

**МАКАРОВА АНГЕЛИНА ГЕННАДЬЕВНА**

**ЦЕРЕБРАЛЬНАЯ МИКРОАНГИОПАТИЯ: ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С ВОСПАЛЕНИЕМ  
(КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.24. Неврология

3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук

**Добрынина Лариса Анатольевна**

доктор медицинских наук

**Шабалина Алла Анатольевна**

**Официальные оппоненты:**

**Савин Алексей Алексеевич**, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры неврологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

**Щербо Сергей Николаевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Факультета дополнительного профессионального образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Защита диссертации состоится** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в «\_\_:\_\_» часов на заседании диссертационного совета 24.1.186.01 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](http://www.neurology.ru).

**Автореферат разослан** «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 года.

**Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат медицинских наук**

**Кузнецова Полина Игоревна**

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Возраст-зависимая церебральная микроангиопатия (ЦМА) (болезнь мелких сосудов) – основная причина сосудистых и смешанных с нейродегенерацией когнитивных расстройств (КР), четверти всех инсультов, значимая причина инвалидизации и смертности (Боголепова А.Н., 2015; Парфенов В.А., 2017; Pantoni L., 2010; Wardlaw J.M. et al., 2013; Feigin V.L. et al., 2019). В то же время ЦМА остается заболеванием с неуточненными патогенетическими механизмами и как следствие – отсутствием модифицирующего лечения (Wardlaw J.M. et al., 2019). Терапевтическая стратегия, направленная на коррекцию артериальной гипертензии как основного фактора риска, не привела к снижению частоты КР в популяции (SPRINT M. et al., 2019).

Проведенные в последние десятилетия гистологические и иммуногистохимические исследования на экспериментальных животных и аутопсийных образцах мозга указывают на значимую роль воспаления, сопряженного с эндотелиальной дисфункцией, повреждением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и нейровоспалением, в развитии ЦМА (Gouw A.A. et al., 2011). Общность воспаления и ассоциированных с ним механизмов для развития ЦМА и болезни Альцгеймера (БА) (Zimmer E.R. et al., 2014; Gomez-Nicola D., 2015; Chandra A. et al., 2019), позволяет предполагать, что хронические воспалительные реакции с устойчивым присутствием в ЦНС цитокинов, свободных радикалов и окислительного стресса являются потенциальными факторами формирования коморбидности двух заболеваний (Jian B. et al., 2020; Poudel P., 2022). Подтверждением роли воспаления и связанных с ним механизмов при ЦМА являются и установленные взаимосвязи когнитивных и психоэмоциональных расстройств, разных вариантов течения заболевания с циркулирующими биомаркерами воспаления (Добрынина Л.А. и др., 2018; 2020; Poggesi A. et al., 2016; Dobrynina L.A. et al., 2020; Low A. et al., 2021).

Проведенные в последние годы полногеномные исследования ассоциаций (genome-wide association studies, GWAS) при ЦМА и БА подтвердили высокую значимость воспаления и функционирования иммунной системы в развитии заболеваний и выявили повторяющиеся от исследования к исследованию локусы и гены риска их развития («GWAS Catalog», <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>). До 90% всех установленных значимых GWAS-локусов расположены в некодирующих регионах, связанных с регуляцией транскрипции и трансляции генов. Эти данные при учете многофакторности в развитии ЦМА позволяют предполагать большую актуальность для прогрессирования заболевания изменений в экспрессии установленных генов. Известно, что именно эпигенетические факторы регуляции транскрипции способны увеличивать и уменьшать вклад GWAS-локусов в патогенез заболевания.

Для проведения настоящего исследования по уточнению роли изменений экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, в развитии ЦМА с КР, была отобрана группа генов на основе анализа исследований GWAS при ЦМА и ее МРТ-

признаков, БА, АГ, а также гены циркулирующих маркеров крови. На основе уточненных генов было сформировано техническое задание производителю «NanoString Technologies» (Вашингтон, США) на создание оригинальной панели оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, у пациентов ЦМА с КР для анализатора NanoString nCounter. NanoString nCounter – относительно новая система количественного определения РНК, которая обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными методами, включая ПЦР в реальном времени (qPCR) и секвенирование РНК. Она отличается высокой степенью автоматизации и эффективностью по времени, а ее чувствительность сравнима с qPCR (Geiss G.K. et al., 2008; Reis P.P. et al., 2011; Prokopc S.D. et al., 2013). Технология NanoString основана на визуализации отдельных молекул штрих-кодов с цветовой кодировкой, привязанных к специфическим для мишени зондам (Leek J.T. et al., 2010; Parker H.S. et al., 2012).

Уточнение связи ЦМА и ее клинических проявлений с экспрессией генов, ассоциированных с воспалением, позволит определить значимые маркеры прогрессирования заболевания и возможные, потенциально связанные с ними молекулярные патогенетические пути. Уточнение общих для ЦМА и БА механизмов, может стать основанием для создания диагностической панели индивидуального риска коморбидности патологий и соответственно утяжеления течения заболевания, поиска таргетных молекул для иммунотерапии.

#### **Цель исследования:**

изучить связи клинических и нейровизуализационных проявлений ЦМА с особенностями профиля экспрессии генов, ассоциированных с воспалением.

#### **Задачи исследования:**

1. Оценить профиль экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, у пациентов с ЦМА в сравнении со здоровыми добровольцами.
2. Уточнить связи сосудистых факторов риска развития ЦМА с изменением экспрессии генов, ассоциированных с воспалением.
3. Оценить связь нейропсихологических типов и выраженности КР с профилем экспрессии исследуемых генов у пациентов с ЦМА.
4. Уточнить связи МРТ-признаков и волюмометрических показателей головного мозга с профилем экспрессии исследуемых генов у пациентов с ЦМА.
5. Оценить влияние изменений экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, на формировании диагностических форм (МРТ-типов) ЦМА.

#### **Научная новизна**

Впервые разработана, создана и апробирована панель оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением при ЦМА. Использован подход к формированию панели оценки экспрессии генов на основе отбора генов воспалительного профиля, установленных при повторных GWAS ЦМА и БА, а также генов циркулирующих маркеров, ассоциированных с повреждением сосудистой стенки и мозга при ЦМА.

Впервые методом NanoString nCounter осуществлена оценка экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, при ЦМА с когнитивными расстройствами на российской популяции.

Впервые выявлены гены, изменение экспрессии которых, позволяет предсказывать развитие ЦМА и ее более тяжелое течение, развитие клинически выраженных КР. Установлены гены, изменение экспрессии которых ассоциировано с тяжестью артериальной гипертензии.

Определен профиль дифференциально экспрессирующихся генов для двух МРТ-типов ЦМА, описанных ранее на основании группирования диагностических МРТ-признаков ЦМА. Ассоциация второго МРТ-типа с изменением экспрессии генов, участвующих в процессах воспаления, позволяет предполагать более значимый вклад воспалительных реакций в его развитие.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Оригинальный подход к созданию панели определения экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, позволил установить значимые гены-маркеры для оценки прогноза тяжести течения ЦМА и связанных с ней КР. На основе установленных генов может быть создана новая панель определения экспрессии генов, значимых для индивидуального прогноза прогрессирования ЦМА с КР.

Вновь установленные молекулярные маркеры, ассоциированные с прогрессированием ЦМА и КР, формированием разных форм ЦМА, могут использоваться для диагностики разных форм течения заболевания, прогноза развития выраженных КР, тактики ведения пациентов.

Изменение экспрессии установленных генов потенциально может быть иницирующим в развитии коморбидности ЦМА и болезни Альцгеймера (смешанные сосудисто-дегенеративные формы).

### **Методология и методы исследования**

Работа проводилась в ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва) с 2020 по 2022 гг. Клиническая часть исследования выполнялась в 3-м неврологическом отделении, лабораторная и нейровизуализационная – в отделах лабораторной и лучевой диагностики соответственно. Использовался дизайн одномоментного сплошного исследования. Объектом изучения послужили пациенты ЦМА с КР и контрольная группа без сосудистой / дегенеративной патологии головного мозга. Всем участникам проводилось клиническое обследование; оценка сосудистых факторов риска; расширенное когнитивное тестирование с использованием общепризнанных шкал; определение экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, на анализаторе NanoString nCounter; МРТ головного мозга.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Более тяжелое течение ЦМА ассоциировано со снижением уровня экспрессии генов *BINI* и *VEGFA*.

2. Нарастание тяжести АГ ассоциируется со снижением экспрессии генов *FBN2*, *PLAT* и *NOS3*, а АГ кризового течения – с *WBP2*.
3. Основные пути, поддерживающие прогрессирование ЦМА и ее коморбидность с БА, вероятно, связаны со снижением VEGF-A-ангиогенеза и VEGF-C-лимфангиогенеза и BIN-опосредованного транцитоза амилоида-β.
4. Развитие клинически выраженных КР ассоциировано со снижением экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFC*, *CD2AP*, *ACE*, *BINI* и *MRPL38*.
5. Выраженные изменения белого вещества связаны со снижением уровня экспрессии *VEGFA* и связанного с ним ангиогенеза.
6. МРТ-тип 2 ЦМА на стадии ГИБВ Fazekas 3 характеризуется снижением экспрессии генов *ACOX1*, *CD33*, *CD2AP*, *TNFR1* и *VEGFC*.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности результатов обоснована достаточной когортой обследованных, применением современных методов нейровизуализации и молекулярно-генетической диагностики, адекватной статистической обработкой полученных результатов. Диссертация апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании научных сотрудников клинических отделений и лабораторий клинической и профилактической неврологии, института мозга, института нейрореабилитации и восстановительных технологий ФГБНУ «Научный центр неврологии» (Протокол № 5 от года). Материалы диссертации представлены на 9-м Конгрессе Европейской академии неврологии, XII Всероссийской научно-практической конференции «Поленовские чтения», Нейрофоруме-2023, Российском конгрессе лабораторной медицины-2023.

### **Публикации**

По материалам диссертации подготовлено 13 публикаций, из них 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Личный вклад автора**

Автору принадлежит определяющая роль в разработке протокола исследования, в постановке цели и задач, обосновании основных положений, формулировании выводов и практических рекомендаций. Отобраны пациенты, проведен подробный клинико-неврологический осмотр, тестирование когнитивных функций, оценка сосудистых факторов риска, сбор и обработка биоматериала (образцы крови), интерпретация и анализ полученных результатов молекулярно-генетического тестирования (под руководством заведующей отделом лабораторной диагностики ФГБНУ НЦН, доктора медицинских наук Шабалиной А.А.). Автором проанализированы основные отечественные и зарубежные источники литературы, проведены аналитическая и статистическая обработка, а также обобщены полученные данные.

