

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНЫЙ ЦЕНТР НЕВРОЛОГИИ»**

На правах рукописи

АРДАШИРОВА НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

РНК-БИОМАРКЕРЫ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

3.1.24 – Неврология

1.5.7 – Генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Е.Ю. Федотова

академик РАН

доктор медицинских наук, профессор

С.Н. Иллариошкин

Москва – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Этиология болезни Паркинсона.....	12
1.2 Патоморфологические изменения при болезни Паркинсона.....	13
1.3 Стадирование патологического процесса по Брааку.....	14
1.4 Основные патогенетические механизмы при болезни Паркинсона.....	15
1.5 Клиническая картина болезни Паркинсона.....	20
1.6 Диагностика болезни Паркинсона.....	22
1.7 Биомаркеры болезни Паркинсона.....	24
1.8 Биомаркеры болезни Паркинсона в крови.....	25
1.9 РНК-маркеры болезни Паркинсона.....	26
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1 Пациенты, включенные в исследование.....	35
2.2. Молекулярно-генетические исследования.....	38
2.3. Статистическая обработка данных.....	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	50
3.1 Анализ изучаемых микроРНК при болезни Паркинсона.....	50
3.2. Экспрессия 760 генов, ассоциированных с развитием нейропатологического процесса при болезни Паркинсона.....	66
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ.....	92
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	92
СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	120

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- БП – болезнь Паркинсона
ГСМ – глубокая стимуляция мозга
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭГ – дифференциальная экспрессия генов
ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
мРНК – матричная РНК
нкРНК – некодирующая РНК
ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография
ОТ-ПЦ – метод обратной транскрипции с последующей ПЦР
ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография,
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция реального времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
ЦНС – центральная нервная система
AUC – площадь под кривой
EXP-5 – экспортин-5
GWAS – исследование с полногеномным поиском ассоциаций
FDR – ожидаемая доля ложных отклонений
HADS – госпитальная шкала депрессии и тревоги
MDS - Международное общество расстройств движений
MDS UPDRS – Унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона
Международного общества расстройств движений
МОСА – Монреальская шкала когнитивной оценки
NMSQ – шкала немоторных нарушений при БП
PDQ-39 – опросник качества жизни при БП
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
PBMC – периферические моноциты крови
REM-фаза – фаза сна с быстрыми движениями глаз
RISC – РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс
ROC-анализ – анализ, позволяющий оценить качество бинарной классификации

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием в мире [63] и одним из самых частых двигательных расстройств [127]. На сегодняшний момент его распространенность составляет в среднем 1-2 на 1000 человек, и затрагивает 1% населения старше 60 лет [194]. Клиническая картина БП включает в себя многообразие моторных и немоторных проявлений. Заболевание медленно прогрессирует и постепенно приводит к инвалидизации пациентов.

Природа БП, как и для большинства нейродегенеративных заболеваний, многофакторна. Около 5-10% составляют моногенные формы заболевания, для остальных случаев точная этиология неизвестна. К числу причин развития заболевания относят, в числе прочих, нарушение регуляции экспрессии генов [133].

На регуляцию экспрессии генов при БП влияют все основные известные эпигенетические механизмы – метилирование ДНК, модификации гистонов и некодирующие РНК [80, 81, 129, 190]. Функционально наиболее изученным классом некодирующих РНК являются микроРНК (длиной в 19–24 нуклеотида).

На сегодняшний день диагноз БП устанавливается клинически [152], и точность клинической диагностики не превышает 80% [161], в связи с чем практическую важность имеет поиск биомаркеров заболевания. Проводится множество исследований по поиску биомаркеров БП, так как это позволит улучшить прижизненную диагностику заболевания и с большей эффективностью разрабатывать лечение, замедляющее прогрессирование заболевания. Регуляторные и белок-кодирующие транскрипты изучаются в качестве потенциальных биомаркеров при БП [142, 157, 205, 218].

Для изучения экспрессии кодирующих и некодирующих РНК применяются различные подходы – это транскриптомный анализ, использование мультиплексных панелей, прямое выявление экспрессии отдельных РНК методом

ПЦР. При БП перестраиваются крупные генные сети [136, 164, 169], изменяется экспрессия множества генов и их регуляторных молекул, поэтому изучение экспрессии одновременно кодирующих и некодирующих РНК у одних и тех же пациентов представляет интерес и с патогенетической точки зрения, и с позиции поиска биомаркеров.

У больных БП были выявлены значимые отклонения в экспрессии микроРНК по сравнению с контрольной группой [40, 46, 86, 95, 107, 125, 128, 190]. Проведено несколько работ по поиску микроРНК, которые могли бы использоваться в качестве биомаркеров заболевания. В ряде работ был выявлен специфический набор микроРНК крови, который статистически значимо отличался у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [35, 42, 59, 60, 94, 111, 118]. Однако значимость микроРНК в качестве диагностических биомаркеров требует дальнейшего их изучения. В связи с тканеспецифичностью экспрессии микроРНК, остается неясной динамика экспрессии микроРНК в различных тканях при развитии заболевания [134].

Помимо микроРНК при БП также исследовалась экспрессия генов, в том числе, проводился транскриптомный анализ, но в связи с большим количеством изучаемых транскриптов и небольшими выборками результаты исследований не соответствуют друг другу [48, 167, 171]. В различных работах выявлялись отличия в экспрессии следующих генов *SNCA* [116], *FAXDC2 (C5ORF4)*, *COPZ1*, *MACF1*, *WLS*, *PRG3*, *ZNF160*, *EFTUD2* [164, 167], *ZNF160* и *SOD2* [167], *CHCHD2* [113], а также ряда других генов [171, 175, 178, 183]. Поиск биомаркеров БП среди кодирующих РНК является перспективным направлением и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Изучить паттерн экспрессии ряда микроРНК, отобранных на основании их потенциальной роли в молекулярном патогенезе БП, в лейкоцитах крови, а также связь их экспрессии с клиническими характеристиками заболевания.

2. Исследовать уровень выбранных микроРНК в структурах центральной нервной системы и в периферических тканях в аутопсийных образцах пациентов с БП и сопоставить их с результатами, полученными *in vivo* на лейкоцитах крови.

3. Определить дифференциально экспрессирующиеся гены нейропатологии в лейкоцитах крови пациентов с БП в сравнении с контрольной группой, а также выявить гены, экспрессия которых ассоциирована с клинической картиной заболевания.

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

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

Научная новизна

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

Теоретическая и практическая значимость

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

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

Методология и методы исследования

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

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

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

Личный вклад автора

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

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется количеством наблюдений, постановкой цели и задач, критериями включения пациентов в

исследование, использованием в работе современных методов обследования, применением адекватного задачам исследования статистического анализа.

Материалы были представлены на 6, 7 и 8 Конгрессах Европейской академии неврологии (2020, 2021 и 2022 гг.), Всемирном конгрессе по болезни Паркинсона и связанным расстройствам (2021 г.), Конгрессе Международного общества по болезни Паркинсона и двигательным расстройствам (2021 г.), Нейрофоруме-2022.

Внедрение результатов работы

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

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 145 листах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 10 приложений и иллюстрирована 16 рисунками. Диссертация построена из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы и практические рекомендации, список литературы, приложения. Библиографический указатель содержит 16

отечественных и 205 зарубежных источников литературы, а также 10 публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своим научным руководителям д.м.н., проф., академику РАН С.Н. Иллариошкину и д.м.н. Е.Ю. Федотовой за неоценимую помощь в планировании и реализации работы. Автор также благодарит сотрудников 5 неврологического и научно-консультативного отделения за помощь в наборе пациентов в исследование. Отдельная глубокая благодарность к.б.н. Н.Ю. Абрамычевой за помощь в молекулярно-генетической части работы. Автор выражает благодарность д.м.н., проф. В.С. Сухорукову и его сотрудникам за участие в реализации исследования экспрессии генов нейропатологии. За помощь в подборе патоморфологического материала автор благодарит к.м.н. П.Л. Ануфриева.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных двигательных расстройств[127] и вторым по частоте нейродегенеративным заболеванием в мире[63]. На сегодняшний момент его распространенность составляет в среднем 1-2 на 1000 человек и затрагивает 1% населения старше 60 лет[194]. БП является прогрессирующим инвалидизирующим заболеванием, которое затрагивает функции множества органов и систем. Клинические проявления можно разделить на моторные и немоторные. Основными моторными симптомами являются замедленность движений (брадикинезия), тремор, повышение мышечного тонуса по пластическому типу (ригидность), постуральная неустойчивость. У большинства пациентов также развиваются различные немоторные симптомы: гипосмия, нарушение функции тазовых органов, когнитивные и аффективные расстройства, нарушение поведения в фазу сна с быстрыми движениями глаз [25], нарушения поведения и речи[16], головокружение[6], нарушение потоотделения и терморегуляции[7]. При данном заболевании имеет место значительная гетерогенность клинических проявлений, возраста манифестации, темпов прогрессирования[25].

1.1 Этиология болезни Паркинсона

Этиология БП до конца не изучена. 5-10% случаев БП имеют моногенный тип наследования и до 15% пациентов имеют семейный анамнез данного заболевания[57, 91]. На сегодняшний день выявлено 23 генетических локуса, обозначенных акронимом PARK, для которых показано участие в развитии генетических форм БП [148]. В полногеномных ассоциативных исследованиях (GWAS) была дополнительно показана связь полиморфизмов в других генах с

развитием заболевания (например, гены *HLA-DRA*, *EIF4GI*, *GBA*, *MAPT*, *BST1*, *TMEM230*, *APOE* и *POLG*)[47, 75]

Большинство случаев БП имеют мультифакторную природу. Наиболее значимым фактором риска развития БП является возраст[105]. Среди прочих факторов риска выделяют мужской пол[74], жизнь в сельской местности и взаимодействие с пестицидами[38]. Использование антагонистов β -адренорецепторов увеличивает риск БП, а агонистов β -адренорецепторов – снижает[130]. Курение[38], употребление кофе[140], блокаторов кальциевых каналов[76] и статинов [26] также снижает риск развития БП. Имеются противоречивые данные по влиянию нестероидных противовоспалительных препаратов[68], уровню мочевой кислоты[219] и наличию подагры[23, 181]. Также среди факторов риска согласно критериям продромальной стадии Общества по болезням движения (MDS) выделяют контакт с бытовыми растворителями, наличие близкого родственника с БП или генетической мутации, сахарный диабет 2 типа и гиподинамию[31, 83].

1.2 Патоморфологические изменения при болезни Паркинсона

Двумя основными патоморфологическими чертами БП является накопление телец Леви в структурах головного мозга и постепенная утрата дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции[25]. Тем не менее, ни один из этих патоморфологических маркеров не является абсолютно специфичным для БП. Точная патоморфологическая диагностика возможна только при совместном их применении[148].

Тельца Леви – это эозинофильные включения, которые накапливаются внутри нейронов, и содержат более 90 белков. Их основными компонентами являются альфа-синуклеин и убиквитин[28, 203]. Тельца Леви в начале заболевания обнаруживаются в холинергических и моноаминергических нейронах ствола мозга

и обонятельного тракта, но по мере прогрессирования заболевания обнаруживается также в нейронах коры больших полушарий и лимбической системы[148].

Белок альфа-синуклеин кодируется геном *SNCA*. С его мутациями связана одна из генетических, аутосомно-доминантных форм БП. Помимо мутаций ряд однонуклеотидных полиморфизмов в данном локусе увеличивает риск развития БП и повышает уровень экспрессии альфа-синуклеина[133, 199]. В норме альфа-синуклеин участвует в синаптической передаче, также показана его роль в биосинтезе нейротрансмиттеров, функционировании митохондрий, регуляции экспрессии генов[147]. При патологическом процессе мономерный альфа-синуклеин превращается в олигомерный, приобретая цитотоксические свойства, и затем полимеризуется в малые протофибриллы, а затем и в большие, нерастворимые фибриллы, которые составляют основную часть телец Леви[126, 199].

1.3 Стадирование патологического процесса по Брааку

В 2003 г. Браак и соавторы предположили, что спорадическая БП начинает развиваться вследствие воздействия неизвестного патогена в кишечнике, в результате чего происходит накопление и распространение агрегатов альфа-синуклеина по восходящему пути[37]. В последствии была предложена гипотеза «двойного удара» (dual-hit hypothesis), которая предполагает, что БП начинается в обонятельных нейронах и сплетениях стенки кишечника, и дальше распространяется в структуры головного мозга[82].

Для данной гипотезы свои имеются клинически и патоморфологические обоснования[160, 163]. Известно, что задолго до появления моторных симптомов БП пациентов могут беспокоить симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), например, запоры, что связывают с накоплением альфа-синуклеина в нервных сплетениях стенки кишечника[126]. Также до появления двигательных нарушений может появиться гипосмия, которая ассоциирована с накоплением телец Леви в обонятельных структурах [89, 162].

Стадирование по Брааку основывается на патоморфологических данных (рис. 1):

1 стадия: тельца Леви обнаруживаются только в продолговатом мозге и/или промежуточной ретикулярной зоне

2 стадия: патологические изменения стадии 1 + заднее ядро шва, гигантоклеточные ретикулярные ядра и комплекс голубого пятна

3 стадия: патология стадии 2 + вовлечение среднего мозга, в частности, компактной части черной субстанции

4 стадия: патология стадии 3 + вовлечение структур переднего мозга. Вовлечение коры ограничено трансэнториальным регионом и аллокортексом. Неокортекс не поражен.

5 стадия: изменения, соответствующие стадии 4 + вовлечение префронтальной коры и ассоциативных областей сенсорной коры

6 стадия: патология, соответствующая стадии 5 + вовлечение первичных ассоциативных зон неокортекса и премоторной коры, легкие изменения в первичных зонах сенсорной и моторной коры[36].

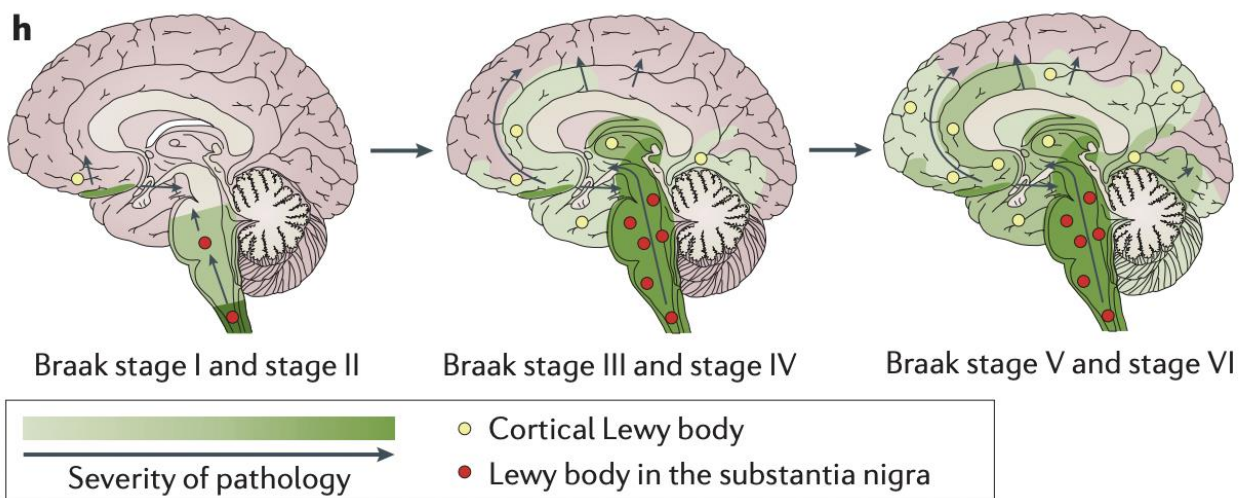


Рисунок 1. Стадирование по Брааку [148]

1.4 Основные патогенетические механизмы при болезни Паркинсона

БП – гетерогенное заболевание, которое может вызываться как генетическими причинами, так и развиваться спорадически. Имеются некоторые отличия в

превалирующих патогенетических процессах при генетических и спорадических формах, тем не менее, в ходе развития БП так или иначе вовлекаются все основные звенья патогенеза, представленные ниже.

1. Генетические факторы

Как уже упоминалось выше, большинство случаев БП имеют мультифакторную природу. Тем не менее, показано, что гены, мутации в которых являются причиной развития моногенных форм (такие как, *SNCA*, *LRRK2*, *PINK1* и другие), имеют значение и при развитии спорадических форм[133]. Также выявление локусов, которые ассоциированы с повышением риска БП, говорит о наличии наследственной предрасположенности к этому заболеванию. По выражению доктора Джудит Стерн: «Генетика взводит курок, факторы внешней среды его спускают»[155].

2. Конформационные изменения альфа-синуклеина и его распространение по прионоподобному типу

Мономеры альфа-синуклеина под воздействием различных факторов, формируют олигомеры, из которых образуются протофибриллы и большие, нерастворимые фибриллы альфа-синуклеина. Триггеры подобных изменений могут быть разнообразны, в том числе повышение продукции альфа-синуклеина, наличие мутаций повышает вероятность конформационных нарушений и последующую олигомеризацию, или нарушение молекулярных путей, в которые вовлечен альфа-синуклеин, в том числе путей его деградации[148]. Предполагаемым механизмом распространения альфа-синуклеина является его распространение по прионоподобному типу. Он заключается в том, что агрегаты альфа-синуклеина могут передаваться с помощью аксонального транспорта в другие области мозга, высвобождаться в межклеточное пространство и захватываться соседними нейронами, при этом патологический альфа-синуклеин является матрицей, при взаимодействии с которой нормальный альфа-синуклеин приобретает патологические свойства, что провоцирует его агрегацию [3, 24, 41].

3. Нарушение убиквитин-протеасомной деградации белков

С возрастом протеолитические защитные механизмы снижают свою активность[213]. На втором месте по содержанию после альфа-синуклеина в тельцах Леви стоит убиквитин[192]. Убиквитин-протеасомная система очищает клетку от ненужных белков с помощью селективного протеолиза, и снижение ее функционирования ведет к накоплению белков в клетках[189].

4. Лизосомальная недостаточность

Помимо нарушений в убиквитин-протеасомной системе, при БП наблюдаются нарушения на лизосомальной этапе деградации белков и в аутофагии[56] Помимо нарушения деградации белков, при БП также нарушен процесс митофагии – удаления нефункциональных митохондрий [186]. В этот процесс вовлечены гены *PINK1* и *Parkin*, которые ответственны за развитие моногенных, аутосомно-рецессивных форм БП[71].

5. Митохондриальная дисфункция

Митохондриальная дисфункция является одним из основных звеньев в патогенезе БП. Как было сказано, ряд «паркинсонических» гены участвует в функционировании митохондрий [110]. При БП была показана связь накопления митохондриальных мутаций и числа копий митохондриальной ДНК с развитием заболевания[11]. У пациентов с БП снижается активность митохондриального комплекса I, компонента дыхательной цепи[120, 141]. Есть предположение, что альфа-синуклеин, в норме присутствующий в митохондриях, при олигомеризации вызывает снижение активности комплекса I и окислительный стресс[58]. Аксональная дегенерация, которая предполагается ранним нейродегенеративным феноменом при БП, также развивается вероятно вследствие митохондриальной дисфункции[97, 148], [101].

6. Окислительный стресс

Как следствие митохондриальной дисфункции при БП может рассматриваться окислительный стресс, но, с другой стороны, сам окислительный стресс может быть причиной развития БП. Так мутации в гене *DJ1* провоцируют развитие БП за счет нарушения защитных механизмов ответа на окислительный стресс[77, 138] Таким образом, окислительный стресс может быть как промежуточным звеном, так

и ключевым фактором развития БП. При окислительном стрессе повреждаются белки, липиды, нуклеиновые кислоты. Соединения кислорода с азотом в составе белков и нуклеиновых кислот приводят к развитию нитрозильного стресса в клетке[14].

7. Нейровоспаление

Нейровоспаление, хоть и не является, по-видимому, триггером к развитию БП, сопровождает имеющиеся нарушения и является важным звеном патогенеза[84]. Белки некоторых «паркинсонических» генов, таких как *LRRK2*, *PINK1*, участвуют в функционировании иммунной системы, тогда как мутации в этих генах приводят к развитию моногенных форм БП [117, 170, 193]. Показано, агрегация альфа-синуклеина активирует врожденные и приобретенные механизмы иммунитета [84, 156]. А нейровоспаление, в свою очередь, провоцирует развитие конформационных нарушений альфа-синуклеина, замыкая порочный круг[70].

8. Участие нейротрофических факторов

Нейротрофические факторы способны улучшать выживаемость нейронов, способствуют регенерации аксонов, улучшают коннективность и функционирование нейронов, улучшают нейропластичность[51]. Снижение уровня нейротрофических факторов было показано в исследованиях аутопсийных образцов пациентов с БП[132]. Клинические исследования с участием нейротрофических факторов продемонстрировали улучшение работы nigrostriарной системы при проведении радионуклидных исследований[33].

9. Нарушение процессов апоптоза

Апоптоз – один из типов программируемой клеточной смерти – является необходимым процессом для нормального функционирования любой ткани. Нарушение этого процесса может приводить как к нейродегенеративным заболеваниям, так и к развитию опухолей ЦНС. Дегенерация дофаминергических нейронов черной субстанции является причиной моторных симптомов при БП. Апоптоз считается основным механизмом гибели данных нейронов. Некоторые наследственные формы БП ассоциированы с мутациями в генах, вызывающих митохондриальную дисфункцию. Белки, которые участвуют в апоптозе, также

локализованы на наружной мембране митохондрий, и взаимодействуют с белками, ответственными за развитие БП. Например, белок Parkin подавляет апоптоз через убиквитинирование белка BAK. При наличии мутации способность к убиквитинированию снижается. При исследовании головного мозга пациентов со спорадической БП была выявлена повышенная активность каспазы-3 и BAX, а также существенное снижение BCL-2, что обратно коррелирует с длительностью и тяжестью заболевания. Таким образом, избыточная активация процессов апоптоза сопровождает развитие нейродегенеративного процесса при БП [131].

10. Нарушение везикулярного транспорта

Несколько механизмов везикулярного транспорта вовлечены в патогенез БП. Гены, ответственные за развитие БП, участвуют в различных процессах при БП: слияние везикул, эндоцитоз, работа аппарата Гольджи, функционирование лизосом. Мутации в этих генах могут приводить к нарушению функционирования везикулярного транспорта. Так, например, альфа-синкулеин влияет на слияние везикул, SYNJ1 и DNAJC регулируют эндоцитоз, LRRK2 и Rab влияют на функционирование аппарата Гольджи. Есть данные и о вовлечении других белков, ассоциированных с БП, в нарушение везикулярного транспорта [62].

11. Демиелинизация аксонов

Имеются данные о том, что демиелинизация аксонов также является одним из важных звеньев патогенеза БП. С одной стороны, показано наличие ретроградной демиелинизации при БП [188]. С другой стороны, было показано повышение легких цепей нейрофиламентов при БП, что является маркером поражения аксонов [49, 85].

12. Эпигенетические факторы

В отсутствие каузативных мутаций в генах, ответственных за развитие БП, важным звеном, которое может являться пусковым механизмом развития БП, являются эпигенетические факторы [1].

Эпигенетическая регуляция приводит к дифференциальной экспрессии генов. Это феномен, который в течение жизни клетки влияет на ее развитие, взаимодействие с другими клетками, адаптацию к внешней среде. Нарушение

сбалансированной экспрессии генов может иметь последствия в виде развития заболевания. Факторы внешней среды могут влиять на развитие и стабилизацию эпигенетических изменений, что может заполнить пробел в понимании основ развития нейродегенеративных заболеваний [145].

Ниже перечислены наиболее изученные эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов:

- метилирование ДНК[15, 129]
- модификация гистонов[80]
- РНК-сайленсинг, осуществляемый с помощью некодирующих РНК, в том числе микроРНК [190]

1.5 Клиническая картина болезни Паркинсона

Клиническая картина БП достаточно многообразна, так как болезнь поражает не только центральную нервную систему (ЦНС), но и другие органы и системы, это отражается в развитии моторных и немоторных симптомов заболевания.

Основными моторными симптомами являются замедленность движений (брадикинезия), повышение мышечного тонуса (ригидность), тремор покоя. На более поздних стадиях развивается постуральная неустойчивость[25].

Среди немоторных симптомов наиболее часто возникают симптомы поражения вегетативной нервной системы, которые проявляются склонностью к запорам, учащением мочеиспускания и недержанием мочи, эректильной дисфункцией, ортостатической гипотензией, нестабильностью артериального давления. Могут развиваться нарушения сна (нарушения поведения в фазу сна с быстрыми движениями глаз (REM-фазу), дневная сонливость, бессонница). Часто БП сопровождаются аффективными нарушениями: тревожные, депрессивные расстройства. Могут развиваться галлюцинации, особенно на фоне противопаркинсонической терапии. На более поздних стадиях и при тяжелом течении развиваются когнитивные нарушения, в первую очередь зрительно-пространственные, а также затрагивающие сферу внимания, нередко развивается

апатия, другие регуляторные нарушения. На фоне противопаркинсонической терапии могут возникать нарушения импульсного контроля, такие как игромания, гиперсексуальность, нарушения пищевого поведения[25].

Некоторые немоторные симптомы могут развиваться задолго до развития моторных симптомов, в продромальную стадию, и проявляются нарушениями обоняния, склонностью к запорам (что, как обсуждалось выше, соответствует гипотезе Браака о распространении телец Леви от обонятельного и желудочно-кишечного тракта дальше по ЦНС). Нарушение поведения в REM-фазу сна является прогностическим признаком развития синуклеинопатии в будущем, с вероятностью конверсии в БП и в другие синуклеинопатии (деменцию с тельцами Леви или мультисистемную атрофию) - 33,5-41% в течение 5 лет[151], 82,4% в течение 10 лет и 96,5% в течение 14 лет[73]. Развитию БП также могут предшествовать эректильная дисфункция, повышенная утомляемость, дневная сонливость, боль, когнитивные нарушения[12].

Таблица 1. Маркеры продромальной стадии БП

Нарушение поведения в REM-фазу сна
Нарушение захвата лиганда к переносчику дофамина (<65% от нормы) по данным ПЭТ или ОФЭКТ
Субклинический паркинсонизм
Снижение обоняния
Запоры
Избыточная дневная сонливость
Ортостатическая гипотензия
Эректильная дисфункция
Нарушения мочеиспускания
Депрессия (с или без тревожных расстройств)
Когнитивные нарушения

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография, ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

Исследовательские критерии диагностики продромальной БП[31], которые были обновлены в 2019 году[83], представлены факторам риска развития БП, и маркерами продромальной стадии, куда в основном входят немоторные симптомы (табл. 1). Тем не менее, на сегодняшний день данные критерии не являются достаточно чувствительными, чтобы надежно диагностировать продромальную стадию БП[8].

Большая часть биомаркеров представлена немоторными симптомами, которые, как обсуждалось выше, могут появляться значительно раньше моторных. Считается, что на более поздних стадиях немоторные симптомы могут ухудшать качество жизни в большей степени, чем моторные[100].

1.6 Диагностика болезни Паркинсона

Диагностика БП до сегодняшнего дня остается клинической. Подход к диагностике состоит в выявлении синдрома паркинсонизма, поддерживающих критериев, критериев исключения и «красных флагов». В настоящее время используются критерии MDS, которые были разработаны в 2015 году[152]. Их точность составляет 92,6%, однако, сравнение с аутопсийным материалом не проводилось[153]. Предыдущие критерии были разработаны Банком мозга Соединенного королевства, и показывают диагностическую точность около 83% по сравнению с патоморфологическим исследованием[161].

Основными заболеваниями, с которыми проводится дифференциальная диагностика БП, являются синдромы атипичного паркинсонизма, такие как мультисистемная атрофия, прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация[149]. Также проводится дифференциальная диагностика с сосудистым паркинсонизмом, эссенциальным тремором.

Точность клинической диагностики БП неврологами, которые не являются экспертами в области болезней движения, составляет около 74%, при диагностике специалистами в области болезней движения – точность повышается до 80%[161].

Если даже на развернутой стадии отмечаются затруднения в диагностике, то ранняя диагностика БП является достаточно трудной задачей. Лишь в 26% случаев пациентов, у которых не оценивался ответ на терапию, подтвердился диагноз БП, а среди пациентов, отвечающих на лечение, на ранних стадиях (длительность заболевания менее 5 лет) точность диагностики составляла 53% [19]. Основную сложность в первые годы заболевания представляет дифференциальная диагностика с синдромами атипичного паркинсонизма, так как характерные для того или иного заболевания признаки появляются на более поздних стадиях [149].

На сегодняшний день лечение БП носит исключительно симптоматический характер. Для коррекции моторных симптомов используются препараты агонистов дофаминовых рецепторов, ингибиторов моноаминоксидазы типа В, амантадина, но золотым стандартом является применение препаратов леводопы в различных формах [5, 9, 25]. Помимо «классических» препаратов в последние годы активно разрабатываются подходы к патогенетической терапии БП, которая бы позволила замедлить или остановить развитие заболевания, но, к сожалению, на сегодняшний день клинические исследования этих препаратов не увенчались успехом [201].

Возможными причинами негативных результатов называют значительную клиническую и патоморфологическую гетерогенность заболевания, недостаточное понимание патогенеза заболевания, трудность точной прижизненной диагностики, особенно на ранней стадии [102]. Среди прочих причин отмечают неправильно выстроенный дизайн исследования, недостаточную длительность наблюдения, отсутствие объективных способов оценки прогрессирования заболевания [201].

В связи с этим особенную актуальность приобретает поиск биомаркеров заболевания, которые бы позволили установить диагноз, провести дифференциальную диагностику, оценить степень прогрессирования нейродегенеративного процесса и прогноз [2, 4]. Надежные биомаркеры для диагностики и оценки прогрессирования/тяжести заболевания, влияния терапии на сегодняшний день не найдены [102, 142].

1.7 Биомаркеры болезни Паркинсона

Согласно определению рабочей группы из США и Великобритании FDA-NHS (Food and Drug Administration - National Health Service), биомаркер – это индикатор нормального или патологического биологического процесса, биологического ответа на влияние или вмешательство, в том числе терапевтическое. Биомаркеры могут включать молекулярные, гистологические, радиологические или физиологические характеристики. Биомаркер не является мерой самочувствия, функционирования или выживания индивидуума [221].

Биомаркеры можно разделить на:

Диагностические, для подтверждения диагноза заболевания или его подтипа;

1. Мониторинговые, для оценки текущей тяжести, прогрессирования, распространенности заболевания;
2. Фармакодинамические (или биомаркеры ответа), для оценки ответа на вмешательство;
3. Предсказательные / прогностические, для оценки вероятности развития клинического события (позитивного или негативного) после влияния медицинского вмешательства или факторов внешней среды;
4. Биомаркеры безопасности, для предсказания токсического влияния препаратов, медицинских процедур или факторов внешней среды.
5. Биомаркеры риска, используются с целью оценки риска развития болезни или определенного медицинского состояния у пациента без данного заболевания[44]

«Идеальный» биомаркер должны удовлетворять следующим критериям:

1. Аналитическая валидность (воспроизводимость, точность)
2. Клиническая валидность (высокая чувствительности и специфичность)
3. Клиническая применимость (улучшение клинических исходов при использовании биомаркера)

4. Доступность биоматериала (в данном аспекте предпочтительны биомаркеры в жидкостях, для взятия которых не требуется инвазивных манипуляций)
5. Оптимальное соотношение цены и эффективности
6. Соответствие этическим соображениям[174].

Имеющиеся и исследуемые биомаркеры БП можно разделить на:

1. Клинические
2. Нейровизуализационные
3. Биохимические биомаркеры в крови
4. Биохимические маркеры в цереброспинальной жидкости
5. Гистологические
6. Генетические
7. Эпигенетические
8. С применением информационных технологий[218]

В данном обзоре мы сосредоточимся на биомаркерах БП, выявляемых в крови.

1.8 Биомаркеры болезни Паркинсона в крови

Кровь является наиболее доступным субстратом для анализа, и в крови при БП исследуются многочисленные ее компоненты, содержание веществ, молекул, различные параметры. Например, широко исследуется альфа-синуклеин в крови. Он в основном содержится в эритроцитах крови (>99%)[30], таким образом, его определение изолированно в сыворотке или плазме затруднительно в связи с тем, что любой гемолиз приводит к контаминации образцов альфа-синуклеином из эритроцитов. Тотальный альфа-синуклеин в сыворотке и плазме показывает противоречивые результаты [69, 88]. Аналогично, противоречивые данные были получены по уровню тотального альфа-синуклеина в эритроцитах[17, 55]. Однако, было показано, что концентрация олигомерного альфа-синуклеина в сыворотке и эритроцитах возрастает при БП [207, 210]. Аналогично повышается уровень

фосфорилированного альфа-синуклеина в плазме [137]. Анализ панели различных посттрансляционных модификаций альфа-синуклеина показал хорошую способность классифицировать БП и контрольную группу (AUC 0,84) [200]. Тем не менее, крупных исследований, которые могли бы показать информативность различных вариантов данного биомаркера, на сегодняшний день недостаточно [69].

Легкие цепи нейрофиламентов потенциально могут быть использованы в качестве биомаркера для дифференциальной диагностики с синдромами атипичного паркинсонизма, так как их концентрация возрастает при прогрессирующей надъядерном параличе, мультисистемной атрофии, кортикобазальной дегенерации, но не при БП [79]. Помимо этого, легкие цепи нейрофиламентов могут быть предиктором когнитивного снижения при БП [112].

