

На правах рукописи



СЕМЕНОВА ЕКАТЕРИНА ИГОРЕВНА

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ТРАНСКРИПТОМА ПРИ
НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ НА РАННИХ СТАДИЯХ БОЛЕЗНИ
ПАРКИНСОНА**

Специальность 1.5.3. – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена в лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней Отдела генетических основ патологических процессов Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

Научный руководитель: **Шадрина Мария Игоревна**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики наследственных болезней Отдела генетических основ патологических процессов Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва.

Официальные оппоненты: **Брага Элеонора Александровна**
доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», г. Москва;

Павлова Галина Валериевна
доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией нейрогенетики и генетики развития Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, г. Уфа.

Защита диссертации состоится 24 октября 2024 г., начало в 14:00, на заседании диссертационного совета 02.1.003.06 на базе НИЦ «Курчатовский институт» по адресу: 123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ «Курчатовский институт» и на сайте www.nrcki.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 02.1.003.06
кандидат биологических наук

А.С. Жирник

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное неуклонно прогрессирующее с возрастом нейродегенеративное заболевание. В промышленно развитых странах частота встречаемости БП составляет 1% среди людей старше 60 лет и 3% среди людей в возрасте 80 лет и старше. По примерным оценкам, всего в мире насчитывается около 6 миллионов пациентов с БП. При этом отмечается, что в последние два десятилетия частота и распространенность этого заболевания стремительно растут. Характерные для БП неврологические симптомы приводят к ухудшению качества жизни пациента, его инвалидизации и смерти. Также чрезмерную нагрузку испытывают лица, осуществляющие уход за пациентами с БП.

Отличительными патологическими признаками БП являются гибель дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (ЧС) и накопление телец Леви. Вследствие гибели дофаминергических нейронов проявляются классические двигательные симптомы БП, по которым ставят клинический диагноз, — тремор, ригидность, брадикинезия и постуральная неустойчивость. При этом заболевание манифестирует только после потери около 70% дофаминергических нейронов, а сама дегенерация нейронов развивается в течение многих лет до возникновения моторных симптомов. В этот период может возникать целый ряд немоторных нарушений, таких как гипосмия, нарушения сна, тревожность, депрессия и запоры. Эти симптомы являются неспецифическими для БП и обусловлены изменениями функционирования различных нейромедиаторных систем, таких как дофаминергическая, гипокретиновая, норадренергическая, серотонинергическая, холинергическая и гистаминергическая.

С точки зрения генетики, выделяют семейную и спорадическую формы БП. Преобладающая часть случаев заболевания спорадические, только около 10% всех пациентов имеют наследственную форму. Идентификация генов семейных форм и анализ кодируемых этими генами белков позволили определить процессы, вовлеченные в патогенез БП. Так, на сегодняшний день считается, что митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, нарушения аутофагии и убиквитин-протеасомной деградации белков играют центральную роль в развитии нейродегенерации при БП. Но, несмотря на достигнутый прогресс, причины развития БП все еще остаются не до конца ясными.

В настоящее время доказано, что при БП как в ЧС, так и в других структурах мозга происходят выраженные изменения на уровне транскриптома. В большей части работ по изучению транскриптома был исследован постмортальный материал мозга пациентов с БП, находящихся на последних, тяжелых стадиях заболевания и прошедших активное медикаментозное лечение. В связи с чем можно предположить, что выявленные изменения могут отличаться от изменений транскриптома на ранних стадиях патологического процесса.

Ткани мозга пациентов, находящихся на самых ранних стадиях БП, недоступны, и выходом из этой ситуации является изучение экспрессии генов в периферической крови. Периферическая кровь является одной из наиболее доступных и перспективных тканей для фундаментальных и клинических исследований. Исследования, проводимые в периферической крови, позволили уточнить картину патогенеза БП. С одной стороны, были подтверждены хорошо известные процессы, вовлеченные в патогенез. В то же время, выявлены новые кандидатные гены БП, для которых было показано изменение экспрессии у пациентов.

Важную роль в изучении этиопатогенеза многофакторных заболеваний, к которым относится БП, играют исследования транскриптома дискордантных по данным заболеваниям монозиготных близнецов. Данный подход позволяет минимизировать влияние генетических факторов на изменения транскриптома, характерные для БП. Выявляемые при этом дифференциально экспрессирующиеся гены далее необходимо проанализировать на расширенных выборках пациентов с БП. Особый интерес при этом представляет изучение пациентов, находящихся на стадии первичных моторных нарушений до начала противопаркинсонической терапии. Изучение таких пациентов может помочь выявить биомаркеры, связанные с начальными этапами нейродегенерации. Такими биомаркерами могут являться относительные уровни мРНК кандидатных генов в периферической крови.

В связи с этим **целью** настоящей работы было изучение изменения экспрессии генов на уровне транскриптома при нейродегенеративных процессах, развивающихся у пациентов с болезнью Паркинсона, и выявление новых маркеров ранних стадий заболевания.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Полнотранскриптомный анализ периферической крови трех пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП, и отбор генов для дальнейшего анализа.
2. Анализ изменения экспрессии генов, отобранных в результате полнотранскриптомного анализа, в периферической крови трех пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП.
3. Анализ изменения экспрессии отдельных генов в периферической крови пациентов с БП, находящихся на ранних клинических стадиях развития заболевания.

Научная новизна работы

В настоящей работе был проведен полнотранскриптомный анализ в периферической крови монозиготных близнецов, дискордантных по БП, и не несущих при этом мутаций, ассоциированных с данным заболеванием. Данный анализ позволил подтвердить вовлеченность биологического процесса «циркадные ритмы» в патогенез БП и отобрать гены для дальнейшего исследования.

При анализе экспрессии отдельных кандидатных генов нами было показано достоверное изменение уровней мРНК генов *MTA1*, *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП.

Установлено, что у генов *ADORA2A* и *DNM2* изменяются уровни экспрессии только у пациентов с ранними стадиями БП, получавших лекарственную терапию. Вероятно, что данные гены вовлечены в процессы, подверженные воздействию терапии противопаркинсоническими препаратами.

Теоретическая и практическая значимость работы

1. Полнотранскриптомный анализ в периферической крови монозиготных близнецов, дискордатных по БП, подтвердил вовлеченность биологического процесса «циркадные ритмы» в патогенез данного заболевания. В связи с этим можно сказать, что данный процесс может быть интересен для более детального рассмотрения в будущих исследованиях.

2. Данные о достоверных изменениях экспрессии генов *ADORA2A* и *DNM2* в группе пациентов с ранними стадиями БП, получавших терапию, могут быть полезными при исследовании патологий, спровоцированных длительным приемом противопаркинсонических препаратов.

