизм компонентов IGF-сигналинга, а также организацию ВКМ [29, 30]. Протеомное исследование спинномозговой жидкости у более чем 850 пациентов с различными МРТ-признаками ЦМА (ГИБВ, лакуны, микрокровоизлияния) выявило значимую ассоциацию ГИБВ с повышением уровня матриксных металлопротеиназ (в частности, MMP12), эластана и белков коллагена в спинномозговой жидкости ещё на ранних стадиях ЦМА [31].

Существует ряд ограничений, препятствующих эффективному трансляционному переходу к разработке экспериментальной патогенетической терапии ЦМА. Дизайны молекулярно-генетических исследований ограничены в результативности и воспроизводимости из-за отсутствия стандартных подходов к сопоставлению получаемых данных с количественным и пространственным распределением сочетанных МРТ-признаков ЦМА, особенно на поздних стадиях заболевания. Однако в последних популяционных

исследованиях было замечено, что многократный прирост числа значимых генетических полиморфизмов выявляется при разделении МРТ-признаков ЦМА по локализации, например на глубокую и перивентрикулярную ГИБВ [32], на лобарные и глубокие МКИ [33], расширенные периваскулярные пространства в белом веществе и базальных ганглиях [34].

Ранее нами было предложено уточнение форм ЦМА на основе распределения по отделам головного мозга и выраженности по четырёхбалльной системе её МРТ-признаков [35]. На выборке из почти 100 случаев ЦМА в развёрнутой стадии, характеризующейся распространённой сливной ГИБВ (стадия Fazekas 3), на основании кластерного иерархического агломеративного анализа и итерационного алгоритма k-средних МРТ-данные пациентов были разделены на МРТ-тип 1 и МРТ-тип 2 [35]. Два варианта не имели статистически значимых различий в представленности и тяжести сосудистых факторов. Мы продемонстрировали, что МРТ-тип 1 характеризуется более выраженной перивентрикулярной ГИБВ, множественными лакунами и микрокровоизлияниями, атрофией коры головного мозга, а также более тяжёлым спектром клинических проявлений (выраженные когнитивные расстройства и нарушения ходьбы) и более молодым возрастом. При МРТ-типе 2 гиперинтенсивность глубокого и юкстакортикального белого вещества сочеталась с единичными лакунами без микрокровоизлияний и атрофии коры, а также более мягкими клиническими проявлениями и была старше. На основании исследований методом ИФА показателей плазмы крови, ассоциированных с поражением сосудистой стенки и мозга, а также МРТ-исследований патофизиологических механизмов — проницаемости ГЭБ с помощью T1-динамического контрастирования, пульсативных свойств сосудов и соотношения гидросред мозга (венозного и артериального кровотока и ликворотока) — было установлено, что в формировании МРТ-типа 1 доминирующую роль играет ишемия и истощение ангиогенеза, а при МРТ-типе 2 основным патогенетическим фактором является нарушение проницаемости ГЭБ и хроническое воспаление [35].

Мультиомодальная валидация данного подразделения развёрнутых стадий ЦМА на МРТ-типы предполагает поиск дифференцирующих молекулярно-генетических сигнатур. В данной статье представлены результаты пилотного исследования по установлению ассоциаций между профилем экспрессии белков мононуклеарных клеток периферической крови и двумя основными МРТ-типами возраст-зависимой ЦМА.

МЕТОДИКА

Описание выборки

В исследовании участвовали 6 пациентов с церебральной микроангиопатией (3 мужчины и 3 женщины в возрасте $64 \pm 8,8$ лет) и

3 здоровых добровольца (1 мужчина и 2 женщины в возрасте $64 \pm 8,5$ лет). При МРТ-исследовании на магнитно-резонансном томографе с величиной магнитной индукции 3 Тл (“Siemens Healthineers AG”, Германия) оценивали МРТ-признаки ЦМА и исключали наличие иных МРТ-изменений. У всех пациентов с ЦМА МРТ-признаки соответствовали критериям STRIVE и носили выраженный характер (ГИБВ в стадии Fazekas 3, лакуны, микрокровоизлияния). В соответствии с разработанным нами методом определения МРТ-типов ЦМА [32], трое пациентов с ЦМА были отнесены к МРТ-типу 1 (2 мужчины и 1 женщина в возрасте $64 \pm 9,6$ лет), а трое пациентов — к МРТ-типу 2 (1 мужчина и 2 женщины в возрасте $65 \pm 10,0$ лет). У здоровых добровольцев не было отмечено патологических МР-признаков. Критериями невключения в исследование были: перенесённый субкортикальный инфаркт в течение последних 3 месяцев, перенесённый геморрагический или ишемический инсульт (не лакунарный); кардиальная патология со снижением фракции выброса $< 50\%$, атеросклеротический стеноз брахиоцефальных артерий $> 50\%$, хроническая болезнь почек с СКФ < 30 мл/мин, декомпенсированный сахарный диабет 2 типа, нарушение функций щитовидной железы без эутиреоза, онкологические заболевания, перенесённое инфекционное или острое соматическое заболевание, оперативное вмешательство в течение последнего месяца.

Пробоподготовка образцов

Забор крови производили утром натощак в ЭДТА-вакутейнеры. Полученные образцы хранили при температуре 4°C не более 5 ч. Выделение лейкоцитов производили из 400 мкл свежей периферической крови после двукратной промывки холодной водой без РНК-аз и двукратной промывки холодным PBS (в режиме центрифугирования 3 мин при 500 g). Клеточный осадок хранили в буфере, содержащем 2% SDS в 100 мМ триэтиламмоний бикарбонате (ТЭАБ, “Fluka Analytical”, Швейцария), pH 8,5, при температуре -20°C .

После размораживания к каждому образцу в объёме 50 мкл добавляли по 50 мкл раствора, содержащего 10% SDS в 100 мМ триэтиламмоний-бикарбонатном буфере (ТЭАБ, “Fluka Analytical”) до конечной концентрации 5% SDS и 50 мМ ТЭАБ (pH 8,5). Полученные растворы подвергали обработке с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls (“BANDELIN Electronic GmbH & Co.”, Германия) (мощность 30%) в течение 30 с на льду, после чего образцы центрифугировали при 10000 g в течение 3 мин при 4°C .

Для гидролитического расщепления белков трипсином (“Promega”, США) использовали спин-колонки S-trap (“Protifi”, США) в соответствии с рекомендациями производителя, как описано ранее [36]. Полученный супернатант (триптический гидролизат) высушивали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия). Концентрацию пептидов определяли

колориметрическим методом при помощи набора Pierce Quantitative Colorimetric Peptide Assay kit (“Pierce”, США) согласно рекомендациям производителя. После этого пептиды высушивали, растворяли в 0,1% муравьиной кислоте до концентрации 1 мкг/мкл и передавали на хромато-масс-спектрометрический анализ.

Панорамный хромато-масс-спектрометрический анализ

Анализ полученных гидролизатов проводили в трёх технических повторах для каждого образца с использованием системы УВЭЖХ Ultimate 3000 RSLC-nano (“Thermo Scientific”, США), сопряжённой с масс-спектрометром высокого разрешения Q Exactive HF-X Quadrupole-Orbitrap (“Thermo Scientific”). Образцы наносили в равном количестве (по 2 мкл) на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn ($0,5 \text{ мм} \times 3 \text{ мм}$, диаметр частиц 5 мкм) (“Thermo Scientific”) и промывали подвижной фазой С (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты в деионизованной воде) со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 4 мин в изократическом режиме. Далее пептиды разделяли на ВЭЖХ колонке PeakyEfficiency (FE 100 мкм \times 30 см, 1,9 мкм размер частиц) (“Молекта”, Россия) в градиентном режиме элюирования. Градиент формировали подвижной фазой А (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой В: (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиной кислоты) при скорости потока 0,3 мкл/мин. Колонку промывали 2% подвижной фазой В в течение 4 мин, после чего линейно увеличивали концентрацию подвижной фазы В до 35% за 74 мин, затем линейно увеличивали концентрацию фазы В до 99% за 2 мин, после 5 мин промывки при 99% буфера В, концентрацию этого буфера линейно снижали до исходных 2% за 3 мин. Общая длительность анализа составляла 90 мин.

