

*На правах рукописи*

**ХАЧЕВА КРИСТИНА КОНСТАНТИНОВНА**

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ РОЛЬ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В ТКАНИ  
СЛЮННОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА**

3.1.24. Неврология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2024

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

**Научный руководитель:**

академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор

**Сергей Николаевич Иллариошкин**

**Официальные оппоненты:**

**Нодель Марина Романовна**, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нервных болезней и нейрохирургии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет);

**Смоленцева Ирина Геннадьевна**, доктор медицинских наук, доцент, начальник лечебно-реабилитационного центра Федерального государственного бюджетного учреждения «Клиническая больница» Управления делами Президента Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г. в «\_\_\_:\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета 24.1.186.01 при ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, г. Москва, Волоколамское шоссе, дом 80 и на сайте [www.neurology.ru](http://www.neurology.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

**Кузнецова Полина Игоревна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность и степень разработанности темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (ЧС). Этиология и патогенез заболевания окончательно не установлены. Показано наличие связи между прогрессирующей нейродегенерацией и образованием агрегатов патологического фосфорилированного белка  $\alpha$ -синуклеина (ф- $\alpha$ -син) в нервной системе (Travagli et al., 2020; Alam et al., 2019).

В настоящее время в соответствии с критериями Международного общества расстройств движений (Movement Disorder Society – MDS) клинический диагноз устанавливается правильно только в 58% случаях на ранней стадии БП и в 80% случаях – на поздней (Beach et al., 2018; Virameteekul et al., 2023). Для объективизации патологии ЧС при БП предложены методы нейровизуализации – МРТ-SWI с оценкой кластеров дофаминергических нейронов (нигросом) и транскраниальная сонография с оценкой эхогенности ЧС (ТКС ЧС), однако этим методикам свойствен ряд недостатков, ограничивающих их применение на практике (Мазуренко, 2017; Ma et al., 2022). Таким образом, очевидна острая необходимость разработки надежных и достоверных методов прижизненной диагностики БП.

Новый импульс в разработке биомаркеров БП связан с концепцией Н. Вгаак и С. Hawkes о раннем накоплении  $\alpha$ -синуклеина в вегетативных нервных волокнах периферических органов (желудочно-кишечный тракт, сердце и др.), что соответствует наличию у пациентов с БП различных немоторных симптомов, развивающихся еще в латентной (премоторной) стадии нейродегенерации. На основании этих данных в качестве потенциального биомаркера БП рассматривается детекция агрегатов ф- $\alpha$ -син в структурах периферической нервной системы (ПНС) с использованием иммуногистохимического метода (ИГХМ) (Beach et al., 2010; Borghammer, 2018). Так, присутствие агрегатов ф- $\alpha$ -син в биоптатах толстой кишки, кожи и слюнных желез продемонстрировано в работах многих авторов (Iranzo A. et al., 2018; Jimenez-Jimenez et al., 2023). Установлено, что наибольшая выявляемость включений патологического  $\alpha$ -синуклеина характерна для биоптатов слюнных желез по сравнению с образцами кожи и толстой кишки (Chahine et al., 2020). В отдельных ранних работах чувствительность ИГХМ-исследования слюнных желез

не превышала 50% (Folgoas et al., 2013), однако по мере совершенствования методологий окрашивания получаемые результаты существенно улучшались до 75% и более. К настоящему времени высокие 100%-ные значения чувствительности данного метода описаны в двух иммуногистохимических исследованиях (Ma et al., 2019; Carletti et al., 2017). Согласно мета-анализам, специфичность ИГХМ-детекции ф- $\alpha$ -син в слюнных железах может достигать 96% и 98%. Показано, что наиболее информативным является изучение инцизионных биоптатов слюнной железы с количественной оценкой распространенности ф- $\alpha$ -син. При этом метод отличается высокой безопасностью (Tsukita et al., 2019). По данным MDS, именно ИГХМ-анализ биопсийного материала слюнных желез представляет собой наиболее перспективный метод для прижизненной морфологической диагностики нейродегенеративного процесса у пациентов с БП (Heinzel et al., 2019).

Работы по сравнению чувствительности ИГХМ (детекция ф- $\alpha$ -син) с методом ТКС (детекция гиперэхогенности ЧС) в диагностике БП на сегодняшний день отсутствуют. Не изучена также взаимосвязь выраженности накопления ф- $\alpha$ -син в ПНС со стадией заболевания, степенью моторной и немоторной дисфункции. Все это определяет актуальность настоящего исследования.

**Цель работы:** оценка возможности использования иммуногистохимической детекции ф- $\alpha$ -син в ткани подъязычной слюнной железы в качестве диагностического метода у пациентов с БП.

#### **Задачи работы**

1. Разработать методологию исследования ф- $\alpha$ -син в ткани подъязычной слюнной железы у пациентов с БП в качестве дополнительного прижизненного биомаркера нейродегенеративного процесса.
2. Выявить локализацию ф- $\alpha$ -син и нейрональных маркеров в ткани подъязычной слюнной железы, с оценкой на этой основе чувствительности и специфичности иммуногистохимического исследования биопсийных образцов у пациентов с БП и участников группы контроля (лиц с патологией подъязычной слюнной железы без нейродегенеративных заболеваний).
3. Оценить содержание ф- $\alpha$ -син с использованием автоматизированного морфометрического анализа и определить пороговое значение его распространенности для дифференцирования пациентов с БП и лиц без заболевания.

4. Определить выраженность разнообразных неврологических и системных проявлений БП в обследуемой когорте пациентов при помощи специализированных шкал/опросников (NMSS, NMSQ, MDS-UPDRS, RBDSQ, PDQ-8-SI, HADS, MOCA) и оценить взаимосвязь содержания ф- $\alpha$ -син с клиническими характеристиками заболевания – стадией и длительностью патологического процесса, выраженностью моторных и немоторных симптомов, наличием/отсутствием факторов риска и др.
5. Сравнить результаты иммуногистохимического исследования ф- $\alpha$ -син в подъязычной слюнной железе пациентов с БП с результатами транскраниальной сонографии черной субстанции и оценить взаимодополняемость обеих методик в процессе диагностического поиска.

### **Научная новизна**

Впервые в мире у пациентов с БП проведено изучение взаимосвязи выраженности моторных и немоторных клинических симптомов, оцененных по шкалам/опросникам NMSS (Non-Motor Symptoms Scale), NMSQ (Non-Motor Symptoms Questionnaire), MDS-UPDRS (Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale), RBDSQ (REM Sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire), PDQ-8-SI (Parkinson's Disease Questionnaire Summary Index), HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale) и MOCA (Montreal Cognitive Assessment), с распространенностью включений ф- $\alpha$ -син в биоптатах подъязычной слюнной железы. Впервые в мире проведено изучение взаимосвязи результатов транскраниальной сонографии черной субстанции с распространенностью включений ф- $\alpha$ -син в структурах периферической нервной системы (в подъязычной слюнной железе) при БП. Разработан метод автоматизированного морфометрического анализа накопления ф- $\alpha$ -син, расположенного в непосредственной близости от нервных волокон, в составе слюнных желез пациентов с БП, определено пороговое значение содержания ф- $\alpha$ -син с целью дифференциальной диагностики пациентов с БП и лиц без заболевания. Предложен и протестирован оригинальный протокол иммуногистохимического исследования распространённости ф- $\alpha$ -син в биоптатах подъязычной слюнной железы. Впервые в стране создана база образцов биопсийного материала подъязычной слюнной железы пациентов с БП для формирования биобанка материала с целью проведения дальнейших исследований в данной области.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическое значение работы заключается в описании взаимосвязи содержания маркера БП – ф- $\alpha$ -син – в нервных волокнах ПНС в составе подъязычной слюнной железы с клиническими характеристиками заболевания у пациентов с БП, а также в определении пороговых значений распространенности включений ф- $\alpha$ -син для дифференциации здоровых лиц без БП и пациентов с БП.