3. Полученные нами данные о достоверных изменениях экспрессии генов *MTA1*, *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* помогают расширить представления о нейродегенеративных процессах, происходящих на самых ранних стадиях БП.

4. Обнаруженное нами достоверное, специфическое для БП и независимое от противопаркинсонической терапии изменение уровней мРНК генов *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП позволяет рассматривать данные гены в качестве потенциальных биомаркеров ранних стадий БП. Также маркером развития нейродегенеративных процессов на ранних стадиях может служить ген *MTA1*, для которого было показано снижение экспрессии в группе пациентов с ранними стадиями БП, не получавших терапию. В будущем подобные биомаркеры могут быть использованы для создания диагностической панели ранних стадий БП.

Методология и методы исследования

В ходе выполнения работы были использованы стандартные молекулярно-биологические и биоинформатические методы исследований. Было проведено секвенирование РНК, отбор дифференциально экспрессирующихся генов с дальнейшим анализом обогащения. Проведен подбор систем праймеров и зондов для исследуемых генов. Для оценки качества систем праймеров и зондов применяли полимеразную цепную реакцию и электрофорез ДНК в агарозном геле. Для экспрессионного анализа проводили выделение РНК из периферической крови, обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию в реальном времени (технология TaqMan). Расчет относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Биологический процесс «циркадные ритмы» (по классификации Gene Ontology) вовлечен в патогенез БП на транскриптомном уровне.
2. Снижение уровня мРНК гена *MTA1* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП может отражать процессы, связанные с гибелью дофаминергических нейронов.
3. Увеличение экспрессии гена *ADORA2A* связано с терапией противопаркинсоническими препаратами и не зависит от стадии заболевания.
4. Ген *DNM2* вовлечен в процессы, подверженные терапии агонистами дофамина.
5. Уровни мРНК генов *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров развития ранних стадий БП.

Личный вклад соискателя

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Работа выполнена в соответствии с общепринятыми этическими и научными принципами. Выводы и основные положения, выносимые на защиту, обоснованы фактическим материалом, полученным в результате проведения экспериментов с использованием надежных методов исследования, а также анализа и интерпретации данных. Основные результаты работы были опубликованы в 3 статьях, а также представлены на 6 российских и международных конференциях и научных школах.

Публикации

По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых российских и международных научных журналах, рекомендованных ВАК Российской Федерации и входящих в базы научного цитирования SCOPUS и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений и условных обозначений» и «Список литературы», который включает 399 источников. Работа изложена на 131 странице, содержит 11 рисунков, 12 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Характеристика анализируемых выборок пациентов

В ходе настоящей работы были исследованы следующие выборки:

1) Монозиготные близнецы, дискордантные по БП.

В исследовании принимали участие три пары фенотипически и генетически монозиготных близнецов, дискордантных по БП. Близнецы имеют славянское происхождение. БП была диагностирована в Государственном Бюджетном Учреждении Здравоохранения «Приморская краевая клиническая больница № 1». Участники исследования не имели семейной истории БП. Пациенты находились на 2-4 стадиях шкалы Хен-Яра и имели смешанную форму БП. Длительность заболевания составила не менее 7 лет. У здоровых близнецов не было никаких признаков БП во время сбора биологического материала. Близнецы жили в одном районе, и их работа не была связана с контактом с опасными факторами, такими как пестициды и тяжелые металлы. В их истории болезни не было информации о наличии травм головы. Средний возраст \pm стандартное отклонение близнецов на момент взятия образцов крови составили $65,3 \pm 4,2$ лет.

2) Группы пациентов с ранней стадией БП.

Были исследованы 2 выборки пациентов с недавно поставленным диагнозом «болезнь Паркинсона» – БП1 и БП2. Для постановки диагноза пациенты были исследованы по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) и шкале Хен-Яра. Все пациенты из данных выборок находились на самых ранних клинических стадиях БП (1-2 стадии по шкале Хен-Яра). Соотношение полов составило примерно 1: 1. Форма БП была преимущественно смешанной. Для анализа были взяты только те пациенты, у которых отсутствовали наиболее частые мутации, ассоциированные с БП. Выборка БП1 включала 45 пациентов, получавших и не получавших терапию противопаркинсоническими препаратами. Средний возраст \pm стандартное отклонение пациентов составили $55,6 \pm 7,6$ лет. Выборка БП2 включала 56 пациентов, получавших и не получавших терапию противопаркинсоническими препаратами. Средний возраст \pm стандартное отклонение пациентов составили $58,6 \pm 10,8$ лет.

3) В качестве групп сравнения в настоящей работе исследовались следующие выборки:

- 23 пациента с различными неврологическими заболеваниями (боковой амиотрофический склероз, болезнь Мари-Шарко, болезнь Вильсона-Коновалова, мозжечковая атаксия и др.). Средний возраст \pm стандартное отклонение составили $46,1 \pm 14,5$ лет.

- 44 неврологически здоровых добровольца. Средний возраст \pm стандартное отклонение составили $50,0 \pm 12,4$ лет.

В группы больных с различными неврологическими патологиями и группы контроля отбирались лица славянского происхождения обоих полов. Все больные и неврологически здоровые добровольцы были отобраны в

Научном центре неврологии, г. Москва. Все образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

Секвенирование РНК и анализ полученных данных

Для секвенирования РНК из тотальной РНК периферической крови монозиготных близнецов, дискордантных по БП, была выделена фракция поли(А). Библиотеки для секвенирования готовили из поли(А)-фракции с использованием набора реагентов NEBNext® mRNA Library Prep Reagent Set (NEB, Rowley, MA, USA). Секвенирование проводили с использованием HiSeq1500 (Illumina, San Diego, CA, USA), производя не менее 5 миллионов чтений длиной 50 оснований на библиотеку.

Сырые файлы FASTQ были обработаны посредством тримминга с целью удаления неоднозначных нуклеотидов и оснований низкого качества в программе AdapterRemovalV2. В случае первого близнеца, для которого не было получено одного сиквенса высокого качества было получено несколько библиотек ридов, которые были собраны в одну после проверки на корреляцию между повторностями (R^2 Спирмана > 0.95). Было произведено выравнивание очищенных FASTQ файлов относительно транскриптома, полученного из генома GRCH38 и аннотации гена GRCH38.91 с использованием команды RSEM rsem-prepare-reference с включенной опцией -star, чтобы также генерировать индексы STAR. Картирование было проведено с помощью STAR и RSEM, использовалась команда rsem-calculate-expression с включенной опцией —star. Полученные псевдоотсчеты были нормализованы при помощи алгоритма TMM, реализованного в команде «calcNormFactors» из R-пакета «edgeR», и алгоритма CPM, реализованного в команде «voom» из R-пакета «limma». Нормализованные риды были обработаны с использованием команд «voom» (оценка отношения среднее/дисперсия, расчет весовых коэффициентов наблюдения), «lmFit» (создание линейной модели для описания наблюдений) и «eBayes» (расчет параметров линейной модели) из R-пакета «limma». Гены считались дифференциально экспрессирующимися при fold change (FC) $> 1,5$ и и p-value t-критерия от limma с поправкой FDR $< 0,05$.

