

АРДАШИРОВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

РНК-БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

3.1.24 – Неврология

1.5.7 – Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Екатерина Юрьевна Федотова

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Сергей Николаевич Иллариошкин

Официальные оппоненты:

Катунина Елена Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель Отдела нейродегенеративных заболеваний Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства;

Шадрина Мария Игоревна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней НИЦ «Курчатовский институт».

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «___» _____ 2023 г. в «__ : __» часов на заседании Диссертационного совета Д 001.006.01 при ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 80 и на сайте www.neurology.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2023 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета 24.1.186.01,
кандидат медицинских наук

Кузнецова Полина Игоревна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием в мире (Erkkinen *et al.*, 2018) и одним из самых частых двигательных расстройств (Mhyre *et al.*, 2012). Клиническая картина БП включает в себя многообразие моторных и немоторных проявлений (Иллариошкин С.Н. и соавт., 2017; Литвиненко И.В. и соавт., 2018; Левин О.С. и соавт., 2022). Заболевание характеризуется неуклонным прогрессирующим и постепенно приводит к тяжелой инвалидизации пациентов.

На сегодняшний день диагноз БП устанавливается клинически (Левин О.С. и соавт., 2017; Postuma *et al.*, 2015), и точность такой клинической диагностики не превышает 80% (Rizzo *et al.*, 2016), в связи с чем практическую важность имеет поиск биомаркеров заболевания (Катунина Е.А. и соавт., 2017; Poewe *et al.*, 2017). Особую значимость представляет поиск молекулярно-генетических биомаркеров БП, так как они, наиболее вероятно, позволят не только улучшить диагностику заболевания, но и разработать патогенетическое лечение, влияющее на течение нейродегенеративного процесса.

Около 5–10% БП составляют моногенные наследственные формы, тогда для остальных случаев заболевания точная этиология неизвестна. К числу важных молекулярных факторов, способствующих развитию заболевания, в числе прочих относят нарушение регуляции экспрессии генов (Nalls *et al.*, 2014). На профиль экспрессии генов при БП влияют все основные известные эпигенетические механизмы – метилирование ДНК, модификации гистонов и некодирующие РНК (Шадрина М.И., 2023; Tatura *et al.*, 2016; Miranda-Morales *et al.*, 2017; Harrison *et al.*, 2018; Harrison *et al.*, 2019). Функционально наиболее изученным классом некодирующих РНК являются микроРНК (длиной в 19–24 нуклеотида).

При БП имеет место перестройка крупных генных сетей (Niethammer *et al.*, 2012; Santiago *et al.*, 2017; Santos-Lobato *et al.*, 2021), изменяется экспрессия множества генов и их регуляторных молекул. Регуляторные и белок-кодирующие транскрипты изучаются в качестве потенциальных биомаркеров при БП (Rao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Parnetti *et al.*, 2019; Yilmaz *et al.*, 2019).

Степень разработанности темы

У больных БП были выявлены значимые отклонения в экспрессии микроРНК по сравнению с контрольной группой (Briggs *et al.*, 2015; Hoss *et al.*, 2016; Tatura *et al.*, 2016; Leggio *et al.*, 2017; Mcmillan *et al.*, 2017). Несколькими группами исследователей предложены в качестве биомаркеров специфические наборы микроРНК, выявляемые в периферической крови и характерные для БП (Botta-orfila *et al.*, 2014; Burgos *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2016; Dong *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2020). При этом остается неясной взаимосвязь экспрессии микроРНК в периферической крови и в различных тканях, в том числе в головном мозге, на разных этапах развития заболевания (Nicole Ludwig, 2016).

Помимо системы микроРНК, при БП также исследовалась экспрессия различных генов, потенциально связанных с патогенетическими механизмами заболевания, но в связи с большим количеством изучаемых транскриптов и небольшими выборками результаты исследований остаются достаточно противоречивыми (Пчелина С.Н. и соавт., 2017; Шадрина М.И. и соавт., 2023; Scherzer *et al.*, 2007; Chatterjee *et al.*, 2017; Santiago *et al.*, 2017). Тем не менее, поиск биомаркеров БП среди кодирующих РНК признается весьма перспективным направлением и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

Анализ биомаркерной роли микроРНК и РНК-транскриптов, ассоциированных с широким кругом нейропатологических процессов, у пациентов с БП.

Задачи исследования

1. Изучить паттерн экспрессии ряда микроРНК, отобранных на основании их потенциальной роли в молекулярном патогенезе БП, в лейкоцитах крови, а также связь их экспрессии с клиническими характеристиками заболевания.
2. Исследовать уровень выбранных микроРНК в структурах центральной нервной системы и в периферических тканях в аутопсийных образцах пациентов с БП и сопоставить их с результатами, полученными *in vivo* на лейкоцитах крови.
3. Определить дифференциально экспрессирующиеся гены нейропатологии в лейкоцитах крови пациентов с БП в сравнении с контрольной группой, а также

выявить гены, экспрессия которых ассоциирована с клинической картиной заболевания.

4. Исследовать особенности экспрессии микроРНК и генов, ассоциированных с развитием нейропатологического процесса, на ранних стадиях заболевания, и оценить влияние на паттерн их экспрессии проводимой противопаркинсонической терапии.

5. Провести корреляционные сопоставления дифференциально экспрессирующихся генов нейропатологии и микроРНК и определить среди них перспективные гены-мишени для регуляторных транскриптов.

Научная новизна

Впервые изучен профиль экспрессии большого числа генов, ассоциированных с нейропатологическими процессами, и регуляторных микроРНК у пациентов с БП одновременно на клетках крови и аутопсийном материале. Определены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК (miR-29c-3p, miR-29a-3p, miR-7-5p, miR-30c-5p) и гены (*CDKN1A* и *CPT1B*), показана их роль в качестве диагностических биомаркеров при БП, выявлен ряд значимых корреляций с клинической картиной (в частности, с длительностью, формой, степенью выраженности немоторных проявлений, а также, в случае микроРНК, с назначением противопаркинсонических препаратов). Впервые на одной выборке пациентов показаны взаимосвязанные, сетевые изменения в экспрессии кодирующих и некодирующих РНК при БП.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение работы заключается в определении ряда перспективных регуляторных и кодирующих РНК, уровень экспрессии которых изменяется у пациентов с БП, в том числе с формированием определенных характерных паттернов экспрессии при разных фенотипах заболевания. Изучены соотношения уровней экспрессии ряда микроРНК в лейкоцитах, периферических тканях и различных областях головного мозга при БП, показана тканеспецифичность экспрессии регуляторных РНК.

