

На правах рукописи

ШАДРИНА МАРИЯ ИГОРЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

03.01.07 – Молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

МОСКВА – 2011

Работа выполнена в Отделе молекулярных основ генетики человека Учреждения Российской академии наук Института молекулярной генетики РАН

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Петр Андреевич Сломинский
Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Виктор Алексеевич Спицын
Учреждение Российской академии медицинских наук
Медико-генетический научный центр РАМН

доктор биологических наук, профессор
Ольга Олеговна Фаворова
Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздравсоцразвития России

доктор биологических наук, профессор
Валерий Вячеславович Носиков
Учреждение Российской академии наук Институт
биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится « » _____ 2011 г. в часов
на заседании Диссертационного совета Д.002.37.01 при Учреждении Российской
академии наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Россия, Москва, ул.
Вавилова, д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по
адресу: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан « » _____ 2011 г.

**Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук**

Л.С. Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТ

Актуальность проблемы

Изучение структурно-функциональной организации генома человека – одна из центральных проблем в современной биологии. В рамках этой проблемы решаются важнейшие задачи, связанные с анализом процессов реализации генетической информации на всех уровнях биологической организации – от отдельной клетки до целостного организма. При этом будет выяснена функция отдельных генов, генных сообществ и генома в целом в жизнедеятельности организма на всех этапах онтогенеза. Для получения максимально полной информации требуется выяснение роли отдельных элементов генома как в норме, так и при развитии патологических процессов – как моногенных, так и сложных многофакторных заболеваний. Анализ патологических процессов позволит связать воедино генетические и эпигенетические факторы, влияющие на функционирование организма в различных условиях.

Одними из наиболее актуальных заболеваний являются болезни центральной нервной системы, так как они затрагивают функционирования основных регуляторных систем организма. Среди этих болезней отдельную большую группу составляют нейродегенеративные заболевания, которые характеризуются избирательной дегенерацией отдельных типов нейронов и структур мозга. Одним из таких заболеваний является болезнь Паркинсона – многофакторное заболевание с выраженным генетическим компонентом, для которого характерно существование как семейных, так и спорадических форм. Болезнь Паркинсона относится к числу самых частых нейродегенеративных заболеваний человека. По последним данным, болезнью Паркинсона по всему миру болеет около 6 млн. человек. Считается, что болезнь Паркинсона наблюдается у не менее 1-2% населения в возрасте старше 65 лет и не менее 4-5% в возрасте старше 85 лет. В последнее время наблюдается рост числа больных идиопатическим паркинсонизмом и снижение возраста начала заболевания.

Высказывается предположение, что с увеличением среднего возраста населения в ближайшие годы распространенность болезни Паркинсона в мире будет увеличиваться.

Изучение этого заболевания активно ведется уже на протяжении ста лет. Многолетние исследования позволили достаточно полно описать болезнь Паркинсона с клинической точки зрения. Выявлено большое количество форм и стадий болезни Паркинсона, которые указывают на то, что при заболевании задействованы разные отделы нервной системы и в его патогенез вовлечено большое число различных процессов, обеспечивающих нормальное функционирование нервных клеток. Достаточно полно охарактеризована болезнь Паркинсона с точки зрения нейропатологии. Показано, что нейродегенеративные изменения при болезни Паркинсона связаны с избирательной гибелью различных типов нейронов. В первую очередь наблюдается уменьшение числа дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции, базальных ядрах, покрышке среднего мозга. Установлено, что характерные для болезни Паркинсона клинические признаки проявляются при гибели приблизительно 60% дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции и 80%-ном снижении уровня дофамина в полосатом теле. В тоже время, несмотря на интенсивные молекулярно-биологические исследования, причины развития заболевания остаются до конца не выясненными. На сегодняшний день выявлено семь генов (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, *DJ1*, *UCHL1*, *ATP13A2*), вовлеченных в патогенез семейной формы болезни Паркинсона. Однако их вклад в развитие спорадической формы заболевания остается не известным. Кроме того, выявлен ряд потенциальных генов-кандидатов, связанных с развитием спорадической формы болезни Паркинсона.

Анализ кодируемых этими генами белков позволил предложить несколько механизмов, объясняющих причины селективной и прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов. К ним в первую очередь относятся процессы,

связанные с митохондриальной дисфункцией, убиквитин-зависимой протеасомной деградацией белков, дифференцировкой дофаминергических нейронов, функционированием синапсов и лизосом, обменом дофамина.

В целом же до сих пор нет единой картины этиопатогенеза данного заболевания. В связи с этим дальнейшее изучение болезни Паркинсона на различных уровнях крайне актуально. Необходимо проводить анализ заболевания с генетических позиций, выявляя новые гены, различные мутации и полиморфные варианты, приводящие к семейной и влияющие на риск развития спорадической форм заболевания. Важным направлением является изучение изменения транскриптома при болезни Паркинсона, в первую очередь, на ранних стадиях патологического процесса. Это позволит выявить механизмы, запускающие нейродегенеративные процессы. Моделирование болезни Паркинсона на животных также поможет лучше понять причины развития болезни Паркинсона. Проведение такого рода работ позволит в будущем выстроить целостную картину всех молекулярно-генетических процессов, задействованных в патогенезе заболевания, и, следовательно, лучше понять механизмы функционирования, как отдельных нейронов, так и всей нервной системы человека в целом.

Выявление механизмов и генов, вовлеченных в патогенез болезни Паркинсона на разных стадиях заболевания, поможет также разработать методы его доклинической диагностики. Это даст возможность начать разработку принципов и подходов к профилактическому лечению на ранних стадиях заболевания, когда процессы дегенерации дофаминергических нейронов затронули лишь ограниченное число клеток.

Цель и задачи исследования

Основной **целью** данной работы было изучение роли генетических факторов в патогенезе спорадической формы болезни Паркинсона и выявление новых геномных и транскриптомных маркеров данного заболевания.

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

1. Разработка быстрого и эффективного метода анализа дозы отдельных экзонов гена *PARK2* и гена *SNCA* на основе ПЦР в реальном времени.
2. Анализ мутаций с изменением копийности в генах *PARK2* и *SNCA* у пациентов с болезнью Паркинсона.
3. Изучение роли точковых мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в генах, вовлеченных в патогенез болезни Паркинсона, в развитии спорадической формы заболевания.
4. Поиск новых ДНК маркеров спорадической формы болезни Паркинсона.
5. Изучение изменения транскриптома в процессе развития токсической модели болезни Паркинсона, вызванной введением 6-гидроксидофамина.
6. Изучение изменения транскриптома в клетках периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона, находящихся на ранних стадиях заболевания.

Научная новизна и практическая значимость работы

Разработан быстрый и эффективный метод выявления делеций и дупликаций экзонов 1-12 в гене *PARK2* и мультипликаций гена *SNCA* на основе ПЦР в реальном времени и технологии TaqMan. Данный метод пригоден для массового скрининга больных на мутации с изменением копийности в генах *PARK2* и *SNCA*.

При проведении анализа мутаций с изменением копийности в генах *PARK2* и *SNCA* впервые было показано, что делеции и дупликации экзонов гена *PARK2* вносят существенный вклад в развитие спорадической формы болезни Паркинсона в российской популяции. Обнаружено, что у людей, имеющих делеции и дупликации, риск развития заболевания повышен в 8,53 раза (95%ДИ=1,14-63,52; $p=0,0095$) Вероятность развития спорадической формы болезни Паркинсона в раннем возрасте у людей, имеющих мутации с изменением копийности экзонов гена *PARK2*, повышена в 13,95 раза (95%ДИ=1,85-105,96; $p=0,0004$). Получено подтверждение гипотезы о том, что

данный тип мутаций в гене *PARK2* в гетерозиготном состоянии влияют на риск развития заболевания.

Впервые установлено, ген *PARK2* отвечает за часть фенотипической вариабельности болезни Паркинсона в российской популяции. Показано, что наличие делеций и/или дупликаций экзонов в гене *PARK2* способствует существенному снижению возраста клинического дебюта болезни Паркинсона (на 9 лет), развитию дистонии и симметричному протеканию заболевания.

Впервые обнаружено, что ген *POMC* вовлечен в патогенез болезни Паркинсона. Показано, что наличие аллеля Т по полиморфизмам rs28930368 и rs2071345 гена *POMC* повышает риск развития заболевания в 5,01 раза (95%ДИ= 1,05–23,83; $p=0,03$) и приводит к развитию клинического фенотипа с преобладанием мышечной ригидности.

Впервые показано, что ген *WFS1* вовлечен в патогенез болезни Паркинсона. Обнаружено, что наличие аллеля Т по полиморфизму rs1801211 гена *WFS1* повышает риск развития заболевания в 2,34 раза (95%ДИ=1,29–4,24; $p=0,005$).

Впервые выявлена ассоциация полиморфизма rs2736990 (С/Т) в гене *SNCA* с риском развития спорадической формы болезни Паркинсона для российской популяции. Показано, что носительство аллеля С по данному полиморфизму повышает риск развития болезни Паркинсона в 1,75 (95%ДИ= 1,19–2,58; $p=0,004$).

Выявленные нами мутации и однонуклеотидные полиморфизмы в генах *PARK2*, *SNCA*, *POMC* и *WFS1* в дальнейшем могут быть включены в панель маркеров для определения индивидуального риска развития болезни Паркинсона.

Впервые проведено изучение относительных уровней экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* в периферической крови больных на ранних стадиях развития болезни Паркинсона и показано, что изменение уровня мРНК каждого гена в отдельности не является специфичным для этого заболевания. В то же

время совместный анализ относительных уровней экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* выявил разные паттерны уровней их мРНК в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона, больных церебральным атеросклерозом и у группы пациентов с различными неврологическими заболеваниями. Это говорит о специфическом системном ответе организма на ранних стадиях патологического процесса при болезни Паркинсона. Кроме того, полученные данные указывают на то, что изменения экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* по отдельности не могут служить биомаркерами для ранних стадий болезни Паркинсона. Однако эти данные позволяют предположить, что совместный анализ количества транскриптов генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13*, а также других генов, вовлечённых в патогенез БП, в дальнейшем могут стать основой для создания панели маркеров для диагностики этого заболевания на досимптоматической стадии.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 36 печатных работ, из них 20 статей, 2 главы из книг, 1 патент и 13 сообщений в материалах тезисов научных конференций и симпозиумов.

Апробация диссертации

Результаты, полученные в данной работе, были представлены на следующих конференциях и конгрессах: XV International Congress of Neuropathology (15-18 September 2003, Turin, Italy), IX International Symposium on Mutations in the Genome (23-27 September 2007, Xiamen, China), конференции Европейского Общества Генетики человека (ESHG) в 2006, 2007 и 2009 гг., IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (11-15 мая 2008 г., Новосибирск, Россия), VII Международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток» (22-25 октября 2009г., Звенигород, Россия), VI Съезд Российского общества медицинских генетиков (14-18 мая 2010г., Ростов-на-Дону, Россия), XXI съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (19-25 сентября 2010 г., Калуга, Россия), The Second

World Parkinson Congress (28 September – 1 October 2010, Glasgow, UK), II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (17-19 мая 2011 г., Курск, Россия), Седьмой Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (3-13 июня 2011 г., Судак, Крым, Украина). Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на заседании Ученого совета учреждения Российской академии наук Института молекулярной генетики РАН 30 мая 2011 г. и на совместном заседании межинститутского семинара "Хромосома" и экспертной комиссии Диссертационного совета Д002.037.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН (ИБГ РАН) 28 июня 2011 г

Структура и объем диссертации

Диссертация включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение; заключение; выводы; библиографический указатель. Список литературы состоит из 595 источников, среди которых 23 источника отечественной и 572 источника зарубежной литературы. Материалы диссертации изложены на 288 страницах машинописного текста, содержат 31 таблицу и 27 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ.

Результаты исследования

Анализ вклада мутаций с изменением копийности в генах *PARK2* и *SNCA* в патогенез болезни Паркинсона у больных из России.