Выделение тотальной РНК из крови

Для выделения тотальной РНК взятие образцов периферической крови осуществляли в 8 часов утра натощак. Выделение тотальной РНК проводили из 200 мкл цельной крови с использованием набора ZR Whole-Blood Total RNA Kit™ («Zymo Research Corp.», США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit 3.0 («Invitrogen», США). После выделения в полученный раствор тотальной РНК добавляли тРНК дрожжей (концентрация 1 мг/мл).

Анализ экспрессии отдельных генов-кандидатов

Анализ изменения относительных уровней мРНК генов проводили с использованием реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. В качестве референсных генов для нормализации данных на основании ранее проведенной работы были выбраны гены *SARS* и *PSMD6*. Реакция обратной транскрипции была проведена с использованием набора RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase kit («Thermo Fisher Scientific», США) согласно рекомендациям производителя. Реакция проводилась на амплификаторе T3 Thermocycler (T3 Thermoblock, «Biometra», Германия). Была использована смесь random hexamer primer («Thermo Fisher Scientific», США) и Oligo(dT)18 primer («Thermo Fisher Scientific», США) в соотношении 3:2 соответственно.

При проведении ПЦР в реальном времени в качестве матрицы использовались кДНК, полученные в ходе реакции обратной транскрипции. Перед добавлением в реакционную смесь кДНК разводили в водном растворе тРНК дрожжей (100 нг/мкл) до концентрации 0,02 нг/мкл. ПЦР в реальном времени проводилась на амплификаторе QuantStudio 3 (Applied Biosystems, США). Состав реакционной смеси объемом 30 мкл состоял из 5 мкл кДНК (0,02 нг/мкл), 3 мкл ПЦР-буфера (×10) (Синтол, Россия), 3 мкл 25 мМ MgCl₂, 10 пМ праймеров (Евроген, Россия), 2,5 пМ зонда («ДНК-синтез», Россия), по 200 мкМ каждого dNTP и 1 ферментной единицы ДНК-полимеразы Taq («Синтол», Россия). Для проведения амплификации использован следующий температурный режим: 50°C – 60 сек., далее 40 циклов 95°C – 15 сек. и 61°C – 30 сек., далее 25°C – 30 сек. Каждый образец был проанализирован в трех повторностях, чтобы скорректировать различия в качестве образцов и эффективности реакции обратной транскрипции.

Биоинформатическая обработка данных

Анализ обогащения дифференциально экспрессирующихся генов по Gene Ontology Biological Processes (GO BP) был проведен в программе Cytoscape v.3.9.0 с использованием приложений ClueGO v.2.5.8 и CluePedia v.1.5.8. Значимо обогащенные кластеры генов были отобраны на основе одностороннего гипергеометрического теста с поправкой Benjamini-Hochberg (p-value <0.01). Группы кластеров метаболических процессов были сформированы на основе общего количества генов по отношению к кластеру (>50%). Были отобраны terms GO BP с 3-го по 6-ой уровни иерархии, для которых процент ассоциированных генов составлял >20%. Группы метаболических процессов были сформированы на основе наличия общих генов между ними. Для отбора генов, связанных с БП, была использована программа Pathway Studio v. 12.4.0.5 (Elsevier, Amsterdam, the Netherlands). Запрос включал в себя ключевое слово «Parkinson».

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов для анализа экспрессии генов-кандидатов с помощью ПЦР в реальном времени были подобраны с использованием программы Beacon Designer 7.0 (Premier Biosoft, США) и нуклеотидных последовательностей генов-кандидатов (*ADORA2A*,

MTA1, NR1D1, OPRL1, TP53, PTGDS, DNM2, HNMT, NSF, PTGS2) и генов «домашнего хозяйства» (*SARS, PSMD6*) из базы данных NCBI. Проверка специфичности праймеров и зондов была проведена с помощью Primer3 and BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Расчет относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации $\Delta\Delta C_t$. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ “Statistica for Windows 8.0” (StatSoft, Inc. (2007)), STATISTICA (version 8.0. www.statsoft.com) и программного обеспечения MS Excel 2019 (Microsoft). Для оценки относительных уровней экспрессии генов применяли непараметрический U-тест Манна-Уитни.

Сеть взаимодействия генов была построена в программе Pathway Studio v. 12.4.0.5 (Elsevier, Amsterdam, the Netherlands) с использованием таких ключевых слов, как «Parkinson», «neurodegeneration», «mitochondria», «oxidative stress», «apoptosis», «autophagy», «protein ubiquitination».

Результаты исследования

Полнотранскриптомный анализ в периферической крови трех пар монозиготных близнецов, дискордантных по болезни Паркинсона

Был проведен полнотранскриптомный анализ в периферической крови трех пар монозиготных близнецов, дискордантных по БП, в ходе которого было идентифицировано 1512 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ). Для этих ДЭГ был проведен анализ обогащения с использованием базы GO BP. Выявленные биологические процессы представлены в таблице 1.

В таблице 1 видно, что полученные биологические процессы образуют девять групп, не связанных между собой. Для генов из этих групп с помощью программы Pathway Studio была проведена оценка возможной вовлеченности в патогенез БП. Результаты данной оценки представлены в последнем столбце таблицы 1. Показано, что наибольший процент генов, ассоциированных с БП, приходится на группу «circadian behavior». В связи с чем именно эта группа была выбрана нами для дальнейшего более подробного исследования. Всего в кластер «circadian behavior» вошло 10 генов. Как видно из рисунка 1, 9 из 10 генов могут быть связаны с патогенезом БП. При этом для гена *ANCY* в настоящий момент не показано прямой связи с БП, но имеются данные о вовлеченности в процессы, характерные для этого заболевания (окислительный стресс, апоптоз).