### **Внедрение результатов работы**

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

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц и иллюстрирована 17 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, общей характеристики обследованных лиц и методов исследования, главы собственных результатов исследования, обсуждения, выводов, практических рекомендаций и литературного указателя, содержащего 43 отечественных, 435 зарубежных источников и 13 публикаций автора, подготовленных по теме диссертации.

### **Соответствие паспорту научной специальности**

По своей актуальности, научной новизне, практической и теоретической значимости содержание данной диссертационной работы соответствует Паспортам научных специальностей:

- 1) **3.1.24. «Неврология»**, предметная область исследования соответствует пункту:  
*3. Сосудистые заболевания нервной системы.*

Паспорта научных специальностей ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации (Медицинские науки)

- 2) **3.3.8. «Клиническая лабораторная диагностика»**, предметная область исследования соответствует пункту:

*11. Цитогенетические и молекулярно-генетические методы исследований.*

Паспорта научных специальностей ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации (Медицинские науки)

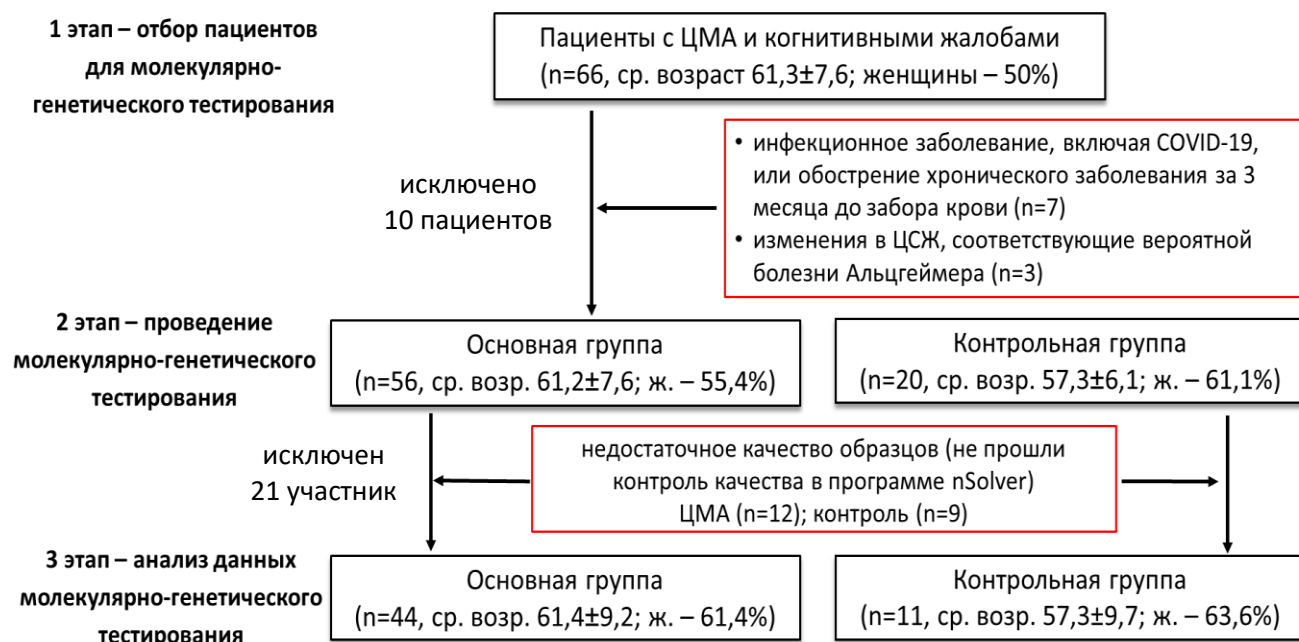
## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика групп исследования

Основную группу составили пациенты с ЦМА, соответствующие критериям STRIVE (Wardlaw J.M. et al., 2013), с T2 / FLAIR ГИБВ стадии Fazekas 2 и 3 (F2 и F3) (Fazekas F. et al., 1987), с КР, в возрасте 46-75 лет. В группу контроля вошли добровольцы без клинических и МРТ-признаков патологии головного мозга, сопоставимые по возрасту и полу. Все участники подписали информированное согласие на проведение исследования и обработку персональных данных. Исследование и его протокол одобрены локальным Этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол №10-6/20 от 27.11.2020г).

**Критерии невключения в исследование:** ЦМА вследствие других причин; наличие изменений при МРТ, кроме соответствующих ЦМА; атеросклеротический стеноз экстра- / интракраниальных артерий > 50%; амнестический тип КР вследствие вероятной БА или выявление в ЦСЖ маркеров нейродегенеративного процесса; острый и подострый период малого субкортикального инфаркта (до 3 месяцев); перенесенная острая инфекция, включая COVID-19, или обострение хронического заболевания за 3 месяца до забора крови; декомпенсированная соматическая патология; противопоказания для проведения МРТ исследования.

Алгоритм формирования групп исследования представлен на Рисунке 1. Для проведения молекулярно-генетического исследования отобраны 56 пациентов и 20 контролей.



**Рисунок 1** – Алгоритм формирования основной и контрольной групп исследования



## 2.2. Клиническое и нейропсихологическое обследование

Клиническое обследование включало анализ течения заболевания, оценку сосудистых факторов риска, соматический и неврологический осмотр, определение когнитивного уровня по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA) (Nasreddine Z.S. et al., 2005); независимости в повседневной жизни (индекс Бартел и шкала Лоутон) (Mahoney F.I., 1965; Graf C., 2008); нарушений ходьбы по оригинальной шкале НЦН (Добрынина Л.А. и др., 2018). КР определялись как СубКР при MoCA  $\geq 26$ , умеренные КР (УКР) и деменция при MoCA –  $< 26$ , соответственно независимости или зависимости от окружающих в повседневной жизни.

Расширенное тестирование отдельных когнитивных функций (КФ) проводилось всем участникам с использованием методик и тестов, показавших высокую чувствительность при ЦМА (Гаджиева З.Ш., 2019; Добрынина Л.А. и др., 2022). Тип КР определялся на основании сочетания отклонений (в сигмах) в управляющих функциях мозга (УФМ) (тест прослеживания пути ТМТ В-А и Струпа) и памяти (тест отсроченного воспроизведения 10 слов) (Добрынина Л.А. и др., 2022). При равном отклонении для обоих КФ диагностировался смешанный тип КР, при преобладании нарушений УФМ или памяти – преимущественно дизрегуляторный или амнестический, соответственно.

## 2.3. Нейровизуализационное исследование

МРТ-исследование головного мозга в стандартных и 3D T1-mpr режимах проведено всем включенным в исследование. Проводилась качественная оценка МРТ-признаков ЦМА (STRIVE, Wardlaw J.M. et al., 2013). Использовался оригинальный протокол оценки всех МРТ-признаков ЦМА по 4-балльной системе выраженности отдельно для долей мозга и трех отделов белого вещества, подкорковых структур с последующим кластерным анализом распределения и выраженности МРТ-признаков и выделением двух МРТ-типов ЦМА (Забитова М.Р., 2019; Добрынина Л.А. и др., 2020; Dobrynina L.A. et al., 2020; Kremneva E.I. et al., 2021).

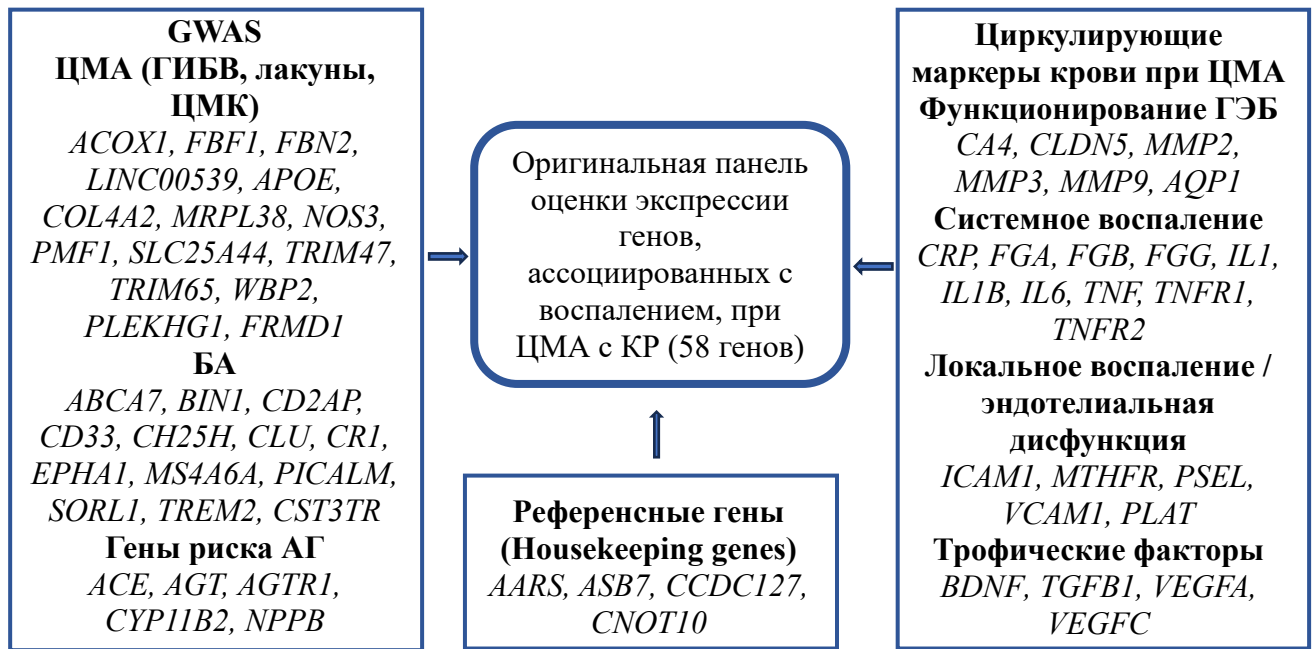
Методом повоксельной морфометрии (VBM, voxel-based morphometry) (Ashburner J., Friston K.J., 2000) (программа SPM12 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>)) оценивались общий объем ГИБВ и показатели интракраниального пространства – общий объем головного мозга (Total Brain Volume, TBV), объем серого и белого вещества (Gray Matter Volume, GM; White Matter Volume, WM), цереброспинальной жидкости (Cerebral Spine Fluid, CSF). Полученные данные нормализовывались на общий интракраниальный объем (Total Intracranial Volume, TIV).