Изучаются также антитела в сыворотке крови, так, отмечается снижение уровня антител к альфа-синуклеину у пациентов с БП [214].

1.9 РНК-маркеры болезни Паркинсона

Изменения в транскриптоме при БП на настоящий момент активно исследуются на предмет выявления диагностических биомаркеров и изучения патогенеза заболевания.

РНК можно условно подразделить на два больших класса, каждый из которых имеет свои функции: белок-кодирующие РНК, к которым относится матричная РНК (мРНК), и белок-некодирующие РНК [54]. Функциональная классификация белок-некодирующих РНК представлена на рисунке 2.

Некодирующие РНК (нкРНК) являются важным регулятором экспрессии генов, действуя как напрямую, так и влияя на модификацию гистонов и метилирование ДНК[54]. Функциональные и структурные особенности некодирующих РНК на сегодняшний день продолжают изучаться, появляются новые классы, уточняются мишени и механизмы их действия при различных состояниях. Влияние на экспрессию генов позволяет рассматривать некодирующие РНК как потенциальные терапевтические мишени.

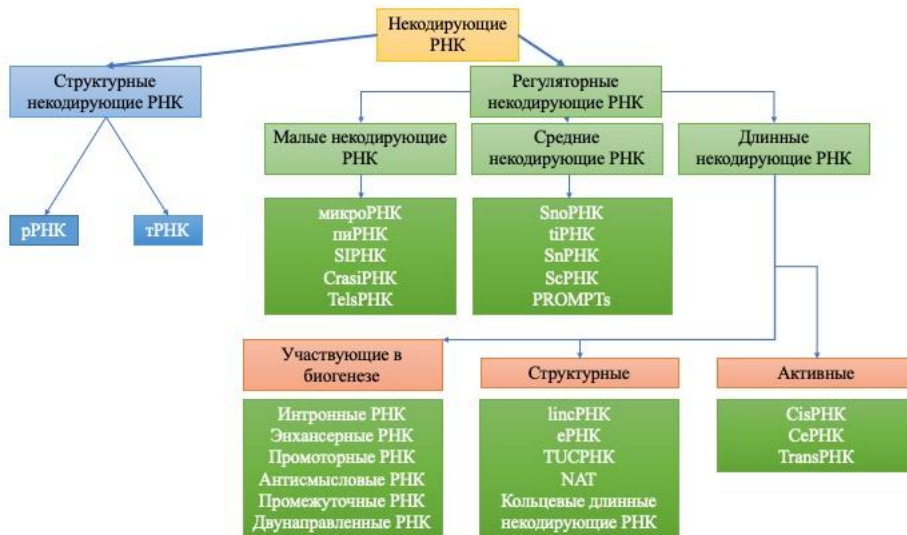


Рисунок 2. Структурно-функциональная классификация некодирующих РНК[54].

1.9.1. Механизм действия микроРНК

Функционально наиболее изученным классом нкРНК является микроРНК, длиной 19-24 нуклеотида. На настоящий момент в человеческом эпигеноме идентифицировано около 2,000 различных микроРНК (<http://www.mirbase.org>), и их число постоянно пополняется.

МикроРНК участвуют в развитии нервной системы, поддерживают ее гомеостаз, а также участвуют в патологических процессах, таких как гипоксия-ишемия, нейровоспаление и нейродегенерация[52, 118].

МикроРНК реализуют свой классический механизм действия через РНК-сайленсинг. С генов, кодирующих микроРНК, транскрибируется при-микроРНК. РНКаза *Drosha* обеспечивает созревание до пре-микроРНК, которую переносит в цитоплазму экспортин-5 (EXP-5). В цитоплазме белок-РНКаза *Dicer* переводит пре-микроРНК в микроРНК. МикроРНК соединяется с белком *Argonaute* (ago) и формирует РНК-индуцируемый сайленсинговый комплекс (RISC)[202]. RISC связывается с 3'-концом комплементарной мРНК, таким образом подавляя ее экспрессию и приводя к деградации[124, 204, 208]. RISC может контролировать

экспрессию также через связывание субъединиц рибосом и через аккумуляцию РНК в так называемые процессинговые тельца (P-bodies)[195]. Механизм РНК-сайлесинга графически показан на рисунке 3. У одной микроРНК может быть до 200 мишеней, поэтому незначительные изменения в структуре и функции микроРНК могут приводить к функциональным сетевым сдвигам и к развитию патологического процесса[107].

Изучается роль микроРНК в развитии многих мультифакторных заболеваний. Показано изменение паттерна экспрессии микроРНК при различных злокачественных новообразованиях [146]. Экспрессия микроРНК меняется и при развитии различных заболеваний ЦНС: болезни Альцгеймера, инсульте, эпилепсии, рассеянном склерозе, боковом амиотрофическом склерозе, болезни Гентингтона[87]. При БП также проводились исследования микроРНК как в головном мозге[40, 95, 191], так и в крови (приложение 3 и 4).

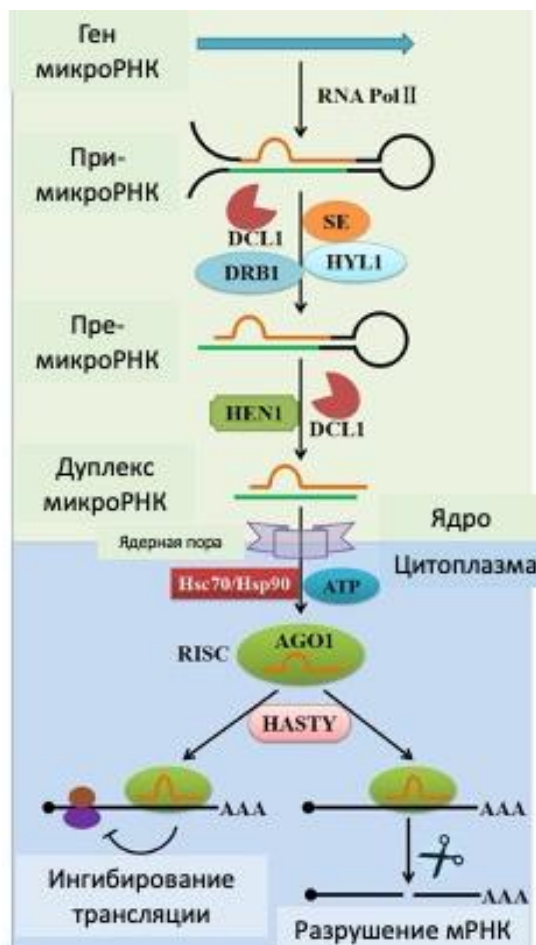


Рисунок 3. Механизм РНК-сайлесинга

1.9.2 МикроРНК как биомаркер болезни Паркинсона

МикроРНК при БП рассматриваются в качестве потенциальных биомаркеров, что связано с их стабильность в биологических жидкостях, участием в патогенезе заболевания, экспрессией в различных тканях. Также немаловажно, что микроРНК могут поступать из ЦНС в кровяное русло[184], они имеют способность образовывать связи с белками и инкапсулироваться в экзосомы – микровезикулы[45].

Большинство исследований микроРНК выполнялись с использованием больших панелей на первом этапе, и их результаты в дальнейшем на втором этапе работы подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. К таким работам относится исследование Kean Khoo и соавторов. С помощью панели из 833 микроРНК были определены 4 микроРНК (miR-1826, miR-450b-3p, miR-626 и miR-505), комбинация которых предсказывала диагноз БП с 91%-ной чувствительностью и 100%-ной специфичностью [94]. В исследовании Votta-orfila с соавторами из 377 микроРНК, входивших в панель, после двуступенчатой валидации было показано, что сниженная экспрессия miR-29c, miR-29a и miR-19b может с чувствительностью и специфичностью около 73% и 78%, соответственно, прогнозировать наличие БП[35]. В исследовании 2015 года, проведенном Ding и соавторами, авторам удалось выделить 5 микроРНК (miR-195, miR-15b, miR-221, miR-181a и miR-185), которые в комбинации показали чувствительность 77,4% и специфичность 93,4 в диагностике БП[59]. В другом исследовании 2015 года было показано, что панель из 4 микроРНК (miR-141, miR-214, miR-146b-5p, miR-193a-3p) обладала 80% чувствительностью и 65% специфичностью для диагностики ранней БП[60]. Chen и соавторы выделили 14 дифференциально экспрессирующихся микроРНК, среди которых наибольшей диагностической значимостью отличались: повышение miR-27a и снижение экспрессии let-7a, let-7f, miR-142-3p и miR-222[50].

Некоторые исследования использовали данные предыдущих работ и изучали их воспроизводимость. В исследовании Ma и соавторов 2016 года при

исследовании 13 микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при БП по данным предыдущих исследований, для 9 микроРНК (miR-141, miR-193a-3p, miR-133b, miR-15b, miR-181a, miR-185, miR-195, miR-29a, miR-19b, miR-244, miR-34b, miR-24, miR-34b, miR-148b) не было выявлено значимых отличий, но было выявлено снижение miR-29c, miR-146a, miR-214 и miR-221 у пациентов с БП. При этом показатель $AUC > 0,6$ отмечался только для miR-221 и равнялся 0,787[119]. В исследовании Li и соавторов была исследована экспрессия miR-137, miR-124, и miR-184, показана биомаркерная функция для miR-137 и miR-124 (AUC 0,707 и 0,709, соответственно)[108]. В исследовании Cao и соавторов изучали 24 микроРНК в экзосомах сыворотки крови, было выявлено значимое повышение miR-24 и miR-195 и снижение miR-19b у больных с БП[45]. В исследовании Caggi и соавторов было выявлено повышение уровня экспрессии miR-155-5p и снижение miR-146a-5p, при этом на фоне высоких доз леводопы экспрессия miR-155-5p имела тенденцию к нормализации[43]. В исследовании Yang и соавторы (2019 г.) было выявлено повышение экспрессии miR-132 при БП, однако, значения уровни экспрессии контрольной группы в значительной мере перекрывались с экспрессией у пациентов с БП[217]. При оценке только экспрессии miR-132-3p и miR-146a-5p выявлено снижение экспрессии у пациентов с БП ($AUC > 0,7$) [179]. В исследование Xie и соавторов было выявлено повышение miR-30c-2-3p и снижение miR-15b-5p, miR-138-5p, miR-338-3p, miR-106b-3p and miR-431-5p в экстрацеллюлярных везикулах плазмы пациентов с БП по сравнению с контрольной группой, показатель AUC для каждой микроРНК был более 0,6[212]. Исследование, проведенное в мононуклеарах плазмы, показало снижение экспрессии miR-27a-3p и повышение miR-27b-3p у пациентов с БП[66].

В некоторых исследованиях комбинация микроРНК работала в качестве биомаркера лучше, чем отдельные микроРНК. Так комбинации hsa-miR-335-5p/hsa-miR-3613-3p, hsa-miR-335-5p/hsa-miR-6865-3p и miR-335-5p/miR-3613-3p/miR-6865-3p продемонстрировали хорошую дискриминационную способность в отношении БП по сравнению с контролем с $AUC = 0.9-1.0$ [143].

Логично предположить, при БП наблюдается обширная функциональная перестройка сетей микроРНК. Попытку выделить сети микроРНК, экспрессия которых сочетанно изменяется в крови и головном мозге, с помощью биоинформатического анализа предприняли Chatterjee и соавторы[48].

Мета-анализ, проведенный в 2019 году, показал, что при БП снижается экспрессия miR-221-3p, miR-214-3p, miR-29c-3p, miR-29a-3p, miR-19b-3p, miR-193a-3p, miR-141-3p, miR-451a, miR-146a-5p, miR-133b, miR-15b-5p, miR-185-5p, miR-181a-5p. Тем не менее, при сравнении результата мета-анализа с оригинальными статьями, показано значительное расхождение результатов, а miR-451a, которая имела значимое снижение экспрессии при БП, не была упомянута ни в одном оригинальном исследовании как вероятный биомаркер[172]. Следовательно, требуются дополнительные исследования - мета-анализы, посвященные накопленным данным по микроРНК.

Таким образом, на сегодняшний день исследования микроРНК в качестве биомаркера БП остаются противоречивыми[135], что связано с небольшим объемом выборок, методологическими различиях исследований, а также различными биологическими субстратами (структуры ЦНС, плазма, лейкоциты, микровезикулы и т.д.)[173].

Суммарные данные по дифференциальной экспрессии микроРНК отражены в приложениях 3-5.

1.9.3 МикроРНК на фоне противопаркинсонической терапии

В нескольких работах проводилась оценка микроРНК на фоне проводимой противопаркинсонической терапии. В исследовании Margis и соавторов экспрессия микроРНК сравнивалась у нелеченых пациентов с БП, у пациентов, получающих лечение, и у лиц контрольной группы. Нелеченая группа показала более низкий уровень экспрессии miR16-2 и miR-26a2 по сравнению с двумя другими группами[121]. Алиева и соавторы показали изменения в экспрессии miR-7, miR-9-5p, miR-9-3p, miR-129, miR-132 между группой пациентов с БП, которые не

получали терапию, и пациентами, которые получали лечение любыми противопаркинсоническими препаратами [21]. Serafin и соавторы в 2015 году выявили микроРНК (miR-29a-3p, miR-30b-5p и miR-103a-3p), концентрация которых значимо была повышена в плазме крови пациентов с БП, которые получали леводопа-терапию, по сравнению с теми, кто ее не получал [176]. В исследовании Caggiu исследовали экспрессию 4 микроРНК в периферической крови, выявили повышение уровня miR-155-5p у больных БП, которое снижалось до нормальных значений при терапии леводопой [43]. В исследовании Ozdilek экспрессия miR-29c повышалась у пациентов с БП на терапии [139].

Кроме противопаркинсонической медикаментозной терапии изучалось влияние глубокой стимуляции мозга (ГСМ) при БП на профиль микроРНК. Soreq и соавторы изучали микроРНК в лейкоцитах крови у пациентов до нейрохирургической операции и на фоне ГСМ. Они выявили 16 микроРНК с измененной экспрессией у всех пациентов с БП и 11 микроРНК, экспрессия которых менялась на фоне проведения ГСМ [182].

1.9.4 Другие некодирующие РНК как биомаркеры БП

Другие нкРНК также могут быть биомаркерами БП [99]. Например, в исследовании Fan и коллег было выявлено, что 4 длинных некодирующих РНК (AC131056.3-001, HOTAIRM1, lnc-MOK-6:1, and RF01976.1-201) имеют отличия экспрессии в лейкоцитах пациентов с БП и здоровых добровольцев [64]. В исследовании Zou и соавторы исследовали экзосомы, которые попадают в кровь из ЦНС, они исследовались на предмет профиля длинных некодирующих РНК, авторы выявили значительное повышение уровня lnc-POU3F3 у пациентов с БП [220]. Также проводились исследования по оценке экспрессии других нкРНК - circРНК, pi-РНК, тРНК [99, 158].

1.9.5. РНК-биомаркеры, отражающие экспрессию генов, при болезни Паркинсона

В качестве биомаркеров нкРНК изучаются в большей степени, чем кодирующие РНК, вероятно, в связи с их большей стабильностью. А также по причине влияния одной нкРНК (прежде всего микроРНК) на большое количество мишеней. Тем не менее, экспрессия генов и экспрессия кодирующих РНК тоже изучалась в крови пациентов с БП.

Ранее в исследованиях было показано, что содержание белка альфа-синуклеина при БП в различных тканях может отличаться от контрольной группы[10]. В связи с этим нескольких исследованиях оценивалась экспрессия *SNCA*, кодирующего альфа-синуклеин, и его нескольких транскриптов, получающихся в результате альтернативного сплайсинга. Исследование, проведенное в 2015 г, показало, что на ранней стадии БП транскрипты альфа-синуклеина могут служить биомаркером заболевания[116], в то время как другое не выявило значимых отличий между БП и контрольной группой, но выявило отличия с группой деменции с тельцами Леви[122].

В связи со сложностью и комплексностью транскриптомных изменений при БП интересен подход, связанный с первоначальным выбором изучаемых транскриптов с помощью нейросетей, который представлен в работах авторской группы Santiago, Potashkin и соавторов. Была показана повышенная экспрессия *SOD2* при болезни Паркинсона[168]. В другом исследовании была показана повышенная экспрессия *HNF4A* и пониженная *PTBP1* [166]. Иные изучаемые авторами гены не показали достоверной значимости для диагностики БП (см. приложение 6) [165].

При БП проводились транскриптомные исследования. В работе Shamir и соавторов с помощью использования микрочипов было выявлено 64 гена с повышенной экспрессией и 23 гена со сниженной экспрессией при БП по сравнению с контрольной группой, при этом в нем присутствовали и гены, участвующие в развитии болезни Паркинсона, согласно базам данных[178]. В

транскриптомном исследовании Scherzer и соавторов было выявлено 22 гена, экспрессия которых меняется при БП[171].

При анализе экспрессии генов в эритроцитах пациентов с БП с использованием панели Nanostring и с последующим подтверждением результатов с помощью ПЦР в реальном времени было выявлено снижение экспрессии *CHCHD2*[113].

При БП изучалась также экспрессия отдельных генов. Например, в двух исследованиях экспрессия транскрипционного фактора *Nurr1* значимо была понижена в крови пациентов с БП[104, 217]. В исследовании Fazeli и соавторов в 2020 году было выявлено снижение уровня экспрессии *SRRM2* в мононуклеарах крови пациентов с БП на ранней стадии заболевания[66]. При исследовании экспрессии генов *CLN3*, *GABBR1*, *WFS1*, *DNM2*, *EPN2*, *EXOC4* у пациентов с БП на ранних стадиях не было выявлено отличий в экспрессии с контрольной группой[175, 183], а при изучении экспрессии *VCP1* и *SNCA* было выявлено снижение их экспрессии у пациентов с БП [22]. У пациентов с БП, ассоциированной с мутацией в гене *GBA*, выявлен высокий уровень экспрессии гена *LAMP2*[13].

Подробнее исследования экспрессии генов при БП суммированы в приложении 6.

Таким образом, кодирующие и некодирующие РНК активно исследуются при БП на предмет их использования в качестве биомаркеров заболевания.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Пациенты, включенные в исследование

В исследование для оценки профиля микроРНК было включено 70 пациентов с БП и 40 здоровых добровольцев. У всех обследованных было получено информированное согласие на участие в исследовании и подписано согласие на обработку персональных данных.

Пациенты соответствовали следующим критериям включения:

1. полученное разрешение на обработку персональных данных и подписанное информированное согласие на участие в исследовании;
2. возраст более 18 лет;
3. установленный диагноз «болезни Паркинсона» в соответствии с критериями MDS 2015 года [150]

Критериями невключения в исследование были:

4. возраст менее 18 лет;
5. установленные другие причины синдрома паркинсонизма;
6. наличие выраженных когнитивных нарушений, не позволяющих осуществлять продуктивный речевой контакт с пациентом;
7. тяжелая психическая и соматическая патология.

Основным критерием исключения был отказ от продолжения участия в исследовании.

Включение пациентов в исследование происходило с 2019 по 2021 год, среди пациентов 5 неврологического отделения ФГБНУ «Научный центр неврологии». Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол заседания №12-4/19 от 25.12.19).

Для каждого пациента осуществлялся:

1. подробный сбор жалоб, анамнеза, общий и неврологический осмотр,

2. отдельно уточнялся возраст начала и продолжительность заболевания, схема терапии, определялась форма заболевания,

3. проводилась оценка по международным стандартизированным клиническим шкалам:

- шкала Hoehn - Yahr
- унифицированная рейтинговая шкала болезни Паркинсона, пересмотренная Международным обществом по болезни Паркинсона (MDS-UPDRS)
- Монреальская шкала когнитивной оценки (МОСА)
- опросник качества жизни больных с БП (PDQ-39)
- опросник немоторных симптомов (NMSQ)
- госпитальная шкала депрессии и тревоги (HADS);

4. проводился забор венозной крови для дальнейшего молекулярно-генетического исследования.

У здоровых добровольцев уточняли возраст, отсутствие тяжелых хронических заболеваний, и также проводился забор венозной крови для дальнейшего молекулярно-генетического исследования.

В группе пациентов с БП было 35 мужчин и 35 женщин, медиана возраста – 62 [55; 69]. В контрольной группе было 25 женщин и 15 мужчин (критерий хи-квадрат, $p=0,21$). Медиана возраста в контрольной группе - 59 [51; 63], по возрасту контрольная группа и группа БП были сопоставимы (критерий Манна-Уитни, $p=0,07$). Клинические характеристики пациентов с БП представлены в таблице 2.

Для анализа профиля экспрессии 760 генов, ассоциированных с нейропатологическими процессами, из основной группы БП, в которой исследовались микроРНК, были выбраны 2 группы пациентов. Первую группу составили 13 пациентов с БП на 1-2 стадии по шкале Hoehn-Yahr, не получающих лечение (группа Н-БП). Вторую группу составили 16 пациентов с БП на 3 стадии по шкале Hoehn-Yahr, которые больше года получали противопаркинсоническую терапию. Клинические и демографические характеристики пациентов с БП представлены ниже в таблице 3.

Таблица 2. Клинические характеристики пациентов с болезнью Паркинсона, включенных в исследование экспрессии микроРНК

Характеристики	
Длительность заболевания, лет	5 [3; 7]
Возраст дебюта, лет	56 [48; 63]
Форма заболевания: - акинетико-ригидная (n, %) - смешанная (n, %)	18 (25,7%) 52 (74, 3%)
Стадия по шкале Hoehn-Yahr 1 стадия (n, %) 2 стадия (n, %) 3 стадия (n, %) 4 стадия (n, %)	14 (20%) 21 (30%) 33 (47,1%) 2 (2,9%)
UPDRS, общий балл	63 [47; 80]
HADS тревога, балл	5 [4; 9]
HADS депрессия, балл	6 [4; 10]
МОСА, балл	25 [20; 26]
Выраженные когнитивные нарушения (n, %)	20 (28,6%)
PDQ-39, балл	62 [55; 69]
NMSQ, балл	8 [5; 12]
Без противопаркинсонической терапии (n, %)	23 (32,8%)
Терапия леводопой (n, %)	41 (58,5%)
Терапия агонистами дофаминовых рецепторов (n, %)	30 (42,8%)
Терапия амантадином (n, %)	20 (28,5%)

Группу сравнения составили 16 здоровых добровольцев (10 мужчин и 6 женщин, возраст - 62,0 [54,5; 63,5] лет). Все три группы были сопоставимы по полу и возрасту.

Исследовалось ограниченное количество образцов, это связано с тем, что данный метод является дорогостоящим и высокотехнологичным, и в доступных литературных источниках количество образцов в исследованиях с использованием технологии Nanostring не превышает нескольких десятков[32, 106, 115].

Таблица 3. Клинические характеристики обследованных групп, включенных в исследование экспрессии генов, ассоциированных с развитием нейропатологических процессов

	Н-БП (N=13)	П-БП (N=16)
Муж./Жен.	8/5	10/6
Возраст, лет	58,0 [53; 65]	62 [49; 66]
Возраст дебюта заболевания, лет	55 [50; 62]	51 [41; 57]
Длительность заболевания, лет	3 [2; 4]	8 [6; 12,5]
Форма заболевания: - акинетико-ригидная (n, %) - смешанная(n, %)	2 (15,3%) 11 (84,7%)	2 (12,5%) 14 (87,5%)
Шкала Hoehn-Yahr: - I стадия (n, %) - II стадия (n, %) - III стадия (n, %)	8 (61,6%) 5 (38,4%) 0	0 0 16 (100%)
UPDRS, общий балл	39 [32; 42]	72 [61; 93]
MoCA, балл	25 [25; 27]	25 [24,5; 26]
Подшкала тревоги шкалы HADS, балл	5 [4; 8]	5 [3; 8]
Подшкала депрессии шкалы HADS, балл	3 [1; 7]	7 [4; 9]
PDQ-39, балл	23 [21; 63]	49 [19; 73]
NMSQ, балл	7 [5; 10]	8 [3; 12]
Терапия леводопой (n, %)	0	16 (100%)
Терапия агонистами дофаминовых рецепторов (n, %)	0	13 (81,3%)
Терапия амантадином (n, %)	0	9 (56,3%)

Н-БП – группа пациентов на начальных стадиях БП, которые не получали лечения. П-БП – группа продвинутых стадий БП, получающих лечение. К – контрольная группа.

2.2. Молекулярно-генетические исследования

Молекулярно-генетическая часть работы выполнялась на базе ДНК-лаборатории 5-ого неврологического отделения ФГБНУ ИЦН.

2.2.1 Анализ экспрессии микроРНК в лейкоцитах крови

Выделение суммарной (тотальной) РНК

Пробирки с венозной кровью сразу после забора помещали в лед для транспортировки в лабораторию, где незамедлительно проводили выделение лейкоцитарной фракции по следующему протоколу: кровь аликвотили по 300 мкл в пробирки с 1,5 мл эритроцит-лизис буфера (Quagen), инкубировали 15 минут, далее центрифугировали в течение 10 минут на 2100 оборотах при температуре 4 °С на центрифуге ALC PK131R, при неполном лизисе эритроцитов повторяли процедуру. При получении гомогенного раствора осадок вновь центрифугировали с 1,5 мл эритроцит-лизис буфера, после чего лейкоцитарный осадок осушали и растворяли в 350 мкл RLT буфера из состава RNeasy mini kit (Qiagen) с 3,5 мкл меркаптоэтанола, полученные образцы хранили на -80°С.

Собственно выделение тотальной РНК проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy mini kit (Qiagen) по стандартному протоколу производителя.

Концентрацию в образцах РНК после выделения определяли с помощью флуориметра DeNovix QFX Fluorimeter согласно протоколу производителя. Содержание РНК в образцах после выделения варьировалась от 1,5 нг/мкл до 52,2 нг/мкл, в соответствие с чем были скорректированы объемы образцов при дальнейших исследованиях.

Полученные аликвоты РНК хранили при температуре -20°С.

Выбор целевых микроРНК

В работе был проведен подробный анализ имеющихся литературных данных по дифференциально экспрессирующимся микроРНК при БП (см. приложения 3-5). Критерием выбора микроРНК в настоящее исследование было наличие более, чем одного исследования о ее дифференциальной экспрессии при БП (вне зависимости от исследуемого субстрата – областях ЦНС, нейрональных клетках-

предшественниках, плазме крови, лейкоцитах, моноцитах, везикулах, экзосомах цереброспинальной жидкости и т.д.). По результатам анализа были выбраны 12 зрелых микроРНК (табл. 4).

Таблица 4. МикроРНК и их последовательности

МикроРНК	Последовательность*
miR-7-5p	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGUU
miR-29a-3p	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA
miR-29c-3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
miR-30c-5p	UGUAAACAUCUACACUCUCAGC
miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
miR-129-5p	CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
miR-146a-5p	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU
miR-221-3p	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
miR-520d-5p	CUACAAAGGGAAGCCCUUC
miR-191-5p	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG

* - по данным <https://www.mirbase.org/>

Выбор референсной микроРНК

Основываясь на литературных данных и существующих рекомендациях в качестве референсной микроРНК мы использовали miR-191-5p, последовательность которой также представлена в Таблице 4, которая характеризуется стабильной экспрессией в тканях и клетках[53].

Количественный анализ микроРНК методом обратной транскрипции с последующей ПЦР (ОТ-ПЦР)

Среди существующего целого ряда технологий для определения уровня микроРНК был выбран метод ОТ-ПЦР, в силу своей надежности, воспроизводимости и относительно низкой стоимости. Первый этап, обратную

транскрипцию микроРНК (ОТ), проводили с помощью специфичных для каждой детектируемой микроРНК праймеров, формирующих петлю (stem-loop праймеры). Такой подход позволил в результате реакции ОТ получать кДНК длиной 50-60 bp, что дало возможность для последующего проведения специфичной ПЦР. Преимуществом использования stem-loop праймеров является лучшая чувствительность и специфичность по сравнению с линейными праймерами.

Для синтеза stem-loop праймеров было опробовано два вида шпильевидных конструкций на основе двух разных универсальных реверсных ПЦР-праймеров: mR-5 (5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3) и mR-6 (5'-CTGGTGTCGTGGAGTC-3'). После апробации более состоятельной оказалась конструкция с применением mR-6 [198]. Схема детекции уровня микроРНК с помощью stem-loop праймеров приведена на Рис. 4.

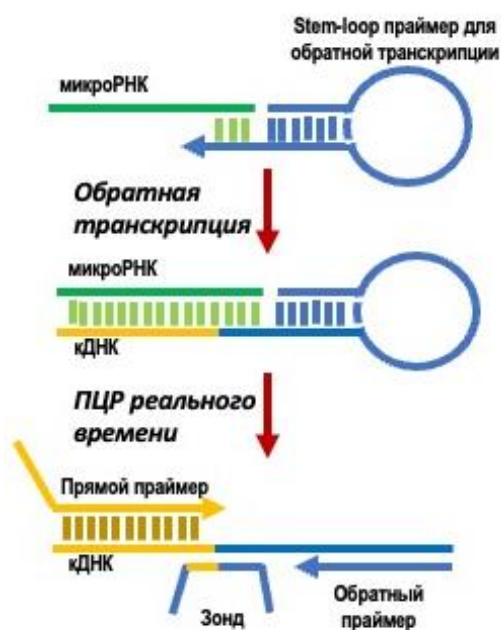


Рисунок 4. Схема детекции микроРНК с помощью stem-loop праймеров

Индивидуально для каждой микроРНК были подобраны оригинальные специфические stem-loop праймеры. Последовательности праймеров указаны в приложении 1. Все используемые олигонуклеотидные праймеры были синтезированы в компании ООО «Синтол» (Москва, Россия).

Обратную транскрипцию проводили в мультиплексном формате для целевой и референсной РНК в объеме 25 мкл содержащем: 10 мкл 2,5x реакционной среды для проведения ОТ (ООО «Синтол»), 50 е.а. MMLV ревертазы (ООО «СИНТОЛ»), 10 пкмоль соответствующего Stem-loop праймера для целевой микроРНК (см. прил. 1) и 10 пкмоль праймера для референсной miR-191-5p, 30 нг тотальной РНК. Протокол реакции ОТ для амплификатора T100 Thermal Cycler (BioRad): 20°C – 3 минуты; 60 циклов: 25 °C – 30 сек, 42 °C – 30 сек, 50 °C – 1 сек; инактивация ревертазы 92 °C – 5 минут, 4 °C – хранение до извлечения образцов. Полученные образцы кДНК, при необходимости, хранили при температуре -20 °C.

ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) также проводили в мультиплексном формате для целевой и референсной РНК в объеме 25 мкл: 10 мкл 2,5x реакционной среды для проведения ПЦР-РВ (ООО «Синтол») содержащей KCl, TrisHCL (pH 8,8), 6,25 MgCl₂, SynTaq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween20; по 10 пкмоль соответствующего специфического прямого праймера для целевой микроРНК (см. прил. 2) и референсной miR-191; 10 пмоль универсального обратного праймера; 10 пмоль зонда для микроРНК интереса, меченного красителем FAM, и 5 пмоль зонда для miR-191, меченного R6G; 2 мкл полученной после ОТ кДНК.

Протокол реакции ПЦР-РВ для амплификатора АНК-48 (ИАП РАН, Россия): предварительный прогрев 95 °C – 300 сек; далее 65 циклов: денатурация 95 °C – 15 сек, отжиг и элонгация 56 °C – 40-50 сек, (рис. 3).

Проверку чувствительности и эффективности ПЦР-РВ проводили путем амплификации последовательных разведений контрольных матриц (специально синтезированных исследуемых микроРНК) по вышеописанному протоколу (рис. 4). На основании полученных значений пороговых циклов C(t) были построены графики, на которых по оси абсцисс – значение C(t), а по оси ординат – десятичный логарифм концентрации соответствующей микроРНК (рис. 4 и 5).

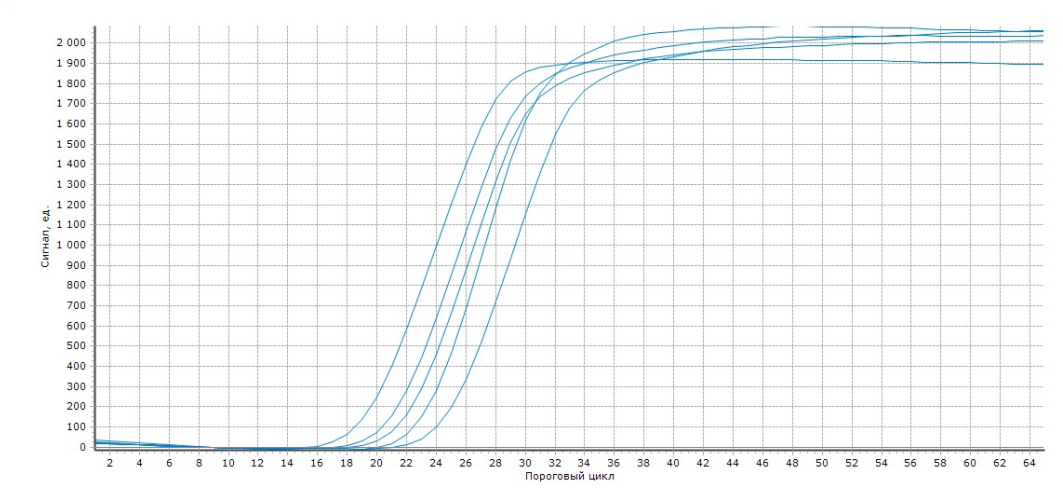


Рисунок 5. ПЦР-РВ для синтетической miR-191-5p в соответствующих концентрациях

Расчет эффективности проводили на основании наклона прямой (от -3,7 до -3,0 – приемлемый диапазон, говорящий о 90-110% эффективности ПЦР). В нашем случае значение наклона кривой было -3,09, что говорит о достаточной эффективности ПЦР (рис. 6).