Масс-спектрометрический анализ проводили в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (“Thermo Scientific”). Для масс-спектрометрического анализа были установлены следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2,1 кВ, температура капилляра 240°C . Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 450 m/z до 1500 m/z , при разрешении 60000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора. Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено не более 20, при этом граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа была установлена 500000 единиц, а нормализованная энергия соударения (NCE) была равна 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядному состоянию. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 110 мс. Величину AGC

для прекурсоров и фрагментных ионов устанавливали 1×10^6 и 2×10^5 соответственно. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 90 с. Коммерчески доступный гидролизат цитохрома *c* (Dionex™ Cytochrome C Digest, “Thermo Scientific”) использовали для контроля качества хромато-масс-спектрометрического анализа.

Идентификация белков и анализ данных панорамного протеомного анализа

Для 9 образцов с целью идентификации белков и расчёта показателя LFQ для их количественной оценки было использовано программное обеспечение MaxQuant (version 2.0.3.0, Max Planck Institute of Biochemistry, Германия) со встроенным алгоритмом Andromeda [37] с использованием файла FASTA, содержащего аминокислотные последовательности белков человека (протеом UP000005640, 15.05.2023) и его инвертированного аналога для вычисления частоты ложноположительных идентификаций (FDR). При идентификации белков были заданы следующие поисковые параметры: расщепляющий фермент — трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов — $\pm 4,5$ ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS — ± 20 ppm, возможность пропуска одного сайта расщепления трипсином. Окисление метионинов, ацетилирование N-конца белка и карбамидометилирование цистеина были учтены как возможные и обязательная модификация пептидов соответственно. Опция “matching between runs” (MBR) была включена с параметрами по умолчанию. Для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и белков в качестве порога использовали величину FDR = 0,01.

Для дальнейшего статистического анализа в программное обеспечение Perseus 2.1.3.0 (Max Planck Institute of Biochemistry) [35] загружали величины LFQIntensity белков во всех образцах с учётом технических повторов из файла выдачи результатов MaxQuant “proteinGroups.txt”. Предварительно данные фильтровали: удаляли общепринятые белки-контаминанты, ложноположительные идентификации, а также оставляли в анализе белки, которые были идентифицированы по 2 и более пептидам. Для количественного анализа содержания белков в 9 образцах применяли \log_2 -трансформированные величины LFQ с нормализацией по Z-score и фильтрацией по 7 валидным величинам LFQ из 9 с учётом технических повторов хотя бы для одной исследуемой группы. После иерархической кластеризации, проведённой с параметрами по умолчанию, удалили из анализа 3 образца с сильно отличающимися белковыми профилями вследствие контаминации лейкоцитарных клеток основными белками крови человека.

В рамках отработки альтернативного варианта оценки контаминации выбранных 6 образцов (2 пациента с МРТ-типом 1, 2 пациента с МРТ-типом 2 и 2 здоровых добровольца) компонентами крови использовали программное обеспечение R/Bioconductor

(пакет MSnSet.utils). Поиск основных белков крови (гемоглобин, фибриноген, альбумин, спектрин) производили по идентификаторам белков в MSnSet (с применением NCBI RefSeq protein IDs). На основании рассчитанных показателей LFQ был создан логический вектор для вычисления среднего значения “присутствия” идентифицированных белков в образцах, с последующим построением графика плотности (KDE-plot). В дальнейшем анализе перечисленные примесные белки в оставшихся 6 образцах не принимали во внимание.

Для количественного анализа содержания белков в образцах применяли \log_2 -трансформированные величины LFQ с нормализацией по Z-score и фильтрацией по валидным значениям LFQ (5 валидных значений из 6 хотя бы в одной экспериментальной группе). Недостающие значения LFQ в каждом образце были восполнены путём выборки значений из нормального распределения с шириной (разброс) 0,5 сигм от действительного стандартного отклонения образца и понижением на 1,4 сигмы стандартного отклонения. Оценку дифференциальной экспрессии белков по итоговым расчётным \log_2 -трансформированным нормализованным значениям LFQ производили между когортами (ЦМА vs норма, МРТ-тип 1 vs норма, МРТ-тип 2 vs норма, МРТ-тип 1 vs МРТ-тип 2) на основе оценки *t*-критерия Стьюдента (*q*-value < 0,05, *s*₀ = 1) с поправкой на множественность сравнения (permutation-based FDR), предусматриваемой по умолчанию в указанном ПО. Визуализацию полученных данных анализа дифференциальной экспрессии проводили путём построения графиков Volcano-plot. Статистически значимыми различиями содержания белков считали при величине *q*-value < 0,05 и кратности изменений FC > 2 (то есть, $\log_2 FC > 1$).

Для построения тепловой карты профилей экспрессии белков было проведено предварительное сравнение трёх когорт (МРТ-тип 1, МРТ-тип 2, норма) методом ANOVA с последующим попарным сравнением методом теста Тьюка (post-hoc Tukey's HSD test, *q*-value < 0,05). Для всех белков со статистически значимыми изменениями экспрессии, выявленными указанным методом, проводили иерархическую кластеризацию образцов по сходству профилей экспрессии с использованием метода k-means (K = 20). Функциональную аннотацию белков со значимо изменённой экспрессией производили точным методом Фишера на основе международных баз данных молекулярных путей (GO, GSEA, Reactome, KEGG, Pfam, Interpro) [38]. Анализ белок-белковых взаимодействий выполняли в программе STRING [39].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате панорамного протеомного анализа после удаления общепринятых контаминантов и ложноположительных идентификаций в 9 исследуемых образцах было достоверно обнаружено 1554 белка. При контроле качества образцов посредством иерархической кластеризации в трёх образцах

были выявлены сильно отличающиеся белковые профили со сниженным количеством идентифицированных белков с валидными величинами LFQ в трёх экспериментальных группах почти в 3 раза до 574 белков. Это может быть следствием контаминации образцов выделенных лейкоцитов мажорными белками крови и отражать проблему динамического диапазона при протеомном анализе данного биологического материала. Для дальнейшего анализа были выбраны 6 образцов, характеризующихся более представленными белковыми профилями из 703 белков, для которых провели дополнительную оценку контаминации образцов нецелевыми компонентами крови.

Оценка контаминации образцов

Для 6 образцов был произведен дополнительный поиск основных белков крови (гемоглобин, фибриноген, альбумин, спектрин) с созданием логического вектора для вычисления среднего значения “присутствия” идентифицированных белков в образцах, с последующим построением графика плотности (KDE-plot) (рис. 1А). Оба образца МРТ-типа 2 продемонстрировали значимую контаминацию нецелевыми компонентами крови (рис. 1Б), что относится к одному из ограничений данного пилотного исследования.

Оценка дифференциальной экспрессии белковых групп

После первичной обработки данных масс-спектрометрии для статистического анализа использовали 703 белковых группы (Дополнительные материалы, табл. S1). Описательная статистика (среднее арифметическое, медиана, стандартное отклонение и размах) представлена в Дополнительных материалах (табл. S2). Для 4 пациентов с ЦМА относительно 2 здоровых добровольцев мы выявили значимое снижение экспрессии 141 белка и повышение экспрессии 92 белков ($q\text{-value} < 0,05, s0 = 1$) (рис. 2А; Дополнительные материалы, табл. S3). Наиболее выраженное снижение экспрессии наблюдалось для белков, вовлечённых в ремоделирование ВКМ

(TIMP2, GALNS, ARSA), и модуляцию TGFβ сигналинга (LRG1). Наиболее значительное повышение экспрессии продемонстрировали иммуномодулирующие белки (IGJ, CD5-подобный белок (CD5L)), а также регуляторы целостности эпителиальных барьеров и трансклеточного трафика (белок Ras-семейства Rab-10, мезин (MSN)).

Дополнительно произведена оценка дифференциальной экспрессии белковых групп для пациентов с двумя различными МРТ-типами ЦМА. При сравнении когорты пациентов с МРТ-типом 1 относительно здоровых добровольцев мы идентифицировали значимое снижение экспрессии 136 белков и повышение экспрессии 217 белков ($q\text{-value} < 0,05, s0 = 1$) (рис. 2Б; Дополнительные материалы, табл. S3). В наибольшей степени снижалась экспрессия упомянутой выше GALNS, иммуномодулирующих белков эозинофильных гранул (основного протеина эозинофилов (RNASE3), эозинофильного нейротоксина (RNASE2), эозинофильной пероксидазы (EPX)), а также белков, ассоциированных с воспалением (лектина CLEC5A, рецептора комплемента CR1). Белки с наиболее значимым повышением экспрессии различаются по функциям, но все потенциально задействованы в регуляции целостности ГЭБ через межклеточную адгезию и трансклеточный трафик — IGJ, SYTL4, фосфатидатцитидилтрансфераза 2 (CDS2), регуляторные лёгкие цепи миозина (MYL12A/B) и альфа-4 цепь тропомиозина (TMP4) [41–45].