Практическое значение работы заключается в выявлении информативных РНК-биомаркеров, которые могут быть полезны в качестве дополнительных диагностических показателей при БП в сложных случаях, особенно на начальных стадиях заболевания, с учетом выявленных отличий экспрессии генов у данной категории пациентов. Предложены потенциальные молекулярно-генетические маркеры прогрессирования БП.

Методология и методы исследования

Объектом исследования являлись пациенты с БП. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями Международного общества расстройств движений (MDS) от 2015 года (Postuma *et al.*, 2015). Было получено информированное согласие на участие в исследовании и подписано согласие на обработку персональных данных.

Экспрессия генов нейропатологии и микроРНК определялась в выделенной из лейкоцитарной фракции тотальной РНК с помощью двух различных методов: с использованием панели Nanostring nCounter® Human Neuropathology Panel для определения экспрессии генов и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) реального времени для определения экспрессии микроРНК. Определение экспрессии микроРНК в аутопсийных образцах проводилось после выделения тотальной РНК с помощью ПЦР реального времени (ПЦР-РВ).

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с БП наблюдается дифференциальная экспрессия следующих микроРНК в лейкоцитах крови: miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-29c-3p и miR-30c-5p.
2. Профиль экспрессии микроРНК при БП ассоциирован с клиническими характеристиками заболевания: длительностью болезни, моторным фенотипом и немоторными аффективными нарушениями. Основные противопаркинсонические препараты влияют на уровень дифференциально экспрессирующихся микроРНК.

3. Экспрессия микроРНК при БП является тканеспецифичной: наблюдаются значимые различия в профиле экспрессии между областями головного мозга, периферическими тканями, лейкоцитами крови.
4. Для ранних стадий БП характерны изменения уровня экспрессии генов *CDKN1A* (один из важных регуляторов клеточного цикла) и *CPT1B* (регулятор бета-окисления в митохондриях), для развернутых стадий – гена *LRP1* (участник прионоподобного распространения α -синуклеина). Экспрессия *CPT1B* ассоциирована также с длительностью заболевания.
5. При БП отмечаются сетевые, взаимосвязанные изменения в экспрессии микроРНК и генов нейропатологии, что подтверждается корреляционными связями между экспрессией *miR-7-5p* и *CPT1B*, *miR-7-5p* и *LRP1*, а также функциональной связью *miR-7-5p* с ее геном-мишенью *SNCA*, кодирующим α -синуклеин.

Личный вклад автора

Автор проводил разработку протокола исследования. Самостоятельно проводился набор клинического материала: опрос и осмотр пациентов, оценка по шкалам. Автор выполнял большую часть работы в ДНК-лаборатории: выделение РНК, проведение обратной транскрипции, ПЦР-РВ. Также автор проводил статистический анализ полученных данных и подготовку статей с последующей их публикацией в научных журналах. Автору принадлежит определяющая роль в обобщении полученных результатов, обосновании основных положений, формулировании выводов и практических рекомендаций.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется количеством наблюдений, постановкой цели и задач, критериями включения пациентов в исследование, использованием в работе современных методов обследования, применением адекватного задачам исследования статистического анализа.

Материалы были представлены на 6, 7 и 8 Конгрессах Европейской академии неврологии (2020, 2021 и 2022 гг.), Всемирном конгрессе по болезни Паркинсона и

связанным расстройствам (2021 г.), Конгрессе Международного общества по болезни Паркинсона и двигательным расстройствам (2021 г.), Нейрофоруме-2022.

Внедрение результатов работы

Полученные результаты внедрены в ФГБНУ НЦН в работу неврологических отделений, ДНК-лаборатории, учебный процесс подготовки клинических ординаторов, аспирантов, и врачей-неврологов, которые обучаются на циклах повышения квалификации.

Публикации

По материалам диссертации подготовлено 10 публикаций, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 145 листах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 10 приложений и иллюстрирована 16 рисунками. Диссертация построена из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы и практические рекомендации, список литературы, приложения. Библиографический указатель содержит 16 отечественных и 205 зарубежных источников литературы, а также 10 публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям д.м.н., проф., академику РАН С.Н. Иллариошкину и д.м.н. Е.Ю. Федотовой за неоценимую помощь в планировании и реализации работы. Автор также благодарит сотрудников 5 неврологического и научно-консультативного отделения за помощь в наборе пациентов в исследование. Отдельная глубокая благодарность к.б.н. Н.Ю. Абрамчевой за помощь в молекулярно-генетической части работы. Автор выражает благодарность д.м.н., проф. В.С. Сухорукову и его сотрудникам за участие

в реализации исследования экспрессии генов нейропатологии. За помощь в подборе патоморфологического материала автор благодарит к.м.н. П.Л. Ануфриева.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре представлены современные представления об эпидемиологии, этиологии, патогенезе и клинической картине БП. Рассмотрены сложности диагностики БП, текущее состояние разработки биомаркеров заболевания. Подробно освещены РНК-маркеры, в том числе микроРНК, РНК-маркеры, отражающие экспрессию генов, и их изменения при БП, известные к настоящему времени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий дизайн и методология исследования

В исследование для оценки профиля микроРНК было включено 70 пациентов с БП и 40 здоровых добровольцев. Основным критерием включения был установленный диагноз «болезни Паркинсона» в соответствии с критериями MDS 2015 года (Postuma *et al.*, 2015).

В исследование включались пациенты, проходившие стационарное обследование и лечение в 5-м неврологическом отделении с ДНК-лабораторией ФГБНУ «Научный центр неврологии» с 2019 по 2021 год.

Для каждого пациента осуществлялся подробный сбор жалоб, анамнеза, общий и неврологический осмотр, отдельно уточнялись возраст начала и продолжительность заболевания, схема терапии, определялась форма заболевания, проводилась оценка по международным стандартизированным клиническим шкалам: шкала Hoehn–Yahr, унифицированная рейтинговая шкала болезни Паркинсона, пересмотренная шкала MDS (MDS-UPDRS), Монреальская шкала когнитивной оценки (MoCA), опросник качества жизни больных с БП (PDQ-39), опросник немоторных симптомов (NMSQ), госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS). Проводился забор венозной крови для дальнейшего молекулярно-генетического исследования.

У здоровых добровольцев уточняли возраст, отсутствие тяжелых хронических заболеваний, после чего проводили забор венозной крови для дальнейшего молекулярно-генетического исследования.

В группе пациентов с БП было 35 мужчин и 35 женщин, медиана возраста – 62 [55; 69] лет. В контрольной группе было 25 женщин и 15 мужчин, медиана возраста в контрольной группе составила 59 [51; 63] лет. По возрасту и по полу контрольная группа и основная группа БП были сопоставимы ($p=0,07$ и $p=0,21$, соответственно).

