

АНДРЕЕВ МАКСИМ НИКОЛАЕВИЧ

**МУЛЬТИСИСТЕМНАЯ АТРОФИЯ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СПЕКТР И
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ БИОМАРКЕРЫ**

3.1.24. Неврология

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Федотова Екатерина Юрьевна

академик РАН, доктор медицинских наук, профессор,

Иллариошкин Сергей Николаевич

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии»

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Екатерина Юрьевна Федотова

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);

Заклязьминская Елена Валерьевна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской генетики Государственного научного центра ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского».

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

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2024 года в _____: _____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.186.01 при ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, город Москва, Волоколамское шоссе, дом 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ НЦН по адресу: 125367, город Москва, Волоколамское шоссе, дом 80 и на сайте www.neurology.ru.

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 года.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Кузнецова Полина Игоревна

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Мультисистемная атрофия (МСА) — нейродегенеративное заболевание, относящееся к группе синуклеинопатий, для которого характерно сочетание вегетативной недостаточности с синдромом паркинсонизма либо мозжечковым синдромом. Заболеваемость в мире в среднем составляет 0,6–0,7 случаев на 100 тыс. населения в год [Пизова Н.В., 2017; Dumurgier J., 2020; Fanciulli A., 2022; Wenning G.K., 2004].

На сегодняшний день принято выделять паркинсонический и мозжечковый типы МСА. Несмотря на наличие четких диагностических критериев МСА [Wenning G.K., 2022], установление данного диагноза является сложной задачей: большое количество случаев МСА диагностируется ошибочно [Нодель М.Р., 2009; Palma J.-A., 2018; Stankovic I., 2022; Stefanova N., 2009]. Некоторыми исследователями отмечается необходимость пересмотра существующих критериев и выделение новых типов МСА, учитывая новые данные о клиническом полиморфизме заболевания [Stankovic I., 2019]. Нуждаются в уточнении нейрофизиологические маркеры и критерии вовлечения в процесс вегетативной нервной системы у пациентов с МСА.

Выделены несколько генов, предположительно играющих роль в развитии МСА [Katzeff J.S., 2019; Soma H., 2006; Stemberger S., 2011; Sturm E., 2014]. Описаны случаи МСА с мутациями в гене α -синуклеина (*SNCA*), а также показана ассоциация болезни с нуклеотидными вариантами в данном гене [Al-Chalabi A., 2009, Ross O.A., 2010; Scholz S.W., 2009]. В азиатских популяциях при МСА найдены мутации в гене *COQ2*, кодирующем фермент биосинтеза коэнзима Q10, с частотой до 1,7% [Mitsui J., 2016]. У пациентов европейского этнического происхождения частота носительства мутаций в *COQ2* существенно меньше, однако во многих странах этот вывод требует подтверждения. Таким образом, роль генетической составляющей при МСА

требует дальнейшего изучения.

Одним из наиболее перспективных кандидатов на роль биомаркера МСА является коэнзим Q10, играющий важную роль в митохондриальной дыхательной цепи и обладающий антиоксидантным эффектом. По некоторым данным, уровень данного кофермента у пациентов с МСА в сыворотке крови и в ликворе может быть сниженным [Compta Y., 2019; Du J., 2018; Kasai T., 2016; Kuo S.-H., 2016; Mitsui J., 2016].

На настоящий момент причины патологической агрегации α -синуклеина в нейронах и/или глиальных клетках при синуклеинопатиях окончательно не определены. Одной из гипотез является дисбаланс в изоформах белка и транскриптах *SNCA*. Показано, что некоторые изоформы α -синуклеина склонны к более выраженной внутриклеточной агрегации, чем другие, и они могут по-разному экспрессироваться при такой «классической» синуклеинопатии, как болезнь Паркинсона (БП) [Bungeroth M., 2014, Chakroun T., 2020; Gamez-Valero A., 2018; Tseng E., 2019]. При МСА подобных исследований до настоящего времени не проводилось. Исходя из вышеуказанного, сформулирована цель данного исследования.

Цель исследования

Анализ клинико-нейрофизиологических особенностей и молекулярно-генетических маркеров мультисистемной атрофии.

Задачи исследования

1) Исследовать фенотипические особенности пациентов с МСА в сравнении с БП, а также характеристики двух типов МСА — мозжечкового и паркинсонического.

2) Провести комплексную количественную оценку вегетативной дисфункции, в том числе с анализом диагностической значимости батареи тестов Юинга и кожных симпатических вызванных потенциалов, для расширения информативного биомаркерного спектра у пациентов с МСА.

3) Изучить у российских пациентов наличие ассоциаций между развитием синуклеинопатий и нуклеотидными вариантами в основных генах МСА – *SNCA* и *COQ2*, а также оценить их влияние на соответствующие молекулярные субстраты (потенциальные биомаркеры) — белок альфа-синуклеин и коэнзим Q10.

4) Исследовать лейкоцитарную экспрессию гена *SNCA* (его альтернативных транскриптов) при синуклеинопатиях, а также соответствующие корреляции с нуклеотидными вариантами гена *SNCA* и уровнем белка альфа-синуклеина в крови.

Научная новизна

В работе уточнен фенотипический спектр МСА и двух его типов (мозжечкового и паркинсонического) у российских пациентов, с особым акцентом на клинико-инструментальном анализе нарушений со стороны вегетативной нервной системы.

Впервые на одной когорте пациентов с МСА исследованы однонуклеотидные полиморфизмы гена *SNCA* с целью поиска генетических ассоциаций, показана дифференциальная экспрессия *SNCA* и его отдельных транскриптов.

Впервые в России и в одном из первых исследований в европейских популяциях у пациентов с МСА изучена роль коэнзима Q10: проведено секвенирование гена *COQ2*, продукт которого (ко-Q2) участвует в биосинтезе вышеуказанного коэнзима, а также оценен его уровень в периферической крови пациентов по сравнению с контролем.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение работы заключается в сопоставлении молекулярных механизмов двух основных форм синуклеинопатий – МСА и БП – на трех уровнях: генетическом (нуклеотидные варианты *SNCA*), посттранскрипционном (альтернативные транскрипты *SNCA*) и посттрансляционном (общий уровень белка альфа-синуклеина). В работе

проведено исследование возможной роли коэнзима Q10 в развитии митохондриальной дисфункции при синуклеинопатиях: изучены нуклеотидные варианты гена *COQ2* и уровень скорректированного коэнзима Q10 в крови.