Для когорты пациентов ЦМА с МРТ-типом 2 относительно здоровых добровольцев мы выявили значимое снижение экспрессии 143 и повышение экспрессии 88 белков ($q\text{-value} < 0,05, s0 = 1$) (рис. 2В; Дополнительные материалы, табл. S3). Наиболее выраженное снижение экспрессии вновь замечено для белков, опосредованно влияющих на ремоделирование ВКМ: ARSA, LRG1, SORL1, TIMP2. Самое выраженное повышение экспрессии получено для провоспалительных белков комплемента (CFB, CFH), цепей иммуноглобулинов (гамма и лямбда), а также вазомодуляторов (аргиназа-1, богатый гистидином гликопротеин HRG).

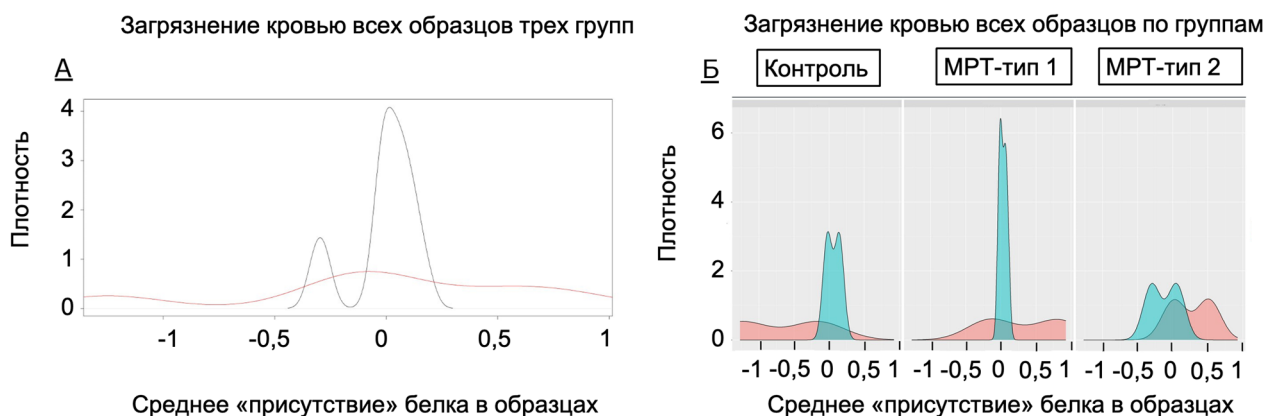


Рисунок 1. Визуализация данных исследования контаминации образцов компонентами крови (KDE-plot). **А** – контаминация кровью всех исследуемых образцов: красная линия – белки-контаминанты, чёрная линия – белки, представляющие интерес. **Б** – контаминация кровью образцов отдельных групп. Площадь под кривой, выделенная красным цветом – белки-контаминанты, площадь под кривой, выделенная голубым цветом – белки, представляющие интерес. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

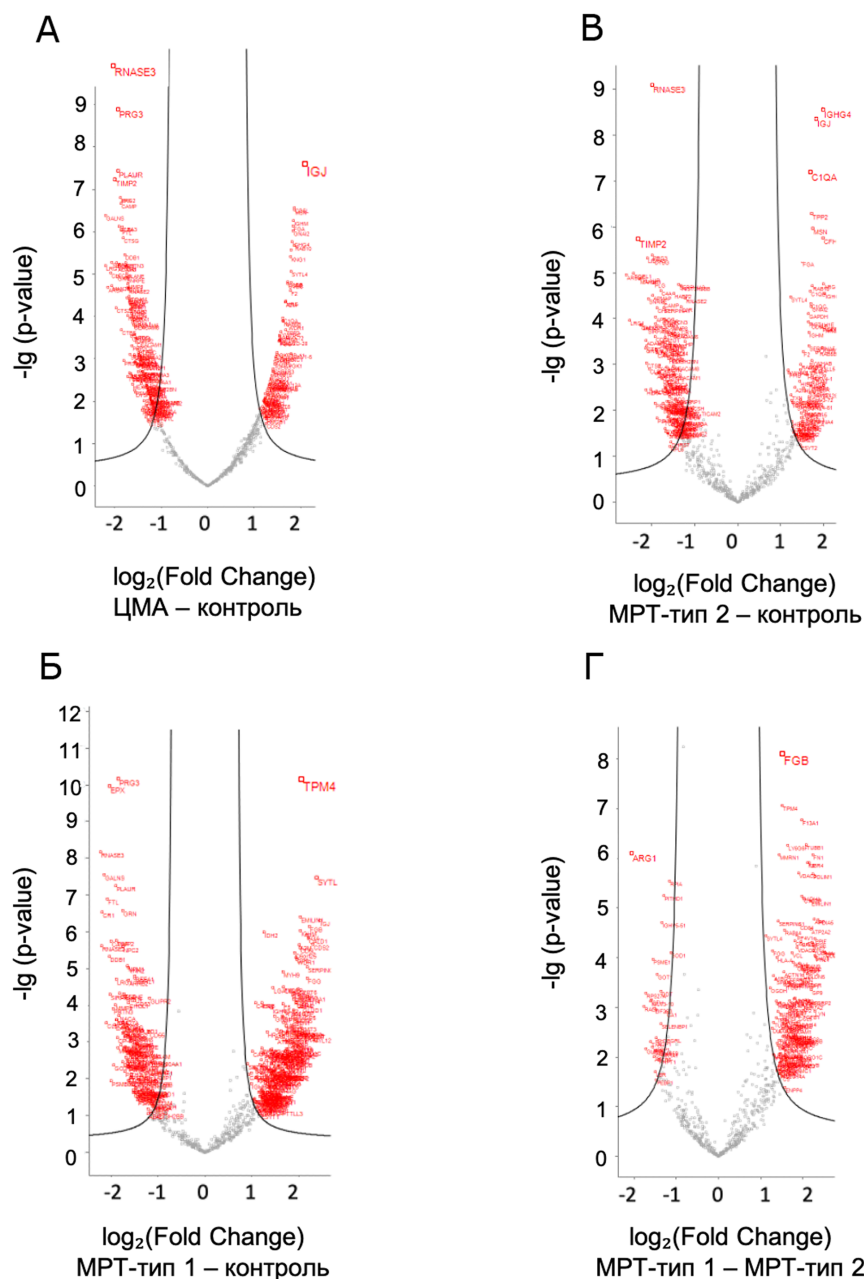


Рисунок 2. Графики Volcano-plot, демонстрирующие по оси абсцисс дифференциальную экспрессию белков ($\log_2(\text{Fold Change})$), по оси ординат – статистическую значимость, выраженную в формате $-\lg(p\text{-value})$. Красным выделены белковые группы, демонстрирующие статистически значимые различия по результатам t -теста Стьюдента. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

Но учитывая наличие контаминации данного типа образцов нецелевыми белками крови, данные изменения могут рассматриваться как неспецифичные и требующие дополнительного изучения.

Для когорты пациентов с МРТ-типом 1 относительно когорты пациентов с МРТ-типом 2 мы обнаружили значимое снижение экспрессии 27 и повышение экспрессии 152 белков ($q\text{-value} < 0,05$, $s_0 = 1$) (рис. 2Г; Дополнительные материалы, табл. S3). В наибольшей степени снижена экспрессия протективных белков стресса: модулятора тонуса сосудистой стенки аргиназы-1, регулятора везикулярного трафика и апоптоза Ral-A, супрессора аутофагии GLIPR2, убиквитин-

содержащих белков, антиоксидантного белка TXN. Самое значительное повышение экспрессии отмечено для регуляторов гемостаза (тромбоцитарный гликопротеин GP6, дисульфид-изомераза PDIA5), тромбоцитарных иммуномодуляторов (CD226, LYN), регуляторов внутриклеточного трафика (EHD3, белок-предшественник бета-амилоида APP) и энергетического метаболизма (пептидилпролил-изомераза PPIF, FHL1).