Подбор праймеров и оптимизация метода анализа дозы отдельных экзонов генов *PARK2* и *SNCA*.

Для определения дозы отдельных экзонов генов *PARK2* и *SNCA* нами был выбран метод ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Использование TaqMan зондов позволяет проводить совместную амплификацию исследуемого и референсного генов, что значительно повышает точность и скорость анализа. Для проведения ПЦР анализа были подобраны

комбинации праймер-зонд для 1-12 экзонов гена *PARK2* и 4-6 экзонов гена *SNCA*. Для определения числа копий экзонов генов *PARK2* и *SNCA* использовались известные диапазоны значений коэффициента *R*, подтверждение которых было получено нами при анализе ДНК контроля и больных ювенильным паркинсонизмом с типированными ранее гетерозиготными делециями экзонов гена *PARK2* [Illarioshkin et al., 2003].

Предложенный нами вариант быстрой диагностики делеций и дупликаций отдельных экзонов гена *PARK2* и мультипликаций гена *SNCA* ранее описан не был. ПЦР в реальном времени на основе технологии TaqMan обладает целым рядом преимуществ перед другими имеющимися методами. Совместная амплификация отдельных экзонов гена *PARK2/SNCA* с геном *HBB*, используемым в качестве референсного гена, и оценка количества ДНК с помощью метода второй производной, учитывающей эффективность реакции, значительно повышают точность анализа и обеспечивают хорошую воспроизводимость результатов. Быстрота исполнения, точность в определении числа копий экзонов, относительно невысокая стоимость и безопасность данного метода делают возможным его применение для массового анализа больных.

Анализ делеций и дупликаций экзонов гена *PARK2* в выборке спорадических больных болезнью Паркинсона.

С использованием разработанного нами метода были проанализированы больные со спорадической формой БП из России на наличие делеций и дупликаций экзонов в гене *PARK2*.

При анализе 170 спорадических больных БП с ранним началом развития заболевания (<45 лет) был выявлен 21 больной с делециями и дупликациями экзонов гена *PARK2*. Распределение выявленных нами делеций и дупликаций экзонов гена *PARK2* представлено на рисунке 1А. Из представленных данных видно, что в рассматриваемой группе больных встречаются как делеции в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, так и дупликации в гетерозиготном

состоянии. При этом были обнаружены делеции как единичных экзонов, так и групп экзонов гена *PARK2*.

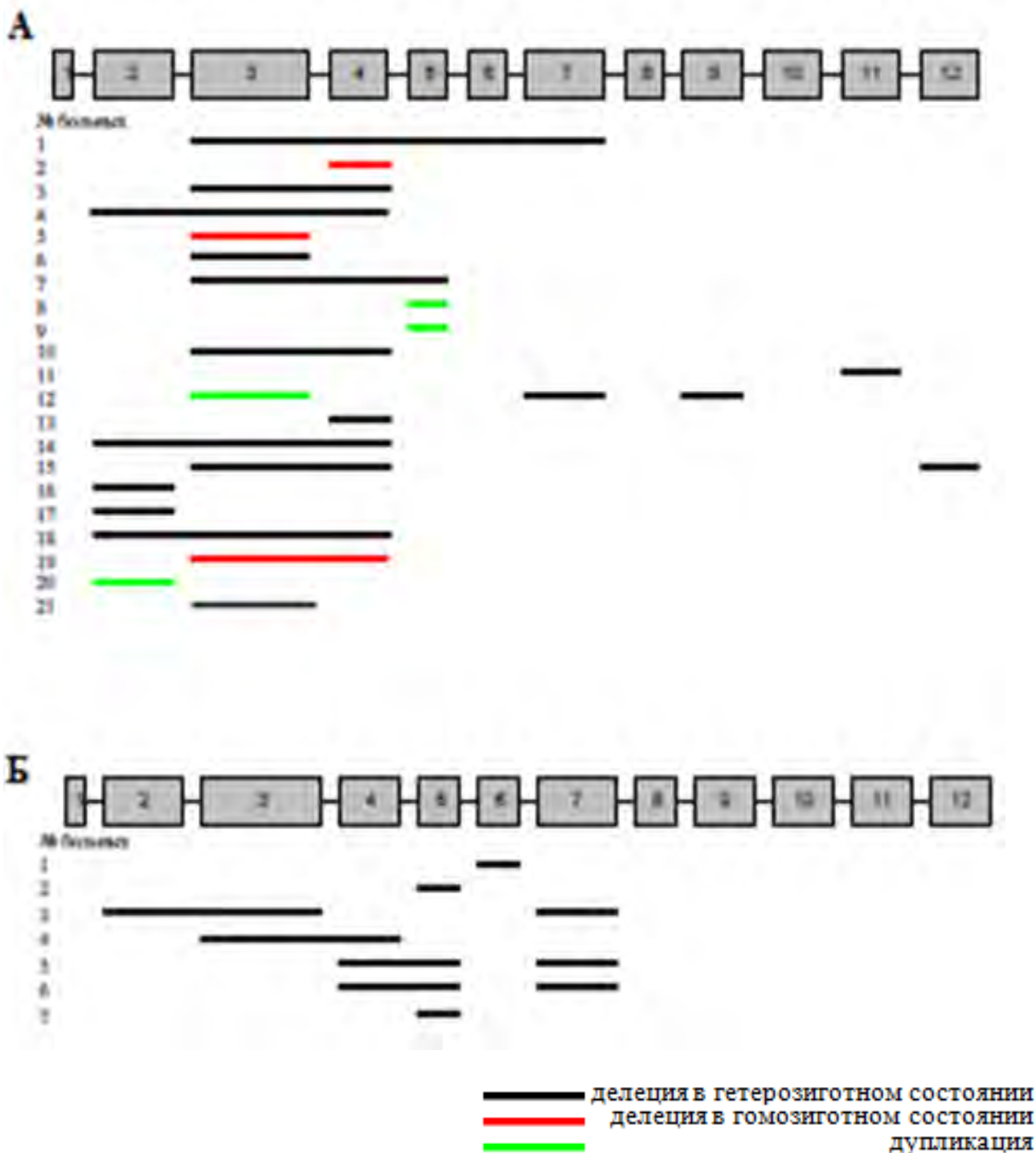


Рисунок 1. Распределение делеций и дупликаций в гене *PARK2* у спорадических больных БП из России с ранним (А) и поздним (Б) началом развития заболевания.

При анализе 183 больных БП с поздним началом развития заболевания (≥ 45 лет) были выявлены только делеции гена *PARK2* в гетерозиготном

состоянии у 7 больных. При этом были обнаружены делеции как отдельных экзонов, так и делеции групп экзонов гена *PARK2*. Распределение выявленных нами мутаций представлено на рисунке 1Б.

Необходимо отметить, что с помощью нашего метода на основе TaqMan ПЦР в реальном времени нельзя напрямую определить – являются ли делеции групп экзонов в гетерозиготном состоянии протяженными делециями, затрагивающими одну хромосому, или сложными компаундными делециями. Такая оценка с использованием разработанного нами метода возможна лишь при совместном анализе больных и их близких родственников.

К сожалению, в нашем случае ДНК близких родственников больных была недоступна. К тому же необходимо подчеркнуть, что в данном исследовании нас интересовала, в первую очередь, оценка частоты больных с делециями и дупликациями экзонов гена *PARK2*, а не точная характеристика мутаций в каждом конкретном случае.

На следующем этапе была проанализирована частота больных с делециями и/или дупликациями экзонов (мутаций с изменением копийности экзонов) гена *PARK2* в выборке спорадических больных из России. Частота больных, носителей мутаций с изменением копийности экзонов гена *PARK2*, в общей выборке составила 7,9 % (28 больных из 353). Наиболее часто пациенты с такими мутациями встречались в группе спорадических больных с ранним началом развития заболевания. Частота больных, имеющих мутации с изменением копийности в гене *PARK2*, составила 12,4 % (21 больной из 170), что значительно превышает частоты таких больных в большинстве популяций мира. Так, частота спорадических больных с ранним началом развития БП с делециями и/или дупликациями экзонов гена *PARK2* в популяциях из Европы составляет от 1,3% (Сербия) до 5,5% (Италия) и 6% (Германия).

В тоже время нами было обнаружено, что частота пациентов, носителей мутаций с изменением копийности, в группе спорадических больных с поздним началом развития БП значительно ниже, чем в группе больных с ранним

началом развития заболевания, и составляет 3,8% (7 больных из 183). Это значение оказалось сравнимо со значением, полученным в другом исследовании нашей лаборатории [Сломинский и др., 2003]. В этом исследовании были проанализированы спорадические больные из Башкирии с поздним началом развития БП, частота больных с делециями в гетерозиготном состоянии составила 5,3%. Такая частота говорит о сопоставимости результатов исследования Сломинского и др. с нашими результатами. В мире мутации с изменением копийности в гене *PARK2* при спорадической форме БП с поздним началом развития исследованы мало. В популяции из Индии делеций и дупликаций экзонов гена *PARK2* при поздней спорадической форме БП обнаружено не было [Chaudhary et al., 2006]. В большинстве же популяций мира таких исследований не проводилось.

Далее нами был проведен более детальный анализ частоты делеций или дупликаций определенных экзонов. Более часто в выборке спорадических больных из России встречались делеции экзонов гена *PARK2*. Они были найдены у 25 пациентов (7%). При этом гетерозиготные делеции были выявлены у спорадических больных БП с ранним (15 пациентов) и поздним (7 пациентов) началом развития заболевания. Гомозиготные делеции были обнаружены только в группе спорадических больных БП с ранним началом развития заболевания у 2 пациентов. Дупликации экзонов гена *PARK2* были обнаружены только в группе больных с ранним началом развития БП у 4 пациентов. В целом же частота спорадических больных БП, имеющих дупликации, в нашей выборке оказалась крайне низкой и составила 1%.

Среди мутаций с изменением копийности определенных экзонов в гене *PARK2* у спорадических больных БП из России наиболее часто встречались изменения числа копий экзонов 3 и 4. В группе спорадических больных с ранним началом развития изменения копийности экзона 3 выявлены у 13 больных, экзона 4 – у 11 больных, делеции и дупликации других экзонов (экзоны 2, 5, 6, 7, 9, 11, 12) найдены у 16 больных. В группе больных БП с

поздним началом развития заболевания изменения копийности экзона 3 выявлены у 2 больных, экзона 4 – у 3 больных, хотя явного преобладания частоты делеций какого-либо экзона гена *PARK2* в данной группе больных не наблюдалось. Однако в целом у спорадических больных из России наиболее часто встречаются именно изменения копийности экзонов 3 и 4. Эти данные согласуются с данными Periquet и соавторов (2003), также показавших, что в гене *PARK2* наиболее часто встречаются делеции экзонов 3 и 4 [Periquet et al., 2003].

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что мутации с изменением копийности экзонов в гене *PARK2* вносят существенный вклад в патогенез БП у спорадических больных из России, в особенности у больных с ранним началом развития заболевания. Наше исследование показало, что разработанный нами метод применим для быстрой и точной детекции экзонных перестроек в генах *PARK2* и *SNCA*. Диагностику экзонных перестроек в гене *PARK2* целесообразно начинать с анализа наиболее делетируемых экзонов, в первую очередь, с экзонов 3 и 4.

Анализ делеций и дупликаций экзонов гена *PARK2* был также проведен у 100 индивидуумов из популяционной выборки. В результате у одного человека была выявлена гетерозиготная делеция экзона 7. Таким образом, частота лиц с мутациями с изменением копийности экзонов в гене *PARK2* составила 1% (таблица 1).

Основываясь на данных, полученных в результате анализа выборки спорадических БП и популяционной выборки, были рассчитаны относительные шансы развития БП у людей с делециями и дупликациями экзонов гена *PARK2* (таблица 1). Расчеты показали, что у людей, имеющих делеции и/или дупликации, риск развития БП повышен в 8,53 раза. В большинстве случаев болезнь начнется в раннем возрасте (до 45 лет). У людей с делециями и/или дупликациями вероятность развития БП в раннем возрасте повышена в 13,95 раза ($p=0,0004$).