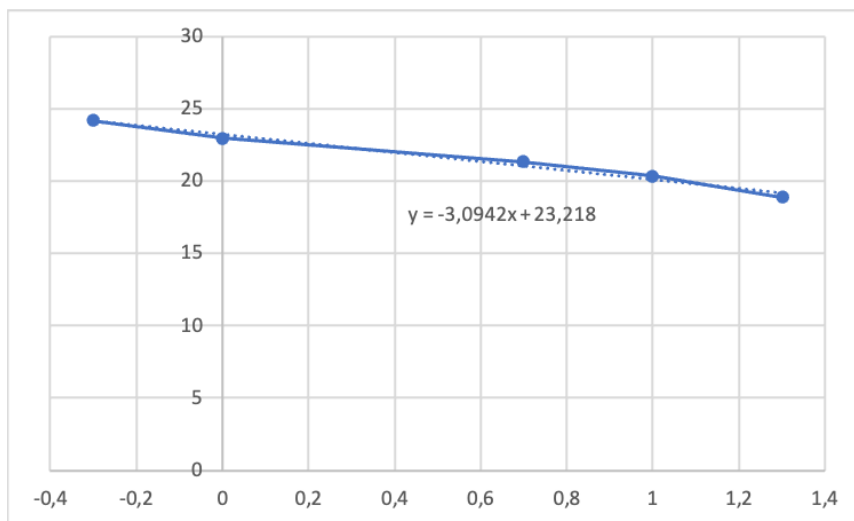


Рисунок 6. Эффективность ПЦР-РВ для miR-191-5p

По результатам ПЦР-РВ получали значения пороговых циклов C_t для для микроРНК интереса и для референсной miR-191-5p (Рис. 7). Для каждого образца каждой микроРНК проводилась постановка в 2 пробах, результаты по 2 пробам усреднялись. Относительный уровень экспрессии микроРНК рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$ (21), по формуле $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$, где $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{интересующего})$

образца А) – Δ СТ(референтного образца Б) = (СТ_{интересующей микроРНК образца А} – СТ_{референтной микроРНК образца А}) – (СТ_{интересующей микроРНК образца Б} – СТ_{референтной микроРНК образца Б})

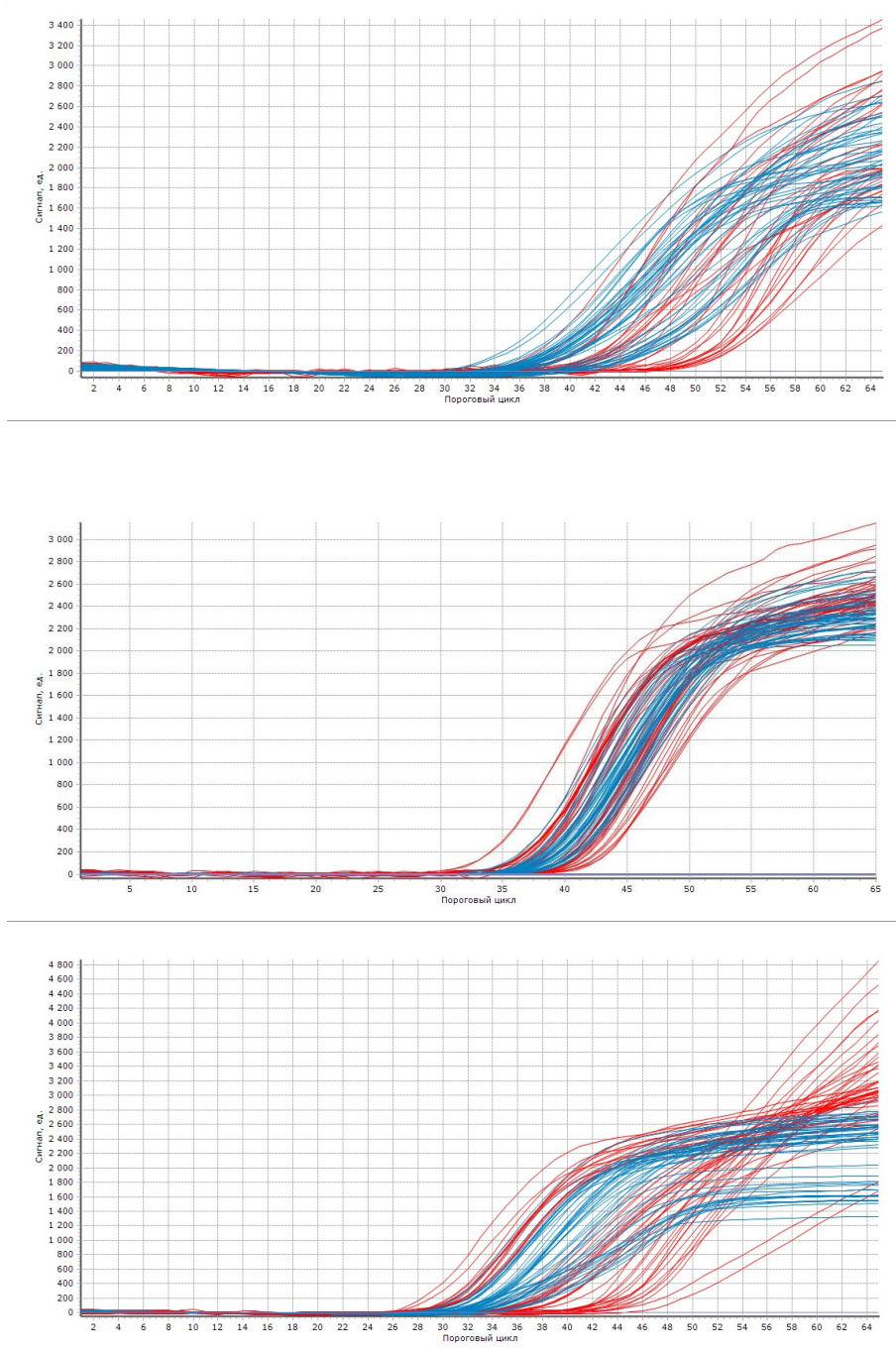


Рисунок 7. Примеры графиков накопления продукта амплификации целевой микроРНК (красные кривые) и референтной miR-191-5p (синие кривые) в мультиплексном формате, получаемых по результатам ПЦР-РВ

2.2.2 Определение экспрессии микроРНК в аутопсийных образцах

Для оценки экспрессии микроРНК в периферических тканях и центральной нервной системе исследовались образцы, полученные при аутопсии у трех пациентов с БП. Исследовались образцы стриатума, коры лобной доли, кожи, слюнных желез, пищевода, желудка, двенадцатиперстной кишки, прямой кишки, толстой кишки. Выбор периферических тканей для оценки экспрессии был обусловлен тем, что именно в коже, слюнной железе и в желудочно-кишечном тракте выявляются агрегаты альфа-синуклеина, в том числе в виде характерной фосфорилированной формы белка[163]. Выбор областей головного мозга был обусловлен предшествующим патоморфологическим исследованием, у пациента В. были обнаружены и верифицированы специфичные для БП тельца Леви и накопления фосфорилированного альфа-синуклеина в стриатуме и коре лобной доли[163].

Пациент В., 70 лет. Диагноз: болезнь Паркинсона, смешанная форма. Длительность заболевания - 7 лет. Пациент получал трехкомпонентную противопаркинсоническую терапию, в том числе леводопа-содержащими препаратами. Причина смерти: острый трансмуральный инфаркт переднебоковой стенки миокарда.

Пациентка А., 47 лет. Диагноз: болезнь Паркинсона, смешанная форма, выраженные моторные флюктуации и лекарственные дискинезии. Длительность заболевания – 10 лет. Причина смерти: острая сердечная недостаточность на фоне тяжелого сепсиса.

Пациентка М., 61 год. Диагноз: болезнь Паркинсона, смешанная форма. Длительность заболевания - 4 года. Противопаркинсоническую терапию не получала в связи с непереносимостью данных препаратов. Причина смерти: острая почечная недостаточность.

В первом аутопсийном случае (пациент В.) были доступны для исследования экспрессии микроРНК все образцы периферических тканей и областей головного мозга.

Выделение РНК из парафиновых блоков

Все образцы хранились в виде парафиновых блоков. Препараты из парафиновых блоков нарезали на микротоме, выделяли интересующую область, далее образцы подвергались депарафинизированию ксилолом с последующей отмывкой этанолом, и далее проводили выделение РНК с помощью набора для выделения РНК из парафиновых блоков RNeasy FFPE Kit (Qiagen) по стандартному протоколу производителя.

Анализ микроРНК в аутопсийных образцах

В аутопсийных образцах исследовались 7 микроРНК: miR-7-5p, miR-30c-5p, miR132-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p, miR-29a-3p, miR-126-3p (последние две – не во всех образцах). Количественный анализ микроРНК проводился методом обратной транскрипции с последующей ПЦР, описанным выше для лейкоцитарной фракции крови.

Полученные результаты экспрессии 7 микроРНК в лейкоцитах и областях головного мозга сопоставлялись с данными онлайн базы экспрессии микроРНК в тканях – miTED (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/mited/#/expressions> с фильтром «brain» и «white blood cells»).

2.2.3 Исследование экспрессии генов нейропатологии с использованием платформы Nanostring

Для всех 45 образцов был определен профиль экспрессии генов с использованием платформы Nanostring, с помощью панели Nanostring nCounter® Human Neuropathology Panel (NanoString Technologies, WA, USA), которая включает в себя 760 генов, участвующих в нейропатологических процессах. Данная технология позволяет с высокой точностью и эффективностью определять экспрессию множества генов в одном образце с помощью мультиплексной библиотеки зондов. Технология основана на методе «молекулярных штрихкодов», который представляет собой прямое связывание мРНК с флуоресцентным зондом.

Для каждой мРНК в библиотеке присутствует два специфичных зонда. С помощью первого зонда длиной 35-50 оснований происходит захват мРНК, с помощью второго зонда такой же длины, который связан с цветным кодом, подается сигнал для детекции. Все зонды находятся в единой смеси, поэтому требуется лишь одна реакция гибридизации, в ходе которой формируется триплетная структура, каждая из которых образована целевой мРНК, зондом для захвата и зондом с флуоресцентной меткой (рис. 8). Для каждой мРНК флуоресцентная метка уникальна. Определение уровня экспрессии мРНК происходит с помощью подсчета количества флуоресцентных меток для каждой мРНК [72].

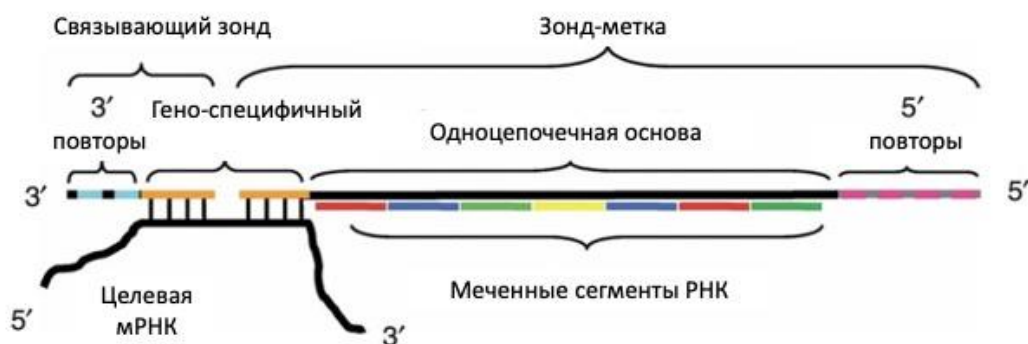


Рисунок 8. Схема гибридизации при использовании технологии Nanostring nCounter

Панель, использованная в исследовании – Nanostring Neuropathology Panel, которая включает в себя гены, участвующие в следующих функциональных путях и фундаментальных процессах.

Фундаментальные процессы:

- Передача сигнала между нейронами

- Взаимодействие нейронов и глии
- Нейропластичность, развитие и старение
- Компарментализация и структурная целостность
- Нейрональное воспаление
- Метаболизм нейронов

Функциональные пути:

- Секреция нейротрансмиттеров
- Везикулярный транспорт
- Рецепторный ответ для нейротрансмиттеров/обратный захват
- Синтез и хранение нейротрансмиттеров
- Секреция трофических факторов
- Факторы роста
- Ангиогенез
- Модификации хроматина
- Апоптоз
- Нейрональный цитоскелет
- Структура аксонов и дендритов
- Межнейронное взаимодействие
- Целостность тканей
- Активация микроглии
- Ремоделирование матрикса
- Провоспалительные цитокины

Подробно гены, включенные в панель, перечислены в приложении 7.

Каждый картридж был рассчитан на 12 образцов, поэтому для 45 образцов потребовалось 4 запуска. Образцы помещались в nCounter Analysis System (NanoString Technologies) согласно протоколу производителя. Сырые данные были обработаны с помощью пакета nSolver (version 4.0). Данные были нормированы на набор из 6 позитивных контрольных РНК и 10 генов домашнего хозяйства, которые были включены в панель.

Аннотация генов по Gene Ontology проводилась с помощью базы данных AmiGO2 (<http://amigo.geneontology.org>) по состоянию на сентябрь 2022 года. Были применены фильтры по виду (*Homo sapiens*) и по источнику данных (GO Central).

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

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась в программе IBM SPSS и Statistica 10,0. Нормальность распределения значений была проверена тестом Шапиро-Уилка. Для статистического анализа экспрессии микроРНК были использованы непараметрические критерии (критерий Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, коэффициент корреляции Спирмена). Статистический уровень значимости p принимался равным 0,05.

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

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

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Анализ изучаемых микроРНК при болезни Паркинсона

3.1.1 Экспрессия микроРНК в группе пациентов с БП и в контрольной группе

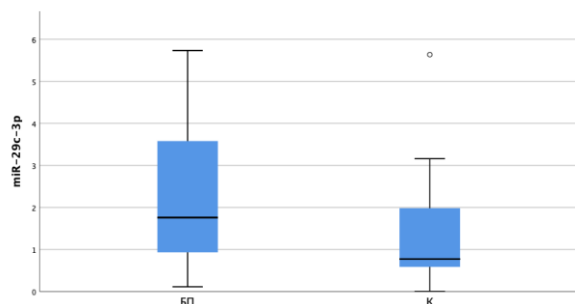
В работе изучалась экспрессия 12 микроРНК в группе пациентов с БП и в контрольной группе. Полученные значения представлены в таблице 5. По результатам сравнения двух групп были получены 4 дифференциально экспрессирующихся микроРНК ($p < 0,05$): miR-29c-3p (уровень повышен при БП), miR-7-5p (повышен) и miR-29a-3p (уровень снижен при БП), miR-30c-5p (снижен). Выявленные дифференциально экспрессирующиеся микроРНК при БП представлены на рисунке 9.

Таблица 5. Экспрессия микроРНК в группе БП и в контрольной группе

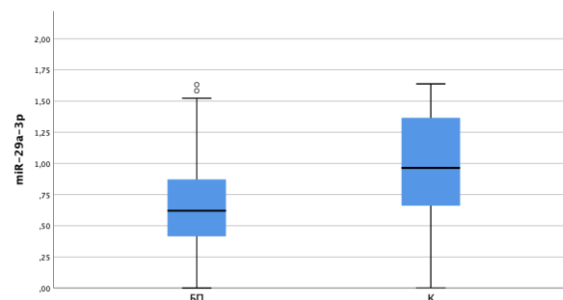
МикроРНК	Болезнь Паркинсона (N=70)	Контрольная группа (N=40)	FC	p
miR-29c-3p	1,76 [0,93; 3,58]	0,77 [0,59; 1,98]	2,28	0,003*
miR-29a-3p	0,63 [0,41; 1,01]	0,97 [0,66; 1,4]	0,65	0,003*
miR-7-5p	0,68 [0,19; 1,68]	0,2 [0,04; 1,5]	3,4	0,024*
miR-30c-5p	0,53 [0,34; 1,43]	1,03 [0,46; 1,77]	0,51	0,043*
miR-126-3p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

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

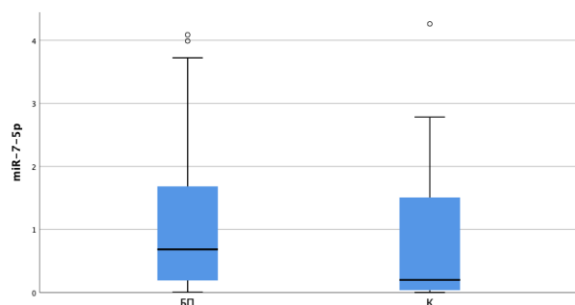
А

 $\Delta\Delta CT$ 

Б

 $\Delta\Delta CT$ 

В

 $\Delta\Delta CT$ 

Г

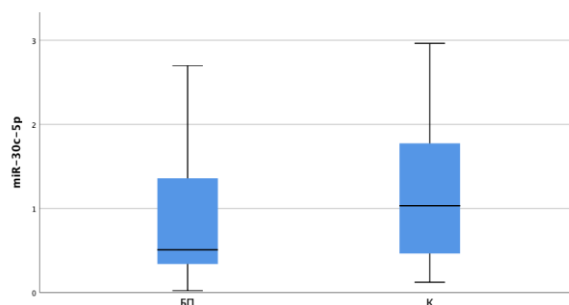
 $\Delta\Delta CT$ 

Рисунок 9. Уровни экспрессии четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК при болезни Паркинсона по сравнению с контрольной группой
 А – уровень экспрессии miR-29c-3p. Б – уровень экспрессии miR-29a-3p. В – уровень экспрессии miR-7-5p. Г – уровень экспрессии miR-30c-5p.
 БП – болезнь Паркинсона. К – контрольная группа.

Из четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК для двух было показано существенное увеличение уровня экспрессии при БП по сравнению с контролем – для miR-29c-3p в 2,3 раза, для miR-7-5p в 3,4 раза. Для одной микроРНК miR-30c-5p было показано снижение в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой, тогда как для miR-29a-3p отмечалось небольшое снижение в 1,5 раза, которое, однако, соответствовало критериям отбора по параметру FC.

Несмотря на выявленные статистически значимые отличия, как видно из рисунка 9, наблюдаются значительные перекрытия диапазонов экспрессии между группами. На это же указывают данные, полученные при проведении ROC-

анализа, при котором были получены невысокие значения AUC для всех четырех микроРНК (табл. 6).

Таблица 6. ROC-анализ для четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК при болезни Паркинсона

МикроРНК	AUC [ДИ]	Se	Sp	Порог
miR-29c-3p	0,673 [0,572; 0,784]	79%	53%	0,81
miR-29a-3p	0,674 [0,566; 0,781]	74%	60%	0,68
miR-7-5p	0,623 [0,508; 0,739]	80%	43%	0,13
miR-30c-5p	0,624 [0,509; 0,738]	68%	59%	0,59

AUC – значение площади под ROC-кривой. Se – чувствительность. Sp – специфичность, ДИ – доверительный интервал.

Все полученные значения AUC составляют меньше 0,7, что говорит о «недостаточной» (“poor”) потенциальной диагностической значимости данных микроРНК для разграничения случаев БП от здоровых добровольцев.

Также был проведен анализ диагностической значимости комбинации четырех данных микроРНК – miR-29c-3p, miR-7-5p, miR-30-5p и miR-29a-3p – с помощью построения бинарной логистической регрессии (приложение 8) и последующим ROC-анализом. Результаты ROC-анализа – на рисунке 10. При комбинации четырех микроРНК значение AUC составило 0,793 (доверительный интервал [0,708; 0,878]), что является «приемлемым» (“fair”, AUC > 0,7) для разграничения случаев БП от здоровых добровольцев. При этом чувствительность составляла 76%, специфичность – 69,2%.

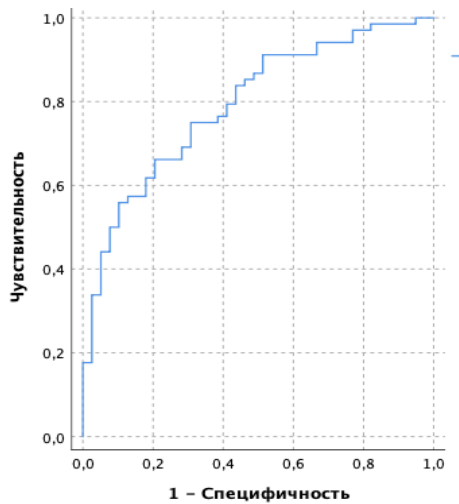


Рисунок 10. ROC-анализ для комбинации четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК: miR-29с-3р, miR-29а-3р, miR-7-5р, miR-30с-5р

Как иллюстрация соответствия выявленного профиля экспрессии микроРНК и клинического диагноза приведен следующий типичный клинический случай БП.

Пациент Н.Н., 58 лет, обратился с жалобами на дрожание правой руки, нарушение мелкой моторики, скованность, замедленность движений в правой руке, изменение почерка.

В 54 года появилось дрожание в правой руке при физической нагрузке. Через 2 года присоединились скованность, замедленность движений в правой руке. В 56 лет после обращения к неврологу был поставлен диагноз: Болезнь Паркинсона. На проведенной МРТ - умеренное расширение боковых и 3-его желудочков в отсутствии признаков нарушения проходимости ликворных путей, небольшая арахноидальная киста по контуру нижних латеральных отделов правой лобной доли. Противопаркинсоническую терапию не принимал. Заболевание медленно прогрессирует.

Семейный анамнез не отягощен по неврологическим заболеваниям.

Сопутствующие заболевания: Нарушения ритма сердца: фибрилляция предсердий, пароксизмальная форма. Транзиторная артериальная гипертензия. Вторичный эритроцитоз. Дислипидемия. Ожирение 1 степени. Аденома предстательной железы. Мочекаменная болезнь. Подагрический артрит. Двусторонний гонартроз. Деформирующий спондилоартроз позвоночника. Состояние после перенесенной коронавирусной инфекции от октября 2020г.

При осмотре: Гипомимия. Установочный нистагм в крайних отведениях. Мышечный тонус повышен по пластическому типу в правой руке. Олигобрадикинезия в руках при выполнении динамических тестов D>S. Тремора покоя нет. В пробе Тевенара устойчив. Походка с ахейрокинезом справа. Четких нарушений чувствительности на момент осмотра не выявлено. Тазовые функции контролирует. При оценке по шкале UPDRS общий балл 27. У пациента отсутствуют когнитивные нарушения (29 баллов по MoCA) и аффективные

нарушения (1 и 3 балла по HADS). По опроснику NMSQ – 0 баллов, по PDQ-39 – 23 балла.

Таким образом, пациент страдает болезнью Паркинсона в течение 4 лет, с дебютом заболевания в 54 года. В настоящий момент у пациента 2 стадия по шкале Hoehn-Yahr.

При определении экспрессии микроРНК уровень *miR-29c-3p* составил 4,93 (повышен, порог – 0,81), *miR-7-5p* - 5,7 (повышен, порог - 0,13), *miR-29a-3p* – 0,86 (не снижен, соответствует нормальным значениям, порог – 0,68) и *miR-30c-5p* – 0,32 (снижен, порог - 0,59). При использовании вышеуказанной модели логистической регрессии данный пациент классифицирован как «пациент с болезнью Паркинсона».

3.1.2 Сопоставление уровня экспрессии изучаемых микроРНК с демографическими характеристиками, моторными и немоторными проявлениями болезни Паркинсона

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

Все исследуемые микроРНК были проанализированы на предмет взаимосвязи с возрастом на момент исследования и возрастом дебюта заболевания с помощью корреляционного анализа. Ни для одной из исследуемых микроРНК ассоциации с возрастными характеристиками выявлено не было (в анализе учитывались только взаимосвязи, у которых коэффициент корреляции Спирмена был выше 0,3).

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

В работе проводилось сравнение экспрессии микроРНК при двух основных клинических формах заболевания – акинетико-ригидной и смешанной. Анализ показал, что отмечается более высокий уровень экспрессии *miR-29a-3p* при акинетико-ригидной форме по сравнению со смешанной ($p=0,01$): 1,06 [0,58; 1,52] и 0,59 [0,41; 0,82], соответственно (рисунок 11).

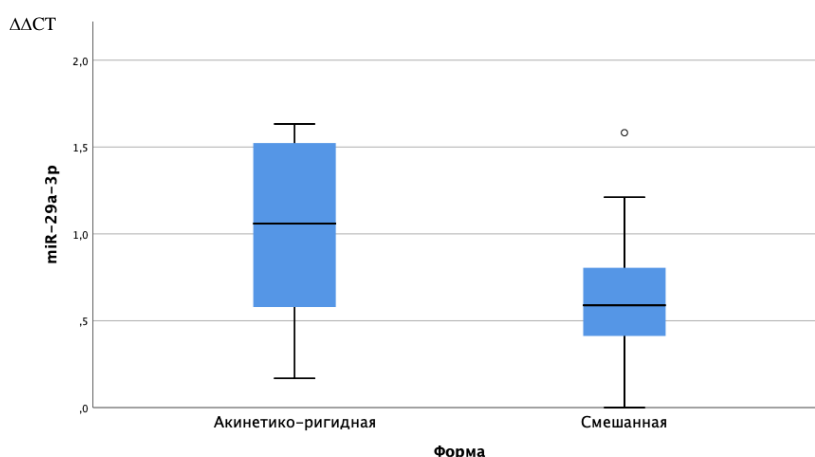


Рисунок 11. Экспрессия miR-29a-3p при акинетико-ригидной и при смешанной формах болезни Паркинсона

Исследовались корреляции между микроРНК и тяжестью БП, которые оценивались с помощью соответствующих шкал. Была выявлена слабая корреляция экспрессии miR-30c-5p с тяжестью заболевания по шкале Hoehn-Yahr ($R=0,304$; $p=0,011$). Не было выявлено взаимосвязи между экспрессией микроРНК и баллами по шкале UPDRS и ее подшкалам (часть I – немоторные аспекты повседневной жизни, часть II – моторные аспекты повседневной жизни, часть III – исследование двигательных функций).

Подробно исследовались корреляции между уровнем экспрессии микроРНК и различными немоторными симптомами БП: аффективной симптоматикой (тревогой, депрессией), когнитивными нарушениями, суммарной оценкой немоторных нарушений.

Аффективные нарушения в работе оценивались с помощью шкалы HADS. При корреляционном анализе уровня микроРНК с суммарным баллом шкалы и отдельными подшкалами тревоги и депрессии статистически значимых взаимосвязей выявлено не было. При сравнении группы пациентов с депрессией (>7 баллов, с «субклинически выраженной» и с «клинически выраженной», $n=28$) и группы пациентов без депрессии ($n=42$) наблюдается некоторое повышение miR-30c-5p в группе депрессии $0,56 [0,33; 1,5]$ по сравнению с группой без депрессии $0,48 [0,34; 1,2]$ ($p=0,045$). При подобном же сравнении пациентов с тревогой ($n=25$)

и без таковой (n=45) уровни экспрессии микроРНК не отличались. Также не выявлено дифференциально экспрессирующихся микроРНК при сравнении группы с наличием аффективных нарушений (депрессия и/или тревога, n=35) с группой без таковых (n=35).

Отдельно исследовалась взаимосвязь микроРНК с когнитивными нарушениями при БП, которые оценивались по шкале MoCA. Корреляционный анализ не показал значимых ассоциаций между уровнем 12 исследуемых микроРНК и баллами по шкале MoCA. Аналогично, как и при исследовании аффективных нарушений, основная группа пациентов с БП была разделена на 2 подгруппы по набираемому баллу по шкале MoCA: пациенты без значимых когнитивных нарушений (n=50) и пациенты, имеющие выраженные когнитивные нарушения (MoCA<19 баллов, n=20). Сформированные подгруппы ожидаемо отличались по возрасту (60 [49; 66], 70 [62; 74], $p=0,002$), стадии заболевания по шкале Hoehn-Yahr (2,3 [1; 3], 3,0 [2,3; 3,0], $p=0,027$) и представленностью форм заболевания – акинетико-ригидной и смешанной (соответственно, 14%/86% и 55%/45%, $p<0,001$), то есть подгруппа без когнитивных была младше по возрасту, с меньшей тяжестью состояния, и в подгруппе преобладала смешанная форма заболевания. Сравнение двух сформированных подгрупп с учетом их различий по возрасту, тяжести и форме БП не показало отличий в профиле исследуемых микроРНК.

При оценке профиля немоторных проявлений по данным опросника NMSQ была выявлена слабая прямая корреляция уровня miR-106a-5p и суммарного балла по шкале NMSQ ($R=0,36$; $p=0,011$).

Помимо моторных и немоторных симптомов в работе исследовалось качество жизни пациентов с БП по опроснику PDQ-39 и его взаимосвязь с профилем микроРНК. Медианный балл по подшкалам представлен на рисунке 12. Корреляций с общим баллом выявлено не было. Была выявлена слабая корреляция экспрессии miR-146a-5p с подшкалой PDQ-39 «Общение» ($R=0,421$; $p=0,002$).



Рисунок 12. Медиана баллов по подшкалам шкалы качества жизни при болезни Паркинсона PDQ-39 в изучаемой выборке

Таким образом, подробный анализ микроРНК и клинико-демографических характеристик группы БП выявил слабые прямые связи между длительностью заболевания и уровнем экспрессии miR-129-5p, miR-126-3p, miR-30c-5p и обратную корреляцию с miR-29a-3p, кроме того снижение miR-29a-3p в случаях смешанной формы заболевания по сравнению со случаями с акинетико-ригидной формой, слабую связь экспрессии miR-30c-5p с баллом по шкале Hoehn-Yahr и повышение экспрессии данной микроРНК в группе пациентов, имеющих депрессию. Была выявлена слабая корреляция miR-106a-5p и суммарного балла по шкале NMSQ, а также связь уровня miR-146-5p с одним из параметров качества жизни при БП.

3.1.3 Анализ уровня экспрессии изучаемых микроРНК в зависимости от противопаркинсонической терапии

Основная группа пациентов с БП была разделена на две подгруппы по наличию/отсутствию противопаркинсонической терапии. Характеристика подгрупп представлена в таблице 7.

Таблица 7. Клинико-демографическая сравнительная характеристика подгрупп пациентов с болезнью Паркинсона, получающих и не получающих противопаркинсоническую терапию

Характеристики	Группа без терапии (N=23)	Группа с терапией (N=47)	p
Муж./жен.	10 / 13	25 / 22	p=0,451
Возраст, лет	58 [53; 68]	63 [55; 70]	p=0,290
Длительность заболевания, лет	3 [1; 5]	6 [4; 10]	p<0,001*
Дебют заболевания, лет	56 [46; 66]	56 [48; 63]	p=0,670
Шкала Hoehn-Yahr			p<0,001*
1 стадия (n, %)	13 (56,5%)	1 (2,1%)	
2 стадия (n, %)	6 (26,1%)	15 (31,9%)	
3 стадия (n, %)	4 (17,4%)	29 (61,8%)	
4 стадия (n, %)	0	2 (4,2%)	
Шкала UPDRS, баллы	44 [32; 61]	72 [58; 93]	p<0,001*
Подшкала HADS -тревога, баллы	5 [2; 8]	7 [4; 9]	p=0,107
Подшкала HADS - депрессия, баллы	4 [3; 7]	8 [4; 10]	p=0,021*
Шкала MOCA, баллы	26 [23; 27]	23 [19; 25]	p=0,025*
Шкала NMSQ, баллы	6 [5; 8]	10 [7; 15]	p=0,005*
Опросник PDQ-39, баллы	23 [15; 50]	49 [29; 71]	p=0,015*
Формы:			p=0,962
- акин.-ригид.	6 (26,1%)	12 (25,5%)	
- смешанная	17 (73,9%)	35 (74,5%)	

* - p<0,05. Акин.- ригид. – акинетико-ригидная форма.

Полученные характеристики подгрупп были вполне ожидаемы. В группе пациентов, получающих терапию противопаркинсоническими препаратами, была большая длительность заболевания, тяжесть состояния по шкалам Hoehn-Yahr и UPDRS, была более выражена депрессия, более выраженное когнитивное снижение, чаще встречались немоторные проявления, и было большее снижение качества жизни.

Как показал анализ уровня экспрессии 12 изучаемых микроРНК в двух сформированных подгруппах, наличие противопаркинсонической терапии не приводило к статистически значимым изменениям профиля микроРНК.

Внутри подгруппы пациентов, получающих терапию, отдельно изучалось влияние на экспрессию микроРНК приема основных противопаркинсонических препаратов: леводопы, агонистов дофаминовых рецепторов, амантадинов. Процент пациентов, принимающих данные группы препаратов, представлен на рисунке 13.

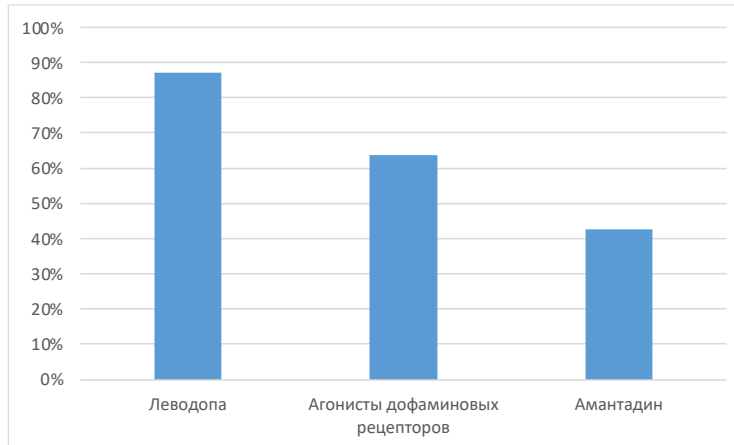


Рисунок 13. Терапия противопаркинсоническими препаратами в подгруппе пациентов, получающих лечение

В ряде случаев пациенты принимали комбинацию препаратов, поэтому, проводились попарные сравнения для каждой группы препаратов отдельно.