Кластерный анализ и функциональная аннотация белковых групп

Для кластерного анализа было использовано 499 белков со значимо изменённой экспрессией

хотя бы при одном попарном сравнении методом ANOVA с post-hoc исследованием (q -value < 0,05). Белки были сгруппированы на тепловой карте по сходству экспрессии методом k -means в 20 кластеров (рис. 3). Функциональная аннотация точным методом Фишера выявила значимое обогащение молекулярных путей из международных баз данных для 9 кластеров (кластеры 7, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20) (рис. 3; Дополнительные материалы, табл. S4).

Для обеих когорт пациентов с ЦМА относительно здоровых добровольцев выявлено снижение экспрессии белков двух крупных кластеров: кластера 9 (35 белков), функционально аннотированного к дегрануляции нейтрофилов, а также кластера 11 (51 белок), ассоциированного с врождённым иммунитетом, активацией лизосом, компонентами ВКМ, везикулярным транспортом, пространственной модификацией белков. 11 кластер также аннотирован к профилю генов со сниженной экспрессией в мозговой ткани при болезни Альцгеймера. Наиболее отчетливо у пациентов с ЦМА относительно группы контроля снижается экспрессия РНКазы А из кластера 3 (RNaseA) и 4 белков из кластера 2 (SORL1, TIMP2, PLAUR, PRG3), участвующих в процессах нейровоспаления и взаимодействия с ВКМ. При этом для обоих МРТ-типов ЦМА в сравнении с группой контроля отмечается повышение экспрессии 32 белков кластера 20, вовлечённого в регуляцию каскада белков комплемента и приобретённого гуморального иммунного ответа, а также повышение экспрессии 3 белков кластера 4 (SYTL4, IGJ, FGA), принимающих участие в регуляции гуморального иммунного ответа и гемостаза. Повышение экспрессии 5 белков кластера 14 (SNCA, PPIA, IGHA1, PRMT5, группа актиновых белков), сопряжено с повышением экспрессии белков из крупного неаннотированного кластера 13 (33 белка) — у пациентов с МРТ-типом 1 этот кластер экспрессируется более активно, чем у пациентов с МРТ-типом 2, относительно группы контроля. Согласно базе данных STRING, белки этих двух кластеров вовлечены в стресс-индуцированное взаимодействие актинового цитоскелета и везикулярного транспорта клетки с внешней средой, преимущественно посредством ключевого узлового белка — профиллина-1.

Наиболее генерализованные изменения в профиле экспрессии белков отмечаются для когорты пациентов с первым МРТ-типом ЦМА относительно второго МРТ-типа ЦМА и здоровых добровольцев. Наиболее выраженное повышение экспрессии двух белков кластера 1 (FGB, TPM4) дополняется повышением экспрессии белков кластеров 12 (52 белка), 15 (50 белков) и 16 (39 белков) — все они вовлечены в организацию межклеточных контактов, активацию и дегрануляцию тромбоцитов. Также у пациентов с МРТ-типом 1 отмечается более выраженное, чем у пациентов с МРТ-типом 2, снижение экспрессии 18 белков кластера 10, относительно группы контроля — они задействованы в убиквитин-протеасомной деградации белков, регуляции энергетического метаболизма и клеточного цикла, апоптоза.

У пациентов со вторым МРТ-типом ЦМА, относительно группы пациентов с первым МРТ-типом и здоровых добровольцев также выявлены изменения в профиле экспрессии белков: наиболее повышенная экспрессия отмечена для двух белков кластера 5 (белка комплемента CFH и вазомодулирующего белка аргиназы-1) и убиквитин-содержащей белковой группы белков кластера 6 (RPS27A, UBC, UBB, UBA52). Повышение экспрессии белков кластера 19 (42 белка), задействованных в функционировании комплекса анкирина-1, и 4 белков кластера 17 (Ras-белки Ral-A и Rab-5B, иммуноглобулиновые белки IGLV3-10 и IGHV5-51), вовлечённых в адаптивный гуморальный иммунный ответ, сопряжено с выраженным повышением экспрессии 14 белков неаннотированного кластера 18, особенно относительно когорты пациентов с МРТ-типом 1. В базе данных STRING белки из этих трёх сопряжённых кластеров формируют единую сеть белок-белковых взаимодействий, указывающих на регуляцию энергетического метаболизма и антиоксидантной защиты клеток, везикулярного транспорта, организации хроматина, иммунитета и воспаления, клеточной адгезии. Ключевыми узловыми белками сети являются гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа GAPDH и TXN. У пациентов со вторым МРТ-типом ЦМА относительно группы пациентов с первым МРТ-типом и здоровых добровольцев также отмечено снижение экспрессии 4 белков кластера 7 (DLD, HIST2H3A, HIST1H3A, SERPINA1) и 51 белка неаннотированного кластера 8 — согласно базе данных STRING, эти белки формируют сеть взаимодействий, ассоциированную с провоспалительной дифференцировкой лейкоцитов, в частности, с митохондриальным и ЭПР-стрессом, синтезом гликопротеинов и созреванием лизосом, влияющих на экспрессию рецепторов иммунных клеток и провоспалительных транскрипционных факторов (таких как NF-κB). Ключевыми узловыми белками в сети взаимодействий являются супероксиддисмутаза-2 (SOD2), белок теплового шока HSP90AA1 и лизосомальный белок LAMP1.

ОБСУЖДЕНИЕ

Нами произведено первое исследование панорамного протеома периферической крови для пациентов с различными МРТ-типами ЦМА. Результаты исследования указывают на ряд ключевых аспектов пробоподготовки образцов, влияющих на качество получаемых данных. В частности, перед промывкой лейкоцитарной фракции клеток холодным PBS необходима тщательная очистка осадка от красных кровяных телец с использованием эритроцитарного лизирующего буфера. Не менее важным аспектом является минимизация информационного шума, связанного с воздействием на клетки стрессовых факторов при пробоподготовке (быстрая смена температурного режима, агрессивное суспендирование и центрифугирование клеток).

Использованная нами классическая методика исследования протеома при помощи панорамной хромато-масс-спектрометрии может быть

