

Т.С. СВЕКЛИНА, С.Б. ШУСТОВ, В.А. КОЗЛОВ, С.Н. КОЛЮБАЕВА,
А.Н. КУЧМИН, Н.А. КОЧЕРГИНА, П.Д. ОКТЫСЮК, В.В. КОНЯЕВ

ПРОТЕОМНЫЕ РАЗЛИЧИЯ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-го ТИПА И ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ С СОХРАНЕННОЙ И СНИЖЕННОЙ ФРАКЦИЕЙ ВЫБРОСА

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность, фракция выброса, сахарный диабет 2-го типа, протеом, белки, экзосомы, масс-спектрометрия.

Поиск белковых маркеров хронической сердечной недостаточности в сочетании с сахарным диабетом 2-го типа является актуальной задачей.

Цель исследования: определение фенотипа больных с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной или низкой фракцией выброса, в том числе отягощенной сахарным диабетом 2-го типа, на основе изучения белкового профиля крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, денситометрии и масс-спектрометрической идентификации белков.

Материал и методы. У 48 пациентов (69,1±3,1 года) с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной или низкой фракцией выброса с или без сахарного диабета 2-го типа и здоровых добровольцев исследовали протеом различными методами (выделение экзосом методом ультрацентрифугирования с последующим анализом протеома экзосом сывороток; анализ триптических низкомолекулярных фрагментов цельных сывороток пациентов методом полуквантитативной МАЛДИ масс-спектрометрии в присутствии изотопно-меченного стандарта; электрофоретическое разделение компонентов сыворотки в полиакриламидном геле с последующей денситометрией; анализ сыворотки методами ВЭЖХ-МС/МС) с целью определения специфических белков, ответственных за развитие хронической сердечной недостаточности у больных сахарным диабетом 2-го типа.

Результаты исследования. Наше исследование выявило наличие белков воспаления (фибриноген бета, гаптоглобин, серотрансферрин) и печеночной ткани (альфа-1-антитрипсин, апоВ) у исследуемых групп, часть из которых была снижена по сравнению с контрольной группой (апоВ, фибриноген бета, серотрансферрин, альфа-1-антитрипсин) на фоне проводимой стандартной терапии. ВЭЖХ-МС/МС с применением *timS* TOF Pro продемонстрировала более перспективные результаты. Различия между группами сравнения, полученные с помощью «gel-based» подхода (гель-электрофорез в полиакриламидном геле с дальнейшей денситометрией), были показаны для ряда других белков (сравнительно с «gel-free» подходом, подразумевающим только ВЭЖХ-МС/МС, без использования разделения в геле), что также может объясняться ограничениями каждого из методов: данные подходы к исследованию протеома являются скорее взаимодополняющими, чем взаимозаменяемыми.

Выводы. Существуют вариации циркулирующих белков у пациентов с сердечной недостаточностью, связанные с различиями патофизиологии хронической сердечной недостаточности, которые не полностью фиксируются действующей классификацией, основанной на определении фракции выброса. Высокопроизводительные протеомные методы анализа позволяют более точно определить критерии фенотипов хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса и, соответственно, механизмы формирования патогенетических путей возникновения данного состояния.

Введение. В последнее десятилетие стало ясно, что неблагоприятный прогноз хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (ХСН-СФВ) определяется количеством и выраженностью структурно-функциональных перестроек миокарда, изменениями и интенсивностью внутри-миокардиальных взаимодействий. Парадигма развития хронической сердечной недостаточности (ХСН) предполагает следующую последовательность

событий [26]: 1) сопутствующие состояния и заболевания, такие как избыточный вес/ожирение, сахарный диабет 2-го типа (СД2), хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и артериальная гипертензия (АГ), приводят к развитию вялотекущего малосимптомного системного воспаления; 2) оно постепенно поражает эндотелиальный гликокаликс коронарного сосудистого русла и микрососудистые коллатерали; 3) генерализованное повреждение гликокаликса с развитием эндотелиопатии дестабилизирует сосудистую стенку с повышением ее проницаемости и парацеллюлярного транспорта; 4) в результате происходит инфильтрация миокарда кардиотоксическими, воспалительными и профибротическими агентами, снижается биодоступность вазоактивных медиаторов (оксида азота и циклического гуанозинмонофосфата) и активность протеинкиназы G в кардиомиоцитах; 5) это, в свою очередь, вызывает гипертрофию и снижение эластичности миокарда из-за гипофосфатирования титина; 6) в результате развивается жесткость кардиомиоцитов и прогрессирующий интерстициальный фиброз, приводящий к диастолической жесткости левого желудочка и САД.

Ремоделирование миокарда при ХСН-СФВ отличается от такового при ХСН с низкой фракцией выброса (ХСН-НФВ) за счет потери кардиомиоцитов и структурного истощения синцития с развитием преимущественно эксцентрического ремоделирования, объемной перегрузки и постоянной нейрогуморальной активации [16, 31].

Диагностика ХСН на ранней стадии ремоделирования миокарда позволит своевременно начать лечение, тем самым улучшив прогноз и качество жизни пациентов. В настоящее время наиболее информативными диагностическими инструментами являются эхокардиография, диастолический стресс-тест и определение мозгового натрийуретического пептида (BNP) и его N-концевого пропептида (NT-proBNP) [5]. Тем не менее эти методы диагностически имеют низкую специфичность как на ранних стадиях ХСН, так и в условиях стабильного течения уже сформировавшегося заболевания. Альтернативой является возможность выявления генетической предрасположенности к ХСН, что оказывает существенную помощь в определении групп риска. Раннее выявление известных полиморфизмов генов, ассоциированных с ХСН, имеет ценное прогностическое значение [2], но не позволяет точно определить ранний дебют заболевания и своевременно начать профилактическое лечение.

Наличие генов предрасположенности предполагает существование измененных метаболических путей с участием соответствующих белковых структур, вовлеченных в генез ХСН. Несмотря на полиэтиологическую природу ХСН, эти пути, по-видимому, связаны с эффективным функционированием компенсаторных механизмов. В связи с этим выяснение компонентов метаболических путей, определяющих развитие ХСН у предрасположенных пациентов, является актуальной задачей, направленной на создание новых методов неинвазивной ранней диагностики ХСН. Для ее решения мы применили серию «гелевых» и «безгелевых» методов протеомного анализа, исследуя как сыворотку цельной крови, так и ее отдельные компоненты (экзосомы).

Цель исследования – определение фенотипа больных с ХСН-СФВ, в том числе отягощенным СД2, на основе изучения белкового профиля крови с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, денситометрии и масс-спектрометрической идентификации белков.

Материал и методы. В исследование были включены пациенты с ранее установленным диагнозом ХСН, СД2 в соответствии с актуальными на период

эксперимента клиническими рекомендациями [1, 4], находящиеся в компенсированном состоянии на правильно подобранной терапии.

