

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение

высшего образования

**«ЯРОСЛАВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ**

**МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**Министерства здравоохранения**

**Российской Федерации**

ФГБОУ ВО ЯГМУ

Минздрава России

150000, г. Ярославль, ул. Революционная, 5

Тел. (4852) 30-56-41 Тел./факс 72-91-42

<http://www.yma.ac.ru> E-mail: [rector@yma.ac.ru](mailto:rector@yma.ac.ru)

31.08.2023 № 9/19-372

На №

**«УТВЕРЖДАЮ»**

Ректор ФГБОУ ВО «Ярославский  
государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ

академик РАН, доктор медицинских наук,

профессор А. Л. ХОХЛОВ



г.

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

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

**о научно-практической значимости диссертации**

**Ардашировой Натальи Сергеевны**

**на тему «РНК-биомаркеры болезни Паркинсона»,**

**представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям:**

**3.1.24. – Неврология и 1.5.7. - Генетика**

#### **Актуальность исследования**

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой второе по распространенности нейродегенеративное заболевание в мире, им страдает 1-2 из 1000 человек, а среди населения старше 60 лет распространенность составляет 1%. Клиническая картина БП представлена разнообразными моторными и немоторными проявлениями, и заболевание характеризуется медленным прогрессированием, приводящим к инвалидизации пациентов. На сегодняшний день терапия, которая бы замедляла прогрессирование БП, не разработана.

Природа БП, как и у многих других нейродегенеративных заболеваний, имеет многофакторный характер. Малая часть случаев относится к моногенным формам, в то время как причины развития большинства случаев БП остаются неизвестными. Среди факторов, способствующих развитию заболевания, в литературе упоминается нарушение регуляции экспрессии генов.

Регуляция экспрессии генов при БП зависит от всех основных известных эпигенетических механизмов, таких как метилирование ДНК, модификации гистонов и некодирующие РНК. Особое внимание уделяется микроРНК (длиной в 19–24 нуклеотида), которые являются самым изученным классом некодирующих РНК.

На данный момент диагноз БП ставится в основном на основании клинических данных, но его точность не превышает 80%, поэтому поиск биомаркеров становится все более важным, так как это позволит улучшить диагностику заболевания при жизни и разрабатывать более эффективные методы лечения, замедляющие прогрессирование болезни. В качестве потенциальных биомаркеров исследуются регуляторные и белок-кодирующие транскрипты.

Для изучения экспрессии кодирующих и некодирующих РНК используются различные методы, такие как транскриптомный анализ, мультиплексные панели и прямое определение экспрессии отдельных РНК с помощью ПЦР. При БП наблюдаются изменения в крупных генных сетях, а также изменения экспрессии множества генов и их регуляторных молекул. Изучение экспрессии как кодирующих, так и некодирующих РНК у одних и тех же пациентов представляет интерес с патогенетической точки зрения и для поиска биомаркеров.

В предыдущих исследованиях у пациентов с БП были выявлены значимые изменения в экспрессии микроРНК по сравнению с контрольной группой. Некоторые работы указывают на специфический набор микроРНК в крови, который статистически значимо отличается у пациентов с БП, однако значение микроРНК в качестве диагностических биомаркеров требует дополнительного исследования, так как экспрессия микроРНК может быть тканеспецифичной и динамичной в различных тканях при развитии заболевания.

Кроме микроРНК, исследовалась экспрессия генов, включая транскриптомный анализ. Однако из-за большого количества изучаемых транскриптов и ограниченных выборок результаты исследований не всегда согласуются между собой. В различных работах выявлялись отличия в экспрессии различных генов, и в настоящее время данные мало воспроизводимы. Поиск биомаркеров среди кодирующих РНК является перспективным направлением, но требует дальнейшего изучения.

Таким образом, представленная диссертационная работа, посвященная поиску РНК-биомаркеров у пациентов с БП, является актуальной для современной неврологии и генетики.

## **Новизна исследования и полученных результатов**

Впервые был проведен исследовательский анализ, включающий профиль экспрессии большого количества генов, связанных с нейропатологическими процессами, а также регуляторных микроРНК, у пациентов с БП одновременно на клетках крови и аутопсийном материале. Были обнаружены дифференциально экспрессирующиеся микроРНК (miR-29c-3p, miR-29a-3p, miR-7-5p, miR-30c-5p) и гены (*CDKN1A* и *CPT1B*), которые показали свою значимость в качестве диагностических биомаркеров при БП. Кроме того, были выявлены интересные корреляции с клинической картиной заболевания, включая продолжительность, форму и степень выраженности немоторных проявлений, а также связь с применением противопаркинсонических препаратов. На основе одной исследовательской выборки пациентов были продемонстрированы взаимосвязанные, сетевые изменения в экспрессии как кодирующих, так и некодирующих РНК при БП.