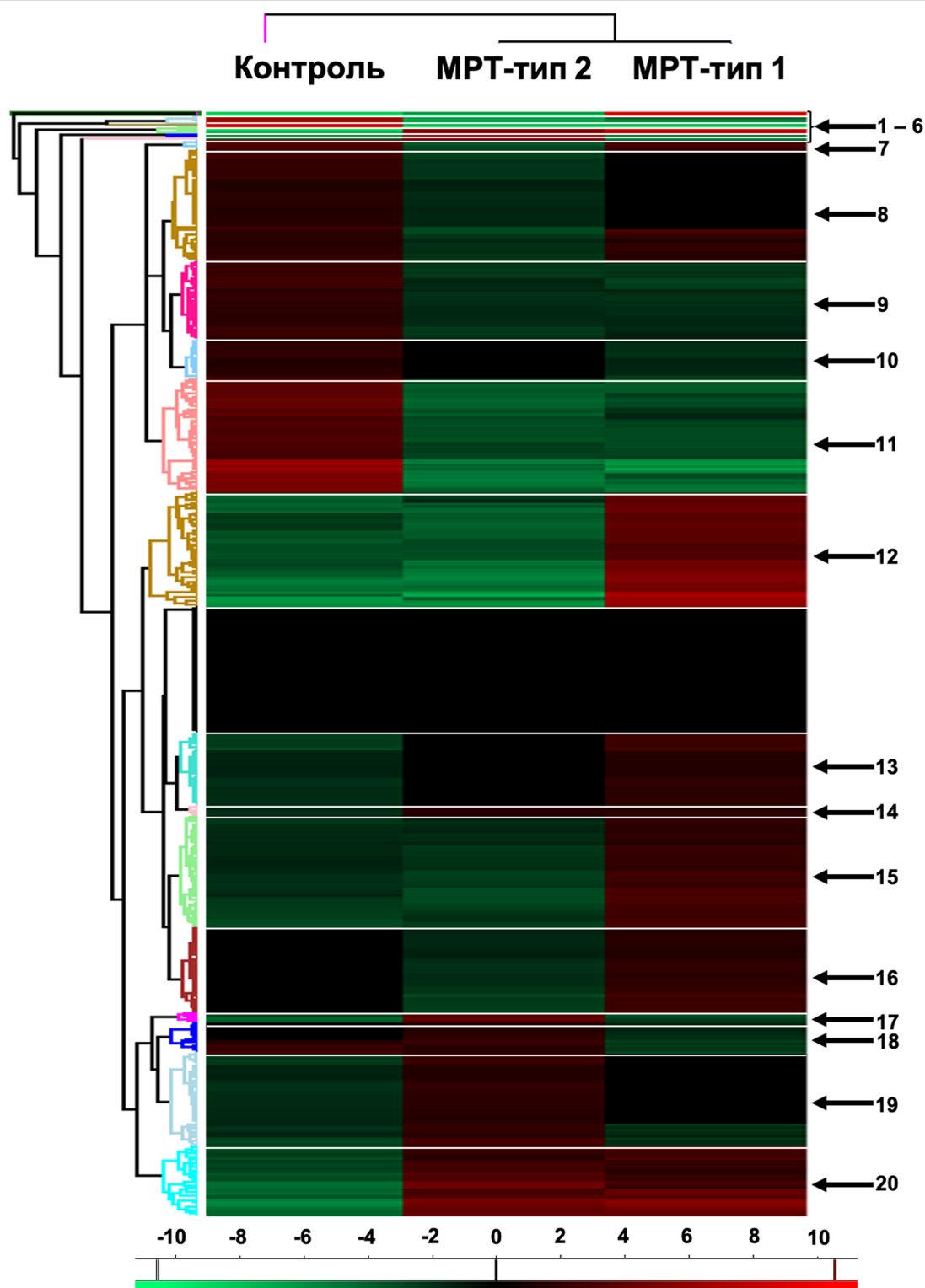


Рисунок 3. Тепловая карта, демонстрирующая различия при анализе дифференциально экспрессирующихся белков в анализе методом ANOVA для трёх групп. Кластер 1, кол-во белковых групп 2: ярко-розовый. Кластер 2, кол-во белковых групп 4: пастельно-голубой. Кластер 3, кол-во белковых групп 1: болотный. Кластер 4, кол-во белковых групп 3: светло-зелёный. Кластер 5, кол-во белковых групп 2: тёмно-синий. Кластер 6, кол-во белковых групп 1: розовый. Кластер 7, кол-во белковых групп 4: небесно-голубой-1. Кластер 8, кол-во белковых групп 51: золотой. Кластер 9, кол-во белковых групп 35: фуксия-1. Кластер 10, кол-во белковых групп 18: небесно-голубой-2. Кластер 11, кол-во белковых групп 51: персиковый. Кластер 12, кол-во белковых групп 52: тёмно-золотой. Кластер 13, кол-во белковых групп 33: цвет морской волны. Кластер 14, кол-во белковых групп 5: светло-розовый. Кластер 15, кол-во белковых групп 50: салатный. Кластер 16, кол-во белковых групп 39: коричневый. Кластер 17, кол-во белковых групп 4: фуксия-2. Кластер 18, кол-во белковых групп 14: синий. Кластер 19, кол-во белковых групп 42: светло-голубой. Кластер 20, кол-во белковых групп 32: ярко-голубой. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии журнала.

усовершенствована. Применение масс-спектрометрии в режиме независимого сбора данных (DIA), а также программы клеточной деконволюции позволят получать более информативные белковые профили и проводить их оценку с поправкой на соотношение разных клеточных популяций. Внедрение машинного обучения для количественной и пространственной оценки MP-признаков ЦМА, соответствующих критериям STRIVE, будет способствовать повышению достоверности и воспроизводимости данных корреляционного анализа для профиля экспрессии белков.

Проведённый нами анализ дифференциальной экспрессии и кластерный анализ экспрессии белков с функциональной аннотацией позволил выявить ряд молекулярно-генетических изменений, требующих дальнейшей валидации на более мощных выборках.

В частности, у пациентов с развёрнутыми стадиями ЦМА наметилась общая тенденция к снижению экспрессии группы белков, ассоциированных с везикулярным трафиком и ремоделированием ВКМ (в том числе, в базальной мембране эндотелия сосудов), среди них лизосомальные ферменты GALNS [40, 41] и ARSA [42, 43], ингибитор металлопротеиназы TIMP2 [44] и гликопротеин LRG1 [45]. Примечательно, что эта группа белков также функционально аннотирована в отношении болезни Альцгеймера, что не противоречит современной тенденции к увеличению доли случаев ЦМА, комбинированных с нейродегенерацией [15]. В частности, у пациентов с ЦМА мы обнаружили тенденцию к снижению экспрессии трансмембранного рецептора SORL1. Он осуществляет везикулярный трафик предшественника бета-амилоида и продуктов его метаболизма, снижение его экспрессии выявлено в мозговой ткани пациентов с болезнью Альцгеймера [46].

Известно, что самая частая наследственная форма ЦМА — церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (ЦАДАСИЛ) — также ассоциирована с накоплением гликопротеиновых гранулярных осмофильных включений в стенке мелких церебральных сосудов [47]. Другие наследственные формы ЦМА связаны с мутациями в генах, кодирующих лизосомальные ферменты (CTSA) [48], компоненты ВКМ базальной мембраны эндотелия (COL4A1/COL4A2) [49]. Популяционные генетические исследования спорадических форм ЦМА также подтверждают ассоциацию ЦМА с экспрессией генов, регулирующих состав ВКМ (с учётом математической поправки на сосудистые факторы риска) [19]. Необходимо углублённое изучение структуры базальной мембраны, ВКМ сосудистой стенки и периваскулярного ВКМ для церебральных мелких сосудов.

Низкая мощность выборок пациентов с разными МРТ-типами ЦМА не позволяет говорить о значимых различиях в экспрессии белков между этими двумя группами. Но результаты пилотного исследования указывают на тенденцию к недостаточной активации протективных

стресс-индуцированных белков у пациентов с первым МРТ-типом ЦМА, характеризующимся более ранним возрастом дебюта и более тяжёлым спектром клинических проявлений [35], по сравнению с МРТ-типом 2. В частности, недостаточная экспрессия аргиназы-1 и антиоксидантных белков (TXN и др.) может приводить к NO-опосредованному повреждению ГЭБ активными формами кислорода и провоспалительными иммунными клетками. А угнетение Ras-белков, убиквитин-содержащих белков и супрессоров аутофагии может способствовать апоптозу компонентов НВЕ. Также у первого МРТ-типа ЦМА необходимо подтвердить в будущих исследованиях тенденцию к более интенсивной активации тромбоцитарных белков, повышающих риск микротромбозов, и белков, вовлечённых в стресс-индуцированную перестройку актинового цитоскелета и ремоделирование сосудистой стенки (таких как профиллин-1) [50–52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённое нами панорамное исследование имеет ряд существенных ограничений: минимальный размер исследуемой выборки, контаминирование ряда образцов нецелевыми компонентами крови, отсутствие клеточной деконволюции на этапе анализа данных масс-спектрометрии. Тем не менее, результаты исследования указывают на необходимость дальнейшего изучения профиля экспрессии белков в периферической крови и ликворе пациентов с различными МРТ-типами ЦМА на более мощных выборках, в том числе в контексте сопоставления с результатами РНК-секвенирования и иммуногистохимического анализа. Это позволит углубить наши представления о патогенетических механизмах развития ЦМА и валидировать наш подход к подразделению развёрнутых стадий ЦМА на МРТ-типы. Учёт этиопатогенетической гетерогенности МРТ-проявлений ЦМА повысит эффективность поиска диагностических биомаркеров заболевания и мишеней-кандидатов для таргетной терапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Протеомное исследование, включая пробоподготовку и хромато-масс-спектрометрические измерения, выполнено с использованием оборудования ЦКП “Протеом человека” Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Протеомный анализ выполнен в рамках темы “Влияние соединений, обладающих геропротективными свойствами, на единичные биомакромолекулы, модельные объекты и организм человека” при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2024-643).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Образцы плазмы крови, использованные в данном исследовании, были исходно получены с соблюдением всех необходимых этических стандартов. Все испытуемые подписали информированное согласие на участие в исследовании и были проинформированы о последующем использовании биологических материалов. Исследование было одобрено соответствующим этическим комитетом Российского центра неврологии и нейронаук (протокол № 3-3/24 от 15 апреля 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbtmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