Критерии включения (для основной группы): наличие СД2 (длительность заболевания не менее пяти лет) и ишемической болезни сердца (ИБС) с сохраненной фракцией выброса (ФВ); подписание добровольного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии исключения (для основной группы): отказ от участия в исследовании; пациенты с кардиомиопатией, ИБС, врожденными или приобретенными пороками сердца и клапанов, нарушениями ритма, инфекционными, онкологическими и аутоиммунными заболеваниями, патологией дыхательной системы, синдромом обструктивного апноэ сна, анемией, острым состоянием.

Группы сравнения включали пациентов с перенесенным инфарктом миокарда (пациенты со сниженной ФВ с СД2 и без него), хронической болезнью почек (пациенты с нормальной ФВ, но без СД2).

Пациенты были сопоставимы по возрасту (средний возраст $69,1 \pm 3,1$ года), индексу массы тела и длительности заболевания. Сбор данных проводился в соответствии с международным стандартом GCP. Протокол исследования был рассмотрен и одобрен локальным этическим комитетом Военно-медицинской Академии имени С.М. Кирова (протокол № 271 от 22.11.2022).

Исследование проводилось в несколько этапов и включало изучение 78 образцов сыворотки крови. Забор биологических образцов и их первичная обработка проходили в клинике пропедевтики внутренних болезней Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова. Фиксация белка, пробоподготовка и идентификация образцов проводились в НИИ им. А.А. Смородинцева и Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Санкт-Петербургского государственного университета. В ходе исследования образцы сыворотки крови были проанализированы с помощью различных методов протеомного анализа для выявления белков, которые в перспективе могут быть использованы в качестве маркеров ХСН.

Первый этап исследования. Для исследования было отобрано 48 образцов сыворотки крови добровольцев из шести групп: 1) контроль (5 мужчин / 2 женщины) и пациентов с: 2) ХСН-СФВ и СД2 (3 мужчин / 4 женщины), 3) ХСН-СФВ без СД2 (6 мужчин / 5 женщин), 4) ХСН-НФВ и СД2 (3 мужчин / 5 женщин), 5) ХСН-НФВ без СД2 (9 мужчин / 0 женщин) и 6) СД2 без ХСН (4 мужчин / 2 женщины). Протеомный анализ аликвот сыворотки крови пациентов проводился в НИИ им. Смородинцева. Для исследования были выбраны экзосомы, циркулирующие в крови и несущие молекулы регуляторной информации, такие как пептиды и РНК [36]. Изменение пептидного состава экзосом сопровождается процессами, инициируемыми развитием сердечной недостаточности [25]. Именно регуляторные пептиды, участвующие в патологическом процессе, могут транспортироваться в составе экзосом от клетки к клетке. При фракционировании (выделении экзосом для дальнейшего анализа) из анализа исключаются другие пептиды, не участвующие в регуляторных процессах. Предполагалось, что обогащенные экзосомами фракции биологических жидкостей пациентов будут содержать пептидные маркеры, связанные с компенсаторными процессами, сопровождающими развитие сердечной недостаточности различной этиологии.

Выделение экзосом методом ультрацентрифугирования (с контролем морфологии экзосом методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)) и анализ протеома экзосом сывороток методом электрофореза с последующей денситометрией. Сыворотки пациентов из каждой группы объединяли,

чтобы получить 12 мл материала из каждой группы. После сыворотку разбавляли в четыре раза фосфатно-солевым буфером и центрифугировали при 3000g в течение 30 мин на 8 °С для осаждения клеток и клеточного мусора. Надосадочную жидкость снова центрифугировали при 10000g в течение 30 мин при 8 °С для удаления микровезикул. Полученный супернатант центрифугировали при 110000g в течение 2 ч на 4 °С для осаждения экзосом. Осадок повторно растворяли в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Для ПЭМ образцы раствора пептидов в концентрации 1 мг/мл наносили на медные электронно-микроскопические решетки, покрытые коллодионной подложкой. После адсорбции пептидов на подложке в течение 1 мин решетки дважды промывали дистиллированной водой. Затем образцы на решетках негативно контрастировали 2%-м раствором натриевой соли фосфорнотунгусовой кислоты в течение 1 мин. После контрастирования сетки высушивали и исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM 1011 при ускоряющем напряжении 80 кВ. Электронные микрофотографии были получены с помощью цифровой камеры Morada (Olympus Inc.) [21].

Анализ триптических пептидов из цельных сывороток пациентов методом полуколичественной МАЛДИ масс-спектрометрии в присутствии изотопно-меченного стандарта («gel-free» подход). Сыворотки пациентов разводили в 25 раз в воде, а затем смешивали с трипсином (конечная концентрация 0,05 мг/мл в 50 мМ бикарбонате аммония) в равных объемах. Образцы инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением равного объема 1%-го раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 10%-го водного раствора ацетонитрила. Для измерения относительного количества пептида к сыворотке после трипсинизации добавляли стандарт в выбранном соотношении (описано в разделе «Результаты»). Стандарт готовили следующим образом: 20 мкл тяжелой воды ($H_2^{18}O$) в 10%-й ТФУ добавляли к суспензии пептида и инкубировали при 60 °С в течение 60 мин, после чего раствор высушивали в вакуумном концентраторе Eppendorf Plus и повторно растворяли в воде. Конечная концентрация стандарта составляла 4×10^{-6} М. Масс-спектры регистрировали в рефлексном режиме детектирования положительных ионов с использованием матрицы НССА на масс-спектрометре UltrafleXtreme (Bruker). Для каждого спектра собирали не менее 5000 лазерных импульсов.

Электрофоретическое разделение компонентов сыворотки в полиакриламидном геле («gel-based» подход). Электрофорез белков в 8%-м полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в планшетах 10×10 см при градиенте напряжения 20 В/см в геле следующего состава: 8%-й акриламид (акриламид/метиленбисакриламид = 29:1), 37 мМ Tris-HCl, pH 9,4, 0,01%-й SDS, 0,01%-й персульфат аммония, 0,001%-й тетраметилэтилендиамин (TEMED) с использованием электродного буфера, содержащего 0,125 М Tris-HCl, pH 6,8 и 0,1%-й SDS. Гель окрашивали раствором Кумасси следующим образом: 1) выдерживали 15 мин в фиксаторе (35%-го этанола, 10%-й уксусной кислоты в воде), 2) после этого инкубировали 30 мин в окрашивающем растворе (0,25%-й Coomassie R-250, BioRad, 25%-го этанола, 10%-го водного раствора уксусной кислоты, 3) затем промывали в растворе 25%-го этанола, 10%-м водном растворе уксусной кислоты до полного обесцвечивания фона и 4) переносили гель в дистиллированную воду. Изображения окрашенного геля получали на станции документирования гелей ChemiDoc MP (Bio-Rad, США).