## 2.4. Лабораторные методы исследования

### *Создание оригинальной панели оценки экспрессии генов для NanoString nCounter*

Для формирования диагностической панели оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, были проанализированы результаты полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) при ЦМА, ГИБВ, лакунах, микрокровоизлияниях, АГ и БА. По базе «GWAS Catalog» (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>) были отобраны

повторяющиеся при исследованиях гены, которые стали основой создания панели оценки экспрессии генов NanoString nCounter. В панель также были включены гены, кодирующие провоспалительные цитокины и белки, воспроизводимые при повторных исследованиях и продемонстрировавшие свою роль в патогенезе ЦМА (Воскресенская О.Н., 2016; Добрынина Л.А. и др., 2018; Забитова М.Р., 2019; Poggesi A. et al., 2016; Low A. et al., 2019; Evans L.E. et al., 2021). Таким образом, для создания панели было отобрано 58 генов (Рисунок 2).



**Рисунок 2** – Алгоритм формирования панели оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, при ЦМА с КР

Проводилась кластеризация отобранных генов в функциональные группы с помощью программы «STRING» (<https://string-db.org/>) на основе построения сетей белок-белкового взаимодействия. Названия генов приведены в соответствии с международной номенклатурой (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>).

### **Оценка экспрессии генов на панели NanoString nCounter**

Из образцов венозной крови получали лейкоцитарную фракцию, из которой выделяли тотальную РНК с использованием набора «MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit» (Thermo Fisher Scientific Inc, США) согласно прилагаемому протоколу производителя. Степень деградации и концентрацию полученной РНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (ThermoFS) с применением набора Qubit RNA IQ. Определение экспрессии генов проводилось на анализаторе NanoString nCounter с использованием оригинальной панели, изготовленной биотехнологической компанией NanoString Technologies по индивидуальному заказу (CodeSet Design). Образцы помещали в цифровой анализатор «nCounter Analysis System» (NanoString Technologies, Вашингтон, США). На Рисунке 3 приведен принцип работы метода.



**Рисунок 3** – Принцип работы NanoString, основанный на методе «молекулярных штрих-кодов» – цифровом обнаружении и прямом молекулярном штрихкодировании молекул-мишеней за счет использования таргетной пары зондов (репортерного / флуоресцентного и захватывающего для иммобилизации на поверхности чипа)

Обработка образца включала несколько этапов (Geiss G.K. et al., 2008): 1-й этап – гибридизация – инкубация образца со смесью зондов; 2-й этап – иммобилизация – зонды захватившие мишень иммобилизуются на поверхности картриджа и выравниваются, а не связавшиеся зонды удаляются в автоматизированном режиме; 3-й этап – подсчет экспрессии РНК – по количеству молекул РНК, связавшихся с зондом. Обработку полученных «сырых» данных, контроль качества и нормализацию проводили с использованием программного обеспечения «nSolver 4.0» согласно руководству пользователя. Контроль качества осуществлялся после импорта данных с оценкой следующих параметров: качество визуализации (Imaging QC) –  $> 75\%$  поля зрения; плотность связывания (Binding Density QC) – в диапазоне значений 0,1-2,25; линейность положительного контроля (Positive Control Linearity QC) –  $> 0,95$ ; предел обнаружения для положительного контроля (Positive Control Limit of Detection QC) – установлен как 0,5 fM. Нормализация выполнялась с использованием 4-х референсных генов, подобранных и включенных в панель биотехнологической компанией NanoString Technologies – *AARS*, *ASB7*, *CCDC127*, *CNOT10*. При анализе результатов из исследования исключены 12 пациентов с ЦМА и 9 контролей с недостаточным качеством образцов (визуализация  $< 75\%$  поля зрения; плотность связывания  $< 0,1$ ).

#### ***Оценка экспрессии генов методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в реальном времени***

Для генов, проявивших значимые различия в экспрессии по результатам анализа на платформе NanoString nCounter, проводилось дополнительное подтверждение полученных находок методом обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР в режиме реального времени. Подтверждающее исследование проводилось для тех же участников основной и контрольной групп. Для анализа были отобраны гены, которые показали значимые изменения уровня экспрессии для всей группы ЦМА и второго МРТ-типа ЦМА по сравнению с контрольной группой – *ACOX1*, *BIN1*, *CD2AP*, *TNFR1*, *VEGFA*. Для нормализации были использованы 2 референсных гена *AARS*, *ASB7*, из числа референсных генов, применявшихся при проведении NanoString. Оригинальные олигонуклеотидные праймеры были разработаны с помощью программы Vector NTI и синтезированы компанией ThermoFS (США).

Экстракцию тотальной клеточной РНК осуществляли с использованием реактива

TRIzol (ThermoFS, США).

Обратную транскрипцию для синтеза первой цепи кДНК проводили с помощью набора RevertAid (Thermo FS) с использованием праймера oligo-dT и MMLV-ревертазы.

Количественную ПЦР в режиме реального времени для каждой полученной кДНК соответствующего гена включая референсные проводили отдельно с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (Мастер – микс PowerTrack SYBR Green, Thermo FS) на термоциклере CFX-96 (BioRad, США).

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager BioRad (расчет уровня относительной экспрессии). Критерием уровня экспрессии мРНК служил показатель  $C(t)$  – пороговый цикл реакции для соответствующей мРНК. Уровень экспрессии исследуемых генов рассчитывался методом  $\Delta\Delta C_t$ .

## 2.5. Статистическая обработка полученных результатов

Статистический анализ проводился в программе «IBM SPSS Statistics, 26.0» (IBM) и на языке программирования R версии 4.2.2 с использованием «RStudio» (версия 2022.12.0-353).

Показатели описательной статистики для категориальных – частота и доля (%), для количественных – медиана, 1-й и 3-й квартили или среднее и стандартное отклонение. Во всех случаях использовали двусторонние варианты статистических критериев. Нулевую гипотезу отвергали при  $p < 0,05$ . Сравнительный анализ качественных показателей проводили при помощи критерия  $\chi^2$  Пирсона или критерия Фишера. Гипотеза о нормальности распределения признаков проверялась с помощью критериев Шапиро-Уилка, Колмогорова-Смирнова, построения частотных гистограмм. Количественные показатели с нормальным типом распределения сравнивали  $t$ -критерием Стьюдента, с типом распределения, отличающимся от нормального, – критерием Манна-Уитни или Краскела-Уоллиса с последующим внутригрупповым попарным анализом по методу Манну-Уитни с последующей поправкой Бонферрони на множественность сравнений. Корреляционный анализ количественных переменных проводился методом Спирмена, с оценкой значимости корреляции. Прогностическая ценность изменения экспрессии генов в отношении развития признака оценивалась методом бинарной логистической регрессии. Адекватность логистической модели подтверждалась ROC-анализом. ROC-кривые позволили определить пороговые значения экспрессии генов с определением их чувствительности и специфичности.

Оценка дифференциальной экспрессии генов проводилась путем определения двоичного логарифма отношения величин, полученных в группах ( $\log_2FC$  (fold change)), значимым считалось изменение экспрессии гена при  $|\log_2FC| > 1$ . Визуализации относительного уровня экспрессии исследованных генов проводилась путем построения «тепловой карты» в «RStudio», пакет «gplots», иерархическая кластеризация проведена методом «ward.D2», на евклидовых расстояниях между точками и визуализирована с помощью дендрограмм.

При отсутствии значимой взаимосвязи экспрессии генов с наличием КР,

проверялась гипотеза об опосредующей роли третьих переменных (медиаторов). Использовался каузальный медиаторный анализ в «RStudio», пакеты «mediation» и «lavaan», квази-Байесовский метод Монте Карло (Tingley D. et al., 2014). Обеспечение удовлетворительной сходимости результатов достигалась использованием 100 000 симуляций (Tingley D. et al., 2014). Нормализованные объемные показатели интракраниального пространства были использованы в качестве потенциальных медиаторов связей экспрессии генов (независимая переменная) и балла по MoCA (зависимая переменная).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Характеристика пациентов с ЦМА и участников контрольной группы

Общая характеристика основной и контрольной групп представлена в Таблице 1. Основные значимые различия касались наличия АГ и ее тяжести при ЦМА.

**Таблица 1**

Общая характеристика обследуемых основной и контрольной групп

Показатели	ЦМА (n = 44)	Контроль (n = 11)	p
Возраст (mean±SD)	61,4±9,2	57,3±9,7	0,293
Пол (n, %): женский / мужской	27 (61,4%) / 17 (38,6%)	7 (63,6%) / 4 (36,4%)	1,000
АГ (n, %) степень 1 / 2 / 3	44 (100%) 4 (9,1%) / 14 (31,8%) / 26 (59,1%)	4 (36,7%) 2 (18,2%) / 2 (18,2%) / 0	<b>0,001</b> <b>0,001</b>
Кризовое течение АГ (n, %) частота кризов (n, %): редкие (1-2) / частые (>3 в год)	21 (47,7%) 16 (36,4%) / 5 (11,4%)	1 (9,1%) 1 (9,1%) / 0	<b>0,036</b> 0,092
Сахарный диабет 2 типа (n, %)	10 (22,7%)	0 (0%)	0,184
Гиперхолестеринемия (n, %)	13 (29,6%)	1 (9,1%)	0,255
Курение (n, %)	19 (43,2%)	3 (27,3%)	0,713
Ожирение (n, %)	17 (38,6%)	3 (27,3%)	0,105

#### 3.2. Клинические и МРТ-проявления ЦМА

Клинические и МРТ-проявления ЦМА представлены в Таблице 2.