## **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными, поскольку основываются на достаточном количестве клинических и лабораторных данных. Основная выборка составила 70 пациентов с БП и 40 здоровых добровольцев, в крови которых была определена экспрессия микроРНК. Для определения экспрессии 760 генов с помощью панели Nanostring Human Neuropathology Panel из данной группы было выбрано 29 пациента с БП и 16 здоровых добровольцев.

В диссертации представлен анализ экспрессии генов и микроРНК, оценена дифференциальная экспрессия при БП и в контрольной группе, а также на различных стадиях БП, при различной клинической картине. Для микроРНК была показана связь изменения экспрессии с приемом противопаркинсонических препаратов. Статистическая обработка материала проведена с использованием набора адекватных методов статистического анализа, были введены поправки на множественные сравнения. Сформулированные выводы полностью соответствуют поставленной целям и задачам.

## **Достоверность полученных результатов**

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается репрезентативностью и достаточным объемом выборки, грамотно разработанным дизайном

исследования с правильно сформированными критериями включения и исключения пациентов, применением методов исследования, адекватных поставленным целям и задачам, а так же научно обоснованными методами статистического анализа. Это позволило правильно интерпретировать полученные результаты и сформулировать обоснованные выводы и практические рекомендации.

### **Научная и практическая ценность диссертации**

Теоретическое значение данной работы заключается в выявлении перспективных регуляторных и кодирующих РНК, уровень экспрессии которых изменяется у пациентов с БП. Это включает определение характерных паттернов экспрессии при различных фенотипах заболевания. Исследованы соотношения уровней экспрессии микроРНК в различных тканях и областях головного мозга при БП, что позволило подтвердить тканеспецифичность экспрессии микроРНК.

Практическое значение этой работы заключается в выявлении информативных РНК-биомаркеров, которые могут быть полезны в качестве дополнительных диагностических показателей при БП, особенно в сложных случаях и на ранних стадиях заболевания. Это основано на обнаруженных различиях в экспрессии генов у данной категории пациентов. Кроме того, исследование предложило потенциальные молекулярно-генетические маркеры, связанные с прогрессированием БП, что может иметь важное клиническое применение.

Результаты работы внедрялись при выполнении НИР в рамках темы научно-исследовательской работы № АААА-А20-120110390022-1.

### **Личный вклад автора**

Научные результаты, обобщенные в диссертационной работе, получены автором самостоятельно. Клиническая часть работы была выполнена на базе 5-ого неврологического и научно-консультативного отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии». Молекулярно-генетическая часть работы была выполнена на базе ДНК-лаборатории 5-ого неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии». На этапе планирования научной работы соискатель непосредственно участвовал в разработке дизайна исследования, постановке цели и задач. Соискатель разработала и заполнила всю базу данных исследования, провела осмотр и оценку по шкалам пациентов, самостоятельно проводила большинство молекулярно-генетических исследований (подготовку образцов крови, выделение РНК, обратную

транскрипцию, полимеразную цепную реакцию). Статистическая обработка данных выполнена автором самостоятельно. Автор принимала активное участие в формулировании выводов и практических рекомендаций.

### **Оценка содержания диссертации**

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, иллюстрирована 16 таблицами и 16 рисунками, состоит из введения, обзора литературы по теме работы (1 глава), описания материалов и методов исследования (2 глава), изложения собственных результатов (3 глава), обсуждения (глава 4), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы, который включает 221 источник, из них 16 отечественных и 205 иностранных источников, 10 публикаций по теме диссертационной работы, 3 клинических наблюдений, содержит 10 приложений. Текст диссертации написан четким научным языком, стилистически выверен. Материал изложен в логической последовательности, результаты исследования базируются на достаточной выборке. Иллюстративный материал и таблицы наглядны и выполнены на высоком уровне.

Во введении обозначена актуальность проблемы. Отражена цель исследования - анализ биомаркерной роли микроРНК и РНК-транскриптов, ассоциированных с широким кругом нейропатологических процессов, у пациентов с БП. Четко сформулированы задачи исследования. Определена научная новизна и практическая значимость результатов исследования, выдвинуты положения, выносимые на защиту.

В первой главе компетентно и четко изложены современные представления о БП, ее этиологии, патогенезе, клинической картине, диагностике. Детально изложено современное состояние задачи поиска биомаркеров БП, обсуждены предыдущие публикации с акцентом на биомаркеры в крови, в частности, РНК-биомаркеры. Рассматриваются как белок-кодирующие, так и некодирующие, регуляторные РНК, подробно рассмотрены микроРНК.

Во второй главе описана подробная методология исследования. Приведены данные обследованных пациентов, обозначены критерии включения и невключения пациентов в исследование, описаны клинические шкалы, по которым описывалась клиническая картина пациентов. Детально описаны молекулярно-генетические методы, которые использовались в данной работе, показано обоснование выбора целевых микроРНК, особенности проведения количественного анализа экспрессии, рассчитана его эффективность. Приведена методика выделения микроРНК из парафиновых блоков. Детально изложен принцип технологии Nanostring, приведен список фундаментальных клеточных процессов и функциональных путей, в которые входят гены панели Neuropathology Panel.