Таблица 1. Результаты анализа обогащения данных, полученных при проведении RNA-Seq анализа в периферической крови близнецов, дискордантных по БП

GO Term (GO ID)	Benjamini-Hochberg Adjustment p-Value of Hypergeometric Test for Enrichment	GO Group ¹	Number Of DEG, Associated with GO Group	Group PValue Corrected with Benjamini-Hochberg	Процент генов, ассоциированных с БП ²
circadian behavior (GO:0048512)	$7,05 \times 10^{-3}$	I	10	$2,38 \times 10^{-3}$	80,00
negative regulation of glucose catabolic process to lactate via pyruvate (GO:1904024)	$5,15 \times 10^{-3}$	II	6	$2,10 \times 10^{-3}$	50,00
glucose catabolic process to lactate via pyruvate (GO:0019661)	$7,82 \times 10^{-3}$				
negative regulation of mitophagy (GO:1901525)	$7,82 \times 10^{-3}$				
lactate metabolic process (GO:0006089)	$8,56 \times 10^{-3}$				
response to testosterone (GO:0033574)	$5,13 \times 10^{-3}$	III	12	$4,33 \times 10^{-3}$	41,66
cellular response to testosterone stimulus (GO:0071394)	$9,62 \times 10^{-3}$				
protein transmembrane import into intracellular organelle (GO:0044743)	$8,25 \times 10^{-3}$	IV	8	$3,31 \times 10^{-3}$	25,00
positive regulation of ligase activity (GO:0051351)	$8,83 \times 10^{-3}$	V	4	$3,31 \times 10^{-3}$	25,00
regulation of triglyceride biosynthetic process (GO:0010866)	$7,91 \times 10^{-3}$	VI	6	$2,60 \times 10^{-3}$	16,66
regulation of ATP biosynthetic process (GO:2001169)	$8,61 \times 10^{-3}$	VII	6	$3,33 \times 10^{-3}$	16,66
cytoplasmic sequestering of protein (GO:0051220)	$5,19 \times 10^{-3}$	VIII	7	$1,95 \times 10^{-3}$	14,29
cytoplasmic sequestering of transcription factor (GO:0042994)	$8,56 \times 10^{-3}$				
branched-chain amino acid metabolic process (GO:0009081)	$7,39 \times 10^{-3}$	IX	8	$2,53 \times 10^{-3}$	0
leucine metabolic process (GO:0006551)	$7,46 \times 10^{-3}$				

¹ Term groups were formed based on common genes per term (>50%).

² Оценка возможной вовлеченности генов из GO Group в патогенез БП на основе анализа данных литературы с использованием Pathway Studio.

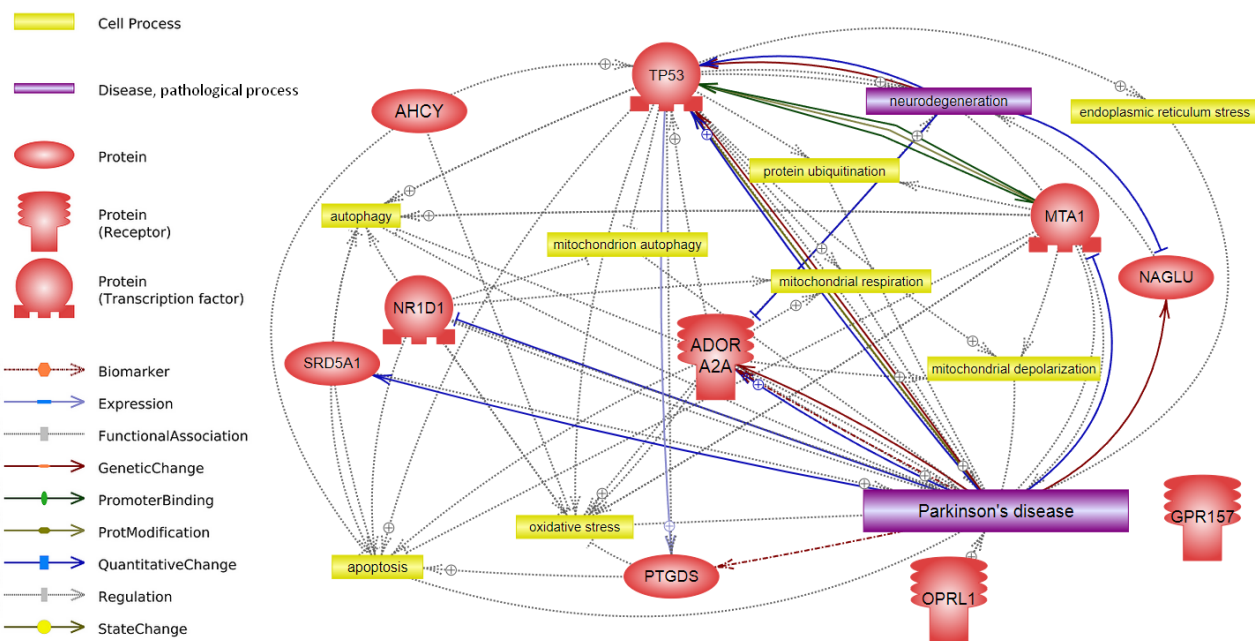


Рисунок 1. Сеть взаимодействия генов циркадного поведения, построенная с использованием Pathway Studio v. 12.4.0.5.

В настоящее время имеются данные о том, что при БП может наблюдаться дисфункция циркадных ритмов. В литературе описано, что в целом для пациентов с БП характерно уменьшение амплитуды цикла отдыха-активности. У них часто встречается ночная гипертензия, инвертированный ритм артериального давления, нарушения суточной терморегуляции и гормональных ритмов. Основными поведенческими маркерами циркадных ритмов являются характеристики цикла сон-бодрствование. Расстройства, связанные со сном, являются наиболее распространенной группой немоторных симптомов при БП. К ним относятся бессонница, чрезмерная сонливость в дневное время, расстройство поведения в фазе сна с быстрыми движениями глаз и синдром беспокойных ног. Кроме того, на молекулярном уровне было показано изменение экспрессии некоторых циркадных генов у пациентов с БП. Идентифицированное нами изменение экспрессии генов, входящих в кластер «circadian behavior», может говорить о вовлеченности данного процесса в БП, что подтверждает ранее полученные данные.

Далее нами был проведен анализ изменения экспрессии на уровне мРНК с помощью ПЦР в реальном времени для генов, входящих в кластер «circadian behavior»: *ADORA2A*, *AHCY*, *GPR157*, *MTA1*, *NAGLU*, *NR1D1*, *OPRL1*, *PTGDS*, *SRD5A1*, *TP53*. При этом необходимо отметить, что представленность транскриптов генов *AHCY*, *GPR157*, *NAGLU* и *SRD5A1* была ниже уровня детекции используемого в работе метода. Результаты экспрессионного анализа для остальных генов представлены в таблице 2.