Для анализа аминокислотной последовательности белка проводили ферментативный гидролиз геля трипсином после электрофореза в ПААГ. Фрагмент окрашенной области вырезали, краситель отмывали дважды по 100 мкл смеси 30 мМ раствора бикарбоната аммония и 40%-го водного раствора ацетонитрила. После этого образец обезвоживали в 100%-м ацетонитриле, затем ацетонитрил удаляли и фрагмент геля выдерживали на воздухе до полного испарения ацетонитрила. После высушивания к гелевому фрагменту добавляли 2 мкл раствора трипсина (20 мкг/мл в 50 мМ бикарбонате аммония) и инкубировали в твердотельном термостате Gnome при 37 °С в течение 19 ч. Реакцию останавливали 3 мкл раствора 1%-го ТФУ, 10%-го ацетонитрила в воде.

Для идентификации белков полученный набор триптических пептидов смешивали в равных объемах с матрицей HCCA, наносили на стальную мишень и анализировали в режиме рефлекторной детекции положительных ионов на масс-спектрометре UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF. Для каждого спектра суммировалось не менее 5000 лазерных импульсов. После измерения спектры дополнительно калибровали по внутреннему стандарту в программе flexAnalysis (пики при m/z 842,51 и 2211,01, соответствующие пептидам, полученным при автопротеолизе трипсина). Белки идентифицировали с помощью MASCOT, обратившись к базе данных SwissProt (загружена в октябре 2023 г.) и выполнив поиск только среди белков человека. Окисление остатков метионина и дезамидирование оценивались как изменяемые модификации. Точность определения массы была ограничена 50 ppm. Допускалось до двух трипсиновых ошибок (пропуск участка протеолиза).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью непараметрического одностороннего теста ANOVA с поправкой на множественные сравнения. Пороговое значение статистической оценки составляло 56 баллов. Если значение балла превышало пороговое значение, идентификация белка считалась статистически значимой – $p < 0,05$. В дальнейшем различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Второй этап исследования. В Ресурсном центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» СПбГУ (государственное задание №АААА-А19-119091690086-6) на образцах сыворотки тех же групп осуществляли хроматографию с масс-спектрометрической идентификацией белков («gel-free» подход).

Протеомный анализ сыворотки методами ВЭЖХ-МС/МС и статистическая обработка полученных данных. После забора крови у пациентов полученные образцы сыворотки фиксировали в лизирующем буфере (25 мМ Трис pH 8,5 / 7 М мочевины / 2 М тиомочевина / 4% CHAPS (детергент 3-[(3-холомидопропил) диметиламмоний]-1-пропансульфонат)) в объемном соотношении 1:1 и замораживали при температуре –80 °С. Подготовка образцов: для обеспечения равномерного распределения компонентов и полного растворения белковых агрегатов после оттаивания образцы вихревым методом перемешивали в течение 10 мин и обрабатывали в ультразвуковой ванне в течение 10 мин с добавлением 1М ДТТ до конечной концентрации в растворе 40 мМ. Затем из образцов отбирали аликвоты для выделения белка. Их переносили в чистые пробирки, белок осаждали ацетоном, полученный осадок дважды промывали холодным метанолом (HRP для ВЭЖХ), сушили и повторно растворяли в буфере (8 М мочевины / 50 мМ бикарбонат аммония / 20 мМ ДТТ). Полученную концентрацию белка измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0, набора реагентов QuDye Protein. Для дальнейшего трипсинолиза отбирали

объемы растворов, содержащие по 20 мкг белка. Образцы доводили до полного объема буфером для лизиса (8 М мочевины / 50 мМ бикарбонат аммония), затем инкубировали с 50 мМ ДТТ (объем ДТТ добавлен 1/10 объема исходного раствора) в течение 1 ч при температуре +37 °С для восстановления дисульфидных связей, а затем с 150 мМ йодацетамидом (объем йодацетамида добавлен 1/10 объема исходного раствора) в течение 15 мин в темноте при комнатной температуре для карбоксиметилирования восстановленных связей. Затем образцы растворяли в семи объемах 50 мМ бикарбоната аммония, добавляли 400 нг трипсина Trypsin Gold (соотношение трипсина и белка в образце по весу 1:50) и инкубировали образцы при температуре +37 °С в течение 18 ч. Для инактивации трипсинолиза к образцам добавляли 1/10 объема 10%-й муравьиной кислоты. Растворы триптических пептидов, полученные после трипсинолиза, очищали методом твердофазной экстракции (Phase C18, Empore™ Extraction Disks, 3М, США, 4 слоя) с использованием StageTips [27] по опубликованному протоколу [23] с минимальными изменениями (вместо 0,1%-х растворов ТФИ использовали 0,1%-е растворы муравьиной кислоты). Очищенные образцы высушивали в вакуумном концентраторе (CentriVap Vacuum Concentrator, Labconco, США) и повторно растворяли в воде с 0,1%-й муравьиной кислотой до приблизительной концентрации пептидов 250 нг/мкл для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Приблизительно 500 нг триптических пептидов были собраны для быстрого протеомного анализа (ВЭЖХ-МС/МС с измерением ионной подвижности) с использованием системы ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) nanoElute (Bruker Daltonics, Германия) и масс-спектрометра TimsToF Pro (Bruker Daltonics, Германия). ВЭЖХ проводили с использованием предварительной колонки Acclaim PepMap 5 mm Trap Cartridge и аналитической колонки Bruker TEN (неподвижная фаза – C18 ReproSil AQ, длина 100 мм, внутренний диаметр 75 мкм, размер частиц неподвижной фазы 1,9 мкм, диаметр пор неподвижной фазы 120 Å (Bruker Daltonics, Германия) в градиентном режиме при скорости потока 400 нл/мин; температура аналитической колонки 60 °С). Фаза А – водный раствор 0,1%-й муравьиной кислоты; фаза Б – ацетонитрил с добавлением муравьиной кислоты до концентрации 0,1%. Градиент: от 2 до 35%-й фазы В за 35 мин, от 35 до 95%-й фазы В за 0,5 мин, затем промывка 95%-й фазой В в течение 10 мин, затем снижение до 2% фазы В через 0,5 мин. Параметры источника электрораспылительной ионизации (Captive Spray): напряжение на входном капилляре 1500 В, поток азота 3 л/мин, температура источника +180 °С. Масс-спектрометрический анализ проводили в автоматическом режиме DDA PASEF: регистрация положительных ионов, цикл 1,1 с, фрагментация ионов с минимальным зарядом +2, детектируемый диапазон m/z от 100 до 1700, диапазон ионной подвижности $1/k_0$ от 0,6 до 1,6 В·с/см².

Для идентификации обнаруженных пептидов использовали программу Peaks Xpro (v.10.6) (Bioinformatics Solutions Inc., Канада). Поиск проводили по базе данных белков человека Uniprot (загружена 19.01.2024) и базе данных общих белковых загрязнений cRAP (<https://www.thegpm.org/crap/>). Параметры поиска: не более двух пропущенных сайтов трипсинолиза; заряд иона от 2 до 7; допуск на массу иона-предшественника 10 ppm; допуск на массу дочернего иона 0,05 ppm; FDR (коэффициент ложного обнаружения) < 1%; в дальнейший статистический анализ включались белки, в которых было обнаружено не менее двух уникальных пептидов.