Таблица 1. Относительный шанс развития болезни Паркинсона у носителей делеций и дупликаций экзонов гена *PARK2* из России.

	Наличие делеций и дупликаций (N(%))	Отсутствие делеций и дупликаций (N(%))	Отношение шансов (95% доверительный интервал (CI))	P value
Общая выборка спорадических больных	28 (7,9%)	325 (92,1%)	8,53 (1,14-63,52)	0,0095
Группа больных с ранним началом развития	21 (12,4%)	149 (87,6%)	13,95 (1,85-105,96)	0,0004
Группа больных с поздним началом развития	7 (3,8%)	176 (96,2%)	3,94 (0,48-32,48)	0,27
Популяционная выборка	1 (1%)	99 (99%)	-	-

По результатам нашего исследования можно предположить, что делеции в гомозиготном и гетерозиготном состоянии в гене *PARK2* приводят, преимущественно, к развитию ранней формы БП, в то время как к позднему развитию БП могут приводить только делеции в гетерозиготном состоянии. Эти результаты согласуются с предположением, выдвинутым Foroud и др. Оно заключается в том, что гомозиготность по мутациям в гене *PARK2* приводит к развитию заболевания в раннем возрасте, тогда как гетерозиготность может приводить к развитию заболевания в позднем возрасте [Foroud et al.,2003].

Нами был проведен поиск корреляций между наличием делеций и/или дупликаций экзонов в гене *PARK2* и клиническими характеристиками больных. Все спорадические больные из нашей выборки были оценены по следующим клиническим критериям: полу, возрасту клинического дебюта и клинической картине заболевания. Корреляционный анализ проводился с использованием ранговой корреляции по Спирмену. В выборке больных с ранним началом развития заболевания были выявлены корреляции между наличием делеций и/или дупликаций экзонов гена *PARK2* и возрастом начала заболевания ($R = -0,30$; $p < 0,05$) и развитием дистонии ($R = -0,20$; $p < 0,05$). Более детальный анализ корреляции с возрастом начала БП показал, что средний возраст начала

заболевания у носителей делеций и/или дупликаций составляет 24 ± 11 лет, в то время как средний возраст начала заболевания у людей с отсутствием мутаций подобного типа составляет 33 ± 9 лет. Таким образом, показано, что носители делеций и/или дупликаций экзонов гена *PARK2* заболевают в среднем на 9 лет раньше. Достоверность этой корреляции была подтверждена тестом по Манну-Уитни ($p=0,000130$). Кроме того, в выборке спорадических больных с ранней формой БП был проведен подробный анализ корреляции между наличием делеций/дупликаций экзонов гена *PARK2* и развитием дистонии. Так, среди 21 больного, у которых были обнаружены делеции и дупликации в гене *PARK2*, было выявлено 8 больных с дистонией и 13 – без нее. Анализ 149 больных без делеций и дупликаций выявил 22 больных с наличием дистонии и 127 с ее отсутствием. В результате было показано, что наличие делеций и дупликаций способствует развитию дистонии ($\chi^2=7,79$; $p=0,0203$).

Корреляционный анализ в выборке больных с поздним началом развития БП выявил только одну корреляцию между наличием делеций экзонов гена *PARK2* и симметричным течением заболевания ($R= -0,19$; $p<0,05$). У всех 7 больных – носителей делеций в гене *PARK2* наблюдалось симметричное течение заболевания, в то время как среди 176 больных без делеций в гене *PARK2* было выявлено 89 больных с асимметрией и 87 без нее. В результате было показано, что наличие делеций способствует симметричному развитию заболевания ($\chi^2=7,37$; $p=0,0251$).

Таким образом, проведенный нами анализ показал, что делеции и дупликации экзонов гена *PARK2* могут вносить существенный вклад в патогенез спорадической формы БП в российской популяции. Установлено, что ген *PARK2* отвечает за часть фенотипической вариабельности БП в российской популяции.

Анализ дупликаций и трипликаций гена *SNCA* в выборке аутосомно-доминантных больных болезнью Паркинсона.

С использованием описанного нами метода ПЦР в реальном времени на основе технологии TaqMan проведен анализ 61 больного БП с аутосомно-

доминантным типом наследования, у которых наблюдались клинические признаки, наиболее характерные для больных БП с мутациями в гене *SNCA*. Для анализа дупликаций и трипликаций гена *SNCA* были проанализированы экзоны 4, 5 и 6 на наличие изменения их копийности. При этом для всех трех анализируемых экзонов получены значения коэффициента R, лежащие в диапазоне от 0,7 до 1,3. Эти данные свидетельствуют об отсутствии дупликаций и трипликаций в данных экзонах и, следовательно, отсутствии дупликаций и трипликаций всего гена *SNCA* в исследуемой выборке. Наши результаты согласуются с данными исследований, проведенных в США, Германии и Португалии, не выявивших увеличения копий гена *SNCA* в семьях с аутосомно-доминантной формой наследования БП [Bras et al., 2008; Gispert et al., 2005; Johnson et al., 2004]. Более того, скрининг такого рода мутаций у спорадических больных БП в различных популяциях также не выявил носителей дупликаций и трипликаций гена *SNCA* [Bras et al., 2008; Johnson et al., 2004; Hofer et al., 2005; Nishioka et al., 2006]. По всей видимости, мутации такого типа чрезвычайно редки в нашей популяции, и можно предположить, что дупликации и трипликации гена *SNCA* не вносят существенного вклада в патогенез аутосомно-доминантной формы БП у больных из России. В связи с этим, дальнейший анализ мультипликаций гена *SNCA* при спорадической форме БП у больных из России не представляется целесообразным.

Анализ спектра точковых мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в генах, вовлеченных в патогенез болезни Паркинсона, у больных из России.
Анализ мутации G2019S в гене *LRRK2* у больных болезнью Паркинсона.

Изучение спектра точковых мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в генах, вовлеченных в патогенез БП, у больных из России был начат с анализа мутации G2019S в гене *LRRK2*. Эта мутация является одной из восьми мутаций в гене *LRRK2* с доказанной патогенетической значимостью. Кроме того, установлено, что мутация G2019S - самая часто встречающаяся мутация в гене *LRRK2* и самая частая из всех точковых мутаций, описанных при БП. В связи с этим в первую очередь было интересно оценить вклад

именно этой мутации в патогенез БП у больных из России.

Исторически мутация G2019S в гене *LRRK2* была выявлена у больных с аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона. Известно, что при семейных формах заболевания частота мутации G2019S может достигать 11.5%, в то время как у больных со спорадической формой заболевания ее частота не превышает 7% [Fonzo et al. 2005]. В связи с этим анализ частоты встречаемости данной мутаций у больных БП из России нами был начат с исследования группы больных с семейной формой заболевания.

Всего нами было проанализировано 13 больных с аутосомно-доминантной формой БП, у которых наблюдались клинические признаки, наиболее часто встречающиеся у больных БП с мутациями в гене *LRRK2*. Был выявлен только один больной с анализируемой мутацией в гетерозиготном состоянии. Таким образом, частота мутации G2019S в гене *LRRK2* в данной группе больных с аутосомно-доминантной формой заболевания из России составляет 7,7%. Выявленная нами частота близка к частоте данной мутации у больных с семейной формой БП из популяций европейского происхождения, у которых её значение лежит в пределах от 2,8 до 11,6% [Fonzo et al. 2005; Kachergus et al., 2004]. Однако это значение может быть и несколько завышенным в виду очень небольшого числа проанализированных больных с семейной формой БП.

Далее был проведён анализ исследуемой мутации в выборке спорадических больных БП из России. В группе 170 спорадических больных с ранним началом развития было выявлено 2 (1,2%) пациента с мутацией G2019S в гетерозиготном состоянии. В группе 183 спорадических больных с поздним началом развития был обнаружен 1 (0,5%) пациент с мутацией G2019S в гетерозиготном состоянии. Таким образом, частота мутации G2019S в общей выборке спорадических больных из России составляет 0,8%, и её значение соответствует частотам данной мутации в популяциях европейского

происхождения, значение которых находится в диапазоне от 0,6% до 4,6% [Berg et al., 2005(b); Gilks et al., 2005].

Анализ точковых мутаций и однонуклеотидных полиморфизмов в генах, вовлеченных в патогенез болезни Паркинсона, с помощью технологии ДНК-микрочипов.

Для более широкомасштабного анализа спектра точковых мутаций и полиморфизмов в генах, вовлеченных в патогенез БП, нами была использована ДНК чиповая технология (технология APEX). В результате были проанализированы 68 точковых мутаций и 29 однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в генах *PARK2*, *PARK7*, *LRRK2*, *PINK1*, *STH/Tau haplotype*, *MAPT*, *UCHL1*, *NR4A2 (NURR1)*, *PSEN1*, *SNCB*. Необходимо отметить, что большинство мутаций и ОНП, представленных на чипе, располагается в генах *PARK2* и *LRRK2*, что составляет соответственно более 58% и 19% от всех мутаций и ОНП на чипе.

Данная часть работы проводилась на двух выборках пациентов с БП с ранним началом развития, поскольку считается, что именно у этой группы пациентов генетический фактор в развитии заболевания выражен сильнее. Именно поэтому в первую выборку вошёл 21 пациент с ювенильной формой БП, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу. Выбор этих пациентов для анализа точковых мутаций и ОНП объясняется большой представленностью на чипе точковых мутаций гене *PARK2*, которые приводят к развитию ювенильного паркинсонизма. Во вторую выборку вошёл 41 пациент со спорадической формой БП с ранним началом развития, поскольку предполагается, что мутации в гене *PARK2* могут вносить большой вклад в патогенез заболевания у данных больных.

Из 68 изученных нами точковых мутаций мы обнаружили только три различных миссенс мутации в гетерозиготном состоянии в гене *PARK2* у трёх различных пациентов со спорадической БП с ранним началом развития. Ранее было показано, что эти три миссенс мутации (M1L, A82G и C253Y) в гене *PARK2* приводят в гомозиготном состоянии к развитию ювенильной формы БП

с наследованием по аутосомно-рецессивному типу [Hedrich et al., 2001; Oliveira et al., 2003; Rawal et al., 2003]. Частота проанализированных нами точковых мутаций в гене *PARK2* у больных с БП из российской популяции составила 5%.

Согласно литературным данным, различные точковые мутации в гене *PARK2* в разных популяциях (Польша, Италия, Турция, Бразилия, Куба, Северо-Западная Индия, Северная Америка, Австралия) приводят к развитию БП с ранним началом развития значительно реже, чем делеции и дупликации экзонов в этом гене. Кроме того, существует большое разнообразие точковых мутаций в гене *PARK2*, каждая из которых сама по себе встречается довольно редко [Abbas et al., 1999; Bertoli-Avella et al., 2005; Kozirowski et al., 2010; Sun et al., 2006; Vinish et al., 2010]. Таким образом, можно предположить, что для российской популяции характерна крайне высокая микрогетерогенность исследованных нами точковых мутаций, и для определения спектра мутаций в генах моногенных форм БП необходимо ресеквенирование экзонов генов моногенных форм БП и в первую очередь *PARK2* и *LRRK2*. Подобная работа позволит установить характерный для российской популяции (или любой другой) профиль распределения точковых мутаций в генах моногенных форм БП у больных, как с семейной, так и со спорадической формой данного заболевания.

Нам также удалось выявить 12 ОНП (из 29 представленных на чипе) в генах *PARK2*, *NR4A2*, *LRRK2* и *PARK7*. Для оценки возможного вклада выявленных нами ОНП в развитие БП мы провели сравнительный анализ распределения генотипов по этим ОНП в центрально-европейской популяции (данные по популяции CEU, central Europe, из проекта по картированию гаплотипов HapMap) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) с полученными нами результатами, а также анализ с использованием более представительной выборки больных со спорадической формой БП и популяционного контроля. В результате ни для одного из выявленных нами ОНП не была обнаружена ассоциация с развитием БП в российской популяции.