Для анализа профиля экспрессии 760 генов, ассоциированных с нейропатологическими процессами, из основной группы БП, в которой исследовались микроРНК, были выбраны 2 группы пациентов. Первую группу составили 13 пациентов с БП на 1–2 стадии по шкале Hoehn-Yahr, не получающих лечение (группа Н-БП). Вторую группу составили 16 пациентов с БП на 3 стадии по шкале Hoehn-Yahr, которые больше года получали противопаркинсоническую терапию (группа П-БП). Группу сравнения составили 16 здоровых добровольцев. Все три группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Анализ экспрессии микроРНК

Лейкоциты крови. Для оценки экспрессии микроРНК в лейкоцитах крови проводилось выделение тотальной РНК из образцов периферической крови (взятой в течение 2 часов до выделения) с помощью набора RNeasy mini kit (Qiagen). На основании литературных источников было выбрано 12 микроРНК, показавших свою дифференциальную экспрессию при БП более, чем в одном исследовании: miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30c-5p, miR-106a-5p, miR-126-3p, miR-129-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-520d-5p. В качестве референсной микроРНК была выбрана miR-191-5p (Costé *et al.*, 2020). Количественный анализ экспрессии микроРНК проводили методом обратной транскрипции с последующей ПЦР (ОТ-ПЦР). Для обратной транскрипции были подобраны и синтезированы праймеры, формирующие петлю (stem-loop праймеры), специфичные для каждой детектируемой микроРНК. Далее проводили ПЦР-РВ. По результатам ПЦР-РВ получали значения пороговых циклов C_t для исследуемой микроРНК и для референсной miR-191-5p. Относительный уровень экспрессии микроРНК рассчитывали методом $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ (Livak *et al.*, 2001).

Аутопсийные образцы. Для оценки экспрессии микроРНК в периферических тканях и центральной нервной системе исследовались образцы, полученные при аутопсии у трех пациентов с БП. Исследовались образцы стриатума, коры лобной доли, кожи, слюнных желез, пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, прямой кишки, толстой кишки. Все образцы хранились в виде парафиновых блоков. Препараты из парафиновых блоков нарезали на микротоме, выделяли интересующую область, далее образцы подвергались депарафинизированию ксилолом с последующей отмывкой этанолом, и далее проводили выделение РНК с помощью набора для выделения РНК из парафиновых блоков RNeasy FFPE Kit (Qiagen) по стандартному протоколу производителя. В аутопсийных образцах исследовались 7 микроРНК: miR-7-5p, miR-30c-5p, miR132-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p, miR-29a-3p, miR-126-3p (выбранные на основании предшествующего анализа в лейкоцитах крови). Количественный анализ микроРНК проводился методом обратной транскрипции с последующей ПЦР, описанным выше для лейкоцитарной фракции крови.

Полученные результаты экспрессии 7 микроРНК в лейкоцитах и областях головного мозга сопоставлялись с данными онлайн базы экспрессии микроРНК в тканях – miTED по состоянию на сентябрь 2022 (Kavakiotis *et al.*, 2021).

Анализ экспрессии генов нейропатологии с использованием платформы Nanostring

Для всех 45 образцов был определен профиль экспрессии генов с использованием платформы Nanostring, с помощью панели Nanostring nCounter® Human Neuropathology Panel (NanoString Technologies, WA, USA), которая включает в себя 760 генов, участвующих в нейропатологических процессах. Образцы помещались в nCounter Analysis System (NanoString Technologies) согласно протоколу производителя. Сырые данные были обработаны с помощью пакета nSolver (version 4.0). Данные были нормированы на набор из 6 позитивных контрольных РНК и 10 генов домашнего хозяйства, которые были включены в панель. Аннотация генов по Gene Ontology проводилась с помощью базы данных AmiGO2 (<http://amigo.geneontology.org>) по состоянию на сентябрь 2022 года. Были применены фильтры по виду (*Homo sapiens*) и по источнику данных (GO Central).

Поиск генов-мишеней для микроРНК осуществлялся по базе miRDB (<http://mirdb.org>).

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась в программе IBM SPSS (IBM, США) и Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США). Нормальность распределения значений была проверена тестом Шапиро-Уилка.

Для статистического анализа экспрессии микроРНК были использованы непараметрические критерии. Статистический уровень значимости p принимался равным 0,05.

Для анализа экспрессии генов применялись параметрические статистические критерии. Для поправки на множественные сравнения использовался подход FDR (false discovery rate, частота ложноположительных результатов), метод Бенджамини-Хохберга. При оценке дифференциальной экспрессии генов (ДЭГ) критериями были $q < 0,05$ (после применения поправки FDR), а также кратность отношения величин, полученных в группах, FC (fold change) $> 1,5$ или $< 0,66$.

В корреляционном анализе связь оценивалась как слабая при $r = 0,3-0,5$, средней силы при $r = 0,5-0,7$, сильная при $r = 0,7-0,9$. Также в работе применялись логистическая регрессия и ROC-анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия микроРНК в группе пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе

В работе изучалась экспрессия 12 микроРНК в группе пациентов с БП и в контрольной группе. Полученные значения представлены в таблице 1.

По результатам сравнения двух групп были получены 4 дифференциально экспрессирующихся микроРНК ($p < 0,05$): miR-29c-3p (уровень повышен при БП), miR-7-5p (повышен) и miR-29a-3p (уровень снижен при БП), miR-30c-5p (снижен).

Анализ диагностической значимости комбинации четырех данных микроРНК – miR-29c-3p, miR-7-5p, miR-30c-5p и miR-29a-3p – был проведен с помощью построения бинарной логистической регрессии и последующим ROC-анализом. Результаты ROC-анализа представлены на рисунке 1.

Таблица 1. Экспрессия микроРНК в группе БП и в контрольной группе.

МикроРНК	Болезнь Паркинсона (N=70)	Контрольная группа (N=40)	FC	p
miR-29c-3p	1,76 [0,93; 3,58]	0,77 [0,59; 1,98]	2,28	0,003*
miR-29a-3p	0,63 [0,41; 1,01]	0,97 [0,66; 1,4]	0,65	0,003*
miR-7-5p	0,68 [0,19; 1,68]	0,2 [0,04; 1,5]	3,4	0,024*
miR-30c-5p	0,53 [0,34; 1,43]	1,03 [0,46; 1,77]	0,51	0,043*
miR-126-3p	0,23 [0,15; 0,44]	0,4 [0,11; 0,8]	0,57	0,192
miR-132-3p	1,01 [0,4; 2,01]	0,87 [0,37; 1,39]	1,16	0,207
miR-520d-5p	0,27 [0,05; 1,02]	0,52 [0,04; 1,77]	0,52	0,364
miR-146a-5p	0,11 [0,03; 1,37]	0,07 [0,03; 0,34]	1,57	0,335
miR-129-5p	0,47 [0,2; 2,21]	0,4 [0,23; 0,71]	1,175	0,402
miR-221-3p	0,63 [0,42; 1,04]	0,72 [0,49; 0,99]	0,87	0,437
miR-106a-5p	1,41 [0,43; 3,5]	1,39 [0,76; 2,8]	1,01	0,691
miR-214-3p	15,23 [6,97; 22,65]	15,75 [6,01; 27,3]	0,97	0,707

* - $p < 0,05$. FC – кратность отношения величин полученных в группах.