Статистический анализ проводили в среде языка R (R v.4.1.2; R Core Team, 2021). Графики строили с помощью пакетов ggplot2 [35], Venn diagram [12] и EnhancedVolcano [9]. Качественное сравнение групп основывалось на наличии/отсутствии белков в образцах: качественным отличием считался белок, присутствующий не менее чем в 3/4 образцов одной группы и полностью отсутствующий в образцах второй группы. Протеомные данные анализировались количественно на основе площади хроматографических пиков соединений, соответствующих их количеству в образце. В окончательный анализ включали белки, присутствующие в $\geq 2/3$ образцов. Для устранения недостающих значений проводили интерполяцию методом средней замены k-nearest neighbours [34] с использованием пакета impute [18]. Затем данные были логарифмированы по основанию 2, после чего была проведена квантильная нормализация [10, 20] с использованием пакета статистических программ limma [28]. Протеомы всех образцов были проанализированы методом анализа главных компонент с использованием пакета mixOmix [29]. Для выявления белков, уровни которых достоверно различались между группами сравнения, использовали умеренный t-тест (пакет limma) с уровнем значимости $\alpha = 0,05$.

Результаты исследования. Первый этап. Результаты протеомного анализа, в зависимости от использованного метода, были следующими:

1) при выделении экзосом методом ультрацентрифугирования с последующим анализом протеома сывороточных экзосом различий между группами пациентов не обнаружено;

2) анализ низкомолекулярных триптических фрагментов из цельной сыворотки пациентов методом полуквантитативной масс-спектрометрии МАЛДИ в присутствии стандарта, меченного изотопами, не выявил статистически значимых различий между исследуемыми группами пациентов;

3) только электрофоретическое разделение компонентов сыворотки в полиакриламидном геле с последующей денситометрией выявило статистически значимые различия в концентрации белков между высокомолекулярными фракциями сывороток исследуемых групп пациентов. В качестве диагностически ценных белков были выделены серотрансферрин, альбумин, $\alpha 1$ -антитрипсин и фибриноген β , концентрация которых во всех группах была ниже, чем в контрольной группе (табл. 1).

Таблица 1

Результаты масс-спектрометрической идентификации белков на первом этапе (классификация белков по OS=Homo sapiens)

Белок	Score	ID белка	Масса, Да
$\alpha 2$ -Макроглобулин	123	A2MG_HUMAN	163 188
Церулоплазмин	58	CERU_HUMAN	122 128
Комплемент С3	122	CO3_HUMAN	187 030
Серотрансферрин	80	TRFE_HUMAN	77 014
Сывороточный альбумин	133	ALBU_HUMAN	69 321
$\alpha 1$ -Антитрипсин	62	A1AT_HUMAN	46 707
β -Цепь фибриногена	72	FIBB_HUMAN	55 892
γ -Цепь фибриногена	79	FIBG_HUMAN	51 479
γ -Цепь области С иммуноглобулина G	59	IGHG1_HUMAN	36 083
Гаптоглобин	80	HPT_HUMAN	45 177
Аполипопротеин А-I	120	APOA1_HUMAN	30 759
β -Субъединица гемоглобина	84	HBB_HUMAN	15 988

Второй этап. Протеомный анализ, проведенный на втором этапе, также не выявил качественных отличий белкового состава сыворотки крови у пациентов с ХСН-СФВ. Тем не менее, по сравнению с группой контроля, были определены количественные изменения белков E1A689 и C0JYY2 (изоформы белка аполипопротеина В (АпоВ)) (табл. 2), концентрации которых были выше у пациентов группы контроля.

Таблица 2

Сравнение группы ХСН-СФВ и контроля по белкам АпоВ на втором этапе

Белки	logFC	Средняя экспрессия	t	p	adj. p-value	B
tr E1A689 E1A689_HUMAN	2,626038	13,77487	5,071372	0,000359	0,035587	0,414658
tr C0JYY2 C0JYY2_HUMAN	2,626039	13,77487	5,071372	0,000359	0,035587	0,414658

Примечание. Здесь и далее столбец «Белки» содержит кодовое название белка в базе данных Uniprot; logFC – логарифм диапазона изменения; adj. P-value – значения p-value с поправкой на множественные сравнения.

При сравнении групп ХСН-СФВ и ХСН-НФВ с СД2 качественных отличий белкового состава сыворотки не выявлено. Однако были выявлены количественные отличия, представленные в табл. 3. Так, в группе ХСН-СФВ отмечалось повышение количества белков H0Y300 и J3QR68 (изоформы белка гаптоглобина). При сравнении групп ХСН-СФВ и СД2 с ХСН-СФВ без СД2 и ХСН-НФВ без СД2 ни количественных, ни качественных отличий не выявлено.

Таблица 3

Сравнение групп ХСН-СФВ и ХСН-НФВ с СД2 по изоформам гаптоглобина на втором этапе

Белки	logFC	Средняя экспрессия	t	p	adj. p-value	B
tr H0Y300 H0Y300_HUMAN	1,118967	19,666694	5,031747	0,000399	0,032949	0,373232
tr J3QR68 J3QR68_HUMAN	1,118967	19,666694	5,031747	0,000399	0,032949	0,373232

Таким образом, проведенное исследование позволило выявить отличия исследуемых групп от группы контроля в виде снижения концентраций серотрансферрина, альбумина, α 1-антитрипсина и фибриногена β на первом этапе; при сравнении группы контроля и основной группы (ХСН-СФВ) определено снижение концентрации белков АпоВ в группе с ХСН-СФВ, при сравнении групп с ХСН-СФВ и ХСН-НФВ с СД2 выявлено повышение гаптоглобина в группе ХСН-СФВ на втором этапе.

Обсуждение. Согласно последним исследованиям в области протеомики, отличительная специфика протеомного профиля пациентов с хронической болезнью почек не ограничивается отдельными белками, а представлена их комплексами. В большинстве исследований выявлена повышенная экспрессия не только кардиопротекторных белков, в частности связанных с защитой от окислительного стресса и негативной регуляцией воспаления, но и белков, характеризующихся экстракардиальной экспрессией в жировой ткани (PXDN, RBP7), почках (HAVCR1), легких (ACVRL1) и печени (GDF2, ASGR1, EPO, IGFALS) [7]. Белки, коррелирующие с окислительным фосфорилированием, окислением β -жирных кислот и нарушениями сократимости, также были обнаружены при наличии СД2 у пациентов [11, 32].