Анализ дополнительных однонуклеотидных полиморфизмов в генах *SNCA* и *MAPT*.

Согласно данным полногеномных исследований ассоциаций для двух генов – *SNCA* и *MAPT*– были выявлены строгие ассоциации с БП практически во всех исследованиях [International Parkinson Disease Genomics Consortium, 2011]. В связи с этим, мы так же решили провести анализ ОНП расположенных в этих генах. Были выбраны по одному ОНП в гене *SNCA* и в гене *WNT3*, расположенном рядом с геном *MAPT*, – rs2736990 и rs415430 соответственно [Simón-Sánchez et al., 2009]. Результаты, полученные нами в ходе этого этапа работы, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов ОНП в генах *SNCA* и *MAPT/WNT3*.

	ГЕНОТИПЫ, %			Отношение шансов (95% доверительный интервал (ДИ))	p
	CC	CT	TT		
<i>SNCA</i> rs2736990				(CC+CT)/TT	
Спорадические больные с ранним началом развития БП	33,6%	44,3%	22,1%	1,77 (1,05-2,85)	0,03
Спорадические больные с поздним началом развития БП	20,8%	57,4%	21,8%	1,74 (1,05-2,76)	0,01
Общая выборка спорадических больных БП	26,1%	51,9%	22,0%	1,75 (1,19-2,58)	0,004
Популяционная выборка	21,4%	45,6%	33,0%	-	-
<i>MAPT/WNT3</i> rs 415430				(AA+AG)/GG	
Спорадические больные с ранним началом развития БП	75,2%	24,1%	0,7%	0,19 (0,008-4,87)	0,19
Спорадические больные с поздним началом развития БП	79,2%	19,7%	1,1%	0,16(0,008-3,39)	0,11
Общая выборка спорадических больных БП	77,5%	21,5%	1,0%	0,87(0,14-5,24)	0,87
Популяционная выборка	79,5%	20,5%	0%	-	-

Как видно из представленных данных, наличие аллеля С в ОНП rs2736990 в гене *SNCA* достоверно повышает риск развития БП. Таким образом, нам удалось показать чёткую ассоциацию полиморфизма rs2736990 в гене *SNCA* с риском развития спорадической формы БП в российской популяции. Мы получили соотношение шансов OR = 1,75 (ДИ95% = 1,19-2,58; p = 0,004), что отражает повышение риска развития БП у носителей аллеля С почти в два раза.

Наши данные также сопоставимы с результатами полногеномных исследований Simón-Sánchez и др. и Edwards и др. ($OR = 1,29$, $p = 0,01$; $OR = 1,27$, $p = 6,17 \times 10^{-13}$ и $OR = 1,23$, $p = 2,24 \times 10^{-16}$), полученных на больших выборках пациентов с БП (более 2000 и 1700 человек, соответственно) [Edwards et al., 2010; 2009; Simón-Sánchez et al., 2009].

Поиск новых генов-кандидатов болезни Паркинсона с помощью технологии ДНК-микрочипов.

Как уже не раз говорилось выше, в большинстве случаев БП носит спорадический идиопатический характер. И одним из наиболее распространенных на сегодняшний день подходов для поиска новых генов и ДНК маркеров, влияющих на риск развития многофакторных заболеваний, является анализ ассоциаций с использованием чиповых технологий. При этом используются ДНК чипы, позволяющие анализировать, как полиморфные варианты в целом геноме, так полиморфные варианты в ограниченном числе генов, связанных с определенными метаболическими путями.

Для поиска новых генов-кандидатов и ДНК-маркеров, которые могут быть вовлечены в патогенез БП, нами был выбран чип, содержащий 50 ОНП в 19 генах, белки которых вовлечены в передачу нервного импульса (*CCK*, *CCKAR*, *CCKBR*, *DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD5*, *TH*, *HTR1A*, *HTR1B*, *HTR2A*, *HTR2C*, *SLC6A4*, *TPH1*, *OPRM1*, *OPRD1*, *POMC*, *PENK*, *WFS1*). Этот чип был выбран, так как для ряда генов, представленных на чипе, ранее была показана их возможная связь с БП [Bressman et al., 2003; Ritz et al., 2009; Ryoо et al., 1998].

Было проанализировано 97 пациентов со спорадической формой БП с поздним началом развития (средний возраст $60,1 \pm 12,3$ лет). В отобранную группу больных не включались больные с идентифицированными мутациями в генах *PARK2* и *LRRK2*. Контрольную группу составили 100 индивидуумов из популяционной выборки, не страдающих неврологическими заболеваниями, соответствующих по полу, возрасту обследованной группе больных БП.

Распределение генотипов для всех исследованных полиморфизмов в популяционном контроле соответствовало равновесию Харди–Вайнберга. При анализе полученных результатов было обнаружено, что распределение генотипов и аллелей для 4 ОНП, расположенных в трех различных генах, отличается между выборкой спорадических больных БП и популяционным контролем (таблица 3).

Таблица 3. Частоты аллелей и генотипов ОНП в генах *HTR2A*, *WFS1*, *POMC*

	ГЕНОТИПЫ, %			Отношение шансов (95% доверительный интервал (ДИ))	p
	GG	GA	AA		
<i>HTR2A</i> rs6311				GG/(GA+AA)	
Спорадические больные с поздним началом развития БП	31,9%	52,6%	15,5%	1,81 (1,05-3.24)	0,04
Популяционная выборка	46,0%	43,0%	11,0%		
<i>WFS1</i> rs1801211				CC/(CT+TT)	
Спорадические больные с поздним началом развития БП	53,6%	43,4%	2,1%	2,34 (1,29-4,24)	0,005
Популяционная выборка	73,0%	27,0%	0,0%		
<i>POMC</i> rs28930368				CC/(CT+TT)	
Спорадические больные с поздним началом развития БП	90,7%	4,1%	5,2%	5,01 (1,05-23,83)	0,03
Популяционная выборка	98,0%	1,0%	1,0%		
<i>POMC</i> rs2071345				CC/(CT+TT)	
Спорадические больные с поздним началом развития БП	90,7%	2,1%	7,2%	5,01 (1,05-23,83)	0,03
Популяционная выборка	98,0%	2,0%	0,0%		

В гене проопиомеланокортина *POMC* было проанализировано два ОНП – rs28930368 (C282T), rs2071345 (C585T), расположенные в кодирующей области экзона 3, и один ОНП – rs1042571 (C866T), расположенный в 3'-нетранслируемой области. Для двух ОНП, расположенных в кодирующей области экзона 3 гена *POMC*, была выявлена ассоциация с БП. Было установлено, что наличие аллеля T по обоим ОНП повышает риск развития заболевания в 5 раз (OR=5,01, ДИ95%=1,05-23,83, p=0,03) в российской популяции.

Был проведен поиск корреляций между генотипами по ОНП rs28930368 (C282T) и ОНП rs2071345 (C585T) в гене *POMC* и различными клиническими характеристиками больных. Корреляционный анализ проводился с использованием ранговой корреляции по Спирмену, и для обоих ОНП в гене *POMC* была выявлена одинаковая корреляция с одним клиническим признаком – формой заболевания ($R=0,25$, $p<0,05$).

С целью более детального анализа выявленной корреляции и оценки влияния «неблагоприятных» аллелей исследованных ОНП были произведены следующие модификации:

- все больные были подразделены на 2 подгруппы: 1) группа больных с преобладанием тремора ($n=61$), в которую вошли больные с дрожательной и дрожательно-ригидной формой БП; 2) группа больных с преобладанием мышечной ригидности ($n=36$), в которую вошли больные с акинетико-ригидной, ригидной и ригидно-дрожательной формой.
- гетерозиготы и гомозиготы по аллелям T для обоих ОНП были объединены в единый (комбинированный) генотип.

Для обоих полиморфизмов были обнаружены идентичные корреляции между формой болезни и комбинированным генотипом (гамма-корреляция: $\text{Gamma}=0,5787$; $Z=2,8532$; $P=0,0043$ для rs28930368 (C282T) и $\text{Gamma}=0,5893$; $Z=2,8967$; $P=0,0038$ для rs2071345 (C585T)). При этом у больных с комбинированным генотипом СТ+ТТ преимущественно наблюдалось развитие клинических форм с преобладанием мышечной ригидности (78% против 22%), тогда как у пациентов с гомозиготным генотипом СС чаще развивался клинический фенотип с преобладанием тремора (68% против 32%). Наблюдаемые корреляции были идентичны для обоих ОНП.

Таким образом, можно утверждать, что два полиморфизма в кодирующей области гена *POMC* ассоциированы с БП: носители редкого T-аллеля по обоим ОНП имеют достоверно более высокий риск БП, а наличие этого аллеля у пациентов коррелирует с развитием более тяжелой ригидной

формы БП. Функциональная роль указанных полиморфизмов неясна. Эти ОНП приводят к синонимическим заменам S94S (rs28930368 (C282T)) и A195A (rs2071345 (C585T)) и вряд ли могут влиять непосредственно на риск развития БП. Однако эти замены могут быть сцеплены с каким-либо другим функционально значимым вариантом, непосредственно влияющим на риск развития БП. Белок проопиомеланокортин является предшественником большого числа регуляторных пептидов, включая адренкортикотропный гормон (АКТГ) и α -меланотропин. Проведенные нами исследования показали, что пептидный препарат семакс, являющийся синтетическим аналогом АКТГ(4–10), может изменять экспрессию мРНК мозгового нейротрофического фактора (BDNF) как в первичных глиальных клетках мозга новорожденных крыс, так в нейронах гиппокампа и лобной коры. Кроме того, было установлено, что α -меланотропин может повышать экспрессию мРНК BDGF и в нейронах среднего мозга крыс [Dolotov et al., 2003]. АКТГ и α -меланотропин кодируются последовательностью экзона 3, в которой расположены ассоциированные с БП полиморфизмы. Известно, что РОМС, как нейропептид, ответственен за пролиферацию, дифференцировку и выживание нейронов. Эти данные, возможно, частично объясняют выявленную ассоциацию между полиморфизмами гена *РОМС* и БП.

Суммируя полученные нами результаты, можно предположить, что ген *РОМС* играет роль в патогенезе спорадической БП и является новым геном-кандидатом данного заболевания. Можно также предположить, что ген *РОМС* отвечает за часть фенотипической вариабельность БП в российской популяции.

Поиск новых генов-кандидатов болезни Паркинсона с использованием крыс с 6-гидроксидофаминовой моделью заболевания.

Для поиска новых генов, вовлеченных в патогенез БП, может быть использован подход, основанный на анализе транскриптома области черной субстанции в процессе развития данного заболевания на моделях грызунов (мыши и крысы). При этом возможны два варианта формирования паркинсон-

подобного фенотипа. Первый основан на использовании различных линий трансгенных животных (с нокаутом или повышенной экспрессией генов моногенных форм заболевания или введением в геном грызунов мутантных вариантов генов). Второй вариант, который был использован в данной работе, основан на токсическом повреждении дофаминергических нейронов черной субстанции при локальном или системном введении некоторых токсинов.

Для проведения работы в качестве нейротоксина был выбран 6-гидроксидофамин (6-ГДА), который обладает высоким сродством к транспортерам дофамина и норадреналина. 6-ГДА не способен проникать через ГЭБ, поэтому было использовано стереотаксическое одностороннее введение в стриатум, вызывающее продолжительную (1–3 недели) ретроградную дегенерацию в нигростриатной системе [Blandini et al., 2007; Sauer, Oertel 1994]. Согласно экспериментальным данным через две недели после введения 6-ГДА уровень дофамина снижается в черной субстанции на 30%, а в стриатуме – в области проекций аксонов на 75% [Дильмухаметова и др., 2009].