При приеме препаратов леводопы наблюдается снижение экспрессии miR-29a-3p: 0,52 [0,34; 0,8] для пациентов, получающих лечение, и 0,78 [0,57; 1,21] для пациентов, не принимающих препарат ($p=0,026$).

Агонисты дофаминовых рецепторов (АДР) снижали экспрессию miR-7-5p: 0,33 [0,09; 0,94] при приеме АДР и 1,38 [0,32; 2,2] без приема данных препаратов ($p=0,004$). Также АДР, наоборот, повышали экспрессию miR-30c-5p: 0,78 [0,36; 1,65] у пациентов, принимающих препараты АДР, и 0,48 [0,32; 1,08] у пациентов, не принимающих данные препараты ($p=0,049$).

Прием амантадинов также снижал экспрессию miR-7-5p: 0,48 [0,08; 0,91] у пациентов, получающих лечение амантадинами и 1,08 [0,23; 2,17] у пациентов, не получающих их ($p=0,03$).

3.1.4. Анализ экспрессии микроРНК в подгруппе пациентов, не получающих лечение

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

При попарном сравнении экспрессии микроРНК в трех группах (пациентов, не получающих лечение, получающих противопаркинсоническую терапию и контрольной группы) с помощью критерия Краскела-Уоллиса были выявлены отличия в экспрессии. Для miR-7-5p, miR-30c-5p, miR-29c-3p отличия наблюдались именно между подгруппой пациентов, не получающих лечения, и контрольной группой, но не между контрольной группой и подгруппой пациентов, принимающих препараты. Результаты представлен в таблице 8.

Таблица 8. Дифференциально экспрессирующиеся микроРНК в подгруппе пациентов с болезнью Паркинсона, не получающие противопаркинсоническую терапию, при сравнении с контрольной группой

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

* апостериорный анализ

Эти же микроРНК были определены как дифференциально экспрессирующиеся для общей группы БП (табл. 5), за исключением miR-29a-3p, для которой в этом анализе не было выявлено отличий в экспрессии.

Отдельно в подгруппе пациентов с БП, не получающих противопаркинсоническую терапию, были проанализированы корреляции экспрессии микроРНК с клинико-демографическими характеристиками. Не было

выявлено отличий в экспрессии микроРНК в зависимости от пола. Также при корреляционном анализе не было выявлено связей с возрастом на момент осмотра.

Выявлены корреляции экспрессии ряда микроРНК с длительностью заболевания, возрастом дебюта болезни и стадией заболевания по шкале Hoehn-Yahr. Результаты представлены в таблице 9. В числе выявленных связей с длительностью заболевания были определены 3 корреляции «средней силы»: для miR-129-5p, miR-132-3p и miR-146a-5p. При этом с баллом по шкале UPDRS и ее подшкалами корреляций обнаружено не было. Также не выявлено отличий в экспрессии микроРНК в зависимости формы заболевания.

Таблица 9. Корреляции экспрессии микроРНК с клиническими характеристиками в подгруппе пациентов с болезнью Паркинсона, не получающих лечение

МикроРНК	Длительность заболевания		Возраст начала заболевания		Стадия по шкале Hoehn-Yahr	
	R	p	R	p	R	p
miR-7-5p	0,432	0,042	--	--	--	--
miR-29a-3p	-0,460	0,027	0,416	0,049	--	--
miR-30c-5p	--	--	--	--	0,476	0,025
miR-126-3p	0,449	0,032	--	--	0,455	0,029
miR-129-5p	0,656#	0,001	--	--	--	--
miR-132-3p	0,522#	0,011	-0,478	0,021	--	--
miR-146a-5p	0,639#	0,001	--	--	--	--

“--“ - $p > 0,05$. # - $R > 0,5$

При корреляционном анализе не было выявлено связей уровней микроРНК с общим баллом по шкале HADS и подшкалой депрессии, при этом выявлена средней силы прямая корреляция между экспрессией miR-30c-5p и подшкалой тревоги HADS ($R=0,564$; $p=0,008$). Не было корреляций с баллами по шкале MoCA. С суммарным баллом по опроснику немоторных проявлений NMSQ корреляций не отмечалось. С суммарным баллом по опроснику качества жизни PDQ-39 – слабой силы обратная корреляция экспрессии miR-221-3p ($R=-0,482$; $p=0,043$).

3.1.5. Сравнительный анализ экспрессии микроРНК в структурах головного мозга, в периферических тканях и лейкоцитах крови при болезни Паркинсона

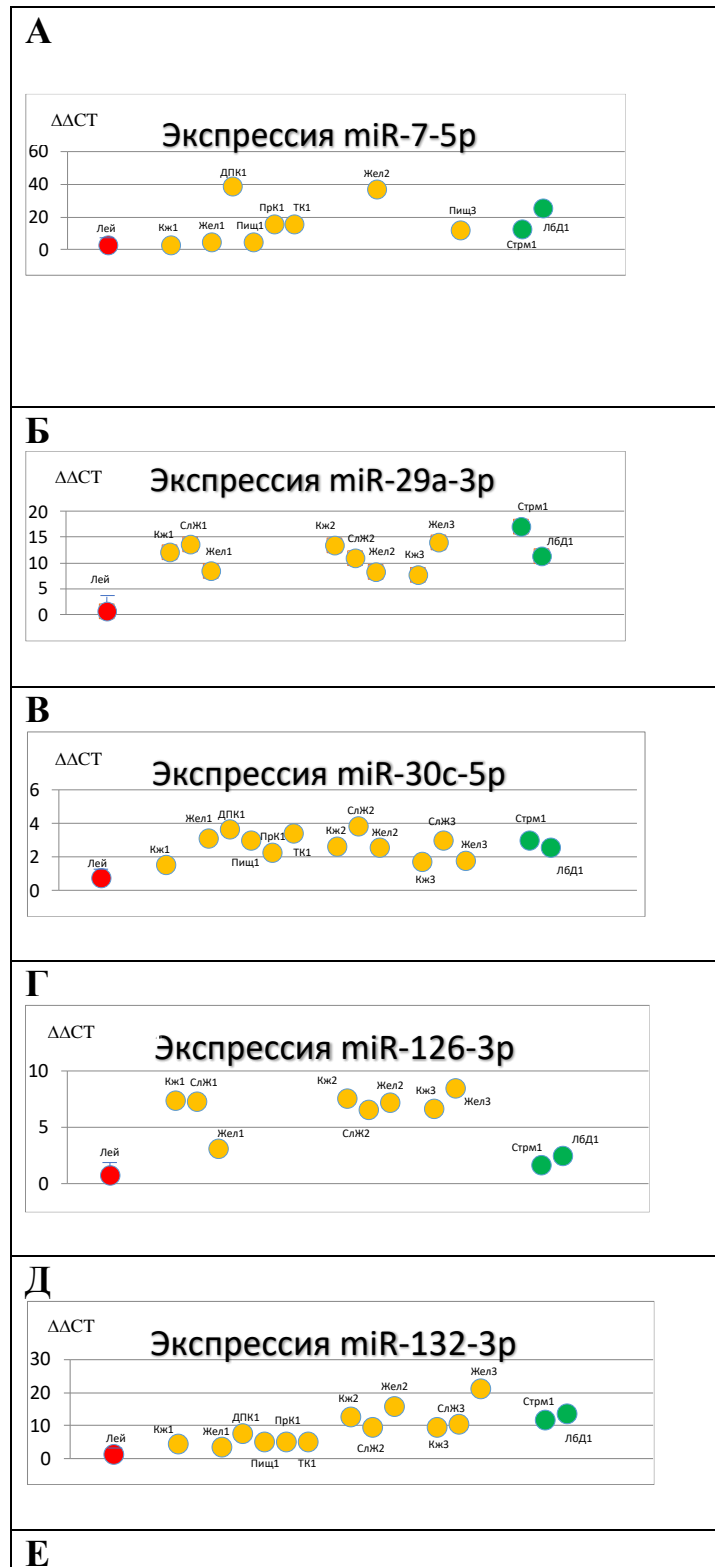
Для сравнительного анализа экспрессии микроРНК в различных периферических тканях и областях головного мозга были выбраны 7 микроРНК – miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-30c-5p, miR-126-3p, miR132-3p, miR-146a-5p, miR-221-3p. Три из них miR-7-5p, miR-29a-3p и miR-30c-5p по проведенному анализу на лейкоциты являются дифференциально экспрессирующимися при БП. Для четырех других miR-126-3p, miR132-3p, miR-146a-5p и miR-221-3p была показана связь с клиническими характеристиками заболевания в общей группе БП и в подгруппе БП на начальных стадиях.

Сравнительный анализ 7 микроРНК проводился в центральной нервной системе (стриатум, кора лобной доли) и в периферических тканях (кожа, слюнная железа, пищевод, желудок, двенадцатиперстная кишка, прямая кишка, толстая кишка). Обоснование выбора аутопсийного материала (органов, тканей и областей) представлено в главе 2 «Материалы и методы».

На рисунке 14 суммированы полученные данные по уровню экспрессии микроРНК в периферических тканях и в областях головного мозга. Также на этом рисунке приводятся значения соответствующих микроРНК в лейкоцитах, полученных в группе БП на предыдущем этапе работы, в виде медианы и квартилей, нормированные на группу контроля.

Как видно из рисунка, уровни экспрессии микроРНК в периферических тканях (отмечены на рисунке желтым) имели большой разброс и значительно варьировали. При этом зачастую уровень микроРНК в образцах периферических тканей превышал уровень экспрессии в лейкоцитах крови (отмечены красным). Уровни экспрессии микроРНК в структурах головного мозга относительно сравнимы между собой (стриатум – кора лобной доли), и также как и для

периферических тканей в большинстве случаев превышают уровни экспрессии соответствующих микроРНК в лейкоцитах крови.



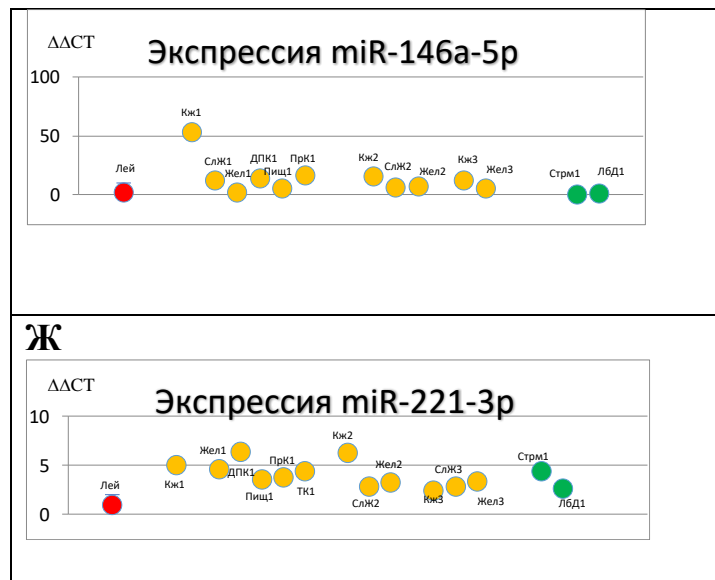


Рисунок 14. Уровень экспрессии микроРНК в лейкоцитах, в периферических тканях и в областях головного мозга

А - miR-7-5p, Б - miR-29a-3p, В - miR-30c-5p, Г - miR-126-3p, Д - miR-132-3p, Е - miR-146-5p, Ж - miR-221-3p.

Лей - лейкоциты, Кж - кожа, СлЖ - слюнная железа, Жлд - желудок, ДПК - двенадцатиперстная кишка, Пищ - пищевод, ПрК - прямая кишка, ТК - толстая кишка, Стрм - стриатум, ЛБД - лобная доля.

Красный маркер - лейкоциты крови, желтый - периферические ткани, зеленый - области головного мозга.

1 - пациент В., 2 - пациентка А., 3 - пациентка М.

На рисунках ось ординат представлена в разном масштабе, адаптированном для каждой микроРНК.

Учитывая важность соотношения уровней микроРНК в лейкоцитах и уровней этих же некодирующих РНК в структурах центральной нервной системы, мы провели сравнительное исследование по их сопоставимости.

Для этого был проведен сравнительный анализ собственных результатов по соотношению уровней экспрессии в разных областях, полученных методом ПЦР реального времени, с данными атласа экспрессии микроРНК - DIANA Tools, microRNA Tissue Expression Database [93], где представлены данные по здоровым

лицам, полученные при NGS-секвенировании транскриптома. Результаты оценки сопоставимости представлены в приложении 9.

Для всех микроРНК был продемонстрирован схожий паттерн отношения экспрессии «головной мозг – лейкоциты» при сравнении собственных результатов и данных атласа. Таким образом, уровни трех микроРНК: miR-7-5p, miR-29a-3p и miR132-3p были значительно повышены в головном мозге по сравнению с лейкоцитами (в десять раз и больше). Существенное повышение в головном мозге по сравнению с лейкоцитами отмечалось для miR-30c-5p, miR-126-3p и miR-221-3p (в 2-5 раз). Тогда как для miR-146a-5p был характерен относительно пониженный уровень экспрессии в структурах головного мозга и по нашим данным, и по данным атласа miTED.

3.2. Экспрессия 760 генов, ассоциированных с развитием нейропатологического процесса при болезни Паркинсона

3.2.1 Экспрессия генов, ассоциированных с развитием нейропатологического процесса, в группе пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе

При сравнении экспрессии в мультиплексном режиме с помощью панели Neuropathology Panel (Nanostring) в общей группе БП по сравнению с группой контроля выявлены различия в экспрессии двух генов ($q < 0,05$), которые, однако, не достигли необходимого значения FC: ген *GTF2H1* (FC=1,16; $q=0,02$) и ген *CDKN1A* (FC=0,7; $q=0,03$).

Подобным же образом проведено сравнение подгруппы Н-БП – пациентов с БП, не получающих противопаркинсоническую терапию, на начальных стадиях заболевания – с контрольной группой. Были выявлены отличия в экспрессии для трех генов. Для одного из них – *FUS* – различия по FC не достигали необходимого уровня (FC=0,76, $q=0,03$), тогда как два других гена – *CDKN1A* и *CPT1B* – подходили под критерии ДЭГ и представлены в таблице 10.

Таблица 10. Дифференциально экспрессирующиеся гены в группе начальной болезни Паркинсона по сравнению с контрольной группой

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

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

Развернутая аннотация данных генов по Gene Ontology представлена в приложении 10.

Отдельно для каждого из генов был проведен ROC-анализ (табл. 11). Дискриминационную значимость экспрессии обоих генов можно отнести к «хорошему» уровню (“good”, $AUC > 0,8$). Также из двух переменных была составлена логистическая регрессионная модель с последующей оценкой с помощью ROC-анализа (рис. 15). AUC модели составила 0,91 (доверительный интервал – $[0,814; 1]$), чувствительность – 87,5%, специфичность – 77%, то есть модель потенциально можно отнести по условной шкале к уровню с «отличной» (“excellent”, $AUC > 0,9$) диагностической значимостью. Данный результат требует валидации на независимых выборках.

Таблица 11. ROC-анализ для двух дифференциально экспрессирующихся генов – *CDKN1A*, *CPT1B* – при начальной болезни Паркинсона

Ген	AUC [ДИ]	Se	Sp	Порог
<i>CDKN1A</i>	0,856 [0,712; 0,99]	0,813	0,769	56,9
<i>CPT1B</i>	0,875 [0,752; 0,998]	0,813	0,769	34,8

AUC – значение площади под ROC-кривой. Se – чувствительность. Sp – специфичность.

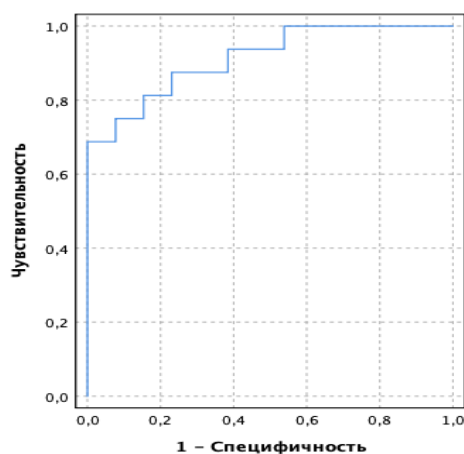


Рисунок 15. ROC-анализ для комбинации двух генов, имеющих дифференциальную экспрессию при начальных стадиях БП и в контрольной группе

В качестве иллюстрации возможности использования данной математической модели приведен клинический случай типичного пациента с начальной стадией БП с оценкой экспрессии двух значимых генов.

Пациентка Б.Л., 66 лет, обратилась с жалобами на дрожание и скованность в левой руке, замедленность при движениях.

С 62 лет стала отмечать эпизодическое дрожание и неловкость при движениях в левой кисти. Получала физиотерапию, нейрометаболическую терапию. В связи с усилением замедленности, дрожания, обратилась повторно. Заболевание медленно прогрессирует. Противопаркинсоническую терапию ранее не получала.

Сопутствующие заболевания: артериальная гипертензия. Семейный анамнез не отягощен по неврологическим заболеваниям.

В неврологическом статусе: Умеренная гипомимия. Умеренное повышение мышечного тонуса по пластическому типу $S > D$ с феноменом «зубчатого колеса» левой руке. Мелкоамплитудный тремор покоя левой руки, усиливающийся при волнении. Олигобрадикинезия, больше в правых конечностях. Ходьба слегка замедлена, ахейрокинез слева. Постуральных нарушений нет. При оценке по шкале UPDRS общий балл 61. У пациентки отсутствовали выраженные когнитивные нарушения (24 баллов по MoCA), тревожные и депрессивные расстройства (6 баллов по подшкале тревоги шкалы HADS, 0 баллов по шкале депрессии). Пациентка имела 6 баллов по шкале NMSQ и 8 баллов по шкале PDQ-39.

Таким образом, пациентка страдает болезнью Паркинсона в течение 4 лет, с дебютом заболевания в 62 года. Пациентка имеет 2 стадию по шкале Hoehn-Yahr.

При оценке экспрессии генов была выявлена экспрессия CDKN1A равная 40,07 (снижена, пороговое значение – 56,9) и CTR1B - 16,34 (снижена, пороговое значение -34,8), что при использовании как классификатора по отдельным генам, так и модель логистической регрессии, классифицирует данную пациентку как «пациента с болезнью Паркинсона».

При сопоставлении уровней экспрессии генов при развернутой стадии БП с контрольной группой было показано повышение экспрессии уровня *LRP1* при БП (Таблица 12).

Подробная аннотация этого гена по Gene Ontology приведена в приложении 10.

Таблица 12. Дифференциально экспрессирующиеся гены в группе пациентов с развернутыми стадиями болезни Паркинсона по сравнению с контрольной группой

Ген	П-БП (N=16)	К (N=16)	FC	p	q
<i>LRPI</i>	118,0±34,8	69,6±27,4	1,7	0,0004	0,01

П-БП – группа пациентов с развернутыми стадиями болезни Паркинсона. К – контрольная группа. FC – кратность отношения величин полученных в группах. q – значение p после коррекции на множественные сравнения.

3.2.2 Сопоставление уровня экспрессии генов нейропатологии с демографическими характеристиками, моторными и немоторными проявлениями болезни Паркинсона

В исследуемой выборке не было выявлено значимых отличий в экспрессии генов при сравнении групп мужчин и женщин ($q > 0,05$). Также в общей группе БП не было выявлено корреляций экспрессии генов нейропатологии с возрастом пациентов.

Корреляций экспрессии генов с возрастом дебюта заболевания не было выявлено. Были выявлены многочисленные корреляционные связи между уровнями экспрессии ряда генов и клиническими маркерами прогрессирования заболевания – длительностью болезни и тяжестью состояния по шкале Hoehn-Yahr, UPDRS-I ($R > 0,3$, $p < 0,01$, табл. 13). Значимых корреляций с общим баллом шкалы UPDRS, 2-ой и 3-ей ее подшкалами не выявлено.

Как видно из таблицы 13 многие гены коррелировали и с длительностью, и с тяжестью заболевания. Наибольшей степенью достоверности обладает корреляция экспрессии гена *CPT1B* с длительностью заболевания (рис. 16).

Этот же ген *CPT1B* был выявлен как дифференциально экспрессирующийся при сравнении пациентов начальных стадий и пациентов развернутых стадий БП. На развернутых стадиях его экспрессия была выше по сравнению с начальными стадиями (табл. 14).

Таблица 13. Корреляционные связи между экспрессией генов нейропатологии и клиническими маркерами прогрессирования болезни Паркинсона

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

“--“ - $p > 0,01$. # - $q < 0,05$

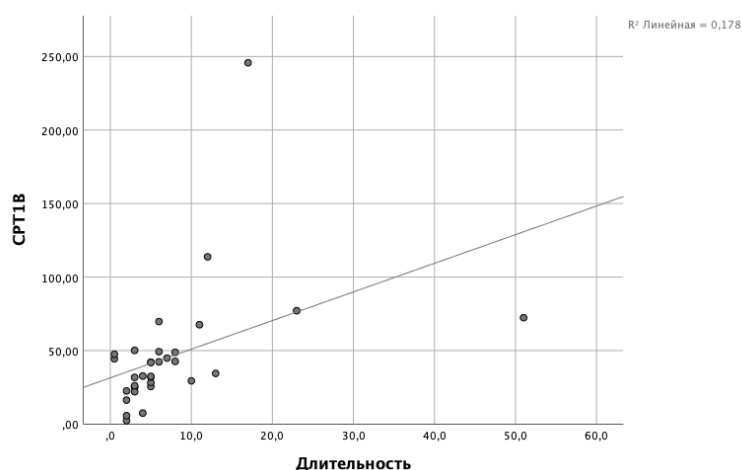


Рисунок 16. Корреляция уровня экспрессии гена *CPT1B* с длительностью болезни Паркинсона

Таблица 14. Дифференциальная экспрессия гена *CPT1B* у пациентов на развернутых стадиях по сравнению с начальными стадиями болезни Паркинсона

Ген	Н-БП (N=13)	П-БП (N=16)	FC	p	q
<i>CPT1B</i>	36,4±13,5	64,8±40,1	1,78	0,0005	0,01

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

При сравнении уровня экспрессии генов нейропатологии с формой заболевания было выявлено снижение экспрессии *USP21* при смешанной форме (34,8±11,5 против 48,8±3,4 при акинетико-ригидной форме; FC=0,71; p<0,001; q<0,001) и повышение экспрессии *PLCB1* при смешанной форме (23,2±5,4 против 20±0,01 при акинетико-ригидной форме; FC=1,16; p=0,0014; q=0,03). Однако данные результаты не удовлетворяли критериям дифференциальной экспрессии генов по критерию FC>1,5 или <0,66.

Проводился подробный корреляционный анализ немоторных проявлений БП. Была выявлена тенденция к обратной корреляции между тяжестью когнитивных расстройств (по шкале MoCA) и экспрессией *SLC11A1*, баллом по шкале депрессии HADS и экспрессией генов *NLRP3*, *GLS*, а также общим баллом немоторных симптомов (по шкале NMSQ) и экспрессией *SAMK4* (прямая корреляция) и *POLR2J* (обратная корреляция) (табл. 15).

Также не было выявлено значимых корреляций между экспрессией 760 генов нейропатологии и качеством жизни пациентов, оцениваемом с помощью опросника PDQ-39, отмечалась тенденция к прямой корреляции с экспрессией *HRAS* (R=0,681, p=0,001) и *GNB5* (R=0,585, p=0,005).

Таблица 15. Корреляционный анализ немоторных проявлений и экспрессии генов нейропатологии

Ген	HADS - депрессия		MoCA		NMSQ	
	R	p	R	p	R	p
<i>SLC11A1</i>	--	--	-0,512	0,005	--	--
<i>POLR2J</i>	--	--	--	--	-0,569	0,007
<i>NLRP3</i>	0,499	0,006	--	--	--	--
<i>GLS</i>	-0,500	0,006	--	--	--	--
<i>CAMK4</i>	--	--	--	--	0,555	0,009

“--“ - $p > 0,01$.

Анализ влияния противопаркинсонической терапии на экспрессию генов нейропатологии отдельно не проводился, поскольку разделение группы П-БП, состоящей из 16 пациентов, на более малочисленные подгруппы не давало достаточной статистической значимости для дальнейших выводов.

В выборке П-БП был один пациент, получающий терапию энтакапоном в составе комплексной противопаркинсонической терапии. Энтакапон является ингибитором катехол-О-метилтрансферазы, которая, в свою очередь, кодируется геном *SOMT*. В панель Neuropathology Nanostring входит оценка уровня экспрессии гена *SOMT*, в связи с этим случай пациента, получающего энтакапон, приведен ниже как клинический пример.

Пациент П.А., 66 лет, обратился с жалобами на дрожание обеих рук, застывания при ходьбе, замедленность движений, внезапные периоды «выключения», колебания состояния в зависимости от приема препаратов, эпизодическое недержание мочи в ночное время, императивные позывы на мочеиспускание.

Пациент считает себя больным с 49 лет, когда появились жалобы на быструю утомляемость, неловкость в левой руке, дрожание левой руки. В 52 года установлен диагноз «болезни Паркинсона», начата терапия прамипексолом с положительным эффектом. В 56 лет к терапии добавлены препараты леводопы. Заболевание медленно прогрессировало, в 61 год начались затруднения при ходьбе. На момент осмотра пациент получал леводопу/карбидопу 250мг/25мг суммарно 3 т. в сутки, леводопу/карбидопу/энтакапон 150мг/37,5мг/200мг 1 т. 1 раз в день, прамипексол пролонгированного действия 3мг 1т. 1 раз в день, амантадин 100 мг 2 раза в день.

Сопутствующие заболевания: Атеросклероз магистральных артерий головы. Ишемическая болезнь сердца. Атеросклероз аорты, коронарных артерий.

Семейный анамнез не отягощен по неврологическим заболеваниям.

В неврологическом статусе: Брадифрения. Гипосмия. Движения глазных яблок слегка ограничено вверх. Снижена конвергенция. Гипомимия. Гипокинетическая дизартрофония. Мышечный тонус повышен по пластическому типу, больше слева, феномен «зубчатого колеса» в сгибателях и разгибателях обеих кистей. Умеренная гипокинезия при выполнении динамических проб, больше слева. Умеренный тремор покоя и постурально-кинетический тремор рук, больше слева. В пробе Тевенара ретропульсия более 3 шагов. Походка замедленная, выраженная микробазия. Ахейрокинез, больше слева. Умеренная камптокормия. Императивные позывы к мочеиспусканию, недержание мочи.

Таким образом, пациент страдает болезнью Паркинсона в течение 17 лет, с дебютом заболевания в 49 лет. В связи с наличием постуральных нарушений пациент имеет 3 стадию по шкале Hoehn-Yahr. При оценке по шкале UPDRS общий балл - 98. При оценке когнитивных функций - 22 балла по шкале MoCA. Аффективные нарушения были субклиническими: по подшкале депрессии пациент набрал 8 баллов, что соответствует субклинической депрессии, по подшкале тревоги – 4 балла, что является нормой. По опроснику PDQ-39 – 51 балл. По шкале NMSQ – 14 баллов.

При оценке экспрессии генов была выявлена относительно высокая экспрессия гена *COMT* – 45,2 (среднее значение в группе БП– $38,5 \pm 13,8$, при этом в контрольной группе значения ниже – $30,8 \pm 18,1$).

Таким образом, у данного пациента значение экспрессии *COMT* находится в верхнем диапазоне и превышает средние значения в группе П-БП, и значительно превышает значения в контрольной группе, что может рассматриваться как компенсаторная реакция на фоне лечения ингибиторами *COMT*.

3.2.3 Анализ экспрессии генов, связанных с развитием моногенных форм болезни Паркинсона

Около 5-10% случаев БП вызываются мутациями в определенных генах[159]. В связи с этим была отдельно проанализирована экспрессия генов, мутации в которых вызывают наследственные формы БП. Значения экспрессии этих генов у пациентов с БП и в контрольной группе представлены в таблице 16.

Таблица 16. Экспрессия генов, ответственных за развитие моногенных форм* болезни Паркинсона

Ген	БП (N=29)	К (N=16)	FC	p	q
<i>SNCA (PARK1)</i>	173,2±64,5	235,6±111,7	0,73	0,012	0,25
<i>LRRK2 (PARK8)</i>	1289,1 ±443,0	1017,6±409,4	1,27	0,012	1,00
<i>PRKN(PARK2)</i>	1,9±1,5	3,0±2,3	0,65	0,113	1,00
<i>DJI (PARK7)</i>	738,4±139,5	676,2±123,0	1,09	0,154	1,00
<i>UCHL1 (PARK5)</i>	8,8±7,8	11,4±7,9	0,77	0,200	1,00
<i>PLA2G6 (PARK14)</i>	43,0±15,4	48,3±15,8	0,89	0,801	1,00
<i>ATP13A2 (PARK9)</i>	36,6±11,8	40,3±15,4	0,91	0,377	1,00
<i>GBA</i>	237,1±41,7	226,5±51,8	1,05	0,539	1,00
<i>HTRA2 (PARK13)</i>	44,6±20,4	47,8±16,5	0,93	0,463	1,00
<i>VPS35 (PARK17)</i>	432,4±72,7	443,4±55,2	0,97	0,526	1,00
<i>SYNJ1 (PARK20)</i>	102,9±25,4	100,9±26,8	1,02	0,580	1,00
<i>PINK1(PARK6)</i>	165,8±45,2	167,0±67,7	0,99	0,783	1,00

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

Статистически значимых отличий экспрессии при БП и в контрольной группе выявлено не было. Тем не менее, наблюдалась тенденция к снижению уровня экспрессии (в 1,4 раза) гена *SNCA*, кодирующего альфа-синуклеин, при БП по сравнению с контрольной группой ($p=0,01$).

3.2.4. Сопоставительный анализ дифференциально экспрессирующихся генов нейропатологии и микроРНК

Преимуществом данной работы явилась возможность исследования корреляций между экспрессией генов нейропатологии и экспрессии микроРНК, так как выборка во второй части работы (экспрессия генов) формировалась из выборки в первой части работы (экспрессия микроРНК). В связи с этим был проведен корреляционный анализ четырех дифференциально экспрессирующихся микроРНК (miR-29c-3p, miR-7-5p, miR-30-5p и miR-29a-3p) с тремя генами нейропатологии, показавшими дифференциальную экспрессию (*CDKN1A*, *CPT1B*

и *LRP1*), а также с геном *SNCA*, кодирующим альфа-синуклеин, который является основным нейropатологическим маркером БП и который продемонстрировал тенденцию к дифференциальной экспрессии. Были выявлены две обратные корреляция экспрессии miR-7-5p с *CPT1B* ($R=-0,49$, $p=0,005$) и экспрессии miR-7-5p с *LRP1* ($R=-0,46$; $p=0,014$).

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

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Анализ изучаемых микроРНК при болезни Паркинсона

Изменение экспрессии кодирующих и некодирующих РНК играют важную роль в развитии нейродегенеративных заболеваний. Множество исследований, посвященных патогенезу нейродегенеративных заболеваний, с проведением сложного биоинформатического анализа не выявляют какого-то одного, критического звена в их развитии и говорят о перестройках целых ансамблей различных кодирующих РНК, микроРНК, длинных некодирующих РНК[164]. В свою очередь, изменения на уровне транскриптома могут происходить по разным причинам, например, непосредственно связанными с самой нейродегенерацией, с ее клиническими проявлениями (например, последствиями нарушениями сна, постоянной ритмической мышечной активностью, нарушениями перистальтики кишечника и др.), с проводимой медикаментозной терапией. Таким образом, изменения на уровне сетей РНК являются интегральным маркером процессов, происходящих в организме при развитии заболевания.

4.1.1 Анализ биомаркерной функции экспрессии микроРНК

В работе были представлены данные об экспрессии генов и микроРНК в группе пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе.

В предыдущих исследованиях биомаркерной роли микроРНК были продемонстрированы противоречивые результаты, что может быть связано с различием в изучаемых субстратах и методах детекции микроРНК, а также с большой вариабельностью экспрессии микроРНК. Это может являться следствием действия различных факторов, в том числе не связанных с основным заболеванием.

Для проведения нашей работы были отобраны 12 микроРНК с наиболее воспроизводимым профилем экспрессии в предыдущих исследованиях.

В нашем исследовании было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии miR-29c-3p и miR-7-5p при БП. MiR-29a-3p и miR-30c-5p, напротив, продемонстрировали снижение экспрессии при БП. На выборке пациентов с начальными стадиями заболевания подтверждена дифференциальная экспрессия для miR-29c-3p, miR-7-5p и miR-30c-5p (кроме miR-29a-3p).

По отдельности данные микроРНК дают низкий (“poor”) уровень диагностической значимости. Поэтому была проанализирована их комбинация. Комбинация указанных микроРНК позволяет отличить БП от контрольной группы с дискриминационной значимостью $AUC=0,79$, что соответствует «приемлемому» (“fair”) уровню и позволяет рассматривать данную комбинацию в качестве потенциального диагностического биомаркера БП.