Практическое значение работы заключается в детальной оценке клинической гетерогенности МСА с описанием клинических и нейрофизиологических характеристик двух фенотипов заболевания (паркинсонического и мозжечкового). Показана диагностическая значимость батареи тестов Юинга и кожных симпатических вызванных потенциалов для дифференциальной диагностики МСА с клинически близким заболеванием — БП.

Методология и методы исследования

Объектом исследования были пациенты с диагнозом МСА. У всех пациентов производилась оценка клинико-демографических данных, анамнеза заболевания, семейного анамнеза, неврологического и соматического статуса, данных нейровизуализации и нейрофизиологических обследований.

Скрининг на наличие мутаций проводился с использованием фрагментного анализа, прямого секвенирования по Сэнгеру. Уровень транскриптов гена *SNCA* определяли по пороговому циклу, нормированному на пороговый цикл гена бета-актина (*ACTB*) методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. МСА — быстро прогрессирующее, клинически гетерогенное, заболевание, недостаточно диагностируемое на практике.
2. Показана высокая диагностическая значимость батареи тестов Юинга и кожных симпатических вызванных потенциалов для выявления вегетативной дисфункции у пациентов с МСА.

3. Нуклеотидный вариант в полиморфном сайте rs10005233 гена *SNCA* ассоциирован с развитием синуклеинопатий – МСА и БП.

4. При синуклеинопатиях наблюдается дисбаланс транскриптов гена *SNCA* в лейкоцитах крови, что может иметь патогенетическое и, потенциально, диагностическое значение.

5. Полиморфные варианты нуклеотидной последовательности гена коэнзима Q2 (*COQ2*) не ассоциированы с развитием синуклеинопатий у российских пациентов.

Личный вклад автора

Автору принадлежит определяющая роль в постановке цели и задач исследования, разработке и выполнении протокола исследования, обосновании выводов и практических рекомендаций. Все этапы клинического осмотра, интерпретация нейрофизиологических и нейровизуализационных данных, молекулярно-генетические исследования, включая анализ данных, выполнены автором лично. Автором проведены анализ и статистическая обработка данных, сформулированы выводы по результатам работы, подготовлены статьи с последующей публикацией в научных журналах и представлением результатов на научных конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Высокая достоверность результатов обусловлена достаточным объёмом группы обследованных пациентов, четкой постановкой цели и задач, применением современных молекулярно-генетических, нейровизуализационных, нейрофизиологических и клинических методов исследования, адекватной статистической обработкой полученных результатов.

Диссертация апробирована и рекомендована к защите на совместном заседании сотрудников консультативно-диагностического, 1-го, 2-го, 3-го неврологических отделений, 5-го неврологического отделения с лабораторией молекулярно-генетической диагностики, отдела лучевой

диагностики, лаборатории клинической нейрофизиологии, лаборатории клинических исследований ФГБНУ НЦН и при участии сотрудников кафедры многопрофильной клинической подготовки факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова (протокол №8 от 13 сентября 2023 года).

Материалы диссертации были представлены в виде постерных и устных докладов на XVIII междисциплинарном конгрессе «Вейновские чтения» (Москва, Россия, 10–12 февраля 2022 г.), V Национальном конгрессе с международным участием «Болезнь Паркинсона и расстройства движений» (Москва, Россия, 25–27 июня 2022 г.); 8th Congress of the European Academy of Neurology (Вена, Австрия, 28 июня – 1 июля 2022 г.); 9th Congress of the European Academy of Neurology (Будапешт, Венгрия, 1–4 июля 2023 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Работа соответствует паспорту научной специальности 3.1.24. Неврология, согласно п. 1 – Нейрогенетика, наследственные и дегенеративные заболевания нервной системы, а также специальности 1.5.7. Генетика, согласно п. 19 – Генетика человека. Медицинская генетика.

Внедрение результатов работы

Полученные результаты внедрены в ФГБНУ «Научный центр неврологии» в работу неврологических отделений, используются в учебном процессе для подготовки ординаторов, аспирантов, врачей-неврологов, создании обучающих циклов повышения квалификации.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 127 листах машинописного текста, содержит 38 таблиц, 4 приложений и иллюстрирована 22 рисунками. Диссертация состоит из следующих разделов: введение; обзор литературы; материалы, дизайн и методы исследования; результаты исследования; обсуждение полученных результатов; выводы и практические рекомендации, список литературы и приложений.

Библиографический указатель содержит 8 отечественных и 183 зарубежных источника литературы, а также 6 собственных публикаций автора, подготовленных по теме диссертационной работы.

МАТЕРИАЛЫ, ДИЗАЙН И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работу были включены 45 российских пациентов с диагнозом «мультисистемная атрофия» (критерии постановки диагноза – см. ниже). В качестве группы сравнения обследованы 30 пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона». Все пациенты проходили обследование и лечение на базе 5 неврологического отделения с молекулярно-генетической лабораторией и наблюдались амбулаторно в консультативно-диагностическом отделении ФГБНУ НЦН (г. Москва). Группы были представлены преимущественно лицами славянской этнической принадлежности, проживающими на территории европейской части Российской Федерации.

Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол №3-4/21 от 24.03.2021). Перед проведением исследования все пациенты были ознакомлены с предстоящими процедурами и подписали информированное согласие.

Общие критерии включения для всех участников исследования: полученное разрешение на обработку персональных данных и подписанное информированное согласие на участие в исследовании; возраст более 18 лет.

Критерии включения в основную группу: лица, соответствующие диагностическим критериям МСА Международного общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений (MDS) от 2008 года; после их обновления в 2022 году диагноз устанавливался согласно обновленным критериям MDS.

Критерии включения в группу сравнения: лица, соответствующие диагнозу БП согласно критериям MDS от 2015 года.

Общие критерии невключения для всех участников исследования: возраст менее 18 лет; тяжелая соматическая или психическая патология.

Критерии исключения из исследования: отказ пациента от продолжения исследования; тяжелая соматическая или психическая патология.

Демографические характеристики сравниваемых групп представлены в таблице 1. Группы не отличались по полу и по возрасту. В общей группе МСА у 20 пациентов диагностирован мозжечковый тип заболевания (МСА-М), у 25 — паркинсонический тип (МСА-П).

Таблица 1. Демографические характеристики групп пациентов

Характеристика	МСА (n=45)	БП (n=30)	p
Пол (муж/жен)	16 /29	11 /19	>0,999
Возраст, лет	61,78±9,33	64,27±6,47	0,265

Всем пациентам с синуклеинопатиями был проведен сбор жалоб и анамнеза, семейного анамнеза, а также стандартные общий и неврологический осмотры. При проведении общего осмотра проводилась ортостатическая проба. Оценка выраженности клинической симптоматики осуществлялась с использованием соответствующих шкал и опросников: Унифицированная шкала оценки МСА (UMSARS), Унифицированная шкала оценки БП (UPDRS), Монреальская шкала когнитивной оценки (MoCA), стандартизированная шкала оценки атаксии (SARA), Госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS), Опросник по болезни Паркинсона из 39

пунктов (PDQ-39), Шкала оценки исходов болезни Паркинсона в части автономной дисфункции (SCOPA-AUT).