В нашем исследовании при сравнении ЧМТ-КФВ с СД2 и контрольной группой были выявлены количественные различия в уровнях двух белков: аполипопротеина В (АпоВ), код E1A689_HUMAN, и аполипопротеина В (включая Ag(X)), код C0JYY2_HUMAN. Белок апоВ обволакивает поверхность липопротеинов в виде макромолекулярных каркасов, обеспечивая их структурную целостность и способствуя проникновению в уязвимую зону сосудистой интимы. Таким образом, повышенный уровень липопротеинов апоВ инициирует и форсирует формирование атеросклеротической бляшки с последующей ее дестабилизацией [14, 33]. Примечательно, что эти белки были характерны для обеих групп, но их концентрация была выше в контрольной группе. Вероятно, это можно объяснить сопутствующей терапией у пациентов с САД и СД2.

Сравнивая группы ХСН-СФВ и ХСН-НФВ у пациентов с СД2, мы обнаружили количественные изменения в двух изоформах гаптоглобина: H0Y300 и J3QR68, которые преобладали в группе с нормальной ФВ. Во-первых, гаптоглобин является мощным антиоксидантом – он задерживает свободный гемоглобин плазмы и связывается с ним, обеспечивая переработку гемового железа в печени, предотвращая повреждение почек. Гаптоглобин также ингибирует действие оксида азота, стимулирует и поддерживает ангиогенез, обладает иммуномодулирующим действием, выступая в качестве противовоспалительного агента острой фазы воспаления [3, 15]. Таким образом, гаптоглобин обладает характерным функциональным спектром, позволяющим предположить его участие в развитии микроциркуляторной дисфункции, лежащей в основе развития и прогрессирования ХСН, однако полученные данные достаточно противоречивы. Так, в крупном продольном (более 22 лет) шведском популяционном исследовании, основанном на длительном наблюдении за 6071 пациентом, было показано, что повышение концентрации пяти острофазных провоспалительных белков: фибриногена, церулоплазмينا, гаптоглобина, оросомукоида и альфа1-антитрипсина, ассоциируется с повышенным риском развития инфаркта миокарда, инсульта или ХСН [13]. Однако прогностическая роль гаптоглобина трактуется совершенно иначе В. Naas et al., которые подчеркивают ухудшение прогноза у пациентов с инфарктом миокарда на фоне низких концентраций гаптоглобина [17]. Наблюдая 41 пациента с декомпенсированной сердечной недостаточностью, D.Y. Lu et al. выявили ухудшение выживаемости на фоне снижения концентраций гаптоглобина [22]. Эти данные подтверждены результатами исследования В.И. Подзолкова с соавт., которые рассматривали низкий уровень гаптоглобина как потенциальный маркер осложнений при ХСН [6]. В нашем исследовании более низкая концентрация гаптоглобина также была характерна для лиц с ишемической ХСН-НФВ.

Учитывая широту и сложность патогенеза ХСН, интересно отметить, что в нашем исследовании выявлено наличие воспалительных белков (фибриноген β , гаптоглобин, серотрансферрин) и белков ткани печени (α -1-антитрипсин, апоВ), некоторые из которых на фоне терапии были снижены по сравнению с контрольной группой (апоВ, фибриноген бета, серотрансферрин, альфа-1-антитрипсин). Ряд авторов также выявили белки окисления жирных кислот в формировании протеомного профиля пациентов с СД2 и ХСН, однако исследования ограничивались изучением биопсийного материала. Так, в образцах ХСН-ХФВ и СД2 была обнаружена сниженная экспрессия генов белков, входящих в состав комплексов митохондриальной электронно-транспортной цепи: комплекс I (NADH-дегидрогеназа – NDUFA4, NDUFA6, NDUFA9, NDUFA11,

NDUFA13, NDUFB5, NDUFC2, NDUFS1, NDUFS5 и NDUFS7), комплекс II (сукцинатдегидрогеназа – SDHC), комплекс III (цитохром-редуктаза – UQCRFS1 и UQ2), комплекс IV (цитохром-оксидаза – MT-CO₂) и комплекс V (АТФ-синтаза – ATP5F1A). Также выявлено истощение в тканях ряда белков (MICOS13 – mitochondrial contact site and cristae organisation system, 13 KD sub-unit, 120 kDa dynamin-like protein, mitochondrial, encoded by the OPA1 gene, AFG3L2 – AFG3-подобная матричная AAA-пептидаза, субъединица 2, FIS1 – белок деления митохондрий 1 и PHB2 – прогибитин 2), связанных с поддержанием целостности митохондрий и ответственных за поглощение пирувата, кодируемых генами SLC25A5 (ген транслоказы ADP/ATP 2), SLC25A11 (ген митохондриального 2-оксоглутарата/белка-переносчика малата), SLC25A12 (ген митохондриального Ca²⁺-связывающего белка-переносчика Aralar1 – интегрального мембранного белка, расположенного во внутренней мембране митохондрий и действующего как глутамат/аспартатный антипортер) и MCP2 (хемокиновый (C-C мотив) лиганд 8 (CCL8), также известный как моноцитарный хемоаттрактантный белок 2). Это указывает на митохондриальные аномалии и функциональную дисрегуляцию в тканях больных СД2 [34].

Таким образом, полученные в ходе нашей работы данные позволяют рассматривать ее как первый шаг к возможному более глубокому фенотипированию пациентов с ХСН, выходящему за рамки традиционной оценки ФВ. На разных этапах исследования мы получили разные результаты, что связано как с различиями в объектах исследования (экзосомы или цельная сыворотка), так и с разнообразием используемых методов: масс-спектрометры ultrafleXtreme (система MALDI-MS/MS) и timsTOF Pro (система HPLC-electrospray-MS/MS с измерением ионной подвижности и системой PASEF) отличаются по чувствительности, разрешению и производительности [24, 30], что может объяснить различия в результатах анализа цельной сыворотки с использованием «безгелевого» подхода на разных этапах работы. Предварительно ВЭЖХ-МС/МС с использованием timsTOF Pro показала более перспективные результаты, поэтому дальнейшие исследования сыворотки (с увеличением выборки пациентов) и выделенных экзосом будут проводиться с использованием этого прибора. Для ряда других белков наблюдались различия между контрольными группами, полученными с использованием «гелевого» подхода (гель-электрофорез в ПААГ с последующей денситометрией) (по сравнению с «безгелевым» подходом с использованием только ВЭЖХ-МС/МС, без использования внутригелевого разделения), что также может быть связано с ограничением каждого метода: эти подходы к протеомным исследованиям скорее дополняют друг друга, чем взаимозаменяемы [8, 19]. Из полученных первичных данных ясно, что протеомика может быть использована для выявления важных биологических различий между пациентами с ХСН.

Выводы. Существуют вариации циркулирующих белков у пациентов с сердечной недостаточностью, связанные с различной патофизиологией ХСН, которая не полностью фиксируется классификацией, основанной на определении ФВ. Высокопроизводительные протеомные подходы позволяют более широко подойти к определенному фенотипу ХСН-СФВ и, соответственно, определить механизмы патогенетических путей возникновения данного состояния.