Семейство miR-29 состоит из 3 микроРНК: miR-29a, miR-29b и miR-29c. При изучении их в качестве биомаркеров было неоднократно показано снижение miR-29a и miR-29c в крови у пациентов с БП, и снижение miR-29a и miR-29c нарастало по мере прогрессирования заболевания по шкале Hoehn-Yahr [27]. В проспективном исследовании у пациентов группы риска синуклеинопатий – пациентов с нарушениями поведения в REM-фазу сна, которым впоследствии был установлен диагноз синуклеинопатии, было выявлено снижение обеих микроРНК, что позволяет рассматривать их в качестве прогностического маркера БП [67]. Отдельно miR-29a исследовалась в нескольких работах, и было показано ее снижение, что соответствует нашим результатам [29, 35, 123]. В работе на турецкой популяции [139] было показано увеличение miR-29c у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой, что соответствует нашим результатам, но противоречит большинству имеющихся данных [35, 119, 123]. В предыдущих исследованиях были выявлены ассоциации и с клинической картиной: при болезни Паркинсона с деменцией экспрессия семейства miR-29 была ниже по сравнению с группой БП с нормальными когнитивными функциями [78]. В нашем исследовании отличий экспрессии этих микроРНК в зависимости от когнитивных нарушений не было выявлено. Serafin и соавторами было выявлено повышение экспрессии miR-29a только у пациентов, получающих терапию леводопой, но не у пациентов, не

получавших лечения [176]. Это не соответствует нашим результатам: экспрессия miR-29a-3p снижалась примерно в полтора раза при леводопа-терапии. Что касается работ, посвященных иным субстратам, было выявлено снижение экспрессии miR-29a-3p and miR-29c-3p, в слюне у пациентов с БП. При этом работ, посвященных роли семейства miR-29 непосредственно в патогенезе БП, немного. Исходя из эксперимента на клеточных культурах, повышение экспрессии семейства miR-29 имеет протекторную роль при воздействии нейротоксинами через воздействие на пути нейровоспаления[20, 206].

Согласно имеющимся данным, miR-7 снижает экспрессию альфа-синуклеина [61, 90], нарушение процессинга которого является одним из ключевых звеньев патогенеза БП. Показано снижение экспрессии miR-7 в головном мозге у пациентов с БП, за счет чего, вероятно, увеличивается экспрессия альфа-синуклеина[190]. Также было показано, что снижение экспрессии miR-7 увеличивает вероятность апоптоза и ухудшает рост клеток культуры дофаминергических нейронов[109]. В работе Алиевой и соавт. было показано, что уровень miR-7 значимо увеличен у пациентов, которые не получали терапию леводопой, по сравнению с теми, кто получал противопаркинсоническую терапию. В нашей работе уровень экспрессии miR-7-5p был значимо выше, чем в контрольной группе, при анализе подгрупп становится очевидно, что экспрессия miR-7 ниже в группах пациентов, которые получают лечение агонистами дофаминовых рецепторов и амантадином.

Уровень miR-30c-1 был снижен при БП по сравнению с контролем в работах Valletunga и Martins, что соответствует полученным нами результатам[123, 196]. Не было продемонстрировано прямого влияния miR-30c-1 на экспрессию генов, ответственных за развитие БП, но с помощью различных баз данных было показано, что предположительные цели для данной микроРНК (*Notch1*, *HDAC4*, *BECN1*, *UBE2I*, *HSPA4* и *DNMT1*) играют роль в регуляции аутофагии и апоптоза дофаминергических клеток[197].

4.1.2 Сопоставление уровня экспрессии микроРНК с демографическими характеристиками и клиническими проявлениями болезни Паркинсона

Было проведено сопоставление уровня экспрессии микроРНК с демографическими характеристиками изучаемой группы.

При исследовании корреляции уровня микроРНК с длительностью БП были выявлены слабые взаимосвязи длительности заболевания с экспрессией четырех микроРНК: miR-29a-3p, miR-30c-5, miR-126-3p, miR-129-5p. В группе начальных стадий БП были выявлены 6 корреляций с длительностью: три слабой силы - miR-7-5p, miR-29a-3p, miR-126-3p, и три средней силы - miR-129-5p, miR-132-3p, miR-146a-5p. Не было выявлено связей с полом, возрастом на момент исследования и возрастом дебюта (за исключением слабых связей в группе начальных стадий БП между возрастом дебюта и miR-29a-3p, miR-132-3p).

По полученным данным miR-129-5p прямо коррелировала с длительностью БП: в общей группе БП корреляция была слабой силы, тогда как в подгруппе начальных стадий – средней силы. В предыдущих исследованиях было продемонстрировано, что miR-129 имеет ингибирующее влияние на *SNCA* [216]. *Malat1* (Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), для которого было показано повышение при БП[98], связывается с miR-129 и снижает ее экспрессию, таким образом уменьшая ее ингибирующее влияние на *SNCA*. Таким образом, предположительно, путь *Malat1/miR-129/SCNA* играет важную роль в развитии БП[211]. В крови пациентов с БП было выявлено повышение miR-129 по сравнению с контрольной группой [21].

MiR-126-3p прямо коррелировала с длительностью заболевания (в общей группе и в подгруппе начальных стадий) и со стадией по Hoehn-Yahr (в подгруппе начальных стадий), хотя эти связи и имеют слабую силу. Повышение miR-126-3p ранее было выявлено в дофаминергических нейронах пациентов с БП[95]. Повышение экспрессии miR-126 снижало выживаемость первичных дофаминергических нейронов и SH-SY5Y клеток, повышая их чувствительность к токсичности 6-OHDA и ставроспорина, а также ассоциированных с болезнью

Альцгеймера пептидов бета-амилоида 1-42[96]. Повышение экспрессии miR-126 снижало экспрессию p85 β , IRS-1 и SPRED1, фосфорилированной АКТ и внеклеточной киназы (ERK). Таким образом предположительно miR-126 снижает активность сигнального пути инсулина/IGF-1/фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K)/АКТ и ERK, провоцируя гибель нейронов [95]. По данным Gui и соавторов miR-126 снижалась в экзосомах цереброспинальной жидкости при болезни Паркинсона, а по данным Martins и соавторов – снижение было выявлено и в моноцитах крови [123].

Экспрессия miR-132-3p в работе коррелировала с длительностью заболевания и возрастом дебюта БП в группе пациентов, не получающих лечение противопаркинсоническими препаратами. В исследованиях на мышинных моделях БП показал повышенную экспрессию miR-132-3p в среднем мозге. Обсуждается его влияние на транскрипционный фактор Nurr1, который обеспечивает выживание и дифференцировку дофаминергическим нейронам среднего мозга [154] Alieva и соавторы изменение экспрессии miR-132 у пациентов с БП, получавших терапию, по сравнению с теми, кто не получал лечение противопаркинсоническими препаратами [21]. Briggs и соавторы, также описывают повышение miR-132 в нейронах черной субстанции [40].

MiR-146a-5p отрицательно коррелирует с длительностью заболевания в группе пациентов, не получавших лечение. Ранее в нескольких исследованиях было показано снижение его экспрессии в крови у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [43, 60, 119].

Литературные данные относительно экспрессии miR-29a-3p и miR-30c-5p были обсуждены ранее, так как данные микроРНК снижали свою экспрессию при БП в сравнении с контрольной группой. При этом, интересно то, что miR-29a-3p имеет обратную корреляцию с длительностью заболевания то есть, по мере прогрессирования заболевания экспрессия данной микроРНК постепенно снижалась, а miR-30c-5p, напротив имеет прямую корреляцию с длительностью заболевания, таким образом, можно предположить, что в начале заболевания

снижение экспрессии данной микроРНК максимально, что может говорить о вовлечении в запускающие механизмы патогенеза БП.

Среди набора микроРНК потенциальным маркером прогрессирования заболевания, наряду с miR-126-3p, может быть miR-30c-5p, так как она имеет корреляцию с тяжестью заболевания по шкале Hoehn-Yahr (в общей группе БП и в подгруппе начальных стадий). Тем не менее, данная корреляция обладает слабой силой, требуются дальнейшие валидационные исследования, чтобы изучить биомаркерный потенциал данной микроРНК относительно прогрессирования БП. Корреляций уровня экспрессии микроРНК с данными по шкалам UPDRS выявлено не было.

В работе было выявлено повышение miR-29a-3p при акинетико-ригидной форме по сравнению со смешанной (только в общей группе БП, но не в подгруппе начальных стадий). Это может быть связано со значительной клинической и патогенетической гетерогенностью БП[92], а также с тем, что экспрессия микроРНК в крови может изменяться по разным причинам, в том числе причиной может служить наличие мышечного тремора, постоянной мышечной активности, или назначение леводопа-терапии, которая по нашим данным также влияет на уровень miR-29a-3p.

Кроме того, экспрессия ранее обсужденной микроРНК miR-30c-5p была несколько повышена при депрессии в общей группе БП и наблюдалась прямая корреляция средней силы с тревогой по шкале HADS в подгруппе начальных стадий БП. Следовательно уровень экспрессии miR-30c-5p нарастал с аффективными нарушениями наряду с длительностью БП и тяжестью по шкале Hoehn-Yahr. Известно, что у пациентов с большей длительностью заболевания депрессивные/тревожные расстройства встречаются чаще, поэтому изолированное влияние аффективных нарушений или тяжести и длительности заболевания на уровень miR-30c-5p в данном случае выделить затруднительно.

Для анализа влияния наличия или отсутствия когнитивных нарушений на экспрессию микроРНК среди пациентов основной группы была выделена группа пациентов с деменцией, у которых были выявлены более высокие баллы по

клиническим шкалам, которые оценивают моторные и немоторные симптомы, а также более высокое превалирование акинетико-ригидной формы при наличии когнитивных нарушений. Эти данные соответствуют литературным [92]. Влияния когнитивных нарушений на уровень микроРНК выявлено не было.

При оценке профиля немоторных проявлений по данным опросника NMSQ была выявлена слабая прямая корреляция miR-106a-5p и суммарного балла по шкале NMSQ. Ранее в литературе было показано снижение miR-106a-5p в дофаминергических нейронах черной субстанции [40], а также повышение уровня данной микроРНК при физических нагрузках у пациентов с БП, что также ассоциировано и с улучшением когнитивных функций [180]. Таким образом, повышение miR-106a-5p может потенциально оказывать протективную роль, и повышаться компенсаторно при нарастании тяжести немоторных симптомов.

При анализе баллов по шкале качества жизни было выявлено, что наибольший вклад в снижение качества жизни вносит нарушение подвижности. В подгруппе начальных стадий БП общий балл по опроснику PDQ-39 обратно коррелировал с уровнем экспрессии miR-221-3p (слабая корреляционная связь). Ранее в литературе показана дифференциальная экспрессия данной микроРНК в крови у пациентов с БП, а одной из мишеней для miR-221 является ген *PARK2* [59, 190]. В общей группе БП была выявлена слабая корреляция экспрессии miR-146a-5p с подшкалой «Общение». Интересно, что в подгруппе начальных стадий БП у нелеченых больных отмечалась средней силы корреляция miR-146a-5p с длительностью заболевания, а длительность, как известно, напрямую связана с качеством жизни больных с БП.

4.1.3. Анализ уровня экспрессии изучаемых микроРНК в зависимости от противопаркинсонической терапии

При распределении пациентов с БП по группам в зависимости от наличия или отсутствия противопаркинсонической терапии были получены предсказуемые отличия между группой пациентов, получающих лечение, и не получающих. Так,

в группе пациентов, которые не получали противопаркинсоническую терапию, была ниже длительность заболевания, баллы по шкале Hoehn-Yahr и UPDRS, ниже было количество немоторных нарушений по шкале NMSQ, выше качество жизни по шкале PDQ-39, реже встречались депрессивные и когнитивные нарушения, которые появляются обычно по мере прогрессирования заболевания[34, 65].

Противопаркинсоническая терапия оказывала влияние на экспрессию микроРНК у пациентов с БП. При приеме препаратов леводопы наблюдается значимое снижение экспрессии miR-29a-3p. Таким образом, прием препаратов леводопы дополнительно снижает miR-29a-3p, при этом данная группа препаратов назначается преимущественно на продвинутых стадиях заболевания (что отражается в отрицательной корреляции экспрессии данной микроРНК с длительностью заболевания).

Агонисты дофаминовых рецепторов существенно снижали экспрессию miR-7-5p и несколько повышали экспрессию miR-30c-5p. Прием амантадинов также несколько снижал экспрессию miR-7-5p. Эти изменения обратны тем, которые наблюдаются при сравнении БП с контрольной группой: при БП miR-7-5p повышена в подгруппе начальных стадий в >6 раз, а в общей группе БП - в >3 раз. Возможно именно назначение агонистов дофаминовых рецепторов и амантадинов, которые снижают экспрессию микроРНК, может объяснить это условное снижение кратности уровня miR-7-5p.

4.1.4. Сравнительный анализ экспрессии значимых микроРНК в структурах головного мозга и в периферических тканях при болезни Паркинсона

Экспрессия микроРНК в различных тканях, согласно литературным данным, отличается[134, 187]. В нашей работе мы также показали существенную вариабельность уровней микроРНК, которая зависит от исследуемой ткани. В частности, было показано, что большинство микроРНК количественно более представлено в различных периферических тканях и в структурах головного мозга по сравнению с лейкоцитами. Вероятно это связано с тем, что функциональная

регуляция некодирующих РНК наиболее значима в высокоспециализированных клетках, особенно в клетках центральной нервной системы[18, 134]. Известно, что представленность и разнообразие микроРНК в головном мозге является одной из самых высоких в организме, и микроРНК являются важным регулирующим механизмом в процессах его функционирования[39].

С другой стороны такая тканеспецифичность микроРНК ставит под вопрос о возможной экстраполяции данных, полученных в клетках периферической крови, на клетки центральной нервной системы для изучения патогенеза заболевания. Клетки периферической крови и выявляемые в них изменения микроРНК при нейродегенерации скорее следует рассматривать в качестве доступного диагностического биомаркера заболевания. Тогда как однонаправленность изменений экспрессии микроРНК в крови и в головном мозге при БП требуют дальнейших подтверждений с изучением большего количества образцов «патологии» и «нормы».

В работе проводилось сопоставление с общедоступной базой данных по экспрессии микроРНК в различных тканях[93]. Подобные базы данных стали появляться только в последнее время, и пока, к сожалению, они являются разрозненными, неунифицированными и фрагментарными (в отличие от аналогичных баз по матричным РНК). Однако их появление всё же позволяют проводить сопоставления с собственными, полученными данными. Приведенное в данной работе подобное сравнение показало, что несмотря на различия в методах определения экспрессии микроРНК (ПЦР реального времени vs. секвенирование) и в «статусе» обследованных (пациенты с БП vs. здоровые лица) были получены сопоставимые результаты.

Основными ограничениями данной работы являются малое количество доступных для исследования образцов, во вторых, сопоставление с «нормой» по общедоступной базе, а не по собственным результатам и, в-третьих, сопутствующая соматическая патология в двух исследованных аутопсийных случаях из трех. При этом, что касается исследованных образцов областей головного мозга, то в данном аутопсийном случае отсутствовала значимая

хроническая патология, которая могла бы исказить полученные результаты. Из возможных преимуществ работы является предшествующее патоморфологическое исследование материала центральной нервной системы на предмет специфичных для БП изменений, при котором были обнаружены и верифицированы тельца Леви и накопления фосфорилированного альфа-синуклеина.

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

4.2. Экспрессия 760 генов нейропатологии при болезни Паркинсона

4.2.1. Экспрессия генов нейропатологии в группе пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе

Работ, посвященных мультиплексному исследованию экспрессии генов и изучению транскриптома при БП, не так много, а результаты их существенно разнятся.

В нашем исследовании была использована панель Nanostring, содержащая 760 генов, ассоциированных с различными нейропатологическими процессами. Одними из основных преимуществ данной платформы являются возможность одновременного измерения экспрессии сотен генов в одной реакции и высокая чувствительность метода. Для исключения ложноположительных результатов в мультиплексной реакции мы применили в своей работе достаточно «жесткие» критерии отбора ДЭГ.

В работе сравнивалась общая группа пациентов с БП с контрольной группой. Однако сравнительный анализ не выявил статистически значимых ДЭГ, возможно, в связи с гетерогенностью собранной выборки – наличием ранних и поздних стадий, разбросом значений длительности заболевания, тяжести состояния,

наличием противопаркинсонической терапии у части пациентов. Вероятно, именно гетерогенность выборки не позволила выявить общих маркеров собственно заболевания, характеризующих все стадии нейродегенеративного процесса.

Большой интерес представляют выявленные изменения экспрессии генов на ранних стадиях БП, так как именно они являются наиболее сложными в диагностическом плане. Проведенный сравнительный анализ в нашей работе выявил достоверное снижение экспрессии генов *CDKN1A* и *CPT1B* в группе Н-БП по сравнению с контролем.

CDKN1A является ингибитором циклин-зависимых киназ и играет ключевую роль в регуляции клеточного цикла. Большинство проведенных ранее исследований было посвящено роли *CDKN1A* в развитии опухолей, однако помимо этого было показано его участие и в процессах нейродегенерации [103, 169]. Работ о вовлечении данного белка в патогенез БП чрезвычайно мало. В одной из работ было показано, что уровень мРНК *CDKN1A* повышался в ранние сроки (через 5 ч) после инъекции нейротоксина МРТР, вызывающего паркинсонизм, в стриатуме у экспериментальных мышей [144]. Однако клиническое значение данного маркера для БП в проведенных до настоящего времени других исследованиях показано не было. В нашей работе мы впервые показали возможное значение экспрессии этого гена (снижение) в качестве перспективного диагностического биомаркера у пациентов с БП, а участие в ключевых клеточных процессах указывает на потенциальную его роль в патогенезе нейродегенерации.

LRP1 показал дифференциальную экспрессию (повышение) при продвинутых стадиях БП по сравнению с контрольной группой. LRP1 – белок, ассоциированный с рецептором липопротеидов низкой плотности. Он является нейрональным белком, осуществляющим захват ApoE. Также он является рецепторным белком для бета-амилоида, участвующего в патогенезе болезни Альцгеймера [215]. Было показано повышение его экспрессии в нейронах черной субстанции на ранних стадиях БП [209].

Третий ДЭГ, выявленный в настоящем исследовании – *CPT1B*. Одноименный белок, кодируемый данным геном, регулирует бета-окисление в

митохондриях [185]. Как известно, митохондриальная дисфункция является одним из основных звеньев патогенеза БП. Было показано, что ряд генов, ассоциированных с наследственными формами первичного паркинсонизма, влияют на функцию митохондрий [110]. Кроме того, была показана связь накопления митохондриальных мутаций и числа копий митохондриальной ДНК с развитием заболевания [11]. Есть предположение, что ключевой белок молекулярного патогенеза БП альфа-синуклеин, в норме присутствующий в митохондриях, при олигомеризации вызывает снижение активности комплекса I и оксидативный стресс [58]. Не случайно в клинике у пациентов с БП показано снижение активности митохондриального комплекса I дыхательной цепи [120, 141]. Также установлено, что связывание альфа-синуклеина с митохондриальной мембраной ведет к ее разрушению [28]. В целом, митохондриальная дисфункция и накопление альфа-синуклеина при БП – это взаимосвязанные процессы. В связи с этим выявленное нами снижение экспрессии «митохондриального» гена *CPT1B* у пациентов на начальных стадиях БП может подтверждать митохондриальную дисфункцию как одно из основных звеньев патогенеза заболевания.

Разработка транскриптомных биомаркеров БП – перспективное направление исследований, которое продолжает развиваться. В нашей работе мы показали, что экспрессия ряда исследованных генов может потенциально использоваться для совершенствования диагностики и оценки прогрессирования БП. В то же время, необходимо отметить определенные ограничения проведенного исследования. Во-первых, нами оценивалась малая выборка пациентов при большом количестве изучаемых генов, и для «компенсации» указанного ограничения использована максимально жесткая статистическая обработка результатов с применением поправки на множественные значения и порогом для параметра FС. Во-вторых, методика исследования не является «золотым стандартом» для количественной оценки экспрессии генов, в связи с чем представленные результаты следует рассматривать в качестве предварительных. Необходимы дальнейшие валидационные исследования полученных данных, в том числе на больших выборках.

4.2.2. Анализ экспрессии генов в зависимости от клинических проявлений БП

При анализе экспрессии генов в зависимости от пола не было выявлено значимых отличий. Также не было выявлено зависимости от возраста дебюта и возраста на момент исследования.

Были выявлены многочисленные корреляционные связи между уровнями экспрессии ряда генов и клиническими маркерами прогрессирования заболевания – длительностью болезни и тяжестью состояния по шкале Hoehn-Yahr, UPDRS-I, а также с немоторными проявлениями. Тем не менее, показателя, который бы охватывал все аспекты прогрессирования заболевания и клинического ухудшения симптомов, выявлено не было. Значимых корреляций с общим баллом шкалы UPDRS, 2-ой и 3-ей ее подшкалами не выявлено.

Если на начальных стадиях БП выявляется сниженная экспрессия *CPT1B*, то, согласно нашим предварительным данным, на развернутых стадиях она повышается. В работе получены корреляции экспрессии *CPT1B* с длительностью болезни, а также повышенный его уровень в группе П-БП по сравнению с группой Н-БП (группы статистически значимо различались по длительности заболевания, и указанные особенности экспрессии *CPT1B*, вероятно, могут быть связаны именно с этим). Также имелась тенденция к корреляции между уровнем экспрессии *CPT1B* и тяжестью заболевания по шкале Hoehn-Yahr, не достигавшая статистической значимости после поправки на множественные сравнения. Учитывая выявленные ассоциации, данный ген заслуживает внимания как потенциальный биомаркер прогрессирования БП.

Разработка маркеров не только для диагностики, но и для оценки прогрессирования заболевания – немаловажный аспект, который в перспективе позволит проводить мониторинг достигаемого клинического эффекта на фоне приема разрабатываемых новых препаратов для патогенетического лечения БП. Нейродегенеративные заболевания развиваются медленно на протяжении многих

лет, и четкой верификации замедления прогрессирования заболевания на фоне терапии требуется достаточно продолжительное время. Разработка информативных суррогатных биомаркеров прогрессирования заболевания позволит ускорить оценку эффективности новых нейропротективных препаратов. По такому принципу проходили первые фазы исследования препаратов для патогенетического лечения болезни Альцгеймера[177], и один из этих новых препаратов, направленный против белка бета-амилоида, был зарегистрирован в 2021 г. американским Управлением по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA). Полученные в нашей работе биомаркеры заболевания и его прогрессирования требуют дальнейшей оценки, в том числе у одних и тех же пациентов в динамике.

4.2.3 Анализ экспрессии генов, связанных с развитием моногенных форм болезни Паркинсона

Многие гены, вызывающие развитие моногенных форм БП, были включены в панель Human Neuropathology Panel Nanostring Technology. Мы проанализировали экспрессию этих генов, и не выявили значимых отличий при БП и в контрольной группе. Имеется тенденция к снижению экспрессии *SNCA* при болезни Паркинсона, но она не достигала уровня статистической значимости после введения поправки на множественные сравнения.

4.3. Корреляции уровня микроРНК и уровня экспрессии генов

В нашей работе была выявлена обратная корреляция экспрессии *CPT1B* с miR-7-5p ($R=-0,49$, $p=0,005$). Экспрессия miR-7-5p повышалась при болезни Паркинсона по сравнению с контрольной группой, а также снижалась при терапии агонистами дофаминовых рецепторов и амантадинами по сравнению с пациентами, которые не получали лечения или получали другое лечение. Уровень *CPT1B* был снижен на начальных стадиях БП по сравнению с контрольной группой, но в последствии его

экспрессия повышалась на поздних стадиях. Отмечалась прямая корреляция с длительностью заболевания и баллом по шкале Hoehn-Yahr. Обратная корреляция данных показателей может говорить о том, что как *CPT1B* изменяет свою экспрессию в первую очередь в начале заболевания, так и *miR-7-5p*, вероятно, также повышается в первую очередь до начала лечения и впоследствии их значения приближаются к исходным. *CPT1B*, по данным базы данных miRDB, не является непосредственной мишенью для данной микроРНК, но *CPT1A*, который также является митохондриальным белком, входящим в семейство СРТ и экспрессирующимся преимущественно в печени, является мишенью для данной микроРНК. Таким образом, опосредованное косвенное влияние на *CPT1B* также возможно. Были выявлены также обратная корреляция экспрессии *LRP1* с *miR-7-5p* ($R=-0,46$; $p=0,014$).

Были изучены корреляционные связи микроРНК с экспрессией гена *SNCA*, кодирующим альфа-синуклеин, который является основным нейропатологическим маркером БП. Ранее было показано влияние *miR-7* на экспрессию гена *SNCA*, который является ее потенциальной мишенью, в связи с чем *miR-7* рассматривается в качестве одной из терапевтических возможностей для снижения экспрессии *SNCA* [61]. Подобные связи могут являться отражением тесных системных транскриптомных изменений при мультифакториальных заболеваниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В проведенном исследовании у пациентов с БП оценивалась экспрессия ряда микроРНК и кодирующих РНК генов, ассоциированных с развитием нейropатологических процессов, в лейкоцитах периферической крови. БП является системным заболеванием, поэтому изменения в уровнях экспрессии в лейкоцитах можно рассматривать не только в качестве диагностических биомаркеров заболевания, но и в качестве косвенных маркеров процессов, происходящих в центральной нервной системе при данном заболевании, при этом учитывая тканеспецифичность экспрессии микроРНК.

В данной работе мы получили набор транскриптов, которые могут служить диагностическими маркерами болезни Паркинсона, маркерами прогрессирования заболевания. Экспрессия некоторых генов и микроРНК может быть ассоциирована с некоторыми фенотипическими проявлениями. Данное исследование является пилотным. Все представленные данные нуждаются в валидации на более крупных выборках, оценке воспроизводимости результатов.

Для исследования экспрессии микроРНК мы выбрали те микроРНК, которые уже ранее показали дифференциальную экспрессию в других исследованиях. Была показана воспроизводимость результатов в отношении изменения экспрессии miR-29c-3p, miR-30c-5p и miR-7-5p.

Что касается изменения экспрессии генов, то транскрипты, которые имели дифференциальную экспрессию в нашем исследовании, мало обсуждались в литературе ранее в связи с БП. Тем не менее, исследования, подобные данному, позволяют выбрать из большого массива транскриптов-маркеров перспективные для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

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

обладает диагностической чувствительностью 88% и специфичностью 77%. На развернутых стадиях заболевания отмечается повышение экспрессии гена *LRP1* (участника прионоподобного распространения α -синуклеина), тогда как с длительностью заболевания ассоциирована экспрессия *CPT1B* ($q < 0,05$). Другие клинические характеристики заболевания не связаны с РНК-маркерами изученных генов нейропатологии.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ардаширова Н.С. МикроРНК в патогенезе и диагностике болезни Паркинсона / Ардаширова Н.С., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37. – № 2. – С. 99–105
2. Ardashirova N. MiR-146 as a potential biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Abramycheva N., Fedotova E., Illarioshkin S. MiR-146 as a potential biomarker for

Parkinson's disease. // *European Journal of Neurology*. – 2020. – Vol. 27, Supplement 1 – P. 633

3. Ardashirova N. MiR-126-3p as a potential biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Abramychева N., Fedotova E., Illarioshkin S. // *European Journal of Neurology* – 2021. – Vol. 28 Supplement 1 – P. 238.

4. Ardashirova N. MicroRNAs as a potential biomarker of Parkinson's disease / Ardashirova N., Protopopova A., Abramychева N., Fedotova E., Illarioshkin S. // *Movement Disorders*. – 2021. – Vol. 36 Supplement 1 – P. 329-330.

5. Ardashirova N. MiR-29c-3p could be a biomarker for Parkinson's disease / Ardashirova N., Arbamycheva N., Fedotova E., Illarioshkin S. / *Abstract Book from XXVI World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders 1 – 4 May 2021 - International Association of Parkinsonism and Related Disorders, 2021 – P.32-33.*

6. Ардаширова Н.С. Изменение профиля экспрессии микроРНК в лейкоцитах пациентов с болезнью Паркинсона / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // *Изменение профиля экспрессии микроРНК в лейкоцитах пациентов с болезнью Паркинсона*. – 2022. – *Acta Naturae*. – Т.14. – №3(54) – С. 79-84.

7. Ардаширова Н.С. Тканеспецифичность экспрессии микроРНК при болезни Паркинсона / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Ануфриев П.Л., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // **Нервные болезни**. – 2022. – № 3. – С. 3-9.

8. Ардаширова Н.С. Выявление РНК-маркеров болезни Паркинсона с помощью мультиплексного анализа генной экспрессии / Ардаширова Н.С., Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Сухоруков В.С., Воронкова А.С., Муджири Н.М., Иллариошкин С.Н. // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии**. - 2022. - Т. 16. - №4. - С. 38-43.

9. Федотова Е.Ю. Эпигенетика нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся расстройствами движений / Е. Ю. Федотова, Н. Ю. Абрамычева, Е. В. Яковенко, Н.С. Ардаширова, Е.П. Нужный, С.А. Ключников, М.В. Ершова, С.Н. Иллариошкин // *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений*. – 2022. – № 2. – С. 215-218.

10. Ardashirova N. mRNA biomarkers for Parkinson's disease progression / Ardashirova N., Abramycheva N., Fedotova E., Voronkova A., Mudzhiri N., Sukhorukov V., Illarioshkin S. // European Journal of Neurology. – 2022. – Vol. 29, Supplement 1. – P. 863.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ветчинова А. С. Редактирование эпигенома при нейродегенеративных заболеваниях / Ветчинова А. С., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С. Н. // Нейрохимия. - 2021. - № 4 (38). - С. 320–328.
2. Гусев Е. И. Разработка ранней диагностики болезни Паркинсона и комплексный экономический анализ эффекта от ее внедрения / Гусев Е.И. и соавт. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2021. - № 1 (121). - С. 54-65.
3. Иллариошкин С. Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона / Иллариошкин С. Н. // Неврологический журнал. - 2015. - № 4. – С.4-13
4. Катунина Е. А. Подходы к ранней диагностике болезни Паркинсона / Катунина Е.А. и соавт. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2019. - № 6 (119). - С. 119-127.
5. Катунина Е. А. Амантадины в лечении болезни Паркинсона. Новые возможности в условиях COVID-19 / Катунина Е. А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2021. - № 4 (121). - С. 101-106.
6. Кашежева А. А. Головокружение при болезни Паркинсона / Кашежева А. А., Замерград М. В., Левин О. С. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2021. - № 10 (121). - С. 64-68.
7. Коломан И. И. Нарушения терморегуляции при болезни Паркинсона / Коломан И. И., Левин О. С. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2021. - № 10 (121). - С. 69-75.
8. Коцоев Г. А. Оценка критериев MDS, предложенных для установления продромальной стадии болезни Паркинсона, у пациентов с клинически диагностированным заболеванием / Коцоев Г. А., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С.Н. // Нервные болезни. - 2021. - № 2. - С. 30–34.

9. Литвиненко И. В. Возможности преодоления проблем поздних стадий болезни Паркинсона с помощью постоянной инфузии интестинального геля, содержащего леводопу/карбидопу / Литвиненко И.В. и соавт. // Нервные болезни. - 2020. - № 4. - С. 12–19.
10. Пчелина С.Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона / Пчелина С.Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2011. - № 4 (5). - С. 46–51.
11. Сухоруков В. С. Роль индивидуальных особенностей митохондриальной ДНК в патогенезе болезни Паркинсона / Сухоруков В.С. и соавт. // Генетика. - 2020. - № 4 (56). - С. 392–400.
12. Титова Н. В. Немоторные симптомы болезни Паркинсона: подводная часть айсберга / Титова Н. В., Чаудури К. Р. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2017. - № 4 (11). - С. 5–18.
13. Усенко Т.С. Экспрессия генов мембранных белков лизосом при болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (GBA) / Усенко Т.С. и соавт. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2020. - № 2 (14). - С. 43–49.
14. Федорова Т. Н. Значимость окислительного повреждения белков и ДНК в крови пациентов с болезнью Паркинсона в оценке тяжести заболевания / Федорова Т.Н. // Нейрохимия. - 2021. - № 2 (38). - С. 186–192.
15. Яковенко Е. В. Метилирование ДНК при болезни Паркинсона / Яковенко Е. В., Федотова Е. Ю., Иллариошкин С. Н. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. - 2020. - № 4 (14). – С. 75-81.
16. Яковлева О. В. Речевые и поведенческие контаминации как неэпилептические автоматизмы при болезни Паркинсона / Яковлева О. В., Левин О. С. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2021. - № 10 (121). - С. 58-63.
17. Abd-Elhadi S. Total and Proteinase K-Resistant α -Synuclein Levels in Erythrocytes, Determined by their Ability to Bind Phospholipids, Associate with Parkinson's Disease /

Abd-Elhadi S., Honig A., Simhi-Haham D., Schechter M., Linetsky E., Ben-Hur T., et al. // *Sci Rep.* - 2015. - Vol. 5, No. 1. - P. 11120.

18. Adlakha YK, Saini N. Brain microRNAs and insights into biological functions and therapeutic potential of brain-enriched miRNA-128 / Adlakha YK, Saini N. // *Mol Cancer.* - 2014 г. - Vol. 13(1) - P. 33.

19. Adler CH. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: Clinicopathologic study / Adler CH., Beach TG., Hentz JG., Shill HA., Caviness JN., Driver-Dunckley E., et al. // *Neurology.* - 2014. - Vol. 83, No. 5. - P. 406-12.