- Gorelick P.B., Scuteri A., Black S.E., DeCarli C., Greenberg S.M., Iadecola C., Launer L.J., Laurent S., Lopez O.L., Nyenhuis D., Petersen R.C., Schneider J.A., Tzourio C., Arnett D.K., Bennett D.A., Chui H.C., Higashida R.T., Lindquist R., Nilsson P.M., Roman G.C., Sellke F.W., Seshadri S. (2011) Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association / American Stroke Association. *Stroke*, **42**(9), 2672–2713. DOI: 10.1161/STR.0b013e3182299496
- Wardlaw J.M., Smith E.E., Biessels G.J., Cordonnier C., Fazekas F., Frayne R., Lindley R.I., O'Brien J.T., Barkhof F., Benavente O.R., Black S.E., Brayne C., Breteler M., Chabriat H., DeCarli C., de Leeuw F.-E., Doubal F., Duering M., Fox N.C., Greenberg S., Hachinski V., Kilimann I., Mok V., van Oostenbrugge R., Pantoni L., Speck O., Stephan B.C.M., Teipel S., Viswanathan A., Werring D., Chen C., Smith C., van Buchem M., Norrving B., Gorelick P.B., Dichgans M. (2013) Neuroimaging standards for research into small vessel disease and its contribution to ageing and neurodegeneration. *Lancet Neurol.*, **12**(8), 822–838. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70124-8
- Rosenberg G.A., Wallin A., Wardlaw J.M., Markus H.S., Montaner J., Wolfson L., Iadecola C., Zlokovic B.V., Joutel A., Dichgans M., Duering M., Schmidt R., Korczyn A.D., Grinberg L.T., Chui H.C., Hachinski V. (2016) Consensus statement for diagnosis of subcortical small vessel disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **36**(1), 6–25. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.172
- Cannistraro R.J., Badi M., Eidelman B.H., Dickson D.W., Middlebrooks E.H., Meschia J.F. (2019) CNS small vessel disease: a clinical review. *Neurology*, **92**(24), 1146–1156. DOI: 10.1212/WNL.0000000000007654
- Azarpazhooh M.R., Avan A., Cipriano L.E., Munoz D.G., Sposato L.A., Hachinski V. (2018) Concomitant vascular and neurodegenerative pathologies double the risk of dementia. *Alzheimers Dement.*, **14**(2), 148–156. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.07.755
- Santisteban M.M., Iadecola C. (2018) Hypertension, dietary salt and cognitive impairment. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **38**(12), 2112–2128. DOI: 10.1177/0271678X18803374
- Fisher C.M. (1965) Lacunes: small, deep cerebral infarcts. *Neurology*, **15**(8), 774–784. DOI: 10.1212/wnl.15.8.774
- Fisher C.M. (1982) Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology*, **32**(8), 871–876. DOI: 10.1212/wnl.32.8.871
- Pantoni L. (2010) Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *Lancet Neurol.*, **9**(7), 689–701. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70104-6
- Wardlaw J.M., Benveniste H., Williams A. (2022) Cerebral vascular dysfunctions detected in human small vessel disease and implications for preclinical studies. *Annu. Rev. Physiol.*, **84**, 409–434. DOI: 10.1146/annurev-physiol-060821-014521
- Markus H.S., de Leeuw F.E. (2023) Cerebral small vessel disease: recent advances and future directions. *Int. J. Stroke*, **18**(1), 4–14. DOI: 10.1177/17474930221144911
- Williamson J.D., Pajewski N.M., Auchus A.P., Bryan R.N., Chelune G., Cheung A.K., Cleveland M.L., Coker L.H., Crowe M.G., Cushman W.C., Cutler J.A., Davatzikos C., Desiderio L., Erus G., Fine L.J., Gaussoin S.A., Harris D., Hsieh M.-K., Johnson K.C., Kimmel P.L., Tamura M.K., Launer L.J., Lerner A.J., Lewis C.E., Martindale-Adams J., Moy C.S., Nasrallah I.M., Nichols L.O., Oparil S., Ogrocki P.K., Rahman M., Rapp S.R., Reboussin D.M., Rocco M.V., Sachs B.C., Sink K.M., Still C.H., Supiano M.A., Snyder J.K., Wadley V.G., Walker J., Weiner D.E., Whelton P.K., Wilson V.M., Woolard N., Wright J.T. Jr., Wright C.B.; SPRINT MIND Investigators for the SPRINT Research Group (2019) Effect of intensive vs standard blood pressure control on probable dementia: a randomized clinical trial. *JAMA*, **321**(6), 553–561. DOI: 10.1001/jama.2018.21442
- Hainsworth A.H., Markus H.S., Schneider J.A. (2024) Cerebral small vessel disease, hypertension, and vascular contributions to cognitive impairment and dementia. *Hypertension*, **81**(1), 75–86. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.19943
- Sonnen J.A., Santa Cruz K., Hemmy L.S., Woltjer R., Leverenz J.B., Montine K.S., Jack C.R., Kaye J., Lim K., Larson E.B., White L., Montine T.J. (2011) Ecology of the aging human brain. *Arch. Neurol.*, **68**(8), 1049–1056. DOI: 10.1001/archneurol.2011.157
- Toledo J.B., Arnold S.E., Raible K., Brettschneider J., Xie S.X., Grossman M., Monsell S.E., Kukull W.A., Trojanowski J.Q. (2013) Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain*, **136**(Pt 9), 2697–2706. DOI: 10.1093/brain/awt188
- Kapasi A., Yu L., Petyuk V., Arfanakis K., Bennett D.A., Schneider J.A. (2022) Association of small vessel disease with tau pathology. *Acta Neuropathol.*, **143**(3), 349–362. DOI: 10.1007/s00401-021-02397-x
- Lammie G.A., Brannan F., Slaterry J., Warlow C. (1997) Nonhypertensive cerebral small-vessel disease. An autopsy study. *Stroke*, **28**(11), 2222–2229. DOI: 10.1161/01.str.28.11.2222
- Debette S., Schilling S., Duperron M.-G., Larsson S.C., Markus H.S. (2019) Clinical significance of magnetic resonance imaging markers of vascular brain injury: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Neurol.*, **76**(1), 81–94. DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.3122
- Bhagat R., Marini S., Romero J.R. (2023) Genetic considerations in cerebral small vessel diseases. *Front. Neurol.*, **14**, 1080168. DOI: 10.3389/fneur.2023.1080168
- Manini A., Pantoni L. (2023) Genetic causes of cerebral small vessel diseases: a practical guide for neurologists. *Neurology*, **100**(16), 766–783. DOI: 10.1212/WNL.00000000000201720