Был проведен анализ 2 опытных и 2 контрольных групп крыс (по 10 животных в каждой группе). Подробная схема эксперимента представлена на рисунке 2. Декапитация первой партии животных проводили через 2 недели после введения токсина. В это время у животных проявились только первые симптомы паркинсонизма. Вторая партия животных была декапитирована через 4 недели после введения токсина, когда у крыс, которым был введен 6-ГДА, наблюдалось развитие ярко выраженной клинической симптоматики паркинсонизма.

В результате проведенного анализа были выявлены 131 и 698 генов, достоверно изменивших экспрессию в черной субстанции через 2 и 4 недели после введения токсина соответственно. При этом для 33 генов было обнаружено изменение экспрессии в обеих временных точках.

Для дальнейшего анализа панели дифференциально экспрессирующихся генов была использована база данных DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

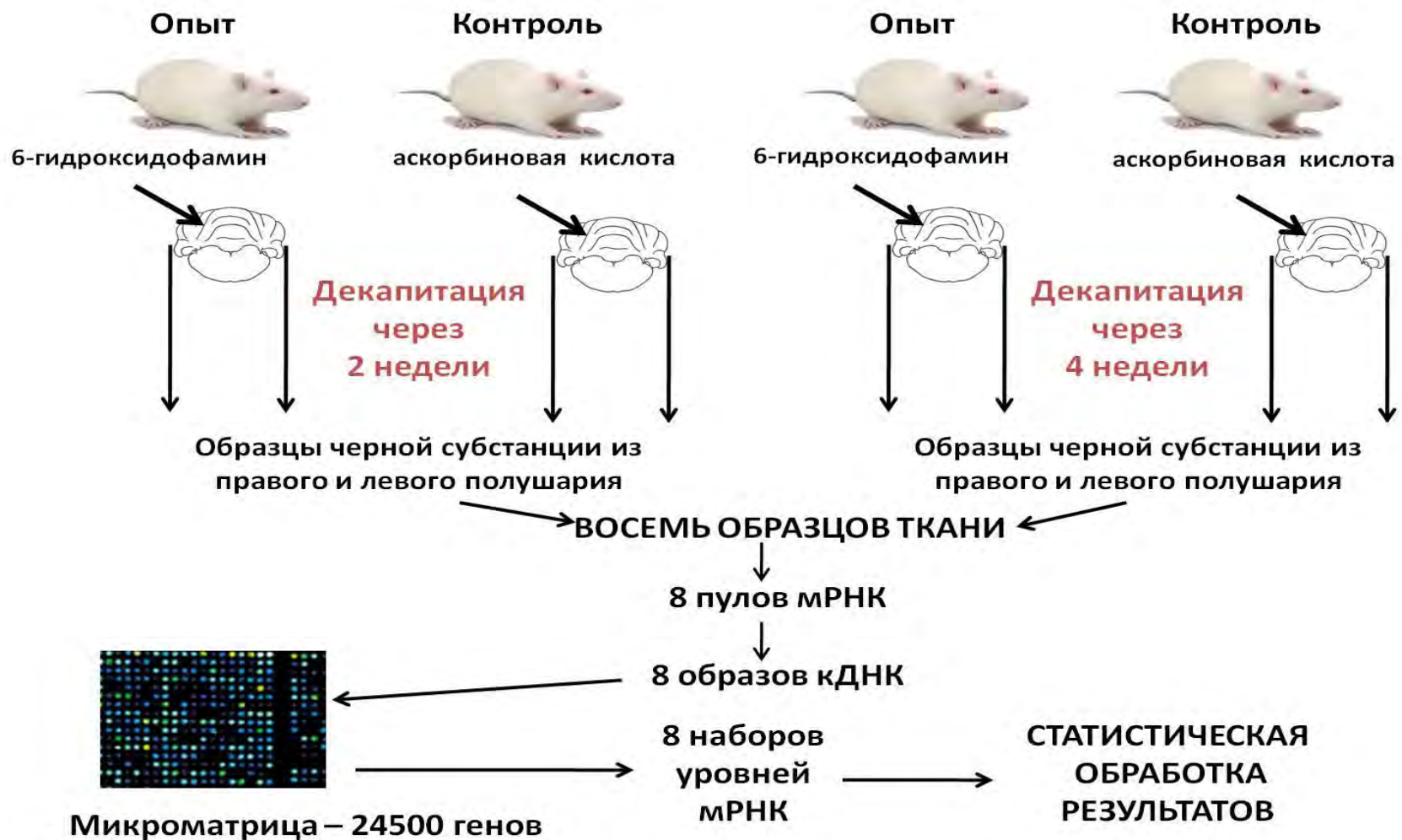
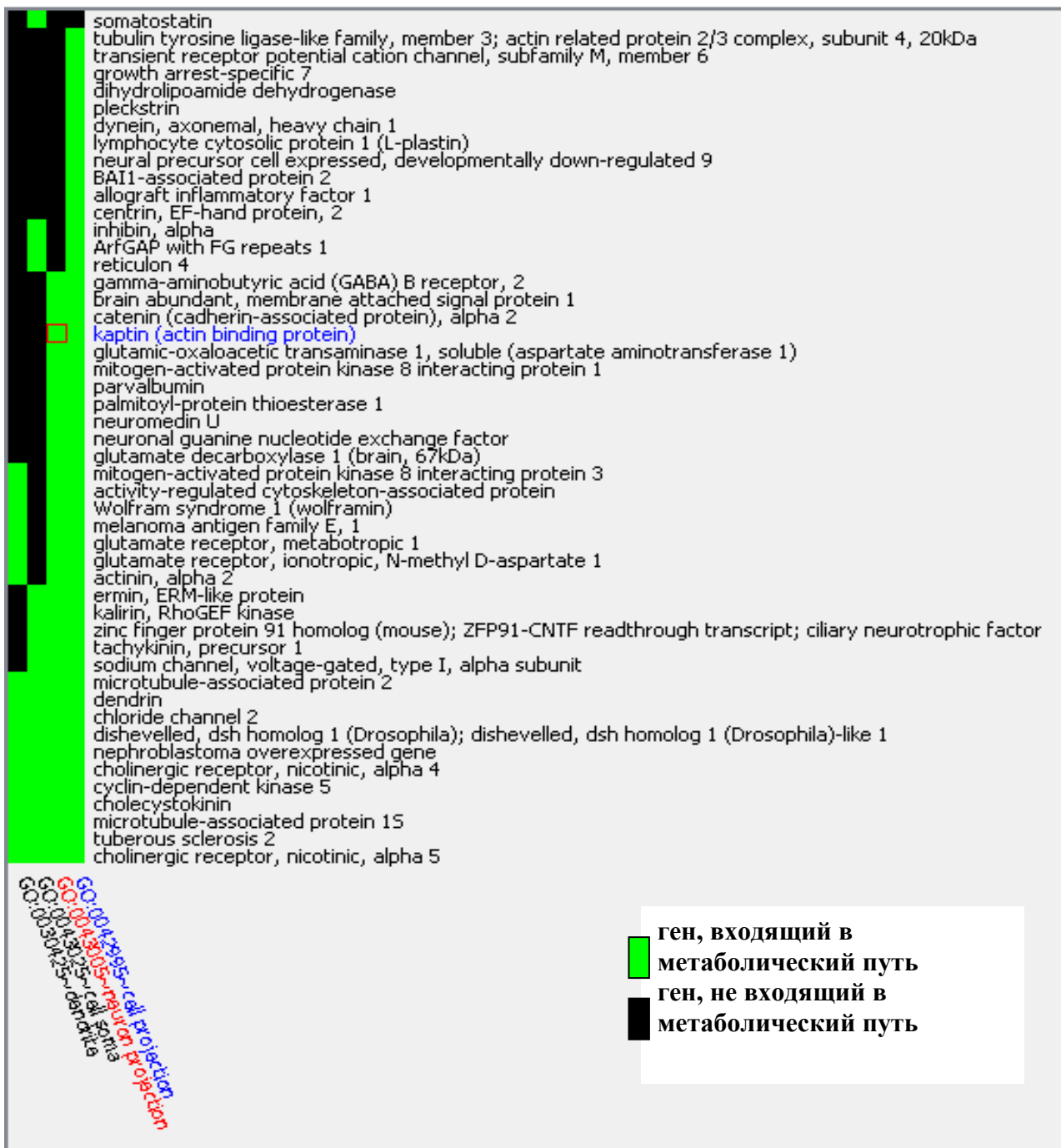


Рисунок 2. Схеме эксперимента по моделированию паркинсонизма с использованием 6-ГДА и последующего анализа изменения транскриптома в черной субстанции у крыс с паркинсон-подобным фенотипом.

Эта база данных позволяет проводить быстрое аннотирование любых интересующих исследователя генов и объединять их по функциональным группам. Такая функциональная кластеризация дает возможность выявить основные биологические процессы, изменяющиеся в ответ на те, или иные физиологические или фармакологические воздействия. При этом необходимо отметить, что при кластеризации проводили анализ всех генов, уровень экспрессии которых достоверно изменился. При этом не учитывались ни величина изменения уровня экспрессии, ни ее направление.

Для первой временной точки (2 недели) нам удалось выявить только один кластер с относительно высокой значимостью (Enrichment score – 4.51). В этот кластер вошли гены, белковые продукты которых принимают участие в модификации внеклеточного матрикса и передаче сигналов (в том числе – гены сигнальных пептидов). Таким образом, на ранних сроках (через 2 недели) в черной субстанции мозга крыс наблюдаются неспецифические эффекты, связанные с реакцией на оперативное вмешательство. Специфические эффекты на введение нейротоксина либо отсутствуют, либо выражены крайне слабо, что не позволяет их обнаружить при кластеризации. В тоже время, нельзя исключить важной роли изменения межклеточных взаимодействий и структуры межклеточного матрикса в инициации гибели дофаминергических нейронов.

Через 4 недели после введения нейротоксина ситуация кардинальным образом изменяется и наблюдается специфичный ответ, связанный с поражением нервной ткани. Это подтверждается кластерным анализом дифференциально экспрессирующихся в этот временной период генов. Было выявлено два кластера, один из которых (наиболее значимый) представлен на рисунке 3. В эти кластеры вошли гены, белковые продукты которых вовлечены в процессы нейропротекции, нормального функционирования сомы и дендритов нейронов, синаптической передачи, передачи нервного импульса.



GOTERM_CC_FAT	neuron projection	RT		34	5.6E-8	2.4E-5
GOTERM_CC_FAT	cell soma	RT		20	4.0E-6	8.6E-4
GOTERM_CC_FAT	cell projection	RT		48	4.4E-6	6.4E-4
GOTERM_CC_FAT	dendrite	RT		18	3.7E-5	4.0E-3

Рисунок 3. Функциональная кластеризация дифференциально экспрессирующихся генов в черной субстанции через 2 недели (А) и 4 недели (Б) после введения 6-ГДА.