Для оценки выраженности нарушений функции тазовых органов была использована ультразвуковая оценка (УЗИ) объема остаточной мочи (ООМ).

При наличии снимков магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга, доступных для визуальной оценки, у пациентов основной группы оценивались два ведущих диагностических МР-симптома МСА: оливопонтocerebellарная атрофия и симптом «обода скорлупы».

Батарея тестов Юинга проводилась с помощью аппаратно-программного комплекса “ВНС-Спектр” (Нейрософт, Россия). Во время выполнения проб фиксировались частота сердечных сокращений (ЧСС) и артериальное давление (АД), позволяя таким образом оценить реактивность вегетативной нервной системы. Батарея состоит из следующих тестов: 1) прием Вальсальвы; 2) ортостатическая проба; 3) проба с глубоким дыханием; 4) проба с изометрической нагрузкой. Результаты сравнивались с таблицей нормативных значений, при наличии отклонения от нормы засчитывают 1 балл, при патологии — 2 балла.

Исследование кожных симпатических вызванных потенциалов (КСВП) проводилось на аппаратно-программном комплексе «Нейро-МВП» (Нейрософт, Россия). Регистрация осуществлялась с ладони в ответ на стимуляцию импульсным током длительностью 100 мкс силой от 1 мА, подаваемым на активный электрод. На левой кисти активный электрод (отрицательный) устанавливался на середине ладони, референтный — на средней фаланге безымянного пальца. При КСВП фиксировались следующие показатели: порог возбуждения, латентность ответа, амплитуда ответа A1, амплитуда ответа A2 и соотношение амплитуд A1/A2

Всем пациентам с предварительным диагнозом «мультисистемная атрофия, паркинсонический тип» проведен ДНК-анализ – мультиплексная лигазная реакция зондов с амплификацией по отработанной методике для исключения мутаций – экзонных перестроек в генах *PRKN*, *PINK1*, *SNCA*,

ATP13A2 и *DJ-1*, а также точковых мутаций G2019S в гене *LRRK2* и A30P в гене *SNCA*. В одном случае выявлено носительство дупликации *SNCA* с фенотипом первичной вегетативной недостаточности. Также всем пациентам с предварительным диагнозом «мультисистемная атрофия, мозжечковый тип» проведен поиск на наличие экспансий тандемных повторов в генах *ATXN1*, *ATXN2*, *ATXN3*, *CACNA1A*, ассоциированных с наследственными мозжечковыми атаксиями, по отработанным ранее методикам.

Секвенирование генов *SNCA* и *COQ2* проводили в основной группе МСА (n=45), группе сравнения БП (n=30) и в контрольной группе. В контрольную группу вошли 20 здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами исследованных нозологических групп. Пробоподготовку проводили по стандартному протоколу. Анализ нуклеотидных последовательностей полученных образцов проводили на капиллярном генетическом анализаторе НАНОФОР-05 (ИАП РАН, Россия). Полученные данные сравнивались с частотой минорного аллеля (MAF) согласно баз данных ALFA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/>) и GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

Оценка экспрессии гена *SNCA* в лейкоцитах была проведена для 33 пациентов с МСА (18 пациентов с МСА-П, 15 пациентов с МСА-М), 27 пациентов с БП и 8 человек из контрольной группы. Исследованные группы были сопоставимы по возрасту и полу. В основу анализа был заложен известный факт стабильной экспрессии 4 экзона гена *SNCA*. Праймеры и флуоресцентно меченый TaqMan-зонд были подобраны таким образом, чтобы оценить относительную экспрессию всех транскриптов (98, 112, 126 и 140), а также транскриптов, из которых в результате процесса альтернативного сплайсинга был удален или сохранен 5 экзон, поскольку по литературным данным именно изоформы альфа-синуклеина, транслированные из данного транскрипта, отвечают за повышенную склонность к агрегации (рисунок 1).

Анализ изменения уровня РНК проводили методом обратной транскрипции с последующей количественной полимеразной цепной реакцией в режиме «реального времени» (ОТ-ПЦР) с использованием в качестве референсного гена (housekeeping) — гена *ACTB* (бета-актин), который характеризуется стабильной экспрессией. Относительный уровень экспрессии рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$.

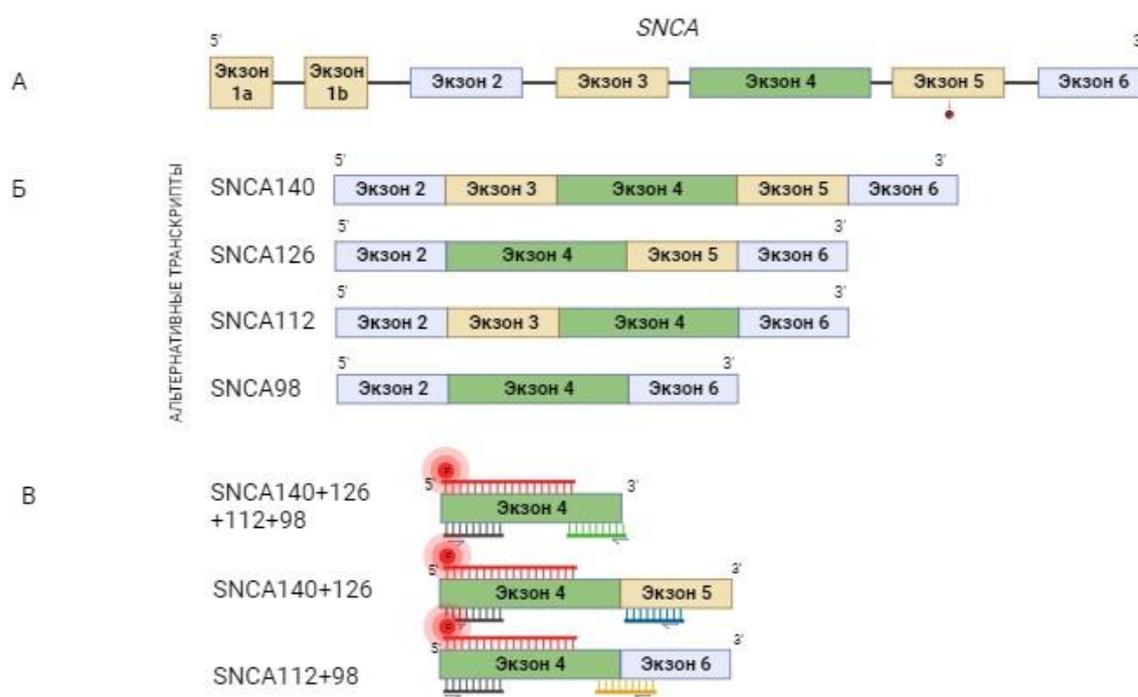


Рисунок 1. Схематичное отображение гена *SNCA* (рис. А) и его основных альтернативных транскриптов (рис. Б). Методика исследования представлена на рис. В.