Благодарность. В работе использовалось оборудование Ресурсного центра «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело источника финансирования.

Литература

1. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом / И.И. Дедов, М.В. Шестакова, А.Ю. Майоров и др. // Сахарный диабет. 2023. Т. 26, № 2S. С. 1–157. DOI: 10.14341/DM13042.
2. Клинико-генетические детерминанты генов ФНО-ос, ИЛ-1/3 и ИЛ-1Ра в инициации и развитии хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца / А.Т. Тепляков, С.Н. Шилов, Е.Н. Березикова и др. // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2009. Т. 24, № 1. С. 40–48.
3. Нарыжный С.Н., Легина О.К. Гаптоглобин как биомаркер // Биомедицинская химия. 2021. Т. 2, № 67. С. 105–118. DOI: 10.18097/PBMC20216702105.
4. Сердечная недостаточность: хроническая (ХСН) и острая декомпенсированная (ОДСН). Диагностика, профилактика и лечение / В.Ю. Мареев, И.В. Фомин, Ф.Т. Агеев и др. // Кардиология. 2018. Т. 58, № 6S. С. 8–158. DOI: 10.18087/cardio.2475.
5. Хроническая сердечная недостаточность. Клинические рекомендации 2020 / С.Н. Терещенко, А.С. Галаявич, Т.М. Ускач и др. // Российский кардиологический журнал. 2020. Т. 25, № 11. С. 4083. DOI: 10.15829/1560-4071-2020-4083.
6. Эндотелиальная микрососудистая дисфункция и ее взаимосвязь с уровнем гаптоглобина у пациентов с различными фенотипами хронической сердечной недостаточности / В.И. Подзолков, Н.А. Драгомирецкая, Ю.Г. Беляев и др. // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. 2021. Т. 17, № 5. С. 674–682.
7. Andrzejczyk K., Abou Kamar S., van Ommen A.M. et al. Identifying plasma proteomic signatures from health to heart failure, across the ejection fraction spectrum. *Sci Rep*, 2024, vol. 14(1), p. 14871. DOI: 10.1038/s41598-024-65667-0.
8. Baggerman G., Vierstraete E., De Loof A. et al. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2005, vol. 8(8), pp. 669–677. DOI: 10.2174/138620705774962490.
9. Blighe K., Rana S., Lewis M. EnhancedVolcano: publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version, 2024, 1.22.0. Available at: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.
10. Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M.A. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, pp. 185–193.
11. Carithers L.J., Ardlie K., Barcus M. et al. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank*, 2015, vol. 13(5), pp. 311–319. DOI: 10.1089/bio.2015.0032.
12. Chen H., Boutros P.C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 2011, vol. 12(35). DOI: 10.1186/1471-2105-12-35.
13. Engström G., Hedblad B., Tydén P. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study. *Atherosclerosis*, 2009, vol. 202(2), pp. 617–22. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.038.
14. Ference B.A., Kastelein J.J.P., Catapano A.L. Lipids and lipoproteins in 2020. *JAMA*, 2020, vol. 324(6), pp. 595–596.
15. Fernandes D.C., Araujo T.L.S., Laurindo F.R. et al. Endocrine function and metabolic interaction. In: Lilly LS, ed. *Pathophysiology of Heart Disease*. 6th ed. Baltimore, MD: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2011, pp. 85–92.
16. González A., Ravassa S., Beaumont J. et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol.*, 2011, vol. 58(18), pp. 1833–1843. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.058.
17. Haas B., Serchi T., Wagner D.R. et al. Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker. *Journal of Proteomics*, 2011, vol. 75(1), pp. 229–36. DOI: 10.1016/j.jpro.2011.06.028.
18. Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B. et al. Impute: Imputation for microarray data. Available at: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/manuals/impute/man/impute.pdf>.
19. Kim Y.I., Cho J.Y. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable? *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019, vol. 1867(1), pp. 9–16. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.08.001.
20. Lee J., Park J., Lim M. et al. Quantile normalization approach for liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic data from healthy human volunteers. *Analytical Sciences*, 2012, vol. 28(8), pp. 801–805.
21. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2014, vol. 3, 26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.
22. Lu D.Y., Lin C.P., Wu C.H. et al. Plasma haptoglobin level can augment NT-proBNP to predict poor outcome in patients with severe acute decompensated heart failure. *J Investig Med*, 2019, vol. 67(1), pp. 20–27. DOI: 10.1136/jim-2018-000710.

23. Mamontova T., Afonin A.M., Ihling Ch. et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules*, 2019, vol. 24(8), 1603.
24. Meier F., Brunner A.D., Koch S. et al. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 2018, vol. 17(12), p. 2534–2545. DOI: 10.1074/mcp.TIR118.000900.
25. Moreira-Costa L., Barros A.S., Lourenço A.P. et al. Exosome-Derived Mediators as Potential Biomarkers for Cardiovascular Diseases: A Network Approach. *Proteomes*, 2021, vol. 9(1), p. 8. DOI: 10.3390/proteomes9010008.
26. Paulus W.J., Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol.*, 2013, vol. 62(4), pp. 263–271. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.092.
27. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2(8), pp. 1896–1906.
28. Ritchie M.E., Hipson B., Wu D. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43(7), e47.
29. Rohart F., Gautier B., Singh A. et al. MixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Computational Biology*, 2017, vol. 13(11), e1005752.
30. Schäfer R. Ultrafextreme: redefining MALDI-TOF-TOF-mass spectrometry performance. *LC GC Eur. (Suppl. S)*, 2009, pp. 26–27.
31. Schwinger R.H.G. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2021, vol. 11(1), pp. 263–276. DOI: 10.21037/cdt-20-302.
32. Sebastião M.J., Almeida H.V., Serra M. et al. Unveiling Human Proteome Signatures of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Biomedicines*, 2022, vol. 10(11), 2943. DOI: 10.3390/biomedicines10112943.
33. Shapiro M.D., Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Res*, 2017, vol. 6, p. 134.
34. Troyanskaya O., Cantor M., Sherlock G. et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, pp. 520–525.
35. Wickham H. Ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer-Verlag, 2016.
36. Xue R., Tan W., Wu Y. et al. Role of Exosomal miRNAs in Heart Failure. *Front Cardiovasc Med*, 2020, vol. 7, 592412. DOI: 10.3389/fcvm.2020.592412.

СВЕКЛИНА ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА – кандидат медицинских наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (sveklinat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9546-7049>).

ШУСТОВ СЕРГЕЙ БОРИСОВИЧ – доктор медицинских наук, профессор 1-й кафедры терапии (усовершенствования врачей), Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (sbs5555@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9075-8274>).

КОЗЛОВ ВАДИМ АВЕИРОВИЧ – доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор кафедры медицинской биологии с курсом микробиологии и вирусологии, Чувашский государственный университет; ведущий научный сотрудник, Институт усовершенствования врачей, Россия, Чебоксары (pooh12@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>).