Практическое значение работы заключается в определении возможности применения метода в качестве дополнительного диагностического подхода, а также в разработке алгоритма ИГХМ-диагностики БП, основанной на детекции ф- $\alpha$ -син в биопсийном материале подъязычной слюнной железы. В работе определена сравнительная чувствительность двух биомаркерных методик у пациентов с БП – ИГХМ-детекции ф- $\alpha$ -син в слюнной железе и ТКС ЧС. Выявление  $\alpha$ -синуклеиновой патологии на уровне вегетативной нервной системы и периферических тканей подтверждает системный характер поражения, свойственный БП, и позволяет глубже оценить взаимосвязь между клинической картиной и патологическими изменениями в нервной ткани. Полученные результаты расширяют диагностический арсенал врача при обследовании пациентов с подозрением на БП и создают основу для объективизации наличия синуклеинопатии на разных стадиях нейродегенеративного процесса.

## **Методология и методы исследования**

Объектом исследования (протокол одобрения локального этического комитета ФГБНУ НЦН № 9-5/21) являлись пациенты с клинически установленным, в соответствии с критериями Международного общества расстройств движений 2015 года (Postuma et al., 2015), диагнозом БП и лица без нейродегенеративных заболеваний с различными патологиями подъязычной слюнной железы. У всех участников получено добровольное информированное согласие. В работе использовались методы клинической оценки состояния участников (первый этап исследования для всех групп) и нейровизуализации (ТКС ЧС) (второй этап исследования для пациентов с БП), биопсия подъязычной слюнной железы, методы гистологического и иммуногистохимического исследования биоптатов (третий этап исследования для пациентов с БП и второй – для участников группы контроля). В дальнейшем (на четвертом этапе исследования для пациентов с БП и на третьем –

для участников группы контроля) проводилось отслеживание возникновения побочных явлений на протяжении 12 мес. после процедуры биопсии. Материалом исследования являлись клинические данные, результаты ТКС ЧС и биопсийный материал подъязычных слюнных желез участников основной группы с БП и группы контроля. Проводилась количественная автоматизированная морфометрия результатов ИГХМ и статистическая обработка полученных данных.

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

1. При БП одним из информативных дополнительных методов диагностики текущего нейродегенеративного процесса является иммуногистохимическое выявление ф- $\alpha$ -син в ткани подъязычной слюнной железы. Чувствительность разработанной методики, основанной на комбинированной окраске исследуемых структур (ф- $\alpha$ -син + нейрональные маркеры тирозингидроксилаза и PGP 9.5), составляет 100%, специфичность – 96,67%.
2. Для повышения информативности иммуногистохимического исследования необходимо проводить анализ распространенности ф- $\alpha$ -син, расположенного в непосредственной близости от периферических нервных волокон, в составе слюнной железы по результатам оценки отношения площади включений ф- $\alpha$ -син к площади нервных волокон с использованием автоматизированного морфометрического метода. В работе установлены пороговые значения отношений площади включений к площади нервных волокон для дифференцирования пациентов с БП и лиц без признаков заболевания, на основании чего оптимизирован процесс обработки и интерпретации результатов иммуногистохимической реакции.
3. Имеется статистически значимая корреляция между содержанием ф- $\alpha$ -син в ткани слюнной железы и выраженностью различных (в первую очередь, вегетативных) немоторных расстройств, нарушений повседневной активности и моторной функции у пациентов с БП. Выявленная взаимосвязь иммуногистохимических характеристик со степенью тяжести немоторных нарушений подчеркивает системный характер нейродегенеративного процесса при БП и указывает на возможность использования иммуногистохимического метода для более глубокой оценки всего многообразного спектра клинических проявлений на различных стадиях заболевания.

4. Более чем у 90% пациентов с БП имеет место совпадение результатов оценки распространенности включений ф- $\alpha$ -син (по данным иммуногистохимического метода) и гиперэхогенности черной субстанции (по данным транскраниальной сонографии черной субстанции). Детекция ф- $\alpha$ -син в ткани подъязычной слюнной железы в соответствии с разработанным алгоритмом рекомендуется в качестве дополнительного метода диагностики БП при невозможности проведения транскраниальной сонографии или при отсутствии гиперэхогенного сигнала у пациента.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертационная работа включает в себя описание подхода к использованию иммуногистохимической детекции маркера БП в ПНС в качестве диагностического, а также оценивает взаимосвязь клинической выраженности признаков заболевания с распространенностью патологического маркера в ПНС. Содержание работы соответствует паспорту специальности 3.1.24. «Неврология», направлениям исследований «Нейровизуализационные и инструментальные методы исследования в Неврологии» (пункт 19), которое включает в себя патоморфологические методы исследования ПНС и ЦНС, и «Нейрогенетика, наследственные и дегенеративные заболевания нервной системы» (пункт 1), которое включает клиническую феноменологию нейродегенеративных болезней.

#### **Личный вклад автора**

Автор самостоятельно определила дизайн исследования, провела клиническую часть работы, отбор участников по критериям включения и невключения и оценку по шкалам/опросникам. Автор самостоятельно выполнила гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсий подъязычной слюнной железы. Автор самостоятельно применила метод автоматизированной морфометрии для количественной оценки результатов ИГХМ-реакций и провела анализ и статистическую обработку данных.

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

Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью, достаточным количеством участников исследования и проанализированных образцов слюнной железы, использованием адекватных статистических методов, применением количественного автоматизированного метода оценки данных.

Результаты работы обсуждены на Всероссийской конференции «Неотложные состояния в неврологии: современные методы диагностики и лечения» (2021 г.), междисциплинарной конференции «Вейновские чтения» (2022 г.), конгрессе «Нейрофорум-2022» и V Национальном конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (2022 г.), конгрессе «Нейрофорум-2024» (2024 г.).

### **Внедрение результатов работы**

Результаты работы внедрены в образовательный процесс студентов, ординаторов и аспирантов по специальности «Неврология» в ФГБНУ НЦН.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 4 в журналах, рекомендованных ВАК РФ (включая 3 статьи в журналах, индексируемых в базе SCOPUS).

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и иллюстрирована 14 рисунками. Диссертация построена из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования, обсуждение, выводы, практические рекомендации, список литературы. Библиографический указатель содержит 23 отечественных и 155 зарубежных источников литературы.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность сотруднику научно-консультативного отделения ФГБНУ НЦН к.м.н. Карабанову А.В. за помощь в наборе пациентов, а также заведующему лабораторией нейроморфологии Института мозга ФГБНУ НЦН д.м.н., профессору Сухорукову В.С. и сотрудникам лаборатории к.м.н. Воронкову Д.Н. и д.м.н. Худоеркову Р.М. за наставничество при проведении гистологического и иммуногистохимического исследования. Искренняя признательность автора – заведующему лабораторией ультразвуковых исследований ФГБНУ НЦН д.м.н. Четкину А.О. и сотрудникам лаборатории за проведение ТКС, а также д.м.н. Сипкину А.Н. и сотрудникам отделения челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского за проведение биопсии подъязычной слюнной железы и помощь в наборе участников исследования. Отдельная благодарность д.м.н. Богданову Р.Р. за помощь в организации работы и координации взаимодействия с ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

#### Общий дизайн и методология исследования

В исследование вошли 30 пациентов научно-консультативного отделения ФГБНУ НЦН с диагнозом БП (МКБ-10 G.20), установленным в соответствии с критериями MDS 2015 г. (основная группа), а также 30 добровольцев с патологией слюнных желез без нейродегенеративных заболеваний (группа контроля) из числа пациентов отделения челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского.