При этом сильных неспецифических эффектов, наблюдаемых через две недели после введения 6-ГДА, на более позднем сроке обнаружено не было. Таким образом, происходит смена преимущественно неспецифической реакции нервной ткани на более специфичный ответ. Среди всех метаболических процессов и генов, выявленных нами в ходе анализа, более подробно были рассмотрены гены, имеющие отношение к нейропротекции. Именно этот метаболический получил самую высокую оценку статической достоверности при проведении кластерного анализа ($p=0,000024$). Анализ уровней экспрессии генов, вошедших в этот кластер, показал, что в основном наблюдается уменьшение относительных уровней мРНК генов, связанных с нейропротекцией, в черной субстанции мозга крыс, подвергшихся воздействию нейротоксина, по сравнению с контрольной группой животных. Наблюдаемые изменения, с одной стороны, могут быть следствием массовой гибели нейронов в изучаемой области мозга на четвертой неделе после введения 6-ГДА. С другой стороны, уменьшение экспрессии этих генов может приводить к развитию процессов деградации нейронов. Для ряда генов было выявлено увеличение относительных уровней их мРНК в черной субстанции мозга крыс, подвергшихся воздействию нейротоксина, по сравнению с контрольной группой животных. К таким генам относятся: ген нейромедина (*NMU*), ген каптенина альфа 2 (*CTNNA2*), ген эрмина (*ERMN*), ген глутамат декарбоксилазы 1 (*GADI*), ген метаботропного рецептора глутамата 1 (*GRM1*), аспартат аминотрансфераза 1 (*GOT1*), ген антигена меланомы семейства E (*MAGEE1*), ген тиоэстеразы 1 пальмитоилированных белков (*PPT1*) и ген парвальбумина (*PVALB*). Активация экспрессии этих генов может быть связана с защитной реакцией нейронов на действие токсина и процессы нейродегенерации. По имеющимся на сегодняшний день данным, большинство из этих генов не связаны с процессами, которые могут приводить к деградации дофаминергических нейронов. Например, наибольшее увеличение экспрессии, почти в 3 раза было обнаружено для гена нейромедина (*NMU*), который

является нейропептидом. Однако точная функция этого белка до сих пор не известна. Установлено, что он может играть важную роль в энергетическом обмене, будучи вовлечен в процессы регуляции аппетита. Так же имеются сведения об участии данного гена в патогенезе некоторых видов рака, таких как рак легкого, рак мочевого пузыря, миелолейкоза [Mitchell et al., 2009]. В тоже время нельзя исключить его участия и в патогенезе БП, так многие функции данного белка пока неизвестны, а нам удалось показать значительное увеличение уровня его мРНК в черной субстанции у крыс с паркинсон-подобным фенотипом.

Только для трех генов (*PPT1*, *GRM*, *PVALB*), увеличивших свою экспрессию, можно предположить связь с процессами, приводящими к нейродегенерации при БП. Так, ген *PPT1* кодирует тиюэстеразу 1 пальмитоилированных белков, которая принимает непосредственное участие лизосомальной деградации белков [Ohno et al., 2010]. В настоящее время показано, что нарушение процессов лизосомальной деградации белков может быть вовлечено в патогенез БП.

Ген *GRM1* кодирует рецептор глутамата, который является одним из участников глутаматэргической системы. Нарушение нормального функционирования этой системы приводит к развитию эксайтотоксичности. При этом происходит нарушение гомеостаза кальция [Захарова М.Н., 2001]. Ген *PVALB* кодирует парвальбумин, имеющий высокое сродство с кальций связывающими белками, такими как кальмодулин. Это сходство предполагает, его важную роль в гомеостазе кальция. Нарушение гомеостаза кальция и его накопление в клетке может привести развитию оксидантного стресса и митохондриальной дисфункции, являющихся основными процессами, приводящими к гибели дофаминергических нейронов. К тому же, при проведении иммуногистохимического анализа черной субстанции из аутопсийного материала от больных БП было показано увеличение количества парвальбумина в дофаминергических нейронах [Soos et al., 2004]. В нашей

работе мы также обнаружили достаточно значительное увеличение, в 2,57 раза, уровня мРНК гена *PVALB* в черной субстанции мозга крыс, которым вводили нейротоксин.

Среди генов, уменьшивших свою экспрессию в черной субстанции крыс с нейротоксином и принимающих участие в нейропротекции, необходимо выделить ген вольфрамина (*WFS1*). При проведении ассоциативных исследований с использованием ДНК-чиповых технологий нами было показано, что ОНП rs1801211 (C1645T) в этом гене ассоциирован с риском развития БП в российской популяции. Белковый продукт гена, вольфрамин, является мембранным гликопротеином эндоплазматического ретикулума и предположительно участвует в формировании синаптических везикул [Takeda et al., 2001], что предполагает его важную роль в функционировании синапсов, а, следовательно, и в жизнедеятельности нейронов.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что ген *WFS1* вовлечен в патогенез БП, и его можно считать новым геном-кандидатом для данного заболевания. Кроме того, по крайней мере, еще четыре гена – *PVALB*, *GRM1*, *PPT1* и *NMU* можно отнести к группе вероятных генов-кандидатов БП. Однако, для выяснения точной роли перечисленных выше генов в патогенезе БП необходимо проведение дальнейших исследований направленных, как на изучение экспрессии этих генов, в первую очередь в периферической крови больных БП, так и на поиск расположенных в них полиморфных маркеров, влияющих на риск развития БП.

В целом же, проведенный анализ транскриптома у крыс с 6-ГДА моделью БП показал, что при таком способе моделирования большинство генов дают неспецифический ответ, связанный в первую очередь с введением токсина непосредственно в область мозга. Вероятно, для изучения изменения экспрессии генов данная модель не является полностью адекватной. Возможно, изучение в дальнейшем других нейротоксических моделей и, в первую очередь, МФТП-моделей, воспроизводящих стадии досимптомной и ранней симптомной

стадий БП, позволит выявить гены и процессы, вовлеченные в патогенез патогнеза БП на ранних стадиях, а так же изучить компенсаторные механизмы, обеспечивающие длительную бессимптомную стадию заболевания.

Выявление вклада изменения экспрессии генов *SLC6A3*, *GSK3B*, *MAPT*, *PARK2*, *SNCA*, *ST13* в патогенез болезни Паркинсона в российской популяции.

Изучение изменения экспрессии генов при БП у человека проводится, главным образом, на аутопсийном материале. Однако полученные при этом данные об изменении экспрессии генов отражают самые поздние стадии БП. В настоящее время не менее актуален анализ изменения экспрессии генов у пациентов с БП *in vivo* в более доступных тканях организма, например, спинномозговой жидкости и крови.

Клетки крови, в частности лимфоциты, содержат отдельные характеристики, свойственные дофаминергическим нейронам: в них содержатся оба фермента синтеза дофамина, мембранный переносчик дофамина и экспрессируется ряд рецепторов дофамина [Barbanti et al., 1999; Buttarelli et al., 2008, Nagai et al., 1996]. Это позволяет предположить, что изменения, обнаруженные в периферической крови больных БП, могут отражать те процессы, которые протекают в дофаминергических нейронах черной субстанции.

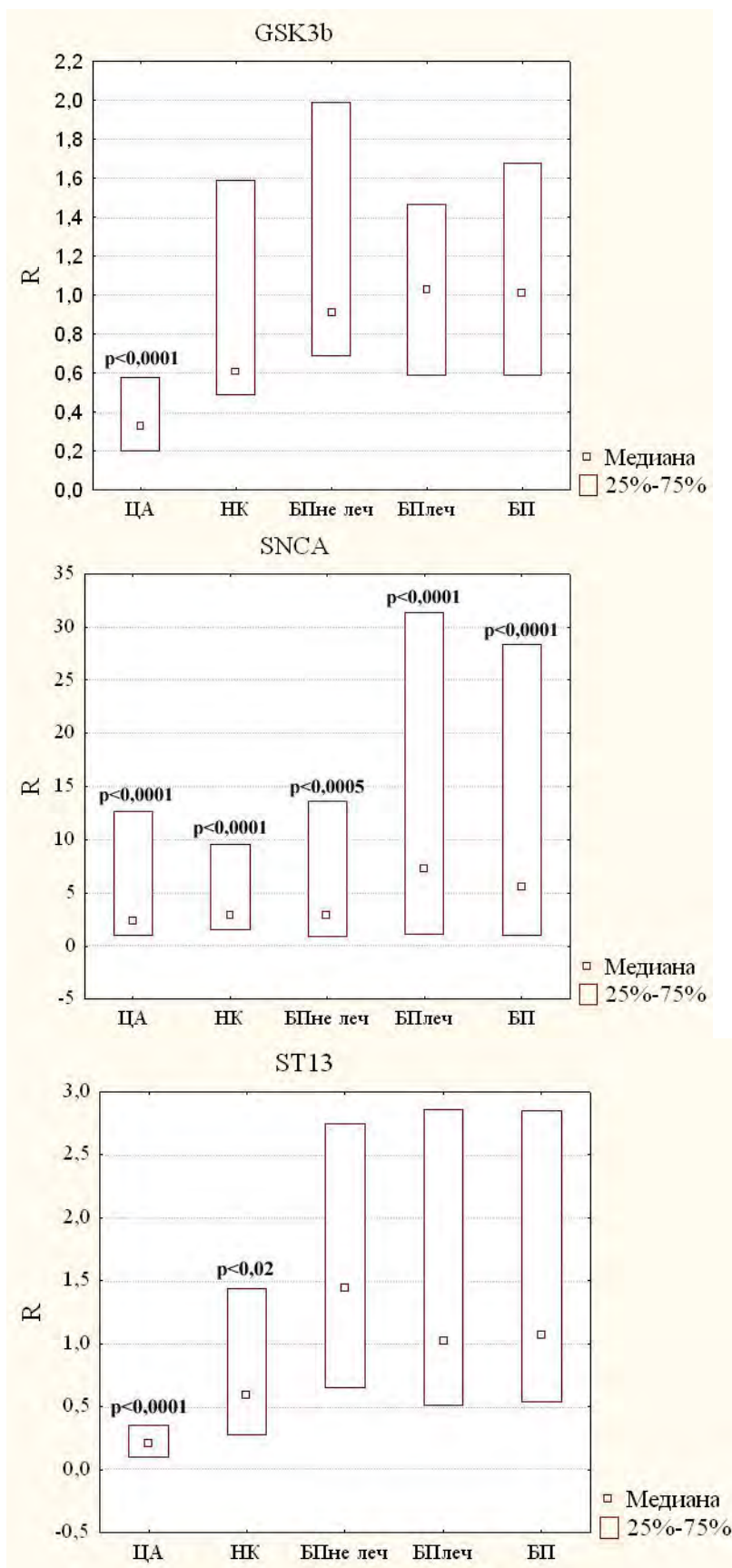
Нами был проведён анализ относительной экспрессии генов-кандидатов *GSK3B*, *SLC6A3*, *MAPT*, *PARK2*, *SNCA*, *ST13* в периферической крови в двух группах пациентов с БП на ранних стадиях, получавших лечение и не получавших его, и в трёх группах сравнения (пациенты с церебральным атеросклерозом, с различными неврологическими заболеваниями и контрольная группа здоровых добровольцев). Подбор групп сравнения осуществлялся таким образом, чтобы патогенез заболевания у пациентов из группы сравнения принципиально отличался от такового при БП, но затрагивал в основном ЦНС.

Нам не удалось выявить стабильной и выраженной экспрессии генов *SLC6A3*, *MAPT*, *PARK2*. В некоторых образцах мы наблюдали экспрессию этих генов, хотя пороговые циклы амплификации были больше 35, что свидетельствует об очень малом количестве кДНК и, соответственно, РНК в образце.

Ген *GSK3B* может быть вовлечён в патогенез БП и, следовательно, отражать ход её развития. Поэтому мы провели анализ изменения экспрессии гена *GSK3B* в периферической крови. Результаты исследования относительной экспрессии этого гена представлены на рисунке 4.

Из представленных данных видно, что во всех группах пациентов с БП в крови практически не наблюдается изменения количества транскриптов гена *GSK3B* по сравнению с группой здоровых добровольцев. В то же время в крови пациентов с ЦА было выявлено статистически значимое снижение относительной экспрессии гена *GSK3B* в три раза (0,33, $p < 0,001$). Ранее Armentero с соавторами показали увеличение количества белка GSK3b в лимфоцитах периферической крови у пациентов с БП [Armentero et al., 2010]. Мы не обнаружили никаких изменений в уровне экспрессии гена *GSK3B* у наших пациентов с БП. Это может быть объяснено тем, что мы исследовали пациентов, находящихся на более ранних стадиях заболевания. Большинство наших пациентов с БП находилось на 1-ой и 2-ой стадиях заболевания по шкале Хен и Яра. Изменения количества белка GSK3b, наблюдаемые Armentero с соавторами, могут появляться на более поздних стадиях (2,42 стадия по Хен и Яру) [Armentero et al., 2010]. Кроме того, изменения уровней экспрессии гена *GSK3B* могут носить неспецифический характер, так как мы обнаружили снижение экспрессии гена *GSK3B* у пациентов с церебральным атеросклерозом. Эти изменения можно объяснить повреждением и гибелью нейронов вследствие нарушения кровообращения в головном мозге.