21. Joutel A., Haddad I., Ratelade J., Nelson M.T. (2016) Perturbations of the cerebrovascular matrisome: a convergent mechanism in small vessel disease of the brain? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **36**(1), 143–157. DOI: 10.1038/jcbfm.2015.62
22. Mok V.C.T., Cai Y., Markus H.S. (2024) Vascular cognitive impairment and dementia: mechanisms, treatment, and future directions. *Int. J. Stroke*, **19**(8), 838–856. DOI: 10.1177/17474930241279888
23. Zlokovic B.V. (2011) Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**(12), 723–738. DOI: 10.1038/nrn3114
24. Beishon L., Panerai R.B. (2021) The neurovascular unit in dementia: an opinion on current research and future directions. *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 721937. DOI: 10.3389/fnagi.2021.721937
25. Dupré N., Drieu A., Joutel A. (2024) Pathophysiology of cerebral small vessel disease: a journey through recent discoveries. *J. Clin. Invest.*, **134**(10), e176330. DOI: 10.1172/JCI172841
26. Mitroï D.N., Tian M., Kawaguchi R., Lowry W.E., Carmichael S.T. (2022) Single-nucleus transcriptome analysis reveals disease- and regeneration-associated endothelial cells in white matter vascular dementia. *J. Cell. Mol. Med.*, **26**(11), 3183–3195. DOI: 10.1111/jcmm.17315
27. Raina A., Zhao X., Grove M.L., Bressler J., Gottesman R.F., Guan W., Pankow J.S., Boerwinkle E., Mosley T.H., Fornage M. (2017) Cerebral white matter hyperintensities on MRI and acceleration of epigenetic aging: the atherosclerosis risk in communities study. *Clin. Epigenetics*, **9**, 21. DOI: 10.1186/s13148-016-0302-6
28. Yang Y., Knol M.J., Wang R., Mishra A., Liu D., Luciano M., Teumer A., Armstrong N., Bis J.C., Jhun M.A., Li S., Adams H.H.H., Aziz N.A., Bastin M.E., Bourgey M., Brody J.A., Frenzel S., Gottesman R.F., Hosten N., Hou L., Kardia S.L.R., Lohner V., Marquis P., Maniega S.M., Satizabal C.L., Sorond F.A., Valdés Hernández M.C., van Duijn C.M., Vernooij M.W., Wittfeld K., Yang Q., Zhao W., Boerwinkle E., Levy D., Deary I.J., Jiang J., Mather K.A., Mosley T.H., Psaty B.M., Sachdev P.S., Smith J.A., Sotoodehnia N., DeCarli C.S., Breteler M.M.B., Ikram M.A., Grabe H.J., Wardlaw J., Longstreth W.T., Launer L.J., Seshadri S., Debette S., Fornage M. (2023) Epigenetic and integrative cross-omics analyses of cerebral white matter hyperintensities on MRI. *Brain*, **146**(2), 492–506. DOI: 10.1093/brain/awac290
29. Deng Y.-T., You J., He Y., Zhang Y., Li H.-Y., Wu X.-R., Cheng J.-Y., Guo Y., Long Z.-W., Chen Y.-L., Li Z.-Y., Yang L., Zhang Y.-R., Chen S.-D., Ge Y.-J., Huang Y.-Y., Shi L.-M., Dong Q., Mao Y., Feng J.-F., Cheng W., Yu J.-T. (2025) Atlas of the plasma proteome in health and disease in 53,026 adults. *Cell*, **188**(1), 253–271.e7. DOI: 10.1016/j.cell.2024.10.045
30. Wang Y.-C., Zhu H.-H., He L.-C., Yao Y.-T., Zhang L., Xue X.-L., Li J.-Y., Zhang L., Song B., Shi C.-H., Li Y.-S., Gao Y., Yang J.-H., Xu Y.-M. (2025) Proteome profiling of serum reveals pathological mechanisms and biomarker candidates for cerebral small vessel disease. *Transl. Stroke Res.*, **16**(6), 1606–1620. DOI: 10.1007/s12975-025-01332-6
31. Hristovska I., Kumar A., Binette A.P., van Westen D., Janelidze S., Stomrud E., Palmqvist S., Ossenkoppele R., Mattsson-Carlsson N., Vogel J.W., Hansson O. (2023) Identification of distinct and shared biomarkers in cerebral small vessel disease (SVD) through proteomic profiling of cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement.*, **19**(Suppl 24), e082927. DOI: 10.1002/alz.082927
32. Armstrong N.J., Mather K.A., Sargurupremraj M., Knol M.J., Malik R., Satizabal C.L., Yanek L.R., Wen W., Gudnason V.G., Dueker N.D., Elliott L.T., Hofer E., Bis J., Jahanshad N., Li S., Logue M.A., Luciano M., Scholz M., Smith A.V., Trompet S., Vojinovic D., Xia R., Alfaro-Almagro F., Ames D., Amin N., Amouyel P., Beiser A.S., Brodaty H., Deary I.J., Fennema-Notestine C., Gampawar P.G., Gottesman R., Griffanti L., Jack C.R. Jr., Jenkinson M., Jiang J., Kral B.G., Kwok J.B., Lampe L., Liewald D., Maillard P., Marchini J., Bastin M.E., Mazoyer B., Pirpamer L., Romero J.R., Roshchupkin G.V., Schofield P.R., Schroeter M.L., Stott D.J., Thalamuthu A., Trollor J., Tzourio C., van der Grond J., Vernooij M.W., Witte V.A., Wright M.J., Yang Q., Morris Z., Sigurdsson S., Psaty B., Villringer A., Schmidt H., Haberg A.K., van Duijn C.M., Jukema J.W., Dichgans M., Sacco R.L., Wright C.B., Kremen W.S., Becker L.C., Thompson P.M., Mosley T.H., Wardlaw J.M., Ikram M.A., Adams H.H.H., Seshadri S., Sachdev P.S., Smith S.M., Launer L., Longstreth W., DeCarli C., Schmidt R., Fornage M., Debette S., Nyquist P.A. (2020) Common genetic variation indicates separate causes for periventricular and deep white matter hyperintensities. *Stroke*, **51**(7), 2111–2121. DOI: 10.1161/STROKEAHA.119.027544
33. Chung J., Marini S., Pera J., Norrving B., Jimenez-Conde J., Roquer J., Fernandez-Cadenas I., Tirschwell D.L., Selim M., Brown D.L., Silliman S.L., Worrall B.B., Meschia J.F., Demel S., Greenberg S.M., Slowik A., Lindgren A., Schmidt R., Traylor M., Sargurupremraj M., Tiedt S., Malik R., Debette S., Dichgans M., Langefeld C.D., Woo D., Rosand J., Anderson C.D. (2019) Genome-wide association study of cerebral small vessel disease reveals established and novel loci. *Brain*, **142**(10), 3176–3189. DOI: 10.1093/brain/awz233
34. Duperron M.-G., Knol M.J., le Grand Q., Evans T.E., Mishra A., Tsuchida A., Roshchupkin G., Konuma T., Tréguët D.-A., Romero J.R., Frenzel S., Luciano M., Hofer E., Bourgey M., Dueker N.D., Delgado P., Hilal S., Tankard R.M., Dubost F., Shin J., Saba Y., Armstrong N.J., Bordes C., Bastin M.E., Beiser A., Brodaty H., Bülow R., Carrera C., Chen C., Cheng C.-Y., Deary I.J., Gampawar P.G., Himali J.J., Jiang J., Kawaguchi T., Li S., Macalli M., Marquis P., Morris Z., Muñoz Maniega S., Miyamoto S., Okawa M., Paradise M., Parva P., Rundek T., Sargurupremraj M., Schilling S., Setoh K., Soukarieh O., Tabara Y., Teumer A., Thalamuthu A., Trollor J.N., Valdés Hernández M.C., Vernooij M.W., Völker U., Wittfeld K., Wong T.Y., Wright M.J., Zhang J., Zhao W., Zhu Y.-C., Schmidt H., Sachdev P.S., Wen W., Yoshida K., Joutel A., Satizabal C.L., Sacco R.L., Bourque G.; CHARGE consortium; Lathrop M., Paus T., Fernandez-Cadenas I., Yang Q., Mazoyer B., Boutinaud P., Okada Y., Grabe H.J., Mather K.A., Schmidt R., Joliot M., Ikram M.A., Matsuda F., Tzourio C., Wardlaw J.M., Seshadri S., Adams H.H.H., Debette S. (2023) Genomics of perivascular space burden unravels early mechanisms of cerebral small vessel disease. *Nat. Med.*, **29**(4), 950–962. DOI: 10.1038/s41591-023-02268-w
35. Добрынина Л.А., Гнедовская Е.В., Забитова М.Р., Кремнева Е.И., Шабалина А.А., Макарова А.Г., Цыпуштанова М.М., Филатов А.С., Калашишникова Л.А., Кротенкова М.В. (2020) Кластеризация диагностических МРТ-признаков церебральной микроангиопатии и её связь с маркерами воспаления и ангиогенеза. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*.