*Критериями включения* служили: полученное информированное согласие, возраст старше 40 лет. *Критериями невключения* являлись: отказ от участия, наличие нейродегенеративного заболевания (для группы контроля), наличие противопоказаний для проведения биопсии (аллергическая реакция на местные анестетики в анамнезе, заболевания системы гемостаза, декомпенсированный сахарный диабет), выраженных когнитивных нарушений (МОСА <17 баллов), а также тяжелое соматическое или психическое состояние.

Пациенты основной группы с идиопатической БП проходили скрининг (оценку соответствия участников критериям включения и невключения) и 4 этапа исследования: сбор анамнеза и оценку по шкалам/опросникам Хен–Яра, NMSS, NMSQ, MDS-UPDRS, RBDSQ, HADS, PDQ-8-SI (1-й этап); ТКС ЧС (2-й этап); биопсию подъязычной слюнной железы и ИГХМ-исследование биоптатов (3-й этап); отслеживание нежелательных явлений после биопсии в течение 12 мес. (4-й этап). Участники группы контроля проходили аналогичные этапы исследования, за исключением тестирования по шкалам/опросникам на 1-м этапе и ТКС ЧС.

#### Иммуногистохимическое и гистологическое исследования

Исследование полученного биопсийного материала проводилось на базе лаборатории нейроморфологии Института мозга ФГБНУ НЦН. Фиксацию материала осуществляли в формалине, проводку – в этиловом спирте, изопропиловом спирте, хлороформе и смеси изопропилового спирта с хлороформом, с последующим заключением материала в парафиновые блоки. С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 10 мкм, которые помещали на стекла (по 8 срезов

на 1 стекло). В каждом исследуемом случае получали 11 стекол (88 срезов на всех стеклах). Из них по 4 стекла (32 среза) использовали для проведения каждой из 2-х иммуногистохимических реакций (детекция антител к ф- $\alpha$ -син и к тирозингидроксилазе (ТГ) – 1-я реакция, и антител к ф- $\alpha$ -син и к белковому продукту гена 9.5 (PGP 9.5) – 2-я реакция), и по одному стеклу – для контрольного гистологического окрашивания и негативного контроля реагента для каждой из реакций. Выбор серии из указанного количества срезов для исследования был основан на информации о дизайнах ранее проведенных ИГХМ-исследований биопсий слюнных желез (Adler et al., 2014; Carletti et al., 2017; Iranzo et al., 2018).

После депарафинизации-регидратации, которая проводилась по стандартной методике, осуществляли тепловую демаскировку антигена и проводили нейтрализацию эндогенной пероксидазной активности в водном растворе 3% перекиси водорода. Между этапами предварительной подготовки проводили промывку материала буфером PBS (натрий-фосфатный буфер) + Triton (0,1%).

Для повышения достоверности определения природы включений и недопущения распознавания неспецифических структур со сходными параметрами интенсивности окрашивания и формой в качестве искомым включений, иммуногистохимическая реакция проводилась с использованием метода двойной детекции: одновременного окрашивания материала на искомый биомаркер ф- $\alpha$ -син и на один из двух нейрональных маркеров (ТГ или PGP 9.5). Использовали следующие пары первичных антител: ф- $\alpha$ -син (клон 81A, ab184674, Abcam, 1:200) + PGP 9.5 (ab108986, Abcam, 1:300) и ф- $\alpha$ -син (клон EP1536Y, ab51253, Abcam, 1:300) + ТГ (клон TH-16, T2928, Sigma, 1:500). Для выявления связывания первичных антител использовали готовую систему MultiVision TL-012-MARH (Thermo Scientific) по инструкции производителя. Препараты изучали под микроскопом при 100-кратном увеличении объектива. Позитивным результатом реакции считалось визуальное обнаружение в материале включений ф- $\alpha$ -син, расположенных вблизи маркеров нервных волокон PGP 9.5 или ТГ. Для последующего количественного морфометрического анализа распределения ф- $\alpha$ -син и нейрональных маркеров с каждого среза в каждом случае отбиралась одна фотография, репрезентирующая поле зрения с максимальным количеством визуально выявленных включений ф- $\alpha$ -син, расположенных вблизи маркеров нервных волокон. В случае отсутствия на

срезе визуально выявляемых включений для количественного анализа выбиралась фотография любого поля зрения, содержащего маркер нервных волокон.

### Цифровая обработка и количественный анализ гистологического материала

Автоматизированный морфометрический анализ состоял из нескольких этапов, проводимых вручную и автоматически. На первом этапе вручную в фоторедакторе проводилась нормализация экспозиции и баланса белого полученных микрофотографий. Далее следовали автоматические этапы анализа (перевод изображения в массив данных и цветовая деконволюция), проводимые по методике, принципиально основанной на публикации (Гуменюк и соав., 2017). Автоматические этапы проводились с помощью программы, написанной на языке программирования Python 3 (Python Software Foundation) с использованием библиотек Open CV (переводит изображение в массив количественных данных, отражающих параметры интенсивности каждого пикселя) и Scikit-image (осуществляет цветовую деконволюцию; в работе адаптирована для разделения двух цветовых каналов – синего и коричневого). Расчет площади включений ф- $\alpha$ -син и нервных волокон, а также их отношения проводился автоматически программой, разработанной специально для реализации задач настоящей работы; он учитывал пороговые значения интенсивности коричневого и синего цвета, а также предварительно определенное эмпирически пороговое значение расстояния между включениями и маркерами нервных волокон.

Автоматизированный морфометрический анализ распространённости ф- $\alpha$ -син включал в себя расчет общей площади включений (в  $\mu\text{км}^2$ ), общей площади волокон (в  $\mu\text{км}^2$ ) и отношения площади включений ф- $\alpha$ -син к площади нервных волокон (отношение «включения / нервные волокна»), которое служило численным выражением степени распространённости агрегатов ф- $\alpha$ -син.

### Статистическая обработка данных

Описательная статистика представлена в виде процентов и средних арифметических ( $M$ ) со значениями стандартных отклонений ( $\sigma$ ) или в виде  $M_e$  [Q1, Q3]. Для оценки нормальности распределения использовали тест Шапиро–Уилка. Для оценки наличия связи применялись корреляционный анализ Спирмена и анализ Пирсона. Оценка взаимосвязи бинарных и количественных данных проводилась при

помощи точечно-бисериального коэффициента корреляции. Проверку статистической значимости проводили при помощи t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна–Уитни. Принятая граница уровня значимости –  $p=0,05$ . Обработка данных проводилась с помощью языка программирования Python 3 (Python Software Foundation), библиотек SciPy и NumPy. ROC-анализ для оценки диагностической значимости ИГХМ был проведен в программе MedCalc (MedCalc Software Ltd).

## **Результаты исследования и обсуждение**

### Клинические и демографические характеристики участников исследования

Группу пациентов с БП (основная группа) составили 30 человек, средний возраст –  $60,2 \pm 9,1$  лет, длительность заболевания с момента постановки диагноза – 4 [2,7] года, стадия по Хен–Яру – 2 [2; 2,5] (преимущественно пациенты имели 2 и 2,5 стадии; у 4 пациентов была 3 стадия, у 2 пациентов стадия 1,5 и у 1 – стадия 1). У большинства пациентов ( $n=19$ ) была смешанная форма заболевания. Анализировалось наличие в анамнезе факторов риска развития БП и факторов протекции (таблица 1).