Таблица 2. Результаты анализа изменения относительных уровней мРНК исследуемых генов в периферической крови близнецов, дискордантных по БП

Ген	Fold change
<i>ADORA2A</i>	1,81¹ 1,34-2,16²
<i>MTA1</i>	1,54 1,05-1,86
<i>NR1D1</i>	0,77 0,36-1,2
<i>OPRL1</i>	1,19 1,08-2,08
<i>TP53</i>	0,91 0,69-1,23
<i>PTGDS</i>	2,67 2,25-2,98

¹медиана, ²25-75 процентиля. Значения с $p < 0,05$ выделены жирным шрифтом. Уровень экспрессии в контроле принят за единицу.

Из таблицы 2 видно, что для трех генов (*ADORA2A*, *MTA1* и *PTGDS*) было обнаружено статистически значимое повышение относительных уровней экспрессии мРНК.

Наибольшее изменение экспрессии в нашей работе наблюдалось для гена *PTGDS*. Данный ген кодирует синтазу простагландина D2, катализирующую превращение простагландина H2 в простагландин D2 (PGD2). На сегодняшний день известно, что путь *PTGDS*-PGD2-рецептор DP1 (DP1R) участвует в регуляции сна. На модельных животных Pinzar et al. показали, что повышенная экспрессия *PTGDS* приводит к увеличению фазы медленного сна, а в работе Onoe et al. было показано, что PGD2 производит индуцирующий сон эффект. Wang et al. обнаружили, что повышенные уровни *PTGDS* наблюдаются у пациентов с нарколепсией и повышенной сонливостью. Выявленное нами увеличение экспрессии *PTGDS* в 2,7 раза у близнецов с БП относительно здоровых близнецов может свидетельствовать о возможных нарушениях, связанных с длительностями разных фаз сна, у близнецов с БП и приводить к возникновению у них повышенной сонливости. Кроме того, имеются данные, что *PTGDS* может обладать противовоспалительной и противоокислительной функцией, препятствовать гибели клеток, вызванной чрезмерным накоплением активных форм кислорода. Таким образом, увеличение экспрессии *PTGDS* в нашей работе также может быть обусловлено развитием компенсаторных механизмов, направленных против усиления окислительного стресса и воспаления.

На сегодняшний день имеются данные о том, что путь *PTGDS*-PGD2-DP1R и *ADORA2A*, взаимодействуя друг с другом, участвуют в регуляции сна. В частности, было показано, что передача сигналов посредством рецептора

аденозина A2A необходима для сна, индуцированного PGD2. Наряду с этим введение PGD2 мышам в работе Mizoguchi et al. приводило к увеличению у них внеклеточного уровня аденозина посредством стимуляции рецептора DP1R. В нашей работе наблюдалось увеличение экспрессии *ADORA2A* в 1,8 раза у близнецов с БП. Белок, кодируемый геном *ADORA2A*, представляет собой связанный с G-белком аденозиновый рецептор подтипа A2A. Рецептор A2A экспрессируется в головном мозге, преимущественно в стриатуме, где он оказывает влияние на функционирование нейронов. В работе Lazarus et al. было показано, что введение агониста рецептора A2A в разные зоны мозга грызунов способствует значительному увеличению продолжительности медленного и быстрого сна. Обнаруженное нами увеличение экспрессии *ADORA2A* может оказывать влияние на цикл сон-бодрствование у близнецов с БП. Так же, как и в случае гена *PTGDS*, вероятно, что повышение экспрессии *ADORA2A* повлечет за собой сомногенный эффект. Поскольку в нашей работе наблюдался одновременный рост *PTGDS* и *ADORA2A*, можно предположить, что пути белков данных генов взаимодействуют друг с другом и при БП. Кроме того, мы предполагаем, что увеличение экспрессии гена *ADORA2A* может оказывать негативное воздействие на двигательную функцию у пациентов с БП, поскольку в литературе имеются данные о том, что рецепторы *ADORA2A* могут образовывать гетеродимеры с рецепторами D2, подавляя тем самым DA-ергическую передачу сигналов.

Еще одним геном, для которого наблюдалось статистически значимое изменение экспрессии в настоящем исследовании, был *MTA1*. Экспрессия *MTA1* была в 1,5 раза больше у близнецов с БП относительно их здоровых сиблингов. Ген *MTA1* кодирует ассоциированный с метастазами белок 1. *MTA1* модулирует экспрессию генов-мишеней, функционируя в качестве корепрессора или коактиватора. В том числе, *MTA1* участвует в регуляции циркадных ритмов посредством регуляции транскрипции циркадных генов. Так как при БП часто наблюдаются нарушения циркадных ритмов, в том числе изменение экспрессии основных циркадных генов, мы предполагаем, что повышение экспрессии *MTA1* у близнецов с БП может быть адаптивным механизмом для поддержания циркадной ритмичности на молекулярном уровне. Вместе с тем, белок *MTA1* функционирует как коактиватор транскрипции тирозингидроксилазы (*TH*), основного фермента синтеза дофамина. В нашей работе у близнецов с БП наблюдалось увеличение экспрессии *MTA1* в 1,5 раза относительно здоровых близнецов. Увеличение экспрессии *MTA1* может приводить к увеличению экспрессии *TH* с последующим возрастанием интенсивности синтеза дофамина. Так, мы предполагаем, что *MTA1* может принимать участие в развитии компенсаторных механизмов при БП.

Анализ изменения экспрессии отдельных генов в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона, находящихся на ранних клинических стадиях развития заболевания

Для проведения анализа изменения экспрессии в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП были отобраны гены *ADORA2A*, *MTA1* и *PTGDS*, для которых было обнаружено достоверное изменение экспрессии в периферической крови монозиготных близнецов, дискордантных по БП. Кроме того, на основании работ, проведенных в лаборатории ранее, и анализа литературных данных были отобраны гены: *DNM2*, *HNMT*, *NSF*, *PTGS2*.

К первой группе генов, отобранных для анализа изменения экспрессии на уровне мРНК в группах пациентов с ранними стадиями БП, относились *ADORA2A*, *MTA1* и *PTGDS*. Результаты анализа изменения экспрессии для этих генов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты анализа изменения относительных уровней мРНК генов *ADORA2A*, *MTA1* и *PTGDS* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП

Ген	БП-2 нелеч ¹	БП-2 леч ²	Неврологический контроль
<i>ADORA2A</i>	1,25 ³ 0,97-1,67 ⁴	1,48 1,10-2,31	1,25 0,79-1,51
<i>MTA1</i>	0,74 0,49-1,00	1,02 0,63-1,71	1,21 1,02-1,49
<i>PTGDS</i>	0,67 0,40-1,56	0,89 0,63-1,87	2,71 1,95-5,51

¹БП-2 нелеч – пациенты с БП, не получавшие терапию; ²БП-2 леч – пациенты с БП, получавшие терапию; ³медиана, ⁴25-75 процентиля. Значения с $p < 0,05$ выделены жирным шрифтом. Уровень экспрессии в контроле принят за единицу.