Сейчас уже не вызывает сомнения тот факт, что альфа-синуклеин вовлечён в патогенез БП. В связи с этим, было интересно изучить экспрессию



ЦА – пациенты с церебральным атеросклерозом;
 НК – пациенты с различными неврологическими заболеваниями (неврологический контроль)
 БП(не леч) – пациенты с БП, не получавшие лечения;
 БП(леч) – пациенты с БП, получавшие лечение;
 БП – все пациенты с БП;
 R – относительный уровень экспрессии исследуемого гена. За единицу принят уровень экспрессии исследуемого гена в группе неврологически здоровых добровольцев.

Рисунок 4. Относительные уровни экспрессии гена *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* у пациентов с БП, НК и ЦА по сравнению с контрольной группой.

гена *SNCA* на ранних стадиях заболевания. Результаты исследования относительной экспрессии гена *SNCA* представлены на рисунке 4.

Из представленных данных видно, что в крови всех пациентов с БП наблюдается статистически значимое увеличение количества транскриптов гена *SNCA* почти в три и более раз (для объединённой группы пациентов с БП медиана составила 5,57, для групп пациентов с БП, не подвергавшихся и подвергавшихся лечению, медианы составили 2,85 и 7,32 ($p < 0,0005$), соответственно, по сравнению с группой здоровых добровольцев). В то же время в крови пациентов с ЦА и НК также было выявлено статистически значимое увеличение относительной экспрессии гена *SNCA* по сравнению с контрольной группой (рисунок 4). Следовательно, наблюдаемое увеличение экспрессии гена *SNCA* в крови пациентов с БП не являются специфичными для БП.

Ген *ST13* и, следовательно, белок ST13 также может играть роль в патогенезе БП, так как было показано его косвенное участие в сборке альфа-синуклеина [Scherzer et al. ,2007]. Более того, в той же работе авторы показали уменьшение экспрессии гена *ST13* в периферической крови пациентов с БП. В связи с этим, мы также исследовали изменения экспрессии гена *ST13* в периферической крови в двух группах пациентов с БП на ранних стадиях, получавших лечение и не получавших его, и в трёх группах сравнения. Результаты исследования относительной экспрессии гена *ST13* представлены на рисунке 4. Из представленных данных видно, что в крови пациентов с БП как получавших, так и не получавших лечение, не наблюдается статистически значимых изменений количества транскриптов гена *ST13*. В то же время в крови пациентов с ЦА и с различными неврологическими заболеваниями было выявлено статистически значимое уменьшение уровня мРНК гена *ST13* (в 2,63 раза и почти в 2 раза соответственно). В отличие от предыдущих исследователей мы не обнаружили значимых изменений в экспрессии гена *ST13* у наших пациентов с БП. Это можно объяснить тем фактом, что мы

исследовали кровь пациентов, находящихся на более ранних стадиях заболевания. У всех наших пациентов была 1-ая или 2-ая стадия БП по шкале Хен и Яра. Изменения же в экспрессии этого гена, наблюдаемые Scherzer et al., вероятно возникают на более поздних стадиях заболевания: 2,3 по шкале Хен и Яра [Scherzer et al., 2007]. К тому же, изменения количества транскриптов гена *ST13* могут быть неспецифичными, так как мы обнаружили статистически значимое снижение экспрессии данного гена в группах пациентов с церебральным атеросклерозом и различными неврологическими заболеваниями. Эти изменения можно объяснить повреждением и смертью нейронов вследствие нарушения микроциркуляции.

Был проведен также совместный анализ относительных уровней экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13*, который позволил выявить разные паттерны уровней их мРНК у пациентов с БП и в группах сравнения, что отражено в таблице 4.

Таблица 4. Направления изменения экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA* и *ST13* у пациентов с БП и в группах сравнения.

ЗАБОЛЕВАНИЕ	ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА		
	<i>GSK3B</i>	<i>SNCA</i>	<i>ST13</i>
Болезнь Паркинсона	—	↑↑	—
Церебральный атеросклероз	↓↓	↑	↓↓
Неврологические заболевания	~↓	↑	↓

↑ увеличение количества мРНК по сравнению с уровнем мРНК у здоровых добровольцев.
 ↓ уменьшение количества мРНК по сравнению с уровнем мРНК у здоровых добровольцев.
 — отсутствие изменения количества мРНК по сравнению с уровнем мРНК у здоровых добровольцев.

Таким образом, наблюдается разная картина изменения экспрессии изученных генов при различных неврологических заболеваниях в периферической крови. Можно предположить, что изменения, наблюдаемые в крови больных БП, могут в какой-то степени отражать те специфические процессы, которые протекают в дофаминергических нейронах. Однако для получения более полной и точной информации о процессах, протекающих на ранних стадиях БП необходим анализ относительных уровней экспрессии большого числа генов. Кроме того, полученные нами данные указывают на то, что изменения экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* по отдельности не могут

служить биомаркерами для ранних стадий БП. С другой стороны, эти данные позволяют предположить, что совместный анализ количества транскриптов генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13*, а также других генов, вовлечённых в патогенез БП, в дальнейшем послужит основой для создания панели маркеров для диагностики этого заболевания.

Заключение.

Как уже не раз говорилось, БП сложное многофакторное заболевание, затрагивающее разные отделы нервной системы. БП имеет богатую клиническую картину. Установлено, что нейродегенеративные изменения при БП связаны с избирательной гибелью различных типов нейронов. Это указывает на то, что в патогенез заболевания вовлечено большое число различных процессов, обеспечивающих нормальное функционирование нервных клеток. Однако, несмотря на многолетние и интенсивные исследования, причины развития заболевания остаются до конца не выясненными. В то же время получен ряд данных, указывающих на то, что в патогенезе БП могут играть важную роль генетические факторы. Об этом в первую очередь говорит наличие семейных форм заболевания и выявление семи генов (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, *DJI*, *UCHL1*, *ATP13A2*), мутации в которых приводят к их развитию. Однако в большинстве случаев (85%-90%) БП носит спорадический характер и обусловлено взаимодействием между генетической конституцией организма и факторами окружающей среды. В связи с этим в данной работе было проведено молекулярно-генетическое исследование патогенеза БП на примере изучения различных групп больных БП из России и 6-ГДА модели паркинсонизма. При этом использовалась стратегия из трех направлений: анализ мутаций в генах моногенных форм БП у спорадических больных, поиск новых генов-кандидатов заболевания и анализ изменения транскриптома на разных стадиях БП.

Генетический анализ различных групп больных БП показал, что определенные мутации в генах моногенных форм БП, а именно делеции и

дубликации экзонов гена *PARK2*, могут вносить существенный вклад в патогенез спорадической формы БП. Было показано, что у людей, имеющих делеции и дубликации, риск развития заболевания повышен в 8,53 раза ($p=0,0095$) и установлено, ген *PARK2* отвечает за часть фенотипической variability БП в российской популяции. Показано, что наличие делеций и/или дубликаций экзонов в гене *PARK2* способствует существенному снижению возраста начала БП (на 9 лет), развитию дистонии и симметричному протеканию заболевания.

Были также впервые обнаружены ассоциации между полиморфными вариантами генов *POMC* (rs28930368 и rs2071345), *WFS1* (rs1801211), *SNCA* (rs2736990) и риском развития спорадической формы болезни Паркинсона для российской популяции.

Выявленные нами мутации и однонуклеотидные полиморфизмы в генах *PARK2*, *SNCA*, *POMC* и *WFS1* в дальнейшем могут быть включены в панель маркеров для определения индивидуального риска развития БП. Выявление таких лиц из группы риска на досимптоматической стадии поможет вовремя принять профилактические меры, что – если не предотвратит развитие БП – то отодвинет появление клинических признаков на более поздний срок и значительно снизит тяжесть протекания заболевания.

Кроме того, выявление таких новых генов кандидатов БП, как ген *POMC* и ген *WFS1* указывает на то, что важную роль в дегенерации дофаминергических нейронов, помимо митохондриальной дисфункции и убиквитин-зависимого протеолиза, может играть нарушение процессов передачи нервного импульса. Можно предположить, что развитие клинических признаков заболевания может быть связано не только с гибелью нейронов, но и с нарушением их нормального взаимодействия.

Анализ изменения транскриптома в черной субстанции мозга крыс в процессе развития паркинсон-подобного фенотипа под воздействие 6-ГДА позволил выявить еще четыре новых гена - *PVALB*, *GRM1*, *PPT1* и *NMU*,

которые можно отнести к группе вероятных генов кандидатов БП. С другой стороны, изучение транскриптома у крыс с 6-ГДА моделью БП показал, что при таком способе моделирования большинство генов дают неспецифический ответ, связанный в первую очередь с введением токсина непосредственно в область мозга. Вероятно, для изучения изменения экспрессии генов данная модель не является полностью адекватной.

Проведение работ по анализу изменения транскриптома в периферической крови больных БП, позволило выявить характерный для ранней стадии заболевания паттерн экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13*, что, по-видимому, указывает на наличие специфического системного ответа организма на ранних стадиях патологического процесса при болезни Паркинсона.

В целом же, полученные нами данные расширяют наши представления о механизмах патогенеза БП. На данный момент мы с уверенностью можем утверждать, что изменения первичной структуры ДНК играют главную роль не только в патогенезе семейной формы заболевания, но и вносят существенный вклад в развитие спорадической формы БП. С другой стороны, показано, что важную роль в патогенезе заболевания может играть изменение экспрессии генов. Все это позволяет предложить следующую стратегию анализа БП, которая будет заключаться в сочетании геномного и транскриптомного анализа различных форм и стадий БП. При этом эти исследования будут включать в себя как анализ уже известных нам генов, так и поиск новых генов, вовлеченных в патогенез заболевания.

Выводы.

1. Разработан основанный на ПЦР в реальном времени метод анализа дозы отдельных экзонов гена *PARK2* и гена *SNCA*, позволяющий проводить диагностику мутаций с изменением копийности при семейной и спорадической формах болезни Паркинсона.
2. Показано, что делеции и дупликации экзонов гена *PARK2* играют важную роль в патогенезе болезни Паркинсона. Риск развития болезни Паркинсона у

лиц с мутациями с изменением копийности в гене *PARK2* повышен в 8,53 раза (95% ДИ=1,14-63,52; $p=0,0095$). Выявлены корреляции между наличием мутаций с изменением копийности в гене *PARK2*, возрастом начала заболевания, наличием дистонии и симметричным течением заболевания.

3. Показано, что дупликации и трипликации гена *SNCA* не являются значимыми в патогенезе болезни Паркинсона у больных из России.

4. Впервые обнаружено, что ген *POMC* вовлечен в патогенез болезни Паркинсона. Показано, что наличие аллеля Т по полиморфизмам rs28930368 и rs2071345 гена *POMC* повышает риск развития заболевания в 5,01 раза (95%ДИ=1,05-23,83; $p=0,03$) и приводит к развитию клинического фенотипа с преобладанием мышечной ригидности.

5. Впервые показано, что ген *WFS1* вовлечен в патогенез болезни Паркинсона. Обнаружено, что наличие аллеля Т по полиморфизму rs1801211 гена *WFS1* повышает риск развития заболевания в 2,34 раза (95%ДИ=1,29-4,24; $p=0,005$). Показано снижение уровня мРНК гена *WFS1* в 1,64 раза ($p<0,05$) в черной субстанции крыс с паркинсон-подобным фенотипом, вызванным 6-гидроксидофамином.

6. Показано, что известные точковые мутации в генах моногенных форм болезни Паркинсона вносят небольшой вклад в патогенез спорадической формы заболевания в России. В гене *PARK2* выявлено три мутации (M1L, A82G и C253Y) в гетерозиготном состоянии у трёх различных пациентов. Мутация G2019S в гене *LRRK2* обнаружена у трех больных, и ее частота составляет 0,8% при спорадической форме заболевания.