Степень нарушения немоторных функций по опроснику NMSQ была умеренной, по шкале NMSS – тяжелой. У пациентов отсутствовали когнитивные и аффективные нарушения, расстройства сна. Отмечалось умеренное снижение качества жизни по опроснику PDQ-8-SI. Для пациентов было характерно заметное ограничение повседневной активности и значительная выраженность немоторных и моторных симптомов по шкале MDS-UPDRS (таблица 1).

В контрольную группу вошло 30 участников без нейродегенеративных заболеваний и без семейного анамнеза по нейродегенеративным заболеваниям с патологиями подъязычной слюнной железы (киста слюнной железы, новообразования, калькулезный сиалоаденит, синдром Шегрена). Статистически значимых различий между участниками двух групп по возрасту, полу, приверженности курению, физической активности не обнаружено ( $p>0,05$ ). Группы различались по частоте встречаемости опыта работы с химическими веществами, наличию ЧМТ в анамнезе и по значениям суммы баллов по шкале МОСА ( $p < 0,05$ ) (таблица 1).

**Таблица 1 – Исходные данные включенных в исследование участников.**

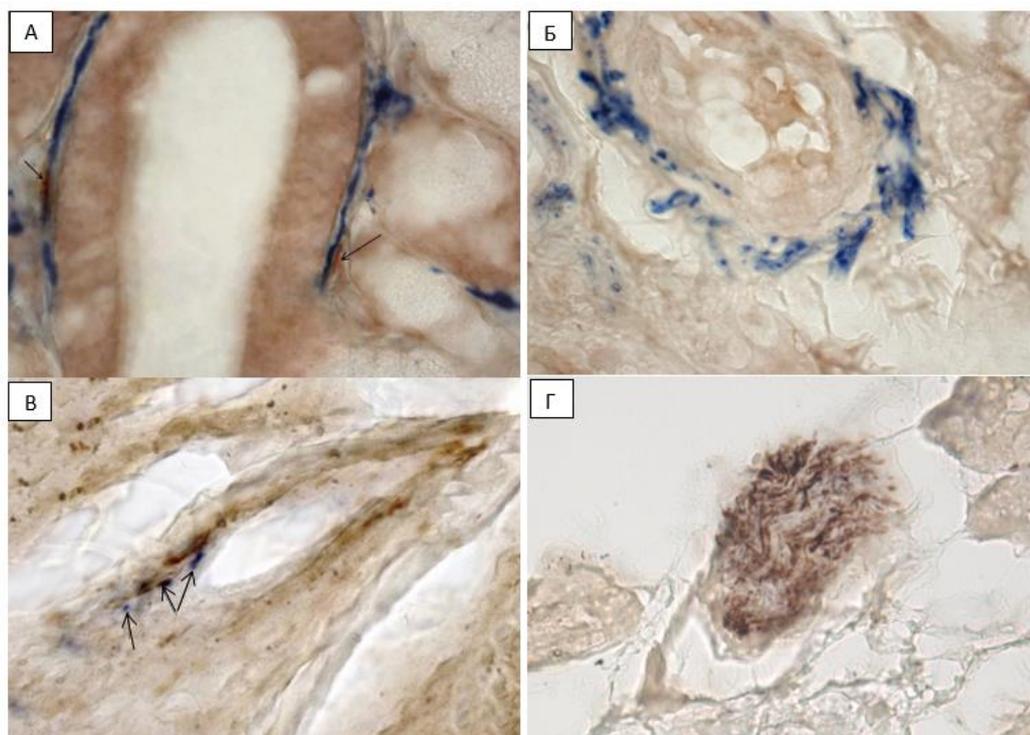
	<b>Основная группа</b>	<b>Группа контроля</b>	<b>p (межгрупповое сравнение)</b>
<b>Демографические характеристики</b>			
<b>Пол</b>	М – 21 Ж – 9	М – 20 Ж – 10	p=0,79 <sup>#</sup>
<b>Возраст, годы</b>	60,2±9,1	58,4±6,8	p=0,389 <sup>*</sup>
<b>Клинические характеристики</b>			
Длительность БП с момента постановки диагноза, годы	4 [2, 7]	-	-
Стадия по Хен–Яру	2 [2;2,5]	-	-
Смешанная форма БП	19 (63,3%)	-	-
Акинетико-ригидная форма БП	10 (33,3%)	-	-
Дрожательная форма БП	1 (3,3%)	-	-
<b>Факторы риска/протекции</b>			
Хроническое воздействие химических веществ/радиации, n (%)	11 (36,7%)	1 (3,3%)	p=0,0017 <sup>#</sup>
Черепно-мозговая травма (ЧМТ) в анамнезе, n (%)	13 (43,3%)	2 (6,7%)	p=0,0015 <sup>#</sup>
Курение, n (%)	10 (33,3%)	6 (20%)	p=0,158 <sup>#</sup>
Физическая активность более 11 ч в неделю, n (%)	13 (43,3%)	16 (53,3%)	p=0,447 <sup>#</sup>
<b>Результаты оценки по шкалам и опросникам</b>			
МОСА, баллы	26,17±1,87	27,67±1,6	p=0,001 <sup>*</sup>
NMSS, баллы	51,82±33,51	-	-
NMSQ, баллы	10,72±4,88	-	-
MDS-UPDRS I, баллы	11 [7;14]	-	-
MDS-UPDRS II, баллы	10 [5;17]	-	-
HADS депрессия, баллы	4,96±3,02	-	-
HADS тревога, баллы	6,17±4,48	-	-
MDS-UPDRS III, баллы	27±9,46	-	-
RBDSQ, баллы	4 [3;8]	-	-
PDQ-8-SI	25 [12,5;37,5]	-	-

*Примечания:* p – уровень значимости; \* – t-критерий Стьюдента; # – U критерий Манна–Уитни.

Все участники прошли процедуру биопсии подъязычной слюнной железы. У 5 пациентов в группе контроля и 5 пациентов в основной группе отмечалась локальная болезненность в области биопсии в первые сутки после процедуры, которая купировалась приемом нестероидных противовоспалительных средств. Отдаленных нежелательных явлений в течение 12 мес. ни у кого не отмечено.

Обнаружение фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина и маркеров нервных волокон в материале слюнных желез

Реакция с антителами к ф- $\alpha$ -син была визуально положительной у 30 (100%) пациентов с БП на всех срезах и у одного (3,3%) участника группы контроля (Г.А.С., мужчина, 48 лет, без клинических признаков и семейного анамнеза нейродегенеративных заболеваний) в 19 срезах из 32 (рисунок 1 А, В). У остальных 29 участников группы контроля на всех срезах визуализировалось только окрашивание нервных волокон (рисунок 1 Б, Г).



**Рисунок 1** – Подъязычная слюнная железа. Ув. объектива  $\times 100$ .

А – Пациент с БП, 61 год. Окрашивание антителами к ф- $\alpha$ -син (положительная реакция, коричневые включения, отмечены стрелками) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон).

Б – Участник группы контроля, 59 лет. Окрашивание антителами к ф- $\alpha$ -син (отрицательная реакция) и PGP 9.5 (положительная реакция).

В – Пациент с БП, 62 года. Окрашивание антителами к ф- $\alpha$ -син (положительная реакция, синие включения, отмечены стрелками) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, темно-коричневое окрашивание нервных волокон).

Г – Участник группы контроля, 54 года. Окрашивание антителами к ф- $\alpha$ -син (отрицательная реакция) и тирозингидроксилазе (положительная реакция).

Ф- $\alpha$ -син в материале пациентов с БП и клинически здорового участника Г.А.С. без признаков заболевания (результаты иммуногистохимии которого были сходны с таковыми у пациентов с БП) визуализировался в виде небольших овальных и

сферических (глобулярных), а также фибриллярных включений, расположенных в непосредственной близости от нервных волокон в виде пучков (при прохождении среза поперек волокна) или извитых фибрилл (при продольном срезе), позитивных при окрашивании на ТГ и PGP 9.5 (рисунок 1 А, В). При этом следует отметить, что общее содержание ф- $\alpha$ -син в материале участника Г.А.С. было визуально несколько меньшим, чем в материале пациентов основной группы.