В работе оценивались уровни белка альфа-синуклеина и коэнизма Q10 в крови. Данные параметры были проанализированы у 24 пациентов с МСА и 10 пациентов с БП. Также для сравнения была исследована контрольная группа из здоровых добровольцев (n=10). Группы были сопоставимы по возрасту и полу. Уровень альфа-синуклеина (пг/мл) в сыворотке крови проводили твердофазным иммуноферментным методом (ELISA). Уровень кофермента Q10 (нг/мл) оценивали в плазме крови методом

высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. С учетом того, что коэнзим Q10 связывает холестерин [Mitsui, 2016], мы определяли скорректированный уровень коэнзима Q10 по отношению уровня коэнзима Q10 в плазме крови к уровню общего холестерина.

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics v.26 (IBM Corporation, США). При сравнении выборок рассчитывался t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни, критерий F Фишера, χ^2 и Краскела–Уоллиса. Также использовались коэффициент корреляции r_{xy} Пирсона, ранговой корреляции Спирмена ρ , поправка Бонферрони. Визуализация количественных связей проводилась с использованием языка программирования R (версия 4.2.2) в программной оболочке «RStudio 2022.12.0 и загружаемых модулей «metan» и «ggplot». Для оценки диагностической значимости количественных признаков при прогнозировании определенного исхода применялся метод анализа ROC-кривых. Статистический уровень значимости принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинико-anamнестические особенности пациентов с мультисистемной атрофией

В работе проведен сравнительный анализ клинической картины между группами пациентов с МСА и с БП.

Согласно полученным данным, длительность заболевания у пациентов с МСА была меньше, чем у пациентов с БП при сопоставимом возрасте начала заболевания. Пациентов с МСА отличал больший клинический полиморфизм симптомов по сравнению с БП. Акинетико-ригидный синдром

имелся у большинства пациентов с МСА (75,6%) и у всех пациентов с БП, а одним из наиболее характерных симптомов МСА является мозжечковая атаксия, которая была выявлена у всех пациентов (в том числе при МСА-П). Также у пациентов с МСА достоверно чаще наблюдались пирамидный синдром и дисфагия. Жалобы ортостатического характера (слабость при вставании, головокружение и/или боли в верхней половине тела) более характерны для пациентов с МСА, однако зарегистрированы не у всех пациентов. Высокоспецифичными симптомами МСА являются инспираторный стридор и полиминимиклонус. При МСА и БП распространенными являются нарушения поведения в фазе сна с быстрыми движениями глаз и тазовые нарушения, при этом у пациентов с МСА последние были более разнообразными. Следует выделить задержку мочеиспускания, которая встречалась только у пациентов с МСА. Симптомы, связанные с гиперактивным мочевым пузырем, такие как учащенные мочеиспускания и недержание мочи, также встречаются значительно чаще у пациентов с МСА по сравнению с пациентами с БП. Данные симптомы подтверждают более выраженное вовлечение при МСА таких центральных структур, как ядра Онуфа, мостовые центры мочеиспускания.

Проводилась оценка по различным формализованным шкалам в группах МСА и БП. При оценке моторных симптомов (UMSARS, ч. 2, UPDRS, ч.3, SARA) тяжесть состояния была достоверно выше у пациентов с МСА. По шкалам немоторных нарушений (SCOPA-AUT, UPDRS, ч. 1) также тяжесть симптоматики была значительно более выражена при МСА, тогда как по оценке когнитивных и аффективных нарушений (MoCA, HADS) группы не различались. Пациенты двух групп также сравнивались по интегративным оценкам повседневной активности/качества жизни (UMSARS, ч.1 и 4, UPDRS, ч.2, PDQ-39): наличие МСА достоверно больше влияло на качество жизни/повседневную активность по сравнению с БП.

В работе сравнивались 2 основных типа МСА – мозжечковый и паркинсонический – по клиническим и анамнестическим характеристикам.

Возраст начала заболевания, а также длительность при двух типах МСА не различались. Из всех исследованных характеристик две группы достоверно различались по наличию поздних нарушений (чаще встречались в группе МСА-П) и дисфагии (также чаще при МСА-П). По остальным признакам статистически достоверного различия не отмечалось. При сравнении пациентов с разными типами МСА обнаружено, что двигательные нарушения были значимо более выражены у лиц с МСА-П, чем у лиц с МСА-М (по шкалам UMSARS ч.2 и UPDRS ч.2). Также стоит отметить тот факт, что, несмотря на превалирование мозжечковой симптоматики у пациентов с МСА-М, оценка по шкале SARA достоверно не отличалась от таковой у пациентов с МСА-П. Полученные данные свидетельствуют о том, что тяжесть мозжечковых нарушений при МСА-М сопоставима с МСА-П, тогда как при МСА-П общая тяжесть двигательных нарушений выше в силу присоединения к мозжечковым расстройствам проявлений паркинсонизма. Группы пациентов с разными типами МСА не различались по немоторным проявлениям.

Из 45 пациентов у 26 пациентов с МСА (12 с МСА-М, 14 с МСА-П) были доступны снимки МРТ для анализа нейровизуализационных признаков, характерных для данного заболевания. В общей группе пациентов с МСА у 88,5% выделялись один или оба нейровизуализационных признака, ассоциированного с заболеванием: у 38,5% — изолированная атрофия ствола/мозжечка, в 26,9% — изолированный симптом «обода скорлупы», в 23,1% — сочетание обоих симптомов, тогда как в 11,5% радиологические признаки МСА отсутствовали. Оливопонтocerebellарная атрофия выявлялась достоверно чаще при МСА-М, тогда как при МСА-П встречались как симптом «обода скорлупы», так и сочетание обоих симптомов.