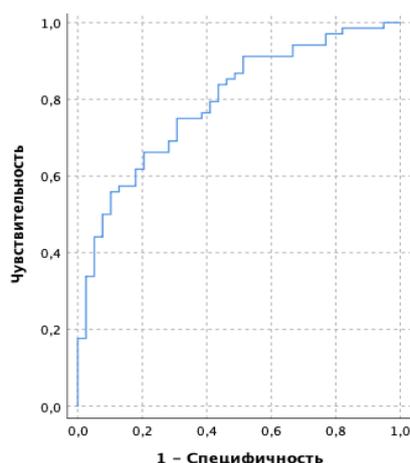


Рисунок 1. ROC-анализ для комбинации четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК: miR-29c-3p, miR-29a-3p, miR-7-5p, miR-30c-5p.

При комбинации четырех микроРНК значение площади под кривой (area under curve, AUC) составило 0,793 (доверительный интервал – 0,708–0,878), что является «приемлемым» (“fair”, AUC > 0,7) для разграничения случаев БП от

здоровых добровольцев. Это позволяет рассматривать данную комбинацию в качестве потенциального диагностического биомаркера БП.

В других работах для двух микроРНК семейства miR-29 – miR-29a-3p и miR-29c-3p – неоднократно была показана дифференциальная экспрессия при БП (Bai *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2011; Botta-orfila *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2016; Serafin *et al.*, 2015). Интересно, что в проведенном исследовании были показаны разнонаправленные изменения этих двух микроРНК из одного семейства, что подчеркивает различную их функциональную значимость. Помимо семейства miR-29 было показано, что miR-30c-5p также дифференциально экспрессируется при БП (снижается), что соответствует результатам, полученным в других работах (Martins *et al.*, 2011; Vallelunga *et al.*, 2014). В случае miR-7-5p также получены данные о дифференциальной экспрессии при БП (уровень повышен). Данная микроРНК взаимодействует с мРНК α -синуклеина, снижая его экспрессию, то есть выполняет «протективные» функции в случае его накопления при БП (Junn *et al.*, 2009; Dohakis, 2010). Некоторыми авторами рассматриваются возможности терапевтического использования miR-7 при БП (Titze-de-Almeida *et al.*, 2020), в связи с этим повышенный уровень miR-7-5p при БП может рассматриваться в качестве компенсаторного.

Сопоставление уровня экспрессии изучаемых микроРНК с демографическими характеристиками, моторными и немоторными проявлениями заболевания

При оценке влияния пола на экспрессию микроРНК не было выявлено значимых отличий в уровне экспрессии всех 12 изученных микроРНК.

Не было выявлено связи экспрессии микроРНК с возрастом и возрастом дебюта. При исследовании корреляции уровня микроРНК с длительностью БП были выявлены слабые взаимосвязи длительности заболевания с экспрессией четырех микроРНК: miR-126-3p ($R=0,316$, $p=0,007$), miR-129-5p ($R=0,385$; $p=0,001$), miR-29a-3p ($R=-0,33$; $p=0,005$) и miR-30c-5p ($R=0,32$; $p=0,007$).

В работе проводилось сравнение экспрессии микроРНК при двух основных клинических формах заболевания – акинетико-ригидной и смешанной. Анализ показал, что отмечается более низкий уровень экспрессии miR-29a-3p при смешанной форме по сравнению с акинетико-ригидной ($p=0,01$): 0,59 [0,41; 0,82] и

1,06 [0,58; 1,52], соответственно. Полученное различие подчеркивает клиническую и патогенетическую гетерогенность «внутри» единой нозологической формы БП (Kann *et al.*, 2020). При этом, возможно, снижение miR-29a-3p в основной группе, выявленное при сравнении с контрольной группой, отражает преобладание смешанной формы заболевания в группе (74,3%) над акинетико-ригидной. Преобладание смешанной формы, обычно имеющей более длительное и доброкачественное течение, также может объяснить связь более длительного течения (до включения в исследование) с более сниженным уровнем miR-29a-3p, что было выявлено в соответствующем корреляционном анализе.

Исследовались корреляции между микроРНК и тяжестью БП, которые оценивались с помощью соответствующих шкал. Была выявлена слабая корреляция экспрессии miR-30c-5p с тяжестью заболевания по шкале Hoehn-Yahr ($R=0,304$; $p=0,011$), что позволяет рассматривать miR-30c-5p в качестве маркера прогрессирования БП. Не было выявлено взаимосвязи между экспрессией микроРНК и баллами по шкале MDS-UPDRS и ее подшкалам.

Подробно исследовались корреляции между уровнем экспрессии микроРНК и различными немоторными симптомами БП. Корреляционный анализ не показал значимых ассоциаций. При сравнении группы пациентов с депрессией, оцениваемой по шкале HADS ($n=28$) и группы пациентов без депрессии ($n=42$) наблюдается некоторое повышение miR-30c-5p в группе депрессии 0,56 [0,33; 1,5] по сравнению с группой без депрессии 0,48 [0,34; 1,2] ($p=0,045$). При подобном же сравнении пациентов с тревогой ($n=25$) и без таковой ($n=45$) уровни экспрессии микроРНК не отличались. Также не выявлено дифференциально экспрессирующихся микроРНК при сравнении группы с наличием когнитивных нарушений, оцениваемых по шкале MoCA ($n=20$), с группой без таковых ($n=50$). При оценке профиля немоторных проявлений по данным опросника NMSQ была выявлена слабая прямая корреляция уровня miR-106a-5p и суммарного балла по шкале NMSQ ($R=0,36$; $p=0,011$).

Исследование уровня экспрессии изучаемых микроРНК в зависимости от противопаркинсонической терапии

Основная группа пациентов с БП была разделена на две подгруппы по наличию/отсутствию противопаркинсонической терапии. Наличие

противопаркинсонической терапии не приводило к статистически значимым изменениями профиля экспрессии 12 изучаемых микроРНК. Внутри подгруппы пациентов, получающих терапию (n=47), отдельно изучалось влияние на экспрессию микроРНК приема основных противопаркинсонических препаратов: леводопы, агонистов дофаминовых рецепторов и амантадина.