Нервные волокна и, соответственно, позитивно окрашенные на ф- $\alpha$ -син включения в материале пациентов с БП и участника Г.А.С. располагались в составе междольковой соединительной ткани, по периметру протоков и между ацинусами подъязычной слюнной железы (рисунок 1 А, В).

Нервные волокна в материале подъязычной слюнной железы остальных 29 участников группы контроля имели аналогичную локализацию; окрашивание на ф- $\alpha$ -син у них отсутствовало (рисунок 1 Б, Г).

#### Морфометрический анализ распространенности фосфорилированного $\alpha$ -синуклеина

В основной группе площадь включений ф- $\alpha$ -син в реакции с нейрональным маркером PGP 9.5 составила 13,82 [10,65; 15,49] мкм<sup>2</sup>, общая площадь волокон (PGP 9.5) – 366,21 [304,49; 417,19] мкм<sup>2</sup>, отношение «включения / нервные волокна (PGP 9.5)» – 0,036 [0,032; 0,045]. Результаты расчетов представлены в таблице 2.

Площадь включений ф- $\alpha$ -син в реакции с нейрональным маркером ТГ составила 1,025 [0,877; 1,425] мкм<sup>2</sup>, общая площадь волокон (ТГ) – 198,83 [136,54; 300,92] мкм<sup>2</sup>, отношение «включения / нервные волокна (ТГ)» – 0,005 [0,0037; 0,0077] (таблица 2).

Площадь нервных волокон с маркером PGP 9.5 у лиц без нейродегенеративных заболеваний была статистически значимо больше, чем у пациентов основной группы и составила 423,34 [360,1; 483,9] мкм<sup>2</sup>, с маркером ТГ – 359,12 [322,11; 465,18] мкм<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ) (таблица 3). У отмеченного выше клинически здорового участника Г.А.С. значения площади нервных волокон, окрашенных на оба нейрональных маркера, были сравнимыми со значениями других участников группы контроля.

**Таблица 2** – Результаты морфометрического анализа материала пациентов с БП.

Реакция	S ф-α-син , мкм <sup>2</sup>	S НВ, мкм <sup>2</sup>	Отношение «В/НВ»	Диапазон значений отношений В/НВ (min-max)
ф-α-син + ТГ	1,025 [0,877; 1,425]	198,83 [136,54; 300,92]	0,005 [0,0037; 0,0077]	0,002–0,013
ф-α-син + РGP 9.5	13,82 [10,65; 15,49]	366,21 [304,49; 417,19]	0,036 [0,032; 0,045]	0,015–0,084

*Примечания:* S – площадь; S ф-α-син – относительная площадь включений ф-α-син; ТГ – тирозингидроксилаза; В – включения; НВ – нервные волокна.

**Таблица 3** – Результаты морфометрического анализа материала пациентов группы контроля.

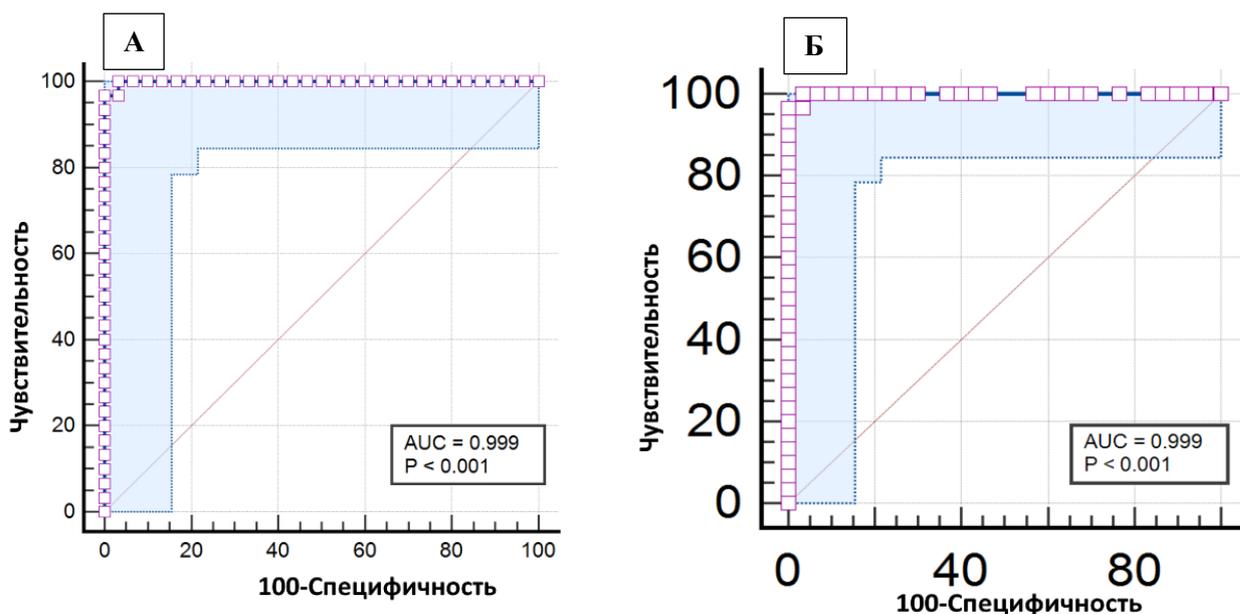
Реакция	S В, мкм <sup>2</sup>	S НВ, мкм <sup>2</sup>	Отношение «В/НВ»	Диапазон значений отношений В/НВ (min-max)
ф-α-син + ТГ	0,00015 [3,3*10 <sup>-5</sup> ; 0,0004]	359,12 [322,11; 465,18]	4*10 <sup>-7</sup> [9*10 <sup>-8</sup> ; 9,8*10 <sup>-7</sup> ]	3*10 <sup>-10</sup> – 0,00206
ф-α-син + РGP 9.5	0,001 [0,0006; 0,0028]	423,34 [360,1; 483,9]	2,5*10 <sup>-6</sup> [1,8*10 <sup>-6</sup> ; 5,8*10 <sup>-6</sup> ]	8,86*10 <sup>-9</sup> – 0,018

*Примечание:* обозначения как в таблице 2.

Рассчитанные при автоматизированном анализе у лиц без нейродегенеративных заболеваний (за исключением вышеуказанного участника Г.А.С.) площади структур, которые имели интенсивность, сходную с таковой для синуклеиновых включений, оказались в тысячи раз меньшими, чем в основной группе. С учетом этого, а также действительного отсутствия визуализируемых синуклеин-позитивных включений у этих 29 участников, данные структуры можно считать погрешностью распознавания нескольких одиночных пикселей при автоматизированной морфометрии. Значения площади включений и отношений «включения / нервные волокна» участника Г.А.С. (0,018 для реакции с РGP 9.5 и 0,00206 для реакции с ТГ) были сопоставимыми с таковыми у пациентов с БП (хотя и несколько меньше). Результаты расчетов в группе контроля показаны в таблице 3.

Диагностическая ценность иммуногистохимической детекции ф- $\alpha$ -син (в реакциях с PGP 9.5 и ТГ) для дифференциации пациентов с БП и лиц без БП была определена с использованием метода построения ROC-кривой (рисунок 2 А, Б).

В реакции на ф- $\alpha$ -син и нейрональный маркер PGP 9.5 специфичность метода составила 96,67%, чувствительность – 100% (рисунок 2 А). В реакции на ф- $\alpha$ -син и нейрональный маркер ТГ специфичность метода составила 96,67%, чувствительность – 100% (рисунок 2 Б).