20. Ahmadzadeh-Darinsoo M. Altered expression of miR-29a-3p and miR-34a-5p by specific inhibition of GSK3 β in the MPP⁺ treated SH-SY5Y Parkinson's model / Ahmadzadeh-Darinsoo M, Ahmadzadeh-Darinsoo M, Abbasi S, Arefian E, Bernard C, Tafreshi AP. // *Noncoding RNA Res.* - 2022. - Vol. 7(1) - P. 1–6.

21. Alieva AKh, Filatova E v., Karabanov A v., Illarioshkin SN, Limborska SA, Shadrina MI, и др. miRNA expression is highly sensitive to a drug therapy in Parkinson's disease / Alieva AKh, Filatova E v., Karabanov A v., Illarioshkin SN, Limborska SA, Shadrina MI, и др. // *Parkinsonism Relat Disord.* - январь 2015 г. - Vol. 21(1) - с. 72–4.

22. Alieva A. VCP expression decrease as a biomarker of preclinical and early clinical stages of Parkinson's disease / Alieva A, Rudenok M, Filatova E, Karabanov A, Doronina O, Doronina K, et al. // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10 (1) – P. 827.

23. Alonso A. Gout and risk of Parkinson disease: A prospective study / Alonso A. et al. // *Neurology.* - 2007. - № 17 (69). - P. 1696–1700.

24. Angot E. Are synucleinopathies prion-like disorders? / Angot E., Steiner J.A., Hansen C., Li J.Y., Brundin P. // *Lancet Neurol.* - 2010. - Vol. 9, No. 11. - P. 1128-1138.

25. Armstrong MJ. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease / Armstrong MJ, Okun MS. // *JAMA.* - 2020. - Vol. 323(6) - P. 548.

26. Bai S. Statin Use and the Risk of Parkinson's Disease: An Updated Meta-Analysis / Bai S, Song Y, Huang X, Peng L, Jia J, Liu Y, et al. // *PLoS One.* - 2016. - Vol. 11(3) - P. e0152564.

27. Bai X, Tang Y, Yu M, Wu L, Liu F, Ni J, и др. Downregulation of blood serum microRNA 29 family in patients with Parkinson's disease / Bai X, Tang Y, Yu M, Wu L, Liu F, Ni J, и др. // *Sci Rep.* - 14 июль 2017 г. - Vol. 7(1) - с. 5411
28. Balestrino R. Parkinson disease / Balestrino R., Schapira A.H.V. // *European Journal of Neurology.* - 2020. - No. 1 (27). - P. 27-42.
29. Barbagallo C. Specific Signatures of Serum miRNAs as Potential Biomarkers to Discriminate Clinically Similar Neurodegenerative and Vascular-Related Diseases / Barbagallo C, Mostile G, Baglieri G, Giunta F, Luca A, Raciti L, et al. // *Cell Mol Neurobiol.* - - 2020. - Vol. 40(4) - с. 531–46.
30. Barbour R. Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood / Barbour R., Kling K., Anderson JP., Banducci K., Cole T., Diep L., et al. // *Neurodegener Dis.* - 2008. - Vol. 5, No. 2. - P. 55-59.
31. Berg D. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease / Berg D. et al. // *Movement Disorders.* - 2015. - No. 12 (30). - P. 1600-1611.
32. Bhatia D. T-cell dysregulation is associated with disease severity in Parkinson's Disease / Bhatia D, Grozdanov V, Ruf WP, Kassubek J, Ludolph AC, Weishaupt JH, et al. // *J Neuroinflammation.* – 2021. – Vol. 18 (1) – P. 250.
33. Bondarenko O. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: Clinical Trials, Open Challenges and Nanoparticle-Mediated Delivery to the Brain / Bondarenko O., Saarma M. // *Frontiers in Cellular Neuroscience.* - 2021. - Vol. 15. – P. 682597
34. Borod J. Depression in Parkinson's disease: Health risks, etiology, and treatment options / Borod J. // *Neuropsychiatr Dis Treat.* - 2008.- Vol 4(1) - P. 81.
35. Botta-orfila T. Identification of Blood Serum Micro-RNAs Associated With Idiopathic and LRRK2 Parkinson's Disease / Botta-orfila T, Morat X, Compta Y, Jos J, Valdeoriola F, Pont-sunyer C, et al. // *J Neurosci Res.* - 2014. - Vol. 92(8) - P. 1-7.
36. Braak H. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease / Braak H. et al. // *Neurobiology of Aging.* - 2003. - No. 2 (24). - P. 197-211.
37. Braak H. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen / Braak H. et al. // *Journal of Neural Transmission.* - 2003. - No. 5 (110). - P. 517-536.

38. Breckenridge CB. Association between Parkinson's Disease and Cigarette Smoking, Rural Living, Well-Water Consumption, Farming and Pesticide Use: Systematic Review and Meta-Analysis / Breckenridge CB, Berry C, Chang ET, Sielken RL, Mandel JS. // PLoS One. - 2016. - Vol. 11(4) - P. e0151841
39. Brennan GP, Henshall DC. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy / Brennan GP, Henshall DC. // Nat Rev Neurol. - 16 сентябрь 2020 г. - Vol. 16(9) - с. 506–19.
40. Briggs CE. Midbrain dopamine neurons in Parkinson's disease exhibit a dysregulated miRNA and target-gene network / Briggs CE, Wang Y, Kong B, Woo TUW, Iyer LK, Sonntag KC // Brain Res. - 2015. - Vol. 1618 - P. 111-21.
41. Brundin P. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases / Brundin P., Melki R., Kopito R. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. - 2010. - No. 4 (11). - P. 301-307.
42. Burgos K. Profiles of Extracellular miRNA in Cerebrospinal Fluid and Serum from Patients with Alzheimer's and Parkinson's Diseases Correlate with Disease Status and Features of Pathology / Burgos K, Malenica I, Metpally R, Courtright A, Rakela B, Beach T, et al. // PLoS One. - 2014. - Vol. 9(5) - P. e94839.
43. Caggiu E. Differential expression of miRNA 155 and miRNA 146a in Parkinson's disease patients / Caggiu E, Paulus K, Mameli G, Arru G, Sechi G, Sechi LA // eNeurologicalSci. – 2018. – Vol. 13 – P. 1-4.
44. Califf RM. Biomarker definitions and their applications / Califf RM. // Exp Biol Med. - 2018. - Vol. 243, No. 3. - P. 213-21.
45. Cao X. MicroRNA biomarkers of Parkinson ' s disease in serum exosome-like microvesicles / Cao X, Lu J, Zhao Z, Li M, Lu T, An X, et al. // Neurosci Lett. – 2017. – Vol. 644 – P. 94-99.
46. Cardo LF. MiRNA Profile in the Substantia Nigra of Parkinson ' s Disease and Healthy Subjects / Cardo LF, Coto E, Ribacoba R, Menéndez M, Moris G, Suárez E, et al. // J Mol Neurosci. - 2014. - Vol. 54(4) - P. 830-6.

47. Chang D. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci / Chang D, Nalls MA, Hallgrímsson IB, Hunkapiller J, van der Brug M, Cai F, et al. // *Nat Genet.* - 2017. - Vol. 49(10) - P. 1511-6.
48. Chatterjee P. Comparative analysis of RNA-Seq data from brain and blood samples of Parkinson's disease / Chatterjee P, Roy D // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2017. - Vol. 484(3) - P. 557-64.
49. Chen J.-H. Blood Neurofilament Light Chain in Parkinson's Disease: Comparability between Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI) and Asian Cohorts / Chen J.-H. et al. // *Journal of Clinical Medicine.* - 2021. - No. 21 (10). - P. 5085
50. Chen L. Identification of aberrant circulating miRNAs in Parkinson's disease plasma samples / Chen L., Yu Z. // *Brain and Behavior.* - 2018. - Vol. 8, No. 4. - P. e00941.
51. Chmielarz P. Neurotrophic factors for disease-modifying treatments of Parkinson's disease: gaps between basic science and clinical studies / Chmielarz P., Saarma M. // *Pharmacological Reports.* - 2020. - Vol. 72, No. 5. - P. 1195–1217.
52. Cho K.H.T. Emerging Roles of miRNAs in Brain Development and Perinatal Brain Injury / Cho K.H.T. et al. // *Frontiers in Physiology.* - 2019. - Vol. 10.
53. Costé É. The crucial choice of reference genes: identification of miR-191-5p for normalization of miRNAs expression in bone marrow mesenchymal stromal cell and HS27a/HS5 cell lines / Costé É, Rouleux-Bonnin F // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10 (1) – P. 17728.
54. Dahariya S. Long non-coding RNA: Classification, biogenesis and functions in blood cells / Dahariya S. et al. // *Molecular Immunology.* - 2019. - Vol. 112. - P. 82–92.
55. Daniele S. α -Synuclein Heterocomplexes with β -Amyloid Are Increased in Red Blood Cells of Parkinson's Disease Patients and Correlate with Disease Severity / Daniele S. et al. // *Frontiers in Molecular Neuroscience.* - 2018. - Vol. 11.

56. Dehay B. Lysosomal impairment in Parkinson's disease / Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, et al. // *Movement Disorders*. - 2013. - Vol. 28(6) - P. 725-32
57. Deng H. The genetics of Parkinson disease / Deng H, Wang P, Jankovic J. // *Ageing Res Rev*. - 2018. - Vol. 42 - P. 72-85.
58. Devi L. Mitochondrial Import and Accumulation of α -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease Brain / Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK // *Journal of Biological Chemistry*. - 2008. - Vol. 283(14) - P. 9089-100.
59. Ding H. Identification of a panel of five serum miRNAs as a biomarker for Parkinson's disease / Ding H, Huang Z, Chen M, Wang C, Chen X, Chen J, et al. // *Parkinsonism Relat Disord*. - 2016. - Vol. 22 - P. 68-73.
60. Dong H. A panel of four decreased serum microRNAs as a novel biomarker for early Parkinson's disease / Dong H, Wang C, Lu S, Yu C, Huang L, Feng W, et al. // *Biomarkers*. - 2016. - Vol. 21(2) - P. 129-37.
61. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153 / Doxakis E. // *J Biol Chem*. - 2010. - Vol. 285(17) - P. 12726–34.
62. Ebanks K. Vesicular Dysfunction and the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Clues From Genetic Studies / Ebanks K., Lewis P.A., Bandopadhyay R. // *Frontiers in Neuroscience*. - 2020. - Vol. 13.
63. Erkkinen MG. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases / Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. - 2018. - Vol. 10(4) - P. a033118.
64. Fan Y. Dysregulated Long Non-coding RNAs in Parkinson's Disease Contribute to the Apoptosis of Human Neuroblastoma Cells / Fan Y, Li J, Yang Q, Gong C, Gao H, Mao Z, et al. // *Front Neurosci*. - 2019. - Vol. 13 - P. 1298
65. Fang C, Lv L, Mao S, Dong H, Liu B. Cognition Deficits in Parkinson's Disease: Mechanisms and Treatment / Fang C, Lv L, Mao S, Dong H, Liu B. // *Parkinsons Dis*. - 2020. - Vol. 2020 - P. 2076942.

66. Fazeli S. A compound downregulation of SRRM2 and miR-27a-3p with upregulation of miR-27b-3p in PBMCs of Parkinson's patients is associated with the early stage onset of disease / Fazeli S, Motovali-Bashi M, Peymani M, Hashemi MS, Etemadifar M, Nasr-Esfahani MH, et al. // PLoS One. – 2020. – Vol. 15 (11) – P. e0240855
67. Fernandez-Santiago R. MicroRNA association with synucleinopathy conversion in rapid eye movement behavior disorder / Fernandez-Santiago R, Iranzo A. // Ann Neurol. – 2015. – Vol. 77(5) – P. 895-901.
68. Gagne JJ. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: A meta-analysis / Gagne JJ, Power MC. // Neurology. - 2010. - Vol. 74(12) - P. 995-1002.
69. Ganguly U. Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough / Ganguly U., Singh S., Pal S., Prasad S., Agrawal BK., Saini R. // Front Aging Neurosci. - 2021. -Vol. 13. – P. 702639.
70. Gao H.-M. Neuroinflammation and Oxidation/Nitration of α -Synuclein Linked to Dopaminergic Neurodegeneration / Gao H.-M. et al. // Journal of Neuroscience. - 2008. - Vol. 28, No. 30. - P. 7687–7698.
71. Ge P. PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: a source of regional vulnerability in Parkinson's disease / Ge P, Dawson VL, Dawson TM // Mol Neurodegener. - 2020. - Vol. 15(1) - P. 20.
72. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, и др. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs / Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, и др. // Nat Biotechnol. - 2008. - Vol. 26(3) - P. 317–25.
73. Giannini G. REM Sleep Behaviour Disorder in Multiple System Atrophy: From Prodromal to Progression of Disease / Giannini G. et al. // Frontiers in Neurology. - 2021. - Vol. 12. – P.677213.
74. Gillies GE. Sex differences in Parkinson's disease / Gillies GE, Pienaar IS, Vohra S, Qamhawi Z. // Front Neuroendocrinol. - 2014. - Vol. 35(3) - P. 370-84.

75. Grenn FP. The Parkinson's Disease Genome-Wide Association Study Locus Browser / Grenn FP, Kim JJ, Makarios MB, Iwaki H, Illarionova A, Brodin K, et al. // *Movement Disorders*. - 2020. - Vol. 35(11) - P. 2056-67.
76. Gudala K. Reduced Risk of Parkinson's Disease in Users of Calcium Channel Blockers: A Meta-Analysis / Gudala K, Kanukula R, Bansal D. // *Int J Chronic Dis*. - 2015. - P. 1-7.
77. Guzman JN. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1 / Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, et al. // *Nature*. - 2010. - Vol. 468(7324) - P. 696-700.
78. Han L. Association of the serum microRNA-29 family with cognitive impairment in Parkinson's disease / Han L, Tang Y, Bai X, Liang X, Fan Y, Shen Y, и др. // *Aging*. - 2020. - Vol. 12(13) - P. 13518–28.
79. Hansson O. Blood-based NfL / Hansson O. et al. // *Neurology*. - 2017. - Vol. 88, No. 10. - P. 930–937.
80. Harrison IF. The histone deacetylase inhibitor nicotinamide exacerbates neurodegeneration in the lactacystin rat model of Parkinson's disease / Harrison IF, Powell NM, Dexter DT // *J Neurochem*. - 2019. - Vol. 148(1) - P. 136-56.
81. Harrison IF. Pathological histone acetylation in Parkinson's disease: Neuroprotection and inhibition of microglial activation through SIRT 2 inhibition / Harrison IF, Smith AD, Dexter DT // *Neurosci Lett*. - 2018. - Vol. 666 - P. 48-57.
82. Hawkes C.H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis / Hawkes C.H., Tredici K. del, Braak H. // *Neuropathology and Applied Neurobiology*. - 2007. - Vol. 33, No. 6. - P. 599–614.
83. Heinzl S. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease / Heinzl S. et al. // *Movement Disorders*. - 2019. - Vol. 34, No. 10. - P. 1464–1470.
84. Hirsch EC. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? / Hirsch EC, Hunot S // *Lancet Neurol*. - 2009. - Vol. 8(4) - P. 382-97.
85. Holmberg B. CSF-neurofilament and levodopa tests combined with discriminant analysis may contribute to the differential diagnosis of Parkinsonian syndromes /

- Holmberg B. et al. // *Parkinsonism & Related Disorders*. - 2001. - Vol. 8, No. 1. - P. 23–31.
86. Hoss AG. microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex / Hoss AG, Labadorf A, Beach TG, Latourelle JC, Myers RH // *Front Aging Neurosci*. - 2016. - Vol. 8(36) - P. 1-8.
87. Hussein M. MicroRNAs in central nervous system disorders: current advances in pathogenesis and treatment / Hussein M., Magdy R. // *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*
88. Ishii R. Decrease in Plasma Levels of α -Synuclein Is Evident in Patients with Parkinson's Disease after Elimination of Heterophilic Antibody Interference / Ishii R., Tokuda T., Tatebe H., Ohmichi T., Kasai T., Nakagawa M., et al. // *PLoS One*. - 2015. - Vol. 10, No. 4. - P. e0123162.
89. Janssen Daalen J.M. Towards subgroup-specific risk estimates: A meta-analysis of longitudinal studies on olfactory dysfunction and risk of Parkinson's disease / Janssen Daalen J.M. et al. // *Parkinsonism & Related Disorders*. - 2021. - Vol. 84. - P. 155–163.
90. Junn E. Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7 / Junn E. et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2009. - Vol. 106, No. 31. - P. 1305291.
- Kalinderi K. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects / Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L. // *Acta Neurol Scand*. - 2016. - Vol. 134(5) - P. 314-26.
92. Kann SJ, Chang C, Manza P, Leung HC. Akinetic rigid symptoms are associated with decline in a cortical motor network in Parkinson's disease / Kann SJ, Chang C, Manza P, Leung HC. // *NPJ Parkinsons Dis*. - 24 декабря 2020 г. - Vol. 6(1) - P. 19.
93. Kavakiotis I. DIANA-miTED: a microRNA tissue expression database / Kavakiotis I, Alexiou A, Tastsoglou S, Vlachos IS, Hatzigeorgiou AG. // *Nucleic Acids Res*. - 2022. - Vol. 50(D1). - P. D1055–61.
94. Kean S. Plasma-Based Circulating MicroRNA Biomarkers for Parkinson's Disease / Kean S, Petillo D, Jung U, Resau JH, Berryhill B, Linder J, et al. // *J Parkinsons Dis*. - 2012. - Vol. 2 - P. 321-31.

95. Kim W. miR-126 contributes to Parkinson's disease by dysregulating the insulin-like growth factor/phosphoinositide 3-kinase signaling / Kim W, Lee Y, McKenna ND, Yi M, Simunovic F, Wang Y, et al. // *Neurobiol Aging*. - 2014. - Vol. 35(7). - P. 1712–21.
96. Kim W. MiR-126 Regulates Growth Factor Activities and Vulnerability to Toxic Insult in Neurons / Kim W, Noh H, Lee Y, Jeon J, Shanmugavadivu A, McPhie DL, et al. // *Mol Neurobiol*. - 2016. - Vol. 53(1). - P. 95–108.
97. Kordower JH. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease / Kordower JH, Olanow CW, Dodiya HB, Chu Y, Beach TG, Adler CH, et al. // *Brain*. - 2013. - Vol. 136(8) - P. 2419-31.
98. Kraus TFJ, Haider M, Spanner J, Steinmaurer M, Dietinger V, Kretzschmar HA. Altered Long Noncoding RNA Expression Precedes the Course of Parkinson's Disease—a Preliminary Report / Kraus TFJ, Haider M, Spanner J, Steinmaurer M, Dietinger V, Kretzschmar HA. // *Mol Neurobiol*. - 2017 г. - Vol. 54(4) - P. 2869–77.
99. Kuo MC. The role of noncoding RNAs in Parkinson's disease: biomarkers and associations with pathogenic pathways / Kuo MC, Liu SCH, Hsu YF, Wu RM // *J Biomed Sci*. – 2021. – Vol. 28 (1) – P. 78.
100. Kurihara K. Impact of motor and nonmotor symptoms in Parkinson disease for the quality of life: The Japanese Quality-of-Life Survey of Parkinson Disease (JAQPAD) study / Kurihara K., Nakagawa R., Ishido M., Yoshinaga Y., Watanabe J., Hayashi Y., et al. // *J Neurol Sci*. - 2020. - Vol. 419. - P. 117172.
101. Lamberts JT. Spreading of α -synuclein in the face of axonal transport deficits in Parkinson's disease: A speculative synthesis / Lamberts JT, Hildebrandt EN, Brundin P // *Neurobiol Dis*. - 2015. - Vol. 77 - P. 276-83.
102. Lang AE. Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations / Lang AE., Espay AJ. // *Movement Disorders*. - 2018. - Vol. 33, No. 5. - P. 660-77.
103. Lanke V. Integrative Analysis of Hippocampus Gene Expression Profiles Identifies Network Alterations in Aging and Alzheimer's Disease / Lanke V, Moolamalla STR, Roy D, Vinod PK. // *Front Aging Neurosci*. - 2018 г. - Vol. 10 – P. 153.

104. Le W. Decreased NURR1 gene expression in patients with Parkinson's disease / Le W, Pan T, Huang M, Xu P, Xie W, Zhu W, et al. // *J Neurol Sci.* – 2008. – Vol. 273 (1-2) – P. 29-33.
105. Lee A. Epidemiology of Parkinson Disease / Lee A, Gilbert RM. // *Neurol Clin.* - 2016. - Vol. 34(4) - P. 955-65.
106. Lee MH. Neurovascular injury with complement activation and inflammation in COVID-19 / Lee MH, Perl DP, Steiner J, Pasternack N, Li W, Maric D, et al. // *Brain.* – 2022. – Vol. 145 (7) – P. 2555-2568.
107. Leggio L. microRNAs in Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Novel Diagnostic and Therapeutic Approaches / Leggio L, Vivarelli S, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, et al. // *Int J Mol Sci.* - 2017. - Vol. 18(12) - P. 2698.
108. Li N. Plasma levels of miR-137 and miR-124 are associated with Parkinson's disease but not with Parkinson's disease with depression / Li N, Pan X, Zhang J, Ma A, Yang S, Ma J, et al. // *Neurological Sciences.* – 2017. – Vol. 38 (5) – P. 761-767.
109. Li S. MicroRNA-7 inhibits neuronal apoptosis in a cellular Parkinson's disease model by targeting Bax and Sirt2 / Li S, Lv X, Zhai K, Xu R, Zhang Y, Zhao S, et al. // *Am J Transl Res.* - 2016 г. - Vol. 8(2) - P. 993–1004.
110. Li W. PARK Genes Link Mitochondrial Dysfunction and Alpha-Synuclein Pathology in Sporadic Parkinson's Disease / Li W, Fu Y, Halliday GM, Sue CM // *Front Cell Dev Biol.* - 2021. - Vol. 9. - №6 – P.612476.
111. Li Y. The relationship between blood–brain barrier permeability and enlarged perivascular spaces: a cross-sectional study / Li Y, Li M, Yang L, Qin W, Yang S, Yuan J, et al. // *Clin Interv Aging.* - 2019. - Vol. 14 - P. 871-8.
112. Lin Y.-S. Levels of plasma neurofilament light chain and cognitive function in patients with Alzheimer or Parkinson disease / Lin Y.-S. et al. // *Scientific Reports.* - 2018. - Vol. 8, No. 1. - P. 17368.
113. Liu X. Reduced erythrocytic CHCHD2 mRNA is associated with brain pathology of Parkinson's disease / Liu X, Wang Q, Yang Y, Stewart T, Shi M, Soltys D, et al. // *Acta Neuropathol Commun.* - 2021. - Vol. 9(1) - P. 37.

114. Livak KJ. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method / Livak KJ, Schmittgen TD. // *Methods*. - 2001. - Vol. 25(4) - P. 402–8.
115. Lo TW. Extracellular Vesicles in Serum and Central Nervous System Tissues Contain microRNA Signatures in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis / Lo TW, Figueroa-Romero C, Hur J, Pacut C, Stoll E, Spring C, et al. // *Front Mol Neurosci*. – 2021. – Vol. 14 – P. 735.
116. Locascio JJ. Association between α -synuclein blood transcripts and early, neuroimaging-supported Parkinson's disease / Locascio JJ, Eberly S, Liao Z, Liu G, Hoising AN, Duong K, et al. // *Brain*. - 2015. - Vol. 138(9) - P. 2659-71.
117. Ma B. LRRK2 modulates microglial activity through regulation of chemokine (CX3C) receptor 1 –mediated signalling pathways / Ma B, Xu L, Pan X, Sun L, Ding J, Xie C, et al. // *Hum Mol Genet*. - 2016. - Vol. 25(16) - P. 3515-23.
118. Ma F. MicroRNAs in central nervous system diseases: A prospective role in regulating blood-brain barrier integrity / Ma F, Zhang X, Yin KJ // *Exp Neurol*. - 2020. - Vol. 323 - P. 113094
119. Ma W. Serum miR - 221 serves as a biomarker for Parkinson ' s disease / Ma W, Wang C, Xu F, Wang M // *Cell Biochem Funct*. – 2016. – Vol. 34 – P. 511-515.
120. Malpartida AB. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy / Malpartida AB, Williamson M, Narendra DP, Wade-Martins R, Ryan BJ // *Trends Biochem Sci*. - 2021. - Vol. 46(4) - P. 329-43.
121. Margis R. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease / Margis R.R., Margis R., Rieder C.R.M. // *Journal of Biotechnology*. - 2011. - Vol. 152, No. 3. - P. 96–101.
122. Marsal-García L. Expression Levels of an Alpha-Synuclein Transcript in Blood May Distinguish between Early Dementia with Lewy Bodies and Parkinson's Disease / Marsal-García L, Urbizu A, Arnaldo L, Campdelacreu J, Vilas D, Ispierto L, et al. // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22 (2) – P. 725.

123. Martins M. Convergence of miRNA Expression Profiling, α -Synuclein Interacton and GWAS in Parkinson's Disease / Martins M, Rosa A, Guedes LC, Fonseca B v, Gotovac K, Rosa M, et al. // *PLoS One*. - 2011. - Vol. 6(10) - P. e25443.
124. Mathonnet G. MicroRNA Inhibition of Translation Initiation in Vitro by Targeting the Cap-Binding Complex eIF4F / Mathonnet G. et al. // *Science*. - 2007. - Vol. 317, No. 5845. - P. 1764–1767.
125. Mcmillan KJ. Loss of MicroRNA-7 Regulation Leads to a -Synuclein Accumulation and Dopaminergic Neuronal Loss In Vivo / Mcmillan KJ, Murray TK, Bengoa-vergniory N, Cordero-llana O, Cooper J, Buckley A, et al. // *Molecular Therapy*. - 2017. - Vol. 25(10) - P. 2404-14.
126. Melki R. Role of Different Alpha-Synuclein Strains in Synucleinopathies, Similarities with other Neurodegenerative Diseases / Melki R. // *Journal of Parkinson's Disease*. - 2015. - Vol. 5, No. 2. - P. 217–227.
127. Mhyre TR. Parkinson's Disease / Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA // *Subcell Biochem*. – 2012. – Vol. 65. – P. 389-455.
128. Minones-Moyano E. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function / Minones-Moyano E, Porta S, Escaramis G, Rabionet R, Iraola S, Kagerbauer B, et al. // *Hum Mol Genet*. - 2011. - Vol. 20(15) - P. 3067-78.
129. Miranda-Morales E. Implications of DNA Methylation in Parkinson ' s Disease / Miranda-morales E, Meier K, Sandoval-carrillo A, Murgatroyd CA // *Front Mol Neurosci*. - 2017. - Vol. 10 - P. 1-13.
130. Mittal S. β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease / Mittal S, Bjørnevik K, Im DS, Flierl A, Dong X, Locascio JJ, et al. // *Science*. - 2017. - Vol. 357(6354) - P. 891-8.
131. Moujalled D. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases / Moujalled D., Strasser A., Liddell J.R. // *Cell Death & Differentiation*. - 2021. - Vol. 28, No. 7. - P. 2029–2044.
132. Nagatsu T. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects / Nagatsu T., Sawada M. // In: Nagatsu T., Sawada M.

(eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Parkinson's Disease*. - Vienna: Springer Vienna, - 2007. - P. 113–120.

133. Nalls MA. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease / Nalls MA, Pankratz N, Lill CM, Do CB, Hernandez DG, Saad M, et al. // *Nat Genet*. - 2014. - Vol. 46(9) - P. 989-93.

134. Ludwig N. Distribution of miRNA expression across human tissues / Ludwig N. et al. // *Nucleic Acids Research*. - 2016. - Vol. 44, No. 8. - P. 3865–3877.

135. Nies YH. MicroRNA Dysregulation in Parkinson's Disease: A Narrative Review / Nies YH, Mohamad Najib NH, Lim WL, Kamaruzzaman MA, Yahaya MF, Teoh SL // *Front Neurosci*. – 2021. – Vol. 15 – P. 705113.

136. Niethammer M. Metabolic brain networks in translational neurology: concepts and applications / Niethammer M, Eidelberg D // *Ann Neurol*. - 2012. - Vol. 72(5) - P. 635-47.

137. Niu M. A longitudinal study on α -synuclein in plasma neuronal exosomes as a biomarker for Parkinson's disease development and progression / Niu M. et al. // *European Journal of Neurology*. - 2020. - Vol. 27, No. 6. - P. 967–974.

138. di Nottia M. DJ-1 modulates mitochondrial response to oxidative stress: clues from a novel diagnosis of PARK7 / di Nottia M, Masciullo M, Verrigni D, Petrillo S, Modoni A, Rizzo V, et al. // *Clin Genet*. - 2017. - Vol. 92(1) - P. 18-25.

139. Ozdilek B, Demircan B. Serum microRNA expression levels in Turkish patients with Parkinson's disease / Ozdilek B, Demircan B. // *International Journal of Neuroscience*. - 2 декабрь 2021 г. - с. 1–9.

140. Palacios N. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women / Palacios N, Gao X, McCullough ML, Schwarzschild MA, Shah R, Gapstur S, et al. // *Movement Disorders*. - 2012. - Vol. 27(10) - P. 1276-82.

141. Park JS. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives / Park JS, Davis RL, Sue CM // *Curr Neurol Neurosci Rep*. - 2018. - Vol. 18(5) - P. 21.

142. Parnetti L. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease / Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, et al. // *Lancet Neurol.* - 2019. - Vol. 18(6) - P. 573-86.
143. Patil KS. Combinatory microRNA serum signatures as classifiers of Parkinson's disease / Patil KS, Basak I, Dalen I, Hoedt E, Lange J, Lunde KA, et al. // *Parkinsonism Relat Disord.* – 2019. – Vol. 64 – P. 202-210.
144. Pattarini R. Long-lasting transcriptional refractoriness triggered by a single exposure to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyrimidine / Pattarini R, Rong Y, Shepherd KR, Jiao Y, Qu C, Smeyne RJ, et al. // *Neuroscience.* - 2012. - Vol. 214 - P. 84–105.
145. Pavlou M. A. S. Epigenetics in Parkinson's Disease / Pavlou M. A. S., Outeiro T. F. // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – P. 363–390.
148. Poewe W. Parkinson disease / Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. // *Nat Rev Dis Primers.* - 2017. - Vol. 3(1) - P. 17013.
146. Peng Y. The role of MicroRNAs in human cancer / Peng Y., Croce C. M. // *Signal Transduction and Targeted Therapy.* – 2016. – No. 1 (1). – P. 15004.
147. Perez R. G. Editorial: The Protein Alpha-Synuclein: Its Normal Role (in Neurons) and Its Role in Disease / Perez R. G. // *Frontiers in Neuroscience.* – 2020. – No. 14. – [Pages not found].
148. Poewe W. Parkinson disease / Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, et al. // *Nat Rev Dis Primers.* - 2017. - Vol. 3(1) - P. 17013.
149. Poewe W. The differential diagnosis of Parkinson's disease / Poewe W., Wenning G. // *Eur J Neurol.* - 2002. - Vol. 9, Supplement 3. - P. 23-30.
150. Postuma RB. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / Postuma RB., Poewe W., Litvan I., Lewis S., Lang AE., Halliday G., et al. // *Movement Disorders.* - 2018. - Vol. 33, No. 10. - P. 1601-8.
151. Postuma R. B. Risk factors for neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder: A multicenter study / Postuma R. B. et al. // *Annals of Neurology.* – 2015. – No. 5 (77). – P. 830–839.

152. Postuma RB. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, et al. // *Movement Disorders*. - 2015. - Vol. 30(12) - P. 1591-601.
153. Postuma RB. Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / Postuma RB., Poewe W., Litvan I., Lewis S., Lang AE., Halliday G., et al. // *Movement Disorders*. - 2018. - Vol. 33, No. 10. - P. 1601-8.
154. Qian Y. Advances in Roles of miR-132 in the Nervous System / Qian Y, Song J, Ouyang Y, Han Q, Chen W, Zhao X, et al. // *Front Pharmacol*. - 2017 . - Vol. 8 – P. 770.
155. Ramos R. Gene-Environment Interactions in the Development of Complex Disease Phenotypes / Ramos R., Olden K. // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2008. – No. 1 (5). – P. 4–11.
156. Ransohoff R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration / Ransohoff R. M. // *Science*. – 2016. – No. 6301 (353). – P. 777–783.
157. Rao P. MicroRNAs as biomarkers for CNS disease / Rao P, Benito E, Fischer A // *Front Mol Neurosci*. – 2013 – Vol.8 – P.770.
158. Ravanidis S. Differentially Expressed Circular RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Parkinson's Disease / Ravanidis S, Bougea A, Karampatsi D, Papagiannakis N, Maniati M, Stefanis L, et al. // *Movement Disorders*. – 2021. – Vol. 36 (5) – P. 1170-1179.
159. Reed X. The role of monogenic genes in idiopathic Parkinson's disease / Reed X, Bandrés-Ciga S, Blauwendraat C, Cookson MR. // *Neurobiol Dis*. - 2019. - Vol. 124 – P. 230–9.
160. Rietdijk C. D. Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease / Rietdijk C. D. et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2017. – No. 8. – P.37.
161. Rizzo G. Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease / Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, Martino D, Fontana A, Logroscino G // *Neurology*. - 2016. - Vol. 86(6) - P. 566-76.
162. Ross G. W. Association of olfactory dysfunction with incidental Lewy bodies / Ross G. W. et al. // *Movement Disorders*. – 2006. – No. 12 (21). – P. 2062–2067.