Как видно из таблицы 3, достоверные изменения относительных уровней мРНК в группах пациентов с ранними стадиями БП были получены для генов *ADORA2A* и *MTA1*. В целом можно сказать, что полученные нами значения уровней мРНК исследуемых генов в группе пациентов с ранними стадиями БП не совпали со значениями, полученными в периферической крови близнецов, дискордантных по БП. Такой результат может быть объяснен тем, что близнецы с БП находились на более развернутых стадиях заболевания и более длительное время получали терапию, чем пациенты с ранними стадиями.

Для гена *ADORA2A* нами было обнаружено достоверное увеличение экспрессии только в группе пациентов с ранними стадиями БП, получавших терапию. Вероятно, что *ADORA2A* вовлечен в процессы, подверженные воздействию терапии противопаркинсоническими препаратами. Аналогичное

возрастание экспрессии данного гена было получено нами и для близнецов с БП, находившихся на более поздних стадиях (2-4 по шкале Хен-Яра) и получавших терапию.

Из таблицы 3 видно, что у пациентов с ранними стадиями БП, не получавших терапию, наблюдалось статистически значимое снижение уровней транскриптов *MTA1*. В то же время у близнецов с БП экспрессия *MTA1* возрастала в 1,5 раза относительно здоровых близнецов. Данное отличие может быть связано с тем, что близнецы с БП находились на более поздних стадиях БП. Полученные нами данные могут быть объяснены тем, что на ранних стадиях патогенеза снижение уровней мРНК *MTA1* может быть следствием гибели дофаминергических нейронов. В свою очередь, рост экспрессии данного гена у близнецов с более поздними стадиями БП, объясняется тем, что клетка пытается восполнить интенсивность синтеза дофамина, через увеличение экспрессии *TH*.

Что касается гена *PTGDS*, изменения его экспрессии наблюдались только в группе неврологического контроля. Данный результат может указывать на то, что данный ген не играет существенной роли в патогенезе ранних стадий БП.

Далее мы провели экспрессионный анализ для гена *DNM2*. Ген *DNM2* был отобран в результате полнотранскриптомного анализа периферической крови пациентов с БП. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4. Результаты анализа изменения относительных уровней мРНК гена *DNM2* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП

Ген	БП-1 нелеч ¹	БП-1 леч ²	Неврологический контроль
<i>DNM2</i>	0,89 ³ 0,48-1,29 ⁴	0,29 0,26-0,582	0,81 0,39-1,18

¹БП-1 нелеч – пациенты с БП, не получавшие терапию; ²БП-1 леч – пациенты с БП, получавшие терапию; ³медиана, ⁴25-75 процентиля. Значения с $p < 0,05$ выделены жирным шрифтом. Уровень экспрессии в контроле принят за единицу.

Ген *DNM2* кодирует белок динамин-2, который является ГТФазой, отвечающей за расщепление везикул. Данный белок играет важную роль в опосредованном клатрином эндоцитозе и динамике цитоскелета. Из таблицы 4 видно, что экспрессия *DNM2* снижалась в 3,5 раза в периферической крови пациентов с БП, получавших терапию, и не изменялась в группах неврологического контроля и пациентов с БП, не получавших терапию. Данный результат может говорить о том, что данный ген не играет важной роли в патогенезе БП на ранних стадиях, но подвергается воздействию терапии агонистами дофамина. В настоящее время имеются данные об усилении интернализации дофаминергических рецепторов в ответ на введение агонистов дофамина, в результате чего происходит снижение количества функциональных рецепторов на поверхности клетки. Кроме того, имеется

предположение, что данный процесс, по-видимому, опосредован динамином-2. Исходя из этого, снижение экспрессии *DNM2* у пациентов с ранней стадией БП, получавших терапию агонистами дофамина, может указывать на усиление компенсаторных механизмов, связанных со снижением интернализации дофаминергических рецепторов в результате уменьшения уровня динамина-2.

Также экспрессионный анализ был проведен для генов *HNMT*, *NSF* и *PTGS2*. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5. Результаты анализа изменения относительных уровней мРНК генов *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП

Ген	БП-2 нелеч ¹	БП-2 леч ²	Неврологический контроль
<i>HNMT</i>	1,43 ³	1,78	1,10
	0,93-2,14 ⁴	1,33-1,97	0,81-2,04
<i>NSF</i>	1,39	1,53	1,21
	1,12-1,86	1,28-2,25	0,63-1,78
<i>PTGS2</i>	4,75	6,76	3,20
	2,70-8,59	2,51-8,00	0,74-8,41

¹БП-2 нелеч – пациенты с БП, не получавшие терапию; ²БП-2 леч – пациенты с БП, получавшие терапию; ³медиана, ⁴25-75 процентиля. Значения с $p < 0,05$ выделены жирным шрифтом. Уровень экспрессии в контроле принят за единицу.

Как видно из данных, представленных в таблице 5, для всех трех генов (*HNMT*, *NSF* и *PTGS2*) было выявлено достоверное увеличение экспрессии у пациентов с БП. Изменения наблюдались как в группе пациентов с БП, не получавших терапию, так и в группе пациентов с БП, получавших терапию. При этом полученные изменения экспрессии являются специфическими для БП, поскольку в группе неврологического контроля для данных генов не было обнаружено достоверных отличий относительно группы здорового контроля.

Первый ген, для которого были получены достоверные изменения экспрессии в периферической крови пациентов с БП – *HNMT*. Данный ген кодирует фермент метаболизма гистамина – гистамин N-метилтрансферазу, которая осуществляет метилирование гистамина в присутствии S-аденозил-1-метионина с образованием N-метилгистамина. В нашей работе наблюдалось увеличение уровней мРНК *HNMT* в периферической крови пациентов с БП. Имеются данные о том, что для пациентов с БП характерно увеличение уровней гистамина. Так, повышенные уровни гистамина были обнаружены в работе Anichtchik et al. в постмортальных образцах мозга – в ЧС, бледном шаре и путамене. Кроме того, повышенные уровни гистамина наблюдались в работе Coelho et al. в крови пациентов с БП, не получавших терапию. Известно, что повышенные уровни гистамина могут способствовать дегенерации дофаминергических нейронов и запуску воспалительных сигнальных

процессов. Гистамин посредством взаимодействия с гистаминергическим рецептором H1 (HRH1) вызывает активацию микроглии и, в конечном итоге, гибель ДА-ергических нейронов. В связи с этим можно предположить, что увеличение экспрессии мРНК *HNMT* может являться защитным механизмом, заключающемся в усилении метаболизма чрезмерного уровня гистамина. Подобное увеличение уровней мРНК *HNMT* было ранее зафиксировано в тканях ЧС и путамена у пациентов с БП в работе Shan et al.