**Рисунок 2** – Результаты анализа специфичности и чувствительности ИГХМ для детекции ф- $\alpha$ -син.

А – для ИГХМ с окрашиванием на ф- $\alpha$ -син + PGP 9.5;

Б – для ИГХМ с окрашиванием на ф- $\alpha$ -син + ТГ.

*Примечания:* AUC – площадь под кривой; p – уровень значимости.

Пороговое значение отношения «включения / нервные волокна (PGP 9.5)», при преодолении которого можно судить об обнаружении агрегатов ф- $\alpha$ -син (а не погрешности распознавания цвета) и подтвердить клинически установленный диагноз БП, составило 0,00002.

Пороговое значение отношения «включения / нервные волокна (ТГ)», при превышении которого можно судить о детекции включений ф- $\alpha$ -син и о верификации клинического диагноза БП, составило 0,000004.

Сопоставление выраженности накопления ф-α-син с клиническими характеристиками пациентов с БП и результатами ТКС ЧС

Выявлена значимая умеренная положительная связь отношения «включения / нервные волокна (ТГ и PGP 9.5)» (для обоих изученных нейрональных маркеров) со значениями шкал и опросников, оценивающих немоторную функцию пациентов с БП, – NMSQ и NMSS (таблица 4). Отмечена слабая корреляция отношения «включения / нервные волокна (ТГ)» и умеренная корреляция отношения «включения / нервные волокна (PGP 9.5)» с балльной оценкой немоторных симптомов БП по подшкале MDS-UPDRS I (таблица 4). Корреляция отношения «включения / нервные волокна (ТГ)» и отношения «включения / нервные волокна (PGP 9.5)» с балльной оценкой активности пациентов в повседневной жизни и оценкой моторных симптомов заболевания по подшкалам MDS-UPDRS II и MDS-UPDRS III была умеренной (таблица 5).

При сопоставлении длительности, стадии заболевания по функциональной шкале Хен–Яра, а также результатов шкал PDQ-8-SI, MOCA, RBDSQ и HADS со значениями отношений «включения / нервные волокна» (для обоих изученных нейрональных маркеров) значимой связи выявлено не было (таблица 4, 5).

**Таблица 4** – Корреляции отношения «включения ф-α-син / нервные волокна» и результатов шкал/опросников оценки симптомов пациентов с БП.

	NMSQ		NMSS		MDS-UPDRS I		RBDSQ		HADS тревога		HADS депрессия	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
<b>S ф-α-син / ТГ</b>	0,54	<b>0,002</b>	0,58	<b>0,001</b>	0,41	<b>0,002</b>	-0,05	0,25	0,25	0,17	0,36	0,05
<b>S ф-α-син / PGP 9.5</b>	0,56	<b>0,0015</b>	0,58	<b>0,0007</b>	0,67	<b>0,00007</b>	-0,06	0,19	0,26	0,16	0,37	0,06

*Примечания:* R– коэффициент корреляции; p – уровень значимости; S ф-α-син – относительная площадь включений ф-α-син; ТГ – тирозингидроксилаза.

Наличие ЧМТ в анамнезе было слабо взаимосвязано с содержанием ф-α-син (точечно-бисериальный коэффициент корреляции,  $r_{pb}=0,5$ ;  $p=0,0048$  в реакции с ТГ и  $r_{pb}=0,54$ ;  $p=0,0019$  в реакции с PGP 9.5).

Попарное сравнение подгрупп с наличием и отсутствием ЧМТ в анамнезе внутри группы пациентов с БП продемонстрировало наличие значимых различий между ними (U тест Манна-Уитни,  $p < 0,05$ ) (таблица 6). Связи между отношением «включения / нервные волокна (ТГ и PGP 9.5)», курением, физической активностью и историей хронического воздействия химических веществ в анамнезе не обнаружено. Попарные сравнения в подгруппах также показали отсутствие различий между ними по наличию/отсутствию факторов курения, приверженности физической активности, истории взаимодействия с химическими веществами (U тест Манна-Уитни,  $p > 0,05$ ) (таблица 6).

**Таблица 5** – Корреляции отношения «включения ф- $\alpha$ -син / нервные волокна», клинических характеристик и результатов шкал/опросников оценки симптомов БП.

	Длительность болезни		Стадия по Хен-Яру		MDS-UPDRS II		MDS-UPDRS III		PDQ-8-SI		MOCA	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
<b>S ф-<math>\alpha</math>-син / ТГ</b>	0,27	0,14	0,35	0,06	0,68	<b>&lt;0,001</b>	0,6	<b>&lt;0,001</b>	-0,06	0,75	-0,21	0,25
<b>S ф-<math>\alpha</math>-син / PGP 9.5</b>	0,35	0,05	0,36	0,05	0,6	<b>&lt;0,001</b>	0,54	<b>0,002</b>	-0,003	0,99	-0,24	0,19

*Примечание:* обозначения как в таблице 4.

**Таблица 6** – Попарное сравнение подгрупп пациентов с БП, разделенных по наличию или отсутствию факторов риска или протекции.

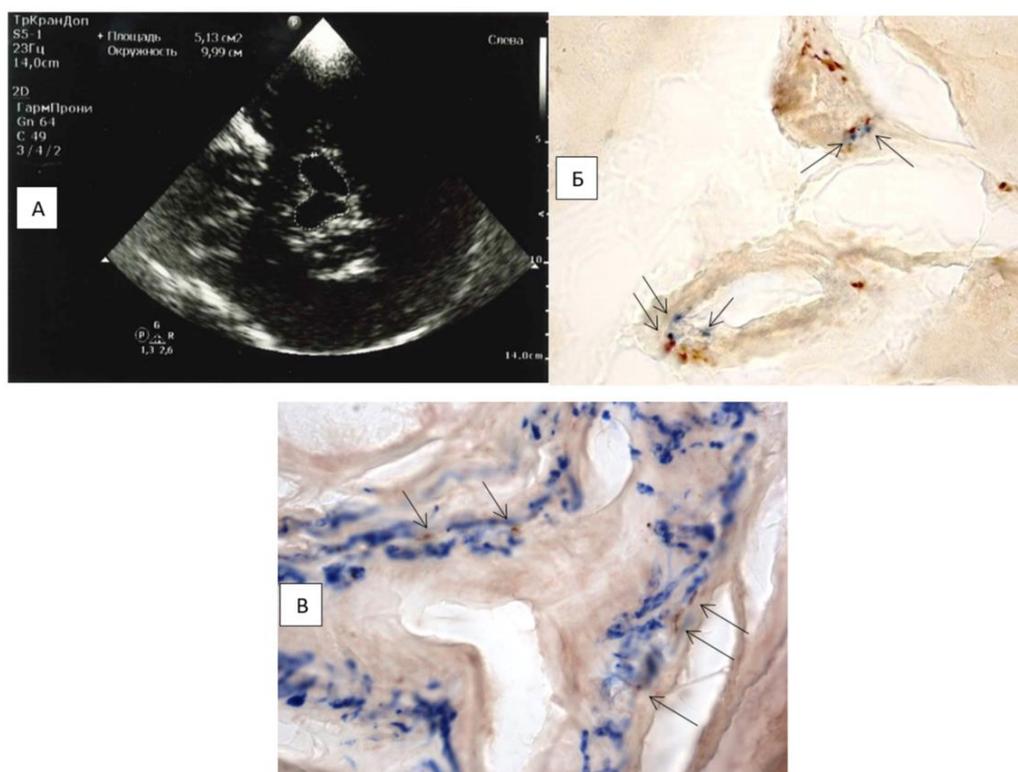
		<b>S ф-<math>\alpha</math>-син/ PGP 9.5</b>	<b>S ф-<math>\alpha</math>-син/ ТГ</b>
<b>ЧМТ в анамнезе</b>	Есть (n=13)	0,048 [0,032;0,060]	0,008 [0,005;0,010]
	Нет (n=17)	0,034 [0,031;0,036]	0,005 [0,003;0,006]
	p	<b>0,01</b>	<b>0,015</b>
<b>Курение</b>	Есть (n=10)	0,036 [0,033; 0,040]	0,005 [0,004;0,007]
	Нет (n=20)	0,034 [0,032;0,047]	0,006 [0,003;0,008]
	p	0,87	0,88
<b>Физическая активность</b>	Есть (n=13)	0,038 [0,031;0,046]	0,005 [0,003;0,007]
	Нет (n=17)	0,034 [0,032;0,041]	0,005 [0,004;0,008]
	p	0,90	0,97
<b>Хроническое воздействие химических веществ</b>	Есть (n=11)	0,037 [0,029;0,048]	0,005 [0,003;0,008]
	Нет (n=19)	0,035 [0,032;0,044]	0,006 [0,004;0,008]
	p	0,79	0,67