**Таблица 2**

Клиническая и МРТ-характеристика основной и контрольной групп

Показатели	ЦМА (n = 44)	Контроль (n = 11)
MoCA (mean±SD)	22,1±4,6 *	28,2±1,3
КР (n, %) СубКР / УКР / деменция	44 (100%) * 11 (25%) / 21 (47,7%) / 12 (27,3%)	—
Тип КР (n, %): дизрег. / амнестич. / смеш.	33 (75%) * 8 (18,2%) / 6 (13,6%) / 19 (43,2%)	—
Нарушения ходьбы (n, %): лёгк. / умерен. / выраж. гемипарез	29 (65,9%) * 12 (27,3%) / 10 (22,7%) / 7 (15,9%) 2 (4,6%)	—
ГИБВ (n, %) стадии Fazekas 2 / 3 объем для Fazekas 2 / 3	44 (100%) * 10 (22,7%) / 34 (77,3%) 11,7 [8,1; 13,8] / 41,6 [26,7; 68,8]	—
Лакуны (n, %) в белом веществе / стволе	35 (79,6%) * 32 (72,7%) / 16 (36,4%)	—
Микрокровоизлияния в подкорковых ядрах / белом веществе (n, %)	31 (70,5%) / 24 (54,6%) *	—
Объем мозга / серого вещества / белого вещества	0,737 [0,715; 0,763] / 0,417 [0,40; 0,435] / 0,320 [0,301; 0,341] *	0,798 [0,774; 0,817] / 0,442 [0,427; 0,465] / 0,352 [0,347; 0,361]
Объем ЦСЖ	0,263 [0,237; 0,285] *	0,202 [0,183; 0,226]

\*p < 0,05

### Клиническая характеристика МРТ-типов ЦМА

Среди пациентов с ЦМА МРТ-тип 1 выявлен у 18 пациентов (F3 – 17 и F2 – 1), МРТ-тип 2 – у 26 (F3 – 17 и F2 – 9). Из-за неравномерного распределения пациентов по стадиям Fazekas, сравнение проводилось между пациентами 1 и 2 типа с ГИБВ стадии F3 (Таблица 3).

**Таблица 3**

Сравнительная характеристика пациентов ЦМА МРТ-типа 1 и 2 ГИБВ стадии Fazekas 3

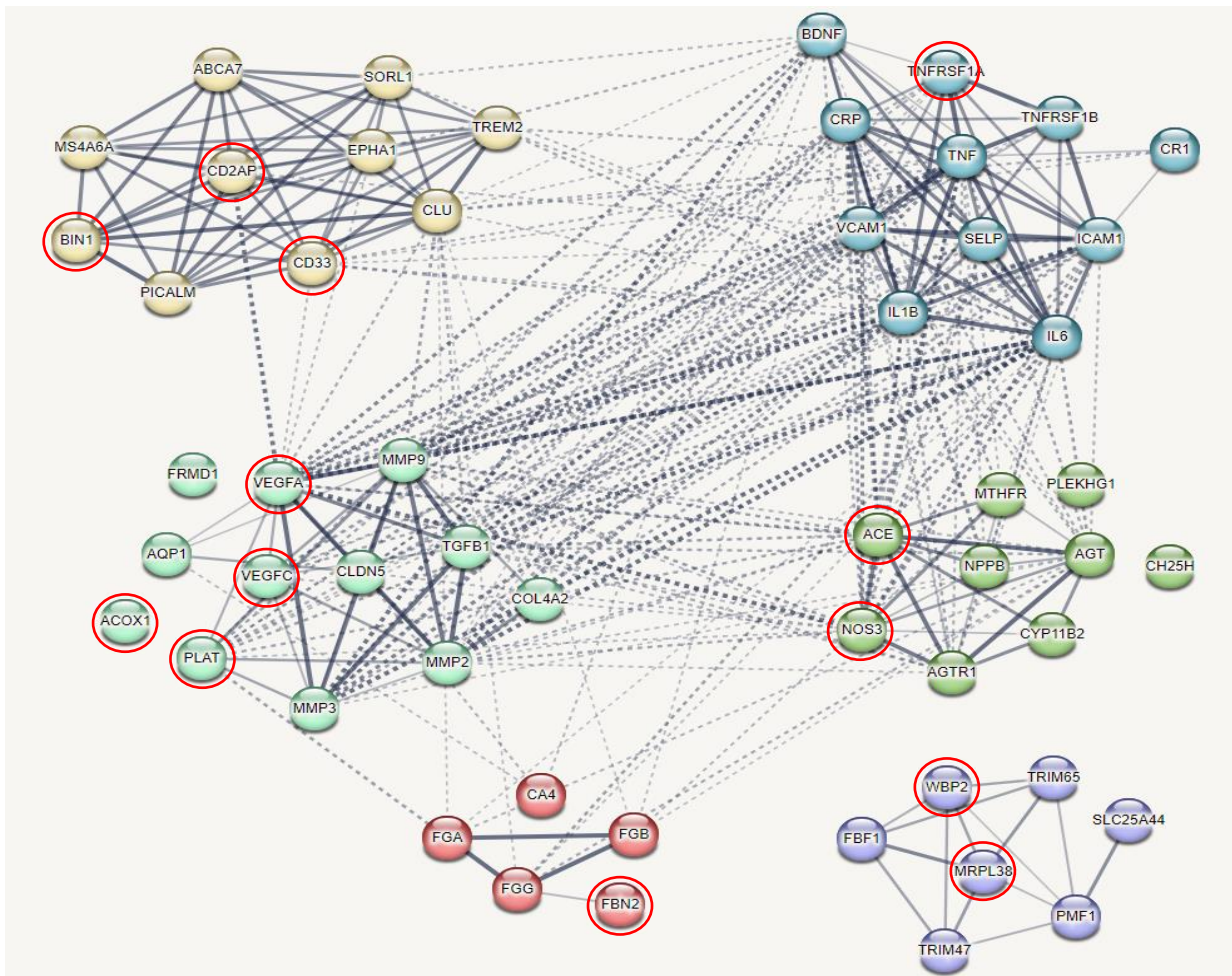
Показатели	Тип 1 F3 (n = 17)	Тип 2 F3 (n = 17)	p
Возраст (mean±SD)	56,4±8,1	67,1±6,3	<b>0,001</b>
Пол (n, %): женский / мужской	10 (58,8%) / 7 (41,2%)	2 (11,8%) / 15 (88,2%)	<b>0,010</b>
АГ (n, %) степень АГ: 1 / 2 / 3	17 (100%) 0 / 5 (29,4%) / 12 (70,6%)	17 (100%) 1 (5,9%) / 6 (35,3%) / 10 (58,8%)	0,721
Сахарный диабет (n, %)	3 (17,7%)	5 (29,4%)	0,688
Курение (n, %)	10 (58,8%)	7 (41,2%)	0,663
Ожирение (n, %)	5 (29,4%)	10 (58,8%)	0,085
MoCA (Me [Q25%; Q75%])	21 [17; 23]	24 [21; 26]	<b>0,043</b>
Когнитивные функции (Me [Q25%; Q75%]): УФМ:			
-ингибирование–тест Струпа (сек)	226 [211; 301]	150 [135; 206]	<b>0,009</b>
-переключение–тест ТМТ В-А (сек)	91 [45; 223]	115 [70; 171]	0,986
-продуктивность–тест беглости речи (слова)	7 [4; 9]	11 [8; 13]	<b>0,006</b>
Память, отсроченное воспроизведение (слова)	3 [2; 6]	6 [5; 8]	<b>0,026</b>
КР (n, %): Деменция / УКР / СубКР	17 (100%) 6 (35,3%) / 10 (58,8%) / 1 (5,9%)	17 (100%) 5 (29,4%) / 6 (35,3%) / 6 (35,3%)	0,110
Типы КР (n, %) дизрегуляторный / амнестический / смешанный	16 (94,1%) 23,5% / 11,8% / 58,8%	11 (64,7%) 17,7% / 11,8% / 35,3%	0,243
Нарушения ходьбы (n, %) без пареза: лёгкие/ умеренные/ выраженные гемипарез	12 (70,6%) 17,7% / 29,4% / 23,5% 2 (11,8%)	14 (82,4%) 41,2% / 23,5% / 17,7% 0	0,652

Пациенты МРТ-типа 1 по сравнению с МРТ-типом 2 были моложе и среди них преобладали женщины, а при МРТ-типе 2 мужчины. Оба типа ЦМА не различались по наличию и выраженности сосудистых факторов риска. Пациенты МРТ-типа 1 имели меньший балл по MoCA и более выраженные КР как в УФМ, так и памяти.

### 3.3. Молекулярно-генетическое исследование: оценка экспрессии генов на оригинальной панели NanoString nCounter при ЦМА Основные функциональные кластеры оцениваемых генов

Проведена оценка кластеризации отобранных генов («STRING» (<https://string-db.org/>)). Установлено 6 кластеров, 5 из них соответствовали функциональным группам регуляции с внутренними и внешними связями разной выраженности и направленности

и 6-й – изолированный кластер, включивший семь связанных генов с разными свойствами (Рисунок 4).

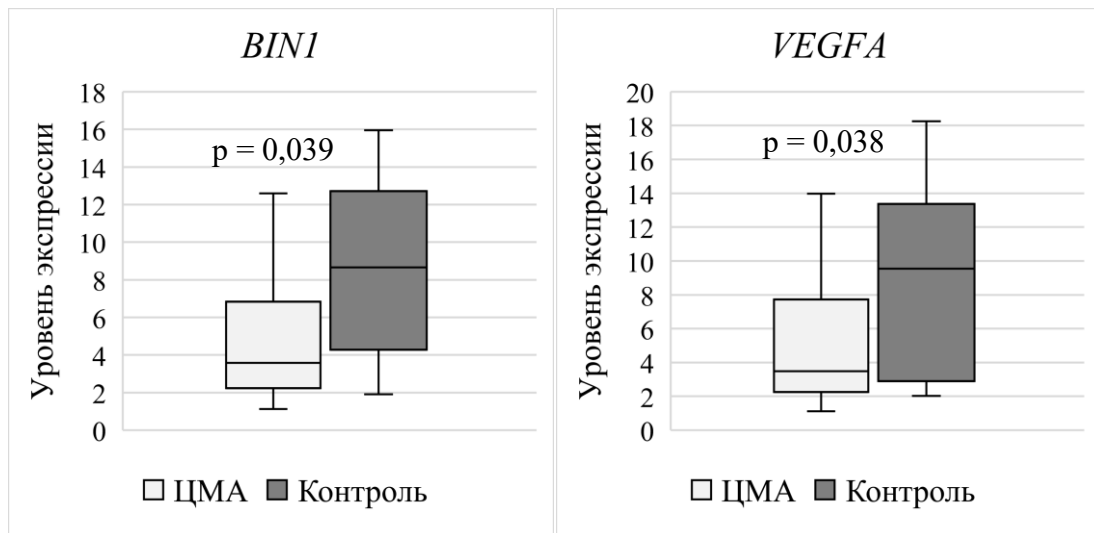


**Рисунок 4** – Кластеризация отобранных генов в функциональные группы на основе литературных данных и информации из международных баз данных с умеренным и высоким уровнем достоверности (толщина линий отражает уровень достоверности) («STRING» (<https://string-db.org/>): 1) *желтый* – регуляция клеточного метаболизма, в том числе амилоидогенеза, клиренса В-амилоида, внутриклеточной организации; 2) *голубой* – регуляция провоспалительных реакций, клеточного и гуморального иммунитета, оксидативный стресс; 3) *салатовый* – регуляция сосудистой проницаемости, поддержание ГЭБ, клеточная пролиферация; 4) *зеленый* – васкулярный гормональный контроль, сосудистая ауторегуляция, регуляция ренин-альдостерон-ангиотензиновой системы; 5) *красный* – коагуляция, фибринолиз и организация внеклеточного матрикса; 6) *фиолетовый* – изолированный кластер. На рисунке отмечены гены, показавшие свою значимость в данном исследовании