КОЛЮБАЕВА СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА – доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела медико-биологических исследований Научно-исследовательского центра, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (ksnwm@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2441-9394>).

КУЧМИН АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (kuchmin63@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2888-9625>).

КОЧЕРГИНА НАТАЛЬЯ АНДРЕЕВНА – специалист, Центр коллективного пользования оборудованием «Хромас», Россия, Санкт-Петербург (st089566@student.spbu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5919-8570>).

ОКТЫСЮК ПОЛИНА ДМИТРИЕВНА – ординатор 1-го года обучения кафедры пропедевтики внутренних болезней, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (polinaok99@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1956-2110>).

КОНЯЕВ ВЛАДИСЛАВ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ – ординатор 1-го года обучения кафедры пропедевтики внутренних болезней, Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Россия, Санкт-Петербург (konyaevvladislav@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8347-2286>).

Tatiana S. SVEKLINA, Sergey B. SHUSTOV, Vadim A. KOZLOV, Svetlana N. KOLYUBAEVA, Alexey N. KUCHMIN, Natalia A. KOCHERGINA, Polina D. OKTYSYUK, Vladislav V. KONYAEV

PROTEOMIC DIFFERENCES IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND CHRONIC CARDIAC INSUFFICIENCY WITH PRESERVED AND REDUCED EJECTION FRACTION

Key words: chronic cardiac insufficiency, ejection fraction, type 2 diabetes mellitus, proteome, proteins, exosomes, mass spectrometry.

The search for protein markers of chronic cardiac insufficiency in combination with type 2 diabetes mellitus is an urgent task.

The purpose of the study was to determine the phenotype of patients with chronic cardiac insufficiency with preserved or low ejection fraction, including those burdened with type 2 diabetes mellitus, based on the study of the protein blood profile using polyacrylamide gel electrophoresis, densitometry and mass spectrometric identification of proteins.

Material and methods. In 48 patients (69.1 ± 3.1 years) with chronic cardiac insufficiency with preserved or low ejection fraction with or without type 2 diabetes mellitus and healthy volunteers, the proteome was examined by various methods (isolation of exosomes by ultracentrifugation followed by the analysis of the serum exosomes' proteome; analysis of tryptic low molecular weight fragments of whole sera of patients by semi-quantitative MALDI mass spectrometry in the presence of an isotopically labelled standard; electrophoretic separation of serum components in polyacrylamide gel followed by densitometry; serum analysis by HPLC-MS/MS methods) in order to determine specific proteins responsible for the development of chronic cardiac insufficiency in patients with type 2 diabetes mellitus.

Research results. Our study revealed the presence of inflammatory proteins (fibrinogen beta, haptoglobin, serotransferrin) and liver tissue (alpha-1-antitrypsin, ApoV) in the studied groups, some of which were reduced compared with the control group (ApoV, fibrinogen beta, serotransferrin, alpha-1-antitrypsin) against the background of standard therapy. HPLC-MS/MS using timsTOF Pro demonstrated more promising results. The differences between the comparison groups obtained using the "gel-based" approach (gel electrophoresis in polyacrylamide gel followed by densitometry) were shown for a number of other proteins (compared with the "gel-free" approach, implying only HPLC-MS/MS, without using separation in gel), which can also be explained by limitation of each of the methods: these approaches to the study of the proteome are complementary rather than interchangeable.

Conclusions. There are variations in circulating proteins in patients with cardiac insufficiency associated with differences in the pathophysiology of chronic cardiac insufficiency, which are not fully fixed by the current classification based on determining the ejection fraction. High-performance proteomic analysis methods make it possible to more accurately determine the criteria for the phenotypes of chronic cardiac insufficiency with a preserved ejection fraction and, accordingly, the mechanisms of forming the pathogenetic pathways of this condition.

References

1. Dedov I.I., Shestakova M.V., Mayorov A.Yu. et al. *Algoritmy spetsializirovannoy meditsinskoj pomoshchi bol'nym sakharnym diabetom* [Standards of Specialized Diabetes Care]. *Sakharnyi diabet*, 2023, vol. 26, no. 2S, pp. 1–157.
2. Teplyakov A.T., Shilov S.N., Berezikova E.N. et al. *Kliniko-geneticheskie determinanty genov FNO-os, IL-1/3 i IL-1Ra v initsiatsii i razvitii khronicheskoi serdechnoi nedostatochnosti u bol'nykh ishemicheskoi bolezniyu serdtsa* [Clinical-genetic determinants of TNF, IL-1B and IL-1RA genes in the initiation and development of chronic heart failure in coronary artery disease patients]. *Sibirskii zhurnal klinicheskoi i eksperimental'noi meditsiny*, 2009, vol. 24, no. 1, pp. 40–48.
3. Naryzhnyĭ S.N., Legina O.K. *Gaptoglobin kak biomarker* [Haptoglobin as a biomarker]. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 2021, vol. 67, no. 2, pp. 105–118.
4. Mareev V.Yu., Fomin I.V., Ageev F.T. et al. *Serdechnaya nedostatochnost': khronicheskaya (KhSN) i ostraya dekompensirovannaya (ODSN). Diagnostika, profilaktika i lechenie* [Russian Scientific Medical Society of Internal Medicine Guidelines for Heart failure: chronic (CHF) and acute decompensated (ADHF)]. *Kardiologiya*, 2018, vol. 58, no. 6S, pp. 8–158.
5. Tereshchenko S.N., Galyavich A.S., Uskach T.M. et al. *Khronicheskaya serdechnaya nedostatochnost'. Klinicheskie rekomendatsii 2020* [Russian Society of Cardiology (RSC) 2020 Clinical practice guidelines for Chronic heart failure]. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal*, 2020, vol. 25, no. 11, p. 4083.
6. Podzolkov V.I., Dragomiretskaya N.A., Beliaev I.G. et al. *Endotelial'naya mikrososudistaya disfunktsiya i yeye vzaimosvyaz' s urovnem gaptoglobina u patsiyentov s razlichnymi fenotipami khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti* [Endothelial Microvascular Dysfunction and Its Relationship with

Haptoglobin Levels in Patients with Different Phenotypes of Chronic Heart Failure]. *Ratsional'naya farmakoterapiya v kardiologii*, 2021, vol. 17, no. 5, pp. 674–682. DOI:10.20996/1819-6446-2021-10-05.

7. Andrzejczyk K., Abou Kamar S., van Ommen A.M. et al. Identifying plasma proteomic signatures from health to heart failure, across the ejection fraction spectrum. *Sci Rep*, 2024, vol. 14(1), p. 14871. DOI: 10.1038/s41598-024-65667-0.

8. Baggerman G., Vierstraete E., De Loof A. et al. Gel-based versus gel-free proteomics: a review. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2005, vol. 8(8), pp. 669–677. DOI: 10.2174/138620705774962490.