У пациентов, принимающих препараты леводопы (n=41), наблюдается сниженный уровень экспрессии miR-29a-3p по сравнению с пациентами, не получающими таковые препараты: 0,52 [0,34; 0,8] и 0,78 [0,57; 1,21], соответственно (p=0,026).

Прием агонистов дофаминовых рецепторов (АДР) был ассоциирован с повышенной экспрессией miR-30c-5p: 0,78 [0,36; 1,65] у пациентов, принимающих препараты АДР (n=30), и 0,48 [0,32; 1,08] у пациентов, не принимающих данные препараты (p=0,049). Помимо этого, прием АДР был ассоциирован со сниженным уровнем экспрессии miR-7-5p: 0,33 [0,09; 0,94] при приеме АДР и 1,38 [0,32; 2,2] без приема данных препаратов (p=0,004).

Прием амантадина также был связан со сниженной экспрессией miR-7-5p: 0,48 [0,08; 0,91] у пациентов, получающих лечение амантадином (n=20), и 1,08 [0,23; 2,17] у пациентов, не получающих его (p=0,03).

Работ по исследованию влияния медикаментозной терапии на экспрессию выбранных микроРНК немного, и они по своим результатам весьма разнородны (Alieva *et al.*, 2014; Serafin *et al.*, 2015). Разнородность получаемых данных подтверждают и наши результаты. На настоящий момент нет данных о механизмах, которые могут приводить к изменению уровня микроРНК под воздействием противопаркинсонических препаратов.

Исследование экспрессии микроРНК в подгруппе пациентов, не получающих лечение

Учитывая важность диагностики БП на начальных стадиях, с целью поиска ранних маркеров заболевания среди микроРНК нами был проведен прицельный анализ группы пациентов, не получающих противопаркинсонические препараты и находящихся на начальных стадиях БП.

Для miR-7-5p, miR-30c-5p, miR-29c-3p различия наблюдались между подгруппой пациентов, не получающих лечения, и контрольной группой. Результаты представлено в таблице 2. Эти же микроРНК были определены как дифференциально экспрессирующиеся для общей группы БП, за исключением miR-29a-3p (табл. 1).

Таблица 2. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК в подгруппе пациентов с БП, не получающие противопаркинсоническую терапию, при сравнении с контрольной группой.

микроРНК	Пациенты без лечения (N=23)	Контрольная группа (N=40)	FC	p*
miR-29c-3p	2,09 [1,52; 3,68]	0,77 [0,59; 1,98]	2,71	0,006
miR-30c-5p	0,45 [0,32; 0,57]	1,03 [0,46; 1,77]	0,44	0,018
miR-7-5p	1,33 [0,19; 2,7]	0,2 [0,04; 1,51]	6,65	0,023

* апостериорный анализ

Отдельно в подгруппе пациентов с БП, не получающих противопаркинсоническую терапию, были проанализированы корреляции экспрессии микроРНК с клинико-демографическими характеристиками. Не было выявлено отличий в экспрессии микроРНК в зависимости от пола. Также при корреляционном анализе не было выявлено связей с возрастом на момент осмотра.

Выявлены корреляции экспрессии ряда микроРНК с длительностью заболевания, возрастом дебюта болезни и стадией заболевания по шкале Hoehn-Yahr. Результаты представлены в таблице 3. В числе выявленных связей с длительностью заболевания были определены 3 корреляции «средней силы»: для miR-129-5p, miR-132-3p и miR-146a-5p. При этом корреляций с баллом по шкале MDS-UPDRS и ее подшкалами обнаружено не было. Также не выявлено отличий в экспрессии микроРНК в зависимости формы заболевания.

При корреляционном анализе не было выявлено связей уровней микроРНК с суммой баллов по шкале HADS и подшкале депрессии, при этом выявлена средней силы прямая корреляция между экспрессией miR-30c-5p и суммой баллов по подшкале тревоги HADS ($R=0,564$; $p=0,008$). В предыдущем анализе (см. стр. 15)

выявленная в общей группе пациентов микроРНК – miR-30c-5p – также была связана с аффективными нарушениями: она была повышена у пациентов с депрессией.

Таблица 3. Корреляции экспрессии микроРНК с клиническими характеристиками в подгруппе пациентов с болезнью Паркинсона, не получающих лечение.

МикроРНК	Длительность заболевания		Возраст начала заболевания		Стадия по шкале Hoehn-Yahr	
	R	p	R	p	R	p
miR-7-5p	0,432	0,04	--	--	--	--
miR-29a-3p	-0,460	0,027	0,416	0,049	--	--
miR-30c-5p	--	--	--	--	0,476	0,025
miR-126-3p	0,449	0,032	--	--	0,455	0,029
miR-129-5p	0,656#	0,001	--	--	--	--
miR-132-3p	0,522#	0,011	-0,478	0,021	--	--
miR-146a-5p	0,639#	0,001	--	--	--	--

“--“ - $p > 0,05$. # - $R > 0,5$

В анализируемой группе не было выявлено корреляций экспрессии микроРНК с баллами по шкале MoCA. Не отмечалось корреляций с суммарным баллом по опроснику немоторных проявлений NMSQ. При этом была установлена обратная корреляция слабой силы между экспрессией miR-221-3p и суммарным баллом по опроснику качества жизни PDQ-39 ($R=-0,482$; $p=0,043$).

Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в структурах головного мозга, в периферических тканях и лейкоцитах крови при БП

Уровни экспрессии микроРНК в периферических тканях имели большой разброс и значительно варьировали. При этом зачастую уровень микроРНК в образцах периферических тканей превышал уровень экспрессии в лейкоцитах крови.

Уровни экспрессии микроРНК в структурах головного мозга были относительно сопоставимы между собой (стриатум – кора лобной доли) и, так же как и для периферических тканей, в большинстве случаев превышали уровни экспрессии соответствующих микроРНК в лейкоцитах крови. Уровни трех микроРНК – miR-7-5p, miR-29a-3p и miR132-3p – были значительно повышены в головном мозге по

сравнению с лейкоцитами (в 10 раз и больше). Существенное повышение в головном мозге по сравнению с лейкоцитами отмечалось для miR-30c-5p, miR-126-3p и miR-221-3p (в 2–5 раз), тогда как для miR-146a-5p был характерен относительно пониженный уровень экспрессии в структурах головного мозга и по нашим данным, и по данным атласа miTED.

Такая тканеспецифичность микроРНК ставит под вопрос о возможной экстраполяции данных, полученных в клетках периферической крови, на клетки центральной нервной системы для изучения патогенеза заболевания. Выявляемые в клетках периферической крови изменения микроРНК при нейродегенерации скорее следует рассматривать в качестве доступного диагностического биомаркера заболевания. В то же время, однонаправленность изменений экспрессии микроРНК в крови и в головном мозге при БП требуют дальнейших подтверждений с изучением большего количества образцов «патологии» и «нормы».