С практической точки зрения важно рассмотрение структуры направительных диагнозов у пациентов с МСА до обращения в ФГБНУ НЦН. Только 13% пациентов были направлены с корректным предварительным диагнозом. Наиболее часто среди других диагнозов

встречались «БП» (56% среди МСА-П) и «поздняя мозжечковая атаксия» (55% среди МСА-М). Также пациенты направлялись с диагнозами «дисциркуляторная энцефалопатия», «прогрессирующий надъядерный паралич», «рассеянный склероз» и «соматоформная дисфункция вегетативной нервной системы», что подчеркивает чрезвычайно высокую фенотипическую гетерогенность данной патологии.

Инструментальный анализ вегетативных симптомов

В работе проводились количественная оценка и ряд инструментальных исследований вегетативной дисфункции, обязательной для МСА. Наряду с ортостатической пробой и УЗИ оценкой ООМ, которые отражены в диагностических критериях МСА, в работе исследовались диагностические возможности батареи тестов Юинга и КСВП.

При ортостатической пробе согласно новым критериям диагностики МСА 2022 г. снижение систолического артериального давления (САД) более 20 мм рт. ст. отмечалось у 95,6% пациентов МСА и у 30% пациентов БП. Снижение диастолического артериального давления (ДАД) установлено у 88,9% у пациентов МСА и у 16,7% у пациентов с БП (различия статистически значимы). Полученные результаты говорят о необходимости рассмотрения положительной ортостатической пробы в контексте клинической картины заболевания, учитывая относительно высокий процент встречаемости среди случаев БП. При сравнении МСА-М и МСА-П не выявлено статистически значимых различий в снижении САД и ДАД между этими двумя подтипами МСА.

По данным УЗИ, ООМ свыше 100 мл встречался исключительно в группе МСА, тогда как при БП таких случаев не зарегистрировано. При сравнении МСА-М и МСА-П подгруппы статистически значимо не различались.

Оценка по шкале Юинга по симпатической дисфункции показала отличия только между группой МСА и БП — с большей симпатической

дисфункцией при МСА. Балл по шкале Юинга в оценке дисфункции парасимпатической системы был значимо выше при МСА по сравнению с группой БП и с контрольной группой (таблица 2). При оценке двух типов МСА между собой подгруппы не отличались.

Таблица 2. Оценка по шкале Юинга в исследованных группах.

Диагноз	МСА (n=45) (1)	БП (n=30) (2)	Контроль (n=10) (3)	$p_{1,2,3}$ ($p_{1,2}$; $p_{1,3}$; $p_{2,3}$)
Симпатическая система, баллы	2 [2; 3]	1 [1; 2]	2 [2; 2]	0,001 (<0,001 ; 0,179; 0,230)
Парасимпатическая система, баллы	3 [3; 4]	2 [1; 2]	0 [0; 1]	<0,001 (0,043; <0,001 ; <0,001)

Учитывая необходимость в инструментальной диагностике фенотипически схожих МСА-П и БП, проведено сравнение двух этих групп, которое показало достоверные различия между обеими группами и по баллам, оценивающим симпатическую дисфункцию ($p=0,002$, $AUC=0,728$, Se 58%, Sp 75%, cut-off 2 балла), и по баллам парасимпатической дисфункции ($p<0,001$, $AUC=0,835$, Se 82%, Sp 63,3%, cut-off 3 балла) — большие значения зарегистрированы в группе МСА-П. Исходя из сравнения двух полученных значений AUC , большей диагностической значимостью обладает оценка парасимпатической системы.

Данные КСВП сравнивались между группами МСА, БП и группой здоровых добровольцев. При сравнении всех трех групп показано, что группа МСА отличается от контрольной группы и от группы БП большим порогом возбуждения, большей латентностью ответа и меньшей амплитудой A_2 ответа (таблица 3). Показатели КСВП в группах с различными типами МСА статистически достоверно не отличались.

Было проведено сравнение параметров КСВП у пациентов с БП и МСА-П. Показано статистически значимое различие по двум параметрам: в группе МСА-П была больше латентность ($p=0,001$, $AUC=0,756$, Se 72%, Sp 70%, cut-off 1,57 мс) и ниже амплитуда A_2 ($p=0,007$, $AUC=0,712$, Se 70%, Sp

68%, cut-off 0,79 мВ). Полученные сведения согласуются с данными о том, что при МСА парасимпатические структуры вовлечены в большей мере, чем при БП. Используемые в работе методы оценки вегетативной дисфункции являются относительно доступными и простыми в проведении и интерпретации данных, в связи с чем могут использоваться в клинической практике как вспомогательные для диагностики случаев МСА.

Таблица 3. Параметры КСВП в исследованных группах.

Диагноз	МСА (n=45) (1)	БП (n=30) (2)	Контроль (n=10) (3)	p _{1,2,3} (p _{1,2} ; p _{1,3} ; p _{2,3})
Порог возбуждения, мВ	7 [5; 8]	5,5 [5; 6]	5 [4; 5]	0,001 (0,028; <0,001; 0,04)
Латентность ответа, мс	1,66±0,33	1,43±0,30	1,21±0,17	<0,001 (0,002; <0,001; 0,053)
Амплитуда ответа А1, мВ	0,12 [0,05; 0,46]	0,25 [0,14; 0,59]	0,32 [0,3; 0,49]	0,137
Амплитуда ответа А2, мВ	0,51 [0,16; 1,4]	1,18 [0,54; 1,62]	3,1 [0,54; 5,81]	0,009 (0,029; 0,007; 0,247)
А1/А2	0,48 [0,13; 0,76]	0,32 [0,13; 0,65]	0,32 [0,05; 0,68]	0,450

Молекулярные биомаркеры мультисистемной атрофии

При секвенировании гена SNCA в группах МСА, БП и в контрольной группе выявлены нуклеотидные замены в ряде полиморфных сайтов, представленных в таблице 4 и на рисунке 2. Для сайта rs10005233 определена более высокая частота встречаемости нуклеотидной замены С>Т среди пациентов с синуклеинопатиями по сравнению с контрольной группой (p=0,032; ОШ=2,944; 95%ДИ: 1,071 – 8,096). При этом, согласно открытым базам данных GnomAD и ALFA, носительство аллеля Т в большинстве изученных популяций встречается с частотой, сопоставимой с группами синуклеинопатий. Следует отметить, что частота носительства Т-аллеля широко варьирует в зависимости от популяции: согласно базе данных ALFA, в азиатской популяции частота носительства составляет 7%.

Анализ генотипов по сайту rs10005233 также показал, что у пациентов

с гетеро- или гомозиготным носительством Т-аллеля повышен риск развития синуклеинопатий в целом – как БП, так и МСА.

Таблица 4. Встречаемость аллельных вариантов гена SNCA в группах.