*Примечание:* обозначения как в таблице 4.

Положительный результат ТКС ЧС получен для 28 (93,3%) пациентов основной группы.

Медианное значение площади гиперэхогенности для 28 пациентов составило 0,245 [0,227; 0,272] см<sup>2</sup>. В двух случаях (6,7%) результат был отрицательным (или неопределенным): в одном случае у обследуемого отсутствовало височное ультразвуковое окно, в другом – у пациента с БП была отмечена нормальная эхогенность ЧС, не превышающая пороговых значений (0,18 см<sup>2</sup>). На рисунке 3 представлен клинический пример пациентки Б.Л.Н. с диагнозом БП, нормальной эхогенностью ЧС и положительным результатом иммуногистохимического исследования биопсии подъязычной слюнной железы (положительное окрашивание на ф-α-син).

Корреляционный анализ не выявил связи между площадью гиперэхогенности ЧС и отношениями «включения / нервные волокна» (R= -0,03, p=0,88 в реакции с ТГ и R= -0,07, p=0,69 в реакции с PGP 9.5).



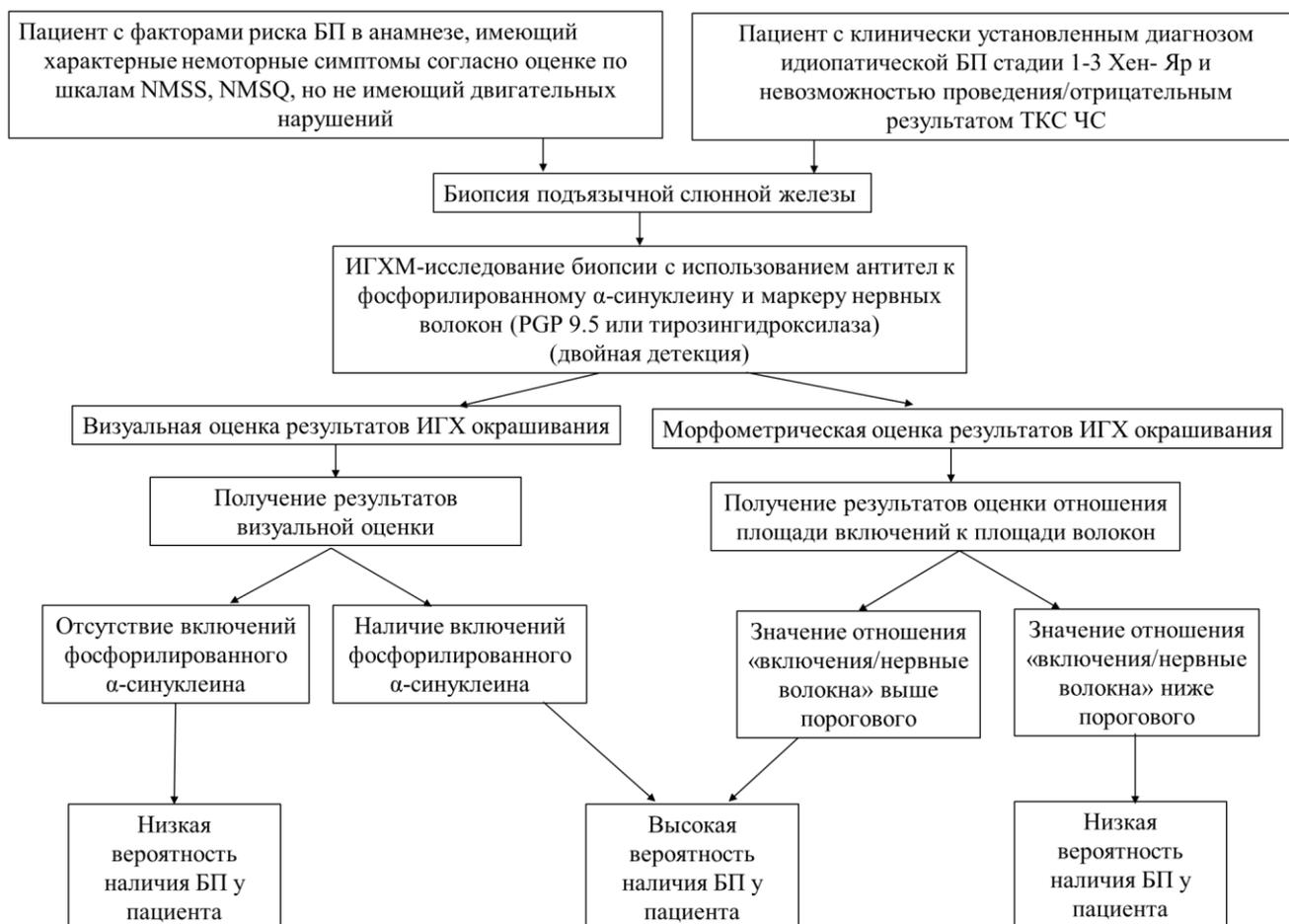
**Рисунок 3** – Результаты ИГХМ (ф-α-син) и ТКС ЧС у пациентки Б.Л.Н.

А – отсутствие гиперэхогенности ЧС. Б – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, синие включения, отмечены стрелкой) и ТГ (положительная реакция, коричневое окрашивание нервных волокон) (ув. объектива × 100). В – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, коричневые включения, отмечены стрелкой) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон) (ув. объектива × 100).

## Алгоритм применения ИГХМ с определением ф- $\alpha$ -син в материале слюнной железы как диагностического биомаркера БП

Результаты исследования продемонстрировали высокую специфичность и чувствительность ИГХМ для детекции агрегатов ф- $\alpha$ -син, расположенных рядом с двумя маркерами нервных волокон, в материале подъязычной слюнной железы, причем чувствительность ИГХМ в нашем исследовании была более высокой, чем чувствительность ТКС ЧС. С учетом наличия значимой положительной корреляции результатов иммуногистохимического исследования с результатами нескольких опросников и шкал выраженности немоторных функций (в особенности, оценивающих автономную дисрегуляцию), имеются основания ожидать высокую вероятность обнаружения агрегатов ф- $\alpha$ -син не только у пациентов на 1–3 стадии Хен–Яра (т.е. у той категории больных, которые принимали участие в настоящем исследовании), но и у пациентов на продромальной стадии БП с наличием исключительно немоторных симптомов, что, тем не менее, требует проведения дополнительных исследований. Для подтверждения наличия немоторных симптомов у пациентов с БП рекомендуется, в первую очередь, использовать тестирование по шкале NMSS и опроснику NMSQ в связи с более убедительными результатами анализа корреляции с распространенностью включений ф- $\alpha$ -син. Значимых различий в результатах при использовании двух маркеров нервных волокон – ТГ и RGP 9.5 – не получено, в связи с чем при практическом применении метода в будущем может быть использовано окрашивание антителами к любому из предложенных маркеров.