Отдельно стоит отметить, что исследование микроРНК в данной работе проводилось на материале из парафиновых блоков после длительного их хранения (в случае образцов областей головного мозга оно составило 5 лет). Полученные результаты подтверждают сохранность микроРНК и возможность их исследования в архивном материале.

Экспрессия 760 генов, ассоциированных с развитием нейропатологического процесса, в группе пациентов с БП и в контрольной группе

При сравнении экспрессии в мультиплексном режиме с помощью панели Neuropathology Panel (Nanostring) общей группы БП с группой контроля не было выявлено различий, которые бы соответствовали бы критериям дифференциальной экспрессии генов. Отсутствие дифференциально экспрессирующихся генов, возможно, связано с гетерогенностью собранной выборки – наличием ранних и поздних стадий, разбросом значений длительности заболевания, тяжести состояния, наличием противопаркинсонической терапии у части пациентов.

При сравнении экспрессии генов на начальных стадиях БП и в контрольной группе выявлены отличия в экспрессии для двух генов – *CDKN1A* и *CPT1B* (табл. 4). Из этих двух переменных (экспрессия *CDKN1A* и *CPT1B*) была составлена

логистическая регрессионная модель с последующей оценкой с помощью ROC-анализа (рис. 2). Показатель AUC составил 0,91 (доверительный интервал – 0,814–1,00), чувствительность – 87,5%, специфичность – 77%, то есть модель потенциально можно отнести по условной шкале к уровню с «отличной» диагностической значимостью (“excellent”, AUC > 0,9), однако данный результат требует валидации на независимых выборках.

Таблица 4. Дифференциально экспрессирующиеся гены в группе начальной болезни Паркинсона по сравнению с контрольной группой.

Ген	Н-БП (N=13)	К (N=16)	ФС	p	q
<i>CDKN1A</i>	47,2±13,4	80,6±19,6	0,62	0,0002	0,01
<i>CPT1B</i>	36,4±13,5	56,1±16,8	0,61	0,0004	0,01

Примечания: Н-БП – начальная болезнь Паркинсона. К – контрольная группа. ФС – кратность отношения величин, полученных в группах; q – значение p после коррекции на множественные сравнения.

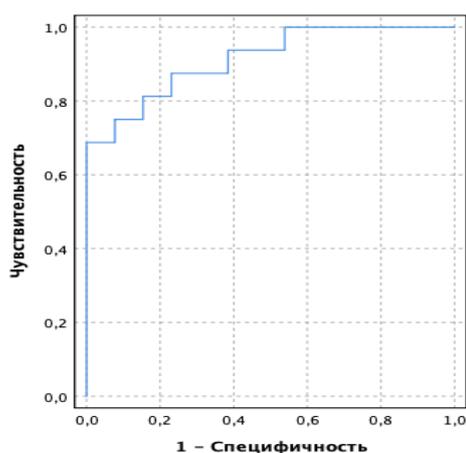


Рисунок 2. ROC-анализ для комбинации двух генов, имеющих дифференциальную экспрессию при начальных стадиях БП при сравнении с контрольной группой.

Известно, что ген *CDKN1A* кодирует ингибитор циклин-зависимых киназ и играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Рядом работ показано его участие в процессах нейродегенерации (Lanke *et al.*, 2018; Santos-Lobato *et al.*, 2021). *CPT1B* кодирует карнитин-пальмитоилтрансферазу I, данный белок регулирует бета-окисление в митохондриях (Strauss *et al.*, 2005). Как известно, митохондриальная дисфункция является одним из основных звеньев патогенеза БП.

В данной работе для обоих генов – *CDKN1A* и *CPT1B* – было показано снижение их экспрессии в лейкоцитах крови на начальных стадиях БП.

При сопоставлении уровней экспрессии генов у пациентов в развернутой стадии БП с контрольной группой было показано повышение экспрессии уровня гена *LRP1* при БП ($118,0 \pm 34,8$ для П-БП, $69,6 \pm 27,4$ для контрольной группы, $FC=1,7$, $p=0,0004$; $q=0,01$). Ген *LRP1* кодирует белок, ассоциированный с рецептором липопротеидов низкой плотности, который осуществляет связывание с ApoE, клиренс бета-амилоида и участвует в патогенезе болезни Альцгеймера (Ma *et al.*, 2022). При этом последние работы показывают, что белок LRP1 играет одну из ключевых ролей в прионоподобном распространении патологии тау-белка и α -синуклеина (Chen *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023) и может повышаться при БП (Wilhelmus *et al.*, 2011; Ozdilek *et al.*, 2022).

Сопоставление уровня экспрессии генов нейропатологии с демографическими характеристиками, моторными и немоторными проявлениями БП

В исследуемой выборке не было выявлено значимых отличий в экспрессии генов в зависимости от пола. Также в общей группе БП не было выявлено корреляций экспрессии генов нейропатологии с возрастом пациентов и с возрастом дебюта заболевания. Были выявлены многочисленные корреляционные связи между уровнями экспрессии ряда генов и клиническими маркерами прогрессирования заболевания – длительностью болезни и тяжестью состояния по шкале Hoehn-Yahr, MDS-UPDRS-I ($R>0,3$, $p<0,01$, табл. 5). После поправки на множественные сравнения статистическая значимость сохранилась для прямой корреляции между уровнем экспрессии *CPT1B* и длительностью БП. Не выявлено значимых корреляций с общим баллом шкалы MDS-UPDRS, а также баллами по 2-й и 3-й ее подшкалам.

При сравнении пациентов на начальных стадиях заболевания и пациентов на развернутых стадиях БП было выявлено, что на начальных стадиях имеет место сниженная экспрессия *CPT1B*, тогда как на развернутых стадиях – повышенная (табл. 6). Полученное различие согласуется с прямой корреляцией экспрессии *CPT1B* и длительностью болезни. Кроме того, имелась тенденция к корреляции

между уровнем экспрессии *CPT1B* и тяжестью заболевания по шкале Hoehn–Yahr, не достигавшая статистической значимости после поправки на множественные сравнения (табл. 5). Учитывая выявленные ассоциации, экспрессия данного гена заслуживает внимания как потенциальный биомаркер прогрессирования БП.

Таблица 5. Корреляционные связи между экспрессией генов нейропатологии и клиническими маркерами прогрессирования БП.