163. Salkov V. N. Clinical and morphological analysis of a case of Parkinson's disease / Salkov V. N., Voronkov D. v., Khacheva K. K., Fedotova E. Yu., Khudoerkov R. M., Illarioshkin S. N. // *Arkh Patol.* – 2020. – Vol. 82(2). – P. 52.
164. Santiago J. A. Dissecting the Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases through Network Biology / Santiago J. A., Bottero V., Potashkin J. A. // *Front Aging Neurosci.* – 2017. – Vol. 9. – P.166.
165. Santiago JA. Evaluation of RNA Blood Biomarkers in the Parkinson's Disease Biomarkers Program / Santiago JA, Bottero V, Potashkin JA // *Front Aging Neurosci.* – 2018. – Vol. 10 – P. 358.
166. Santiago J. A. Network-based metaanalysis identifies HNF4A and PTBP1 as longitudinally dynamic biomarkers for Parkinson's disease / Santiago J. A., Potashkin J. A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2015. – No. 7 (112). – P. 2257–2262.
167. Santiago J. A. Evaluation of RNA Blood Biomarkers in Individuals at Risk of Parkinson's Disease / Santiago J. A., Potashkin J. A. // *Journal of Parkinson's Disease.* – 2017. – No. 4 (7). – P. 653–660.
168. Santiago J. A. Network Analysis Identifies SOD2 mRNA as a Potential Biomarker for Parkinson's Disease / Santiago J. A., Scherzer C. R., Potashkin J. A. // *PLoS ONE.* – 2014. – No. 10 (9). – P. e109042.
169. Santos-Lobato BL. Regulatory miRNA–mRNA Networks in Parkinson's Disease / Santos-Lobato BL, Vidal AF, Ribeiro-dos-Santos Â // *Cells.* - 2021. - Vol. 10(6) - P. 1410.
170. Schapansky J. Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy / Schapansky J, Nardoizzi JD, Felizia F, LaVoie MJ // *Hum Mol Genet.* - 2014. - Vol. 23(16) - P. 4201-14.
171. Scherzer CR. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood / Scherzer CR, Eklund AC, Morse LJ, Liao Z, Locascio JJ, Fefer D, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2007. - Vol. 104(3) - P. 955-60.

172. Schulz J. Meta-analyses identify differentially expressed microRNAs in Parkinson's disease / Schulz J. et al. // *Annals of Neurology*. – 2019. – No. 6 (85). – P. 835–851.
173. Schwienbacher C. Plasma and White Blood Cells Show Different miRNA Expression Profiles in Parkinson's Disease / Schwienbacher C, Foco L, Picard A, Corradi E, Serafin A, Panzer J, et al. // *Journal of Molecular Neuroscience*. – 2017. – Vol. 62 (2) – P. 244-254.
174. Selleck MJ. Making Meaningful Clinical Use of Biomarkers / Selleck MJ., Senthil M., Wall NR. // *Biomark Insights*. - 2017. - Vol. 12. - P. 117727191771523.
175. Semenova EI. Analysis of DNMT2, EPN2 and EXOC4 relative gene expression levels in peripheral blood from Parkinson's disease patients / Semenova EI, Rudenok MM, Alieva AKh, Karabanov AV, Illarioshkin SN, Slominsky PA, et al. // *Molecular Genetics Microbiology and Virology (Russian version)*. - 2021. - Vol. 39(3) - P. 25.
176. Serafin A. Overexpression of blood microRNAs 103a, 30b, and 29a in L -dopa – treated patients with PD / Serafin A. et al. // *Neurology*. – 2015. – No. 84. – P. 1–9.
177. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, и др. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease / Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. // *Nature*. - 2016. - Vol. 537(7618) - P. 50–6.
178. Shamir R. Analysis of blood-based gene expression in idiopathic Parkinson disease / Shamir R, Klein C, Amar D, Vollstedt EJ, Bonin M, Usenovic M, et al. // *Neurology*. - 2017. - Vol. 89(16) - P. 1676-83.
179. Shu Y. Aberrant expression of microRNA-132-3p and microRNA-146a-5p in Parkinson's disease patients / Shu Y, Qian J, Wang C // *Open Life Sci*. – 2020. – Vol. 15 (1) – P. 647-653.
180. da Silva F. Expression levels of specific microRNAs are increased after exercise and are associated with cognitive improvement in Parkinson's disease / da Silva F., Rode M., Vietta G., Iop R., Creczynski Pasa T., Martin A. et al. // *Mol Med Rep*. – 2021. – Vol. 24(2). – P. 618.

181. Singh J. A. Gout and the risk of Parkinson's disease in older adults: a study of U.S. Medicare data / Singh J. A., Cleveland J. D. // *BMC Neurology*. - 2019. - № 1 (19). - P. 4.
182. Soreq L. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes / Soreq L, Salomonis N, Bronstein M, Greenberg DS, Israel Z, Garratt AN, et al. // *Front Mol Neurosci*. – 2013. – Vol. 6 – P. 1-20.
183. Starovatykh YuS. Analysis of the expression of *cln3*, *gabbr1* and *wfs1* genes in patients with parkinson's disease / Starovatykh YuS, Rudenok MM, Karabanov AV, Illarioshkin SN, Slominsky PA, Shadrina MI, et al. // *Molecular Genetics Microbiology and Virology (Russian version)*. - 2020. - Vol. 38(2) - P. 76.
184. Stoicea N. The MiRNA Journey from Theory to Practice as a CNS Biomarker / Stoicea N., et al. // *Frontiers in Genetics*. - 2016. - (7).
185. Strauss K. M. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease / Strauss K. M., Martins L. M., Plun-Favreau H., Marx F. P., Kautzmann S., Berg D., et al. // *Hum Mol Genet*. - 2005. - Vol. 14(15). - P. 2099–111.
186. Sukhorukov V. Impaired Mitophagy in Neurons and Glial Cells during Aging and Age-Related Disorders / Sukhorukov V, Voronkov D, Baranich T, Mudzhiri N, Magnaeva A, Illarioshkin S // *Int J Mol Sci*. - 2021. - Vol. 22(19) - P. 10251.
187. Sun H, Chen Y, Guan L. MicroRNA expression profiles across blood and different tissues in cattle / Sun H, Chen Y, Guan L. // *Sci Data*. - 2019 г. - Vol. 6 – P. 190013.
188. Tagliaferro P. Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease / Tagliaferro P., Burke R. E. // *Journal of Parkinson's Disease*. - 2016. - № 1 (6). - P. 1–15.
189. Tai HC. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction / Tai HC, Schuman EM // *Nat Rev Neurosci*. - 2008. - Vol. 9(11) - P. 826-38.
84. Dehay B. Lysosomal impairment in Parkinson's disease / Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR, et al. // *Movement Disorders*. - 2013. - Vol. 28(6) - P. 725-32.

190. Tatura R. Parkinson's disease: SNCA-, PARK2-, and LRRK2- targeting microRNAs elevated in cingulate gyrus / Tatura R, Kraus T, Giese A, Arzberger T, Buchholz M, Genetics H // *Parkinsonism Relat Disord.* - 2016. - Vol. 33 - P. 115-21.
191. Thome A. D. microRNA-155 Regulates Alpha-Synuclein-Induced Inflammatory Responses in Models of Parkinson Disease / Thome A. D., et al. // *The Journal of Neuroscience.* - 2016. - № 8 (36). - P. 2383–2390.
192. Tofaris GK. Ubiquitination of α -Synuclein in Lewy Bodies Is a Pathological Event Not Associated with Impairment of Proteasome Function / Tofaris GK, Razzaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG // *Journal of Biological Chemistry.* - 2003. - Vol. 278(45) - P. 44405-11.
193. Torres-Odio S. Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation / Torres-Odio S., et al. // *Journal of Neuroinflammation.* - 2017. - № 1 (14). - P. 154.
194. Tysnes OB. Epidemiology of Parkinson's disease / Tysnes OB, Storstein A // *J Neural Transm.* - 2017. - Vol. 124(8) - P. 901-5.
195. Valencia-Sanchez M. A. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs / Valencia-Sanchez M. A., et al. // *Genes & development.* - 2006. - № 5 (20). - P. 515–524.
196. Vallelunga A. Identification of circulating microRNAs for the differential diagnosis of Parkinson's disease and Multiple System Atrophy / Vallelunga A, Ragusa M, di Mauro S, Iannitti T, Pilleri M, Biundo R, et al. // *Front Cell Neurosci.* - 2014. - Vol. 8. - P. 1–10.
197. Vallelunga A. Serum miR-30c-5p is a potential biomarker for multiple system atrophy / Vallelunga A, Iannitti T, Dati G, Capece S, Maugeri M, Tocci E, et al. // *Mol Biol Rep.* - 2019. - Vol. 46(2). - P. 1661–6.
198. Varkonyi-Gasic E. Stem-Loop qRT-PCR for the Detection of Plant microRNAs / Varkonyi-Gasic E. // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1456. – P.163-175
199. Vekrellis K. Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders / Vekrellis K., et al. // *The Lancet Neurology.* - 2011. - № 11 (10). - P. 1015–1025.

200. Vicente Miranda H. Posttranslational modifications of blood-derived alpha-synuclein as biochemical markers for Parkinson's disease / Vicente Miranda H., et al. // *Scientific Reports*. - 2017. - № 1 (7). - P. 13713.
201. Vijiaratnam N. Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease / Vijiaratnam N., Simuni T., Bandmann O., Morris HR., Foltynie T. // *Lancet Neurol*. - 2021. - Vol. 20, No. 7. - P. 559-72.
202. Wahid F. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials / Wahid F., et al. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. - 2010. - № 11 (1803). - P. 1231–1243.
203. Wakabayashi K. The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders / Wakabayashi K., et al. // *Molecular Neurobiology*. - 2013. - № 2 (47). - P. 495–508.
204. Wakiyama M. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system / Wakiyama M., et al. // *Genes & Development*. - 2007. - № 15 (21). - P. 1857–1862.
205. Wang J. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics / Wang J, Chen J, Sen S // *J Cell Physiol*. - 2016. - Vol. 231(1) - P. 25-30.
206. Wang R. miR-29c-3p inhibits microglial NLRP3 inflammasome activation by targeting NFAT5 in Parkinson's disease / Wang R, Li Q, He Y, Yang Y, Ma Q, Li C. // *Genes to Cells*. - 2020. - Vol. 25(6). - P. 364–74.
207. Wang X. Detection of α -synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease / Wang X., et al. // *Neuroscience Letters*. - 2015. - (599).
208. Wang Y. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex / Wang Y., et al. // *Nature*. - 2008. - № 7224 (456). - P. 921–926.
209. Wilhelmus M. M. M. Apolipoprotein E and LRP1 Increase Early in Parkinson's Disease Pathogenesis / Wilhelmus M. M. M., Bol J. G. J. M., van Haastert E. S., Rozemuller A. J. M., Bu G., Drukarch B., et al. // *Am J Pathol*. - 2011. - Vol. 179(5). - P. 2152–6.

210. Williams S. M. Oligomeric α -synuclein and β -amyloid variants as potential biomarkers for Parkinson's and Alzheimer's diseases / Williams S. M., Schulz P., Sierks M. R. // *European Journal of Neuroscience*. - 2016. - № 1 (43). - P. 3–16.
211. Xia D. Administration of resveratrol improved Parkinson's disease-like phenotype by suppressing apoptosis of neurons via modulating the MALAT1/miR-129/SNCA signaling pathway / Xia D, Sui R, Zhang Z. // *J Cell Biochem*. - 2019. - Vol. 120(4). - P. 4942–51.
212. Xie S. Differential expression and significance of miRNAs in plasma extracellular vesicles of patients with Parkinson's disease / Xie S, Niu W, Xu F, Wang Y, Hu S, Niu C // *International Journal of Neuroscience*. – 2020. – P. 1-16.
213. Xilouri M. Alpha-synuclein and Protein Degradation Systems: a Reciprocal Relationship / Xilouri M., Brekk O. R., Stefanis L. // *Molecular Neurobiology*. - 2013. - № 2 (47). - P. 537–551.
214. Yanamandra K. α -Synuclein Reactive Antibodies as Diagnostic Biomarkers in Blood Sera of Parkinson's Disease Patients / Yanamandra K., et al. // *PLoS ONE*. - 2011. - № 4 (6). - P. e18513.
215. Yang L. LRP1 modulates the microglial immune response via regulation of JNK and NF- κ B signaling pathways / Yang L., et al. // *Journal of Neuroinflammation*. - 2016. - № 1 (13). - P. 304.
216. Yang Y. Circulating MicroRNAs and Long Non-coding RNAs as Potential Diagnostic Biomarkers for Parkinson's Disease / Yang Y., et al. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. - 2021. – Vol. 14 – P. 631553.
217. Yang Z. Altered Expression Levels of MicroRNA-132 and Nurr1 in Peripheral Blood of Parkinson's Disease: Potential Disease Biomarkers / Yang Z., et al. // *ACS Chemical Neuroscience*. - 2019. - № 5 (10). - P. 2243–2249.
218. Yilmaz R. Biomarkers of Parkinson's disease: 20 years later / Yilmaz R., et al. // *Journal of Neural Transmission*. - 2019. - № 7 (126). - P. 803–813.
219. Yu Z. The significance of uric acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease / Yu Z., et al. // *Medicine*. - 2017. - № 45 (96). - P. e8502.

220. Zou J. Long Noncoding RNA POU3F3 and α -Synuclein in Plasma L1CAM Exosomes Combined with β -Glucocerebrosidase Activity: Potential Predictors of Parkinson's Disease / Zou J., et al. // Neurotherapeutics. - 2020. - № 3 (17). - P. 1104–1119.

221. FDA-NIH Biomarker Working Group. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource [Internet]. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326791/> (доступ от 13.01.2022).

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Последовательности stem-loop праймеров для обратной транскрипции 13-ти микроРНК

микроРНК	Последовательность праймера
miR-191-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG AGCTGCTT -3'
miR-106a-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG TACCTGCA -3'
miR129-1-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG CAAGCCC -3'
miR126-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG CGCATTATT -3'
miR214-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG ACTGCCTGT -3'
miR221-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG AAACCCAG -3'
miR29a-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG TAACCGATT -3'
miR29c-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG ACCGATTT -3'
miR30c-1-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG CTGAGAG -3'
miR520d-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG AAAGGGC -3'
miR-132-3p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG CGACCATG -3'
miR146a-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG AACCCATG -3'
miR7-1-5p	5'- CTCAACTGGTGTTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAG CAACAAAA -3'

Приложение 2. Последовательности праймеров и зондов для ПЦР-РВ

МикроРНК		Последовательность
	Универсальный обратный праймер	5'- CTGGTGTCTCGTGGAGTC -3'
miR-191-5p	Праймер	5'-AGCTGGGCAACGGAATCCCAAAA-3'
	Зонд	5'- (R6G) – TTCAGTTGAGAGCTGCTT –(RTQ1) -3'
miR-106a-5p	Праймер	5'- AGCTGGGAAAGTGCTTACAGTG -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGAACCCATG –(RTQ1) -3'
miR-7-1-5p	Праймер	5'-AGCTGGGTGGAAGACTAGTGATT-3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGCAACAAAA –(RTQ1) -3'
miR-132-3p	Праймер	5'- AGCTGGGTAACAGTCTACAGCCA -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGCGACCATG –(RTQ1) -3'
miR-146a-5p	Праймер	5'-AGCTGGGTGAGAAGTGAATTCCA-3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGTACCTGCA –(RTQ1) -3'
miR-129-1-5p	Праймер	5'- AGCTGGGCTTTTTGCGGTCTGGG -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGCAAGCCC –(RTQ1) -3'
miR-126-3p	Праймер	5'- AGCTGGGTCTGACCGTGAGTAA -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGCGCATTATT –(RTQ1) -3'
miR-214-3p	Праймер	5'- AGCTGGGACAGCAGGCACAGAC -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGACTGCCTGT –(RTQ1) -3'
miR-221-3p	Праймер	5'- AGCTGGGAGCTACATTGTCTGCT -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGAAACCCAG –(RTQ1) -3'
miR-29a-3p	Праймер	5'- AGCTGGGTAGCACCATCTGAAAT -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGTAACCGATT –(RTQ1) -3'
miR-29c-3p	Праймер	5'- AGCTGGGTAGCACCATTTGAA -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGACCGATTT –(RTQ1) -3'
miR-30c-1-5p	Праймер	5'- AGCTGGGTGTAACATCCTACACT -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGCTGAGAG –(RTQ1) -3'
miR-520d-5p	Праймер	5'- AGCTGGGCTACAAAGGGAAGCC -3'
	Зонд	5'- (FAM)- TTCAGTTGAGAAAGGGC –(RTQ1) -3'

Приложение 3. МикроРНК в структурах и областях головного мозга

Номер miR	Субстрат	Автор	Год	Метод	Результат
let-7b	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
let-7c	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
let-7d	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
let-7e	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
let-7g	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-100	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-106a	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-10b-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-125-3p	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
miR-126	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
miR-1294	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-129-5p	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-130b	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-132	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-132-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-132-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-133b	Средний мозг	Kim et al.	2007	rtPCR	UP
	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
	Средний мозг	Schlaudraff	2014	qPCR	не изменен
	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	не изменен
miR-135a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-135b	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-136	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-137	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-138	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-139-3p	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP

	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	не изменен
miR-140-5p	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
miR-144	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	UP
miR-144-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-144-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-145	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	DOWN
	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-145-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-148a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-148b-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-151b	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-155-5p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-16-2-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-17	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-185	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-198	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-199b	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	UP
miR-19b	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-204-5p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP
miR-205	Лобная кора, стриатум	Cho	2012	rt-qPCR	UP
miR-208b	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-212-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-216b-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-217	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-219-2-3p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-221	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	UP

miR-221-3p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP
miR-223	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-26a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-27a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-27b	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-28-5p	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-299-5p	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-3118-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-3195	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP
miR-3200-3p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-320b	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-330-5p	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-335	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-337-5p	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-338-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-339-5p	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-34b	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	не изменен
	Миндалина, лобная кора, ЧС, мозжечок	Minones-Moyano	2011	RT-qPCR	DOWN
miR-34c	Миндалина, лобная кора, ЧС, мозжечок	Minones-Moyano	2011	RT-qPCR	DOWN
	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	не изменен
miR-362-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-370	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-374a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-376c-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-378c	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-379	ЧС	Cardo	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-380-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-382	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP

miR-382-5p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-421	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-423-5p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-425-5p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP
miR-433	ЧС	<u>Cardo</u>	2014	TLDA+TaqMan	не изменен
miR-4421	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	DOWN
miR-4443	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-448	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	UP
miR-485-3p	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP
miR-485-5p	ЧС	<u>Cardo</u>	2014	TLDA+TaqMan	DOWN
miR-490-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-491-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-504	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-5100	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-516b-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-520d-5p	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-532-5p	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	DOWN
miR-542-3p	ЧС	<u>Cardo</u>	2014	TLDA+TaqMan	UP
miR-543	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	DOWN
miR-544	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	UP
miR-548-d	ЧС	<u>Cardo</u>	2014	TLDA+TaqMan	DOWN
miR-5690	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	DOWN
miR-636	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP

miR-6511a-5p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-670-3p	Префронтальная кора	Hoss	2016	Illumina's HiSeq 2000 system	UP
miR-7	Опоясывающая извилина	Tatura	2016	TaqMan+qPCR	DOWN
	ЧС	McMillan	2017	RT-qPC+ИГХ	DOWN
miR-744	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	DOWN
miR-7b	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
miR-7c	ЧС	Kim et al.	2014	qRT-PCR	UP
miR-92a	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-93	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-95	ЧС	Briggs	2015	Megaplex miRNA TaqMan	UP
miR-95	Скорлупа	Nair	2016	nCounter Human v2 miRNA Expression Assay kit (Nanostring Technologies, USA)+qPCR	UP

ЧС – черная субстанция

UP – повышено

DOWN – снижено

Приложение 4. МикроРНК в крови.

Номер miR	Субстрат	Автор	Год	Метод	Результат
let-7a	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
let-7f	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-1	Цельная Кровь	Margis	2011	RT-qPCR	DOWN
miR-124	Плазма	Li	2017	RT-qPCR	DOWN
miR-1249	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-125b	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-126	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-126*	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-1274b	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-129	Лейкоциты	Alieva	2014	RT-qPCR	Повышено у нелеченных пациентов
miR-1294	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	DOWN
miR-130a	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-130b	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-132	Лейкоциты	Alieva	2014	RT-qPCR	Повышено у нелеченных пациентов
miR-137	Плазма	Li	2017	RT-qPCR	UP
miR-141	Сыворотка	Dong	2015	Solexa sequencing+RT- qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-142- 3p	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-146a-5p	Моноциты	Caggiu	2018	rtPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Dong	2015	Solexa sequencing+RT- qPCR	DOWN
miR-147	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-148b	Сыворотка	Vallelunga	2014	qPCR	DOWN
	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-150	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-151-3p	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-151-5p	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-155-5p	Моноциты	Caggiu	2018	rtPCR	UP

miR-15b	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Ding	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-16	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
MiR-16-2*	Цельная Кровь	Margis	2011	RT-qPCR	UP у получающих лечение по сравнению с нелеченными
miR-16-2-3p	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	DOWN
miR-181a	Сыворотка	Ding	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-185	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	не изменено
	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ding	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-18b*	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-193a-3p	Сыворотка	Dong	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-195	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	UP
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
	Сыворотка	Ding	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	UP
miR-199a-3p	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-199a-5p	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-199b	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-199b-3p	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-19b	Экзосомы	Caо	2017	RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Botta-orfila	2014	TLDA+qPCR	DOWN
	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-200a	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-20a	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-21	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN

	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-214	Сыворотка	Dong	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	DOWN
miR-221	Сыворотка	Ding	2015	Solexa sequencing+RT-qPCR	DOWN
	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	DOWN
miR-222	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
	Плазма	Kean Khoo	2012	Agilent whole human genome miRNA microarray v.3+qPCR	DOWN
miR-223*	Сыворотка	Vallelunga A	2014	qPCR	UP
	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
miR-24	Сыворотка	Vallelunga A	2014	qPCR	UP
	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	UP
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-26a	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-26a2*	Цельная Кровь	Margis	2011	RT-qPCR	UP у получающих лечение по сравнению с нелеченными
miR-26a-5p	Моноциты	Caggiu	2018	rtPCR	не изменено
miR-27a	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	UP
miR-28-5p	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-29a	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Botta-orfila	2014	TLDA+qPCR	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	не изменен
miR-29b	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-29c	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Botta-orfila	2014	TLDA+qPCR	DOWN
	Моноциты	Martins	2011	miRCURYTM locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
	Сыворотка	Ma	2016	RT-qPCR	DOWN
miR-29a	Цельная Кровь	Margis	2011	RT-qPCR	DOWN (нелеченные по

					сравнению с контролем)
miR-301a	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-30a	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-30a-3p	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-30b	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-30c	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Vallelunga A	2014	qPCR	DOWN
	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-30e-3p	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-320a	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-320b	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-320c	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-324-3p	Сыворотка	Vallelunga A	2014	qPCR	UP
	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
miR-335	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-338-3p	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Сыворотка	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-374a	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-374b	Моноциты	Martins	2011	miRCURY™ locked nucleic acid (LNA) array	DOWN
miR-378c	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-423- 5p	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-4293	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-485- 5p	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-505	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Плазма	Kean Khoo	2012	Agilent whole human genome miRNA microarray v.3+qPCR	DOWN
miR-520d-5p	Сыворотка	Jin	2018	qRT-PCR	UP
miR-626	Экзосомы	Cao	2017	RT-qPCR	не изменено
	Плазма	Kean Khoo	2012	Agilent whole human genome miRNA microarray v.3+qPCR	DOWN

miR-671	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	UP
miR-7	Лейкоциты	Alieva	2014	RT-qPCR	UP у нелеченных пациентов
miR-769	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-874	Плазма	Chen	2018	RT-qPCR	DOWN
miR-92b	Лейкоциты	Soreq	2013	NGS	DOWN
miR-9-3p	Лейкоциты	Alieva	2014	RT-qPCR	UP у нелеченных пациентов
miR-9-5p	Лейкоциты	Alieva	2014	RT-qPCR	UP у нелеченных пациентов

UP – повышено

DOWN - снижено

Приложение 5. МикроРНК в цереброспинальной жидкости

MicroRNA	Субстрат	Автор	Год	Метод	Результат
let-7c-3p	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
let-7g-3p3	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	DOWN
miR-1	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-103a	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-10a-5p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-119a	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-1224-5p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-126	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-127-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-128	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-132-5p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-136-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-138-3p	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-151	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-153	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-16-2	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP

miR-19a-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	DOWN
miR-19b-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	DOWN
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-205	ЦСЖ	Marques	2017	qPCR	UP
miR-212-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-22	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-24	ЦСЖ	Marques	2017	qPCR	DOWN
miR-26a	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-28	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-29	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-29c	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-301a	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-30b	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-331-5p	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-370	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-374	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	DOWN
miR-409-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-431-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-433	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-4448	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
miR-485-5p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP

	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP
miR-873-3p	ЦСЖ	Burgos	2014	Illumina HiSeq2000	UP
	ЦСЖ, экзосомальная РНК	Gui	2015	DIANA- mirPath+TaqMan+qPCR	UP

ЦСЖ – цереброспинальная жидкость

UP – повышено

DOWN - снижено

Приложение 6. Дифференциальная экспрессия генов при БП и в контрольной группе по данным литературы

Ген	Субстрат	Автор	Год	Метод	Результат
<i>SOD2</i>	Цельная кровь	Santiago	2014	RT-PCR	UP
<i>HNF4A</i>	Цельная кровь	Santiago	2015	RT-PCR	UP
<i>PTBP1</i>	Цельная кровь	Santiago	2015	RT-PCR	DOWN
		Schrezer			
<i>Nurr1</i>	Лейкоциты крови	Le	2008	RT-PCR	DOWN
	Плазма крови	Yang	2019	RT-PCR	DOWN
<i>SRRM2</i>	Мононуклеары крови	Faxeli	2020	RT-PCR	DOWN
<i>VCP1</i>	Цельная кровь	Алиева	2020	RT-PCR	DOWN
<i>SNCA</i>	Цельная кровь	Алиева	2020	RT-PCR	DOWN
<i>SNCA</i> (транскрипты)	Клетки крови	Locascio	2015	RT-PCR	DOWN
<i>SNCA</i> (транскрипты)	Клетки крови	Marcál-García	2021	RT-PCR	Не изменена
<i>COX4I1</i>	Цельная кровь	Shamir	2017	GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	DOWN
<i>ATP5A1</i>	Цельная кровь	Shamir	2017	GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	DOWN
<i>VDAC3</i>	Цельная кровь	Shamir	2017	GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array	DOWN
<i>CHCHD2</i>	Эритроциты	Liu	2021	Nanostring nCounter+RT- qPCR	DOWN
<i>ST13</i>	Клеточная фракция крови	Scherzer	2007	CodeLink Bioarray protocol + RT-PCR	DOWN
<i>DNM2</i>	Цельная кровь	Семенова	2021	RT-PCR	DOWN (у пациентов, получающих лечение)
<i>EPN2</i>	Цельная кровь	Семенова	2021	RT-PCR	Не изменена
<i>EXOC4</i>	Цельная кровь	Семенова	2021	RT-PCR	Не изменена

<i>CLN3</i>	Цельная кровь	Староватых	2020	RT-PCR	Не изменена
<i>GABBR1</i>	Цельная кровь	Староватых	2020	RT-PCR	Не изменена
<i>WFS1</i>	Цельная кровь	Староватых	2020	RT-PCR	Не изменена
<i>FAXDC2</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>EFTUD2</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>ZNF160</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>PRG3</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>MACF1</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>COPZ1</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена
<i>WLS</i>	Цельная кровь	Santiago	2017	RT-PCR	Не изменена

UP – повышено

DOWN - снижено

Приложение 7. Список генов, включенных в панель Nanostring nCounter®

Human Neuropathology Panel

Нейрональное воспаление	Нейропластичность, развитие и старение	Метаболизм нейронов	Компартментализация и структурная целостность	Взаимодействие нейронов и глии	Передача сигнала между нейронами
<i>ADCY8</i>	<i>ACVRL1</i>	<i>ABL1</i>	<i>ABL1</i>	<i>ABL1</i>	<i>ABAT</i>
<i>ADRA2A</i>	<i>ADRB2</i>	<i>ACAA1</i>	<i>ACAA1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ACHE</i>
<i>AMIGO1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ACHE</i>	<i>ACHE</i>	<i>AKT2</i>	<i>ADCY5</i>
<i>AP3M2</i>	<i>AKT2</i>	<i>ACIN1</i>	<i>ACIN1</i>	<i>AKT3</i>	<i>ADCY8</i>
<i>APOE</i>	<i>AKT3</i>	<i>AGER</i>	<i>AGER</i>	<i>AMIGO1</i>	<i>ADCY9</i>
<i>ARRB2</i>	<i>ANG</i>	<i>AIF1</i>	<i>AIF1</i>	<i>ARHGEF10</i>	<i>ADCYAP1</i>
<i>ATP6V0E1</i>	<i>ANGPT2</i>	<i>AKT1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ATF4</i>	<i>ADORA1</i>
<i>ATP6V1A</i>	<i>APAF1</i>	<i>AKT1S1</i>	<i>AKT1S1</i>	<i>ATRNL</i>	<i>ADORA2A</i>
<i>ATP8A2</i>	<i>APC</i>	<i>AKT2</i>	<i>AKT2</i>	<i>BAD</i>	<i>ADRA2A</i>
<i>BCL2</i>	<i>ARRB2</i>	<i>AKT3</i>	<i>AKT3</i>	<i>BAX</i>	<i>ADRB2</i>
<i>C3</i>	<i>ATF4</i>	<i>AP1S1</i>	<i>AP1S1</i>	<i>BCL2</i>	<i>AKT1</i>
<i>CASP8</i>	<i>ATG5</i>	<i>AP3M2</i>	<i>AP3M2</i>	<i>BDNF</i>	<i>AKT2</i>
<i>CCL2</i>	<i>ATM</i>	<i>AP3S1</i>	<i>AP3S1</i>	<i>CALM1</i>	<i>AKT3</i>
<i>CCL5</i>	<i>ATXN3</i>	<i>AP4S1</i>	<i>AP4S1</i>	<i>CALML5</i>	<i>AMPH</i>
<i>CCR2</i>	<i>ATXN7</i>	<i>APOE</i>	<i>APOE</i>	<i>CAMK2B</i>	<i>AP2A2</i>
<i>CCR5</i>	<i>BAD</i>	<i>APP</i>	<i>APP</i>	<i>CAMK2D</i>	<i>AP2B1</i>
<i>CD33</i>	<i>BAX</i>	<i>ARSA</i>	<i>ARSA</i>	<i>CAMK2G</i>	<i>APOE</i>
<i>CD40</i>	<i>BCL2</i>	<i>ATF4</i>	<i>ATF4</i>	<i>CAMK4</i>	<i>APP</i>
<i>CD44</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>ATF6</i>	<i>ATF6</i>	<i>CD9</i>	<i>ARC</i>
<i>CD68</i>	<i>BDNF</i>	<i>ATP13A2</i>	<i>ATP13A2</i>	<i>CLDN5</i>	<i>ARRB2</i>
<i>CD9</i>	<i>BID</i>	<i>ATP6V0C</i>	<i>ATP6V0C</i>	<i>CLU</i>	<i>ATF4</i>
<i>CDS1</i>	<i>BRMS1L</i>	<i>ATP6V0D1</i>	<i>ATP6V0D1</i>	<i>CNTNAP1</i>	<i>ATP2B3</i>
<i>CLU</i>	<i>C3</i>	<i>ATP6V1H</i>	<i>ATP6V1H</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>ATP6V0C</i>
<i>CNTF</i>	<i>C5</i>	<i>ATP7A</i>	<i>ATP7A</i>	<i>CXCR4</i>	<i>ATP6V0D1</i>
<i>CR1</i>	<i>C6</i>	<i>ATRNL</i>	<i>ATRNL</i>	<i>DLX1</i>	<i>ATP6V0E1</i>
<i>CSF1</i>	<i>CACNA1A</i>	<i>ATXN2</i>	<i>ATXN2</i>	<i>DLX2</i>	<i>ATP6V0E2</i>
<i>CSF1R</i>	<i>CACNA1B</i>	<i>ATXN3</i>	<i>ATXN3</i>	<i>EGR2</i>	<i>ATP6V1A</i>
<i>CSF2RB</i>	<i>CACNA1C</i>	<i>B4GALT6</i>	<i>B4GALT6</i>	<i>FA2H</i>	<i>ATP6V1D</i>
<i>CSPG4</i>	<i>CACNA1D</i>	<i>BAD</i>	<i>BAD</i>	<i>FAM126A</i>	<i>ATP6V1E1</i>
<i>CTSE</i>	<i>CACNA1F</i>	<i>BAX</i>	<i>BAX</i>	<i>FASLG</i>	<i>ATP6V1G2</i>
<i>CUL1</i>	<i>CACNA1S</i>	<i>BCAS2</i>	<i>BCAS2</i>	<i>GAL3ST1</i>	<i>ATP6V1H</i>
<i>CX3CL1</i>	<i>CACNB2</i>	<i>BCHE</i>	<i>BCHE</i>	<i>GJB1</i>	<i>ATP7A</i>
<i>CX3CR1</i>	<i>CACNB4</i>	<i>BCL2</i>	<i>BCL2</i>	<i>GSK3B</i>	<i>ATXN3</i>
<i>CXCL10</i>	<i>CALM1</i>	<i>BNIP3</i>	<i>BNIP3</i>	<i>HEXB</i>	<i>BAD</i>
<i>CXCL11</i>	<i>CAMK2B</i>	<i>C9orf72</i>	<i>C9orf72</i>	<i>HGF</i>	<i>BCHE</i>
<i>CXCL12</i>	<i>CAMK2D</i>	<i>CAB39</i>	<i>CAB39</i>	<i>HRAS</i>	<i>BCL2</i>
<i>CXCL16</i>	<i>CAMK2G</i>	<i>CASP3</i>	<i>CASP3</i>	<i>IKBKB</i>	<i>BDNF</i>
<i>CXCR4</i>	<i>CASP1</i>	<i>CAST</i>	<i>CAST</i>	<i>JAM3</i>	<i>CA2</i>
<i>CYBB</i>	<i>CASP3</i>	<i>CCL2</i>	<i>CCL2</i>	<i>JUN</i>	<i>CACNA1A</i>
<i>DNM1L</i>	<i>CASP6</i>	<i>CCL5</i>	<i>CCL5</i>	<i>KCNJ10</i>	<i>CACNA1B</i>
<i>EGF</i>	<i>CASP7</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND1</i>	<i>KEL</i>	<i>CACNA1C</i>
<i>EGFR</i>	<i>CASP8</i>	<i>CCNH</i>	<i>CCNH</i>	<i>KLK6</i>	<i>CACNA1D</i>
<i>EGR2</i>	<i>CASP9</i>	<i>CCS</i>	<i>CCS</i>	<i>KRAS</i>	<i>CACNA1F</i>
<i>ENTPD4</i>	<i>CCL2</i>	<i>CD68</i>	<i>CD68</i>	<i>LAMA2</i>	<i>CACNA1S</i>
<i>EPO</i>	<i>CCL5</i>	<i>CDC27</i>	<i>CDC27</i>	<i>LPAR1</i>	<i>CACNB2</i>
<i>FAS</i>	<i>CCND1</i>	<i>CDC40</i>	<i>CDC40</i>	<i>MAG</i>	<i>CACNB4</i>
<i>FASLG</i>	<i>CCR2</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDK2</i>	<i>MAL</i>	<i>CADPS</i>
<i>FLT1</i>	<i>CD14</i>	<i>CDK5RAP3</i>	<i>CDK5RAP3</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>CALB1</i>
<i>FLT4</i>	<i>CD34</i>	<i>CDK7</i>	<i>CDK7</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>CALM1</i>
<i>FN1</i>	<i>CDK2</i>	<i>CDS1</i>	<i>CDS1</i>	<i>MAPK1</i>	<i>CALML5</i>
<i>GAA</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>CERS1</i>	<i>CERS1</i>	<i>MAPK10</i>	<i>CAMK2B</i>
<i>GALC</i>	<i>CDS1</i>	<i>CERS2</i>	<i>CERS2</i>	<i>MAPK3</i>	<i>CAMK2D</i>