Вторым геном, продемонстрировавшим достоверное изменение экспрессии, был *NSF*. Ген *NSF* кодирует N-этилмалеимид-чувствительный фактор, который участвует в слиянии внутриклеточных мембран. Данную функцию он выполняет посредством влияния на сборку и разборку SNARE-комплекса. В частности, *NSF* задействован в нейротрансмиссии, обеспечивая слияние синаптических везикул с пресинаптической мембраной. Многочисленные исследования показали, что истощение цитозольного *NSF* нарушает механизм слияния мембран и приводит к накоплению внутриклеточных везикул. Накапливаются данные, свидетельствующие о вовлеченности *NSF* в патогенез БП. В работах Pischedda et al. и Belluzzi et al. было показано, что у пациентов с БП с мутацией G2019S в гене *LRRK2* в образцах базальных ганглиев, а также в клеточных и животных моделях с данной мутацией, были обнаружены белковые агрегаты, содержащие *NSF*. Известно, что *LRRK2* фосфорилирует *NSF*, а фосфорилированный *NSF*, в свою очередь, обладает повышенной АТФазной активностью и способен быстрее разбирать комплекс SNARE *in vitro*. В связи с этим авторы предположили, что мутация G2019S будет приводить к патологическому фосфорилированию *NSF*, и как следствие, динамика синаптических везикул может быть нарушена. Исследование Vabcock et al. на дрозофилах с мутациями в гене *comt*, кодирующем *NSF*, показало, что нарушение функции данного гена приводит к сокращению продолжительности жизни мух и прогрессирующей нейродегенерации, включая гибель ДА-ергических нейронов. Авторы предполагают, что это обусловлено нарушением транспорта лизосомальных протеаз, которое приводит к неспособности поддерживать аутофагию. Увеличенная экспрессия *NSF*, напротив, предотвращала индуцированную α -синуклеином токсичность дофаминергических нейронов в модели БП на мухах. Так, наблюдаемые нами данные об увеличении экспрессии *NSF* у пациентов с БП могут говорить о развитии компенсаторных механизмов, обуславливающих более активный транспорт синаптических везикул.

Наибольшее изменение экспрессии было получено для гена *PTGS2*. Экспрессия *PTGS2* возросла более чем в 4 раза в группе пациентов с БП, не получавших терапию, и более чем в 6 раз в группе пациентов с БП, получавших терапию. Ген *PTGS2* кодирует циклооксигеназу-2 (*COX2*), основной фермент, ответственный за превращение арахидоновой кислоты в простагландин (PG) H₂, который является основным предшественником различных PG, но в особенности PGE₂. Известно, что экспрессия *COX2* в

основном повышается под воздействием воспалительных стимулов. На сегодняшний день имеются данные о том, что *COX2* задействован в патофизиологии БП, однако его точная роль до сих пор неясна. Участие *COX2* в нейродегенерации при БП подтверждалось тем фактом, что в работе Feng et al. мыши с нокаутом данного гена меньше подвергались МФТП-индуцированной нейродегенерации относительно мышей дикого типа. Кроме того, ингибирование *COX2* ацетилсалициловой кислотой и салицилатом в работе Teismann et al. обеспечивало нейропротекцию у мышей с МФТП-индуцированной моделью БП. Таким образом, можно предположить, что увеличение экспрессии *PTGS2*, наблюдаемое у пациентов с БП, свидетельствует о развитии воспалительных процессов, которое вероятно будет приводить к еще большей гибели дофаминергических нейронов и тем самым усиливать нейродегенерацию. Наши данные согласуются с данными, полученными в ранее проведенных исследованиях. Увеличение экспрессии *COX2* было обнаружено в постмортальных образцах дофаминергических нейронах в ЧС мышей с МФТП-индуцированной моделью БП, а также в аналогичных образцах пациентов с БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное, прогрессирующее с возрастом нейродегенеративное заболевание. В первую очередь БП характеризуется гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции, что приводит к появлению моторных симптомов. Именно по их наличию ставят клинический диагноз заболевания. Однако моторные симптомы проявляются только после гибели около 70% дофаминергических нейронов, а сама дегенерация нейронов развивается в течение многих лет до этого. В связи с острой проблемой длительного скрытого периода БП необходим поиск генов и механизмов, которые задействованы в развитии патологического процесса на самых ранних стадиях заболевания и могут быть связаны с моторными и немоторными (нарушения сна, гипосмия, запоры, депрессия) симптомами. Такой поиск может быть основан на изучении РНК маркеров. Одним из наиболее доступных объектов для проведения транскриптомных исследований является периферическая кровь. Опубликованные данные указывают на то, что клетки крови, в частности, лимфоциты, могут быть моделью для исследования процессов, происходящих в мозге при БП.

В качестве первого этапа исследования транскриптома в периферической крови пациентов с БП может быть использован полнотранскриптомный анализ, который позволяет выявить процессы и группы генов, ассоциированные с данным заболеванием. Далее гены, отобранные в результате полнотранскриптомного анализа, должны быть проверены с применением ПЦР в реальном времени. Данный метод в настоящее время является золотым стандартом количественного определения РНК исследуемого гена. Анализ изменения экспрессии отдельных кандидатных генов имеет важное значение при изучении ранних стадий БП, так как может помочь пониманию механизмов патогенеза данного нейродегенеративного заболевания, а также поиску биомаркеров для ранней диагностики риска развития БП.