### ***ЦМА и экспрессия генов***

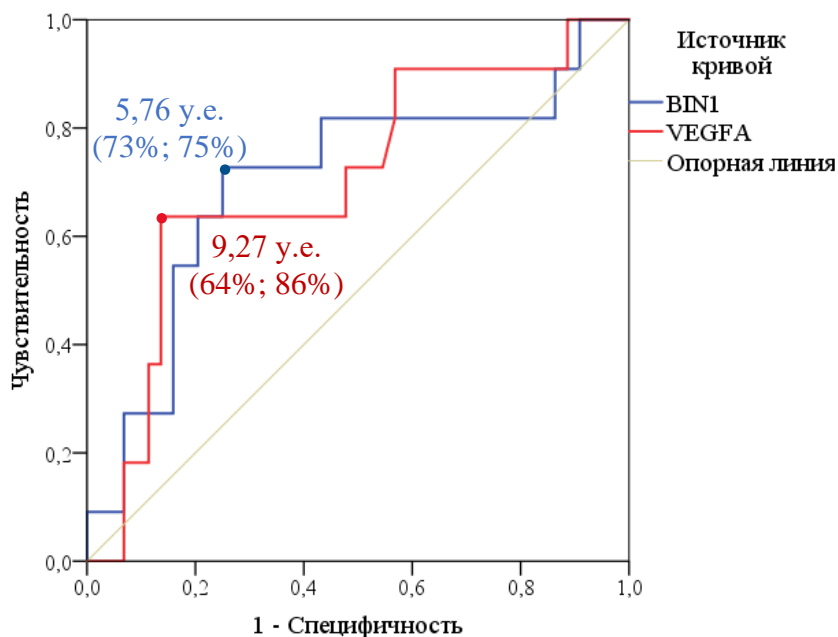
Пациенты с ЦМА по сравнению с контрольной группой имели значимое снижение экспрессии генов *BINI* ( $\log_2FC = -1,272$ ;  $p = 0,039$ ) и *VEGFA* ( $\log_2FC = -1,441$ ;  $p = 0,038$ ) (Рисунок 5).





**Рисунок 5** – Уровни экспрессии генов *BIN1* и *VEGFA* при ЦМА и в контрольной группе

Бинарная логистическая регрессия установила предсказательную способность сниженной экспрессии генов *BIN1* и *VEGFA* в отношении развития ЦМА. На Рисунке 6 приведены ROC-кривые с пороговыми значениями экспрессии данных генов, их чувствительностью и специфичностью в отношении развития ЦМА. Значение площади под кривой (area under curve, AUC) –  $> 0,7$ .



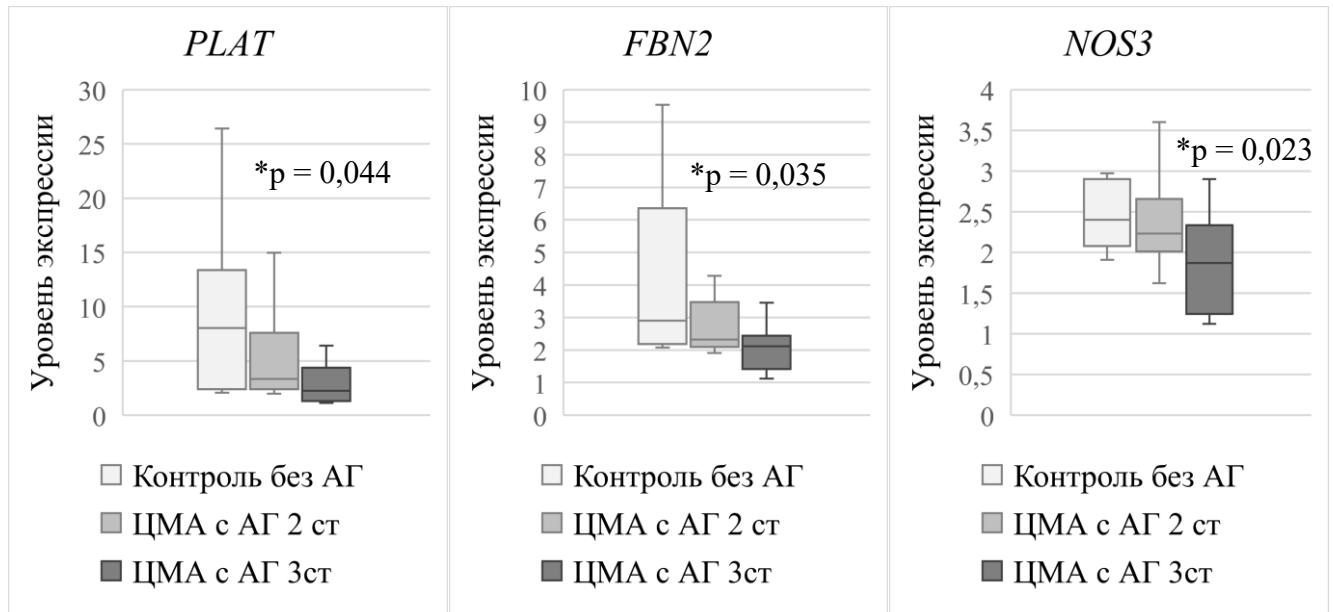
**Рисунок 6** – ROC-кривые экспрессии генов *BIN1* и *VEGFA* при ЦМА

### **Факторы риска ЦМА и экспрессия генов**

**Пол и возраст.** Установлен значимо более высокий ( $p = 0,035$ ) уровень экспрессии *FGA* у мужчин – 12,84 [3,78; 18,38] у.е., чем у женщин 6,38 [2,76; 10,69] у.е., значимо более низкий ( $p = 0,041$ ) уровень *FGB* у мужчин – 2,18 [1,51; 2,93] у.е., чем у женщин 3,82 [2,13; 7,20] у.е. Связь возраста с экспрессией исследуемых генов не установлена.

**Артериальная гипертензия.** У пациентов с ЦМА и АГ по сравнению с контролем без АГ выявлено значимое снижение экспрессии *FGB* ( $\log_2FC = -1,847$ ;  $p = 0,003$ ) и *VEGFA* ( $\log_2FC = -1,866$ ;  $p = 0,004$ ).

Сравнительный анализ экспрессии генов у пациентов ЦМА с АГ 2 и 3 степени и контролем без АГ установил значимое снижение экспрессии генов *FBN2*, *PLAT* и *NOS3* с нарастанием тяжести АГ. Результаты представлены на Рисунке 7.



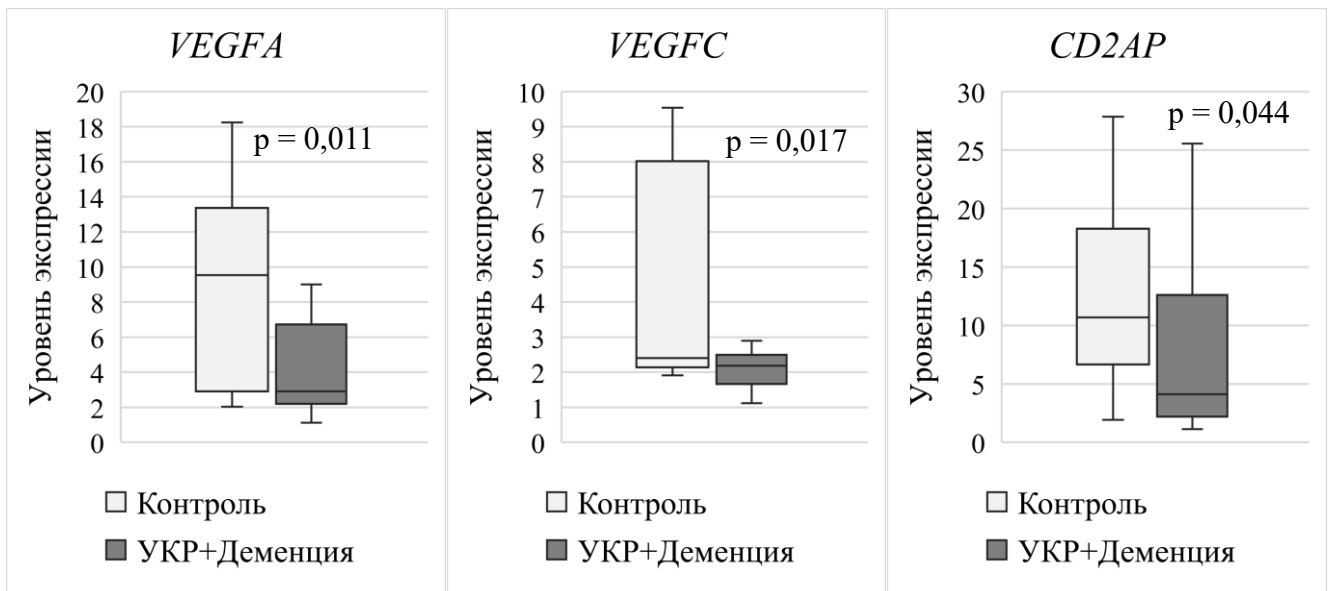
**Рисунок 7** – Экспрессия генов *FBN2*, *PLAT* и *NOS3* у пациентов ЦМА с АГ 2 и 3 степени и в группе контроля. \* Значимые различия для АГ 2 степени и АГ 3 степени при ЦМА

Пациенты с АГ кризового течения по сравнению с пациентами без кризов имели снижение экспрессии *WBP2* ( $\log_2FC = -2,03$ ;  $p = 0,01$ ). Уровень экспрессии *WBP2* составил 13,72 [2,00; 52,30] у.е. при АГ с кризами, против 56,04 [12,92; 119,49] у.е. для АГ без кризов.

Другие сосудистые факторы риска не имели значимых связей с экспрессией оцениваемых генов.

#### **Клинические проявления ЦМА и экспрессия генов**

При клинически значимых КР (УКР и деменция) установлено значимое снижение экспрессии *VEGFA*, *VEGFC* и *CD2AP* (Рисунок 8).