GBA	CHD4	CERS4	CERS4	MAPK8	CAMK2G
GNG2	CHRM5	CERS6	CERS6	MAPK9	CAMK4
GNPTAB	CHRNA7	CHAT	CHAT	MAPKAPK2	CASP3
GNPTG	CNTF	CHMP2B	CHMP2B	MBP	CCL2
GPR84	COL4A1	CLN3	CLN3	MOG	CDK5
GPRASP1	COL4A2	CLN8	CLN8	MTOR	CHAT
GRN	CREB1	CPT1B	CPT1B	MYRF	CHRM5
GUSB	CREBBP	CREB1	CREB1	NF1	CHRNA7
HGF	CRTC2	CRTC2	CRTC2	NFKBIA	CHRN2
HIF1A	CSF1R	CTNS	CTNS	NFKBIB	CNR1
IGF1	CSF2RB	CTSE	CTSE	NGF	CNTN4
IL10	CSPG4	CUL1	CUL1	NGFR	COMT
IL10RA	CTNNA1	CUL2	CUL2	NKX6-2	CPLX1
IL13RA1	CUL1	CUL3	CUL3	NRG1	CREB1
IL15RA	CUL3	CXXC1	CXXC1	NTF3	CREBBP
IL1B	CX3CL1	CYBB	CYBB	NTRK1	CRH
IL1R1	CX3CR1	CYCS	CYCS	OLIG2	CTNNA1
IL4R	CXCL10	DDIT3	DDIT3	PDPK1	CX3CL1
IL6	CXXC1	DDX23	DDX23	PIK3CA	CX3CR1
IL6R	CYCS	DGKB	DGKB	PIK3CB	CYP4X1
INHBB	DDIT3	DGKE	DGKE	PIK3R1	DAGLA
IRF8	DLL4	DLAT	DLAT	PLLP	DBH
ITGA5	DOT1L	DLD	DLD	PMP22	DDC
ITGAL	DRD2	DNAJA2	DNAJA2	PSEN1	DLG3
ITGAX	EFNA1	DNM2	DNM2	PSEN2	DLG4
JAM3	EFNA5	EIF2S1	EIF2S1	PTEN	DLGAP1
LIF	EFNB3	ENTPD4	ENTPD4	RAC1	DNM2
LMNA	EFR3A	EP300	EP300	RAF1	DRD1
LOX	EGF	ERLEC1	ERLEC1	RELA	DRD2
LTBR	EGFL7	FAS	FAS	RHOA	DRD4
MARCO	EGFR	FN1	FN1	SCN2A	EGFR
MMP12	EGR1	FOS	FOS	SH3TC2	EGR2
MMP14	EHMT1	FXN	FXN	SIRT2	ENTPD2
MMP16	EIF2S1	GAA	GAA	SOD1	EP300
MMP19	EMCN	GAL3ST1	GAL3ST1	TGFB1	ERBB3
MMP2	EMP2	GALC	GALC	TP53	F2
MMP24	ENG	GBA	GBA	UGT8	FGF12
MMP9	EP300	GDPD2	GDPD2	XK	FGF14
NAGLU	EPHA2	GFPT1	GFPT1	ZNF24	FMR1
NGFR	EPHA3	GGA1	GGA1		FOS
NLRP3	EPHA4	GGT1	GGT1		FYN
NPAS4	EPHA5	GLS	GLS		GABRA1
NPC2	EPHA6	GNAO1	GNAO1		GABRA4
OPTN	ERBB3	GNPTAB	GNPTAB		GABRB2
OSMR	ERG	GNPTG	GNPTG		GABRB3
P2RX4	FAM126A	GPDIL	GPDIL		GABRG2
P2RY12	FAS	GPR37	GPR37		GABRP
PDGFRB	FASLG	GSK3B	GSK3B		GABRR1
PGK1	FGF12	GSR	GSR		GABRR3
PLCL2	FGF14	GSS	GSS		GAD1
PLEKHO2	FGF2	GSTP1	GSTP1		GAD2
PLXNC1	FLT1	GTF2A1	GTF2A1		GDNF
PPM1L	FLT4	GTF2B	GTF2B		GFAP
PRL	FMR1	GTF2H1	GTF2H1		GLRB
PSEN2	FN1	GTF2H3	GTF2H3		GLS
PSMB8	FOS	GTF2IRD1	GTF2IRD1		GNAI1
PSMB9	FYN	GUCY1B3	GUCY1B3		GNAI2
PTGS2	GATA2	GUSB	GUSB		GNAI3
SCAMP2	GDNF	HDAC2	HDAC2		GNAO1
SERPIN6	GPR4	HDAC6	HDAC6		GNAQ
SLA	GSK3B	HEXB	HEXB		GNB5
SLC2A1	HDAC1	HGF	HGF		GNG2
SNCA	HDAC2	HIF1A	HIF1A		GNGT1

<i>SOD2</i>	<i>HDAC6</i>	<i>HMOX1</i>	<i>HMOX1</i>		<i>GPR37</i>
<i>STAMBPL1</i>	<i>HDAC7</i>	<i>HNRNPM</i>	<i>HNRNPM</i>		<i>GRIA1</i>
<i>STAT1</i>	<i>HGF</i>	<i>HPGDS</i>	<i>HPGDS</i>		<i>GRIA2</i>
<i>TGFB1</i>	<i>HIF1A</i>	<i>HSPA6</i>	<i>HSPA6</i>		<i>GRIA3</i>
<i>TGFBR2</i>	<i>HMGB1</i>	<i>HSPB1</i>	<i>HSPB1</i>		<i>GRIA4</i>
<i>TLR2</i>	<i>HMOX1</i>	<i>HTRA2</i>	<i>HTRA2</i>		<i>GRIK2</i>
<i>TMEM119</i>	<i>HRAS</i>	<i>IDE</i>	<i>IDE</i>		<i>GRIN1</i>
<i>TNF</i>	<i>HSPA6</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH1</i>		<i>GRIN2A</i>
<i>TNFRSF10A</i>	<i>HSPB1</i>	<i>IGF1</i>	<i>IGF1</i>		<i>GRIN2B</i>
<i>TNFRSF10B</i>	<i>HTRA2</i>	<i>IGF1R</i>	<i>IGF1R</i>		<i>GRIN2C</i>
<i>TNFRSF10D</i>	<i>IGF1</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL1B</i>		<i>GRIN2D</i>
<i>TNFRSF11B</i>	<i>IKBKB</i>	<i>IL1R1</i>	<i>IL1R1</i>		<i>GRIN3B</i>
<i>TNFRSF12A</i>	<i>IL1B</i>	<i>IL6</i>	<i>IL6</i>		<i>GRM1</i>
<i>TNFRSF1A</i>	<i>IL1R1</i>	<i>INS</i>	<i>INS</i>		<i>GRM2</i>
<i>TNFRSF1B</i>	<i>IL6</i>	<i>INSR</i>	<i>INSR</i>		<i>GRM5</i>
<i>TREM1</i>	<i>INPP4A</i>	<i>IPCEF1</i>	<i>IPCEF1</i>		<i>GRM8</i>
<i>TREM2</i>	<i>INPP5F</i>	<i>JUN</i>	<i>JUN</i>		<i>GSK3B</i>
<i>VEGFA</i>	<i>ITGA5</i>	<i>KEAP1</i>	<i>KEAP1</i>		<i>GTF2IRD1</i>
<i>XBP1</i>	<i>ITPR1</i>	<i>LAMP1</i>	<i>LAMP1</i>		<i>GUCY1B3</i>
	<i>ITPR2</i>	<i>LCLAT1</i>	<i>LCLAT1</i>		<i>HAP1</i>
	<i>ITPR3</i>	<i>LDHC</i>	<i>LDHC</i>		<i>HCN1</i>
	<i>JAM3</i>	<i>LMNA</i>	<i>LMNA</i>		<i>HOMER1</i>
	<i>JUN</i>	<i>LPO</i>	<i>LPO</i>		<i>HRAS</i>
	<i>KIF3A</i>	<i>LRRK2</i>	<i>LRRK2</i>		<i>HTR1A</i>
	<i>KRAS</i>	<i>LSM2</i>	<i>LSM2</i>		<i>HTR5A</i>
	<i>LIF</i>	<i>LSM7</i>	<i>LSM7</i>		<i>IGF1</i>
	<i>LMNA</i>	<i>LSR</i>	<i>LSR</i>		<i>IGF1R</i>
	<i>MAG</i>	<i>LYPLA1</i>	<i>LYPLA1</i>		<i>INS</i>
	<i>MAP2K1</i>	<i>MAN2B1</i>	<i>MAN2B1</i>		<i>INSR</i>
	<i>MAP2K2</i>	<i>MAPK10</i>	<i>MAPK10</i>		<i>ITPR1</i>
	<i>MAPK1</i>	<i>MAPK8</i>	<i>MAPK8</i>		<i>ITPR2</i>
	<i>MAPK10</i>	<i>MAPK9</i>	<i>MAPK9</i>		<i>ITPR3</i>
	<i>MAPK3</i>	<i>MAPT</i>	<i>MAPT</i>		<i>JUN</i>
	<i>MAPK8</i>	<i>MFN2</i>	<i>MFN2</i>		<i>KCNA1</i>
	<i>MAPK9</i>	<i>MGMT</i>	<i>MGMT</i>		<i>KCNB1</i>
	<i>MAPKAPK2</i>	<i>MMP14</i>	<i>MMP14</i>		<i>KCNJ10</i>
	<i>MAPT</i>	<i>MNAT1</i>	<i>MNAT1</i>		<i>KRAS</i>
	<i>MEAF6</i>	<i>MTOR</i>	<i>MTOR</i>		<i>LAMA2</i>
	<i>MECP2</i>	<i>MUTYH</i>	<i>MUTYH</i>		<i>LPAR1</i>
	<i>MMP14</i>	<i>NAGLU</i>	<i>NAGLU</i>		<i>LRRK2</i>
	<i>MMP19</i>	<i>NAPSA</i>	<i>NAPSA</i>		<i>MAP2K1</i>
	<i>MMP2</i>	<i>NCF1</i>	<i>NCF1</i>		<i>MAP2K2</i>
	<i>MMRN2</i>	<i>NEFH</i>	<i>NEFH</i>		<i>MAPK1</i>
	<i>MTA1</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>NFE2L2</i>		<i>MAPK10</i>
	<i>MTA2</i>	<i>NGFR</i>	<i>NGFR</i>		<i>MAPK3</i>
	<i>MTHFR</i>	<i>NME5</i>	<i>NME5</i>		<i>MAPK8</i>
	<i>MYC</i>	<i>NOL3</i>	<i>NOL3</i>		<i>MAPK9</i>
	<i>NCL</i>	<i>NOS1</i>	<i>NOS1</i>		<i>MBP</i>
	<i>NELFA</i>	<i>NOS3</i>	<i>NOS3</i>		<i>MECP2</i>
	<i>NF1</i>	<i>NPC1</i>	<i>NPC1</i>		<i>MPZ</i>
	<i>NFKBIA</i>	<i>NPC2</i>	<i>NPC2</i>		<i>NCAM1</i>
	<i>NGF</i>	<i>NPY</i>	<i>NPY</i>		<i>NF1</i>
	<i>NGFR</i>	<i>NQO1</i>	<i>NQO1</i>		<i>NFKBIA</i>
	<i>NOS1</i>	<i>NR4A2</i>	<i>NR4A2</i>		<i>NGFR</i>
	<i>NOS3</i>	<i>OXR1</i>	<i>OXR1</i>		<i>NLGN4X</i>
	<i>NOTCH1</i>	<i>PARK7</i>	<i>PARK7</i>		<i>NOS1</i>
	<i>NOTCH3</i>	<i>PARP1</i>	<i>PARP1</i>		<i>NOS2</i>
	<i>NOTCH4</i>	<i>PCNA</i>	<i>PCNA</i>		<i>NOS3</i>
	<i>NRG1</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PDGFRB</i>		<i>NOVA1</i>
	<i>NRXN1</i>	<i>PDPK1</i>	<i>PDPK1</i>		<i>NPAS4</i>
	<i>NTF3</i>	<i>PGAM1</i>	<i>PGAM1</i>		<i>NPTN</i>
	<i>NTNG1</i>	<i>PGK1</i>	<i>PGK1</i>		<i>NPY</i>
	<i>NTRK1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3CA</i>		<i>NQO1</i>

<i>PAK1</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>NR4A2</i>
<i>PARP1</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>NRXN1</i>
<i>PCNA</i>	<i>PINK1</i>	<i>PINK1</i>	<i>NSF</i>
<i>PDGFRB</i>	<i>PLA2G16</i>	<i>PLA2G16</i>	<i>NTF3</i>
<i>PDPK1</i>	<i>PLA2G2A</i>	<i>PLA2G2A</i>	<i>NTRK1</i>
<i>PHF19</i>	<i>PLA2G2E</i>	<i>PLA2G2E</i>	<i>P2RX4</i>
<i>PHF2</i>	<i>PLA2G2F</i>	<i>PLA2G2F</i>	<i>P2RX7</i>
<i>PHF21A</i>	<i>PLA2G4A</i>	<i>PLA2G4A</i>	<i>PAH</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>PLA2G4B</i>	<i>PLA2G4B</i>	<i>PAK1</i>
<i>PIK3CB</i>	<i>PLA2G4C</i>	<i>PLA2G4C</i>	<i>PARK7</i>
<i>PIK3R1</i>	<i>PLA2G4D</i>	<i>PLA2G4D</i>	<i>PDE1B</i>
<i>PKN1</i>	<i>PLA2G4E</i>	<i>PLA2G4E</i>	<i>PDE4D</i>
<i>PLA2G16</i>	<i>PLA2G4F</i>	<i>PLA2G4F</i>	<i>PDGFRB</i>
<i>PLA2G2A</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>PLA2G2E</i>	<i>POLR2B</i>	<i>POLR2B</i>	<i>PIK3CB</i>
<i>PLA2G2F</i>	<i>POLR2H</i>	<i>POLR2H</i>	<i>PIK3R1</i>
<i>PLA2G4A</i>	<i>POLR2J</i>	<i>POLR2J</i>	<i>PINK1</i>
<i>PLA2G4B</i>	<i>POLR2K</i>	<i>POLR2K</i>	<i>PLA2G4A</i>
<i>PLA2G4C</i>	<i>POLR2L</i>	<i>POLR2L</i>	<i>PLA2G4B</i>
<i>PLA2G4D</i>	<i>PPARGC1A</i>	<i>PPARGC1A</i>	<i>PLA2G4C</i>
<i>PLA2G4E</i>	<i>PPP2CA</i>	<i>PPP2CA</i>	<i>PLA2G4D</i>
<i>PLA2G4F</i>	<i>PPP2R5C</i>	<i>PPP2R5C</i>	<i>PLA2G4E</i>
<i>PLCB1</i>	<i>PPP2R5E</i>	<i>PPP2R5E</i>	<i>PLA2G4F</i>
<i>PLCB2</i>	<i>PPT1</i>	<i>PPT1</i>	<i>PLA2G6</i>
<i>PLCB3</i>	<i>PQBP1</i>	<i>PQBP1</i>	<i>PLCB1</i>
<i>PLCB4</i>	<i>PRKAA2</i>	<i>PRKAA2</i>	<i>PLCB2</i>
<i>PLXNB3</i>	<i>PRKCSH</i>	<i>PRKCSH</i>	<i>PLCB3</i>
<i>PLXNC1</i>	<i>PRKN</i>	<i>PRKN</i>	<i>PLCB4</i>
<i>PPARGC1A</i>	<i>PRNP</i>	<i>PRNP</i>	<i>PLCL2</i>
<i>PPP3CA</i>	<i>PRPF3</i>	<i>PRPF3</i>	<i>PMP22</i>
<i>PPP3CB</i>	<i>PRPF31</i>	<i>PRPF31</i>	<i>PNKD</i>
<i>PPP3CC</i>	<i>PSEN1</i>	<i>PSEN1</i>	<i>PPP2CA</i>
<i>PRF1</i>	<i>PSMB8</i>	<i>PSMB8</i>	<i>PPP2R5C</i>
<i>PRKAA2</i>	<i>PSMB9</i>	<i>PSMB9</i>	<i>PPP2R5E</i>
<i>PRKACA</i>	<i>PTDSS1</i>	<i>PTDSS1</i>	<i>PPP3CA</i>
<i>PRKACB</i>	<i>PTDSS2</i>	<i>PTDSS2</i>	<i>PPP3CB</i>
<i>PRKACG</i>	<i>PTGS2</i>	<i>PTGS2</i>	<i>PPP3CC</i>
<i>PRKCA</i>	<i>RAB2A</i>	<i>RAB2A</i>	<i>PPT1</i>
<i>PRKCB</i>	<i>RAD23B</i>	<i>RAD23B</i>	<i>PRKACA</i>
<i>PRKCG</i>	<i>RAN</i>	<i>RAN</i>	<i>PRKACB</i>
<i>PSEN1</i>	<i>RELA</i>	<i>RELA</i>	<i>PRKACG</i>
<i>PSEN2</i>	<i>SART1</i>	<i>SART1</i>	<i>PRKCA</i>
<i>PTEN</i>	<i>SEC23A</i>	<i>SEC23A</i>	<i>PRKCB</i>
<i>PTGS2</i>	<i>SF3A2</i>	<i>SF3A2</i>	<i>PRKCE</i>
<i>PTPRR</i>	<i>SF3B2</i>	<i>SF3B2</i>	<i>PRKCG</i>
<i>RAC1</i>	<i>SF3B4</i>	<i>SF3B4</i>	<i>PRL</i>
<i>RAF1</i>	<i>SGPL1</i>	<i>SGPL1</i>	<i>PSEN1</i>
<i>RAPGEF2</i>	<i>SIRT1</i>	<i>SIRT1</i>	<i>PTEN</i>
<i>RASGRP1</i>	<i>SIRT2</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PTGS2</i>
<i>RELA</i>	<i>SLC11A1</i>	<i>SLC11A1</i>	<i>PTPRN2</i>
<i>RET</i>	<i>SLC1A1</i>	<i>SLC1A1</i>	<i>RAB3A</i>
<i>RHOA</i>	<i>SLC1A2</i>	<i>SLC1A2</i>	<i>RAC1</i>
<i>RING1</i>	<i>SLC8A1</i>	<i>SLC8A1</i>	<i>RAF1</i>
<i>RRAS</i>	<i>SLU7</i>	<i>SLU7</i>	<i>RAPGEF2</i>
<i>RTN4</i>	<i>SMN1</i>	<i>SMN1</i>	<i>RELA</i>
<i>SHH</i>	<i>SMPD4</i>	<i>SMPD4</i>	<i>RHOA</i>
<i>SIRT1</i>	<i>SNCA</i>	<i>SNCA</i>	<i>RIMS1</i>
<i>SIRT2</i>	<i>SNRPA</i>	<i>SNRPA</i>	<i>RIT2</i>
<i>SIRT7</i>	<i>SOD1</i>	<i>SOD1</i>	<i>RRAS</i>
<i>SMYD1</i>	<i>SOD2</i>	<i>SOD2</i>	<i>RYR1</i>
<i>SNCA</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>SQSTM1</i>	<i>RYR2</i>
<i>SOX10</i>	<i>SRC</i>	<i>SRC</i>	<i>RYR3</i>
<i>SP1</i>	<i>SRSF4</i>	<i>SRSF4</i>	<i>S100B</i>

	<i>SP100</i> <i>SPI1</i> <i>STAB1</i> <i>STAT1</i> <i>STAT3</i> <i>SYNJ1</i> <i>TAF10</i> <i>TAF6L</i> <i>TAF9</i> <i>TGFB1</i> <i>TGFBR2</i> <i>THY1</i> <i>TIE1</i> <i>TLR4</i> <i>TNF</i> <i>TNFRSF10A</i> <i>TNFRSF10B</i> <i>TNFRSF10D</i> <i>TNFRSF12A</i> <i>TNFRSF1A</i> <i>TP53</i> <i>TRADD</i> <i>TRIM28</i> <i>TRIM37</i> <i>UBE2N</i> <i>USP21</i> <i>VEGFA</i> <i>XBPI</i> <i>XIAP</i>	<i>STX2</i> <i>SUCLA2</i> <i>TAF10</i> <i>TAF4</i> <i>TAF4B</i> <i>TAF6L</i> <i>TAF9</i> <i>TARDBP</i> <i>TAZ</i> <i>TBP</i> <i>TBPL1</i> <i>TCERG1</i> <i>TCIRG1</i> <i>TFAM</i> <i>TNF</i> <i>TOR1A</i> <i>TP53</i> <i>TPM1</i> <i>TRIM37</i> <i>TRPM2</i> <i>TWISTNB</i> <i>TXNL1</i> <i>U2AF2</i> <i>UBE2K</i> <i>UBE2N</i> <i>UBE3A</i> <i>UBQLN1</i> <i>UGCG</i> <i>UGT8</i> <i>USP30</i> <i>VCP</i> <i>VIP</i> <i>WFS1</i> <i>XAB2</i> <i>XBPI</i> <i>XIAP</i>	<i>STX2</i> <i>SUCLA2</i> <i>TAF10</i> <i>TAF4</i> <i>TAF4B</i> <i>TAF6L</i> <i>TAF9</i> <i>TARDBP</i> <i>TAZ</i> <i>TBP</i> <i>TBPL1</i> <i>TCERG1</i> <i>TCIRG1</i> <i>TFAM</i> <i>TNF</i> <i>TOR1A</i> <i>TP53</i> <i>TPM1</i> <i>TRIM37</i> <i>TRPM2</i> <i>TWISTNB</i> <i>TXNL1</i> <i>U2AF2</i> <i>UBE2K</i> <i>UBE2N</i> <i>UBE3A</i> <i>UBQLN1</i> <i>UGCG</i> <i>UGT8</i> <i>USP30</i> <i>VCP</i> <i>VIP</i> <i>WFS1</i> <i>XAB2</i> <i>XBPI</i> <i>XIAP</i>	<i>SCN1A</i> <i>SCN2A</i> <i>SHANK2</i> <i>SLC12A5</i> <i>SLC17A6</i> <i>SLC18A2</i> <i>SLC18A3</i> <i>SLC1A1</i> <i>SLC1A2</i> <i>SLC32A1</i> <i>SLC6A3</i> <i>SLC6A4</i> <i>SLC8A1</i> <i>SNAP91</i> <i>SNCA</i> <i>SNCAIP</i> <i>SNCB</i> <i>SORCS3</i> <i>SOX9</i> <i>SRC</i> <i>STX1A</i> <i>STX1B</i> <i>STX2</i> <i>SYNJ1</i> <i>SYT1</i> <i>SYT13</i> <i>SYT4</i> <i>SYT7</i> <i>TCIRG1</i> <i>TH</i> <i>TNR</i> <i>TOR1A</i> <i>TRPM2</i> <i>TRPV1</i> <i>TSPO</i> <i>UNC13A</i> <i>VIP</i>
--	--	--	--	--

Приложение 8. Модели бинарной логистической регрессии

А) Для комбинации микроРНК, дифференциально экспрессирующихся при БП и в контрольной группе

	В	Средн.ош.	Вальд	ст.св.	знач.	Exp (В)
miR7	0,126	0,199	0,399	1	0,527	1,134
miR30c	-0,93	0,335	7,729	1	0,005	0,394
miR29c	0,447	0,179	6,247	1	0,012	1,564
miR29a	-0,455	0,166	7,559	1	0,006	0,634
Константа	1,07	0,567	3,56	1	0,059	2,914

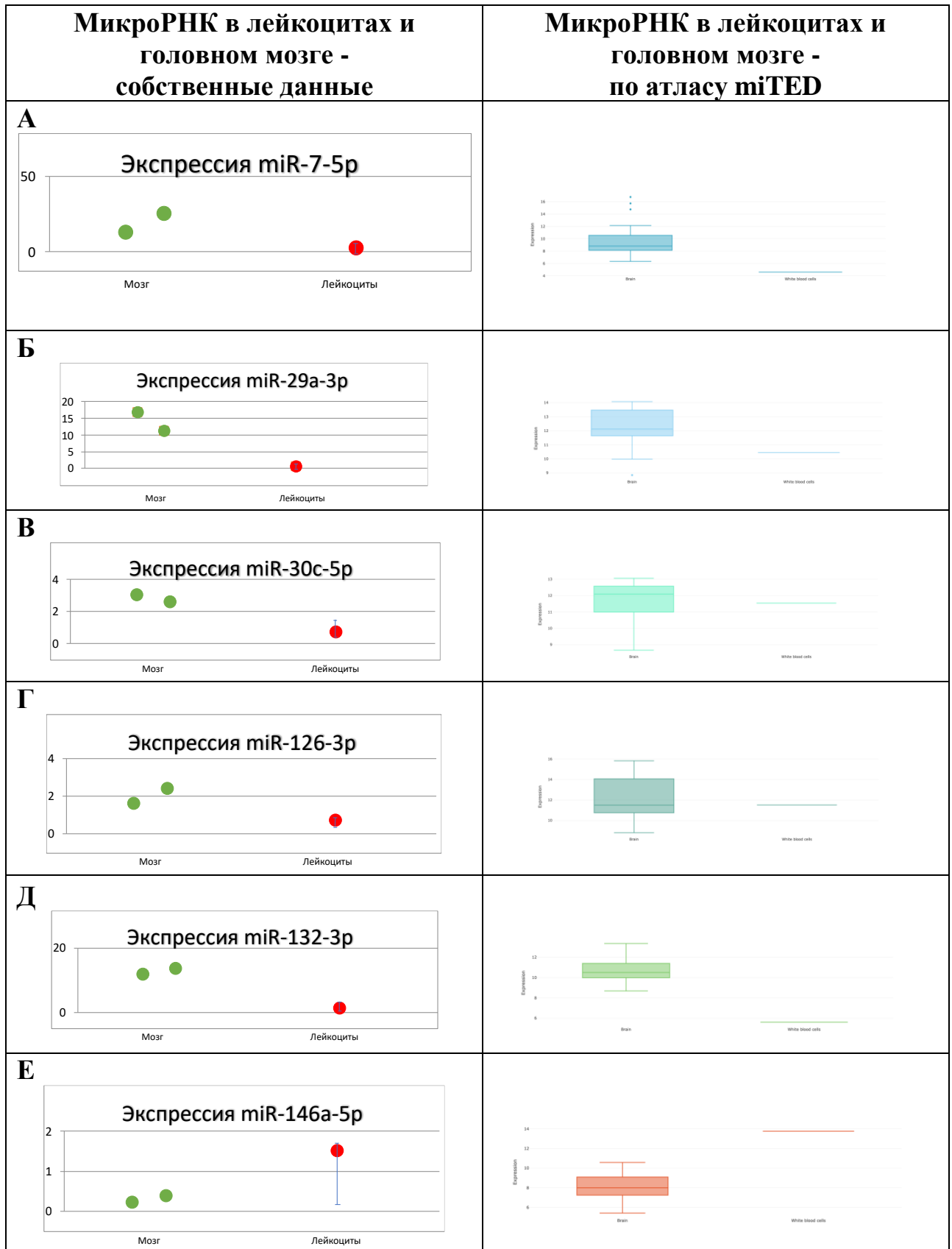
В-коэффициент в уравнении регрессии, средн.ош. – среднеквадратичная ошибка В, Вальд – статистика Вальда, ст.св. – степени свободы, знач. – уровень значимости, exp (В) – оценка соотношений шансов.

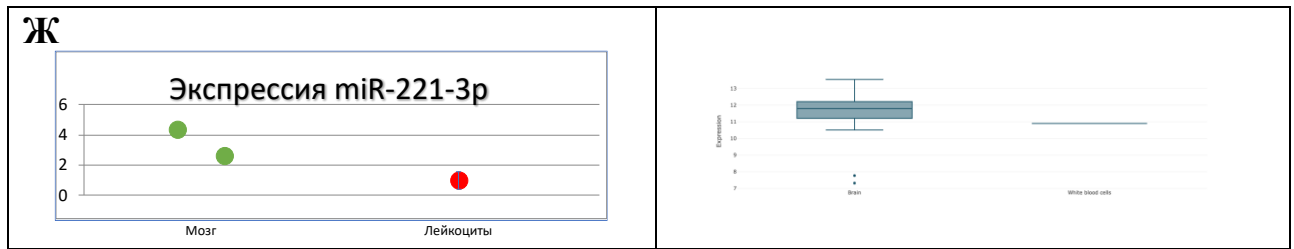
Б) Для комбинации генов, дифференциально экспрессирующихся на ранних стадиях БП и в контрольной группе

	В	Средн.ош.	Вальд	ст.св.	знач.	Exp (В)
<i>CPT1B</i>	0,091	0,041	5,055	1	0,025	1,096
<i>CDKN1A</i>	0,083	0,042	3,849	1	0,05	1,086
Константа	-8,241	3,259	6,393	1	0,011	0

В-коэффициент в уравнении регрессии, средн.ош. – среднеквадратичная ошибка В, Вальд – статистика Вальда, ст.св. – степени свободы, знач. – уровень значимости, exp (В) – оценка соотношений шансов.

Приложение 9. Уровень экспрессии микроРНК в областях головного мозга и в лейкоцитах крови: сравнение полученных результатов и данных атласа miTED





А - miR-7-5p, Б - miR-29a-3p, В - miR-30c-5p, Г –miR126-3p, Д – miR-132-3p, Е – miR-146-5p, Ж – miR-221-3p.

Brain – головной мозг, white blood cells – лейкоциты крови.

На рисунках ось ординат представлена в разном масштабе, адаптированном для каждой микроРНК.

Приложение 10. Аннотация дифференциально экспрессирующихся генов согласно базе данных Gene Ontology

Ген	Молекулярная функция	Компонент клетки	Биологический процесс, в который вовлечен данный ген
<i>CPT1B</i>	Активность картинин O-пальмитоилтрансферазы (GO:0004095)	Митохондрия (GO:0005739)	Транспорт длинноцепочечных жирных кислот (GO:0015909) Метаболизм карнитина (GO:0009437) Метаболизм жирных кислот (GO:0006631)
<i>CDKN1A</i>	Ингибирование активности протеинкиназ (GO:0004860)	Ядро (GO:0005634) Голоэнзимный комплекс циклин-зависимых протеинкиназ (GO:0000307)	Негативная регуляция циклин зависимых серин-треонинкиназ (GO:0045736) Клеточный ответ на повреждение ДНК (GO:0006974) Регуляция G1/S перехода в цикле митоза (GO:2000045)
<i>LRP1</i>	Связывание аполипопротеина (GO:0034185) Активность карго-рецепторов (GO:0038024)	Мембрана (GO:0005886)	Рецептор-опосредованный эндоцитоз (GO:0006898) Фагоцитоз (GO:0006909) Клиренс бета-амилоида с помощью трансцитоза (GO:0150093) Клиренс бета-амилоида с помощью клеточного катаболизма (GO:0150094)