В третьей главе представлены результаты исследования: приведены результаты экспрессии 12 микроРНК, для 4 из них (miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-30c-5p, miR-29c-3p) показана дифференциальная экспрессия. Рассчитаны площади под кривой как для каждой микроРНК в отдельности, так и для всего набора. Были выявлены корреляции ряда микроРНК с длительностью заболевания, формой, стадией заболевания по шкале Hoehn-Yahr, с наличием депрессивной симптоматики, с баллом по шкале немоторных симптомов. Проанализировано влияние противопаркинсонических препаратов на экспрессию микроРНК. В связи с актуальностью ранней диагностики отдельно проанализирована экспрессия в группе пациентов с начальными стадиями БП, проведены сравнения с контрольной группой и корреляционный анализ. Изучена экспрессия ряда микроРНК в аутопсийных образцах пациентов с БП в органах, которые поражаются при данном заболевании, и показана тканеспецифичность экспрессии микроРНК.

Во второй части третьей главы проанализирована экспрессия 760 генов с помощью Nanostring Neuropathology Panel. Было выявлено, что на начальных стадиях заболевания по сравнению с контрольной группой отмечается дифференциальная экспрессия двух генов – *CDKN1A* и *CPT1B*. Также показано, что на продвинутых стадиях отмечается повышение экспрессии *LRP1* в группе развернутых стадий БП. При анализе экспрессии в зависимости от длительности заболевания выявлено повышение экспрессии *CPT1B* по мере прогрессирования БП, что позволяет рассматривать его как потенциальный биомаркер прогрессирования. Были выявлены корреляции ряда генов с моторными и немоторными симптомами, выраженными в соответствующих баллах по клиническим шкалам. Отдельно выбраны гены, ответственные за развитие моногенных форм БП, достоверных отличий в экспрессии при болезни Паркинсона и в контрольной группе выявлено не было. В связи с тем, что анализ проводился на одной и той же выборке, были изучены корреляции генов нейропатологии и микроРНК. Были выявлены две обратные корреляция экспрессии miR-7-5p с *CPT1B* и экспрессии miR-7-5p с *LRP1*.

Четвертая глава посвящена детальному обсуждению полученных результатов, отражены наиболее важные моменты исследования, полученные результаты сопоставлены с данными опубликованной ранее научной литературы.

Выводы и практические рекомендации сформулированы четко и отражают ответы на вопросы, поставленные в задачах исследования.

#### **Полнота изложения результатов диссертации в опубликованных работах**

По материалам диссертации опубликовано 10 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых научных журналах, 2 из них – в изданиях, рекомендованных перечнем ВАК

Минобрнауки РФ, (1 – в международной базе цитирования Web of Science). Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на 6 российских и международных научно-практических конференциях. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основные положения, результаты и выводы диссертации.

### **Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы**

Результаты диссертационной работы, выводы и практические рекомендации могут быть рекомендованы для работы практикующих врачей-специалистов в области нейродегенеративных заболеваний и двигательных расстройств, сталкивающихся с диагностически сложными случаями болезни Паркинсона. Материалы, полученные в ходе исследования, и научные положения могут быть использованы также в работе молекулярно-генетических лабораторий, в образовательной деятельности учреждений высшего и дополнительного профессионального образования.

### **Замечания и вопросы**

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет. Недостатки оформления несущественны и представлены некоторыми стилистическими погрешностями, не снижающими научной значимости исследования.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Ардашировой Натальи Сергеевны на тему «РНК-биомаркеры болезни Паркинсона» является законченной и самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи: выявление РНК-биомаркеров болезни Паркинсона для улучшения клинической диагностики и уточнения патогенеза заболевания, имеющей существенное значение для неврологии и генетики.

Диссертационная работа Ардашировой Натальи Сергеевны полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 (в ред. Постановления Правительства РФ №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г., №426 от 20.03.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, ее автор Ардаширова Наталья Сергеевны

заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальностям 3.1.24. – Неврология и 1.5.7. – Генетика.

Отзыв обсужден и принят на заседании научных сотрудников Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 7 от « 28 » августа 2023 года.

(Специальность 3.1.24 - Неврология)

Заведующий кафедрой нервных болезней с медицинской генетикой и нейрохирургией  
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России,  
доктор медицинских наук, профессор  
Даю согласие на сбор и обработку  
личных данных

  
Н.Н. Спири́н

Н.Н. Спири́н

(Специальность 1.5.7. - Генетика)

Доцент кафедры биологии с генетикой  
ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздрава России,  
кандидат медицинских наук, доцент  
Даю согласие на сбор и обработку  
личных данных


  
С.В. Тихомирова

С.В. Тихомирова

Подписи профессора Н.Н. Спирина и доцента С.  
Ученый секретарь ФГБОУ ВО ЯГМУ Минздра

И заверяю:

профессор И.М.Мельникова.

  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 150999, Россия, г. Ярославль, ул. Революционная, дом 5.  
Тел.: +7 (4852) 30-56-41 e-mail: rector@ysmu.ru