7. Впервые для российской популяции выявлена ассоциация полиморфизма rs2736990 (C/T) в гене *SNCA* с риском развития спорадической формы болезни Паркинсона. Показано, что наличие аллеля С по данному полиморфизму повышает риск развития заболевания в 1,75 (95%ДИ=1,19-2,58; $p=0,004$).

8. Впервые показано, что изменение экспрессии генов *GSK3B*, *SNCA*, *ST13* в периферической крови больных на ранних стадиях развития болезни Паркинсона по отдельности является не специфичным. Однако совместный анализ относительных уровней экспрессии данных генов выявил разные

паттерны уровней их мРНК в периферической крови при болезни Паркинсона и других неврологических заболеваниях, что говорит о специфическом системном ответе организма на ранних стадия патологического процесса при болезни Паркинсона.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи

1. **Shadrina M.I.**, Slominsky P.A., Limborska S.A. Molecular mechanisms of pathogenesis of Parkinson's disease // *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* –2010. –V. 281. – P. 229-66.
2. **Shadrina MI**, Filatova E.V., Karabanov A.V., Slominsky P.A., Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Limborska S.A. Expression analysis of suppression of tumorigenicity 13 gene in patients with Parkinson's disease // *Neurosci. Lett.* –2010. –V. 473. –N. 3. –P. 257-259.
3. **Shadrina M.I.**, Semenova E.V., Slominsky P.A., Bagyeva G.H., Illarioshkin S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Limborska S.A. Effective quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1–12 dosage // *BMC Med. Genet.* –2007. –V. 8. –P. 6 (1–7).
4. **Shadrina M.**, Nikopensus T., Slominsky P., Illarioshkin S., Bagyeva G., Markova E., Ivanova-Smolenskaya I., Kurg A., Limborska S., Metspalu A. Association study of sporadic Parkinson's disease genetic risk factors in patients from Russia by APEX technology // *Neurosci. Lett.* –2006. –V. 405. –P. 212–216.
5. **Shadrina M.I.**, Dolotov O.V., Grivennikov I., Slominsky P.A., Andreeva L.A., Inosemtseva L.S., Limborska S.A., Myasoedov N.F. Rapid induction of neurotrophin mRNAs in rat glial cell cultures by Semax, an adrenocorticotrophic hormone analog // *Neuroscie. Lett.* –2001. –V. 308. –P. 115-118.

6. **Shadrina M.**, Kolomin T., Agapova T., Agniullin Y., Shram S, Slominsky P., Lymborska S., Myasoedov N. Comparison of the Temporary Dynamics of NGF and BDNF Gene Expression in Rat Hippocampus, Frontal Cortex, and Retina Under Semax Action // J. Mol. Neurosci. –2010. –V. 41. –P. 30-35.
7. Semenova E.V., **Shadrina M.I.**, Slominsky P.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Bagyeva G.H., Limborska S.A., Illarioshkin S.N. Anaysis of *PARK2* gene exon rearrangements in Russian patients with sporadic Parkinson’s disease // Mov. Disord. –2011.
8. Illarioshkin S.N., **Shadrina M.I.**, Slominsky P.A., Beshpalova E.V., Zagorovskaya T.B., Bagyeva G.Kh., Markova E.D., Limborska S.A., Ivanova-Smolenskaya I.A. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson’s disease in Russia // Eur. J. Neurol. –2007. –V. 14. –P. 413–417.
9. **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А. Молекулярная генетика болезни Паркинсона // Генетика. –2006. –Т. 42. –№ 8. –С. 1045-1059.
10. **Шадрина М.И.**, Семенова Е.В., Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Багыева Г.Х., Маркова Е.Д., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Метод определения делеций и дупликаций в гене паркина с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени // Мед. Генетика. –2006. –№. 2(Приложение). –С. 52–54.
11. **Шадрина М.И.**, Иллариошкин С.Н., Багыева Г.Х., Беспалова Е.В., Загоровская Т.Б., Сломинский П.А., Маркова Е.Д., Ключников С.А., Лимборская С.А., Иванова-Смоленская И.А. PARK8-форма болезни Паркинсона: мутационный анализ гена LRRK2 в российской популяции // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова. –2007. –№. 3. –С. 46–50.
12. **Шадрина М.И.**, Багыева Г.Х., Иллариошкин С.Н., Семенова Е.Л., Сломинский П.А., Загоровская Т.Б., Маркова Е.Д., Федорова Н.В., Проскокова Т.Н., Лимборская С.А., Иванова-Смоленская И.А. Структурные перестройки в гене паркина (*PARK2*) у больных с

- паркинсонизмом молодого возраста // Мед. Генетика. –2006. –№. 12. –С. 22–26.
13. **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А. Значение митохондриальной дисфункции и окислительных повреждений в молекулярной патологии болезни Паркинсона // Молекулярная биология. –2008. –Т. 42. –№ 5. –С. 809-819.
14. Багыева Г.Х., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., **Шадрина М.И.**, Загоровская Т.Б., Маркова Е.Д., Лимборская С.А., Иванова-Смоленская И.А. Сочетание мутаций в локусах PARK2 и PARK8 у пациентки с ранней формой болезни Паркинсона // Неврол. журн. –2007. –№ 2. –С. 15–18.
15. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., **Шадрина М.И.**, Ключников С.А., Загоровская Т.Б., Миклина Н.И., Сломинский П.А., Лимборская С.А. Молекулярно-генетический анализ наследственных нейродегенеративных заболеваний // Генетика. –2004. –Т. 40. –№ 6. –С. 816-826.
16. Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., **Шадрина М.И.**, Багыева Г.Х., Загоровская Т.Б., Маркова Е.Д., Карабанов А.В., Полещук В.В., Полевая Е.В., Федорова Н.В., Лимборская С.А., Иванова-Смоленская И.А. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы // Анн. клин. эксперим. неврол. –2007. –№ 1. –С. 23–31.
17. Семенова Е.В., **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Багыева Г.Х., Карабанов А.В., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Анализ дозы гена α -синуклеина при аутосомно-доминантной форме болезни Паркинсона // Генетика. –2009. –Т. 45. –№ 4. –С.1-3
18. Федотова Е.Ю., Чечеткин А.О., **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А., Иванова-Смоленская И.А., Иллариошкин С.Н. Транскраниальная

сонография при болезни Паркинсона // Журн. неврол. и психиатрии им. С.С.Корсакова. –2011. –№ 1. –С.49–55.

- 19.Филатова Е.В., **Шадрина М.И.**, Федотова Е.Ю., Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Анализ однонуклеотидного полиморфизма rs415430 в гене *WNT3* в российской популяции при болезни Паркинсона // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. –2011. –№ 2. –С. 3-4.
- 20.Филатова Е.В., **Шадрина М.И.**, Карabanов А.В., Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Экспрессия гена *GSK3B* в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона // Молекулярная биология. –2011. –Т. 45. –№ 3. –С. 461-465.

Главы из книг

- 21.Сломинский П.А., **Шадрина М.И.**, Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Генетические факторы в патогенезе семейной и спорадической формы болезни Паркинсона: Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты/ Отв.ред. Угрюмов М.В. –М., Наука, 2010. с. 137-153.
- 22.Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Иванова-Смоленская И.А., Багыева Г.Х., Загоровская Т.Б., Полевая Е.В., **Шадрина М.И.**, Федорова Н.В., Лимборская С.А. Генетическая гетерогенность первичного паркинсонизма. В кн.: Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей (под ред. С.Н.Иллариошкина, Н.Н. Яхно). М., 2008: 60–64.

Патенты

23. **Шадрина М.И.**, Семенова Е.В., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Лимборская С.А. «Ген *PARK2* и способ диагностики его мутаций», решение о выдаче патента №2010122010/10(031225) от 01.04.2011.

Тезисы устных докладов

24. **Shadrina M.I.**, Slominsky P.A., Illarioshkin S.N., Khusnutdinova E.K., Zherbtsova A.L., Ivanova-Smolenskaya I.A., Limborska S.A. Mutation spectrum of Park2 gene in Parkinson's disease patients from Russia. XV International Congress of Neuropathology (15-18 September 2003, Turin, Italy), Brain Pathology, 2003, P. S33.
25. **Shadrina M.**, Semenova E., Bagyeva G., Partola M., Illarioshkin S., Nikopensius T., Metspalu A., Limborska S. Genetic markers analysis of sporadic Parkinson's disease from Russia // IX International Symposium on Mutations in the Genome (23-27 September 2007, Xiamen, China), abstract book, P. 33.
26. Сломинский П.А., **Шадрина М.И.**, Иллариошкин С.Н. Молекулярная патология болезни Паркинсона. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (11-15 мая 2008 г., Новосибирск, Россия), тезисы докладов, С. 249.
27. **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А. Клинико-генетические и экспериментальные исследования молекулярных механизмов болезни Паркинсона. VII Международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток» (22-25 октября 2009г., Звенигород, Россия), Программа и тезисы, С.54
28. **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Лимборская С.А. Болезнь Паркинсона: анализ и поиск генетических факторов. Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков (14-18 мая 2010г., Ростов-на-Дону, Россия), Медицинская генетика, 2010, С. 194.
29. **Шадрина М.И.**, Сломинский П.А., Лимборская С.А. Геномные маркеры болезни Паркинсона. XXI съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (19-25 сентября 2010 г., Калуга, Россия), тезисы докладов, С.738-739.

30. **Шадрина М.И.**, Семенова Е.В., Филатова Е.В., Карабанов А.В., Иллариошкин С.Н. Сломинский П.А. Генетические факторы риска развития спорадической формы болезни Паркинсона. II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (17-19 мая 2011 г., Курск, Россия), сборник материалов конференции, С.116/
31. **Шадрина М.И.**, Филатова Е.В., Алиева А.Х., Карабанов А.В., Иллариошкин С.Н. Анализ транскриптома при болезни Паркинсона. Седьмой Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (3-13 июня 2011 г., Судак, Крым, Украина), тезисы докладов, Р.457

Тезисы стендовых сообщений

32. Semenova E., **Shadrina M.**, Bagyeva G., Moskovskaya S., Slominsky P., Illarioshkin S., Limborska S. Analysis of exon deletions and duplications in PARK2 gene by TaqMan Real-time PCR method in patients with early-onset Parkinson disease from Russia. The European Human Genetics Conference (6-9 May 2006, Amsterdam, Holland), European Journal of Human Genetics, 2006, V. 14, P. 269.
33. Semenova E., **Shadrina M.**, Bagyeva G., Farkhiulina M., Slominsky P., Illarioshkin S., Limborska S. Analysis of the parkin gene (PARK2) exon 1-12 dosage in patients with sporadic Parkinson's disease from Russia. The European Human Genetics Conference, (16-19 June 2007, Nice, France), European Journal of Human Genetics, 2007, V. 15, P. 219.
34. Semenova E., **Shadrina M.**, Slominsky P., Illarioshkin S., Bagyeva G., Karabanov A., Ivanova-Smolenskaia I., Limborska S. Analysis of the α -synuclein gene dosage in autosomal dominant Parkinson's disease. The European Human Genetics Conference (23-26 May 2009, Viena, Austria), European Journal of Human Genetics, 2009, V. 17, P. 393.

35. Filatova E.V., **Shadrina M.I.**, Karabanov A.V., Slominsky P.A., Illarioshkin S.N., Limborska S.A. Analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms effects on risk of development of Parkinson's disease in Russia. The Second World Parkinson Congress (28 September – 1 October 2010, Glasgow, UK), *Movement Disorders*, 25(3), 2010, P. S616.
36. Филатова Е.В., **Шадрина М.И.**, Карабанов А.В., Сломинский П.А., Иллариошкин С.Н., Лимборская С.А. «Анализ изменения экспрессии кандидатных генов в крови пациентов с болезнью Паркинсона». Материалы VI Съезда Российского общества медицинских генетиков (14-18 мая 2010г., Ростов-на-Дону, Россия), *Медицинская генетика*, 2010, стр. 194.