Ген	Длительность заболевания		Стадия по шкале Hoehn-Yahr		Подшкала MDS-UPDRS-I	
	R	p	R	p	R	p
<i>AGER</i>	0,454	0,009	--	--	--	--
<i>COMT</i>	--	--	0,526	0,002	--	--
<i>CPT1B</i>	0,639	<0,001#	0,603	<0,001	--	--
<i>DOT1L</i>	0,461	0,008	0,471	0,007	--	--
<i>FUS</i>	0,517	0,002	0,484	0,005	--	--
<i>GAA</i>	--	--	0,534	0,002	--	--
<i>HTRA2</i>	0,533	0,002	0,562	0,001	--	--
<i>INPP5F</i>	0,468	0,007	0,470	0,007	--	--
<i>LRP1</i>	0,485	0,005	0,509	0,003	0,479	0,006
<i>MAP2K2</i>	0,476	0,006	0,490	0,004	0,488	0,005
<i>MTOR</i>	0,527	0,002	--	--	--	--
<i>NAGLU</i>	0,534	0,002	--	--	--	--
<i>P2RX7</i>	0,532	0,002	0,541	0,001	0,471	0,007
<i>PDGFRB</i>	0,478	0,006	0,584	<0,001	--	--
<i>PRPF31</i>	0,486	0,005	0,501	0,004	--	--
<i>TCERG1</i>	0,623	<0,001	0,580	<0,001	--	--
<i>TFAM</i>	--	--	0,513	0,003	--	--

“--“ - $p > 0,01$. # - $q < 0,05$

Таблица 6. Дифференциальная экспрессия гена *CPT1B* у пациентов на развернутых стадиях по сравнению с начальными стадиями БП.

Ген	Н-БП	П-БП	FC	p	q
<i>CPT1B</i>	36,4±13,5	64,8±40,1	1,78	0,0005	0,01

Примечание: Н-БП – начальные стадии БП. П-БП – развернутые стадии БП. FC – кратность отношения величин полученных в группах. q – значение p после коррекции на множественные сравнения.

Проводился подробный корреляционный анализ для немоторных проявлений БП. Была выявлена тенденция ($p < 0,01$, $q > 0,05$) к обратной корреляции между

тяжестью когнитивных расстройств (по шкале MoCA) и экспрессией гена *SLC11A1*, между баллом по шкале депрессии HADS и экспрессией генов *NLRP3* и *GLS*, а также между общим баллом немоторных симптомов (по шкале NMSQ) и экспрессией генов *SAMK4* (прямая корреляция) и *POLR2J* (обратная корреляция).

Не было выявлено значимых корреляций между экспрессией 760 генов нейропатологии и качеством жизни пациентов, оцениваемом с помощью опросника PDQ-39.

Исследование экспрессии генов, связанных с развитием моногенных форм БП

Около 5–10% случаев БП вызываются мутациями в определенных генах (Reed *et al.*, 2019). В связи с этим была отдельно проанализирована экспрессия генов, мутации в которых вызывают наследственные формы БП (табл. 7).

Таблица 7. Экспрессия генов, ответственных за развитие моногенных форм* БП, в группе пациентов и в контрольной группе.

Ген	БП	К	FC	p	q
<i>SNCA (PARK1)</i>	173,2±64,5	235,6±111,7	0,73	0,012	0,25
<i>LRRK2 (PARK8)</i>	1289,1 ±443,0	1017,6±409,4	1,27	0,012	1,00
<i>PRKN(PARK2)</i>	1,9±1,5	3,0±2,3	0,65	0,113	1,00
<i>DJI (PARK7)</i>	738,4±139,5	676,2±123,0	1,09	0,154	1,00
<i>UCHL1 (PARK5)</i>	8,8±7,8	11,4±7,9	0,77	0,200	1,00
<i>PLA2G6 (PARK14)</i>	43,0±15,4	48,3±15,8	0,89	0,801	1,00
<i>ATP13A2 (PARK9)</i>	36,6±11,8	40,3±15,4	0,91	0,377	1,00
<i>GBA</i>	237,1±41,7	226,5±51,8	1,05	0,539	1,00
<i>HTRA2 (PARK13)</i>	44,6±20,4	47,8±16,5	0,93	0,463	1,00
<i>VPS35 (PARK17)</i>	432,4±72,7	443,4±55,2	0,97	0,526	1,00
<i>SYNJ1 (PARK20)</i>	102,9±25,4	100,9±26,8	1,02	0,580	1,00
<i>PINK1(PARK6)</i>	165,8±45,2	167,0±67,7	0,99	0,783	1,00

* Гены, ассоциированные с оставшимися формами PARK11, PARK15, PARK18, PARK19, PARK22, PARK23, PARK24, в панели Nanostring не представлены.

Статистически значимых отличий экспрессии при БП и в контрольной группе выявлено не было. Тем не менее, наблюдалась тенденция к снижению уровня

экспрессии (в 1,4 раза) гена *SNCA*, кодирующего α -синуклеин, при БП по сравнению с контрольной группой ($p=0,01$, $q>0,05$).

Сопоставительный анализ дифференциально экспрессирующихся генов нейропатологии и микроРНК

Был проведен корреляционный анализ четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК (*miR-29c-3p*, *miR-7-5p*, *miR-30-5p* и *miR-29a-3p*) с тремя генами нейропатологии, показавшими дифференциальную экспрессию (*CDKN1A*, *CPT1B* и *LRP1*), а также с геном *SNCA*, кодирующим α -синуклеин, который является основным нейропатологическим маркером БП и который продемонстрировал тенденцию к дифференциальной экспрессии. Были выявлены две обратные корреляция – между экспрессией *miR-7-5p* и *CPT1B* ($R=-0,49$, $p=0,005$), а также между экспрессии *miR-7-5p* и *LRP1* ($R=-0,46$; $p=0,014$).

Был проведен функциональный анализ мишеней для указанных микроРНК среди 4 перечисленных выше генов по базе данных miRDB. Выявлена известная пара «микроРНК – ген-мишень»: *miR-7-5p* – *SNCA*, то есть *miR-7-5p* может связываться с мРНК α -синуклеина, регулируя и снижая уровень ее экспрессии. Других пар «микроРНК – ген-мишень» выявлено не было.

Выявленные связи могут являться отражением сетевых изменений регуляторных и белок-кодирующих РНК, происходящих при БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе показаны изменения регуляторных микроРНК, наблюдаемые при БП, на различных стадиях заболевания в зависимости от клинической картины, а также на фоне основных противопаркинсонических препаратов. Также в работе проанализированы кодирующие транскрипты генов, задействованных в нейропатологических процессах. Среди них выявлены дифференциально экспрессирующиеся гены при БП, которые характеризуют ранние и развернутые стадия заболевания. Представленные результаты являются перспективными и заслуживают проведения репликативных исследований, валидации на обширных выборках пациентов с целью детальной оценки их воспроизводимости.