SNP	МСА (1) (N=90)	БП (2) (N=60)	Контроль (3) (N=40)	p	MAF (GnomAD)	MAF (ALFA)
rs76642636 (G>A) A:	1 (1,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0,570	0,2%	0,3%
rs10005233 (C>T) T:	45 (50%)	35 (58,3%)	10 (25%)	0,01	58,9%	52,5%
rs1334654754 (T>C) C:	0 (0%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0,335	0,0007%	0,007%
rs3806789 (C>T) T:	40 (44,4%)	27 (45%)	21 (52,5%)	0,864	56,4%	53,5%
rs770986610 (A>G) G:	1 (1,1%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0,570	-	-

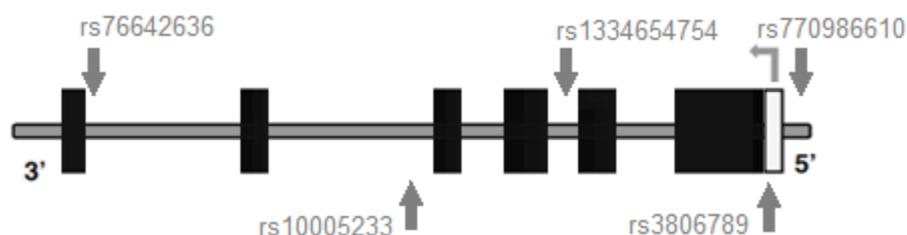


Рисунок 2. Ген SNCA и расположение выявленных нуклеотидных вариантов.

В подгруппах МСА-М и МСА-П был проведен анализ для полиморфизмов rs3806789 и rs10005233 (для других выявленных вариантов подобный анализ не проводился из-за низкой частоты встречаемости альтернативных аллелей). Статистически значимых различий между подгруппами ни по носительству аллельных вариантов, ни по частоте генотипов выявлено не было.

Патогенность обнаруженного варианта в сайте rs10005233, расположенного в интронной области, остается под вопросом; вероятно, он может играть роль в рамках кумулятивного генетического риска для развития синуклеинопатий. Этот полиморфизм представляет еще интерес и потому, что Т-аллель в данном сайте был описан как фактор риска развития нарушений поведения в фазе сна с быстрыми движениями глаз и развития БП [Krohn L., 2020; Mueller J.C., 2005; Parsian A.J., 2007; Sutherland G.T., 2009].

При сравнении уровня альфа-синуклеина в периферической крови в группах МСА, БП и контрольной группе статистически достоверных различий обнаружено не было. При сравнении типов МСА также не было получено значимых различий. При анализе уровня альфа-синуклеина в крови в зависимости от нуклеотидных вариантов rs3806789 и rs10005233 в гене *SNCA* не было выявлено статистически значимых различий в объединенной группе синуклеинопатий (МСА и БП).

Секвенирование гена *COQ2* выявило 10 нуклеотидных вариантов в полиморфных сайтах (таблица 5, рисунок 3). При сравнении трех групп — МСА, БП и контрольной группы — статистически значимых различий по всем 10 нуклеотидным вариантам выявлено не было. Также не выявлено различий при анализе частот генотипов для однонуклеотидных полиморфизмов, которые встречались более одного раза. Не было выявлено различий и при сравнении между типами МСА.

Таблица 5. Встречаемость аллельных вариантов гена *COQ2* в группах

SNP	МСА (1) (N=90)	БП (2) (N=60)	Контроль (3) (N=40)	p	MAF (Gnom AD)	MAF (ALFA)
rs11448409 (T>TT) T:	58 (64,4%)	47 (78,3%)	12 (30%)	0,197	-	66,2%
rs6535454 (A>G) A:	30 (33,3%)	10 (16,7%)	10 (25%)	0,257	25,1%	28,8%
rs6841889 (C>T) T:	58 (64,4)	43 (76,7%)	28 (70%)	0,383	72,2%	-
rs369421547 (C>T) T:	0 (0%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0,335	-	0,013%

Продолжение таблицы 5.

rs377272057 (T>C) C:	0 (0%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0,335	0,038%	0,057%
rs1347080578 (G>C) C:	0 (0%)	1 (1,7%)	0 (0%)	0,335	0,0007 %	0%
rs1261015110 (A>G) G:	2 (2,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0,321	-	0,007%
rs116687075 (T>A) A:	1 (1,1%)	0 (0%)	0 (0%)	0,570	1,6%	2,1%
rs6818847 (C>A) C:	16 (17,8%)	5 (8,3%)	5 (12,5%)	0,497	37,5%	33,6%
rs112033303 (T>A) A:	2 (2,2%)	3 (5%)	0 (0%)	0,307	-	1,3%

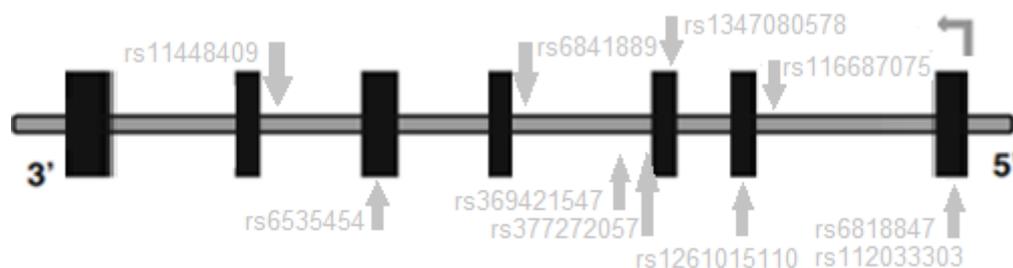


Рисунок 3. Ген *SOQ2* и расположение выявленных нуклеотидных вариантов.

При оценке уровня коэнзима Q10 и скорректированного на общий холестерин уровня коэнзима Q10 в плазме крови в различных подгруппах пациентов (МСА — $154,3 \pm 11,9$ нг/мл и $26,1 \pm 1,9$; БП – $155,4 \pm 17,6$ нг/мл и $27,6 \pm 3,5$; группа контроля — $177,9 \pm 11,9$ нг/мл и $30,5 \pm 4,5$, соответственно) значимых различий показано не было. Аналогично, не получено различий и при сравнении типов МСА. Несмотря на это, следует отметить тенденцию к пониженному уровню коэнзима Q10, скорректированного на общий холестерин, у пациентов с МСА по сравнению с контрольной группой.

При анализе уровня коэнзима Q10 в крови в зависимости от носительства конкретного аллеля для вышеуказанных нуклеотидных вариантов гена *SOQ2* каких-либо значимых различий в объединенной группе синуклеинопатий (МСА и БП) обнаружено не было.