Настоящая работа была посвящена исследованию изменения экспрессии на транскриптомном уровне в периферической крови пациентов с БП. Для достижения этой цели, нами впервые был проведен полнотранскриптомный анализ периферической крови монозиготных близнецов, дискордатных по БП, и не несущих при этом мутаций, ассоциированных с данным заболеванием. Исследование транскриптома монозиготных близнецов, дискордантных по БП, позволяет сократить влияние генетического вклада в выявляемые изменения экспрессии генов, поскольку монозиготные близнецы обладают одинаковым генотипом. В ходе анализа обогащения был идентифицирован метаболический процесс «циркадные ритмы» в качестве приоритетного процесса для более подробного изучения. Дифференциальная экспрессия генов, ассоциированных с данным процессом, подтвердила вовлеченность этого процесса в патогенез БП. При верификации полученных данных с помощью ПЦР в реальном времени было обнаружено,

что три гена из кластера циркадное поведение – *PTGDS*, *ADORA2A* и *MTA1* продемонстрировали достоверное увеличение экспрессии на уровне мРНК у близнецов с БП, в связи с чем были отобраны для дальнейшего анализа изменения экспрессии в периферической крови пациентов с самыми ранними стадиями БП.

Кроме того, на основании работ, проведенных в лаборатории ранее, и анализа литературных данных были отобраны гены: *DNM2*, *HNMT*, *NSF*, *PTGS2*.

Экспрессионный анализ в периферической крови пациентов с ранними стадиями БП показал достоверное изменение уровней мРНК генов *MTA1*, *HNMT*, *NSF* и *PTGS2*. Данные гены могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров ранних стадий БП. Также было обнаружено изменение уровней экспрессии генов *ADORA2A* и *DNM2* у пациентов с БП, получавших терапию, в связи с чем можно предположить, что данные гены вовлечены в процессы, подверженные воздействию терапии противопаркинсоническими препаратами.

ВЫВОДЫ

1. Транскриптомный анализ периферической крови монозиготных близнецов, дискордантных по болезни Паркинсона, показал, что экспрессия трех ассоциированных с биологическим процессом «циркадные ритмы» (по классификации Gene Ontology) генов *PTGDS*, *ADORA2A* и *MTA1* достоверно увеличивается у близнецов с болезнью Паркинсона. Это говорит о вовлеченности данного процесса в патогенез болезни Паркинсона.
2. Показано, что уровень мРНК гена коактиватора тирозингидроксилазы *MTA1* снижается на ранних стадиях болезни Паркинсона. Снижение уровня мРНК *MTA1* может отражать процессы, связанные с гибелью дофаминергических нейронов.
3. У получавших противопаркинсоническую терапию пациентов было обнаружено увеличение экспрессии гена *ADORA2A*, кодирующего рецептор аденозина A2A. Повышение экспрессии этого гена может вести к снижению эффективности терапии агонистами дофамина.
4. В периферической крови пациентов с ранними стадиями болезни Паркинсона, получавших терапию, впервые было обнаружено снижение уровня мРНК гена *DNM2*, кодирующего динамин-2. Снижение экспрессии этого гена может повышать эффективность терапии агонистами дофамина через снижение интернализации рецепторов дофамина.
5. Показано достоверное, специфическое для болезни Паркинсона и независимое от противопаркинсонической терапии увеличение экспрессии генов *HNMT*, *NSF* и *PTGS2* в периферической крови пациентов с ранними стадиями болезни Паркинсона. Данные гены могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров ранних стадий болезни Паркинсона.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых журналах

1. Семенова Е.И., Руденок М.М., Алиева А.Х., Карабанов А.В., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Анализ относительных уровней экспрессии генов *DNM2*, *EPN2* и *EXOC4* в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология, 2021;39(3):25-30. <https://doi.org/10.17116/molgen20213903125>.
2. Semenova E.I., Vlasov I.N., Partevian S.A., Rosinskaya A.V., Rybolovlev I.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I., Alieva A.K. Transcriptome profiling reveals differential expression of circadian behavior genes in peripheral blood of monozygotic twins discordant for Parkinson's disease. *Cells*, 2022, 11, 2599. <https://doi.org/10.3390/cells11162599>. IF = 7.66, Q1.
3. Semenova E.I., Partevian S.A., Shulskaya M.V., Rudenok M.M., Lukashevich M.V., Baranova N.M., Doronina O.B., Doronina K.S., Rosinskaya A.V., Fedotova E.Y., Illarioshkin S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I., Alieva A.K. Analysis of *ADORA2A*, *MTA1*, *PTGDS*, *PTGS2*, *NSF* and *HNMT* gene expression levels in peripheral blood of patients with early stages of Parkinson's disease. *BioMed Research International*, vol. 2023, Article ID 9412776, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/9412776>. IF = 3.25, Q2.

Тезисы докладов

1. Семенова Е.И., Руденок М.М., Рыболовлев И.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Анализ уровня экспрессии генов гистаминаргической системы на ранней симптомной стадии болезни Паркинсона. Медицинская генетика. 2020;19(4):105-106. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.04.105-106>.
2. Семенова Е.И., Руденок М.М., Рыболовлев И.Н., Алиева А.Х., Сломинский П.А., Шадрина М.И. Анализ относительных уровней экспрессии генов гистаминаргической системы и циркадных ритмов в тканях мозга мышей с МФТП-индуцированной моделью ранней симптомной стадии болезни Паркинсона. В сборнике III Объединенный Научный Форум Физиологов, Биохимиков И Молекулярных Биологов; VII Съезд Биохимиков России; X Российский Симпозиум «Белки И Пептиды»; VII Съезд Физиологов СНН. Научные Труды. Место издания Перо Москва. 2021; том 2, с. 222.
3. Semenova E.I., Rudenok M.M., Alieva A.Kh., Karabanov A.V., Illarioshkin S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I. Analysis of *DNM2*, *EPN2* & *EXOC4* relative gene expression levels in peripheral blood from Parkinson's disease patients // ESHG 2021: virtual conference, August 28-31: European Society of Human Genetics. 2021, P09.105.B.
4. Руденок М.М., Семенова Е.И., Карабанов А.В., Росинская А.В., Доронина О.Б., Доронина К.С., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И., Алиева А.Х. РНК-биомаркеры ранних стадий болезни Паркинсона. Нейрофорум-2022 и V Национальный конгресс по болезни Паркинсона и расстройствам движений, Москва, Россия, 23-24 июня 2022.

5. Семенова Е.И., Власов И.Н., Партевян С.А., Росинская А.В., Рыболовлев И.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И., Алиева А.Х. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с циркадными ритмами, в периферической крови монозиготных близнецов, дискордантных по болезни Паркинсона. Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – 58 с.
6. Semenova E.I., Partevian S.A., Shulskaaya M.V., Rudenok M.M., Lukashevich M.V., Baranova N.M., Doronina O.B., Doronina K.S., Rosinskaya A.V., Fedotova E.Y., Illarioshkin S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I., Alieva A.K. Gene expression differences in peripheral blood of patients with early stages of Parkinson's disease. Journal of Clinical Physiology and Pathology. 2023. T. 2. № 3. С. 73-74.