ВЫВОДЫ

1. При болезни Паркинсона РНК-маркеры могут быть ценной молекулярной характеристикой, позволяющей расширить возможности диагностики. У пациентов с болезнью Паркинсона при сравнении с группой здоровых добровольцев выявляются четыре дифференциально экспрессирующиеся микроРНК в лейкоцитах крови – miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-30c-5p, miR-29c-3p; комбинация данных микроРНК обладает диагностической чувствительностью 76% и специфичностью 69%. Первые три из указанных микроРНК имеют высокую диагностическую значимость уже на ранних стадиях заболевания.
2. Уровень микроРНК коррелирует с длительностью болезни Паркинсона (miR-129-5p, miR-132-3p и miR-146a-5p, $R > 0,5$) и связан с наличием немоторных аффективных нарушений (miR-30c-5p, $p < 0,01$). У пациентов с болезнью Паркинсона отмечается ассоциация с фенотипической формой заболевания (miR-29a-3p, $p = 0,01$), что подтверждает гетерогенность данного заболевания на молекулярном уровне. Противопаркинсоническая терапия влияет на характер экспрессии микроРНК: на фоне леводопы, агонистов дофаминовых рецепторов и амантадинов показано изменение экспрессии, соответственно, miR-29a-3p ($p = 0,03$), miR-7-5p ($p = 0,004$) и miR-30c-5p ($p = 0,049$), miR-7-5p ($p = 0,03$).
3. Экспрессия микроРНК является тканеспецифичной, что подтверждается выявленными различиями в экспрессии ряда микроРНК при болезни Паркинсона в областях головного мозга и периферических тканях в сравнении с лейкоцитами крови. Поэтому, несмотря на определенный диагностический потенциал определения экспрессии в лейкоцитах, эти данные не могут быть напрямую экстраполированы на процессы, происходящие в головном мозге.
4. Ранние стадии болезни Паркинсона характеризуются снижением экспрессии в лейкоцитах двух генов – *CDKN1A* (регулятора клеточного цикла) и *CPT1B* (регулятора бета-окисления в митохондриях), при этом их комбинация обладает диагностической чувствительностью 88% и специфичностью 77%. На

развернутых стадиях заболевания отмечается повышение экспрессии гена *LRP1* (участника прионоподобного распространения α -синуклеина), тогда как с длительностью заболевания ассоциирована экспрессия *CPT1B* ($q < 0,05$). Другие клинические характеристики заболевания не связаны с РНК-маркерами изученных генов нейропатологии.

5. При болезни Паркинсона отмечаются сетевые, взаимосвязанные изменения в экспрессии микроРНК и генов нейропатологии, что подтверждается корреляционными связями между экспрессией *miR-7-5p* и *CPT1B* ($R = -0,49$, $p = 0,005$), *miR-7-5p* и *LRP1* ($R = -0,46$; $p = 0,014$), а также функциональной связью *miR-7-5p* с ее геном-мишенью *SNCA*, кодирующим α -синуклеин.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Исследование комбинации уровней экспрессии четырех микроРНК – *miR-7-5p*, *miR-29a-3p*, *miR-29c-3p* и *miR-30c-5p* – может служить подтверждающим диагностическим маркером болезни Паркинсона.
2. Определение уровней экспрессии генов *CDKN1A* и *CPT1B* потенциально может применяться в качестве дополнительного диагностического биомаркера в сложных случаях у пациентов на ранних стадиях болезни Паркинсона.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ардаширова Н.С. МикроРНК в патогенезе и диагностике болезни Паркинсона / Ардаширова Н.С., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37. – № 2. – С. 99–105
2. Ardashirova N. MiR-146 as a potential biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Abramychева N., Fedotova E., Illarioshkin S. MiR-146 as a potential biomarker for Parkinson's disease. // European Journal of Neurology. – 2020. – Vol. 27, Supplement 1 – P. 633
3. Ardashirova N. MiR-126-3p as a potential biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Abramychева N., Fedotova E., Illarioshkin S. // European Journal of Neurology – 2021. – Vol. 28 Supplement 1 – P. 238.

4. Ardashirova N. MicroRNAs as a potential biomarker of Parkinson's disease / Ardashirova N., Protopopova A., Abramychева N., Fedotova E., Illarioshkin S. // Movement Disorders. – 2021. – Vol. 36 Supplement 1 – P. 329-330.
5. Ardashirova N. MiR-29c-3p could be a biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Arbamycheva N., Fedotova E., Illarioshkin S. / Abstract Book from XXVI World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 1 – 4 May 2021 - International Association of Parkinsonism and Related Disorders, 2021 – P.32-33.
6. Ардаширова Н.С. Изменение профиля экспрессии микроРНК в лейкоцитах пациентов с болезнью Паркинсона / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // Изменение профиля экспрессии микроРНК в лейкоцитах пациентов с болезнью Паркинсона. – 2022. – Acta Naturae. – Т.14. – №3(54) – С. 79-84.
7. Ардаширова Н.С. Тканеспецифичность экспрессии микроРНК при болезни Паркинсона / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Ануфриев П.Л., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // **Нервные болезни.** – 2022. – № 3. – С. 3-9.
8. Ардаширова Н.С. Выявление РНК-маркеров болезни Паркинсона с помощью мультиплексного анализа геной экспрессии / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Муджири Н.М., Иллариошкин С.Н. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** - 2022. - Т. 16. - №4. - С. 38-43.
9. Федотова Е.Ю. Эпигенетика нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся расстройствами движений / Е. Ю. Федотова, Н. Ю. Абрамычева, Е. В. Яковенко, Н.С. Ардаширова, Е.П. Нужный, С.А. Ключников, М.В. Ершова, С.Н. Иллариошкин // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2022. – № 2. – С. 215-218.
10. Ardashirova N. mRNA biomarkers for Parkinson's disease progression / Ardashirova N., Abramychева N., Fedotova E., Voronkova A., Mudzhiri N., Sukhorukov V., Illarioshkin S. // European Journal of Neurology. – 2022. – Vol. 29, Supplement 1. – P. 863.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДР – агонисты дофаминовых рецепторов

БП – болезнь Паркинсона

ДЭГ – дифференциальная экспрессия генов

Н-БП – начальные стадии болезни Паркинсона

ОТ-ПЦР – метод обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией

П-БП – развернутые стадии болезни Паркинсона

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция реального времени

AUC – площадь под кривой

FC – кратность отношения величин

FDR – ожидаемая доля ложных отклонений

HADS – госпитальная шкала депрессии и тревоги

MDS – Международное общество расстройств движений

MDS-UPDRS – Унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона Международного общества расстройств движений

MoCA – Монреальская шкала когнитивной оценки

NMSQ – шкала немоторных нарушений

PDQ-39 – опросник качества жизни при болезни Паркинсона