**Рисунок 8** – Экспрессия генов у пациентов с ЦМА и клинически выраженными КР (УКР и деменция) и в группе контроля

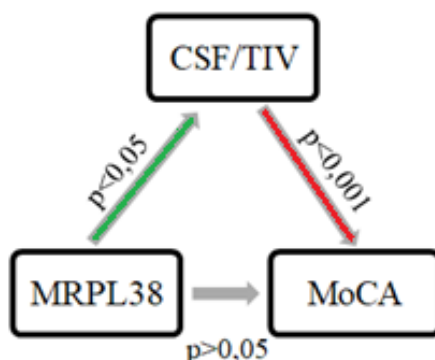
Установлены значимые прямые корреляции результатов расширенного когнитивного тестирования и уровня экспрессии генов: балла по МоСА – с экспрессией *ACE* и *VEGFC*; слов в тесте беглости речи – с *ACE*, *VEGFA* и *VEGFC* и теста отсроченного воспроизведения 10 слов – с *BINI* и *VEGFC* (Таблица 4).

**Таблица 4**

Взаимосвязи экспрессии генов с результатами когнитивного тестирования (корреляционный анализ Пирсона \*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ )

Ген	Шкала МоСА (баллы)	Беглость речи (слова)	Тест 10 слов (слова)
<i>ACE</i>	0,300*	0,288*	0,259
<i>BINI</i>	0,188	0,081	0,277*
<i>VEGFA</i>	0,260	0,320*	0,235
<i>VEGFC</i>	0,381**	0,334*	0,293*

Для генов, экспрессия которых не показала прямых связей с КР ( $p > 0,05$ ), был проведен медиаторный анализ (Рисунок 9). Балл по МоСА имел значимые связи с экспрессией *MRPL38* через нормализованный объем ЦСЖ (CSF/TIV) (эффект медиатора 94%).

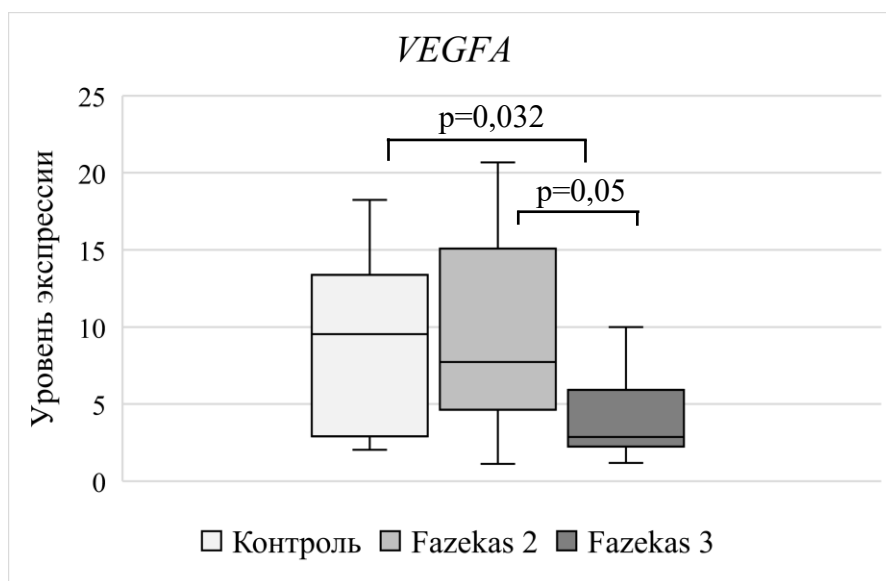


**Рисунок 9** – Связь экспрессии *MRPL38* с баллом MoCA через медиатор CSF/TIV. Зеленая стрелка – прямая связь, красная стрелка – обратная связь.

Сравнение типов КР и группы контроля по экспрессии генов установило, что при смешанном типе по сравнению с контролем и амнестическим типом КР значительно снижалась экспрессия *CD2AP* и *VEGFA*. Наличие и тяжесть психоэмоциональных нарушений (тревога / депрессия) не показало значимых связей с экспрессией генов.

#### ***MPT-признаки ЦМА и экспрессия генов***

С нарастанием T2/FLAIR ГИБВ, оцененной по шкале Fazekas, происходило значимое снижение экспрессии *VEGFA* ( $p=0,009$ ) (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Сравнение уровня экспрессии *VEGFA* при ЦМА с ГИБВ стадий Fazekas 2 и 3 и в контрольной группе

Выраженность иных MPT-признаков и общий балл ЦМА не имели значимых корреляций с экспрессией исследуемых генов.

#### ***Объемные MPT-показатели головного мозга и экспрессия генов при ЦМА***

В Таблице 5 представлены результаты корреляционного анализа основных объемных MPT-показателей головного мозга с экспрессией генов.

Таблица 5

Взаимосвязи объемных МРТ-показателей с уровнем экспрессии генов (корреляционный анализ Пирсона \*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ )

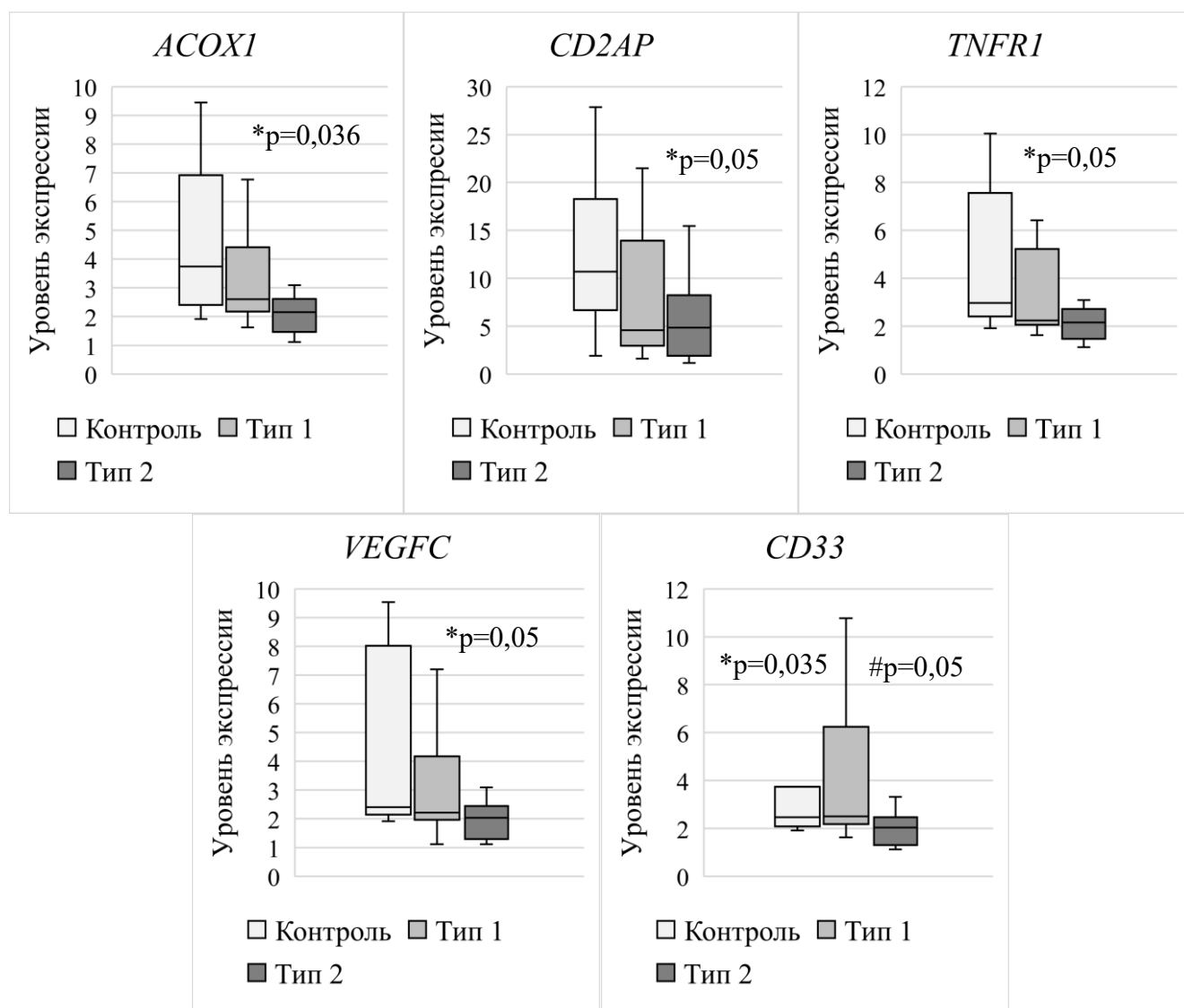
Ген	TBV/TIV	WM/TIV	GM/TIV	CSF/TIV	Объем ГИБВ, см <sup>3</sup>
<i>BIN1</i>	0,337*	0,232	0,276*	-0,337*	-0,173
<i>MRPL38</i>	0,277*	0,154	0,268*	-0,277*	-0,118
<i>VEGFA</i>	0,278*	0,260	0,150	-0,278*	-0,142
<i>VEGFC</i>	0,397**	0,282*	0,315*	-0,397**	-0,130

Сокращения: TBV/TIV – общий объем головного мозга, WM/TIV – общий объем белого вещества, GM/TIV – общий объем серого вещества, CSF/TIV – общий объем цереброспинальной жидкости. Все показатели нормализованы на – общий интракраниальный объем (TIV).

Общий нормализованный объем головного мозга (TBV/TIV) показал прямые, а объем ЦСЖ (CSF/TIV) обратные взаимосвязи с уровнем экспрессии генов *BIN1*, *MRPL38*, *VEGFA* и *VEGFC*. Установлены прямые взаимосвязи объема белого вещества (WM/TIV) с уровнем экспрессии *VEGFC*; объема серого вещества (GM/TIV) – с *BIN1*, *MRPL38* и *VEGFC*.