Если биомаркерная роль коэнзима Q10 в восточноазиатской популяции является доказанной, в европейской популяции уровень коэнзима Q10 в крови не показывал достоверного снижения. Несмотря на это, при проведении патоморфологических исследований установлено снижение уровня коэнзима Q10 в тканях мозжечка именно у пациентов европейского этнического происхождения, что дает основания для дальнейших исследований и, возможно, разработки патогенетического лечения МСА. Кроме того, гетерогенность (многонациональность) российской популяции не позволяет сделать однозначных суждений по данным нашего пилотного исследования и требует дальнейшего изучения роли данного биомаркера.

В рамках анализа экспрессии гена SNCA на первом этапе был проведен анализ суммарной экспрессии (SNCA98 + SNCA112 + SNCA126 + SNCA140), при котором мы ориентировались на стабильно экспрессируемый экзон 4 гена SNCA. Были выявлены статистически значимые различия при сравнении группы МСА и здоровых добровольцев (17,9 [6,44; 36,06] и 0,83 [0,54; 1,9], $p < 0,001$), а также и при сравнении группы БП (17,84 [2,59; 30,03]) и здоровых добровольцев ($p = 0,003$). При сравнении пациентов с БП и МСА различий получено не было (рисунок 4).

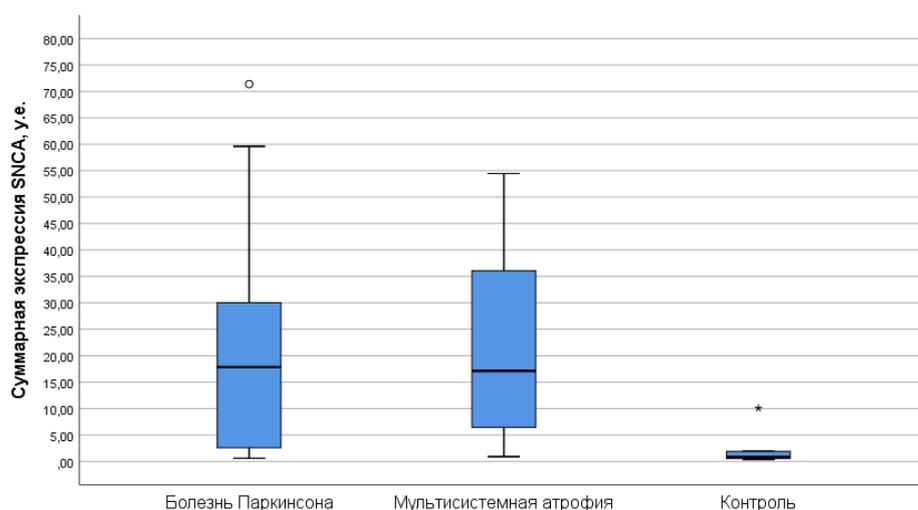


Рисунок 4. Суммарная экспрессия SNCA в исследованных группах.

На втором этапе отдельно рассмотрена экспрессия альтернативных транскриптов с наличием экзона 5 (SNCA126 + SNCA140): статистически достоверных различий между группами: МСА (2,59 [1,12; 4,06]), БП (1,87 [0,86; 3,89]), а также группой контроля 1,01 [0,6; 2,93] выявлено не было ($p=0,325$).

Для вариантов без экзона 5 (SNCA98 + SNCA112) были установлены статистически значимые различия при сравнении всех трех групп ($p=0,001$). При апостериорном анализе при сравнении группы МСА (21,78 [6,63; 41,5]) и контрольной группы (1,59 [0,5; 2,48]) установлены достоверные отличия ($p<0,001$). Схожие данные получены и при сравнении групп БП (25,46 [3,33; 34,82]) и контрольной группы ($p=0,003$). Различий между двумя синуклеинопатиями не было установлено.

При сравнении суммарной экспрессии в подгруппах пациентов с различными типами МСА установлено статистически значимое различие ($p=0,033$, рисунок 5). Общая экспрессия SNCA была статистически значимо выше у пациентов с мозжечковым типом МСА (34,95 [13,43; 39,97]), чем у пациентов с паркинсоническим типом (7,86 [3,1; 29,59]). Данное различие достигалось за счет разного уровня экспрессии вариантов без экзона 5 ($p=0,011$): у пациентов с мозжечковым типом он составлял 40,36 [19,77; 45,57], с паркинсоническим – 10,72 [3,24; 28,34]. Уровень транскриптов с экзоном 5 в подгруппах не различался: МСА-М - 3,2 [1,1; 5,23], МСА-П - 2,34 [1,12; 3,76], $p=0,509$.

При сравнении уровня транскриптов в зависимости от носительства аллелей однонуклеотидных вариантов rs3806789 и rs10005233 статистически значимых различий выявлено не было: для суммарной экспрессии — $p=0,12$ (на уровне тенденции) и 0,419; для экспрессии сплайсинг-формы с экзоном 5 — $p=0,730$ и 0,753; для экспрессии без экзона 5 — $p=0,232$ и 0,307.

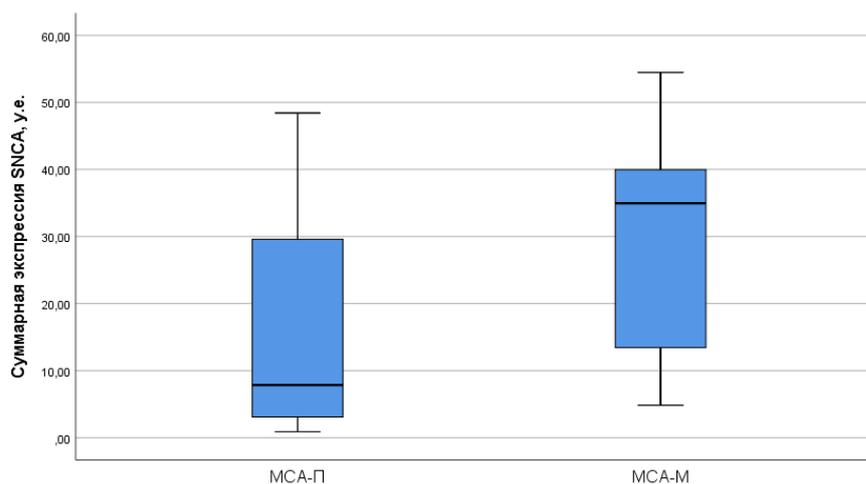


Рисунок 5. Суммарная экспрессия SNCA при различных типах МСА.