- Спецвыпуски, **120**(12–2), 22–31. [Dobrynina L.A., Gnedovskaya E.V., Zabitova M.R., Kremneva E.I., Shabalina A.A., Makarova A.G., Tzipushtanova M.M., Filatov A.D., Kalashnikova L.A., Krotenkova M.V. (2020) Clustering of diagnostic MRI signs of cerebral microangiopathy and its relationship with markers of inflammation and angiogenesis. S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry, **120**(12–2), 22–31.] DOI: 10.17116/jnevro202012012222
36. Соловьева Н.А., Новикова С.Е., Фарафонова Т.Е., Тихонова О.В., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2024) Протеом внеклеточных везикул плазмы крови как источник биомаркеров колоректального рака. Биомедицинская химия, **70**(5), 356–363. [Soloveva N.A., Novikova S.E., Farafonova T.E., Tikhonova O.V., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2024) Proteome of plasma extracellular vesicles as a source of colorectal cancer biomarkers. Biomeditsinskaya Khimiya, **70**(5), 356–363.] DOI: 10.18097/PBMC20247005356
37. Prianichnikov N., Koch H., Koch S., Lubeck M., Heilig R., Brehmer S., Fischer R., Cox J. (2020) MaxQuant software for ion mobility enhanced shotgun proteomics. Mol. Cell. Proteomics, **19**(6), 1058–1069. DOI: 10.1074/mcp.TIR119.001720
38. Tyanova S., Cox J. (2018) Perseus: a bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. Methods Mol. Biol., **1711**, 133–148. DOI: 10.1007/978-1-4939-7493-1_7
39. Szklarczyk D., Nastou K., Koutrouli M., Kirsch R., Mehryary F., Hachilif R., Hu D., Peluso M.E., Huang Q., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2025) The STRING database in 2025: protein networks with directionality of regulation. Nucleic Acids Res., **53**(D1), D730–D737. DOI: 10.1093/nar/gkac1113
40. Wang R.Y., Rudser K.D., Dengel D.R., Evanoff N., Steinberger J., Movsesyan N., Garrett R., Christensen K., Boylan D., Braddock S.R., Shinawi M., Gan Q., Montañó A.M. (2020) Abnormally increased carotid intima media-thickness and elasticity in patients with Morquio A disease. Orphanet J. Rare Dis., **15**, 73. DOI: 10.1186/s13023-020-1331-y
41. Powell A.W., Taylor M.D., Burrow T.A., Hopkin R.J., Prada C.E., Jefferies J.L. (2017) Widespread vasculopathy in a patient with Morquio A syndrome. Texas Heart Inst. J., **44**(6), 420–423. DOI: 10.14503/THIJ-16-6121
42. Fujita K., Teramura N., Hattori S., Irie S., Mitsunaga-Nakatsubo K., Akimoto Y., Sakamoto N., Yamamoto T., Akasaka K. (2010) Mammalian arylsulfatase A functions as a novel component of the extracellular matrix. Connect. Tissue Res., **51**(5), 388–396. DOI: 10.3109/03008200903537097
43. Zarekiani P., Breur M., Wolf N.I., de Vries H.E., van der Knaap M.S., Bugiani M. (2021) Pathology of the neurovascular unit in leukodystrophies. Acta Neuropathol. Commun., **9**, 103. DOI: 10.1186/s40478-021-01206-6
44. Kim S.H., Cho Y.-R., Kim H.-J., Oh J.S., Ahn E.-K., Ko H.-J., Hwang B.J., Lee S.-J., Cho Y., Kim Y.K., Stetler-Stevenson W.G., Seo D.-W. (2012) Antagonism of VEGF-A-induced increase in vascular permeability by an integrin $\alpha 3\beta 1$ -Shp-1-cAMP/PKA pathway. Blood, **120**(24), 4892–4902. DOI: 10.1182/blood-2012-05-428243
45. Hoeh A.E., Chang J.-H., Mueller R.S., Basche M., Fantin A., Sepetis A., de Rossi G., Dritsoula A., Ali R.R., Turowski P., Moss S.E., Greenwood J. (2025) LRG1 alters pericyte phenotype and compromises vascular maturation. Cells, **14**(8), 690. DOI: 10.3390/cells14080593
46. Scherzer C.R., Offe K., Gearing M., Rees H.D., Fang G., Heilman C.J., Schaller C., Bujo H., Levey A.I., Lah J.J. (2004) Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. Arch. Neurol., **61**(8), 1200–1205. DOI: 10.1001/archneur.61.8.1200
47. Иллариошкин С.Н., Абрамычева Н.Ю., Калашиникова Л.А., Максимова М.Ю., Коновалов Р.Н., Степанова М.С., Федотова Е.Ю. (2013) Клинический и молекулярно-генетический анализ церебральной аутосомно-доминантной артериопатии с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (ЦАДАСИЛ) в российских семьях. Неврологический журнал, **18**(4), 8–16. [Illarioshkin S.N., Abramychcheva N.Yu., Kalashnikova L.A., Maximova M.Yu., Kononov R.N., Stepanova M.S., Fedotova E.Yu. (2013) Clinical and molecular genetic analysis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) in Russian families. Nevrologicheskii Zhurnal, **18**(4), 8–16.]
48. Bugiani M., Kevelam S.H., Bakels H.S., Waisfisz Q., Ceuterick-de Grootte C., Niessen H.W.M., Abbink T.E.M., Lesnik Oberstein S.A.M.J., van der Knaap M.S. (2016) Cathepsin A-related arteriopathy with strokes and leukoencephalopathy (CARASAL). Neurology, **87**(17), 1777–1786. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003251
49. Engel J., Prockop D.J. (1991) The zipper-like folding of collagen triple helices and the effects of mutations that disrupt the zipper. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., **20**, 137–152. DOI: 10.1146/annurev.bb.20.060191.001033
50. Caglayan E., Romeo G.R., Kappert K., Odenthal M., Südkamp M., Body S.C., Shernan S.K., Hackbusch D., Vantler M., Kazlauskas A., Rosenkranz S. (2010) Profilin-1 is expressed in human atherosclerotic plaques and induces atherogenic effects on vascular smooth muscle cells. PLOS One, **5**(10), e13608. DOI: 10.1371/journal.pone.0013608
51. Wang Y., Zhang J., Gao H., Zhao S., Ji X., Liu X., You B., Li X., Qiu J. (2014) Profilin-1 promotes the development of hypertension-induced artery remodeling. J. Histochem. Cytochem., **62**(4), 298–310. DOI: 10.1369/0022155414520978
52. Xie Q., Ma L., Xiao Z., Yang M., Chen M. (2023) Role of profilin-1 in vasculopathy induced by advanced glycation end products (AGEs). J. Diabetes Complications, **37**(5), 108415. DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2023.108415

Поступила в редакцию: 16.12.2025.
 После доработки: 15.03.2026.
 Принята к печати: 17.03.2026.

**A PILOT SHOTGUN PROTEOMIC PROFILING OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS
IN PATIENTS WITH DIFFERENT MRI PHENOTYPES OF CEREBRAL SMALL VESSEL DISEASE**

A.A. Geints^{1}, P.S. Shlapakova¹, L.A. Dobrynina¹, E.I. Kremneva¹, E.V. Khriapova², V.G. Zgoda², O.V. Tikhonova²*

¹Russian Center of Neurology and Neurosciences,
80 Volokolamskoye shosse, Moscow, 125367 Russia; *e-mail: gejnts.a.a@neurology.ru

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia

Age-related cerebral microangiopathy (CMA) also known as cerebral small vessel disease (CSVD), is a leading cause of cognitive impairment and stroke. Difficulties in studying CSVD are associated with limitations in visualizing small vessels and diagnostics based on MRI signs of brain damage (white matter hyperintensity, lacunae, microbleeds, etc.). Our previous assessment of each CSVD MRI feature using a four-point severity scale and distribution among brain region using cluster analysis revealed the existence of two MRI types. They do not differ in the severity of vascular risk factors but do differ in the severity of clinical manifestations and levels of circulating plasma biomarkers. Here we present results of a pilot panoramic study of the proteome of peripheral blood mononuclear cells from patients with CSVD MRI types I and II, as well as healthy volunteers. CSVD patients showed a tendency toward downregulation of proteins associated with vesicular trafficking and extracellular matrix (ECM) remodeling relative to control values. Patients with CSVD MRI type 1 showed trends toward insufficient activation of protective proteins (arginase-1, thioredoxin, autophagy and protein stress regulators) and excessive activation of platelet proteins and vascular wall remodeling regulators (such as profilin-1), compared to patients with CSVD MRI type 2. These results indicate the need to study the microstructure of the basement membrane, vascular ECM, and perivascular spaces in cerebral small vessels.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: cerebral microangiopathy; cerebral small vessel disease; proteomic studies; magnetic resonance imaging; STRIVE criteria; protein mass spectrometry

Funding. The proteomic analysis was conducted as part of the research project “The Effect of Compounds with Geroprotective Properties on Single Biomacromolecules, Model Objects, and the Human Body” with financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement no. 075-15-2024-643).

Received: 16.12.2025; revised: 15.03.2026; accepted: 17.03.2026.