#### ***МРТ-типы ЦМА с ГИБВ стадии Fazekas 3 и экспрессия генов***

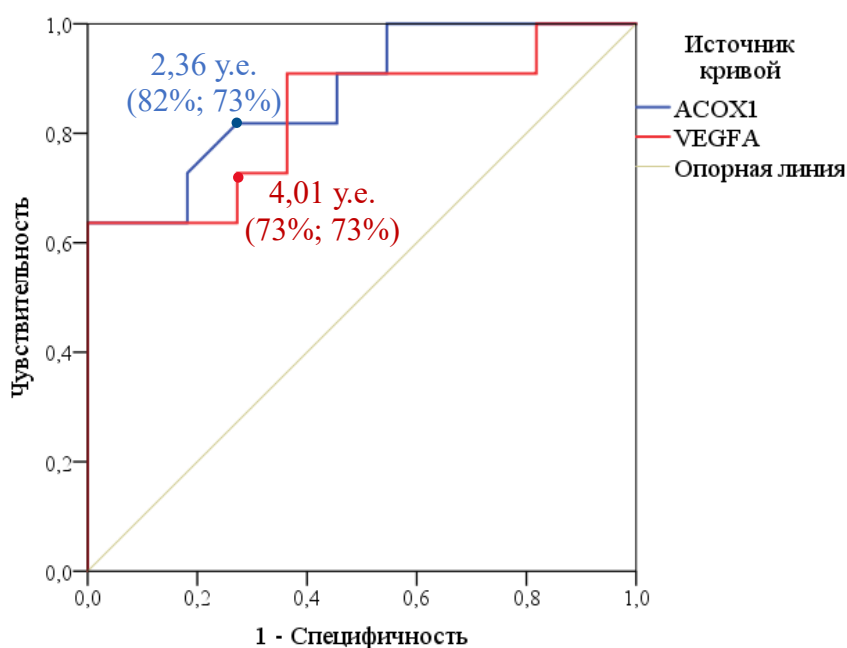
Результаты сравнительного анализа двух МРТ-типов ЦМА с ГИБВ стадии Fazekas 3 и контрольной группы по уровню экспрессии генов, показавших значимые различия, представлены на Рисунке 11. Межгрупповой анализ показал значимое снижение экспрессии *ACOX1*, *CD2AP*, *TNFR1*, *VEGFC*, *CD33* при МРТ-типе 2 по сравнению с контролем и *CD33* при МРТ-типе 2 по сравнению МРТ-типом 1.



**Рисунок 11** – Сопоставление уровня экспрессии генов между двумя МРТ-типами ЦМА с ГИБВ стадии Fazekas 3 и контролем. \* – значимые различия с контролем; # – значимые различия между МРТ-типами

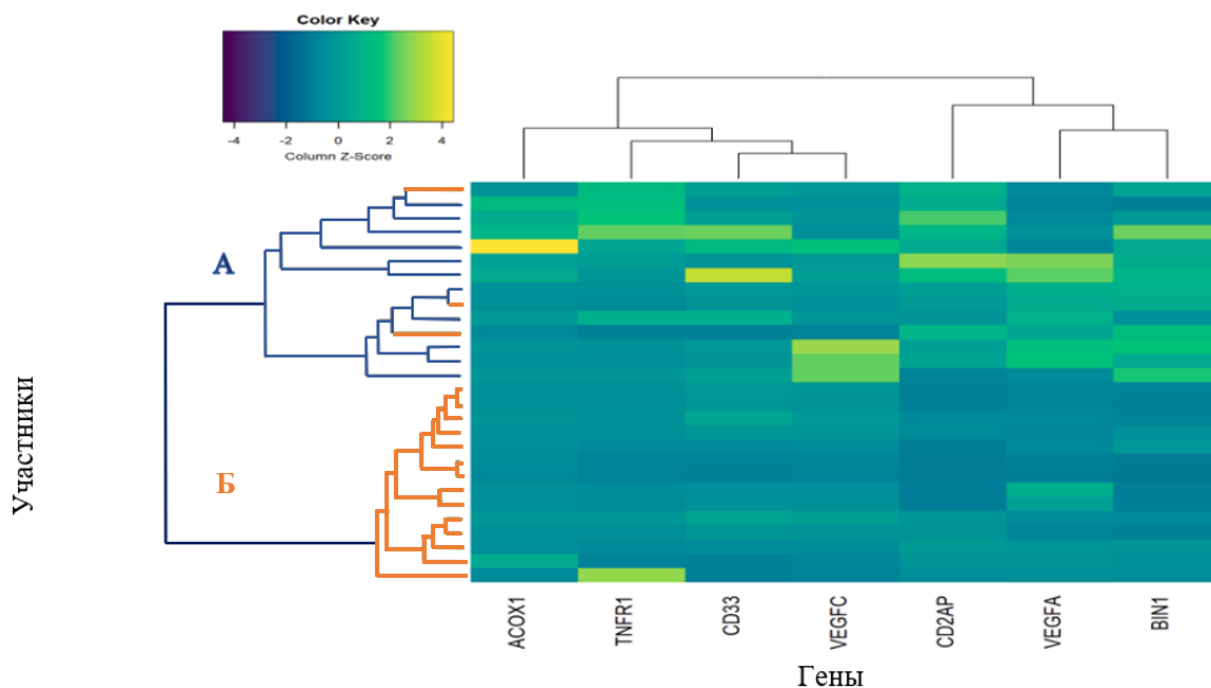
Сравнительный анализ экспрессии генов пациентов МРТ-типа 2 стадии F3 с клинически выраженными КР (УКР и деменция) и группой контроля установил значимые различия ( $p < 0,05$ ) для сниженной экспрессии генов *ACOX1*, *BIN1*, *CD2AP*, *CD33*, *TNFR1*, *VEGFA* и *VEGFC* в отношении развития УКР и деменции.

Бинарная логистическая регрессия установила предсказательную способность в отношении развития клинически выраженных КР у пациентов МРТ-типа 2 сниженной экспрессии *ACOX1* и *VEGFA*. На Рисунке 13 приведены ROC-кривые с пороговыми значениями экспрессии данных генов, их чувствительностью и специфичностью. Значение площади под кривой (AUC) –  $> 0,8$ .



**Рисунок 13** – ROC-кривая прогностической ценности сниженной экспрессии *ACOX1* и *VEGFA* в отношении развития клинически значимых КР (УКР и деменции) при ЦМА второго МРТ-типа с ГИБВ стадии F3

Гены, экспрессия которых при проведенных выше сопоставлениях показала значимые различия от контроля, были использованы для проведения иерархического кластерного анализа у пациентов МТР-типа 2 с ГИБВ стадии F3 и группы контроля. На Рисунке 12 представлена тепловая карта результатов.



**Рисунок 12** – Тепловая карта экспрессии генов пациентов МТР-типа 2 с ГИБВ стадии F3 и группы контроля. А – группа контроля, Б – основная группа. Нарастание интенсивности синей шкалы отражает снижение уровня экспрессии, жёлтой –

увеличение

В первый кластер вошли участники контрольной группы и 3 пациента МРТ-типа 2 с ГИБВ стадии F3, имеющие в соответствии с цветовой шкалой более высокий уровень экспрессии генов, чем во втором кластере, объединивших пациентов МРТ-типа 2 с ГИБВ стадии F3 со сниженной экспрессией.

### **3.4. Подтверждение результатов методом количественной ПЦР в реальном времени**

Результаты, полученные на платформе NanoString nCounter, были подтверждены методом ПЦР в реальном времени. Экспрессия мРНК исследуемых генов методом ПЦР в реальном времени так же была снижена в основной группе по сравнению с контрольной: *ACOX1* ( $p = 0,021$ ), *BINI* ( $p = 0,013$ ), *CD2AP* ( $p = 0,019$ ), *TNFR1* ( $p = 0,026$ ), *VEGFA* ( $p = 0,011$ ).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Настоящее исследование было направлено на уточнение роли в развитии клинических и МРТ-проявлений ЦМА изменений экспрессии генов, ассоциированных с воспалением. Для проведения настоящего исследования производителем NanoString Technologies по запросу исследователей была создана панель оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением. Использовался оригинальный подход в отборе генов. Поскольку ЦМА является главным фактором риска болезни Альцгеймера и доминирующими в популяции смешанных форм, определение при ЦМА изменений в экспрессии генов, характеризующих ЦМА и болезнь Альцгеймера, может установить общность механизмов заболеваний и их коморбидность.

В панель было включено 58 генов из числа регуляторных, установленных при повторных GWAS для ЦМА и болезни Альцгеймера, а также гены циркулирующих маркеров крови, ассоциированных с воспалительными путями при ЦМА. Использовалась технология количественного определения РНК NanoString nCounter, отличающаяся высокой степенью автоматизации, эффективности по времени, с чувствительностью сравнимой с ПЦР в реальном времени.

Установлено влияние сниженной экспрессии генов, ранее упоминаемых, в основном, в связи с патогенезом болезни Альцгеймера, на прогрессирование ЦМА с когнитивными расстройствами.

Установлено снижение экспрессии генов *BINI* и *VEGFA* при ЦМА и их диагностические возможности в предикции заболевания. Показано, что снижение экспрессии *VEGFA*, *CD2AP*, *ACE*, *VEGFC*, *MRPL38* и *BINI* ассоциировано с ухудшением нейропсихологического профиля и развитием более выраженных когнитивных расстройств, характерных для смешанных форм заболеваний. Выявлено, что снижение экспрессии генов, ассоциированных с механизмами воспаления, – *ACOX1*, *CD33*,



*CD2AP*, *TNFR1* и *VEGFC* характеризует МРТ-тип 2 ЦМА, имеющий свои диагностические МРТ-признаки.

Гены, экспрессия которых показала свою значимость в развитии ЦМА с КР и МРТ-особенностей, позволили составить набор (панель) генов (*BINI*, *VEGFA*, *FGF*, *VEGFC*, *CD2AP*, *ACE*, *MRPL38*, *ACOX1*, *CD33*, *TNFR1*) и рекомендовать для использования у пациентов с ЦМА. Уточнение профиля экспрессии указанных генов позволит прогнозировать тяжесть поражения мозга, выраженность когнитивных расстройств, а в последующем способствовать разработке патогенетического лечения для разных форм ЦМА.