9. Blighe K., Rana S., Lewis M. EnhancedVolcano: publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version, 2024, 1.22.0. Available at: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.

10. Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M.A. et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 2003, vol. 19, pp. 185–193.

11. Carithers L.J., Ardlie K., Barcus M. et al. A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank*, 2015, vol. 13(5), pp. 311–319. DOI: 10.1089/bio.2015.0032.

12. Chen H., Boutros P.C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*, 2011, vol. 12(35). DOI: 10.1186/1471-2105-12-35.

13. Engström G., Hedblad B., Tydén P. et al. Inflammation-sensitive plasma proteins are associated with increased incidence of heart failure: a population-based cohort study. *Atherosclerosis*, 2009, vol. 202(2), pp. 617–22. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.05.038.

14. Ference B.A., Kastelein J.J.P., Catapano A.L. Lipids and lipoproteins in 2020. *JAMA*, 2020, vol. 324(6), pp. 595–596.

15. Fernandes D.C., Araujo T.L.S., Laurindo F.R. et al. Endocrine function and metabolic interaction. In: Lilly LS, ed. *Pathophysiology of Heart Disease*. 6th ed. Baltimore, MD: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2011, pp. 85–92.

16. González A., Ravassa S., Beaumont J. et al. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol.*, 2011, vol. 58(18), pp. 1833–1843. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.058.

17. Haas B., Serchi T., Wagner D.R. et al. Proteomic analysis of plasma samples from patients with acute myocardial infarction identifies haptoglobin as a potential prognostic biomarker. *Journal of Proteomics*, 2011, vol. 75(1), pp. 229–36. DOI:10.1016/j.jprot.2011.06.028.

18. Hastie T., Tibshirani R., Narasimhan B. et al. Impute: Imputation for microarray data. Available at: <https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/manuals/impute/man/impute.pdf>.

19. Kim Y.I., Cho J.Y. Gel-based proteomics in disease research: Is it still valuable? *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019, vol. 1867(1), pp. 9–16. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.08.001.

20. Lee J., Park J., Lim M. et al. Quantile normalization approach for liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomic data from healthy human volunteers. *Analytical Sciences*, 2012, vol. 28(8), pp. 801–805.

21. Lotvall J., Hill A.F., Hochberg F. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles*, 2014, vol. 3, 26913. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.

22. Lu D.Y., Lin C.P., Wu C.H. et al. Plasma haptoglobin level can augment NT-proBNP to predict poor outcome in patients with severe acute decompensated heart failure. *J Investig Med*, 2019, vol. 67(1), pp. 20–27. DOI: 10.1136/jim-2018-000710.

23. Mamontova T., Afonin A.M., Ihling Ch. et al. Profiling of seed proteome in pea (*Pisum sativum* L.) lines characterized with high and low responsiveness to combined inoculation with nodule bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecules*, 2019, vol. 24(8), 1603.

24. Meier F., Brunner A.D., Koch S. et al. Online Parallel Accumulation-Serial Fragmentation (PASEF) with a Novel Trapped Ion Mobility Mass Spectrometer. *Mol Cell Proteomics*, 2018, vol. 17(12), p. 2534–2545. DOI: 10.1074/mcp.TIR118.000900.

25. Moreira-Costa L., Barros A.S., Lourenço A.P. et al. Exosome-Derived Mediators as Potential Biomarkers for Cardiovascular Diseases: A Network Approach. *Proteomes*, 2021, vol. 9(1), p. 8. DOI: 10.3390/proteomes9010008.

26. Paulus W.J., Tschöpe C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am Coll Cardiol.*, 2013, vol. 62(4), pp. 263–271. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.02.092.

27. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2(8), pp. 1896–1906.

28. Ritchie M.E., Phipson B., Wu D. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 2015, vol. 43(7), e47.

29. Rohart F., Gautier B., Singh A. et al. MixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Computational Biology*, 2017, vol. 13(11), e1005752.
30. Schäfer R. Ultraflexextreme: redefining MALDI-TOF-TOF-mass spectrometry performance. *LC GC Eur. (Suppl. S)*, 2009, pp. 26–27.
31. Schwinger R.H.G. Pathophysiology of heart failure. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2021, vol. 11(1), pp. 263–276. DOI: 10.21037/cdt-20-302.
32. Sebastião M.J., Almeida H.V., Serra M. et al. Unveiling Human Proteome Signatures of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. *Biomedicines*, 2022, vol. 10(11), 2943. DOI: 10.3390/biomedicines10112943.
33. Shapiro M.D., Fazio S. Apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. *F1000Res*, 2017, vol. 6, p. 134.
34. Troyanskaya O., Cantor M., Sherlock G. et al. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, 2001, vol. 17, pp. 520–525.
35. Wickham H. *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag, 2016.
36. Xue R., Tan W., Wu Y. et al. Role of Exosomal miRNAs in Heart Failure. *Front Cardiovasc Med*, 2020, vol. 7, 592412. DOI: 10.3389/fcvm.2020.592412.

TATIANA S. SVEKLINA – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Department of Internal Diseases Propedeutics, Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (Sveklina@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9546-7049>).

SERGEY B. SHUSTOV – Doctor of Medical Sciences, Professor, 1st Department of Therapy (Advanced Medical Training), Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (sbs5555@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9075-8274>).

VADIM A. KOZLOV – Doctor of Biological Sciences, Candidate of Medical Sciences, Professor, Department of Medical Biology with course of Microbiology and Virology, Chuvash State University; Leading Researcher, Postgraduate Doctors' Training Institute, Russia, Cheboksary (pooh12@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7488-1240>).

SVETLANA N. KOLYUBAEVA – Doctor of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Biomedical Research, Research Center, Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (ksnwm@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2441-9394>).

ALEXEY N. KUCHMIN – Doctor of Medical Sciences, Professor, Department of Propedeutics of Internal Diseases, Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (kuchmin63@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2888-9625>).

NATALIA A. KOCHERGINA – Specialist, Center for Collective Use of Equipment "Khromas", Russia, St. Petersburg (st089566@student.spbu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5919-8570>).

POLINA D. OKTYSYUK – 1st year Resident, Department of Internal Medicine Propedeutics, Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (polinaok99@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1956-2110>).

VLADISLAV V. KONYAEV – 1st year Resident, Department of Internal Medicine Propedeutics, Kirov Military Medical Academy, Russia, St. Petersburg (konyaevvladislav@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8347-2286>).

Формат цитирования: Протеомные различия у больных сахарным диабетом 2-го типа и хронической сердечной недостаточностью с сохраненной и сниженной фракцией выброса [Электронный ресурс] / Т.С. Свеклина, С.Б. Шустов, В.А. Козлов и др. // *Acta medica Eurasica*. 2024. № 3. С. 34–48. URL: <http://acta-medica-eurasica.ru/single/2024/3/5>. DOI: 10.47026/2413-4864-2024-3-34-48.