Положительным результатом диагностического исследования может считаться обнаружение включений ф- $\alpha$ -син, расположенных рядом с маркером нервных волокон, при визуальной оценке и получение при морфометрии значений отношений площади включений ф- $\alpha$ -син к площади нервных волокон, превышающих пороговые значения. Согласно результатам работы, пороговое значение отношения «включения / нервные волокна» для исследования с антителами к RGP 9.5 в качестве маркера нервных волокон составило 0,00002, для исследования с антителами к ТГ в качестве маркера нервных волокон – 0,000004. Предлагаемый алгоритм проведения диагностического иммуногистохимического исследования ф- $\alpha$ -син в материале подъязычной слюнной железы представлен на рисунке 4.



**Рисунок 4** – Алгоритм диагностического иммуногистохимического исследования ф- $\alpha$ -син в материале подъязычной слюнной железы и интерпретации результатов.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало диагностическую значимость метода иммуногистохимической детекции ф- $\alpha$ -син в крупной подъязычной слюнной железе. Исследованный метод может быть использован для верификации установленного клинического диагноза идиопатической БП. Определение ф- $\alpha$ -син может выступать в роли дополнительного диагностического метода на симптомной стадии БП при отрицательном результате нейровизуализационных исследований и в других сложных клинических случаях. В работе показана высокая эффективность предложенного протокола иммуногистохимического окрашивания и возможность применения автоматизированного морфометрического анализа результатов, а также определены пороговые значения для дифференциальной диагностики пациентов с БП и лиц без БП. По результатам проведенного исследования предложен алгоритм применения данного метода.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с болезнью Паркинсона иммуногистохимическое выявление фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в ткани подъязычной слюнной железы является ценным диагностическим биомаркером текущего нейродегенеративного процесса. Процедура является безопасной и не сопровождается развитием отдаленных нежелательных явлений.
2. Включения фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина глобулярной и фибриллярной формы, расположенные вблизи нервных волокон, обнаружены в биопсийном материале подъязычной слюнной железы у всех пациентов с клинически установленным диагнозом болезни Паркинсона и у одного пациента в группе контроля (чувствительность метода при сопоставлении с лицами без клинически верифицированной болезни Паркинсона – 100%, специфичность – 96,67%).
3. Распространенность фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в слюнной железе можно оценивать морфометрически по величине отношения площади включений к площади нервных волокон. Разработанный протокол автоматизированной морфометрической оценки результатов иммуногистохимической реакции позволил определить пороговые значения распространенности включений для дифференцирования пациентов с болезнью Паркинсона и лиц без болезни Паркинсона (0,00002 для реакции с антителами к PGP 9.5 и 0,000004 для реакции с антителами к тирозингидроксилазе), оптимизировать процесс обработки результатов и снизить субъективность в их интерпретации.
4. Установленная взаимосвязь накопления фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в ткани слюнной железы с результатами оценки по шкалам/опросникам NMSS, NMSQ, MDS-UPDRS I (автономная дисфункция в структуре немоторных нарушений), а также подшкалами MDS-UPDRS II и MDS-UPDRS III (повседневная активность и моторные функции), подчеркивает системный характер нейродегенеративного процесса при БП и указывает на возможность использования иммуногистохимического метода для более глубокой оценки всего многообразного спектра клинических проявлений на различных стадиях заболевания.

5. В 93,3% случаев для пациентов с болезнью Паркинсона показано совпадение результатов иммуногистохимического исследования (определение ф- $\alpha$ -синуклеина) и транскраниальной сонографии (определение гиперэхогенности черной субстанции). Разработан алгоритм использования детекции фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина в ткани подъязычной слюнной железы в качестве дополнительного метода диагностики болезни Паркинсона при невозможности проведения транскраниальной сонографии черной субстанции или при отсутствии гиперэхогенного сигнала у пациента.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При проведении иммуногистохимического исследования материала подъязычной слюнной железы у пациентов с болезнью Паркинсона рекомендуется использовать предложенный нами диагностический алгоритм, а также протокол с комбинированной двойной окраской ткани на фосфорилированный  $\alpha$ -синуклеин и нейрональные маркеры (тирозингидроксилазу или PGP 9.5) с последующей автоматизированной морфометрической обработкой результатов.
2. Детекция фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина, локализованного в периферической нервной системе в составе нервных волокон подъязычной слюнной железы, рекомендуется для подтверждения наличия патологического процесса (в соответствии с пороговыми значениями) в дополнение к другим методам диагностики болезни Паркинсона.

### **СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Хачева, К.К. Фосфорилированный  $\alpha$ -синуклеин в слюнной железе как перспективный биомаркер болезни Паркинсона // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2024. – №2. – С. 23-27.
2. Хачева, К.К. Анализ чувствительности и специфичности метода детекции  $\alpha$ -синуклеина в ткани слюнных желез в качестве диагностического гистологического маркера болезни Паркинсона: систематический обзор и мета-анализ / К.К. Хачева,

С.Н. Иллариошкин, А.В. Карабанов // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* – 2024. – Т.18. – №4. – С. (в печати) [K1] (ВАК, SCOPUS)

3. Хачева, К.К. Сравнительный анализ диагностической значимости иммуногистохимического исследования слюнной железы и ультразвукового исследования чёрной субстанции при болезни Паркинсона / К.К. Хачева, А.В. Карабанов, Р.Р. Богданов и соав. // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии.* – 2023. – Т.17. – №1. – С. 36-42. [K1] (ВАК, SCOPUS)

4. Борисова, С.Ю. Новые возможности в дифференциальной диагностике болезни Паркинсона и вторичного паркинсонизма сосудистого генеза / С.Ю. Борисова, Р.Р. Богданов, К.К. Хачева и соавт. // *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений.* – 2022. – №2. – С. 21-22.

5. Хачева, К.К. Сравнительная диагностическая чувствительность транскраниальной сонографии черной субстанции и биопсии слюнной железы у пациентов с болезнью Паркинсона / К.К. Хачева, С.Н. Иллариошкин, А.В. Карабанов и соав. // *Известия Российской Военно-медицинской академии.* – 2021. – Т.40. – №4. – С. 101–106. (ВАК)

6. Сальков, В. Н. Клинико-морфологический анализ случая болезни Паркинсона / В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков, К.К. Хачева и соавт. // *Архив патологии.* – 2020. – Т.82. – №2. – С. 52-56. (ВАК, SCOPUS)

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БП – болезнь Паркинсона

ИГХМ – иммуногистохимический метод

МКБ – международная классификация болезней

МРТ-SWI – магнитно-резонансная томография в режиме изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости

ПНС – периферическая нервная система

ТГ – тирозингидроксилаза

ТКС – транскраниальная сонография

ф- $\alpha$ -син – фосфорилированный  $\alpha$ -синуклеин

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ЧС – черная субстанция

ЦНС – центральная нервная система

AUC – площадь под кривой

HADS – госпитальная шкала оценки тревоги и депрессии

MDS – Международное общество расстройств движений

MDS-UPDRS – унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона международного общества расстройств движений

MOCA – Монреальская когнитивная шкала

NMSQ – опросник оценки немоторных симптомов

NMSS – шкала оценки немоторных симптомов

PDQ-8-SI – опросник качества жизни при болезни Паркинсона – суммарный индекс

PBS – натрий-фосфатный буфер

PGP 9.5 – белковый продукт гена 9.5

RBDSQ – шкала оценки нарушений поведения в REM фазе сна