## ВЫВОДЫ

1. При ЦМА изменение уровня экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, является ценным прогностическим маркером. ЦМА характеризуется снижением экспрессии генов *BINI* и *VEGFA*. Снижение уровня их экспрессии ниже установленного порогового значения с высокой чувствительностью и специфичностью потенциально позволяет прогнозировать тяжелое течение заболевания.
2. У пациентов с ЦМА нарастание тяжести артериальной гипертензии ассоциируется со снижением экспрессии генов *FBN2*, *PLAT* и *NOS3*, что согласуется с перестройкой сосудистой стенки при ЦМА с тяжелой артериальной гипертензией. Кризовое течение артериальной гипертензии ассоциировано со снижением экспрессии гена *WBP2*.
3. Одним из условий формирования коморбидности ЦМА с болезнью Альцгеймера является снижение экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFC* и *BINI*, и, соответственно, угнетение VEGF-А-ангиогенеза, VEGF-С-лимфангиогенеза и BIN-опосредованного транцитоза Аβ.
4. Развитие умеренных когнитивных расстройств и деменции сопряжено непосредственно со снижением экспрессии генов *VEGFA*, *VEGFC* и *CD2AP* и опосредованно с экспрессией *MRPL38* через объем цереброспинальной жидкости. Смешанный (дизрегуляторно-амнестический) тип КР характеризовался значимым снижением экспрессии генов *CD2AP* и *VEGFA* по сравнению с контролем и амнестическим типом когнитивных расстройств.
5. Прогрессирующее поражение белого вещества с нарастанием гиперинтенсивности на МРТ ассоциируется постепенным снижением уровня экспрессии гена *VEGFA*.
6. МРТ-типы ЦМА различаются по профилю экспрессии генов. В развитии МРТ-типа 2 в отличие от МРТ-типа 1, большее значение имеет нарушение путей, ассоциированных с воспалением. Формирование МРТ-типа 2 сопряжено со снижением экспрессии *ACOX1*, *CD33*, *CD2AP*, *TNFR1* и *VEGFC* по сравнению с контролем.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно создание и использование в клинической практике у пациентов с МРТ-признаками ЦМА панели оценки экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, включающей *BIN1*, *VEGFA*, *VEGFC*, *CD2AP*, *ACE*, *ACOX1*, *TNFR1*, *CD33* и *MRPL38*.
2. Сниженная экспрессия *BIN1* и *VEGFA* у пациентов ЦМА может рассматриваться фактором прогрессирования заболевания и коморбидности с болезнью Альцгеймера.
3. Сниженная экспрессия генов *VEGFA*, *VEGFC*, *CD2AP*, *ACE*, *BIN1* и *MRPL38* позволяет прогнозировать нарастание выраженности КР при ЦМА.
4. Сниженная экспрессия генов *ACOX1*, *CD33*, *CD2AP*, *TNFR1* и *VEGFC* соответствует условиям формирования МРТ-типа 2 ЦМА, в формировании которого преобладают механизмы воспаления.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Добрынина Л.А. Кластеризация диагностических МРТ-признаков церебральной микроангиопатии и ее связь с маркерами воспаления и ангиогенеза / Добрынина Л.А., Гнедовская Е.В., Забитова М.Р., Кремнева Е.И., Шабалина А.А., Макарова А.Г., Цыпуштанова М.М., Филатов А.С., Калашникова Л.А., Кротенкова М.В. // **Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова.** – 2020. – Т. 120. – №. 12-2. – С. 22-31.
2. Добрынина Л.А. Связь нарушений кровотока и ликворотока с повреждением стратегических для когнитивных расстройств зон мозга при церебральной микроангиопатии / Добрынина Л.А., Гаджиева З.Ш., Шамтиева К.В., Кремнева Е.И., Ахметзянов Б.М., Цыпуштанова М.М., Макарова А.Г., Трубицына В.В., Кротенкова М.В. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** – 2022. – Т. 16. – №2. – С. 25-35.
3. Добрынина Л.А. Выживаемость, изменения когнитивных функций и состояния головного мозга у пациентов с церебральной микроангиопатией (болезнью мелких сосудов): 5-летнее наблюдение / Добрынина Л.А., Гаджиева З.Ш., Кремнева Е.И., Шамтиева К.В., Цыпуштанова М.М., Макарова А.Г., Трубицына В.В., Бициева Е.Т., Филатов А.С., Бырочкина А.А., Кротенкова М.В. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** – 2022. – Т. 16. – №. 4. – С. 18-28.
4. Добрынина Л.А. Роль изменения экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, при церебральной микроангиопатии с когнитивными расстройствами / Добрынина Л.А., Макарова А.Г., Шабалина А.А., Бурмак А.Г., Шлапакова П.С., Шамтиева К.В., Цыпуштанова М.М., Трубицына В.В., Гнедовская Е.В. // **Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова.** – 2023. – Т. 123. – № 9. – С. 58-68.
5. Добрынина Л.А. Биохимические маркеры нейродегенерации при церебральной микроангиопатии (болезни мелких сосудов) и болезни Альцгеймера / Добрынина Л.А., Цыпуштанова М.М., Шабалина А.А., Шамтиева К.В., Макарова А.Г., Трубицына В.В., Забитова М.Р., Гаджиева З.Ш., Бициева Э.Т., Бырочкина А.А., Гейнц А.А. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** – 2023. – Т. 17. – №. 3. – С. 21-30.

6. Добрынина Л.А. Снижение экспрессии генов BIN1 и VEGFA при церебральной микроангиопатии с когнитивными расстройствами / Добрынина Л.А., Макарова А.Г., Шабалина А.А., Шлапакова П.С., Шамтиева К.В., Цыпуштанова М.М., Гнедовская Е.В. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции. Поленовские чтения. – 2023. С.167.
7. Цыпуштанова М.М. Лабораторные маркеры повреждения гематоэнцефалического барьера и нейродегенерации в дифференциальной диагностике церебральной микроангиопатии и болезни Альцгеймера. / Цыпуштанова М.М., Добрынина Л.А., Шабалина А.А., Шамтиева К.В., Макарова А.Г., Забитова М.Р., Гаджиева З.Ш. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции. Поленовские чтения. – 2023. С.190.
8. Dobrynina L. Reduced expression of BIN1 and VEGFA genes in patients with cerebral small vessel disease and cognitive impairment / L. Dobrynina, A. Makarova, A. Shabalina, P. Shlapakova, M. Tsypushtanova, K. Shamtieva, M. Zabitova, E. Gnedovskaya // European Journal of Neurology. – 2023. – 30. – Suppl. 1 (Abstracts of the 9th Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – P. 202.
9. Shamtieva K. Comparison of signal and biophysical diffusion modeling results in cerebral small vessel disease. / K. Shamtieva, L. Dobrynina, E. Kremneva, A. Geints, V. Gepard, M. Tsypushtanova, A. Makarova, Z. Gadzhieva, A. Filatov, V. Trubitsyna, M. Krotenkova // European Journal of Neurology. – 2023. – 30. – Suppl. 1 (Abstracts of the 9th Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – P. 268.
10. Gadzhieva Z. 5-Year survival and cognitive changes in patients with cerebral small vessel disease / Z. Gadzhieva, L. Dobrynina, E. Kremneva, K. Shamtieva, M. Tsypushtanova, A. Makarova, M. Zabitova, A. Filatov, M. Krotenkova // European Journal of Neurology. – 2023. – 30. – Suppl. 1 (Abstracts of the 9th Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – P. 453-454.
11. Tsypushtanova M.M. Markers of damage to the blood-brain barrier and brain in cerebral small vessel disease and Alzheimer's disease / Tsypushtanova M.M., Dobrynina L.A., Shabalina A.A., Shamtieva K.V., Makarova A.G., Zabitova M.R., Gadzhieva Z.Sh., Geints A.A., Gnedovskaya E.V. // European Journal of Neurology. – 2023. – 30. – Suppl. 1 (Abstracts of the 9th Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – P. 670.
12. Tsypushtanova M.M. Circulating markers of blood-brain barrier permeability, lymphangiogenesis and neurodegeneration in cerebral small vessel disease/ Tsypushtanova M.M., Dobrynina L.A., Shabalina A.A., Shamtieva K.V., Makarova A.G., Zabitova M.R. // European Journal of Neurology. (Abstracts of the 9 Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – 2023. – 30. – Suppl. 1 (Abstracts of the 9th Congress of the European Academy of Neurology, Budapest, 2023). – P. 671.
13. Макарова А.Г. Роль изменения экспрессии генов, ассоциированных с воспалением, при церебральной микроангиопатии с когнитивными расстройствами / А.Г. Макарова, Л.А. Добрынина, А.А. Шабалина, М.М. Цыпуштанова, А.Г. Бурмак, К.В. Шамтиева // Материалы научно-практических конференций в рамках IX Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2023). – 2023. С 95.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АГ – артериальная гипертония  
 БА – болезнь Альцгеймера  
 ГИБВ – гиперинтенсивность белого вещества  
 КР – когнитивные расстройства  
 КФ – когнитивные функции  
 мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
 МРТ – магнитно-резонансная томография  
 НЦН – Научный центр неврологии  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 СубКР – субклинические когнитивные расстройства  
 УКР – умеренные когнитивные расстройства  
 УФМ – управляющие функции мозга  
 ЦМА – церебральная микроангиопатия  
 ЦСЖ – цереброспинальная жидкость  
*ACE* – angiotensin converting enzyme gene / ген ангиотензинпревращающего фермента  
*ACOX1* – Acyl-CoA Oxidase 1 gene / ген пероксисомальной ацил-КоА-оксидазы-1  
 AUC – area under curve, значение площади под кривой  
*BIN1* – bridging integrator 1 gene / ген мостового интегратора-1  
*CD2AP* – CD2 associated protein gene / ген CD2-ассоциированного белка  
*CD33* – CD33 molecule gene / ген белка CD33  
 CSF – cerebral spine fluid / цереброспинальная жидкость  
*FBN2* – fibrillin 2 gene / ген фибриллина 2  
*FGB* – fibrinogen beta chain gene / ген β-цепи фибриногена  
 FLAIR – fluid-attenuated inversion recovery / режим инверсия-восстановление с подавлением сигнала свободной жидкости  
 GM – gray matter volume / объем серого вещества головного мозга  
 GWAS – genome-wide association studies / полногеномные исследования ассоциаций  
*MRPL38* – mitochondrial ribosomal protein L38 gene / ген митохондриального рибосомального белка L38  
 MoCA – Montreal Cognitive Assessment / Монреальская шкала оценки когнитивных функций  
*PLAT* – plasminogen activator gene, tissue type / ген тканевого активатора плазминогена  
 STRIVE – Standards for Reporting Vascular Changes on Neuroimaging / МРТ стандарты исследования церебральной микроангиопатии при старении и дегенерации  
 TBV – total brain volume / общий объем головного мозга  
 TIV – total intracranial volume / общий интракраниальный объем  
*TNF* – tumor necrosis factor gene / ген фактора некроза опухолей  
*TNFR1* – tumor necrosis factor receptor 1 gene / ген рецептора-1 фактора некроза опухолей  
*VEGFA* – vascular endothelial growth factor A gene / ген фактора роста эндотелия сосудовА  
*VEGFC* vascular endothelial growth factor C gene / ген фактора роста эндотелия сосудов  
*WBP2* – WW domain binding protein 2 gene / ген белка, связывающего домен WW  
 WM – white matter volume / объем белого вещества головного мозга