Таким образом, у пациентов с синуклеинопатиями значительно повышена общая экспрессия SNCA, предположительно за счет изоформ SNCA98 и SNCA112 (без экзона 5). Данный факт согласуется с современными представлениями о патогенезе синуклеинопатий и роли в этом процессе избыточной экспрессии белка α -синуклеина, который и образует характерные патоморфологические агрегаты в виде телец Леви и глиальных цитоплазматических включений — телец Паппа–Лантоса. Также выявлено, что имеются различия общей экспрессии SNCA между типами МСА, что может свидетельствовать о различных молекулярных механизмах, вовлеченных в патологический процесс при разных формах болезни. Вышеперечисленное свидетельствует о том, что клиническая и фенотипическая гетерогенность МСА с существованием разных типов заболевания может быть обусловлена различиями в структуре альфа-синуклеина и его различными агрегационными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Мультисистемная атрофия является тяжелым быстро прогрессирующим заболеванием, спектр фенотипических проявлений которого шире по сравнению с наиболее распространенной синуклеинопатией — болезнью Паркинсона. Из двух основных типов мультисистемной атрофии

паркинсонический тип проявляется более тяжелой и разнообразной клинической симптоматикой по сравнению с мозжечковым типом. Несмотря на разработанные диагностические критерии и ряд специфических симптомов, при мультисистемной атрофии на практике наблюдается высокая частота диагностических ошибок.

2. При оценке вегетативной дисфункции как облигатного проявления мультисистемной атрофии важными дополнительными инструментами диагностики являются батарея тестов Юинга и кожные симпатические вызванные потенциалы. При сопоставлении мультисистемной атрофии паркинсонического типа и болезни Паркинсона наибольшую диагностическую значимость показали оценка парасимпатической и симпатической дисфункции в тестах Юинга и латентность/амплитуда ответа A2 в кожных симпатических вызванных потенциалах.

3. Среди полиморфных нуклеотидных вариантов гена *SNCA* замена rs10005233 C>T ассоциирована с обеими изученными синуклеинопатиями — мультисистемной атрофией и болезнью Паркинсона. Носительство данного варианта не связано с уровнем белка альфа-синуклеина в периферической крови. Полученная более низкая частота носительства T-аллеля по сравнению с данными литературы может отражать популяционную особенность обследованной российской когорты пациентов с МСА.

4. Общая экспрессия гена *SNCA* в лейкоцитах, оцененная с помощью оригинальной методики, статистически значимо выше при синуклеинопатиях по сравнению с контролем, в первую очередь, за счет транскриптов, не содержащих экзон 5. Из двух типов мультисистемной атрофии экспрессия *SNCA* выше при мозжечковом типе заболевания по сравнению с паркинсоническим типом, также за счет сплайсинг-форм без экзона 5.

5. В отличие от восточноазиатской популяции, в изученной выборке, состоящей преимущественно из лиц славянской этнической принадлежности,

варианты нуклеотидной последовательности экзонов гена коэнзима Q2 (COQ2) не ассоциированы с развитием мультисистемной атрофии, как и болезни Паркинсона. Выявленные нуклеотидные варианты не влияют на уровень коэнзима Q10 периферической крови, в синтезе которого участвует коэнзим Q2. Скорректированный на холестерин уровень коэнзима Q10 у пациентов с синуклеинопатиями в крови также не изменен.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Обязательные исследования для диагностики вегетативных нарушений при мультисистемной атрофии — ортостатическая проба и исследование объема остаточной мочи — могут быть дополнены количественной оценкой вегетативной дисфункции с помощью батареи тестов Юинга и кожных симпатических вызванных потенциалов.

2. Проведение исследований на выявление вегетативной дисфункции как проявления мультисистемной атрофии наиболее актуально с целью дифференциальной диагностики в группах пациентов с диагнозами “болезнь Паркинсона” (G20) и “поздняя мозжечковая атаксия” (G11.2).

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Андреев М. Н., Федотова Е. Ю. Мультисистемная атрофия: методы диагностики и биомаркеры // **Анналы клинической и экспериментальной неврологии.** — 2022. — Т. 16, № 4. — С. 54–61.
2. Андреев М. Н. Кожно-симпатические вызванные потенциалы при мультисистемной атрофии. Нервные болезни, 2, 18-21, 2022 / М. Н. Андреев, П. А. Федин, Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин // **Нервные болезни.** — 2022. — № 2. — С. 18–21.
3. Андреев М. Н. Клинический полиморфизм мультисистемной атрофии: серия клинических наблюдений / М. Н. Андреев, Е. Ю. Федотова, Р. Н. Коновалов, С. Н. Иллариошкин // **Альманах клинической медицины.** — 2022. — Т. 50, № 5. — С. 310–314.
4. Андреев М.Н. Инструментальная диагностика вегетативных нарушений при мультисистемной атрофии / Андреев М.Н., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. — 2022. — №2. — С.8-12.
5. Andreev, M.N. Skin sympathetic responses in synucleinopathies / M. Andreev, P. Fedin, E. Fedotova, S. Illarioshkin // *European Journal of Neurology.* — 2022. — V.29. — N.S1. — P. 522.
6. Andreev, M.N. Plasma and CSF biomarkers of neurodegeneration in multiple system atrophy / M. Andreev, E. Fedotova, D. Abaimov, A. Shabalina, M. Nesterov, S. Illarioshkin // *European Journal of Neurology.* — 2023. — V30. — N.S1. — P. 749.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление
БП — болезнь Паркинсона
ДАД — диастолическое артериальное давление
ДИ – доверительный интервал
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
КСВП — кожные симпатические вызванные потенциалы
МРТ — магнитно-резонансная томография
МСА — мультисистемная атрофия
МСА-М — мультисистемная атрофия, мозжечковый тип
МСА-П — мультисистемная атрофия, паркинсонический тип
ООМ — объем остаточной мочи
ОТ-ПЦР — обратная транскрипция — полимеразная цепная реакция
ОШ – отношения шансов
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РНК — рибонуклеиновая кислота
САД — систолическое артериальное давление
УЗИ — ультразвуковое исследование
ЧСС — частота сердечных сокращений
ACTB — ген бета-актина
AUC — площадь под кривой
COQ2 — ген коэнзима Q2
cut-off – разграничительное значение
HADS - госпитальная шкала тревоги и депрессии
MAF — частота минорного аллеля
MDS — Международное общество по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений
MoCA - Монреальская шкала когнитивной оценки
PDQ-39 - опросник по болезни Паркинсона из 39 пунктов
SARA — стандартизированная шкала оценки выраженности атаксии
SCOPA-AUT - шкала оценки исходов болезни Паркинсона в части автономной дисфункции
Se - чувствительность
SNCA — ген альфа-синуклеина
Sp - специфичность
UMSARS - унифицированная шкала оценки мультисистемной атрофии
UPDRS - унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона