

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

На правах рукописи

ХАЧЕВА КРИСТИНА КОНСТАНТИНОВНА

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

3.1.24. Неврология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

академик РАН,
доктор медицинских наук,
профессор
С.Н. Иллариошкин

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Болезнь Паркинсона: общие сведения	17
1.2. Патогенез болезни Паркинсона и роль α -синуклеина.....	21
1.3. Клиническая и инструментальная диагностика болезни Паркинсона	25
1.4. Патоморфологические изменения в центральной и периферической нервной системе при болезни Паркинсона.....	31
1.5. Диагностические перспективы иммуногистохимической детекции фосфорилированного α -синуклеина в периферической нервной системе.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	41
2.1. Общая характеристика дизайна и методологии исследования	41
2.2. Общая характеристика участников исследования.....	45
2.3. Проведение транскраниальной сонографии.....	46
2.4. Исследование биопсийного материала	46
2.5. Статистический анализ	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	61
3.1. Клинические и демографические характеристики участников исследования	61
3.2. Обнаружение фосфорилированного α -синуклеина и маркеров нервных волокон в материале слюнных желез участников исследования.....	65
3.3. Морфометрический анализ распространенности фосфорилированного	69
α -синуклеина.....	69
3.4. Сопоставление распространенности включений ф- α -син с клиническими характеристиками пациентов с БП.....	74
3.5. Иммуногистохимическая детекция ф- α -син в сопоставлении с результатами ТКС ЧС	79
3.6. Алгоритм применения ИГХМ с определением ф- α -синуклеина в материале слюнной железы как диагностического биомаркера БП	85

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	87
ВЫВОДЫ	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

α -син – α -синуклеин

БП – болезнь Паркинсона

ИГХМ – иммуногистохимический метод

МКБ – международная классификация болезней

МРТ – магнитно-резонансная томография

НЯ – нежелательное явление

ОС – окислительный стресс

ПНС – периферическая нервная система

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

ТГ – тирозингидроксилаза

ТКС – транскраниальная сонография

ф- α -син – фосфорилированный α -синуклеин

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ЧС – черная субстанция

ЦНС – центральная нервная система

AUC – area under curve (площадь под кривой)

DAT – dopamine transporter (дофаминовый переносчик)

HADS – hospital anxiety and depression scale (госпитальная шкала оценки тревоги и депрессии)

HER – heat induced epitope retrieval (тепловой метод демаскировки эпитопа)

MDS – movement disorder society (международное общество расстройств движений)

MDS-UPDRS – movement disorder society unified Parkinson's disease rating scale (унифицированная шкала оценки болезни Паркинсона международного общества расстройств движений)

МОСА – Montreal cognitive assessment (Монреальская когнитивная шкала)

НАС – non-amyloid-component (неамилоидный компонент)

NMSQ – non-motor symptoms questionnaire (опросник оценки немоторных симптомов)

NMSS – non-motor symptoms scale (шкала оценки немоторных симптомов)

PBS – phosphate-buffered saline (натрий-фосфатный буфер)

PDQ-8-SI – Parkinson's disease questionnaire – summary index (опросник качества жизни при болезни Паркинсона – суммарный индекс)

PGP 9.5 – protein gene product 9.5 (белковый продукт гена 9.5)

RBDSQ – REM sleep behavior disorder screening questionnaire (шкала оценки нарушений поведения в REM фазе сна)

REM – rapid eye movement (фаза быстрого движения глаз)

RT-QuIC – real-time quaking-induced conversion (индуцированная вибрацией конверсия в реальном времени)

SNARE – sensitive factor attachment protein receptor (рецептор протеина присоединения чувствительного фактора)

SWI – susceptibility weighted imaging (изображения, взвешенные по магнитной восприимчивости)

VAMP2 – vesicle-associated membrane protein 2 (мембранный протеин 2, ассоциированный с везикулами)

VMAT2 – vesicular monoamine transporter 2 (везикулярный транспортер моноаминов 2)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции (ЧС) [11]. Оно относится к синуклеинопатиям – группе патологий, связанных с накоплением в нейронах и/или глиальных клетках конформационно измененного синаптического белка α -синуклеина (α -син) [11]. Этиология и патогенез заболевания окончательно не установлены [157]. В исследованиях обнаружена тесная связь между прогрессирующей нейродегенерацией при БП и образованием агрегатов патологической фосфорилированной формы α -синуклеина (ф- α -син) в центральной нервной системе (ЦНС) [26].

В 2003 г. была принята классификация патоморфологических изменений в головном мозге при БП, основанная на теории Н. Braak, которая предполагает, что первые отложения телец Леви (состоящих преимущественно из ф- α -син) локализуются в каудальных отделах ствола головного мозга и обнаруживаются там задолго до появления клинических симптомов [36]. В дальнейшем теория Н. Braak была дополнена С. Hawkes и Р. Borghammer, описавшими накопление агрегатов ф- α -син в периферической нервной системе (ПНС) на ранней стадии БП [34, 82]. В соответствии с патоморфологическими изменениями, ранняя стадия БП проявляется немоторными клиническими симптомами: вегетативными расстройствами, нарушением фазы быстрого сна, изменением обоняния [68].

Согласно морфологической классификации, «классические» проявления болезни с нарушением моторной функции начинаются с 3 стадии по Braak, когда агрегаты α -син повреждают центральное ядро миндалины, ядра моста, холинергические ядра основания переднего мозга и компактную часть ЧС [36].

В настоящее время при использовании критериев Международного Общества расстройств движений (Movement Disorder Society – MDS) 2015 года

клинический диагноз БП устанавливается правильно только в 58% и 80% случаев на ранней и поздней стадии заболевания, соответственно [31, 163]. Поэтому существует необходимость проведения дополнительной инструментальной диагностики, которая в настоящее время преимущественно представлена магнитно-резонансной томографией (МРТ) в режиме изображений, взвешенных по магнитной восприимчивости (Susceptibility Weighted Imaging, SWI – визуализация нигросомы в области ЧС) и транскраниальной сонографией ЧС (ТКС ЧС – оценка эхогенности ножек мозга) [11]. Несмотря на все преимущества, данные методы имеют ряд недостатков, связанных со стоимостью исследования и, в некоторых случаях, невозможностью получения результата по различным причинам [10, 106].

Таким образом, необходимость разработки новых методов ранней прижизненной диагностики БП вызвала интерес к обнаружению агрегатов α -син в структурах ПНС. Накопление патологической формы белка – ф- α -син – было выявлено в биопсийном материале толстой кишки, кожи и слюнных желез [32, 91, 101]. В отдельных ранних работах чувствительность методов иммуногистохимического исследования биоптатов слюнной железы не превышала 50% [71]. К настоящему моменту по данным мета-анализов известно, что объединенная чувствительность и специфичность иммуногистохимического метода (ИГХМ) определения ф- α -син в слюнных железах составляет до 76% и 98%, соответственно [21, 159]. Высокие значения чувствительности, равные 100%, к настоящему времени описаны в двух исследованиях с иммуногистохимической детекцией патологического α -син в слюнных железах [43, 107]. Анализ различных методик, использовавшихся в исследованиях по данной теме показал, что наибольшей перспективой обладает метод на основе изучения инцизионного биопсийного материала крупных слюнных желез с анализом распространенности патологически модифицированного α -син и последующей количественной оценкой результатов [21, 159]. По данным MDS 2019 г., именно ИГХМ-исследование биопсийного материала слюнных желез

представляет собой наиболее перспективный метод для прижизненной морфологической диагностики у пациентов с БП [85].

Работы по сопоставлению чувствительности ИГХМ для детекции модифицированного α -син с методами визуализации нигросом с помощью МРТ SWI и ТКС ЧС отсутствуют, несмотря на их достаточно широкое распространение данных методов нейровизуализации в клинической практике. К настоящему моменту известно только об одном исследовании, проводившем сравнение результатов ИГХМ с нейромеланин-чувствительной МРТ [110]. Взаимосвязь выраженности накопления ф- α -син в ПНС со стадией заболевания, а также степенью моторной и немоторной дисфункции у пациентов с БП к настоящему времени не изучена [21]. В связи с этим, вопрос возможности исследования распространенности данного гистопатологического показателя в ПНС в качестве диагностического и прогностического маркера БП остается актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Несколько лет назад зарубежными авторами было высказано предположение о возможном использовании биопсийного материала кишечника, кожи и слюнных желез для обнаружения ф- α -син в ПНС [31, 102]. Преимуществами исследования слюнной железы являются доступность органа для получения биоптатов, отсутствие необходимости сложной предварительной подготовки к процедуре, минимальные риски осложнений и высокая вероятность нахождения биомаркера заболевания вследствие выраженной вегетативной иннервации слюнных желез [42, 142]. В результате нескольких работ у пациентов с БП скопления агрегатов были обнаружены в слюнных железах в стенке протоков, междольковой соединительной ткани и между ацинусами железы в виде фибриллярных и глобулярных структур [43, 75, 88, 162].

Ранее в лаборатории нейроморфологии ФГБНУ НЦН изучались подходы к разработке методики выявления маркеров нейродегенеративных заболеваний в

органах, имеющих обильную периферическую иннервацию, преимущественно на материале от животных [1, 4, 5, 16–19]. Настоящая работа концептуально являлась продолжением этих исследований и проводилась с использованием биопсийного материала подъязычных слюнных желез, полученного от пациентов с БП и лиц без заболевания, а также с применением автоматизированной морфометрии для оценки распространенности в слюнной железе наиболее перспективного по результатам предыдущих исследований маркера заболевания – ф- α -син – с целью изучения потенциала протокола ИГХМ в качестве диагностического. Кроме того, в данной работе, в отличие от предыдущих исследований, рассматривался вопрос прогностической ценности ИГХМ в оценке ф- α -син в структурах ПНС по результатам детальных сопоставлений клинической картины с результатами выявления данного биомаркера в слюнной железе подъязычной локализации.

Цель исследования

Оценка возможности использования иммуногистохимической детекции ф- α -син в ткани подъязычной слюнной железы в качестве диагностического метода у пациентов с БП.

Задачи исследования

1. Разработать методологию исследования ф- α -син в ткани подъязычной слюнной железы у пациентов с БП в качестве дополнительного прижизненного биомаркера нейродегенеративного процесса.
2. Выявить локализацию ф- α -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- α -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- α -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- α -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- α -син в биоптатах подъязычной слюнной железы.

Впервые в мире проведено изучение взаимосвязи результатов транскраниальной сонографии черной субстанции с распространенностью

включений ф- α -син в структурах периферической нервной системы (в подъязычной слюнной железе) при БП.

Разработан метод автоматизированного морфометрического анализа накопления ф- α -син, расположенного в непосредственной близости от нервных волокон в составе слюнных желез пациентов с БП, определено пороговое значение содержания ф- α -син с целью дифференциальной диагностики пациентов с БП и лиц без заболевания. Предложен и протестирован оригинальный протокол иммуногистохимического исследования распространённости ф- α -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

Теоретическое значение работы заключается в описании взаимосвязи содержания маркера БП – ф- α -син – в нервных волокнах ПНС в составе подъязычной слюнной железы с клиническими характеристиками заболевания у пациентов с БП, а также в определении пороговых значений распространённости включений ф- α -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- α -син в биопсийном материале подъязычной слюнной железы. В работе определена сравнительная чувствительность двух биомаркерных методик у пациентов с БП – ИГХМ-детекции ф- α -син в слюнной железе и ТКС ЧС. Выявление α -синуклеиновой патологии на уровне вегетативной нервной системы и периферических тканей подтверждает системный характер поражения, свойственного 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

Исследование проведено в соответствии с принципами, обозначенными в Хельсинской декларации, и одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 9-5/21). У всех участников исследования получено добровольное информированное согласие. Данные пациентов с БП и лиц без нейродегенеративных заболеваний, составивших контрольную группу, были деперсонализированы.

Объектом исследования являлись пациенты с клинически установленным диагнозом БП (основная группа) и участники группы контроля без нейродегенеративных заболеваний с различными патологиями подъязычной слюнной железы. В работе использовались методы клинической оценки состояния участников (первый этап исследования для всех групп), нейровизуализация (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 месяцев после процедуры биопсии.

Материалом исследования являлись клинические данные участников, результаты ТКС ЧС и биопсийный материал подъязычных слюнных желез участников основной группы с БП и группы контроля. Проведены количественный автоматизированный морфометрический анализ результатов ИГХМ и статистическая обработка полученных данных.

Личный вклад

Автором самостоятельно определена тема, сформулирована цель, задачи и план исследования, осуществлен анализ литературы по теме работы, написаны тексты диссертации, автореферата и публикаций по теме настоящей работы, представлены результаты проведенного исследования на научных конференциях. Соискатель самостоятельно провела клиническую часть исследования: отбор участников по критериям включения и невключения, а также определение неврологического статуса участников и оценку состояния пациентов с БП по соответствующим шкалам и опросникам. Автор самостоятельно осуществила гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсий подъязычной слюнной железы (экспериментальная часть работы). Автор самостоятельно применила метод автоматизированной морфометрии для количественной оценки результатов ИГХМ-реакций и провела анализ и статистическую обработку данных.

Положения, выносимые на защиту

1. При БП одним из информативных дополнительных методов диагностики текущего нейродегенеративного процесса является иммуногистохимическое выявление ф- α -син в ткани подъязычной слюнной железы. Чувствительность разработанной методики, основанной на комбинированной окраске исследуемых структур (ф- α -син + нейрональные маркеры тирозингидроксилаза и PGP 9.5), составляет 100%, специфичность – 96,67%.

2. Для повышения информативности иммуногистохимического исследования необходимо проводить анализ распространенности ф- α -син, расположенного в непосредственной близости от периферических нервных волокон в составе слюнной железы, по результатам оценки отношения площади включений ф- α -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- α -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- α -син (по данным иммуногистохимического метода) и гиперэхогенности черной субстанции (по данным транскраниальной сонографии черной субстанции). Детекция ф- α -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 паспорта специальности), которое включает в себя патоморфологические методы исследования ПНС и ЦНС, и «Нейрогенетика, наследственные и дегенеративные заболевания нервной системы» (пункт 1 паспорта специальности), которое включает клиническую феноменологию нейродегенеративных болезней.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается достаточным количеством участников исследования, соответствующих заранее установленным критериям включения/невключения, адекватным количеством проанализированных образцов подъязычной слюнной железы, использованием актуальных методов исследования, соответствующих статистических методов, воспроизводимостью результатов, применением количественного автоматизированного метода оценки результатов. Критический анализ результатов проводился на каждом этапе работы. Результаты сопоставлялись с данными, полученными в других исследованиях, концептуально сходных с настоящей работой.

Результаты исследования были представлены и обсуждены в рамках Всероссийской научно-практической конференции «Неотложные состояния в неврологии: современные методы диагностики и лечения» (19-20 ноября 2021 г., г. Санкт-Петербург), междисциплинарной конференции «Вейновские чтения» (10-12 февраля 2022 г., г. Москва), конгрессе «Нейрофорум-2022» и V Национальном конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (23-24 июня 2022 г., г. Москва), конгрессе «Нейрофорум-2024» (27-28 июня 2024 г., г. Москва).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК и 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 источника литературы, в том числе 2 публикации автора, подготовленные по теме диссертационной работы.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность сотруднику научно-консультативного отделения ФГБНУ НЦН к.м.н. Карабанову А.В. за помощь в наборе пациентов в исследование. Автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией нейроморфологии ФГБНУ НЦН д.м.н., профессору Сухорукову В.С. и сотрудникам лаборатории к.м.н. Воронкову Д.Н., д.м.н. Салькову В.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. Чечеткину А.О. и сотрудникам лаборатории за проведение транскраниальной сонографии, 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Болезнь Паркинсона: общие сведения

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, основные клинические проявления которого (гипокинезия, ригидность, тремор покоя, поструральные нарушения) обусловлены прогрессирующей гибелью дофаминергических нейронов в ЧС среднего мозга и дегенерацией нигростриарного дофаминергического пути [28]. Однако, согласно современным представлениям, патологический процесс при данном заболевании имеет более распространенный, системный характер, с накоплением патологических форм белка α -син в различных структурах головного мозга и ПНС [9, 74].

По данным Всемирной организации здравоохранения, БП в мире страдают около 8,5 млн. человек (2023 г.) [170]. Примерная численность пациентов с установленным диагнозом БП в Российской Федерации составляет около 210 000 человек (2016 г.) [13]. Показатель первичной заболеваемости в мире и в Российской Федерации составляет 13,4 и 9,03 на 100000. населения в год, соответственно [123, 171]. Несколько сниженный уровень первичной заболеваемости БП в Российской Федерации свидетельствует о возможном недоучете первичных случаев болезни, связанном с трудностями выявления ранних стадий заболевания.

Распространенность БП в мире прямо коррелирует с увеличением возраста населения [125]. Так, среди лиц среднего возраста (40-50 лет) распространенность БП составляет 41 на 100000 населения, а среди пожилых людей (80 лет и старше) — 1900 на 100000 населения [40]. БП в 1,5 раза чаще встречается у мужчин, чем у женщин [125]. Случаи возникновения БП у пациентов молодого возраста (до 40 лет) относят к ранним формам, которые составляют 5-14% всех случаев заболевания [112].

В 90-95% случаев БП является спорадической и имеет многофакторную этиологию, обусловленную сочетанием факторов внешней среды, которые вносят наибольший вклад в развитие заболевания, и генетической предрасположенности [143]. Только 5-10% случаев БП (как правило, с началом в раннем возрасте) имеют исключительно генетическое происхождение, связанное с наследуемыми мутациями в генах *SNCA*, *LRRK2*, *PRKN* и др. [112].

К настоящему времени определена связь между возникновением спорадической БП и воздействием химических веществ [28, 136, 160]. Липофильные растворители (толуол, фенол, гексан) и пестициды, многие из которых обладают селективной токсичностью в отношении дофаминергических нейронов, проникают через гематоэнцефалический барьер и приводят к ингибированию митохондриального окислительного фосфорилирования, приводящего к окислительному стрессу (ОС) [158]. Наличие у пациента в анамнезе черепно-мозговой травмы (ЧМТ) повышает риск БП на 56%, при этом вероятность развития заболевания увеличивается пропорционально тяжести перенесенной травмы [62]. Предполагается, что изменение проницаемости гематоэнцефалического барьера, вызванное травмой, приводит к инфильтрации нервной ткани воспалительными клетками из кровеносного русла, активации нейровоспаления, сопряженного в дальнейшем с развитием синуклеинопатии [62, 142]. Недавно также была обнаружена связь между хроническим воздействием ионизирующего излучения и развитием БП [58].

Помимо факторов риска и прогрессии, для БП описаны и факторы протекции, к которым относятся употребление кофе, физическая активность и курение [52, 126, 136]. По некоторым данным, риск развития БП у курильщиков в 2 раза ниже чем у некурящих и находится в прямой зависимости от индекса курения [126]. Также, согласно исследованиям Paul К.С. и Chen Н., употребление кофе и физическая активность (более 11 часов в неделю) являются факторами, не только защищающими от возникновения заболевания, но и способствующими замедлению прогрессирования моторных и когнитивных нарушений в случае

манифестации БП (период наблюдения за пациентами в исследовании – 5 лет) [52, 126].

Первые признаки нарушения двигательной функции у пациентов с БП возникают только после потери значительного количества нейронов ЧС (более половины) и снижения дофаминергической синаптической передачи на 60-70% [9]. Поэтому для БП характерен длительный продромальный период, составляющий от 5 до 20 лет с момента начала первых нейродегенеративных изменений в нервной системе [9, 49, 177]. В течение продромального периода происходит ряд патогенетических изменений, приводящих к прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов, которая не манифестирует в виде классических моторных симптомов до наступления критического снижения дофаминергической функции [96]. Данный период сопровождается появлением достаточно разнообразных немоторных симптомов, которые, тем не менее, редко диагностируются в качестве признаков дебюта БП и оцениваются ретроспективно. К продромальным признакам относятся нарушения быстрой фазы сна (фаза Rapid Eye Movement – REM), дневная сонливость, нарушение обоняния, депрессия, тревога, астения, а также признаки нарушения функции вегетативной нервной системы – констипация, нарушение мочеиспускания, ортостатическая гипотензия и др. [68, 136]. Хотя бы один из этих признаков присутствовал на ранней стадии заболевания у 71% пациентов [146]. Тяжесть немоторных симптомов, как правило, увеличивается при прогрессировании БП [148].

Расстройство быстрой фазы сна характерно для более чем половины больных БП и проявляется нарушением сопутствующего данной фазе расслабления мышц [63]. В настоящее время расстройство считается предвестником нейродегенеративных заболеваний: риск их развития у пациентов с идиопатическим нарушением REM-фазы увеличивается с 35% через 5 лет после появления расстройства сна до 73% и 92% через 10 и 14 лет, соответственно [63].

Нарушения обоняния составляют 50-90% от всех немоторных признаков в начале заболевания [178]. У 10% пациентов с идиопатическим снижением

обоняния в течение 10 лет устанавливается диагноз БП [148]. Наличие гипосмии у пациента на продромальной и ранней стадии является предиктором более быстрого прогрессирования заболевания [69, 83]. Причиной нарушения обоняния считается гибель клеток обонятельных луковиц вследствие накопления в них патологических форм α -син [69].

Психоэмоциональные расстройства в продромальном периоде и на ранней стадии заболевания проявляются в виде тревоги и депрессии. В 30% случаев у пациентов с БП наблюдается их сочетание [168]. Считается, что психоэмоциональные нарушения являются следствием дисрегуляции дофаминергической и серотонинергической синаптической передачи. Аффективные расстройства ухудшают течение заболевания и сопряжены с большей вероятностью возникновения когнитивных нарушений на фоне БП [168]. Наличие тревоги и депрессии у пациентов с БП также связывают с гибелью норадренергических нейронов в голубоватом пятне [29].

Констипация является следствием поражения нервных структур агрегатами α -син с последующей потерей нейронов энтеральных сплетений и периферических нервных волокон, иннервирующих кишечник [131]. На ранних стадиях БП ее распространенность составляет 50-80%, на продромальной стадии – 10% [133]. Для пациентов с БП на продромальной стадии также характерно наличие повышенной кишечной проницаемости, воспаление стенки толстой кишки, изменение микробиомного состава [84, 106].

Нарушение мочеиспускания характерно для 64% пациентов и проявляется в виде учащённых позывов, недержания, никтурии или функционального обструктивного синдрома с неполным опорожнением мочевого пузыря [55, 172].

Ортостатическая гипотензия и связанное с ней головокружение выявляются у 30-40% пациентов в раннем периоде заболевания [55]. Наличие у пациента гипотензии сопряжено с риском неблагоприятного течения заболевания и тяжестью двигательных нарушений [85].

Еще одним немоторным признаком БП является сиалорея (гиперсаливация), наиболее выраженная в ночное время. Сиалорея встречается в 50% случаев на

ранней стадии БП [55]. Она носит вторичный характер и связана не столько с увеличением продукции слюнными железами слюны (напротив, показано, что у пациентов с БП вырабатывается значительно меньше слюны, чем у лиц группы контроля), сколько с дискоординацией орофарингеальной фазы сглатывания слюны [108]. Возможной причиной нарушения этого процесса является накопление агрегатов ф- α -син в верхнем шейном ганглии, ядрах блуждающего нерва и нервных волокнах, входящих в состав слюнных желез. Негативные последствия сialореи включают не только гигиенические и психосоциальные аспекты, но и высокую вероятность аспирации слюны, приводящей к развитию пневмонии [55].

Следует отметить, что комплекс охарактеризованных выше и ряда других немоторных проявлений у пациентов с БП нередко в значительной степени определяет их качество жизни, по сравнению с классическими двигательными симптомами заболевания [103]. Более того, наряду с установлением смешанной, акинетико-ригидной и дрожательной форм БП предложено отдельно выделять и различные немоторные подтипы заболевания (например, с преимущественно вегетативными, когнитивными, аффективными нарушениями и др.), что может иметь важное прогностическое значение [35].

1.2. Патогенез болезни Паркинсона и роль α -синуклеина

В 1919 г. российским ученым К.Н. Третьяковым была описана взаимосвязь патологических изменений в ЧС с развитием БП, а позднее, в 1950-1960 гг. была установлена роль дофамина в развитии клинических признаков БП [6]. С тех пор детали патогенеза БП на уровне молекулярно-биохимических процессов, стоящие за гибелью нейронов, продолжают изучаться. В настоящее время считается, что эксайтотоксичность, ОС, нейровоспаление и образование скоплений α -син определяют развитие нейродегенерации при БП [123, 158, 166].

Изменение функционирования глутаматергической нейротрансмиттерной системы сопутствует нарушениям в дофаминергической системе, поскольку глутамат активно вовлечен в активность лобно-подкорковых путей, контролирующая произвольные движения [87]. В частности, к ЧС поступают глутаматергические сигналы от коры, таламуса и субталамических ядер. Именно гиперактивация субталамических ядер в результате снижения тормозного влияния дофамина из-за гибели дофаминергических нейронов приводит к усилению глутаматергической афферентации к ЧС с развитием эксайтотоксичности [117].

Предполагается, что глутаматная эксайтотоксичность может не только сопровождать уже начавшуюся гибель нейронов ЧС, но и предшествовать ей [117]. В этом случае, вероятно первичное влияние ОС на активацию эксайтотоксичности [48]. Поскольку дофамин является реактивным нейромедиатором, способным к самоокислению с образованием дофамин-хинона, аминокрома и к последующей продукции супероксид-радикалов, для предотвращения развития ОС важно адекватное функционирование переносчиков дофамина, осуществляющих его возврат из межклеточного пространства (Dopamine Transporter – DAT) и хранение (Vesicular Monoamine Transporter 2 – VMAT2) в составе везикул внутри клетки [48]. Известно, что нарушение работы этих переносчиков может происходить в результате экзогенного влияния химических веществ (пестицидов, металлов) или генетических факторов [160]. Эти же факторы приводят к митохондриальной дисфункции, которая не только сопряжена с образованием свободных радикалов из-за повреждения комплексов дыхательной цепи, но и способствует разобщению энергетически высокозатратного транспорта и поддержке дофамин-индуцированного ОС [160]. Снижение активности глутатиона, связанное с дисбалансом в глутаматергической системе, и увеличение содержания ионов железа при БП, также вносят свой вклад в усиление ОС [87, 115]. Окисляя липиды и жирные кислоты с образованием 4-гидрокси-2-ноненала, свободные радикалы при ОС индуцируют полимеризацию и агрегацию α -син [87, 175].

Эксайтотоксичность и ОС поддерживаются развитием нейровоспаления. Триггером нейровоспаления является активация микроглии и астроцитов, которые начинают продуцировать провоспалительные ферменты, цитокины и хемокины, снижающие активность переносчиков глутамата наряду с увеличением активности глутаматных рецепторов [142]. Соответствующие изменения в глутаматергической системе являются факторами развития эксайтотоксичности, что позволяет судить о тесной связи этого процесса с нейровоспалением. Провоспалительные факторы, вырабатываемые микроглией, способствуют запуску ОС, который в свою очередь, может влиять на агрегацию α -син [161]. Дополнительно к активированной нейроглии воспаление усиливают Т-лимфоциты, инфильтрирующие нервную ткань вследствие изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера. В исследованиях у пациентов с БП Т-лимфоциты нередко обнаруживаются в стриатуме и ЧС [144].

Ключевым молекулярным «игроком» в патогенезе БП является белок α -син [98]. В норме растворимый цитозольный α -син включает 140 аминокислот и обнаруживается в пресинаптических окончаниях нейронов. N-терминальная область белка в форме α -спирали содержит аминокислотную последовательность, взаимодействующую с фосфолипидами, которая нарушается при наличии мутаций способствующих потере способности α -син взаимодействовать с мембранными липидами [100]. Центральная часть белка представлена гидрофобным не-амилоидным компонентом (non-amyloid-component – NAC), способным принимать β -складчатую форму и участвовать в агрегации α -син. C-терминальная область не имеет организованной пространственной структуры и состоит из последовательности, взаимодействующей с белками, которая может подвергаться посттрансляционным модификациям [100]. В подавляющем большинстве случаев фосфорилированная форма белка обнаруживается в составе телец Леви – белковых агрегатов в нервной ткани у пациентов с БП [70]. У здоровых людей ф- α -син обнаруживается крайне редко – с частотой, не превышающей 4% [70].

В норме α -син принимает участие в транспорте и высвобождении везикул с нейромедиаторами (в том числе, дофамином) взаимодействуя с белком VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) и синаптобревином-2 – компонентом мембранных белков SNARE (sensitive factor attachment protein receptor). SNARE и VAMP2 являются ключевыми участниками в процессах объединения транспортных везикул с лизосомами и мембраной нервной клетки [27].

Патологическая гиперпродукция α -син с его последующей модификацией, полимеризацией и агрегацией приводит к разобщению транспорта везикул и высвобождения нейромедиаторов за счет его связывания с синаптобревином-2 [26]. Взаимодействие α -син с фосфолипазой D способствует разрушению везикул для депонирования дофамина, вследствие чего возникает избыток свободного дофамина и развивается дофамин-индуцированный ОС [116]. Агрегаты препятствуют реализации функции транспорта эндоплазматическим ретикулумом, ингибируют процесс аутофагии и работу убиквитин-протеасомной системы. Это лишает клетку возможности удаления патологических форм белков, а также нарушают гомеостаз ионов кальция. Все эти факторы в конечном итоге приводят к эндоплазматическому стрессу и запуску апоптоза [56].

Олигомеры α -син разрушают мембраны митохондрий и останавливают работу комплекса I дыхательной цепи, вызывая митохондриальную дисфункцию и гиперпродукцию свободных радикалов, а также активируют микроглию путем взаимодействия с толл-подобным рецептором 2 (Toll-like receptor 2) и пуринергическими P2X7 рецепторами [80, 81]. Нейровоспаление, активированное или усилившееся в присутствии α -син, в дальнейшем приводит к глутаматной эксайтотоксичности [87].

Предполагается, что патологический α -син распространяется по волокнам ПНС к ЦНС посредством прионоподобной передачи [37]. При этом агрегаты α -син, высвобождаемые после гибели нейронов во внеклеточное пространство, могут интернализироваться соседними нейронами и индуцировать агрегацию собственного α -син. Аналогичные процессы могут происходить и в нейроглии, провоцируя развитие нейровоспаления [64]. В результате, повторение циклов

высвобождения и интернализации агрегатов является основным фактором прогрессии заболевания [37].

Доказательством возможности прионоподобного распространения α -син служит обнаружение в 2008 году телец Леви в трансплантированных эмбриональных дофаминовых нейронах при гистологическом изучении аутопсийных препаратов стриатума пациентов, перенесших операцию трансплантации в конце 1980-х годов [104]. После, на животных и клеточных моделях было показано, что внесение олигомеров α -син извне запускает неправильный фолдинг в нейронах, в которых процессы формирования пространственной структуры белков изначально происходили без значимых отклонений [109]. В настоящее время выдвинуты предположения о способности α -син распространяться не только между нейронами и нейроглией, но и между иммунными клетками, а также переноситься от органа к органу в составе системного кровотока [46, 64].

Таким образом, в основе нейродегенерации при БП лежит порочный круг из связанных между собой патологических процессов: образования α -син, нейровоспаления, ОС и эксайтотоксичности, ведущих в конечном счете к гибели дофаминергических и других нейронов. Первые патологические изменения в виде визуализируемых агрегатов ф- α -син могут наблюдаться не в головном мозге, а в структурах ПНС, откуда они способны распространяться в ЦНС (в частности, по волокнам блуждающего нерва) и, далее – между различными структурами головного мозга вследствие прионоподобной трансинаптической передачи.

1.3. Клиническая и инструментальная диагностика болезни Паркинсона

Клинически диагноз БП кодируется по МКБ-10 (код G.20) и устанавливается на основании соответствия симптомов критериям MDS 2015 г. [128, 169]. Данные критерии подразумевают обязательное наличие двигательных симптомов паркинсонизма (брадикинезия, тремор покоя при осмотре, ригидность) при поддержке хотя бы двух дополнительных факторов (заметный эффект от

дофаминергической терапии, присутствие моторных флуктуаций, тремор покоя в анамнезе, гипосмия, кардиальная симпатическая денервация) и отсутствии исключающих и ставящих диагноз под сомнение критериев [12, 169].

В 2015 г. MDS также был представлен перечень критериев для проведения диагностического поиска на продромальной стадии БП, в который вошли такие немоторные симптомы как идиопатическое расстройство REM-фазы сна, гипосмия, констипация, дневная сонливость, гипотензия, нарушения мочеиспускания, эректильная дисфункция, депрессия [33]. Предполагается, что присутствие этих признаков у пациента может свидетельствовать о высокой вероятности развития БП. Также в данных рекомендациях была представлена формула для расчета риска заболевания, предполагающая установление коэффициентов для каждого из факторов риска или протекции и присутствующих у пациента немоторных симптомов [33]. В 2019 г. перечень MDS был расширен включением таких факторов риска, как изменение уровня мочевой кислоты в крови, низкая физическая активность, наличие сахарного диабета 2 типа [85].

Несмотря на расширение клинических критериев MDS в 2015 г., только у 58% и у 80% пациентов в раннем и позднем периоде заболевания, соответственно, устанавливается верный диагноз [31, 163]. В связи с этим, существует необходимость дополнительного проведения объективного обследования пациентов, особенно на ранних стадиях заболевания, с целью начала своевременной терапии.

Нейровизуализация при БП в клинической практике проводится с использованием МРТ в SWI-режиме и ТКС ЧС [11].

МРТ в SWI-режиме позволяет визуализировать нигросому-1 – нейроанатомическую структуру, которая включает в себя нейроны дофаминергической системы ЧС, ее компактной части [5]. У здоровых людей нигросома-1 имеет вид «ласточкиного хвоста» – гиперинтенсивной структуры линейной формы, располагающейся в задней трети ЧС, передняя и латеральная части которой окружены гипоинтенсивными областями [5, 11]. У пациентов с БП гиперинтенсивность сигнала значительно уменьшается вследствие гибели

дофаминергических нейронов и накопления ионов железа, и «хвост ласточки» не выявляется [130]. Объединенная чувствительность и специфичность МРТ в SWI-режиме для дифференциации пациентов с идиопатической БП и здоровых людей по результатам мета-анализа 19 работ оценивается в 96% и 95%, соответственно [93]. Данный метод подходит для обнаружения как ранних, так и поздних стадий БП, но не позволяет оценить выраженность нейродегенеративного процесса и его динамику во времени [134, 137]. SWI-МРТ также обладает низкой специфичностью при проведении дифференциальной диагностики между идиопатической БП и атипичным паркинсонизмом, так как при различных формах последнего также наблюдается утрата интенсивности сигнала от нигросомы-1 [134]. Доступность МРТ в SWI-режиме ограничена вследствие необходимости использования высокопольных томографов (3 Тесла и выше) для выявления нигросомы-1 и высокой стоимости исследования [11].

ТКС ЧС у пациентов с БП направлена на выявление феномена гиперэхогенности ЧС, связанного с накоплением ионов железа, изменением концентрации нейромеланина и активацией нейровоспаления [176]. В отличие от МРТ в SWI-режиме, ТКС ЧС позволяет не только диагностировать БП, но и, возможно, оценивать выраженность нейродегенеративного процесса и его динамику [173]. Помимо особенностей ультразвукового оборудования и квалификации оператора, на результат ТКС могут оказывать такие факторы как пол пациента (у женщин гиперэхогенность обнаруживается реже) и отсутствие височного ультразвукового окна, характерное для 15-20% пациентов в зависимости от возраста и расовой принадлежности [10, 106]. В литературе описана негативная корреляция между площадью гиперэхогенного сигнала и возрастом пациента, а также положительная связь со стадией по Хен–Яру, предполагающая бóльшую вероятность обнаружения гиперэхогенности у пациентов с более тяжелыми стадиями [156]. Тем не менее, эти данные являются противоречивыми – в других работах показано отсутствие корреляции между гиперэхогенностью и возрастом, полом, длительностью заболевания и стадией по Хен–Яру [73, 174].

Мета-анализ 39 исследований показал, что объединенная чувствительность и специфичность ТКС ЧС при дифференциации идиопатической БП и здоровых людей составляет 84% и 85% [153]. При дифференциации идиопатической БП и других нейродегенеративных заболеваний с помощью ТКС ЧС по результатам 9 публикаций чувствительность и специфичность составили 85% и 71%, соответственно [113]. К преимуществам метода ТКС ЧС можно отнести его довольно высокую распространенность и низкую стоимость.

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография и позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) считаются «золотым стандартом» среди прижизненных методов диагностики БП, однако не являются рутинными методами в клинической практике из-за их ограниченной доступности и необходимости введения радиоизотопных веществ [154]. Они используются, в основном, при проведении научных исследований [11].

В качестве лабораторной диагностики пациентам с подозрением на семейную моногенную форму БП, в том числе при раннем начале заболевания (до 40-45 лет), проводится генетическое тестирование с целью поиска мутаций в генах, ассоциированных с моногенными формами БП: *SNCA* (продукт гена – α -син), *LRRK2* (продукт гена – богатая лейцином повторная киназа 2), *GBA* (продукт гена – глюкоцереброзидаза), *PARK2* (продукт гена – паркин) и др. [90].

Посмертное аутопсийное обнаружение телец Леви и сниженного количества дофаминовых нейронов в головном мозге, в настоящее время, несмотря на развитие методов нейровизуализации и лабораторной диагностики, по-прежнему остается «золотым стандартом» верификации диагноза БП [97].

В связи с тем, что каждый метод прижизненной объективной диагностики так или иначе имеет различные ограничения в применении и не в полной мере позволяет получить информацию о наличии, выраженности и динамике нейродегенеративного процесса с возможностью прогнозирования течения БП, поиск диагностических методов остается актуальной проблемой.

Среди перспективных методов объективной диагностики в литературе обсуждаются: нейромеланин-чувствительная МРТ, сцинтиграфия с

радиофармпрепаратом ^{123}I -метайодобензилгуанидином для оценки симпатической денервации миокарда, ПЭТ с ^{11}C -донепезилом, метод амплификации патологического α -син в биологических жидкостях и тканях – индуцированная вибрацией конверсия в реальном времени (real-time quaking-induced conversion – RT-QuIC), а также иммуногистохимическая детекция α -син в различных тканях, доступных для прижизненного исследования [67, 85].

Нейромеланин-чувствительная МРТ в режиме T1 направлена на детекцию снижения уровня компонента катехоламиновых нейронов ЧС – нейромеланина [77]. Снижение концентрации нейромеланина характерно для пациентов с БП и проявляется в виде гипоинтенсивности области компактной части ЧС. По размеру площади этой области можно определить степень выраженности нейродегенеративного процесса и его динамику – параметры, которые недоступны при визуализации нигросом в SWI-режиме [77, 130].

Процесс синаптической денервации миокарда, характерный для пациентов с БП, может быть оценен при помощи введения аналога норадреналина ^{123}I -метайодобензилгуанидина [127]. Данное вещество распределяется в органах с обильной симпатической иннервацией (в частности, в сердце), где связывается с переносчиком норадреналина на пресинаптических терминалях адренергических нейронов. Для пациентов с БП характерно снижение поглощения ^{123}I -метайодобензилгуанидина в миокарде, что является следствием накопления агрегатов α -син в ПНС и разрушения катехоламинергических нервных волокон [127].

В связи с обсуждением роли микробиоты кишечника в формировании в кишечных сплетениях агрегатов α -син, способных в дальнейшем распространяться в ПНС и ЦНС, особое значение представляет радионуклидное исследование парасимпатической холинергической иннервации кишечника с помощью блокатора ацетилхолинэстеразы ^{11}C -донепезила [85, 86]. У пациентов с БП показано значимое снижение интенсивности сигнала радиолиганда на 22% от нормального значения в поджелудочной железе и толстой кишке, и на 35% – в тонком кишечнике, что является следствием парасимпатической денервации [86].

Похожие изменения наблюдаются при радионуклидном исследовании у пациентов с идиопатическим расстройством REM-фазы сна [94].

RT-QuIC представляет собой усовершенствованный вариант циклической амплификации с возможностью определения накопления патологического белка в реальном времени [7]. Основанием для применения RT-QuIC в диагностике синуклеинопатий стала способность патологических форм α -син прионоподобным образом индуцировать агрегацию мономеров α -син [76]. Метод позволяет обнаруживать наличие сверхмалого количества α -син в тканях (например, коже) или цереброспинальной жидкости у пациентов с БП, в том числе в раннем периоде заболевания. Чувствительность RT-QuIC, по данным отдельных исследований, для детекции α -син в коже при БП составляет от 81% до 91%, специфичность – от 86,7% до 90% [99]. Основными недостатками RT-QuIC являются технологическая сложность, ограниченная доступность в лабораториях по всему миру и вероятность получения неудовлетворительного результата при анализе обильно кровоснабжаемых тканей [67].

В основе развивающегося метода прижизненной иммуногистохимической детекции α -син в различных тканях лежит представление о первичном формировании агрегатов α -син «на периферии» [34, 36, 82]. Использование антител к различным модификациям α -син позволяет обнаружить скопления агрегатов в образцах ткани органов с обильной периферической иннервацией (толстого кишечника, слюнных желез и кожи), полученных путем биопсии, а также выявить в них признаки гибели катехоламинергических нейронов и разрушение нервных волокон [17, 21, 159, 167]. Взятие биопсийного материала кожи и железистой ткани слюнных желез для исследования проводится в амбулаторных условиях, не требует специальной подготовки пациента к процедуре, и является достаточно безопасным методом [21, 159]. Иммуногистохимическая реакция по обнаружению α -син может быть воспроизведена в стандартных патанатомических лабораториях, что является показателем потенциальной доступности метода для пациентов. Авторами рекомендаций MDS (2019 г.) подчеркнута высокая специфичность метода

обнаружения α -син в различных тканях, особенно в крупных слюнных железах [85].

Таким образом, диагностические методы для обнаружения и верификации патологического процесса и его оценки в динамике продолжают развиваться, а поиск наиболее специфичного и чувствительного метода диагностики БП, особенно для определения заболевания на ранней стадии, продолжает оставаться актуальным. Наряду с изучением новых технологий нейровизуализации при БП и развитием методов биохимической детекции патологических форм α -син в ведущих исследовательских центрах мира среди перспективных биомаркерных подходов также рассматривают прижизненные гистологические методы диагностики данного заболевания.

1.4. Патоморфологические изменения в центральной и периферической нервной системе при болезни Паркинсона

Отличительной особенностью БП с морфологической точки зрения является наличие телец Леви и нейритов Леви в ткани головного мозга [98]. Тельца Леви представляют собой интранейрональные, цитоплазматические белковые агрегаты 5-30 мкм в диаметре, состоящие из гранулярного ядра и фибриллярного поверхностного слоя с окружающим его гало [97, 146]. Нейриты Леви являются по своей структуре дистрофически измененными аксонами [98].

Обнаружение телец Леви в ЧС является стандартом посмертной верификации БП [163]. ЧС располагается в среднем мозге, позади волокон ножки мозга и морфологически представлена двумя областями: компактной, содержащей дофаминергические нейроны, и ретикулярной, представленной ГАМКергическими нейронами [98]. Высокое содержание нейромеланина, образующегося из предшественника дофамина – L-дофа, обуславливает темный оттенок ЧС, заметный при макроскопическом исследовании [146]. При БП отмечается накопление телец Леви и гибель дофаминергических нейронов в ЧС, а

также изменение концентрации нейромеланина и железа [15, 16]. Функционально ЧС напрямую связана дофаминергическими путями с полосатым телом, хвостатым ядром и скорлупой [98].

Тельца Леви локализуются не только в ЧС, но и в коре головного мозга, в стволе мозга, в обонятельных луковицах, в лимбической системе [97]. С точки зрения морфологии различают кортикальные и стволовые (brainstem), или классические тельца Леви [28, 165]. Стволовые тельца Леви – эозинофильные образования сферической или овальной формы, располагающиеся в ЧС, дорзальном ядре блуждающего нерва, базальном крупноклеточном ядре, голубоватом пятне и гипоталамусе. Внутри телец находится плотное ядро, окруженное наружным фибриллярным слоем и гало. Кортикальные тельца встречаются в коре головного мозга, и, несколько реже – в миндалевидном теле, парагиппокампальной и поясной извилине [28]. Для эозинофильных кортикальных телец характерно отсутствие плотного ядра и гало, нечеткие границы и небольшой размер (в сравнении с классическими тельцами) [109].

Оба типа включений всегда содержат в своем составе ключевой маркер БП – модифицированный α -син, благодаря чему способны интенсивно окрашиваться в иммуногистохимической реакции с антисинуклеиновыми антителами [96]. Среди всех модифицированных форм до 90% приходится на долю фосфорилированного по серину в 129 положении α -син; оставшиеся 10% составляет нитрозилированный, «усеченный» и немодифицированный варианты белка [59]. В составе телец Леви помимо α -син могут находиться протеасомные, мембранные, митохондриальные и лизосомальные элементы, а также до 300 различных белков, среди которых могут обнаруживаться убиквитин, паркин, тау-протеин, белки теплового шока [165]. Также в ЧС и голубоватом пятне могут выявляться «бледные тельца» – цитоплазматические интранейрональные включения, плохо окрашиваемые гематоксилин-эозином и состоящие из модифицированного α -син [28]. В ранних исследованиях нередко «бледные тельца» выявлялись в ЧС в отсутствие признаков гибели дофаминергических нейронов при посмертном изучении головного мозга пациентов без диагноза БП [151]. Предполагается, что

разные морфологические типы телец Леви (классические и кортикальные), а также «бледные тельца» представляют собой различные этапы «созревания» телец Леви и являются отражением стадийности поражения ЦНС при БП [140].

Модифицированный α -син способен образовывать агрегаты, не содержащие других белковых включений и частей органелл [109]. Агрегаты имеют сферическую, овальную, фибриллярную формы и четкие границы. Они располагаются внутри нейронов и нервных волокон, а также вне клеток, что может являться как следствием активной секреции агрегатов в межклеточное пространство, так и результатом их пассивного выхода за пределы клетки из-за разрушения нейронов [28]. Скопления α -син выявляются в ПНС при помощи ИГХМ с использованием антител к его модифицированным формам задолго до появления признаков накопления телец Леви в ЦНС [34,82].

Объяснение присутствия агрегатов модифицированного α -син в структурах ПНС на ранних стадиях БП было получено благодаря появлению теории Н. Braak (2003 г.), дополненной С. Hawkes (2007 г.) и Р. Borghammer (2018 г.) [34, 36, 82]. Согласно ей, формирование первых агрегатов происходит в энтеральной нервной системе с последующим их распространением по всей ПНС и, затем, ЦНС. Распространение агрегатов в ЦНС начинается с продолговатого мозга, дорзального ядра блуждающего нерва, обонятельных луковиц, периферической и энтеральной нервной системы (дополнение С. Hawkes) (1 стадия по Braak), с последующим поражением каудального ядра шва, гигантоклеточной части ретикулярной формации и голубоватого пятна (2 стадия по Braak) [36, 82]. Далее, тельца Леви обнаруживаются в центральном ядре миндалина, ядрах моста, холинергических ядрах основания переднего мозга, компактной части ЧС (3 стадия по Braak), а затем во всех отделах ЧС, лимбической системы и миндалина (4 стадия по Braak). Заключительные, 5 и 6 стадии по Braak, характеризуются поражением мезокортекса и неокортекса, в особенности префронтальной коры [36]. Таким образом, теория Braak–Hawkes–Borghammer отражает последовательность вовлечения нервной системы в патогенез и, соответственно, развития клинических проявлений у пациентов с БП, начиная с немоторных

симптомов, отражающих поражение ПНС, и завершая возникновением классических двигательных нарушений в результате накопления телец Леви в различных структурах головного мозга.

В настоящее время доказано наличие агрегатов α -син в нервной ткани на ранних стадиях БП в составе кишечника, сердца, кожи, слюнных желез; предполагается наличие ϕ - α -син в желудке, пищеводе, надпочечниках и гортани [91]. Наряду с накоплением модифицированного α -син в структурах ПНС, при БП наблюдается снижение плотности волокон, иннервирующих различные органы, вследствие их дегенерации [110, 155, 164].

В кишечнике патологический α -син обнаруживается в энтеральной нервной системе, которая представляет собой нейронную сеть, локализованную в стенке желудочно-кишечного тракта и участвующую в контроле физиологических функций [53]. При исследовании биоптатов тканей кишечника агрегаты α -син у пациентов с БП обнаруживаются внутри холинергических нейронов в составе сплетений Ауэрбаха и Мейснера и в нервных волокнах [60]. Кроме того, показано, что агрегаты нередко выявляются внутри энтероэндокринных клеток, обладающих функциональной схожестью с нейронами и, вероятно, выступающих в роли сенсорных клеток в желудочно-кишечном тракте [47, 95]. Имеются предположения о первичном образовании агрегатов α -син именно в энтеральной нервной системе, которые в дальнейшем достигают ЦНС по волокнам блуждающего нерва [39].

Сердце иннервируется двумя типами вегетативных нервных волокон. При БП агрегаты α -син обнаруживаются в нервных волокнах вокруг коронарных артерий и в миокарде более чем у 60% пациентов, при этом также наблюдается денервация [164].

Немиелинизированные вегетативные волокна кожи берут начало от симпатической цепочки ганглиев и следуют в составе периферических нервов к своим мишеням – сосудам, мышце, поднимающей волос, и волосяным фолликулам [23]. Именно симпатические нервные волокна являются основным

местом локализации скоплений ф- α -син в коже пациентов с БП. Реже агрегаты α -син обнаруживаются в меланоцитах и фибробластах [121].

Слюнные железы получают эфферентную симпатическую и парасимпатическую иннервацию. В исследованиях показано обнаружение ф- α -син как в крупных слюнных железах (подчелюстной, подъязычной, околоушной), так и в мелких железах в составе симпатических катехоламинергических нервных волокон, регулирующих тонус кровеносных сосудов и продукцию слюны [21, 159]. Процесс экзоцитоза слюны напоминает процесс высвобождения синаптических везикул, является кальций-зависимым процессом и включает в себя стадии докинга, прайминга и слияния. Также показано, что белки VAMP2 и SNARE, содержащиеся в нервной ткани в синаптических терминалях, обнаруживаются в секреторных клетках слюнных желез и участвуют в экзоцитозе [59]. С учетом того, что функция α -син в норме тесно связана с белками VAMP2 и SNARE, можно предположить вероятность его нахождения в составе как нервных волокон, так и секреторных клеток [59].

Таким образом, существуют свидетельства поражения не только ЦНС, но и структур ПНС при БП. Основными наблюдаемыми изменениями являются нейродегенерация и накопление агрегатов патологически модифицированного α -син, которые могут быть обнаружены с помощью иммуногистохимического исследования в различных нервных структурах.

1.5. Диагностические перспективы иммуногистохимической детекции фосфорилированного α -синуклеина в периферической нервной системе

Теория Н. Браак о первичном поражении каудальных отделов ЦНС и ПНС, обнаружение агрегатов α -син в органах с обильной периферической иннервацией, наличие у пациентов с ранними стадиями БП немоторных симптомов – все эти данные послужили основанием для гипотезы о возможности ранней диагностики

БП путем оценки наличия модифицированного α -син в биопсийном материале различных органов, доступных для прижизненного изучения.

Первые работы по выявлению ф- α -син в биопсийном материале с помощью ИГХМ были проведены на материале толстой кишки, полученном в ходе колоноскопии у пациентов с развитой БП [101, 129]. Позже было показано выявление синуклеиновых агрегатов в энтеральной системе и у пациентов на ранней, премоторной стадии [141].

Основным ограничением использования материала толстой кишки для развития данного диагностического метода является отсутствие возможности получения достаточного количества материала при биопсии и низкая вероятность наличия фрагментов сплетений Мейснера и Ауэрбаха – основных мест локализации ф- α -син – в биопсийных образцах ткани [159]. Мета-анализ исследований α -синуклеиновой иммунореактивности в ткани кишечника продемонстрировал высокую специфичность (82%), но низкую чувствительность (57%) при проведении дифференциации между пациентами и клинически здоровыми лицами [38]. Низкая чувствительность метода является показателем возможной необходимости повторения процедуры взятия биопсии. С учетом того, что процедура колоноскопии с биопсией требует специальной подготовки пациента, возможность многократного повторения забора ткани ограничена. Кроме того, необходимо принимать во внимание вероятность возникновения жизнеугрожающих осложнений в виде перфорации кишечника, пневмоперитонеума, кишечного кровотечения [8]. В связи с этим некоторые авторы мета-анализов заключили, что использование биоптатов кишки для ИГХМ-оценки распространенности включений α -син приведет к гиподиагностике БП и будет сопряжено с высоким риском тяжелых нежелательных эффектов [38, 159].

Использование биопсийного материала кожи для детекции ф- α -син в нервных волокнах в составе ее базального слоя значительно безопаснее для пациента [159]. Агрегаты α -син располагаются в волокнах, иннервирующих сосуды и железы кожи [65]. Несмотря на высокую специфичность этой методики

(98%), вероятность выявления агрегатов α -син, тем не менее, оказалась достаточно низкой и могла быть связана со снижением плотности нервных волокон в коже у пациентов с БП [159]. Также было отмечено, что участки кожи различной локализации могут значительно отличаться между собой в плотности волокон и количестве агрегатов ф- α -синуклеина [114, 119]. Для повышения чувствительности метода требовалось взятие множества образцов разной локализации и неоднократное повторение процедуры [102, 114, 119]. Кроме того, большая часть исследований была проведена с использованием криотомной методики, которая не воспроизводима в клинических лабораториях в связи с низкой распространенностью. С учетом того, что в ходе исследований был проведен анализ множества образцов кожи разной локализации, объединенная чувствительность ИГХМ-оценки биопсийного материала кожи составила 76% [159]. Таким образом, очевидно, что исследование кожи требует длительного процесса стандартизации, поскольку даже локализация участка кожи и количество взятий биопсии значительно влияют на вероятность диагностики БП.

По данным MDS 2019 г., именно ИГХМ-исследование биопсийного материала слюнных желез представляет собой наиболее перспективный метод для прижизненной морфологической диагностики у пациентов с БП [85].

Предпосылками к развитию идеи использования слюнных желез для выявления в них α -син были результаты аутопсийных исследований, которые продемонстрировали широкое распространение агрегатов в нервных волокнах, иннервирующих слюнные железы [32]. Первые прижизненные исследования проводились с использованием малых слюнных желез в качестве материала и ставили перед собой задачу доказательства присутствия в них как α -син в «нативной» форме без модификаций, так и модифицированного α -син [44, 71]. В работе Cersosimo M.G с соав. в биопсийном материале малых слюнных желез двух из трех пациентов с БП (II стадия по Хен-Яру) показано наличие нативного α -син в составе периацинарных нервных волокон, расположенного рядом с маркером белков нейрофиламента [44]. Исследование Folgoas E. с соав. продемонстрировало иммунореактивность малых слюнных желез к ф- α -син

только у 3 пациентов с БП из 16. Столь низкая выявляемость маркера в данной ранней работе могла быть связана с анализом слишком малого объема ткани – авторы проводили изучение всего трех срезов с одной биопсии у каждого участника, что во многом было обусловлено небольшими размерами железы [71]. Для получения удовлетворяющего объема материала в работе Carletti R. была проведена инцизионная биопсия всех малых слюнных желез, локализованных в нижней губе. В результате анализа у всех пациентов с БП было показано широкое распространение ф- α -син в нервных волокнах, а также некоторых ацинарных и протоковых клетках [43].

Таким образом, несмотря на удобство расположения малых слюнных желез для взятия материала, объем ткани, получаемый в результате однократной биопсии, оказался слишком небольшим для полноценного суждения о распространенности α -син, что требовало повторения процедуры или выделения нескольких малых слюнных желез одновременно. Соответствующие недостатки исследования малых желез привели к началу изучения крупных слюнных желез. Adler С.Н. с соав. обнаружили агрегаты ф- α -син в нервных волокнах в составе соединительной ткани подъязычной слюнной железы у 75% пациентов с БП, прошедших тонкоигольную биопсию. При этом наблюдалась прямая зависимость между объемом полученного материала и вероятностью выявления агрегатов. Также у 20% пациентов в ходе биопсии не было получено железистого материала, в связи с чем оценка распространенности ф- α -син у этих участников не была проведена [24]. В работе D. Vilas с соав. доля пациентов, у которых в результате 2-3 пункций не было получено образцов ткани подчелюстной слюнной железы, составила 50%. У этих участников исследования процедура биопсии потребовала еще 4 дополнительных пункций [162]. Таким образом, нередко в случае тонкоигольной биопсии слюнных желез производился забор ткани окружающих железу структур вместо собственно железистой ткани, что приводило к необходимости неоднократного повторения биопсии. При этом же увеличивался риск развития нежелательных явлений (НЯ). Поэтому в исследовании Р.М. Худоеркова и соав. был применен метод инцизионной биопсии крупных слюнных

желез, позволяющий в процессе однократной процедуры получить достаточный объем материала с высокой вероятностью обнаружения ф- α -синуклеина у пациентов с БП [22]. Наиболее предпочтительными крупными железами для взятия биопсии являются подчелюстная и подъязычная железа в связи с их достаточной удаленностью от крупных нервов (в отличие, например, от околоушной железы) и удобством расположения [21, 159]. При этом биопсия подъязычной слюнной железы, в отличие от биопсии подчелюстной железы, также не оставляет никакого видимого наружного дефекта, способного вызвать дискомфорт пациента после процедуры. Согласно результатам мета-анализа, объединенная чувствительность метода при использовании крупных слюнных желез в качестве материала составляет 76,3% [21]. Chahine L.M. и соав. также показана наибольшая выявляемость включений патологического α -син в слюнной железе по сравнению с биоптатами кожи и толстой кишки [45].

Помимо диагностической перспективы, представляет интерес возможная прогностическая ценность метода детекции ф- α -син. К настоящему времени сравнение морфологической и клинической картины проводилось в исследованиях биопсии кожи, в которых показана взаимосвязь тяжести немоторных симптомов с распространенностью агрегатов [167]. В некоторых исследованиях кожи продемонстрирована связь распространенности патологических форм α -син с выраженностью двигательных нарушений [78]. В работах по изучению распространенности ф- α -син в слюнных железах сравнение клинических характеристик пациентов с выраженностью накопления агрегатов до настоящего времени не проводилась [21].

Также, только в одной работе (Carletti R. и соав.) был представлен полностью количественный метод обработки результатов по оценке распространенности маркера [43].

Таким образом, возможность использования ИГХМ для исследования потенциального маркера БП – ф- α -син в слюнных железах – в качестве диагностического метода продолжает изучаться. При этом требуют оценки различные технические подходы к его реализации. В настоящее время существует

необходимость в изучении связи клинической картины с выраженностью поражения волокон агрегатами α -син и в количественной оценке распространенности ф- α -син у пациентов с БП на разных стадиях с целью анализа диагностической и, возможно, прогностической ценности метода. Практически не изученной остается взаимосвязь изменений, выявляемых при иммуногистохимическом изучении биопсийных образцов слюнной железы, с другими биомаркерами БП (такими как наличие/отсутствие нигросомы-1, гиперэхогенность ЧС при ТКС и др.).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Общая характеристика дизайна и методологии исследования

В открытое поперечное исследование для достижения поставленных целей и задач включались пациенты, находящиеся на лечении в научно-консультативном отделении ФГБНУ НЦН с диагнозом БП (МКБ-10 G.20 Болезнь Паркинсона), установленным в соответствии с критериями MDS 2015 г. (основная группа), а также добровольцы с патологией слюнных желез без нейродегенеративных заболеваний (группа контроля), находящиеся на лечении в отделении челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского. Исследование проведено в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации и одобрено этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол локального этического комитета № 9-5/21).

Критериями включения служили: наличие информированного согласия и возраст участника исследования старше 40 лет. Ограничение по возрасту в качестве критериев включения было введено исходя из литературных данных о наибольшей распространенности идиопатических форм БП среди пациентов старше 40 лет и для нивелирования вероятности участия пациентов с ранними и моногенными вариантами паркинсонизма [112].

Критериями невключения являлись: отказ участника исследования проходить процедуры исследования, наличие любого нейродегенеративного заболевания (для пациентов группы контроля), наличие противопоказаний для проведения биопсии (аллергическая реакция на местные анестетики в анамнезе, заболевания системы гемостаза, декомпенсированный сахарный диабет), наличие выраженных когнитивных нарушений по результатам оценки по шкале Montreal Cognitive Assessment – МОСА (суммарный балл <17), способных затруднять получение участником информации о предстоящем исследовании, сбор анамнеза, а также осложнять проведение биопсии [72, 118]. Не включались в исследование лица, находящиеся в тяжелом соматическом или психическом состоянии.

Предполагалось исключение участников при отказе продолжать дальнейшее прохождение процедур исследования или при развитии какого-либо состояния, упомянутого в критериях невключения, после начала участия пациента в исследовании.

После получения информированного согласия на участие и прохождения скрининга – оценки соответствия критериям включения и невключения, пациенты основной группы проходили четыре этапа исследования:

I этап – сбор анамнеза;

II этап – ТКС ЧС;

III этап – прохождение биопсии в отделении челюстно-лицевой хирургии с последующим гистологическим и иммуногистохимическим анализом биоптатов;

IV этап – отслеживание возникновения НЯ после процедуры биопсии в течение 12 месяцев.

Участники группы контроля после подписания формы информированного согласия и прохождения скрининга, проходили три этапа исследования:

I этап – сбор анамнеза;

II этап – прохождение биопсии в отделении челюстно-лицевой хирургии с последующим гистологическим и иммуногистохимическим анализом биоптатов;

III этап – отслеживание возникновения НЯ после процедуры биопсии в течение 12 месяцев.

2.1.1. Описание этапов исследования для пациентов основной группы

На этапе скрининга проводилась оценка соответствия участников критериям включения и невключения, в том числе оценка по шкале МОСА.

На I этапе исследования для пациентов основной группы проводились:

- Подробный опрос пациента с целью сбора анамнеза и данных о наличии/отсутствии факторов, способных повлиять на развитие и течение БП – профессиональные вредности (работа с различными химическими веществами,

подверженность радиоактивному облучению), курение, уровень физической активности, перенесенная ЧМТ (наличие перенесенного ЧМТ считалось положительным при получении положительного ответа пациента на вопрос о наличии в анамнезе потери сознания и госпитализации вследствие перенесенной травмы головы);

- Клиническая оценка неврологического статуса пациентов в объеме стандартного неврологического осмотра с акцентом на пробы, специфичные для оценки состояния пациентов с БП (исследование позы и походки, темпа произвольных движений, мышечного тонуса, определение расстройства почерка);

- Оценка стадии БП по функциональной шкале Хен–Яра [111];

- Оценка выраженности моторных и немоторных симптомов БП по шкале Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS I-III) [79];

- Оценка выраженности немоторных симптомов по опроснику Non-Motor Symptoms Questionnaire (NMSQ) и шкале Non-Motor Symptoms Scale (NMSS) [49, 50];

- Оценка наличия нарушений REM-фазы сна по опроснику REM sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire (RBDSQ) [149];

- Оценка качества жизни по опроснику Parkinson's Disease Questionnaire Summary Index (PDQ-8-SI) [89];

- Оценка наличия тревоги и депрессии по шкале Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) [147].

На II этапе исследования пациентам с БП в лаборатории ультразвуковой диагностики ФГБНУ НЦН (заведующий – д.м.н. Чечеткин А.О.) квалифицированным врачом ультразвуковой диагностики проводилась ТКС ЧС.

На III этапе исследования пациенты основной группы проходили процедуру биопсии подъязычной слюнной железы, выполняемую квалифицированным челюстно-лицевым хирургом в амбулаторных условиях в отделении челюстно-

лицевой хирургии в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М. Ф. Владимирского (заведующий отделением – д.м.н. Сипкин А.Н.).

На IV этапе исследования в течение последующих 12 месяцев после биопсии проводилось отслеживание возникновения НЯ путем телефонного опроса на наличие жалоб, имеющих потенциальную связь с проведенной процедурой, с частотой 1 раз в месяц. При наличии жалоб предполагалась организация очной амбулаторной консультации челюстно-лицевого хирурга в отделении.

2.1.2. Описание этапов исследования для пациентов контрольной группы

На этапе скрининга проводилась оценка соответствия участников критериям включения и невключения и оценка когнитивных функций по шкале МОСА.

С участниками контрольной группы на I этапе исследования проводился сбор анамнеза для исключения нейродегенеративных заболеваний, в том числе уточнялся семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям. Все участники контрольной группы в рамках данного этапа также проходили стандартный клинический неврологический осмотр с проведением проб и тестов для выявления признаков нейродегенеративных заболеваний.

На II этапе исследования участники группы контроля проходили процедуру биопсии подъязычной слюнной железы по показаниям, связанным с патологиями слюнных желез, выполняемую квалифицированным челюстно-лицевым хирургом в амбулаторных условиях в отделении челюстно-лицевой хирургии в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Процедура биопсии для участников группы контроля проходила тому же по протоколу, что и для пациентов основной группы.

На III этапе исследования в течение последующих 12 месяцев после биопсии проводилось отслеживание возникновения НЯ путем телефонного опроса на наличие жалоб, имеющих потенциальную связь с проведенной процедурой, с частотой 1 раз в месяц. При наличии жалоб предполагалась организация очной

консультации челюстно-лицевого хирурга в отделении.

Все процедуры исследования и их последовательность представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Этапы и процедуры исследования.

Процедуры исследования	Группы								
	Основная группа					Группа контроля			
	Этапы исследования								
	Скрининг	I	II	III	IV	Скрининг	I	II	III
Соответствие критериям включения/ невключения	+					+			
Оценка по шкале MoCA	+					+			
Сбор анамнеза		+					+		
Неврологический осмотр		+					+		
Шкала Хен-Яр		+							
MDS-UPDRS		+							
NMSQ		+							
NMSS		+							
RBDSQ		+							
PDQ-8-SI		+							
HADS		+							
ТКС ЧС			+						
Биопсия подъязычной слюнной железы				+				+	
Оценка отдаленных нежелательных явлений					+				+

2.2. Общая характеристика участников исследования

Информированное согласие было получено для 62 участников. Основную группу составили 31 пациент с БП. В группу контроля вошли 31 доброволец без нейродегенеративных заболеваний с патологиями слюнных желез. Процедуры скрининга и I этапа исследования были проведены для всех 62 участников исследования. По завершении I этапа 1 участник в основной группе и 1 – в контрольной были исключены из исследования и отстранены от прохождения последующих этапов в связи с отказом продолжать участие. Таким образом, все

этапы исследования прошли 60 участников, из которых 30 составили основную группу и 30 – контрольную группу. Статистическая обработка результатов и анализ безопасности проводились по данным 60 участников.

2.3. Проведение транскраниальной сонографии

ТКС ЧС у пациентов основной группы проводилась с использованием аппарата Philips CX 50 (Philips, Нидерланды) в В-режиме в трех стандартизированных плоскостях сканирования по общепринятой методике в лаборатории ультразвуковых исследований ФГБНУ НЦН [20]. Сонография выполнялась через транстемпоральный доступ с локализацией фазированного секторного датчика S5-1 (диапазон частот 1-5 МГц) в околоушной области. Глубина устанавливалась на уровне 140-160 мм, динамический диапазон – 45-50 дБ. В случае обнаружения гиперэхогенности ЧС эту область обводили вручную курсором с последующим автоматическим расчетом площади (см²). Из показателей площади гиперэхогенности с двух сторон для статистического анализа выбирали одно максимальное значение. Расчет площади гиперэхогенности ЧС проводился автоматически, после выделения ее границ вручную. Площадь гиперэхогенного сигнала ЧС, превышающая пороговые значения (0,20 см²), рассматривалась как признак наличия у пациента нейродегенеративного процесса.

2.4. Исследование биопсийного материала

2.4.1. Процедура получения биопсийного материала

Процедура получения биопсийного материала производилась челюстно-лицевым хирургом в амбулаторных условиях в отделении челюстно-лицевой хирургии в ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского. Абсолютными

противопоказаниями к проведению биопсии являлись: аллергическая реакция на местные анестетики в анамнезе, нарушения системы гемостаза и декомпенсированный сахарный диабет.

Взятие биопсии подъязычной слюнной железы производилось со стороны ротовой полости. В процессе взятия биопсии на первом этапе использовалась поверхностная анестезия лидокаином. Через 30-60 секунд после нанесения анестетика определяли точную локализацию выводного протока подъязычной слюнной железы, после чего проводилась его катетеризация. Процедура катетеризации является относительно безболезненной, в связи с чем инъекционная анестезия на данном этапе не требовалась. Далее, с учетом локализации выводного протока производилась инфильтрационная анестезия 1-2 мл 2% раствора новокаина. Через 5-7 минут (время начала действия инфильтрационной анестезии) на полсантиметра латеральнее проекции протока на слизистую оболочку подъязычной области и параллельно ему производился разрез длиной 1 см, после чего челюстно-лицевой хирург выделял часть подъязычной слюнной железы и производил забор фрагмента железистой ткани. Для пациентов основной группы размер извлекаемого фрагмента составлял около 0,5 см³. У пациентов контрольной группы объем вмешательства определялся диагностической и/или терапевтической необходимостью в соответствии с показаниями для проведения биопсии у каждого участника (от инцизии фрагмента до полной экцизии железы). Для проведения настоящего исследования из общего объема полученного материала участника группы контроля выделялся фрагмент размером 0,3-0,5 см³ (в зависимости от объема вмешательства). Слизистую оболочку ушивали 1-2 швами, снятие которых проводилось через 7 дней после биопсии. Все участники после процедуры получали рекомендации от челюстно-лицевого хирурга для снижения вероятности возникновения побочных эффектов, в том числе рекомендации по уходу за областью биопсии.

2.4.2. Гистологическая обработка материала и изготовление срезов

Гистологическое и иммуногистохимическое исследование полученного биопсийного материала проводилось на базе лаборатории нейроморфологии института мозга ФГБНУ НЦН.

Обработка биопсийного материала была концептуально основана на стандартной методике, ранее отработанной в лаборатории нейроморфологии ФГБНУ НЦН [18, 22]. Образцы материала фиксировали в формалине 10%, приготовленном на фосфатном буфере, в течение 24-36 часов. Около половины исходного полученного биопсийного материала объемом примерно 0,5 см³ использовали для проведения исследования, оставшийся материал помещали в архив. Материал, взятый в работу (объемом около 0,25 см³), дегидратировали в этиловом спирте, изопропиловом спирте, смеси изопропилового спирта с хлороформом, чистом хлороформе и заключали в парафиновые блоки (таблица 2).

С парафиновых блоков готовили срезы толщиной 10 мкм на микротоме Leica SR-2000 (Leica Microsystems, Германия), которые расправляли при помощи водяной бани (температура воды 37-38°C) и помещали на стекла (по 8 срезов на 1 стекло), покрытые адгезивной средой, содержащей полилизин (Superfrost Menzel Glaser Polysine Slides, Thermo Scientific, США) (рисунок 1). Последующая сушка стекол со срезами происходила на нагревательном гистологическом столике (Микростат 40, КБ Техном, Россия) при стабильно поддерживаемой температуре 37-38°C в течение 8-12 часов.

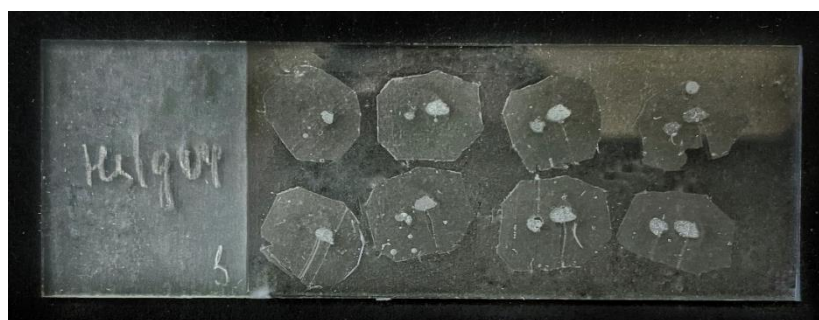


Рисунок 1 – Вид стекла с раскладкой 8 парафиновых срезов подъязычной слюнной железы на 1 стекло.

В каждом исследуемом случае получали всего 11 стекол (88 срезов на всех стеклах), которые использовали для проведения двух иммуногистохимических реакций (детекция антител к ф- α -син и ТГ (1-я реакция) и антител к ф- α -син и PGP 9.5 (2-ая реакция)), контрольного гистологического окрашивания и негативного контроля для каждой из двух реакций (рисунок 2).

Таблица 2 – Этапы предварительной гистологической обработки материала для получения парафиновых блоков.

Этапы	Время выдержки
Фиксация в формалине 10% (на фосфатном буфере)	24-36 ч
Промывание в проточной воде	40 мин
40% этиловый спирт	1 ч
70% этиловый спирт	1 ч
96% этиловый спирт	1 ч
95% изопропиловый спирт I	2 ч
95% изопропиловый спирт II	12 часов
95% изопропиловый спирт + хлороформ 1:1	30 мин
Хлороформ	15 мин
Хлороформ + парафин 1:1	20 мин
Парафин I (при 58°)	40 мин
Парафин II (при 58°)	40 мин
Парафин III	24 часа

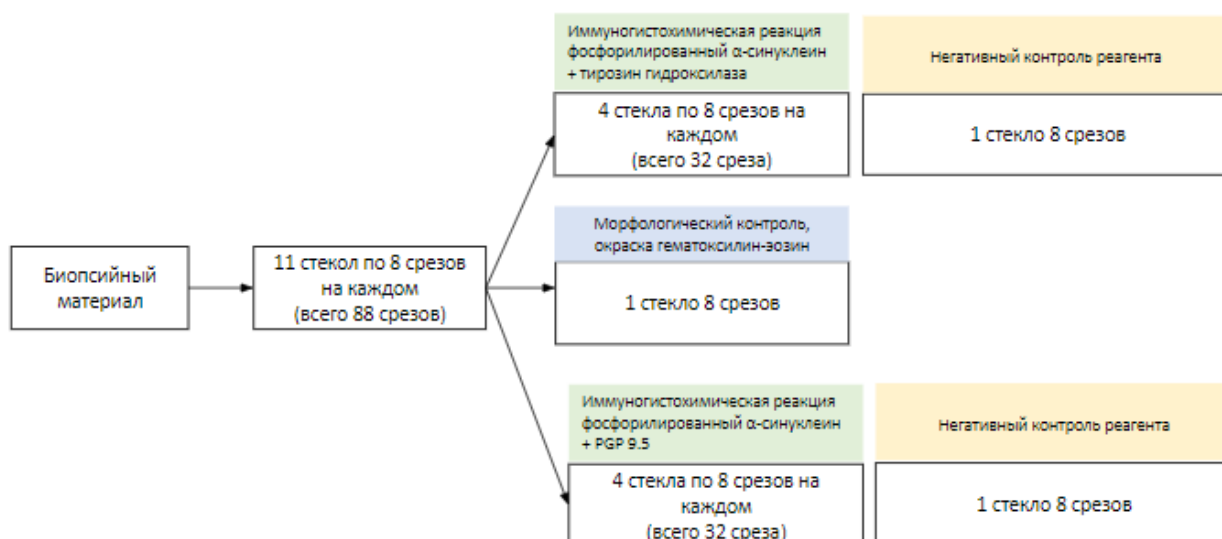


Рисунок 2 – Распределение биопсийного материала каждого участника исследования для проведения иммуногистохимических реакций, морфологического и негативного контроля.

Каждая из двух иммуногистохимических реакций для каждого участника проводилась на 32 срезах (4 стекла). Еще 3 стекла (24 среза) в каждом случае использовали для контрольных процедур: 1 стекло окрашивали гематоксилин-эозином с целью проверки морфологической сохранности исходного материала и 2 стекла – для негативного контроля антител (по одному для каждой реакции).

Выбор серии из указанного количества срезов для исследования был основан на информации о дизайнах ранее проведенных исследований биопсий слюнных желез и использовании в них от 10 до 118 срезов для каждой реакции с целью получения удовлетворяющих по качеству результатов [24, 30, 162]. Нами было выдвинуто предположение, что использование менее чем 30 срезов для каждой реакции и случая в исследовании будет недостаточным для суждения о чувствительности метода и возможности его использования как диагностического, в то время как ИГХМ-исследование 50 и более срезов с материала, полученного от каждого из 60 участников, превышает возможности лаборатории при отсутствии автоматизации процессов проводки и окрашивания. В связи с этим, было принято решение об ограничении серии срезов для двух реакций до 32 для каждого случая и реакции.

Окрашивание гематоксилин-эозином

Для морфологического контроля сохранности материала до проведения иммуногистохимического исследования 8 срезов (1 стекло) с каждой биопсии окрашивали гематоксилином и эозином.

Перед окрашиванием высушенные срезы депарафинировали в трех порциях О-ксилола, спиртах нисходящей концентрации (100%, 96%, 80%, 60%) с последующим промыванием их дистиллированной водой. Стекла со срезами на 3 мин помещали в предварительно приготовленный фильтрованный водный раствор гематоксилина по Майеру (Биовитрум, Россия). По истечении указанного времени срезы для промывания и дифференцировки погружали в аммиачную воду на 0,5-1,5 минуты до приобретения ядрами клеток сине-фиолетового цвета. Далее

стекла промывали в дистиллированной воде. После чего срезы в течение 0,5-1,5 минуты окрашивали в растворе эозина (Биовитрум, Россия), а затем обезвоживали в спиртах восходящей концентрации. Далее, для удаления спирта и просветления срезы помещали в О-ксилол и заключали в канадский бальзам под покрывное стекло (Биовитрум, Россия). Препараты изучали под микроскопом Leica DMLB (Leica Microsystems, Германия) с фотофиксацией с помощью программы QCapture Pro (QImaging, Канада).

2.4.3. Иммуногистохимическое исследование

В настоящей работе применялось не прямое иммуноферментное иммуногистохимическое окрашивание, основанное на специфическом связывании первичных антител с антигенами с образованием комплекса, выявляемого с помощью второго антитела, меченного ферментом.

Для повышения специфичности выявления маркера БП – ф- α -син – был использован метод двойной детекции (двойной иммуногистохимической реакции).

Двойная реакция позволяет выявлять два антигена на одном срезе одновременно. Основным преимуществом такого метода является возможность обнаруживать основной интересующий маркер в тесной связи со структурами, в которых доказано его присутствие. Подобная связь ф- α -син с периферическими нервными волокнами – структурами, в которых неоднократно продемонстрировано присутствие агрегатов, – позволяет значительно снизить вероятность распознавания неспецифических структур со сходными параметрами интенсивности окрашивания и формой в качестве искомым включений [91].

Известно, что в желудочно-кишечном тракте и слюнных железах ф- α -син локализуется преимущественно в периферических нервах в составе органов, в связи с чем в настоящей работе в роли второго компонента реакции было выбрано два известных маркера – ТГ (маркер катехоламинергических нейронов и нервных

волокон) и PGP 9.5 (общееаксональный маркер) [57, 132]. Совместная детекция ф- α -син и нейронального маркера позволяет с большей уверенностью судить о его действительном обнаружении и снизить вероятность определения неспецифического связывания как специфического результата реакции.

Для депарафинизации срезов использовали протокол предварительной обработки, включающий в себя выдержку стекол со срезами в трех порциях раствора О-ксилола и спиртах нисходящей концентрации (100%, 96%, 80%, 60%) с заключительным погружением стекол в дистиллированную воду на 15 минут, а затем промыванием буфером PBS (phosphate-buffered saline, натрий-фосфатный буфер)+Triton (0,1%). После депарафинизации-регидратации осуществляли демаскировку тканевых антигенов.

Необходимость демаскировки перед иммуногистохимическим окрашиванием объясняется образованием межмолекулярных взаимодействий между антигенами и изменением нативной пространственной ориентации эпитопа, которые затрудняют связывание первичных антител с антигенами. Указанные изменения неизбежно возникают в результате фиксации материала в формалине. В настоящей работе использовали тепловой метод демаскировки антигена HIER (Heat Induced Epitope Retrieval), заключающийся в нагревании срезов в микроволновой печи мощностью 600 W в течение 7 мин в 0,1M цитратном буферном растворе (pH=6,0) в соответствии с принятой в лаборатории нейроморфологии методикой [22].

После демаскировки антигенов и охлаждения раствора со стеклами при комнатной температуре, срезы промывали буфером PBS+Triton (0,1%). Далее стекла погружали в 3% водный раствор перекиси водорода на 10 мин для нейтрализации эндогенной пероксидазной активности, после чего снова промывали буферным раствором.

По завершении указанных подготовительных процедур на срезы наносили первичные антитела и инкубировали во влажной камере (во избежание высыхания препарата и последующей остановки реакции связывания с антигенами) в течение ночи (12-14 часов) при комнатной температуре. Пары первичных антител для

проведения двойных реакций были следующими: ф- α -син (клон 81A) + PGP 9.5 (клон EPR4118) и ф- α -син (клон EP1536Y) + тирозингидроксилаза (клон TH-16). После инкубации срезы промывали 5-6 раз буферным раствором PBS+Triton (0,1%).

Характеристики использованных первичных антител указаны в таблице 3.

Для выявления связывания первичных антител использовали готовую полимерную систему MultiVision TL-012-MARH (Thermo Scientific, США), включающую две ферментные метки: пероксидазу (хромоген – аминоэтилкарбазол) и щелочную фосфатазу (хромоген – Fast blue BB и нафтол-AS-MX-фосфат). Малые аминокислотные полимерные субъединицы в составе системы снижают вероятность конфликтов при связывании целевого антигена, что приводит к более последовательному окрашиванию и лучшему усилению сигнала. Также в TL-012-MARH не содержится биотина, что предотвращает фоновое окрашивание, характерное для традиционных биотиновых методов. Готовая система применялась в соответствии с рекомендованной производителем инструкцией.

Таблица 3 – Используемые в исследовании первичные антитела.

Антитела	Каталожный номер	Рабочее разведение	Изготовитель
ф- α -син, клон 81A (моноклональные. мышинные антитела)	ab184674	1:200	Abcam, США
ф- α -син, клон EP1536Y (моноклональные кроличьи антитела)	ab51253	1:300	Abcam, США
PGP 9.5, клон EPR4118 (моноклональные, кроличьи антитела)	ab108986	1:300	Abcam, США
Тирозингидроксилаза, клон TH-16 (моноклональные мышинные антитела)	T2928	1:500	Sigma, США

Препараты изучали под микроскопом Leica DMLB (Leica Microsystems, Германия) при 100-кратном увеличении объектива. Фотографии полей зрения

были получены с помощью программы QCapture Pro (QImaging, Канада).

Для последующего количественного морфометрического анализа распределения ф- α -син и нейрональных маркеров с каждого среза в каждом случае отбиралась одна фотография, репрезентирующая поле зрения с максимальным количеством визуально выявленных включений ф- α -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.

2.4.4. Негативный и положительный контроль

Негативный контроль реагента и ткани

С целью оценки специфичности реакции в иммуногистохимическом исследовании на 1 стекле (8 срезов) из каждой серии выполняли негативный контроль, при котором первичные антитела были заменены на буферный раствор PBS+Triton (0,1%). В каждом случае было показано отсутствие какой-либо реакции.

Негативный контроль ткани проводился с использованием образцов ткани поджелудочной железы из области тела (гастральная часть) размером около 1,5 см, полученных от двух интактных крыс линии Вистар массой 150-200 г. из вивария Института мозга ФГБНУ НЦН, участвовавших в других исследованиях лаборатории нейроморфологии. Для проведения негативного контроля полученные образцы поджелудочной железы фиксировали, заключали в парафин и окрашивали иммуногистохимически с использованием первичных антител к ф- α -син по методике, аналогичной для исследования слюнных желез. Всего было получено два парафиновых блока с образцами поджелудочной железы от каждого животного, которые раскладывали на 4 среза толщиной 10 мкм. Выбор объекта исследования был обоснован железистой структурой органа, достаточной величиной и удобством его расположения для изъятия и практически полным

отсутствием вероятности обнаружения ф- α -син. В результате проведения негативного контроля ткани включений ф- α -син в гастральной и спленальной частях поджелудочной железы крыс при визуализации не обнаружено.

Положительный контроль

Накопление патологического α -син в нигростриарных структурах у пациентов с БП продемонстрировано во многих исследованиях [41, 145, 150], в связи с чем в качестве положительного контроля в работе использовался фрагмент хвостатого ядра пациента Б.В.А. с клинически верифицированным диагнозом G.20 «Болезнь Паркинсона» (дрожательно-ригидная форма, III стадия по шкале Хен–Яра, длительность заболевания 7 лет), полученный посмертно на аутопсии. Фрагмент размером 3x2x2 см фиксировали и заключали в парафиновые блоки, с которых готовили срезы толщиной 10 мкм. На стекло, покрытое адгезивной средой, помещали по 1 срезу. Для каждой из двух иммуногистохимических реакций использовали по 4 стекла. Протокол реакций полностью повторял таковой для исследования подъязычной слюнной железы. В результате ф- α -син был обнаружен в нескольких полях зрения в каждом срезе в виде включений сферической или овальной формы повышенной плотности внутри тел нейронов хвостатого ядра.

2.4.5. Цифровая обработка и количественный анализ гистологического материала

Для проведения количественного анализа содержания ф- α -син с каждого среза для каждого случая были выбраны наиболее репрезентативные микрофотографии 1 поля зрения, содержащего маркеры нервных волокон и ф- α -син. При отсутствии в поле зрения включений ф- α -син отбирали микрофотографию любого поля зрения, содержащего маркер нервных волокон. Все микрофотографии были получены при увеличении объектива x100.

Автоматизированный морфометрический анализ состоял из нескольких этапов, проводимых вручную и автоматически. На первом этапе вручную в фоторедакторе (Lightroom, Adobe, США) 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, в которой была продемонстрирована эффективность автоматизированного метода в оценке белков внеклеточного матрикса на материале сердца приматов и опухоли яичника у человека [2] (рисунок 3).

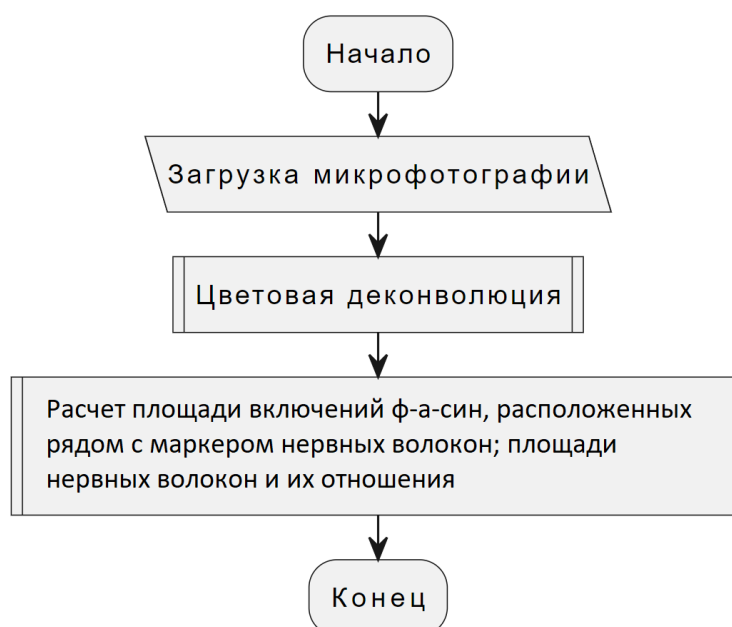


Рисунок 3 – Алгоритм автоматических этапов анализа результатов иммуногистохимического исследования.

Автоматические этапы проводились с помощью программы, написанной на языке программирования Python (Python Software Foundation, США) с использованием библиотек Open CV и Scikit-image. Программа из библиотеки Open CV с помощью функции *imread* () автоматически загружала изображения и осуществляла перевод каждой микрофотографии в массив количественных данных, отражающих параметры интенсивности каждого пикселя [122]. После этого, с помощью Scikit-Image, адаптированной для преобразования изображения

по двум цветовым каналам (коричневому и синему), проводилась цветовая деконволюция [138] (рисунок 4).

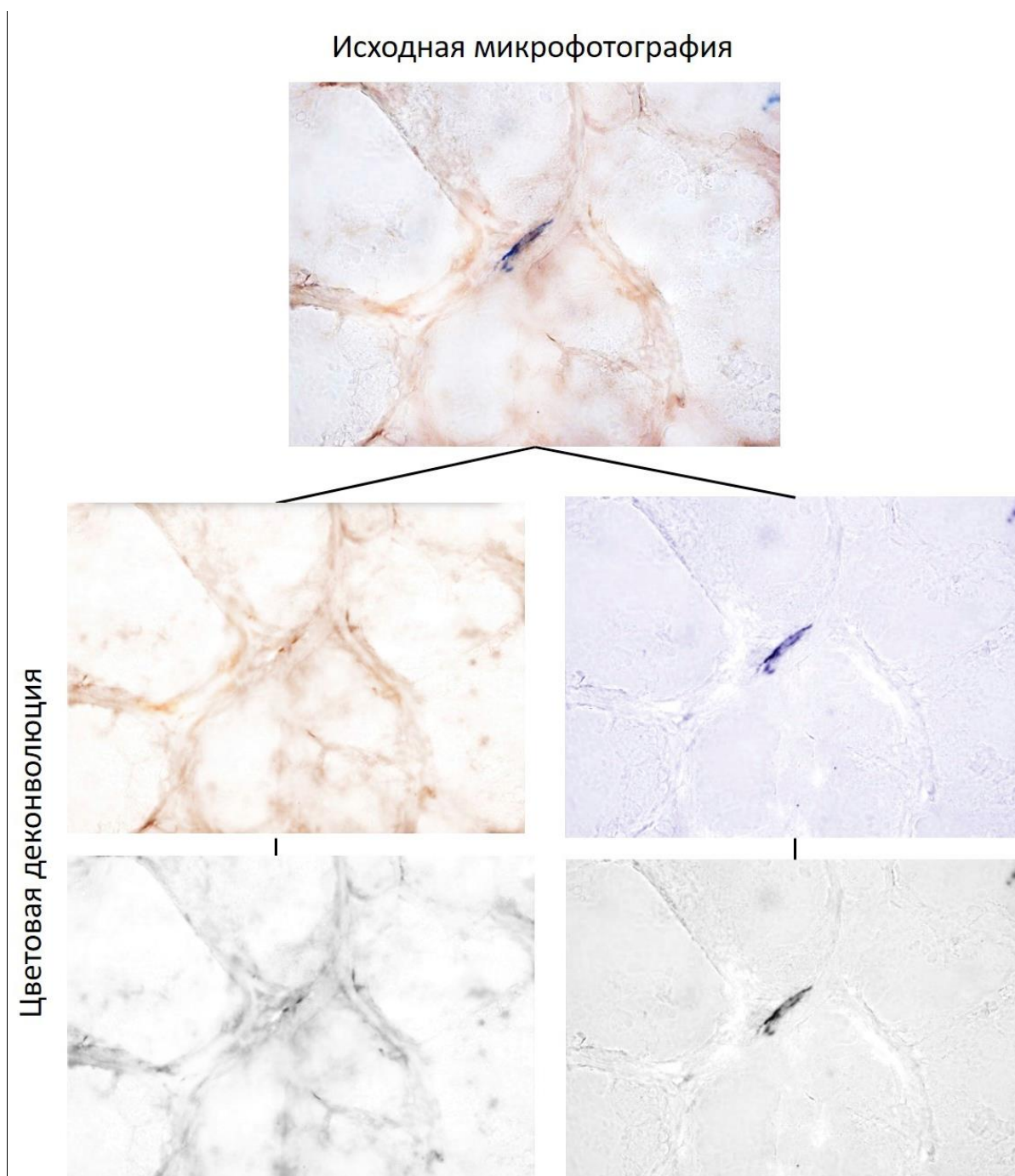


Рисунок 4 – Процесс цветовой деконволюции микрофотографии (ув. объектива x100), полученной с материала пациента с БП (61 год, длительность заболевания 4 года, 2 стадия по Хен–Яру).

На исходном изображении в составе подъязычной слюнной железы визуализируются нервные волокна, окрашенные антителами к PGP 9.5 (синий цвет) и включения ф- α -син овальной формы (темно-коричневый цвет). На этапе цветовой деконволюции происходит разделение исходной микрофотографии на два цветовых канала (синий и коричневый), а затем – получение черно-белого изображения.

Следующие автоматические этапы были разработаны специально для реализации задач настоящего исследования. С учетом предварительно определенных (после нормализации экспозиции баланса белого) порогов интенсивности коричневого и синего цвета, полученного для каждого случая с помощью программы ImageJ (Wayne Rasband, США), на изображении, прошедшем деконволюцию, программой автоматически проводилось удаление всех пикселей с меньшими значениями интенсивности, чем пороговые.

Далее, автоматически проводился расчет площади оставшихся пикселей интересующей интенсивности с учетом порогового значения расстояния между ф- α -син и маркерами нервных волокон. Пороговое расстояние между маркерами ф- α -син и нервных волокон (≤ 10 пикселей или $\leq 0,69$ мкм) было предварительно определено вручную эмпирически на основании данных анализа множества микрофотографий из библиотеки изображений лаборатории нейроморфологии, окрашенных иммуногистохимически на ф- α -син, TГ и PGP 9.5. Введение порогового расстояния позволяло не рассчитывать площадь любых маркеров ф- α -син, удаленных от маркеров нервных волокон на значение, превышающее пороговое, поскольку действительная природа включений, значительно отдаленных от нервных волокон с большей вероятностью была неизвестна. Аналогичные предположения были учтены и при первичной визуальной оценке окрашенного материала.

Таким образом, после учета пороговых значений для интенсивности и расстояния, по всем микрофотографиям, полученным с материала участников исследования, проводился автоматический расчет общей площади нервных волокон и общей площади включений ф- α -син в мкм² (1 пиксель = 0,069 мкм), расположенных рядом с маркерами нервных волокон, а также отношение площади включений к площади нервных волокон. На завершающем этапе вместе с числовыми значениями площадей выводились изображения разделенных цветовых каналов и исходная микрофотография с отмеченными областями, которые использовались для расчетов площади (рисунок 5 А–В).

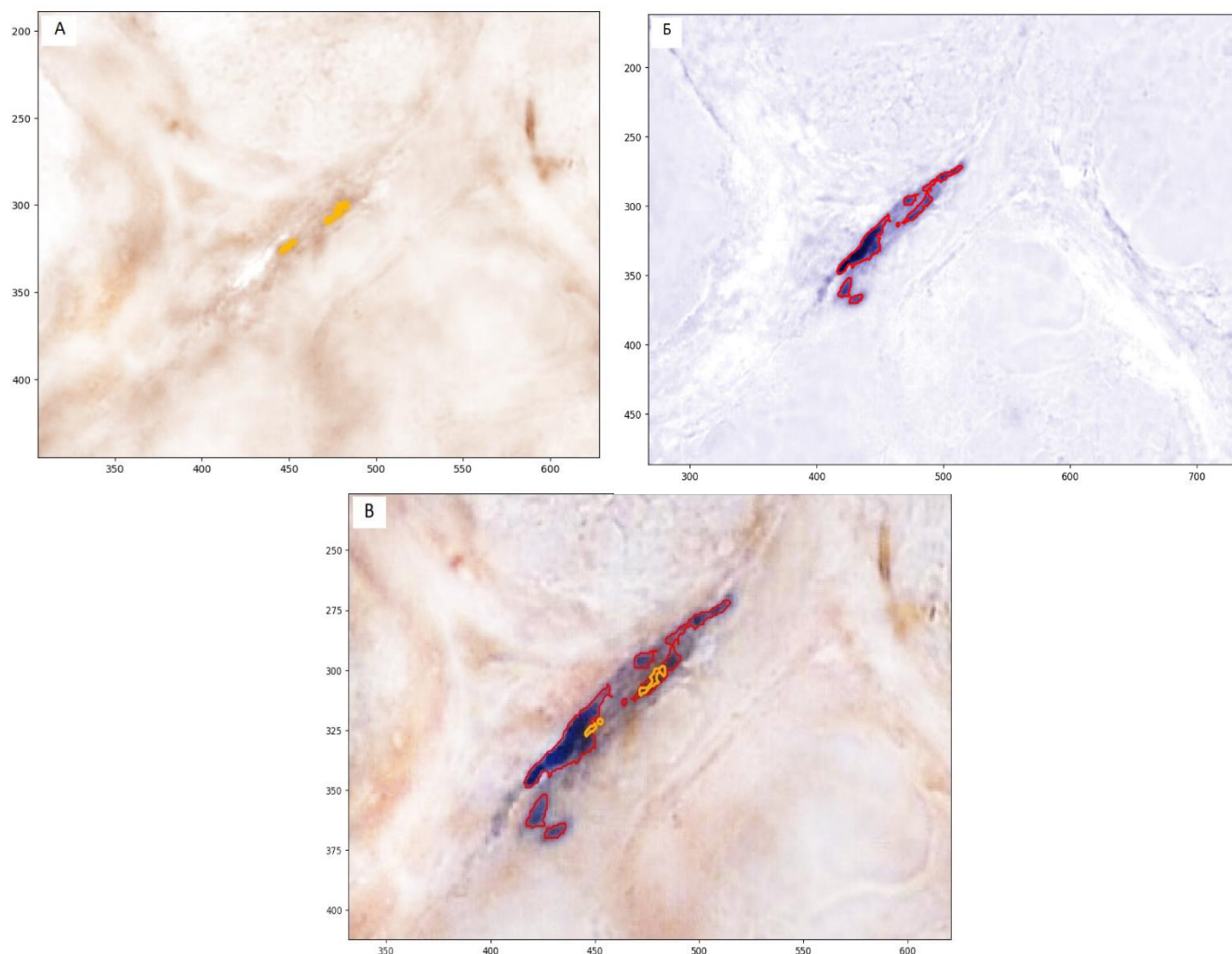


Рисунок 5 – Обозначение областей, по которым был произведен автоматический расчет площади.

А – выделение области расчета площади для оценки размера включений (коричневый канал).

Б – выделение области расчета площади для оценки размера маркера нервных волокон (PGP 9.5) (синий канал).

В – выделение области расчета площади для оценки размера включений и маркера нервных волокон (PGP 9.5) на исходном изображении.

2.5. Статистический анализ

По результатам исследования была создана электронная база результатов клинической оценки и морфометрии в Microsoft Excel (Microsoft, США).

Описательная статистика представлена в виде процентов и средних арифметических (M) со значениями стандартных отклонений (σ) для качественных и количественных нормально распределенных данных, соответственно. При отсутствии признаков нормального распределения данные представлены в виде Me [$Q1$, $Q3$]. Для оценки нормальности распределения использовали тест Шапиро–Уилка. Для оценки наличия связи между явлениями в случае, если распределение данных отличалось от нормального, применялся корреляционный анализ Спирмена (значения коэффициента корреляции: 0,2–0,5 – слабая связь, 0,5–0,7 – умеренная связь, >0,7 – сильная связь). Оценка взаимосвязи бинарных и количественных данных проводилась при помощи точечно-бисериального коэффициента корреляции (r_{pb}). Для нормально распределенных данных использовали корреляционный анализ Пирсона. Проверку статистической значимости при парных сравнениях независимых выборок проводили при помощи t -критерия Стьюдента (для нормально распределенных количественных данных) или U -критерия Манна–Уитни (для качественных порядковых или номинальных признаков и количественных признаков, при отсутствии нормального распределения). Принятая граница уровня значимости – $p=0,05$.

Обработка данных участников проводилась с помощью языка программирования Python. Описательная статистика вычислялась с помощью функций *mean()* (расчет среднего арифметического значения), *std()* (вычисление стандартного отклонения), *median()* (расчет медианы) и *quantile()* (вычисление квартилей) из библиотеки NumPy [119]. T -критерий Стьюдента вычисляли с использованием функции *ttest_ind()*, тест Шапиро–Уилка – с помощью функции *shapiro()*, анализ Спирмена – с помощью функции *spearmanr()*, анализ Пирсона – с помощью функции *pearsonr()*, точечно-бисериальный коэффициент корреляции – с помощью функции *pointbiserialr()* из модуля *scipy.stats* библиотеки SciPy v1.12.0 [139].

ROC-анализ для оценки диагностической значимости ИГХМ был проведен с помощью программы MedCalc, версия 22.026 (MedCalc Software Ltd, Бельгия).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Клинические и демографические характеристики участников исследования

Группу пациентов с БП составили 30 человек (21 мужчина и 9 женщин), средний возраст – $60,2 \pm 9,1$ лет (таблица 4). Для всех пациентов было отмечено соответствие клинической картины критериям MDS 2015 г.. Медианная длительность БП с момента постановки диагноза – 4 [2,7] года. Смешанная форма была диагностирована у 19 пациентов (63,3%), акинетико-ригидная форма – у 10 (33,3%), дрожательная – у 1 (3,3%). Во всех случаях семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям отсутствовал.

При проведении подробного опроса пациентов было выявлено наличие в анамнезе факторов риска развития БП: 11 (36,7%) человек имели в анамнезе опыт длительной работы с химическими соединениями (фенол/толуол, n=1; красители, n=2; акрил, n=1; дизель/бензин, n=2; полимерные смолы, n=1), металлы (алюминий, n=1; литий, n=1; ртуть, n=1) и радиация (n=1)); 13 (43,3%) человек перенесли закрытую ЧМТ. Среди факторов протекции для 10 (33,3%) пациентов были характерны курение (медианный индекс курения – 5,94 [1,85;10] пачка/лет) и для 13 (43,3%) пациентов – физическая активность более 11 часов в неделю (таблица 4).

Среди сопутствующих заболеваний у пациентов с БП присутствовали сердечно-сосудистые заболевания (артериальная гипертония n=17 (56,7%), нарушения ритма сердца n=2 (6,7%), ишемическая болезнь сердца n=1 (3,3%)) и компенсированный сахарный диабет 2 типа (n=1; 3,3%).

Медианная стадия заболевания по шкале Хен–Яра составила 2 [2; 2,5]. Преимущественно пациенты имели 2 и 2,5 стадии Хен-Яр, у 4 (13,3%) пациентов была 3 стадия, у 2 (6,7%) пациентов стадия 1,5 и у 1 (3,3%) пациента стадия 1 по Хен-Яру.

Средний суммарный балл по опроснику NMSQ составил $10,72 \pm 4,88$ баллов и соответствовал умеренной выраженности немоторных симптомов, при этом, результаты шкалы NMSS ($51,82 \pm 33,51$ баллов) характеризовали степень выраженности симптомов как тяжелую.

Для пациентов в среднем было характерно отсутствие тревоги и депрессии по шкале HADS (средний балл $6,17 \pm 4,48$ и $4,96 \pm 3,02$, соответственно). При рассмотрении индивидуальных результатов у 6 (20%) пациентов была выявлена клинически выраженная тревога, у 2 (6,7%) – клинически выраженная депрессия.

У пациентов с БП отсутствовали значимые нарушения сна по опроснику RBDSQ (медианное значение 4 [3; 8] балла).

Средний балл по шкале МОСА составил $26,17 \pm 1,87$, что соответствовало нижней границе нормального состояния когнитивных функций.

Индекс качества жизни, ассоциированного с БП, по опроснику PDQ-8-SI был в среднем равен 25 [12,5; 37,5] (умеренное снижение).

При оценке состояния пациентов по шкале MDS-UPDRS получены следующие медианные и средние значения: MDS-UPDRS I – 11 [7;14] баллов, MDS-UPDRS II – 10 [5; 17] баллов, MDS-UPDRS III – $27 \pm 9,46$ баллов.

Контрольную группу составили 20 мужчин и 10 женщин, средний возраст – $58,4 \pm 6,8$ лет (таблица 4).

Средний балл МОСА был равен $27,67 \pm 1,6$, что соответствовало нормальному состоянию когнитивных функций.

Среди патологий подъязычной слюнной железы у участников группы контроля, которые являлись показаниями для проведения биопсии, были: калькулезный сиаладенит (11 пациентов, 36,7%), новообразования подъязычной слюнной железы (9 пациентов, 30%), киста подъязычной слюнной железы (9 пациентов, 30%), синдром Шегрена (1 пациент, 3,3%).

У участников группы контроля клинических признаков БП и других нейродегенеративных заболеваний при опросе и неврологическом осмотре не обнаружено. Семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям у участников контрольной группы отсутствовал.

Для участников было характерно наличие в анамнезе закрытой ЧМТ (n=2; 6,7%) и вредных условий работы с химическими веществами (n=1; 3,3%) (толуол, фенол), 6 (20%) пациентов были курильщиками (средний индекс курения – 5,75 [2,31; 11,25] пачка/лет). Физическая активность более 11 часов в неделю была характерна для 16 (53,3%) пациентов.

Сопутствующими заболеваниями участников группы контроля были сердечно-сосудистые заболевания (артериальная гипертония – n=11, 36,7%, нарушения ритма сердца – n=2, 6,7%), компенсированный сахарный диабет 2 типа – n=3 (10%), аутоиммунный тиреоидит – n=1 (3,3%).

Статистически значимых различий между участниками двух групп по возрасту (t критерий Стьюдента, p=0,389), полу (U тест Манна-Уитни, p=0,79), приверженности курению (U тест Манна-Уитни, p=0,158) и физической активности (U тест Манна-Уитни, p=0,447) не обнаружено. Группы различались по частоте встречаемости опыта работы с химическими веществами (U тест Манна-Уитни, p=0,0017) и наличию ЧМТ в анамнезе (U тест Манна-Уитни, p=0,0015) – для пациентов с БП в большей степени, чем для лиц из контрольной группы, было характерно наличие в анамнезе данных факторов риска заболевания. Выявлены значимые различия по значениям суммарного балла по шкале МОСА (t критерий Стьюдента, p=0,001), что, вероятно, связано с большей выраженностью когнитивного снижения среди пациентов с БП по сравнению с участниками исследования без нейродегенеративных заболеваний.

Биопсию подъязычной слюнной железы прошли все 60 участников исследования. НЯ в виде болезненности в области биопсии в первые сутки после процедуры, которая купировалась на фоне приема нестероидных противовоспалительных средств, отмечалось только у 5 (8,3% от всей выборки) пациентов в группе контроля и 5 (8,3% от всей выборки) пациентов в основной группе. Возникновение отдаленных НЯ в течение 12 месяцев после биопсии не отмечено.

Таблица 4 – Исходные данные включенных в исследование участников.

	Основная группа	Группа контроля	p (межгрупповое сравнение)
Демографические характеристики			
Количество участников	30	30	-
Пол	М – 21 Ж – 9	М – 20 Ж – 10	p=0,79 [#]
Возраст, годы	60,2±9,1	58,4±6,8	p=0,389 [*]
Клинические характеристики			
Длительность БП с момента постановки диагноза, годы	4 [2, 7]	-	-
Стадия по Хен-Яру	2 [2;2,5]	-	-
Смешанная форма БП, n (%)	19 (63,3%)	-	-
Акинетико-ригидная форма БП, n (%)	10 (33,3%)	-	-
Дрожательная форма БП, n (%)	1 (3,3%)	-	-
Факторы риска/протекции			
Хроническое воздействие химических веществ/радиации, n (%)	11 (36,7%)	1 (3,3%)	p=0,0017 [#]
ЧМТ в анамнезе, n (%)	13 (43,3%)	2 (6,7%)	p=0,0015 [#]
Курение, n (%)	10 (33,3%)	6 (20%)	p=0,158 [#]
Физическая активность более 11 часов в неделю, n (%)	13 (43,3%)	16 (53,3%)	p=0,447 [#]
Результаты оценки по шкалам и опросникам			
МОСА, балл	26,17±1,87	27,67±1,6	p=0,001 [*]
NMSS, балл	51,82±33,51	-	-
NMSQ, балл	10,72±4,88	-	-
MDS-UPDRS I, балл	11 [7;14]	-	-
MDS-UPDRS II, балл	10 [5;17]	-	-
MDS-UPDRS III, балл	27±9,46	-	-
HADS депрессия, балл	4,96±3,02	-	-
HADS тревога, балл	6,17±4,48	-	-
RBDSQ, балл	4 [3;8]	-	-
PDQ-8-SI	25 [12,5;37,5]	-	-

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

3.2. Обнаружение фосфорилированного α -синуклеина и маркеров нервных волокон в материале слюнных желез участников исследования

Изучение морфологической сохранности материала, проведенное перед иммуногистохимическим исследованием, показало, что биопсийный материал всех участников содержит образцы железистой ткани, характерной для подъязычной слюнной железы (рисунок 6 А, Б).

При изучении под микроскопом срезов, полученных с биопсийного материала, взятого у пациентов с БП и участников группы контроля, выявляли характерные для смешанной, слизисто-белковой слюнной железы структуры: протоки и белковые, смешанные и слизистые секреторные отделы (рисунок 6 А). Основная масса железы была представлена смешанными концевыми отделами, состоящими из слизистых и белковых клеток. Выводные протоки на препаратах подъязычной слюнной железы были окружены соединительной тканью и многочисленными сосудами. Соединительная ткань так же составляла многочисленные внутريدольковые перегородки.

В части случаев (у 14 пациентов (46,7%) в основной группе и 3 (10%) участников в группе контроля) наблюдали атрофические изменения ткани железы, которые, вероятно, являлись следствием нарушения автономной иннервации слюнной железы. На срезах обнаруживали жировую ткань, замещавшую участки разрушенных железистых структур и увеличение количества соединительнотканых внутридольковых перегородок. У всех пациентов группы контроля обнаруживали инфильтрацию стромы подъязычной железы воспалительными клетками разной степени выраженности (рисунок 6 Б).

Биопсийный материал подъязычной слюнной железы 60 участников (30 пациентов с БП и 30 лиц без клинических признаков нейродегенеративных заболеваний из группы контроля) был исследован с использованием ИГХМ. Реакция с антителами к ф- α -син и к маркерам нервных волокон – как ТГ, так и

PGP 9.5 – была визуально положительной у 30 (100%) пациентов с БП на всех срезах (рисунок 7 А, В).

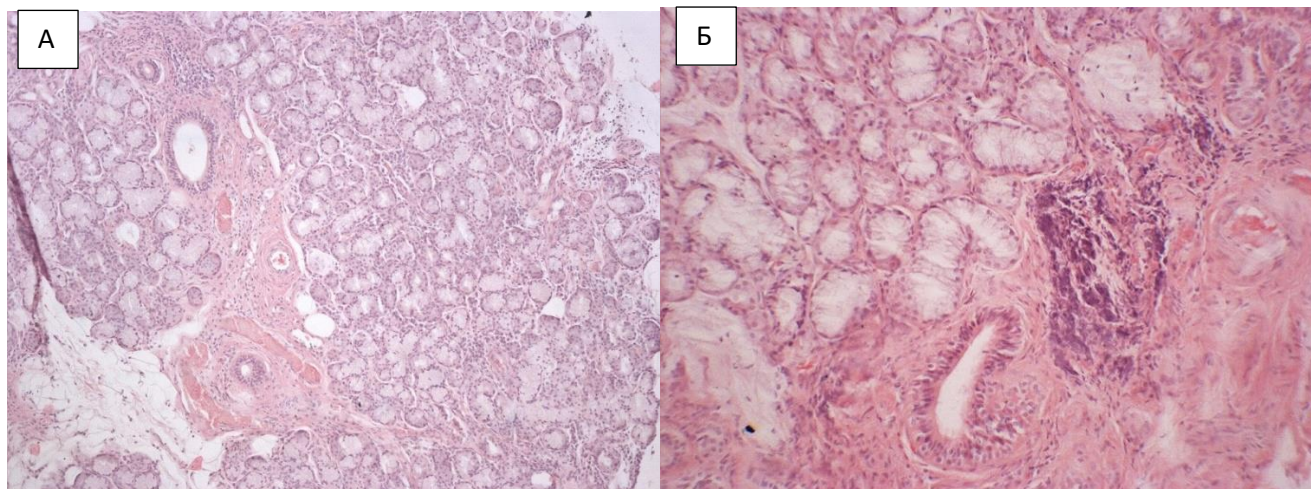


Рисунок 6 – Подъязычная слюнная железа, окраска гематоксилин-эозином.

А – Пациент основной группы, ув. объектива x10. Морфологически сохраняющая железистая ткань, с соединительнотканными перегородками, содержащими кровеносные сосуды.

Б – Участник группы контроля с калькулезным сиаладенитом, ув. объектива x25. Очаг воспалительной инфильтрации.

Включения, напоминающие по форме и интенсивности ф-α-син, расположенные вблизи маркеров нервных волокон, при визуальной оценке выявлялись только у 1 (3,3%) участника группы контроля (Г.А.С., мужчина, 48 лет) и только в 19-ти срезах из 32-х (рисунок 7 Д, Е). Необходимо отметить, что у данного участника отсутствовали клинические признаки БП (в том числе, ранней стадии) и других нейродегенеративных заболеваний, а также семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям. Для Г.А.С. также было нехарактерно наличие факторов риска или протекции БП. Биопсия слюнной железы у этого участника проводилась вследствие калькулезного сиаладенита.

В материале, полученном от остальных 29 (96,6%) лиц без нейродегенеративных заболеваний, визуализировалось только окрашивание нервных волокон (рисунок 7 Б, Г).

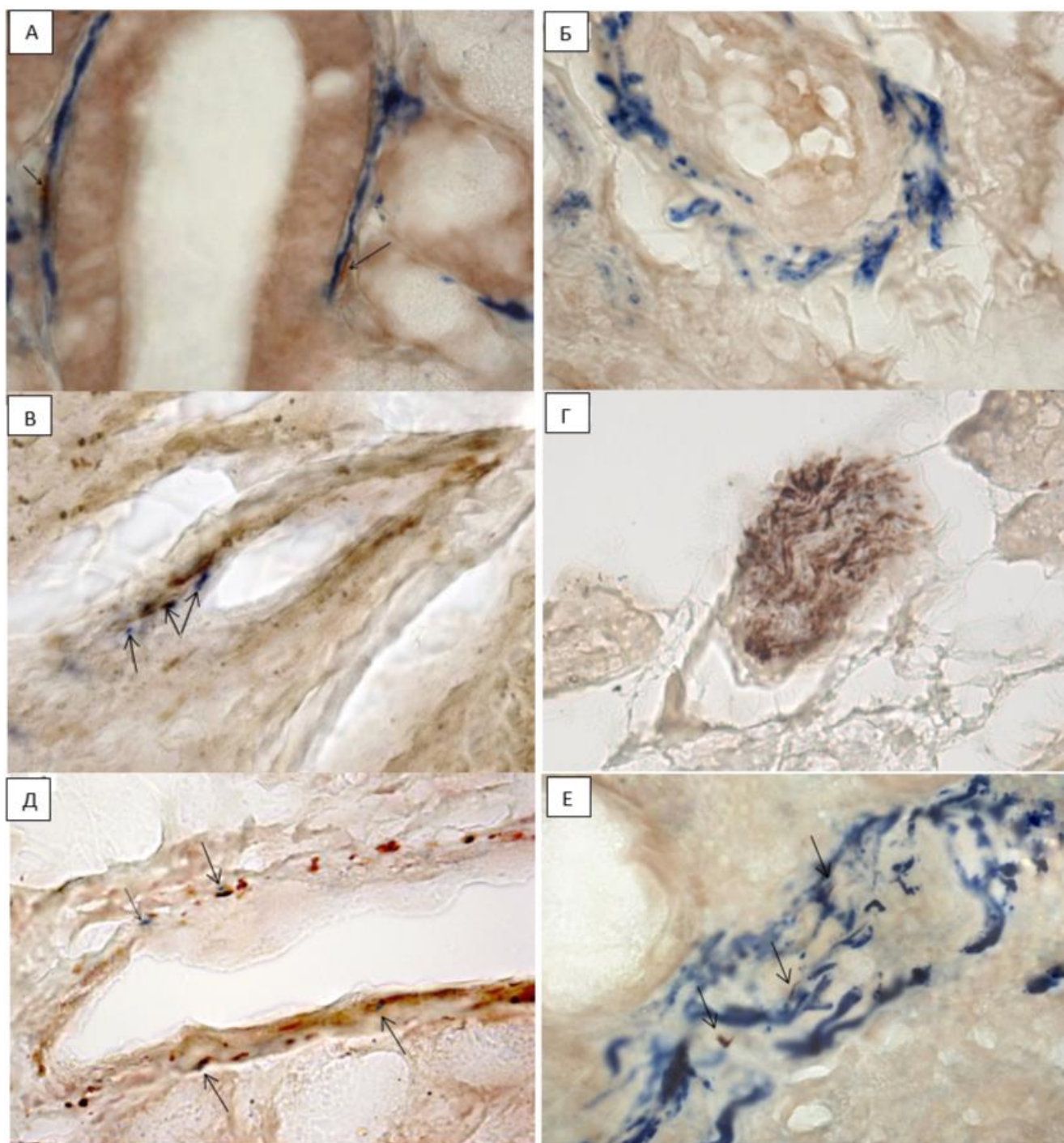


Рисунок 7 – Подъязычная слюнная железа, ув. объектива x100.

А – Пациент с БП, 61 год, длительность болезни 4 года, шкала Хен–Яра – стадия 2. Иммуноферментное окрашивание антителами к ф- α -син (положительная реакция, коричневые включения фибриллярной формы, отмечены стрелками) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон).

Б – Участник группы контроля, 59 лет. Иммуноферментное окрашивание антителами к ф- α -син (отрицательная реакция) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон).

В – Пациент с БП, 62 года, длительность болезни 2 года, шкала Хен–Яра – стадия 1,5. Иммуноферментное окрашивание антителами к ф- α -син (положительная

реакция, синие включения овальной формы, отмечены стрелками) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, темно-коричневое окрашивание нервных волокон).

Г – Участник группы контроля, 54 года. Иммуноферментное окрашивание антителами к ф- α -син (отрицательная реакция) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, темно-коричневое окрашивание нервных волокон).

Д – Участник группы контроля Г.А.С., 48 лет. Иммуноферментное окрашивание антителами к фосфорилированному α -синуклеину (положительная реакция, синие включения овальной формы, отмечены стрелкой) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, темно-коричневое окрашивание нервных волокон).

Е – Участник группы контроля Г.А.С., 48 лет. Иммуноферментное окрашивание антителами к фосфорилированному α -синуклеину (положительная реакция, коричневые включения овальной и фибриллярной формы, отмечены стрелками) и RGR 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон).

Ф- α -син в материале пациентов с БП, позитивных в отношении наличия маркера, и участника Г.А.С. визуализировался в виде небольших овальных и сферических (глобулярных), а также фибриллярных включений относительно высокой плотности, 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 RGR 9.5 (рисунок 7 А, В, Д, Е). Содержание включений ф- α -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- α -син включения в материале пациентов с БП и участника Г.А.С. располагались в составе междольковой соединительной ткани, по периметру внутри- и междольковых протоков и между ацинусами подъязычной слюнной железы (рисунок 7 А, В, Д, Е).

Нервные волокна в материале слюнных желез остальных 29 участников группы контроля имели аналогичную локализацию (рисунок 7 Б, Г). Количество нервных волокон в материале слюнных желез у всех участников группы контроля было визуально несколько выше, чем у пациентов с БП.

3.3. Морфометрический анализ распространенности фосфорилированного α -синуклеина

Автоматизированный морфометрический анализ распространённости ф- α -син включал в себя расчет общей площади включений (в мкм²), общей площади волокон (в мкм²) и отношения площади включений ф- α -син к площади нервных волокон (отношение «включения/нервные волокна»). Отношение «включения/нервные волокна» является численным выражением степени распространенности агрегатов ф- α -син.

При анализе микрофотографий подъязычной слюнной железы пациентов с БП, окрашенных антителами к ф- α -син и RGP 9.5, медианное значение общей площади включений по всем пациентам составило 13,82 [10,65; 15,49] мкм², общей площади волокон, окрашенных на RGP 9.5, – 366,21 [304,49; 417,19] мкм², отношение «включения/нервные волокна, окрашенные антителами к RGP 9.5» – 0,036 [0,032; 0,045] (таблица 5, рисунок 8 А, В). При рассмотрении индивидуальных результатов значения относительных площадей находились в промежутке от 0,015 до 0,084.

Медианные значения площадей при анализе результатов иммуногистохимической реакции с антителами к ф- α -син и к ТГ в основной группе составили: 1,025 [0,877; 1,425] мкм² (общая площадь включений), 198,83 [136,54; 300,92] мкм² (общая площадь волокон, окрашенных на ТГ). Отношение «включения/нервные волокна, окрашенные антителами к ТГ» составило 0,005 [0,0037; 0,0077] (таблица 5, рисунок 8 А, Б). При рассмотрении индивидуальных результатов значения относительных площадей находились в промежутке от 0,002 до 0,013.

Площадь нервных волокон, окрашенных антителами к RGP 9.5, у лиц без нейродегенеративных заболеваний была несколько больше, чем у пациентов основной группы и составила 423,34 [360,1; 483,9] мкм², а окрашенных антителами к ТГ – 359,12 [322,11; 465,18] мкм² (таблица 6, рисунок 8 Б, В).

Различия в площади волокон между двумя группами – группой контроля и основной – были статистически значимыми (U тест Манна–Уитни, $p < 0,001$ для площадей нервных волокон, окрашенных на ТГ, $p = 0,002$ для площадей нервных волокон, окрашенных на PGP 9.5).

Таблица 5 – Результаты морфометрического анализа материала пациентов с БП.

Реакция	S ф-α-син, мкм ²	S НВ, мкм ²	Отношение S «В/НВ»	Диапазон значений отношений S 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 + PGP 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 – площадь включений ф-α-син; ТГ – тирозингидроксилаза; В – включения; НВ – нервные волокна.

Таблица 6 – Результаты морфометрического анализа материала участников группы контроля.

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

Примечания: обозначения как в таблице 5.

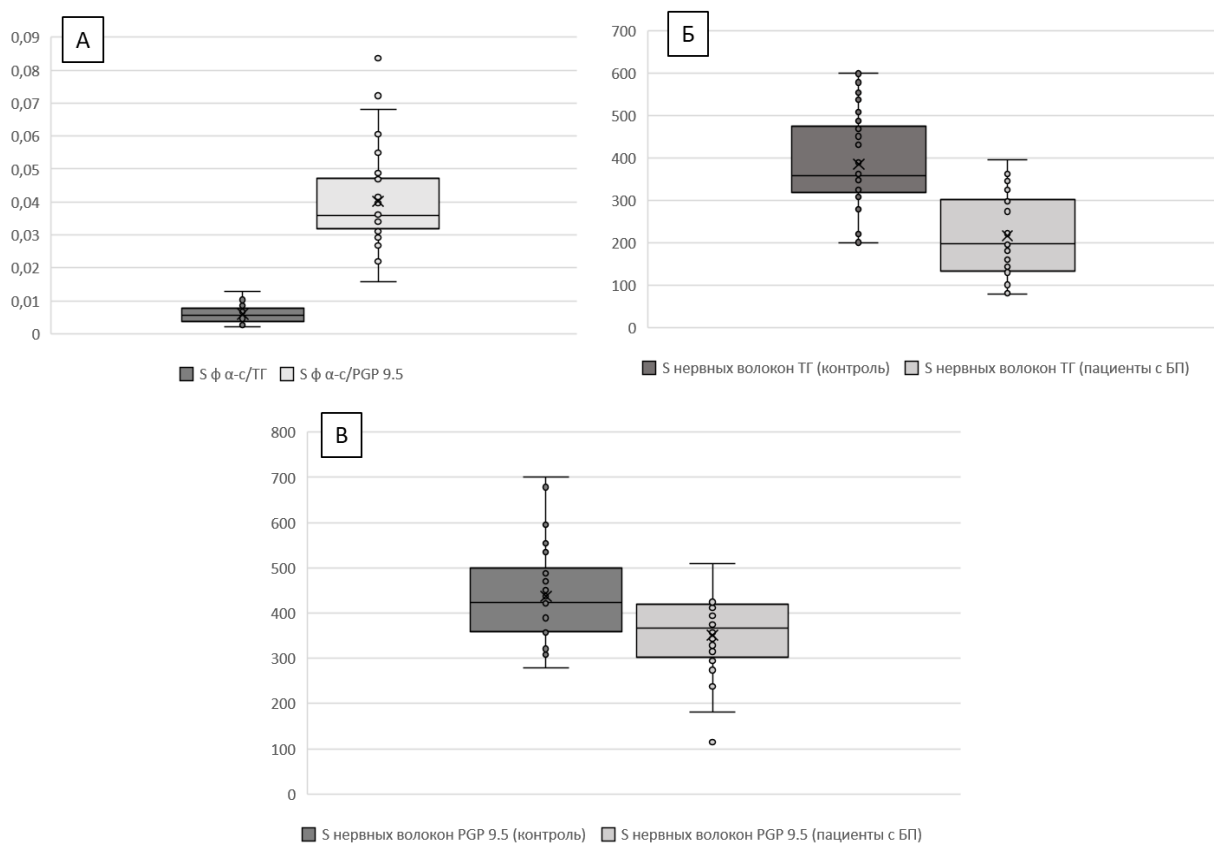


Рисунок 8 – Результаты морфометрического анализа площади нервных волокон и включений ф-α-син у участников исследования.

А – медиана отношений площадей включений ф-α-син к нервным волокнам, окрашенным антителами к ТГ и к PGP 9.5 в группе пациентов с БП.

Б – медиана площади нервных волокон, окрашенных на ТГ в двух группах.

В – медиана площади нервных волокон, окрашенных на PGP 9.5 в двух группах.

Примечания: S – площадь; S ф-α-син/ТГ – отношение площади включений ф-α-син к площади нервных волокон, окрашенных на ТГ; S ф-α-син/PGP 9.5 – отношение площади включений ф-α-син к площади нервных волокон, окрашенных на PGP 9.5.

Таким образом, визуально при микроскопии и при автоматизированном морфометрическом анализе площадь нервных волокон была бóльшей у всех лиц контрольной группы в сравнении с основной группой, что подтверждалось результатами межгруппового сопоставления полученных значений площадей нервных волокон. Данное наблюдение может быть объяснено наличием прогрессирующей денервации у пациентов с БП вследствие выраженного накопления патологических форм α-син в структурах ПНС. У участника Г.А.С. значения площади нервных волокон, окрашенных на оба нейрональных маркера,

были сравнимыми со значениями участников группы контроля, т.е., в данном случае признаков значимой денервации не отмечено.

По результатам автоматизированного морфометрического анализа медианное значение площади структур, распознаваемых как включения ф- α -син и расположенных рядом с маркером PGP 9.5, у участников группы контроля было в тысячи раз меньше ($0,001 [0,0006; 0,0028]$ мкм²), чем аналогичное медианное значение площади для визуализируемых включений ф- α -син в группе пациентов с БП. Медианное отношение площади этих структур, распознаваемых как включения, к нервным волокнам, окрашенным PGP 9.5, было равным $2,5 \cdot 10^{-6} [1,8 \cdot 10^{-6}; 5,8 \cdot 10^{-6}]$ (таблица 6). При рассмотрении индивидуальных результатов, значения отношений «включения/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5» находились в промежутке от $8,86 \cdot 10^{-9}$ до 0,018 (результат участника Г.А.С. с визуально положительной реакцией на ф- α -син). При сравнении отношений «включения/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5», полученных в основной группе пациентов с БП и в контроле, выявлены значимые различия (U тест Манна-Уитни, $p < 0,001$). С учетом этого, а также факта визуального отсутствия структур с позитивной окраской на ф- α -син у 29-ти участников группы контроля, получение настолько малых значений площади структур, распознаваемых как включения при автоматизированной морфометрии, можно считать погрешностью распознавания нескольких одиночных пикселей, имеющих значение интенсивности цвета, схожее с таковым для ф- α -син. Значение отношения «включения/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5» у участника Г.А.С., с визуально положительной реакцией на ф- α -син, было несколько меньше, чем медианное значение отношения «включения/нервные волокна» в основной группе пациентов с БП (0,018 против 0,036), но в тысячи раз больше, чем медианное значение отношений для остальных 29 участников группы контроля ($2,45 \cdot 10^{-6}$).

Медианное значение площади структур, распознаваемых как включения ф- α -син и расположенных рядом с маркером ТГ, составило $0,00015 [3,3 \cdot 10^{-5}; 0,0004]$. Медианное значение отношения площади структур, распознаваемых как включения, к нервным волокнам, окрашенным на ТГ, были кратными 10^{-7} степени

(медианное значение – $4 \cdot 10^{-7}$ [$9 \cdot 10^{-8}$; $9,8 \cdot 10^{-7}$] $\mu\text{км}^2$) (таблица 6). При сравнении отношений «включения/нервные волокна, окрашенные на ТГ», полученных в основной группе пациентов с БП и в контроле, выявлены значимые различия (U тест Манна-Уитни, $p < 0,001$). При рассмотрении индивидуальных результатов значения относительных площадей находились в промежутке от $3 \cdot 10^{-10}$ до 0,00206 (результат участника Г.А.С. с визуально положительной реакцией на ф- α -син). Таким образом, в реакции на ф- α -син и ТГ у 29 участников группы контроля, с высокой долей вероятности, структуры, определенные как ф- α -син при автоматизированном анализе, действительными включениями ф- α -син (также, как и в случае реакции на ф- α -син+PGP 9.5) не являлись. Значение отношения «включения/нервные волокна, окрашенные на ТГ» у участника Г.А.С., у которого визуализировались включения, напоминающие ф- α -син, было в 2,4 раза меньшим, чем медианное значение отношения в основной группе пациентов с БП (0,00206 против 0,005), но в тысячи раз большим, чем медианное значение отношений для остальных 29 участников контрольной группы ($4 \cdot 10^{-7}$).

Диагностическая ценность ИГХМ для детекции ф- α -син, расположенного рядом с PGP 9.5 и ТГ, в дифференциации пациентов с БП и лиц без БП была определена с использованием метода построения ROC-кривой (рисунок 9 А).

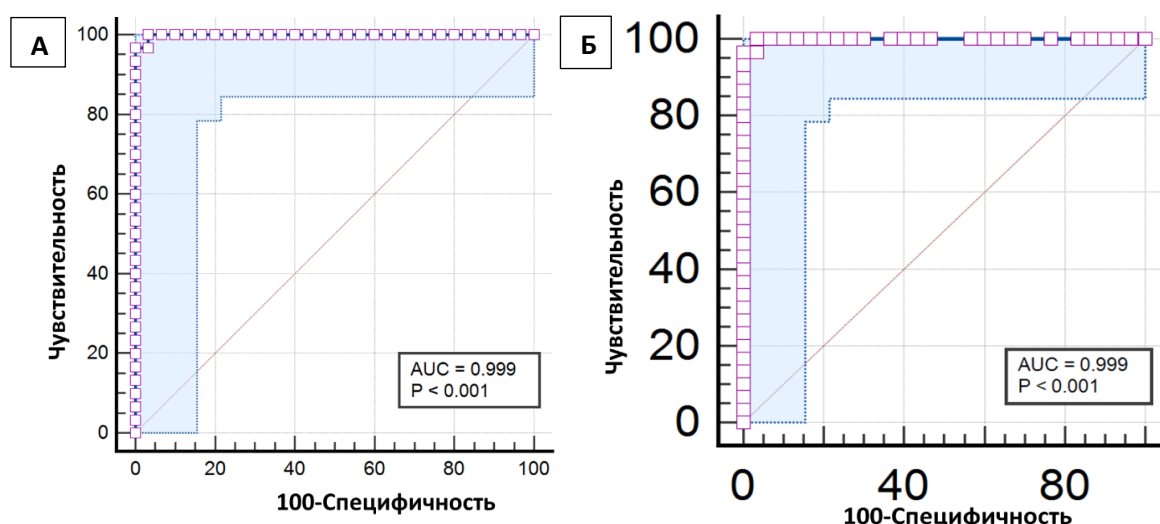


Рисунок 9 – Результаты анализа диагностической ценности ИГХМ детекции ф- α -син.

А – для ИГХМ с окрашиванием на ф- α -син + PGP 9.5;

Б – для ИГХМ с окрашиванием на ф- α -син + ТГ.

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

Диагностическую значимость ИГХМ детекции ф- α -син, расположенного вблизи RGP 9.5 можно считать отличной, поскольку значение площади под кривой AUC (Area Under Curve) равно 0,99 (95% доверительный интервал [0,938; 1,0]), специфичность – 96,67%, чувствительность – 100% (рисунок 9 А).

Пороговое значение отношения «включения/волокна, окрашенные на RGP 9.5», при преодолении которого можно судить об обнаружении действительных агрегатов ф- α -син (а не погрешности распознавания единичных пикселей) и подтверждении клинически установленного диагноза БП – 0,00002.

Диагностическая значимость ИГХМ детекции ф- α -син, расположенного вблизи ТГ, также была отличной – AUC равно 0,99 (95% доверительный интервал [0,938; 1,0]), специфичность – 96,67%, чувствительность – 100% (рисунок 9 Б). Пороговое значение отношения «включения/волокна, окрашенные на ТГ», при превышении которого можно судить о детекции действительных включений ф- α -син и о верификации диагноза БП – 0,000004.

3.4. Сопоставление распространенности включений ф- α -син с клиническими характеристиками пациентов с БП

Все полученные при обследовании пациентов с БП результаты оценки состояния моторных и немоторных функций по специализированным шкалам и опросникам, а также показатели качества жизни были проанализированы на предмет наличия взаимосвязи с содержанием ф- α -син.

При анализе относительной площади включений ф- α -син к площади волокон, окрашенных на ТГ, выявлена значимая умеренная положительная связь данного показателя со значениями шкал и опросников, оценивающих немоторную функцию пациентов с БП: NMSQ ($R=0,54$; $p=0,002$) и NMSS ($R=0,58$; $p=0,001$) (таблица 7, рисунок 10).

Таблица 7 – 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
S ф-α-син / ТГ	0,54	0,002	0,58	0,001	0,41	0,002	-0,05	0,25	0,25	0,17	0,36	0,05
S ф-α-син / PGP 9.5	0,56	0,0015	0,58	0,0007	0,67	0,00007	-0,06	0,19	0,26	0,16	0,37	0,06

Примечания: R – коэффициент корреляции; p – уровень значимости; S ф- α -син/ТГ – отношение «включения ф- α -син/нервные волокна, окрашенные на ТГ»; S ф- α -син/PGP 9.5 – отношение «включения ф- α -син/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5».

Корреляция между отношением «включения/нервные волокна, окрашенные на ТГ» и результатом подшкалы MDS-UPDRS I была слабой, но при этом также значимой и положительной (R=0,41; p=0,002). Отношение «включения/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5», умеренно коррелировало с показателями шкал NMSQ (R=0,56; p=0,0015), NMSS (R=0,58; p=0,0007), MDS-UPDRS I (R=0,67; p=0,00007) (таблица 7, рисунок 11).

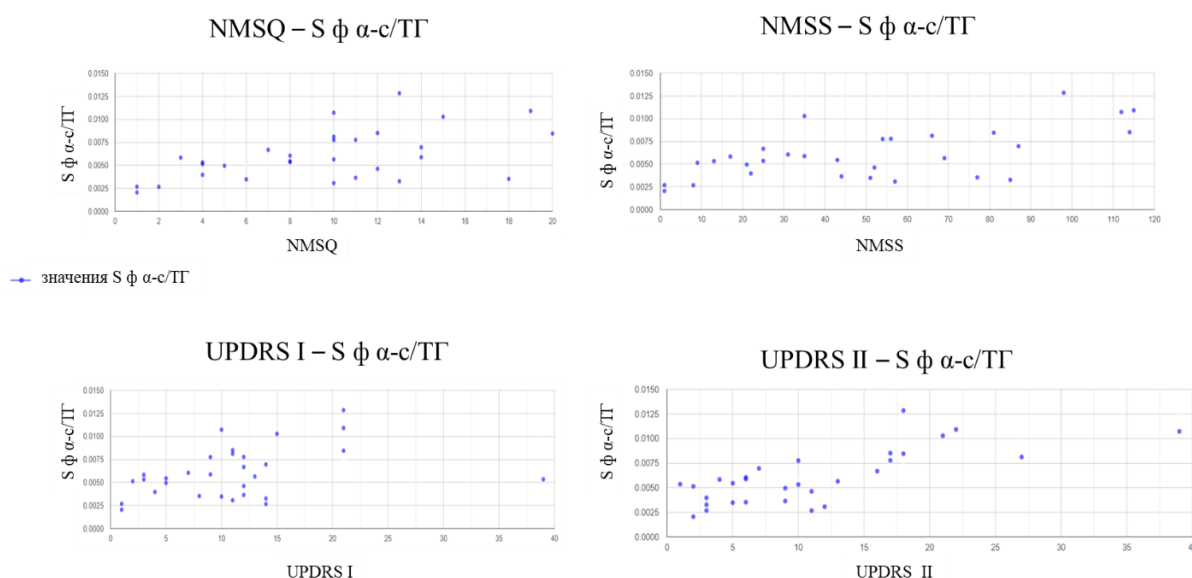


Рисунок 10 – Диаграммы рассеяния для анализа взаимосвязи между отношениями «включения ф- α -син/нервные волокна, окрашенные на ТГ» и результатами шкал/опросников клинического состояния

Примечания: обозначения как в таблице 7.

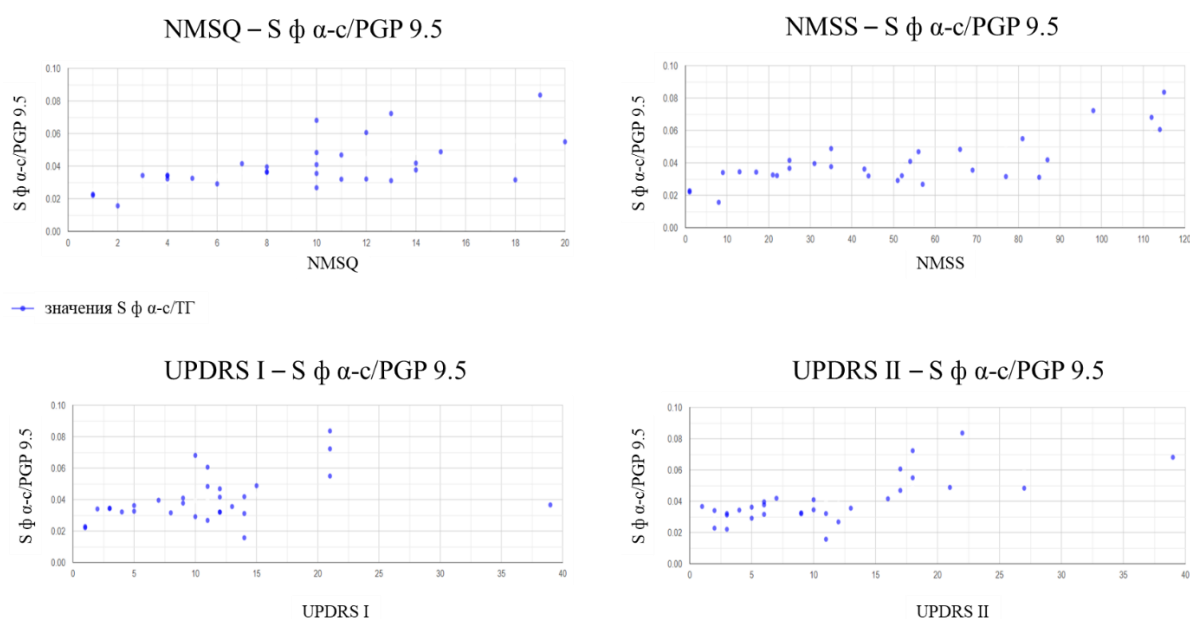


Рисунок 11 – Диаграммы рассеяния для анализа взаимосвязи между отношениями «включения ф-α-син/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5» и результатами шкал/опросников клинического состояния

Примечания: обозначения как в таблице 7.

Связи между отношениями «включения ф-α-син/нервные волокна», окрашенные на PGP 9.5 и на ТГ, и шкалами RBDSQ и HADS, не выявлено (таблица 7).

Обнаружена связь средней силы между относительной площадью включений и балльными показателями раздела II шкалы MDS-UPDRS, отражающего субъективную оценку влияния двигательных нарушений на ежедневную активность ($R=0,68$; $p<0,001$ для включений, расположенных вблизи ТГ, и $R=0,6$; $p<0,001$ для включений, расположенных вблизи PGP 9.5). Для отношений площади включений ф-α-син к нервным волокнам, окрашенным на ТГ и PGP 9.5, и MDS-UPDRS III, оценивающей моторные симптомы, была характерна умеренная положительная связь (таблица 8).

При сопоставлении длительности и стадии заболевания по функциональной шкале Хен–Яра с отношениями площади включений ф-α-син к площади нервных волокон, окрашенных на ТГ и PGP 9.5, значимой связи не выявлено.

Корреляция между относительной площадью включений, показателем качества жизни по PDQ-8-SI и баллами теста МОСА была не значимой (таблица 8).

Таблица 8 – Корреляции отношения «включения ф-α-син/нервные волокна», клинических характеристик и результатов шкал/опросников оценки симптомов пациентов с БП.

	Длительность заболевания		Стадия по Хен-Яру		MDS-UPDRS II		MDS-UPDRS III		PDQ-8-SI		МОСА	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	R	P
S ф-α-син / ТГ	0,27	0,14	0,35	0,06	0,68	<0,001	0,6	<0,001	-0,06	0,75	-0,21	0,25
S ф α-син / PGP 9.5	0,35	0,05	0,36	0,05	0,6	<0,001	0,54	0,002	-0,003	0,99	-0,24	0,19

Примечания: обозначения как в таблице 7.

Таким образом, распространенность включений ф-α-син значимо коррелировала с выраженностью моторных симптомов и немоторных проявлений, оцененных в тестах, включающих вопросы для определения автономной дисфункции, и не имела связи с немоторными симптомами, связанными с дисфункцией различных отделов ЦНС, ассоциированных с развитием аффективных и когнитивных нарушений, расстройств сна.

Наличие ЧМТ в анамнезе было взаимосвязано с содержанием ф-α-син, однако связь являлась слабой (точечно-бисериальный коэффициент корреляции, $r_{pb}=0,5$; $p=0,0048$ для относительной площади включений, расположенных вблизи ТГ, и $r_{pb}=0,54$; $p=0,0019$ для относительной площади включений, расположенных вблизи PGP 9.5) (таблица 9). Таким образом, для пациентов с наличием ЧМТ в анамнезе было преимущественно характерно более высокое содержание ф-α-син. Попарное сравнение подгрупп с наличием и отсутствием ЧМТ в анамнезе внутри группы пациентов с БП выявило значимые различия между ними (U тест Манна-Уитни, $p=0,01$ для сравнения отношений «включения/нервные волокна, окрашенные на PGP 9.5» в подгруппах, $p=0,015$ для сравнения отношений «включения/нервные волокна, окрашенные на ТГ» в подгруппах) (таблица 10). Связи между относительной площадью включений ф-α-син, курением,

физической активностью и историей хронического воздействия химических веществ в анамнезе не обнаружено (таблица 9). Парные сравнения в подгруппах также показали отсутствие различий между ними по наличию/отсутствию факторов курения, приверженности физической активности, истории взаимодействия с химическими веществами (таблица 10).

Таблица 9 – Взаимосвязь относительной площади включений ф- α -син с факторами риска и протекции у пациентов с БП.

	Факторы протекции				Факторы риска			
	Курение		Физическая активность		ЧМТ в анамнезе		Хроническое воздействие химических веществ	
	г _{рб}	р	г _{рб}	р	г _{рб}	р	г _{рб}	р
S ф-α-син / ТГ	0,07	0,69	0,005	0,98	0,5	0,0048	0,04	0,80
S ф-α-син / PGP 9.5	0,03	0,86	0,04	0,83	0,54	0,0019	0,05	0,79

Примечания: обозначения как в таблице 7.

Таблица 10 – Парное сравнение подгрупп пациентов с БП, разделенных по фактору наличия или отсутствия факторов риска или протекции.

		S ф-α-син / PGP 9.5	S ф-α-син / ТГ
ЧМТ в анамнезе	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]
	р	0,01	0,015
Курение	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]
	р	0,87	0,88
Физическая активность более 11 часов в неделю	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]
	р	0,90	0,97
Хроническое воздействие химических веществ	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]
	р	0,79	0,67

Примечания: обозначения как в таблице 7.

Таким образом, результаты корреляционного анализа показали, что распространенность включений ф- α -син значимо и положительно коррелирует с

показателями выраженности немоторных симптомов, которые среди других симптомов также оценивают степень дисфункции вегетативной нервной системы. Выявлена положительная связь с тяжестью двигательных расстройств, которая является причиной снижения повседневной активности. Выявлено, что высокое содержание ф- α -син слабо связано с наличием ЧМТ в анамнезе у пациентов с БП.

3.5. Иммуногистохимическая детекция ф- α -син в сопоставлении с результатами ТКС ЧС

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] см². В двух случаях (6,7%) результат был отрицательным (или не определенным): в 1 случае у обследуемого отсутствовало височное ультразвуковое окно, в другом – у 1 пациента с БП была отмечена нормальная эхогенность ЧС, не превышающая пороговых значений (0,18 см²).

Корреляционный анализ связи между значениями площади гиперэхогенности ЧС и относительной площади включений ф- α -син, расположенного рядом с ТГ, продемонстрировал отсутствие взаимосвязи ($R = -0,03$; $p = 0,88$). Связи между площадью гиперэхогенности и относительной площадью включений ф- α -син, расположенного вблизи RGP 9.5 также не обнаружено ($R = -0,07$; $p = 0,69$).

Для иллюстрации потенциала и взаимодополняемости методов ТКС ЧС и ИГХМ (с детекцией ф- α -син в слюнной железе) приводим два клинических случая БП: пациента Б.Л.Н с отсутствием гиперэхогенности ЧС и положительной иммуногистохимической реакцией, и пациента К.В.С. с положительными результатами ТКС ЧС и ИГХМ.

Клинический случай 1

Пациентка Б.Л.Н., 58 лет. Обратилась в ФГБНУ НЦН с жалобами на дрожание и скованность руки и стопы с правой стороны, боль и напряжение

мышц в дистальных отделах правой ноги, изменение почерка, ощущение беспокойства.

Анамнез заболевания: в возрасте 52 лет впервые отметила неловкость и дрожание в правой руке. Указанные симптомы при их появлении считала проявлениями «перенапряжения», в связи с чем в течение последующих 8 месяцев за медицинской помощью не обращалась. Из-за отрицательной динамики выраженности симптомов (усиление неловкости и скованности в руке) обратилась к неврологу областного центра, где был установлен диагноз БП (МКБ-10 G20), ригидно-дрожательная форма, Хен–Яр стадия 1. В ФГБНУ НЦН обратилась для прохождения ТКС ЧС с целью подтверждения диагноза и согласилась принять участие в настоящем исследовании.

Общий анамнез. Пациентка сообщает, что за 4–5 лет до развития двигательных нарушений отмечала снижение обоняния (до 3 баллов из 5, где 5 – выраженное снижение обоняния) и частые запоры. С указанными симптомами за консультацией к специалистам не обращалась.

Семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям не отягощен. Вредности (хроническое воздействие химических веществ, радиации и др.) и вредные привычки (в том числе, курение) отрицает. Физическая активность – до 2 ч в день (более 11 ч в неделю).

Сопутствующие заболевания: артериальная гипертония I степени, в анамнезе – сотрясение головного мозга (МКБ-10 S06.0) с потерей сознания.

Соматический статус: с момента постановки диагноза отмечает усиление запоров, развитие нарушений мочеиспускания (недержание), которые беспокоят и в настоящее время. В остальном соматический статус без особенностей.

Неврологический статус. В сознании, контактна, ориентирована правильно. Умеренная гипосмия. Легкая гипомимия и гипофония. Отмечается выраженная мышечная ригидность в правой руке, умеренное увеличение мышечного тонуса по пластическому типу в правой ноге. Снижение амплитуды и скорости движений в двигательных пробах в правой руке и ноге. Непостоянный тремор покоя в правой кисти и стопе амплитудой около 1 см. Сухожильные рефлексy живые,

более выраженные с правой стороны. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно. В пробах Ромберга и Тевернара устойчива. Чувствительных нарушений нет. Отмечается замедление темпа ходьбы, правосторонний ахейрокинез.

Тестирование по опросникам и шкалам. MDS-UPDRS: MDS-UPDRS I – 14 баллов; MDS-UPDRS II – 12 баллов; MDS-UPDRS III – 25 баллов; MDS-UPDRS IV – 0 баллов; NMSS – 52 балла (выраженные немоторные симптомы); NMSQ – 25 баллов (выраженные немоторные симптомы); RBDSQ – 3 балла (отсутствие нарушений сна); PDQ-8-SI – 59,375% (снижение качества жизни); HADS тревога – 10 баллов (субклиническая тревога); HADS депрессия – 5 баллов (отсутствие депрессии); МОСА – 28 баллов (нормальное состояние когнитивных функций).

Результаты ТКС ЧС: ширина правого бокового желудочка 17,4 мм, левого – 16,7 мм, ширина третьего желудочка – 3,1 мм. Гиперэхогенности ЧС в области ножек среднего мозга с двух сторон не выявлено (рисунок 12 А).

Результаты исследования ф-α-син в подъязычной слюнной железе: выявляется положительная иммуногистохимическая реакция на ф-α-син. Отношение «включения ф-α-син /нервные волокна, окрашенные на РGP 9.5» – 0,039, что выше порогового значения. Отношение «включения ф-α-син/нервные волокна, окрашенных на ТГ», составило 0,006 – выше порогового значения (рисунок 12 Б, В).

Таким образом, у пациентки с клинически установленным диагнозом БП, в пользу которого свидетельствует наличие классических моторных и немоторных симптомов (запоры, нарушения мочеиспускания, тревога), обнаружена положительная иммуногистохимическая реакция на ф-α-син в нервных волокнах подъязычной слюнной железы, что позволяет подтвердить клинический диагноз. Значения относительной площади ф-α-син у данной пациентки, которые достигают значений чуть выше среднего по выборке в нашем исследовании, сопоставимы с выраженными немоторными нарушениями по результатам шкал и опросников (NMSQ, NMSS).

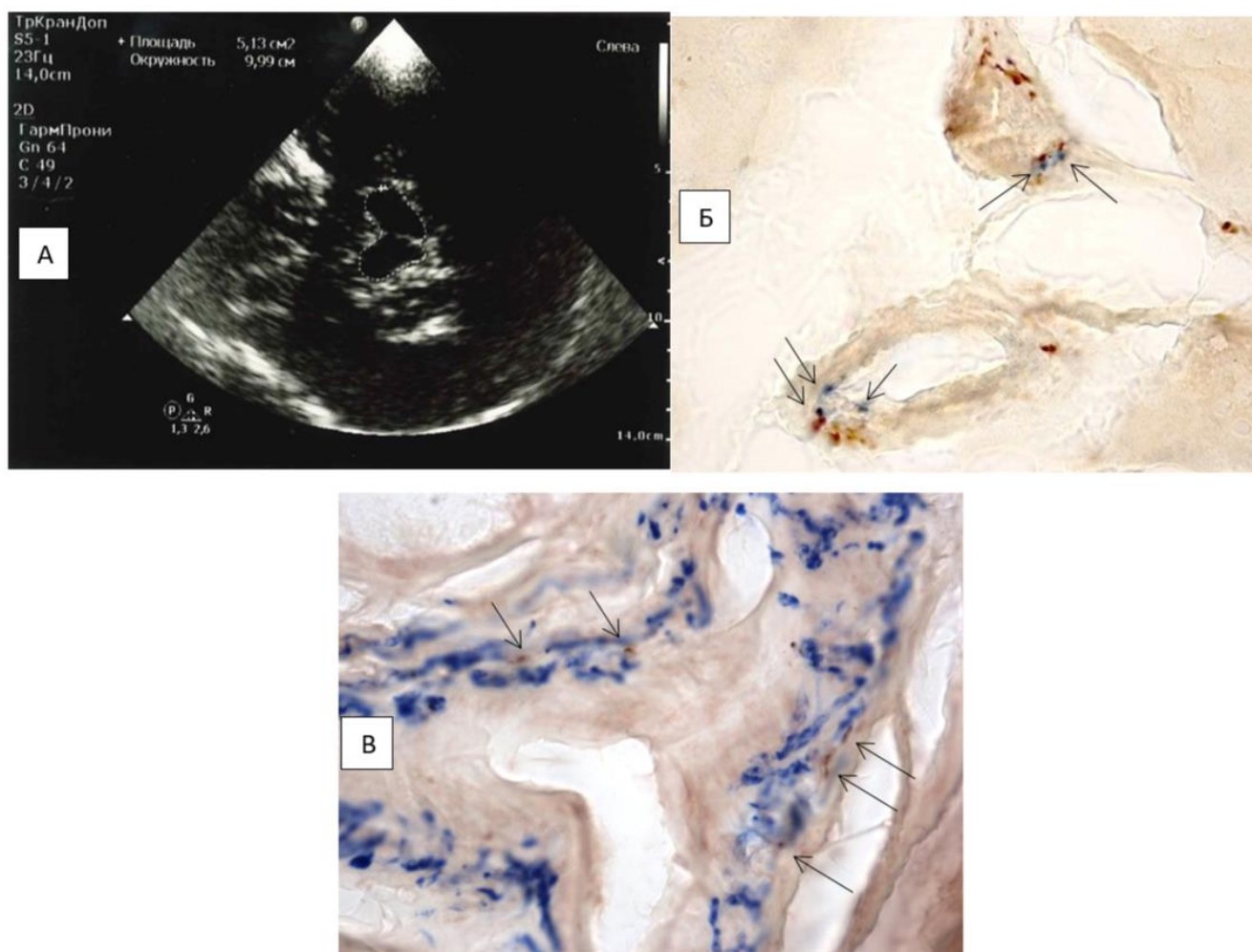


Рисунок 12 – Результаты использования ИГХМ (ф-α-син) и ТКС ЧС у пациентки Б.Л.Н.

А – отсутствие гиперэхогенности ЧС. Б – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, синие включения, отмечены стрелками) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, коричневое окрашивание нервных волокон) (ув. объектива x100). В – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, коричневые включения, отмечены стрелками) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон) (ув. объектива x100).

Клинический случай 2

Пациент К.В.С., 61 год. Обратился в ФГБНУ НЦН с жалобами на скованность и замедленность движений в левой руке и ноге, правой руке, а также нарушения сна, запоры, снижение обоняния.

Анамнез заболевания. В возрасте 55 лет впервые отметил скованность и замедленность в левой руке. Указанные симптомы в течение двух лет считал

проявлениями остеохондроза. После присоединения скованности в ноге, шаркающей походки и снижения громкости голоса пациент обратился за консультацией к неврологу в амбулаторно-поликлиническое учреждение, где был установлен диагноз БП (МКБ-10 G20), акинетико-ригидная форма, Хен-Яр 2 стадия.

Общий анамнез: нарушения стула отметил за 8-10 лет до появления двигательных нарушений, с данной проблемой к специалисту не обращался.

Семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям не отягощен. Вредности (хроническое воздействие химических веществ, радиации и др.) вредные привычки отрицает. Физическая активность – до 1 ч в день. Травмы головы отрицает.

Сопутствующие заболевания: артериальная гипертония II степени, сахарный диабет 2 типа.

Соматический статус: с момента постановки диагноза отмечает усиление запоров. В остальном соматический статус без особенностей.

Неврологический статус. В сознании, контактен, ориентирован правильно. Гипосмия. Умеренная гипофония и гипомимия. Выраженное увеличение мышечного тонуса по пластическому типу в левой ноге и руке, умеренно выраженное – в правой руке. Уменьшение амплитуды и скорости движений в двигательных пробах в левой руке и ноге, менее выражено – в правой руке. Тремора нет. Сухожильные рефлексy живые, повышенные с левой стороны и в правой руке. Координаторные пробы выполняет удовлетворительно. В пробах Ромберга и Тевернара устойчив. Замедленный темп ходьбы, левосторонний ахейрокинез, подволакивание левой ноги.

Тестирование по опросникам и шкалам. MDS-UPDRS: MDS-UPDRS I – 5 баллов, MDS-UPDRS II – 5 баллов, MDS-UPDRS III – 31 баллов, MDS-UPDRS IV – 0 баллов; NMSS – 40 баллов (умеренные немоторные симптомы); NMSQ – 8 баллов (легкие немоторные симптомы); RBDSQ – 6 баллов (нарушения REM-фазы сна); PDQ-8-SI – 3,125% (небольшое снижение качества жизни); HADS

тревога – 0 баллов (отсутствие тревоги); HADS депрессия – 0 баллов (отсутствие депрессии); МОСА – 27 баллов (легкие когнитивные нарушения).

Результаты ТКС ЧС: ширина правого бокового желудочка 20,0 мм, левого – 20,1 мм, ширина третьего желудочка 8,4 мм. Гиперэхогенность ЧС: площадь эхогенного сигнала слева – 0,31 см², справа – 0,27 см² (рисунок 13 А).

Результаты исследования ф-α-син в слюнной железе: выявляется положительная иммуногистохимическая реакция на ф-α-син. Отношение «включения/нервные волокна, окрашенные на РGP 9.5» – 0,041, что выше порогового значения. Отношение «включения/нервные волокна, окрашенные на ТГ», составляет 0,007 – выше порогового значения (рисунок 13 Б, В).

Таким образом, в данном случае клинический диагноз БП с классическими моторными и немоторными (запор, гипосмия) признаками подтверждается положительными результатами как ИГХМ (реакция на ф-α-син), так и ТКС ЧС.

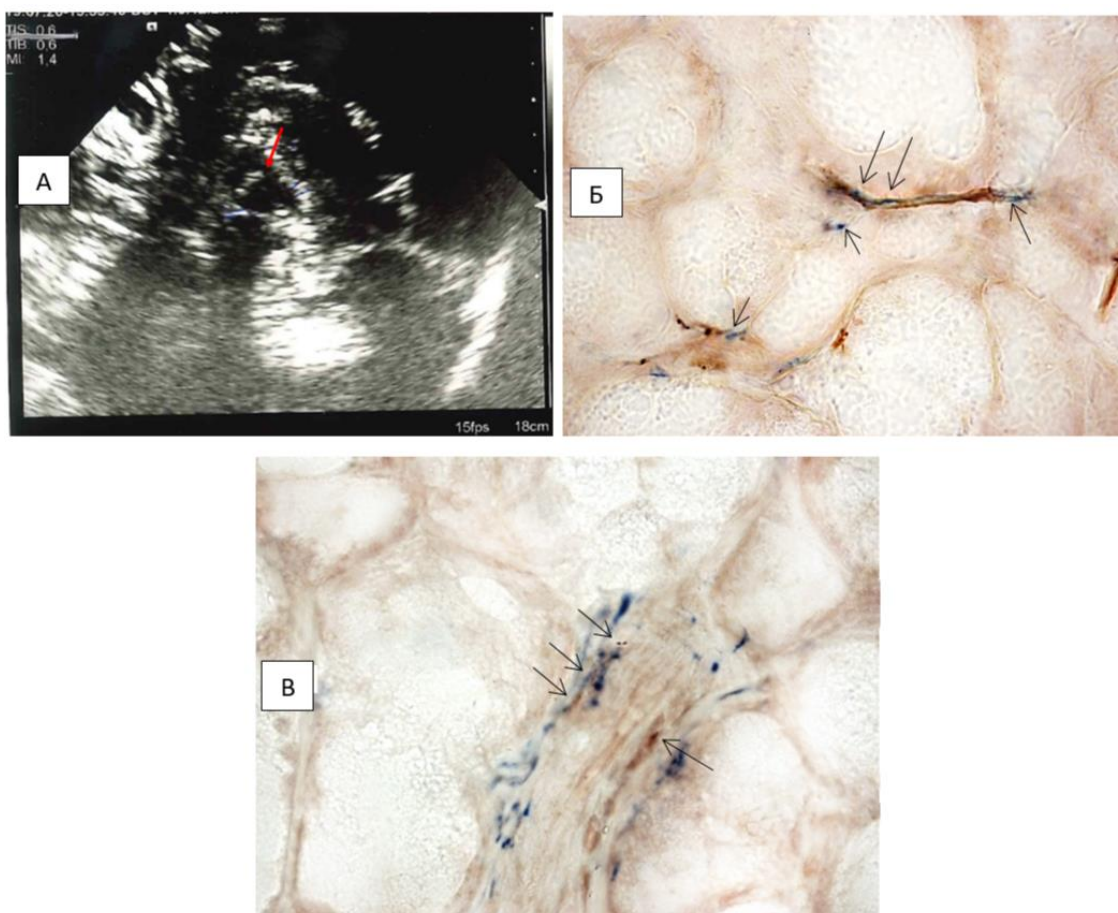


Рисунок 13 – Результаты использования ИГХМ (ф-α-син) и ТКС ЧС у пациента К.В.С.

А – гиперэхогенность ЧС (площадь эхогенного сигнала 0,31 см², указано стрелкой). Б – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, синие включения, отмечены стрелками) и тирозингидроксилазе (положительная реакция, коричневое окрашивание нервных волокон) (ув. объектива x100). В – иммуноферментное окрашивание антителами к ф-α-син (положительная реакция, коричневые включения, отмечены стрелками) и PGP 9.5 (положительная реакция, синее окрашивание нервных волокон) (ув. объектива x100).

3.6. Алгоритм применения ИГХМ с определением ф-α-синуклеина в материале слюнной железы как диагностического биомаркера БП

Результаты исследования продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность ИГХМ для детекции ф-α-син, расположенного 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 несколькими опросниками и шкалами выраженности немоторных функций (в особенности, оценивающими автономную дисрегуляцию), имеются основания ожидать высокую вероятность обнаружения агрегатов ф-α-син не только у пациентов на 1-3 стадии по шкале 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 корреляционного анализа с распространенностью включений ф-α-син. Значимых различий в результатах при использовании маркеров нервных волокон – ТГ и PGP 9.5 – не получено, в связи с чем при практическом применении метода в будущем может быть использовано окрашивание антителами к любому из двух предложенных маркеров.

Результатом диагностического исследования может считаться визуальная оценка наличия включений ф- α -син, расположенного рядом с маркером нервных волокон и рассчитанное при морфометрии значение отношения площади включений к площади нервных волокон. Согласно результатам работы, пороговое значение отношения «включения/нервные волокна» для исследования с антителами к PGP 9.5 в качестве маркера нервных волокон составило 0,00002, для исследования с антителами к ТГ – 0,000004.

Предлагаемый нами алгоритм проведения диагностического иммуногистохимического исследования ф- α -син в материале подязычной слюнной железы представлен на рисунке 14.

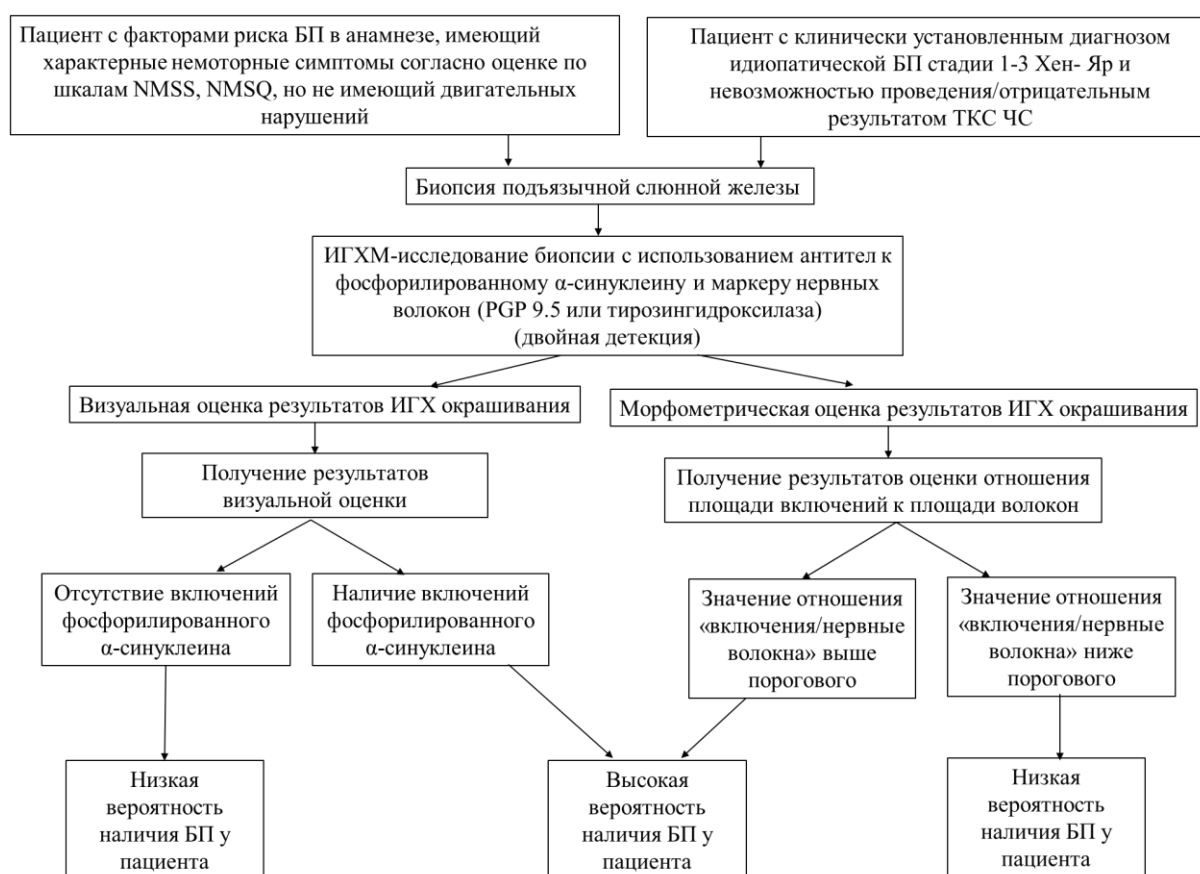


Рисунок 14 – Алгоритм проведения диагностического иммуногистохимического исследования ф- α -син в материале подязычной слюнной железы и интерпретации получаемых результатов.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенная работа была направлена на исследование возможности использования ИГХМ-детекции маркера БП – ф- α -син – в нервных волокнах крупной подъязычной слюнной железы как органа с обильной периферической иннервацией. Оценивалась возможность применения данной технологии в качестве диагностического метода выявления БП.

В исследовании, в соответствии с критериями включения, приняли участие пациенты с клинически установленным диагнозом БП старше 40 лет с медианным значением стадии 2 [2; 2,5] по Хен–Яру, составившие основную группу, а также лица, не имеющие клинических признаков нейродегенеративных заболеваний, которые были включены в контрольную группу. Нижняя граница в возрасте для пациентов с БП была установлена в соответствии с литературными данными о наибольшей распространенности идиопатической БП именно в этой возрастной группе, а также для исключения пациентов с ранними и моногенными вариантами заболевания [112, 125]. Для пациентов с БП проводилось специализированное тестирование с помощью шкал и опросников выраженности немоторных (NMSS, NMSQ, MOCA, RBDSQ, HADS, MDS-UPDRS I) и моторных нарушений (MDS-UPDRS III), повседневной активности (MDS-UPDRS II), качества жизни по опроснику PDQ-8-SI. Клиническая оценка немоторных и моторных симптомов у пациентов с БП при помощи специализированных шкал/опросников – NMSS, NMSQ, MDS-UPDRS, MOCA, RBDSQ, HADS, PDQ-8-SI, шкала Хен–Яра – продемонстрировала наличие выраженных немоторных симптомов, двигательных нарушений, умеренного снижения качества жизни, отсутствие расстройств сна, тревоги и депрессии. Средний балл по NMSQ у пациентов с БП соответствовал умеренной степени нарушения немоторной функции, в то время как балл по шкале NMSS характеризовал выраженность немоторных нарушений как тяжелую. Более легкая степень немоторных симптомов в NMSQ, по сравнению с NMSS могла быть связана с различиями между субъективной оценкой своего состояния

пациентом и объективной оценкой специалистом. У пациентов с БП отсутствовали когнитивные нарушения, тревога, депрессия и расстройства сна.

Всем пациентам с БП проводилась ТКС ЧС. Всем участникам исследования челюстно-лицевым хирургом проводилась биопсия подъязычной слюнной железы с последующим иммуногистохимическим исследованием наличия маркера БП – ф- α -син, расположенного рядом с одним из двух маркеров нервных волокон – PGP 9.5 или ТГ. Участники контрольной группы проходили биопсию в соответствии с показаниями по основному заболеванию, связанному с патологией подъязычной слюнной железы. После иммуногистохимического окрашивания проводилась автоматизированная морфометрическая обработка результатов. Полученные в ходе морфометрии значения отношения площади ф- α -син к площади нервных волокон в дальнейшем были проанализированы на предмет наличия корреляции с данными, полученными при оценке состояния пациентов с БП при помощи шкал и опросников, длительностью и стадией заболевания, факторами риска и протекции, а также значениями площади гиперэхогенности ЧС, определенными при ТКС.

Разработка диагностических методов для определения БП на ранних стадиях, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью является актуальной задачей. Одним из перспективных маркеров заболевания, который может быть использован в качестве объекта для диагностического исследования является патологически модифицированный ф- α -син – ключевой фактор патогенеза БП, присутствие которого было обнаружено не только в нервной ткани ЦНС, но и в нервных волокнах ПНС.

Предпосылками к рассмотрению ИГХМ для детекции ф- α -син в качестве диагностического стали работы Н. Braak и С. Hawkes, продемонстрировавшие первичное формирование синуклеиновых агрегатов в каудальных отделах ЦНС и ПНС с последующим их прионоподобным распространением в ЦНС [36, 82]. Таким образом, было выдвинуто предположение, что у пациентов с БП на ранних, премоторных стадиях возможно обнаружение синуклеиновых агрегатов в

нервных волокнах в составе различных органов с обильной периферической иннервацией.

Подтверждение данному предположению было получено в результате аутопсийных исследований Beach T.G. и Del Tredici K. по детекции ф- α -син в различных органах с помощью ИГХМ, а затем и прижизненных исследований биопсий пациентов с БП, в которых было продемонстрировано наличие агрегатов в органах желудочно-кишечного тракта (особенно – в слюнных железах) [32, 61]. Именно исследование слюнных желез по результатам исследований оказалось наиболее оптимальным по соотношению показателей чувствительности, специфичности, доступности для изучения и безопасности. В последних мета-анализах чувствительность ИГХМ с использованием биоптатов слюнных желез в качестве материала была на уровне 70%, а специфичность превышала 95% [21, 159]. В результате, метод иммуногистохимической детекции ф- α -син в материале слюнных желез был отмечен как перспективный по данным публикации MDS 2019 года [85].

Протокол исследований в ранее проведенных работах включал в себя, как правило, изучение очень малого объема биоптатов слюнных желез, вследствие чего максимальная чувствительность метода в большинстве работ составляла менее 50% [71]. Основными факторами снижения чувствительности в работах выступали: случайный забор ткани других структур, окружающих слюнные железы, отсутствие предварительного тестирования протокола реакции, а также малый объем исследованного материала [25, 162].

Настоящая работа, в отличие от ранее проведенных исследований с меньшими результатами чувствительности и специфичности, включала в себя изучение достаточного объема биопсийного материала, что явилось одним из факторов повышения чувствительности. Другим фактором стало использование отработанного в лаборатории нейроморфологии ФГБНУ НЦН протокола иммуногистохимической реакции по выявлению ф- α -син, который продемонстрировал убедительные результаты при оценке материала отдельных пациентов с БП [22]. В настоящей работе впервые на материале, полученном от 60

участников исследования (самая большая выборка пациентов с БП и лиц без БП, когда-либо участвовавших в подобных исследованиях в стране) данный протокол был успешно протестирован и многократно воспроизведен. В каждом рассмотренном случае у пациентов с БП использованный протокол приводил к положительному результату с высокой выявляемостью ф- α -син. Важной особенностью использованного в исследовании ИГХМ-протокола является применение метода двойной детекции – ф- α -син и нервных волокон, окрашенных антителами к неспецифическому общеаксональному маркеру PGP 9.5 и специфическому для катехоламинергических волокон маркеру ТГ. Основным преимуществом двойной детекции, по сравнению с детекцией только ф- α -син без учета его локализации относительно нервных волокон, является значительное снижение вероятности ошибочного обнаружения неспецифических структур в качестве искомого маркера.

Только у 1 участника группы контроля (Г.А.С., мужчина, 48 лет) ф- α -син, расположенный рядом с маркерами нервных волокон, был обнаружен визуально и при проведении морфометрического анализа. Результаты визуальной оценки подтверждались данными морфометрического анализа – площадь включений ф- α -син и отношение «включения/нервные волокна» у этого участника были хотя и несколько меньшими, чем таковые у пациентов основной группы, но все же сопоставимыми с ними. В то же время, значения площади включений и отношения «включения/нервные волокна» были в тысячи раз большими, чем у остальных участников группы контроля, что подтверждало иную природу этих структур у Г.А.С. по сравнению с таковыми в группе контроля. С учетом выраженного различия значений площадей включений и отношений «включения/нервные волокна» между 29 участниками контрольной группы и пациентами с верифицированным клиническим диагнозом БП, а также с участником Г.А.С. с положительным результатом, можно со значительной долей вероятности судить о том, что у данного участника действительно были выявлены включения ф- α -син. У Г.А.С. отсутствовал семейный анамнез по нейродегенеративным заболеваниям, а также признаки ранней стадии БП или

других нейродегенеративных заболеваний. Выявление у Г.А.С. включений ф- α -син может являться следствием наличия у него вероятности развития нейродегенеративного заболевания в будущем, или быть иллюстрацией редкого (не превышающего 4% по данным литературы) выявления ф- α -син у здорового лица [70]. Несомненно, для подтверждения или опровержения этих предположений в дальнейшем необходимо продолжительное динамическое наблюдение за этим участником.

Достаточный объем биопсийного материала, использование метода двойной детекции, а также разработка, унификация и воспроизведение одного протокола способствовали получению высокого 100-процентного значения чувствительности в нашем исследовании. Аналогичные высокие значения чувствительности, равные 100%, к настоящему времени описаны в двух исследованиях с иммуногистохимической детекцией патологического α -син в слюнных железах [43, 107]. Тем не менее, полученные результаты требуют дальнейшей валидации на большей выборке пациентов с разными стадиями заболевания. К тому же, сохранение части полученного биопсийного материала в архиве позволило создать основу для формирования биобанка материала, который может использоваться в будущих исследованиях.

Результаты оценки локализации и формы включений ф- α -син, полученные в нашей работе, согласовываются с предыдущими иммуногистохимическими исследованиями по обнаружению агрегатов в ткани слюнных желез у пациентов с БП [24, 32, 44, 61]. Агрегаты имели глобулярную или фибриллярную форму, интенсивно окрашивались антителами к ф- α -син и были расположены рядом с маркерами нервных волокон, что подтверждало природу визуализируемых включений. Нервные волокна и, соответственно, включения ф- α -син располагались в составе междольковой соединительной ткани, по периметру внутри- и междольковых протоков и между ацинусами подъязычной слюнной железы. В других исследованиях включения ф- α -син также имели вид фибриллярных или глобулярных структур, расположенных в непосредственной

близости от нервных волокон в составе соединительнотканых перегородок и вокруг протоков слюнных желез [43, 75, 88, 162].

Включения ф- α -син были достаточно специфичны для пациентов с БП. Величина специфичности, отражающая способность метода дифференцировать лиц без нейродегенеративных заболеваний и пациентов с БП, полученная в данном исследовании (96,67%), в целом согласовывается с результатами двух мета-анализов [21, 159]. Объединенная специфичность ИГХМ-детекции ф- α -син в них была равной 96% и 98%, что в очередной раз подтверждает высокую дискриминационную значимость метода исследования маркера заболевания в составе слюнных желез.

Безопасность в данном исследовании также была высокой, что во многом явилось результатом участия в работе квалифицированного челюстно-лицевого хирурга из крупного областного центра. Локальная болезненность в первые сутки после биопсии была характерна для 10 участников из 60 (16,6%) и купировалась приемом нестероидных противовоспалительных средств. Отдаленных нежелательных явлений в течение 12 месяцев у участников не отмечено. В целом, безопасность исследования в нашей работе была сопоставима с другими похожими исследованиями. В части работ развитие побочных эффектов после биопсии и вовсе не было отмечено [22, 24, 43, 110]. В мета-анализе 15 публикаций показано возникновение преходящих НЯ легкой степени тяжести в первые дни после биопсии только у 14,8% пациентов из более чем 500 участников исследований и отсутствие отдаленных НЯ [21].

В ранее проведенных исследованиях (за исключением работы Carletti R. и соав., где была использована морфометрия в программе ImageJ (Wayne Rasband, США)) анализ результатов проводился только на основании визуальной экспертной оценки с качественным описанием наличия/отсутствия ф- α -син без анализа степени распространенности включений или с полуколичественной оценкой выраженности накопления агрегатов по 4- и 5-балльной условной шкале [43]. В проведенном нами исследовании была впервые применена количественная и, в значимой степени, автоматизированная морфометрическая оценка

результатов иммуногистохимической реакции в материале подъязычной слюнной железы в группах пациентов с БП и контроля. Полученные результаты послужили основанием для определения пороговых значений распространенности ф- α -син для каждого типа иммуногистохимической реакции (0,00002 для реакции с антителами к RGP 9.5 и 0,000004 для реакции с антителами к ТГ), позволяющих, в дополнение к визуализационной экспертной оценке, проводить дифференциальную диагностику пациентов с БП и лиц без БП. Таким образом, преимуществами количественной автоматизированной морфометрической оценки являются: снижение субъективности в интерпретации, ускорение процесса обработки результатов и получение количественного значения, позволяющего оценить распространенность маркера заболевания.

Несмотря на то, что в данном исследовании в основной группе принимали участие пациенты с уже установленным клиническим диагнозом БП и двигательными нарушениями (медианное значение стадии болезни по шкале Хен–Яр – 2 [2; 2,5]), наличие значимых корреляций между содержанием ф- α -син и выраженностью немоторных признаков, которые в большинстве случаев предшествуют моторным симптомам, позволяет говорить о том, что ф- α -син как биомаркер может иметь определенный потенциал для выявления доклинической стадии БП, однако для подтверждения такого предположения требуются дополнительные исследования. Данное заключение также согласовывается с общими принципами теории Н. Braak и С. Hawkes о первичном формировании синуклеиновых агрегатов в ПНС [34, 36, 82].

В результате проведенного исследования нами был предложен алгоритм применения метода ИГХМ-детекции ф- α -син в материале подъязычной слюнной железы у пациентов с БП с немоторными симптомами, оцененными по специализированным шкалам/опросникам (NMSS и NMSQ). Благодаря высокой чувствительности и специфичности детекции ф- α -син с помощью ИГХМ, имеются все основания предполагать, что для суждения о наличии или отсутствии заболевания у пациента в случае перехода метода в рутинную практику в

будущем не потребуется анализ большого количества срезов с материала в каждом случае, что значительно упростит воспроизведение метода.

Согласно настоящему исследованию, фактором риска, который, по-видимому, позволит дополнительно заподозрить раннюю стадию БП в сочетании с клиническими немоторными признаками, может являться ЧМТ в анамнезе, что было определено на основании обнаружения положительной, хотя и слабой, корреляции с распространенностью агрегатов ф- α -син, наличия значимых различий между пациентами основной группы с БП и лицами контрольной группы ($p=0,0015$), а также значимых различий между подгруппами пациентов с БП с наличием и отсутствием ЧМТ в анамнезе ($p<0,05$). Взаимосвязь между содержанием ф- α -син и ЧМТ в анамнезе, вероятно, связана с выраженными процессами нейровоспаления у пациентов после перенесенной ЧМТ, которые могут являться триггерами для выраженной агрегации α -син [62, 142, 161]. Эти данные согласовываются с результатами ранее опубликованных работ по теме изучения факторов риска БП [62, 85, 136].

Для оценки возможной прогностической значимости содержания ф- α -син в работе была проведена оценка взаимосвязи выраженности накопления агрегатов с клиническими данными пациентов. Показана значимая положительная умеренная корреляция содержания ф- α -син с результатами шкалы NMSS и опросника NMSQ. Необходимо отметить, что оба теста включают в себя вопросы, касающиеся определения выраженности вегетативной дисфункции у пациента [49, 50]. В шкале NMSS, которая демонстрирует оценку состояния пациента специалистом, содержится 9 таких вопросов из 30 (30%), в опроснике NMSQ, отражающем субъективную самооценку пациентом – 10 вопросов из 30 (33,3%).

Показана значимая связь содержания ф- α -син умеренной и слабой силы с тремя подшкалами шкалы MDS-UPDRS – немоторной подшкалой MDS-UPDRS I (слабая связь), подшкалой оценки повседневной активности MDS-UPDRS II (связь средней силы) и моторной подшкалой MDS-UPDRS III (связь средней силы) ($p<0,05$ для всех сравнений подшкал с распространенностью включений).

Важно отметить, что немоторная подшкала MDS-UPDRS I содержит 3 вопроса (23,07%) из 13 по признакам автономных нарушений [79].

Учитывая, что тесты NMSS, NMSQ и MDS-UPDRS I отражают степень выраженности немоторных нарушений и включают в себя оценку симптомов автономной дисфункции, найденная взаимосвязь с результатами этих шкал/опросников значительно повышает вероятность обнаружения ф- α -син в ПНС у пациентов на раннем этапе БП, когда клиническая картина заболевания представлена разнообразными немоторными симптомами, связанными с автономной дисфункцией. По данным исследования с участием 100 пациентов, немоторные симптомы автономной дисфункции часто встречаются при БП на ранней стадии, при этом самыми распространенными признаками являются: никтурия (63%), гипотензия с головокружением (63%), констипация (61%), сиалорея (46%), недержание мочи (45%), потливость (21%) [135].

Наличие корреляции между оценкой моторных функций по MDS-UPDRS III, немоторными симптомами и содержанием агрегатов согласовывается с данными исследований по ИГХМ-детекции ф- α -син в биоптатах кожи [78, 102]. В работе Gibbons С.Н. и соав. с участием 29 пациентов с БП была показана корреляция между отношением «включения α -син/нервные волокна», полученным при оценке кожных биопсий, и выраженностью немоторных симптомов, таких как констипация ($R=0,74$; $p<0,001$), мочеполовая дисфункция ($p<0,01$) и потливость ($R=0,62$; $p<0,01$), а также с результатами MDS-UPDRS III ($R=0,49$; $p<0,001$) [78]. Lee J.M. и соав. продемонстрировали наличие связи между отношением «включения ф- α -син/нервные волокна» и результатами теста для оценки автономных функций при изучении биопсии кожи ($R=0,42-0,47$, $p<0,01$) [102].

Литературные данные о связи между тяжестью немоторных и моторных нарушений при БП, в сочетании с нашими результатами по анализу корреляции между содержанием агрегатов, выраженностью немоторных симптомов автономной дисфункции и моторных симптомов, позволяют говорить о том, что большие значения отношений площади включений к площади волокон на ранней стадии БП могут являться предикторами более неблагоприятного течения

заболевания [51, 54]. Учитывая информацию об особенностях течения заболевания у пациента с БП, полученную по результатам ИГХМ-детекции ф- α -син, клиницист будет иметь возможность своевременного назначения наиболее подходящей терапии. Тем не менее, для окончательного суждения о предикторной значимости метода необходимо проведение дальнейших исследований, включающих длительное наблюдение за участниками и динамическую оценку изменений распространенности синуклеиновых агрегатов у пациентов на фоне разных терапевтических схем.

Взаимосвязи между распространенностью ф- α -син и результатами оценки по шкалам MOCA, RBDSQ, HADS не обнаружено. Отсутствие взаимосвязи с данными немоторными симптомами (когнитивными нарушениями, расстройством сна и аффективными нарушениями – тревогой и депрессией) может быть объяснено их центральным генезом, не связанным напрямую с дисфункцией ПНС, отражением которой является присутствие синуклеиновых агрегатов в нервных волокнах слюнной железы. Возможность сопоставить полученные данные с другими работами по изучению взаимосвязи параметров шкал RBDSQ, HADS и MOCA с распространенностью ф- α -син в тканях с обильной периферической иннервацией ограничена в связи с отсутствием публикаций по данной теме в настоящее время.

В нашем исследовании показано отсутствие корреляции между результатами оценки качества жизни по опроснику PDQ-8-SI и распространенностью агрегатов ф- α -син. Это может быть связано с высокой субъективностью восприятия качества жизни, на которую влияют не только немоторные симптомы вследствие автономной дисрегуляции и двигательные нарушения, но также когнитивная дисфункция и аффективные расстройства, которые напрямую не связаны с накоплением ф- α -син в ПНС [92, 152].

Отсутствие корреляции результатов ИГХМ-детекции ф- α -син с длительностью заболевания в нашей работе согласовывается с результатами сходного исследования на биоптатах кожи и может являться отражением существования различий в динамике развития патологических процессов при БП

(в том числе – накопления агрегатов ф- α -син) и, соответственно, скорости течения заболевания у разных пациентов [102].

В отличие от работы Wang N. и соав. по изучению биоптатов кожи, в нашем исследовании не было показано корреляции между распространенностью агрегатов ф- α -син и стадией заболевания по функциональной шкале Хен–Яра, что может быть связано с бóльшей однородностью выборки в нашем исследовании [78, 166]. Отметим, что большинство пациентов в настоящей работе имели 2 стадию по Хен–Яру.

Широкая доступность ТКС ЧС послужила предпосылкой к выбору данного метода для сравнения получаемых диагностических результатов (выявление гиперэхогенности ЧС) с ИГХМ-детекцией ф- α -син в подъязычной слюнной железе у пациентов с БП. Гиперэхогенность ЧС была обнаружена у 28 пациентов основной группы; таким образом, чувствительность ТКС ЧС в нашем исследовании составила 93,3%. Полученное значение несколько больше описанных в литературе, в том числе, показанных в проведенном мета-анализе (объединенная чувствительность 84%) [153]. Указанное расхождение может быть объяснено различием в объеме выборки в нашем исследовании и в мета-анализе, проведенном по результатам анализа 39 работ с общим количеством участников более 3000 человек [153].

Совпадение результатов ИГХМ-детекции ф- α -син и ТКС ЧС в нашем исследовании было высоким – у 28 пациентов из 30 (93,3%) клинически установленный диагноз БП был подтвержден в результате использования обоих диагностических подходов. В отдельных клинических случаях, как показано нами, выявление ф- α -син в биоптате слюнной железы может оказаться весьма полезным диагностическим маркером БП у пациентов с отсутствием феномена гиперэхогенности ЧС по данным ТКС или отсутствием височного ультразвукового окна. Это представляется важным с практической точки зрения, поскольку по данным литературы не менее чем у 15-20% пациентов с БП может по разным причинам иметь место нормальная эхогенность ЧС или проведение ТКС невозможно из-за отсутствия ультразвукового окна [10]. Наш опыт позволил

обосновать возможность применения метода ИГХМ-детекции ф- α -син в материале подъязычной слюнной железы для верификации БП на любой из исследованных стадий (т.е. 1-3 стадии по Хен–Яру с преимущественной долей пациентов со стадией 2) при отсутствии подтверждения диагноза с помощью нейровизуализации. В нашем исследовании доля таких пациентов составила 6,7%.

По результатам проведенного корреляционного анализа не получено данных о наличии связи между величиной гиперэхогенности ЧС и содержанием ф- α -син в нервных волокнах подъязычной слюнной железы. В доступной литературе подобные исследования не представлены. Отсутствие корреляции между результатами оценки площади гиперэхогенности ЧС и распространенности ф- α -син может быть связано с различиями в выраженности многообразных патологических процессов в ПНС и ЦНС, в том числе нейровоспаления и накопления патологических форм α -син, что также согласовывается с теорией Н. Braak [36, 176].

Итак, в данной работе предложен и протестирован протокол, основанный на иммуногистохимической и автоматизированной морфометрической оценке распространённости ф- α -син на биопсийном материале подъязычной слюнной железы, для дальнейшего использования в качестве дополнительного метода диагностики БП; впервые применен подход к автоматизированной морфометрической оценке распространенности ф- α -син в составе слюнных желез у пациентов с БП и определено пороговое значение его содержания для дифференциации лиц без БП и пациентов с БП. Впервые в мире у пациентов с БП проведено исследование взаимосвязи выраженности различных моторных и немоторных симптомов, а также данных ТКС ЧС с содержанием ф- α -син в биопсийном материале слюнной железы, что имеет как фундаментальное, так и прикладное значение.

Результаты настоящего исследования (статистически значимая взаимосвязь показателей ИГХМ с немоторными симптомами автономной дисфункции у пациентов с БП, а также выявление положительной реакции на ф- α -син у одного участника из группы контроля без признаков нейродегенеративного заболевания)

дают основания для постановки вопроса о возможности использования данного биомаркера с прогностической целью – т.е. у лиц, находящихся на ранней, премоторной стадии нейродегенеративного процесса. Однако данная гипотеза требует соответствующего подтверждения в дальнейших исследованиях с большей выборкой пациентов на разных, в том числе премоторных, стадиях заболевания и с длительным динамическим наблюдением за участниками.

Согласно полученным данным, бóльшее значение отношения «включения/нервные волокна» связано с большей степенью выраженности немоторных симптомов (особенно тех, что связаны с автономной дисрегуляцией) и моторных нарушений (вследствие наличия корреляции с MDS-UPDRS III) у пациентов с БП. В связи с этим, при наличии данных о распространенности синуклеинового поражения в волокнах ПНС в сочетании с результатами клинической оценки состояния пациента в дальнейшем возможно косвенно судить о степени поражения нервной системы и вероятности неблагоприятного течения БП.

Новый диагностический метод способен восполнить недостаточность способов диагностики БП у пациентов с идиопатической БП. Метод ИГХМ-детекции ф- α -син в материале подъязычной слюнной железы может выступать в роли дополнительного для верификации клинически установленного диагноза на любой из исследованных стадий (т.е. 1-3 стадии по Хен–Яру) при отсутствии возможности проведения ТКС ЧС или при отсутствии выявления гиперэхогенности у пациента с клиническими признаками БП. Своевременная диагностика БП, в свою очередь, позволит раньше начать клиническое наблюдение за пациентом и определить тактику лечения.

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало диагностическую значимость метода иммуногистохимической детекции ф- α -син в периферических нервных волокнах в составе крупной подъязычной слюнной железы. Исследованный метод может быть использован для верификации установленного клинического диагноза идиопатической БП. Определение ф- α -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 иммуногистохимической реакции и возможность применения автоматизированного морфометрического анализа результатов, 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 α -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 α -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 α -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 α -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- α -синуклеина) и транскраниальной сонографии (определение гиперэхогенности черной субстанции). Разработан алгоритм использования детекции фосфорилированного α -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 α -синуклеин и нейрональные маркеры (тирозингидроксилазу или PGP 9.5) с последующей автоматизированной морфометрической обработкой результатов.

2. Детекция фосфорилированного α -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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронков, Д.Н. Локализация общего и фосфорилированного α -синуклеина в периферической нервной системе интактных крыс (тестирование антител разных клонов) / Д.Н. Воронков, О.В. Сальникова, Р.М. Худоерков // Биомедицина. – 2018. – №2. – С. 22-32.
2. Гуменюк, И.С. Автоматизированный морфометрический анализ как метод определения содержания компонентов внеклеточного матрикса и количественной оценки ядерных антигенов / И.С. Гуменюк, Л.М. Чуприненко, А.С. Сотниченко и соав. // Архив Патологии. – 2017. – Т.79. – №5. – С.49–56.
3. Иванов, М.В. Моделирование моторных и немоторных проявлений ранней стадии болезни Паркинсона / М.В. Иванов, К.А. Кутукова // Анналы Клинической и Экспериментальной Неврологии. – 2022. – Т.16. – №2. – С.50-57.
4. Иванов, М.В. Морфохимические изменения в нервной системе тонкого кишечника крыс при длительном пероральном введении ротенона / М.В. Иванов, К.А. Кутукова // Асимметрия. – 2018. – Т.12. – №4. – С.217-222.
5. Иллариошкин, С.Н. Новые МРТ-методики в диагностике болезни Паркинсона: оценка нигральной дегенерации / С.Н. Иллариошкин, Р.Н. Коновалов, Е.Ю. Федотова и соав. // Анналы Клинической и Экспериментальной Неврологии. – 2019. – Т.13. – №4. – С.77-84.
6. Иллариошкин, С.Н. От Джеймса Паркинсона и Жан-Мартена Шарко к Константину Третьякову и современному этапу изучения черной субстанции / С.Н. Иллариошкин, О.С. Левин, О.В. Колоколов // Бюллетень Национального Общества по Изучению Болезни Паркинсона и Расстройств Движений. – 2019. – №1. – С.33-41.

7. Кальнов, С.Л. Прижизненная диагностика прионных болезней / С.Л. Кальнов, О.А. Верховский, В.В. Цибезов и соав. // Вопросы Вирусологии. – 2020. – Т.65. – №6. – С.326-334.
8. Кашин, С.В. Стандарты качественной колоноскопии (пособие для врачей) / С.В. Кашин, Е.Л. Никонов, Н.В. Нехайкова и соав. // Доказательная Гастроэнтерология. – 2019. – Т.8. – №1-2. – С.3-32.
9. Коцоев, Г.А. Оценка критериев MDS, предложенных для установления продромальной стадии болезни Паркинсона, у пациентов с клинически диагностированным заболеванием / Г.А. Коцоев, Е.Ю. Федотова, С.Н. Иллариошкин // Нервные Болезни. – 2021. – №2. – С.30-34.
10. Мазуренко, Е.В. Транскраниальная сонография в клинической практике: новые возможности использования метода у пациентов с болезнью Паркинсона / Е.В. Мазуренко // Международный Неврологический Журнал. – 2017. – Т.3. – №89. – С.144-150.
11. Научно-практический совет Минздрава РФ. Клинические рекомендации Болезнь Паркинсона, вторичный паркинсонизм и другие заболевания, проявляющиеся синдромом паркинсонизма. М.: 2021, 301с.
12. Нодель, М.Р. Современные диагностические критерии болезни Паркинсона / М.Р. Нодель // Российский журнал гериатрической медицины. – 2021. – №1. – С.92-96.
13. Раздорская, В.В. Болезнь Паркинсона в России: распространенность и заболеваемость / В.В. Раздорская, О.Н. Воскресенская, Г.К. Юдина // Саратовский Научно-Медицинский Журнал. – 2016. – Т.12. – №3. – С.379-384.
14. Сальков, В.Н. Морфохимическое исследование альфа-синуклеина, железа и железосодержащих белков в черном веществе головного мозга при болезни Паркинсона / В.Н. Сальков, Р.М. Худоев, Д.Н. Воронков и соав. // Архив Патологии. – 2022. – Т.84. – №2. – С.13-19.
15. Сальков, В.Н. Изменение содержания железа в структурах головного мозга при старении и ассоциированных с ним

нейродегенеративных заболеваниях / В.Н. Сальков, Р.М. Худоевков // Архив Патологии. – 2020. – Т.82. – №5. – С.73-78.

16. Сальков, В. Н. Клинико-морфологический анализ случая болезни Паркинсона / В.Н. Сальков, Д.Н. Воронков, К.К. Хачева и соав. // Архив патологии. – 2020. – Т.82. – №.2. – С. 52-56

17. Соболев, В.Б. Выявление фосфорилированного α -синуклеина в биопсийном материале слюнных желез при болезни Паркинсона / В.Б. Соболев, Р.М. Худоевков, Р.Р. Богданов и соав. // Нервные Болезни. – 2018. – №3. – С.44-50.

18. Соболев, В.Б. Иммуногистохимическое выявление α -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона. / В.Б. Соболев, Р.М. Худоевков // Бюллетень Национального Общества по Изучению Болезни Паркинсона и Расстройств Движений. – 2017. – №2. – С.16–23.

19. Ставровская, А.В. Паракватная модель паркинсонизма и выявление фосфорилированного α -синуклеина в энтеральной нервной системе у крыс / А.В. Ставровская, Д.Н. Воронков, К.А. Кутукова и соав. // Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. – 2019. – №5. – С.63-69.

20. Федотова, Е.Ю. Возможности транскраниальной сонографии в диагностике экстрапирамидных заболеваний / Е.Ю. Федотова, А.О. Чечеткин, С.Н. Иллариошкин // Анналы Клинической и Экспериментальной Неврологии. – 2010. – Т.4. – №4. – С.43–50.

21. Хачева К.К. Фосфорилированный α -синуклеин в слюнной железе как перспективный биомаркер болезни Паркинсона // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2024. – №2. – С.23-27.

22. Худоевков, Р.М. Исследование α -синуклеина в биоптатах подъязычных слюнных желез при болезни Паркинсона / Р.М. Худоевков, Д.Н. Воронков, Р.Р. Богданов и соав. // Неврологический Журнал. – 2016. – Т.21. – №3. – С.152-157.

23. Цибулевский, А.Ю. Кожа: морфология, гистохимия, гистофизиология / А.Ю. Цибулевский, Т.К. Дубовая // Крымский Журнал Экспериментальной и Клинической Медицины. – 2021. – Т.11. – №1. – С.37-42.
24. Adler, C.H. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease / C.H. Adler, B.N. Dugger, M.L. Hinni et al. // *Neurology*. – 2014. – V. 82. – №10. – P.858-864.
25. Adler, C.H. Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings / C.H. Adler, B.N. Dugger, J.G. Hentz et al. // *Movement Disorders*. – 2016. – V.31. – №2. – P.250-256
26. Alam, P. α -synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities / P. Alam, L. Bousset, R. Melki et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2019. – V.150. – №5. – P.522-534
27. Alegre-Abarrategui, J. Selective vulnerability in α -synucleinopathies / J. Alegre-Abarrategui, K.R. Brimblecombe, R.F. Roberts et al. // *Acta Neuropathologica*. – №138. – P.681–704.
28. Balestrino, R. Parkinson disease / R. Balestrino, A.H.V. Schapira // *European Journal of Neurology*. – 2020. – V.27. – №1. – P.27-42.
29. Bari, B.A. Locus coeruleus-norepinephrine: basic functions and insights into Parkinson's disease / B.A. Bari, V. Chokshi, K. Schmidt // *Neural Regeneration Research*. – 2020. – V.15. – №.6. – P.1006-1013.
30. Beach, T.G. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease / T.G. Beach, C.H. Adler, B.N. Dugger et al. // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 2013. – V.72. – №2. – P.130-136.
31. Beach, T.G. Importance of low diagnostic accuracy for early Parkinson's disease / T.G. Beach, C.H Adler. // *Movement Disorders*. – 2018. – V.33. – №10. – P.1551-1554.
32. Beach, T.G. Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders / T.G. Beach,

C.H. Adler, L.I. Sue et al. // *Acta Neuropathologica*. – 2010. – V.119. – №6. – P.689-702

33. Berg, D. MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease / D. Berg, R.B. Postuma, C.H. Adler et al. // *Movement Disorders*. – 2015. – V.30. – №12. – P.1600-1611.

34. Borghammer, P. How does Parkinson's disease begin? Perspectives on neuroanatomical pathways, prions, and histology / P.Borghammer // *Movement Disorders*. – 2018. – №33. – P.48–57.

35. Borghammer, P. The α -synuclein origin and connectome model (SOC Model) of Parkinson's disease: explaining motor asymmetry, non-motor phenotypes, and cognitive decline / P.Borghammer // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2021. – V.11. – №2. – P.455-474.

36. Braak, H. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease / H. Braak, K. Del Tredici, U. Rüb et al. // *Neurobiology of Aging*. – 2003. – №24. – P.197–211.

37. Brettschneider, J. Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies/ J. Brettschneider, K. Del Tredici, V. M.-Y. Lee et al. // *Nature Reviews Neurosciences*. – 2015. – №16. – P.109–120.

38. Bu, J. Diagnostic utility of gut α -synuclein in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis / J. Bu, J. Liu, K Liu et al. // *Behavioural Brain Research*. – 2019. – V.364. – P.340-347.

39. Bu, L.L. Alpha-synuclein accumulation and its phosphorylation in the enteric nervous system of patients without neurodegeneration: An explorative study / L.L. Bu, K.X. Huang, D.Z. Zheng et al. // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2020. – V.12. – P.575481.

40. Cacabelos, R. Parkinson's disease: from pathogenesis to pharmacogenomics / R. Cacabelos // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – V.18. – №3. – P.551.

41. Cai, Q. α -Synuclein aggregates in the nigro-striatal dopaminergic pathway impair fine movement: Partial reversal by the adenosine A2A receptor

antagonist / Q. Cai, N. Xu, Y. He et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – V.24. – №2. – P.1365.

42. Caporali, R. Safety and usefulness of minor salivary gland biopsy: retrospective analysis of 502 procedures performed at a single center / R. Caporali, E. Bonacci, O. Epis et al. // *Arthritis Care & Research: Official Journal of the American College of Rheumatology*. – 2008. – V.59. – №5. – P.714-720.

43. Carletti, R. Phosphorylated α -synuclein immunoreactivity in nerve fibers from minor salivary glands in Parkinson's disease / R. Carletti, F.Campo, M. Fusconi et al. // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2017. – №38. – P.99-101.

44. Cersosimo, M.G. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients / M.G. Cersósimo, C. Perandones, F.E. Micheli et al. // *Movement Disorders*. – 2011. – V.26. – №1. – P.188-190.

45. Chahine, L.M. In vivo distribution of α -synuclein in multiple tissues and biofluids in Parkinson disease / L.M. Chahine, T.G. Beach, M.C. Brumm et al. // *Neurology*. – 2020. – V.95. – №9. – P.e1267-e1284.

46. Challis, C. Gut-seeded α -synuclein fibrils promote gut dysfunction and brain pathology specifically in aged mice / C. Challis, A. Hori, T.R. Sampson et al. // *Nature Neuroscience*. – 2020. – V.23. – №3. – P.327-336.

47. Chandra, R. α -Synuclein in gut endocrine cells and its implications for Parkinson's disease / R. Chandra, A. Hiniker, Y.M. Kuo et al. // *JCI Insight*. – 2017. – V.2. – №. 12. – P.1-13.

48. Chang, K.H. The role of oxidative stress in Parkinson's disease / K.H. Chang, C.M. Chen // *Antioxidants*. – 2020. – V.9. – №7. – P.597.

49. Chaudhuri, K.R. Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease / K.R. Chaudhuri, P. Martinez-Martin // *European Journal of Neurology*. – 2008. – V.15. – P.2-8.

50. Chaudhuri, K.R. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: A comprehensive assessment is essential / K.R. Chaudhuri, L. Yates, P.

Martinez-Martin // *Current Neurology and Neuroscience Reports*. – 2005. – V.5. – №4. – P.275-283.

51. Chaudhuri, K.R. Burden of non-motor symptoms in Parkinson's disease patients predicts improvement in quality of life during treatment with levodopa-carbidopa intestinal gel / K.R. Chaudhuri, W.Z Robieson, O. Sanchez-Solino et al. // *European Journal of Neurology*. – 2019. – V.26. – №4. – P.581-e43.

52. Chen, H. Physical activity and the risk of Parkinson disease / H. Chen. // *Neurology*. – 2005. – V.64. – №4. – P.664-669.

53. Chen, M. Gut-to-brain α -synuclein transmission in Parkinson's disease: evidence for prion-like mechanisms / M. Chen, D.E Mor // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – V.24. – №8. – P.7205.

54. Chen, Y.C. The severity progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease: A 6-year longitudinal study in Taiwanese patients / Y.C. Chen, R.S. Chen, Y.H. Weng et al. // *Scientific Reports*. – 2021. – V.11. – №1. – P.14781.

55. Chen, Z. Autonomic dysfunction in Parkinson's disease: Implications for pathophysiology, diagnosis, and treatment / Z. Chen, G. Li, J .Liu // *Neurobiology of Disease*. – 2020. – V.134. – P.104700.

56. Colla, E. Linking the endoplasmic reticulum to Parkinson's disease and alpha-synucleinopathy / E. Colla // *Frontiers in Neuroscience*. – 2019. – V.13. – P.461767.

57. Cuello, A.C. Immunocytochemistry and neurobiology / A.C. Cuello, J.V. Priestley, M.V. Sofroniew // *Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration*. – 1983. – V.68. – №4. – P.545-578.

58. Dauer, L.T. Moon, Mars and minds: evaluating Parkinson's disease mortality among US radiation workers and veterans in the Million Person Study of low-dose effects / L.T. Dauer, L. Walsh, M.T. Mumma et al. // *Zeitschrift für Medizinische Physik*. – 2024. – V.34. – №1. – P.100-110.

59. De Bartolo, M.I. A systematic review of salivary biomarkers in Parkinson's disease / M.I. De Bartolo, D. Belvisi, R. Mancinelli et al. // *Neural Regeneration Research*. – 2024. – V.19. – №12. – P.2613-2625.
60. De Lataillade, A.G. Enteric synucleinopathy: from trendy concept to real entity / A.G. De Lataillade, T. Lebouvier, W. Noble et al. // *Free Neuropathology*. – 2020. – V.1. – №26. – P.1-9
61. Del Tredici, K. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease / K. Del Tredici, C.H. Hawkes, E. Ghebremedhin et al. // *Acta Neuropathologica*. – 2010. – V.119. – P.703-713.
62. Delic, V. Biological links between traumatic brain injury and Parkinson's disease / V. Delic, K.D. Beck, K.C.H. Pang et al. // *Acta Neuropathologica communications*. – 2020. – V.8. – P.1-16.
63. Diaconu, Ș. REM sleep behaviour disorder in Parkinson's disease / Ș. Diaconu, C. Falup-Pecurariu // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2021. – V.22. – №2. – P.1-5.
64. Domingues, R. Extracellular alpha-synuclein: Sensors, receptors, and responses / R. Domingues, R. Sant'Anna, A.C.C. da Fonseca et al. // *Neurobiology of Disease*. – 2022. – V.168. – P.105696.
65. Donadio, V. Skin α -synuclein deposits differ in clinical variants of synucleinopathy: an in vivo study / V. Donadio, A. Incensi, O. El-Agnaf et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – V.8. – №1. – P.14246.
66. Donadio, V. Skin nerve α -synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease / V. Donadio, A. Incensi, V. Leta et al. // *Neurology*. – 2014. – V.82. – №15. – P.1362-1369.
67. Dong T.T.T. The latest research on RT-QuIC assays—a literature review / T.T.T. Dong, K. Satoh // *Pathogens*. – 2021. – V.10. – №3. – P.305.
68. Durcan, R. Prevalence and duration of non-motor symptoms in prodromal Parkinson's disease / R. Durcan, L. Wiblin, R.A. Lawson et al. // *European Journal of Neurology*. – 2019. – V.26. – №7. – P.979-985.

69. Ercoli, T. Does olfactory dysfunction correlate with disease progression in Parkinson's disease? A systematic review of the current literature / T. Ercoli, C.F. Bagella, C. Frau et al. // *mBrain Sciences*. – 2022. – V.12. – №5. – P.513.
70. Fields, C. R. Targeting alpha-synuclein as a therapy for Parkinson's disease / C.R. Fields, N. Bengoa-Vergniory, R. Wade-Martins et al. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2019. – V.12. – P.299.
71. Folgoas, E. Diagnostic value of minor salivary glands biopsy for the detection of Lewy pathology / E. Folgoas; T. Lebouvier; L. Leclair-Visonneau et al. // *Neuroscience Letters*. – 2013. – V.551. – P.62-64.
72. Freitas, S. Montreal Cognitive Assessment (MoCA): validation study for vascular dementia / S. Freitas, M.R. Simões, L. Alves et al. // *Journal of the International Neuropsychological Society*. – 2012. – V.18. – №6. – P.1031-1040.
73. Fujita, H. Substantia Nigra Hyperechogenicity in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Follow-up Study / H. Fujita, J. Horie, Y. Watanabe et al. // *Dokkyo Medical Journal*. – 2022. – V.1. – №4. – P.367-372.
74. Gadhe, L. Intermediates of α -synuclein aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis / L. Gadhe, A. Sakunthala, S. Mukherjee et al. // *Biophysical Chemistry*. – 2022. – V.281. – P.106736.
75. Gao, L. The diagnostic value of minor salivary gland biopsy in clinically diagnosed patients with Parkinson's disease: comparison with DAT PET scans / L. Gao, H. Chen, X. Li et al. // *Neurological Sciences*. – 2015. – V.36. – P.1575-1580.
76. Garrido, A. α -synuclein RT-QuIC in cerebrospinal fluid of LRRK 2-linked Parkinson's disease / A. Garrido, G. Fairfoul, E.S. Tolosa et al. // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2019. – V.6. – №6. – P.1024-1032.
77. Gaurav, R.L. Longitudinal changes in neuromelanin MRI signal in Parkinson's disease: a progression marker / R. Gaurav, L. Yahia-Cherif, N. Pyatigorskaya et al. // *Movement Disorders*. – 2021. – V.36. – №7. – P.1592-1602.

78. Gibbons, C.H. The diagnostic discrimination of cutaneous α -synuclein deposition in Parkinson disease / C.H. Gibbons, J. Garcia, N. Wang et al. // *Neurology*. – 2016. – V.87. – №5. – P.505-512.
79. Goetz, C G. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results / C.G. Goetz, B.C. Tilley, S.R. Shaftman et al. // *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. – 2008. – V.23. – №15. – P.2129-2170.
80. Grozdanov, V. Increased immune activation by pathologic α -synuclein in Parkinson's disease / V. Grozdanov, L. Bousset, M. Hoffmeister et al. // *Annals of Neurology*. – 2019. – V.86. – №4. – P.593-606.
81. Haque, M.E. Targeting α -synuclein aggregation and its role in mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease / M.E. Haque, M. Akther, S. Azam et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2022. – V.179. – №1. – P.23-45.
82. Hawkes, C.H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis / C.H. Hawkes, K. Del Tredici, H. Braak // *Neuropathology and applied neurobiology*. – 2007. – V.33. – №6. – P.599-614.
83. He, R. Olfactory dysfunction predicts disease progression in Parkinson's disease: a longitudinal study / R. He, Y. Zhao, Y. He et al. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2020. – V.14. – P.569777.
84. Heinzl, S. Gut microbiome signatures of risk and prodromal markers of Parkinson disease / S. Heinzl, V.T.E. Aho, U. Suenkel et al. // *Annals of Neurology*. – 2021. – V.90. – №3. – P.E1-E12.
85. Heinzl, S. Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease / S. Heinzl, D. Berg, T. Gasser et al. // *Movement Disorders*. – 2019. – V.34. – №10. – P.1464-1470.
86. Horsager, J. Radionuclide Imaging of the Gut–Brain Axis in Parkinson Disease / J. Horsager, K. Knudsen, P. Borghammer // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2021. – V.62. – №11. – P.1504.

87. Iovino, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells / L. Iovino, M.E. Tremblay, L. Civiero // *Journal of Pharmacological Sciences*. – 2020. – V.144. – №3. – P.151-164.
88. Iranzo, A. α -Synuclein aggregates in labial salivary glands of idiopathic rapid eye movement sleep behavior disorder / A. Iranzo, S. Borrego, I. Vilaseca et al. // *Sleep*. – 2018. – V.41. – №8. – P.zsy101.
89. Jenkinson, C. The PDQ-8: development and validation of a short-form Parkinson's disease questionnaire / C. Jenkinson, R. Fitzpatrick, V. Peto et al. // *Psychology and Health*. – 1997. – V.12. – №6. – P.805-814.
90. Jia, F. Monogenic Parkinson's disease: genotype, phenotype, pathophysiology, and genetic testing / F. Jia, A. Fellner, K.R. Kumar // *Genes*. – 2022. – V.13. – №3. – P.471.
91. Jimenez-Jimenez, F.J. Alpha-synuclein in peripheral tissues as a possible marker for neurological diseases and other medical conditions / F.J. Jimenez-Jiménez, H. Alonso-Navarro, E. Garcia-Martin et al. // *Biomolecules*. – 2023. – V.13. – №8. – P.1263.
92. Khedr, E.M. Depression and anxiety among patients with Parkinson's disease: frequency, risk factors, and impact on quality of life / E.M. Khedr, A.A. Abdelrahman, Y. Elserogy et al. // *The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery*. – 2020. – V.56. – P.1-9.
93. Kim, P.H. Diagnostic performance of loss of nigral hyperintensity on susceptibility-weighted imaging in Parkinsonism: an updated meta-analysis / P.H. Kim, D.H. Lee, C.H. Suh et al. // *European Radiology*. – 2021. – V.31. – P.6342-6352.
94. Knudsen, K. In-vivo staging of pathology in REM sleep behaviour disorder: a multimodality imaging case-control study / K. Knudsen, T.D. Fedorova, A.K. Hansen et al. // *The Lancet Neurology*. – 2018. – V.17. – №7. – P.618-628.
95. Kochman, E. Clinical and Pre-Clinical Evidence for Enteric α -Synuclein Involvement in Parkinson's Disease / E. Kochman, K. Akhtar, A.

Alelayawi et al. // *International Journal of Neurodegenerative Disorders*. – 2021. – V.4. – P.019.

96. Koeglsperger, T. Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease / T. Koeglsperger, S.L. Rumpf, P. Schließer et al. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2023. – V.18. – №1. – P.32.

97. Kon, T. Neuropathology of Lewy body disease: clinicopathological crosstalk between typical and atypical cases / T. Kon, M. Tomiyama, K. Wakabayashi // *Neuropathology*. – 2020. – V.40. – №1. – P.30-39.

98. Kouli, A. Parkinson's disease: etiology, neuropathology, and pathogenesis / A. Kouli, K.M. Torsney, W.L. Kuan. // *Parkinson's disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. – Brisbane: Exon Publications. – 2018. – P.3-26.

99. Kuzkina, A. Diagnostic value of skin RT-QuIC in Parkinson's disease: a two-laboratory study / A. Kuzkina, C. Bargar, D. Schmitt et al. // *NPJ Parkinson's Disease*. – 2021. – V.7. – №1. – P.99.

100. Lautenkläger, J. C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction / J. Lautenkläger, A.D. Stephens, G. Fusco et al. // *Nature Communications*. – 2018. – V.9. – №1. – P.712.

101. Lebouvier, T. Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease / T. Lebouvier, T. Chaumette, P. Damier et al. // *Gut*. – 2008. – V.57. – №12. – P.1741-1743.

102. Lee, J.M. The search for a peripheral biopsy indicator of α -synuclein pathology for Parkinson disease / J.M. Lee, P. Derkinderen, J.H. Kordower et al. // *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. – 2017. – V.76. – №1. – P.2-15.

103. LeWitt, P.A. Unmet needs in Parkinson disease: Motor and non-motor / P.A. LeWitt, K.R. Chaudhuri // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2020. – V.80. – P.S7-S12.

104. Li, J.Y. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation / J.Y. Li, E. Englund, J.L. Holton et al. // *Nature Medicine*. – 2008. – V.14. – №5. – P.501-503.
105. Lubomski, M. Parkinson's disease and the gastrointestinal microbiome / M. Lubomski, R.L. Davis, C.M. Sue // *Journal of Neurology*. – 2020. – V.267. – P.2507-2523.
106. Ma, X. Application and progress of transcranial substantial ultrasound in Parkinson's disease / X. Ma, T. Li, L. Du et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2022. – V.13. – P.1091895.
107. Ma, L.Y. Nitrated alpha-synuclein in minor salivary gland biopsies in Parkinson's disease / L.Y. Ma, L.Y. Gao, X. Li et al. // *Neuroscience Letters*. – 2019. – V.704. – P.45-49.
108. Maggio, M.P. Drooling and dysphagia in Parkinson's disease / M.P. Maggio, S. Perez-Lloret, M. Merello // *International Review of Movement Disorders*. – 2021. – V.1. – P.147-178.
109. Mahul-Mellier, A.L. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration / A.L. Mahul-Mellier, J. Bartscher, N. Maharjan et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V.117. – №9. – P.4971-4982.
110. Mangone, G. Relationship between substantia Nigra Neuromelanin imaging and dual alpha-Synuclein labeling of labial minor in salivary glands in isolated rapid eye movement sleep behavior disorder and Parkinson's disease / G. Mangone, M. Houot, R. Gaurav et al. // *Genes*. – 2022. – V.13. – №10. – P.1715.
111. Martinez-Martin, P. Validation study of the Hoehn and Yahr scale included in the MDS-UPDRS / P. Martinez-Martin, M. Skorvanek, J.M. Rojo-Abuin et al. // *Movement Disorders*. – 2018. – V.33. – №4. – P.651-652.
112. Mehanna, R. Young-onset Parkinson's disease: Its unique features and their impact on quality of life / R. Mehanna, J. Jankovic // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2019. – V.65. – P.39-48.

113. Mei, Y.L. Transcranial sonography of the substantia nigra for the differential diagnosis of Parkinson's disease and other movement disorders: a meta-analysis / Y.L. Mei, J. Yang, Z.R. Wu et al. // *Parkinson's Disease*. – 2021. – V.2021.
114. Melli, G. Cervical skin denervation associates with alpha-synuclein aggregates in Parkinson disease / G. Melli, E. Vacchi, V. Biemmi et al. // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2018. – V.5. – №11. – P.1394-1407.
115. Mochizuki, H. Parkinson's disease and iron / H. Mochizuki, C.J. Choong, K. Baba // *Journal of Neural Transmission*. – 2020. – V.127. – P.181-187.
116. Mori, A. Lipids: Key players that modulate α -synuclein toxicity and neurodegeneration in Parkinson's disease / A. Mori, Y. Imai, N. Hattori // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – V.21. – №9. – P.3301.
117. Muddapu, V.R. A computational model of loss of dopaminergic cells in Parkinson's disease due to glutamate-induced excitotoxicity / V.R. Muddapu, A. Mandali, V.S. Chakravarthy et al. // *Frontiers in Neural Circuits*. – 2019. – V.13. – P.11.
118. Nasreddine, Z.S. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment / Z.S. Nasreddine, N.A. Phillips, V. Bédirian et al. // *Journal of the American Geriatrics Society*. – 2005. – V.53. – №4. – P.695-699.
119. Navarro-Otano, J. Cutaneous autonomic denervation in Parkinson's disease / J. Navarro-Otano, J. Casanova-Molla, M. Morales et al. // *Journal of Neural Transmission*. – 2015. – V.122. – P.1149-1155.
120. NumPy Statistics Library. – URL: <https://numpy.org/doc/stable/reference/routines.statistics.html> (accessed: 18.08.2024).
121. Oliveira, J.T. Oligomeric α -Synuclein induces skin degeneration in reconstructed human epidermis / J.T. Oliveira, V. Dakic, G. Vitória et al. // *Neurobiology of Aging*. – 2022. – V.113. – P.108-117.

122. Open CV– URL:
https://docs.opencv.org/4.x/d4/da8/group_imgcodecs.html#gacbaa02cffc4ec2422dfa2e24412a99e2 (accessed: 18.08.2024)
123. Ou, Z. Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019 / Z. Ou, J. Pan, S. Tang, D. Duan et al. // *Frontiers in Public Health*. – 2021. – V.9. – P.776847.
124. Pajares, M.A. Inflammation in Parkinson's disease: mechanisms and therapeutic implications / M.A. Pajares, I. Rojo, G. Manda et al. // *Cells*. – 2020. – V.9. – №7. – P.1687.
125. Parkinson's Foundation. – URL:
<https://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/statistics> (accessed: 18.08.2024).
126. Paul, K.C. The association between lifestyle factors and Parkinson's disease progression and mortality / K.C. Paul, Y.H. Chuang, I.F. Shih et al. // *Movement Disorders*. – 2019. – V.34. – №1. – P.58-66.
127. Pitton Rissardo, J. Cardiac 123I-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy in Parkinson's disease: A comprehensive review / J. Pitton Rissardo, A.L. Fornari Caprara // *Brain Sciences*. – 2023. – V.13. – №10. – P.1471.
128. Postuma, R.B. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / R.B. Postuma, D. Berg, M. Stern et al. // *Movement Disorders*. – 2015. – V.30. – №12. – P.1591-1601.
129. Pouclet, H. A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease / H. Pouclet, T. Lebouvier, E. Coron et al. // *Neurogastroenterology & Motility*. – 2012. – V.24. – №4. – P.e202-e205.
130. Prasuhn, J. Clinical MR imaging in Parkinson's disease: How useful is the swallow tail sign? / J. Prasuhn et al. // *Brain and Behavior*. – 2021. – V.11. – №7. – P.e02202.

131. Quigley, E.M.M. Constipation in Parkinson's disease / E.M.M. Quigley // *Seminars in Neurology*. – 2023. – V.43. – №4. – P.562-571.
132. Rode, J. PGP 9.5, a new marker for human neuroendocrine tumours / J. Rode, A.P. Dhillon, J.F. Doran et al. // *Histopathology*. – 1985. – V.9. – №2. – P.147-158.
133. Roos, D.S. Prevalence of prodromal symptoms of Parkinson's disease in the late middle-aged population / D.S. Roos, M. Klein, D.J.H. Deeg et al. // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2022. – V.12. – №3. – P.967-974.
134. Ryman, S.G. MRI biomarkers of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease / S.G. Ryman, K.L. Poston // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2020. – V.73. – P.85-93.
135. Sardar, Z. Non-Motor symptoms burden in early stages of Parkinson's disease / Z. Sardar, S. Liaquat, Q. Yousaf et al. // *Annals of Indian Academy of Neurology*. – 2023. – V.26. – №1. – P.39-43.
136. Schrag, A. Widening the spectrum of risk factors, comorbidities, and prodromal features of Parkinson disease / A. Schrag, J. Bohlken, L. Dammertz et al. // *JAMA Neurology*. – 2023. – V.80. – №2. – P.161-171.
137. Schwarz, S.T. Parkinson's disease related signal change in the nigrosomes 1–5 and the substantia nigra using T2* weighted 7T MRI / S.T. Schwarz, O. Mougin, Y. Xing et al. // *NeuroImage: Clinical*. – 2018. – V.19. – P.683-689.
138. SciKit-image – URL: <https://scikit-image.org/docs/stable/api/skimage.color.html#skimage.color.hed2rgb> (accessed: 18.08.2024)
139. SciPy documentation Statistics. – URL: <https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/stats.html> (accessed: 18.08.2024).
140. Shahmoradian, S.H. Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes / S.H. Shahmoradian, A.J. Lewis, C. Genoud et al. // *Nature Neuroscience*. – 2019. – V.22. – №7. – P.1099-1109.

141. Shannon, K.M. Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease / K.M. Shannon, A. Keshavarzian, E. Mutlu et al. // *Movement Disorders*. – 2012. – V.27. – №6. – P.709-715.
142. Shin, J. Submandibular gland is a suitable site for alpha synuclein pathology in Parkinson disease / J. Shin, S.H. Park, C. Shin et al. // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2019. – V.58. – P.35-39.
143. Simon, D.K. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology / D.K. Simon, C.M. Tanner, P. Brundin // *Clinics in Geriatric Medicine*. – 2020. – V.36. – №1. – P.1-12.
144. Skaper, S.D. An inflammation-centric view of neurological disease: beyond the neuron / S.D. Skaper, L. Facci, M. Zusso et al. // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2018. – V.12. – P.72.
145. Smith, C. Neuropathology of dementia in patients with Parkinson's disease: a systematic review of autopsy studies / C. Smith, N. Malek, K. Grosset et al. // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2019. – V.90. – №11. – P.1234-1243.
146. Sonne, J. Neuroanatomy, Substantia Nigra / J. Sonne, V. Reddy, M.R. Beato. – Tampa: StatPearls Publishing, 2021. – 30p.
147. Spinhoven, P.H. A validation study of the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) in different groups of Dutch subjects / P.H. Spinhoven, J. Ormel, P.P.A. Sloekers et al. // *Psychological Medicine*. – 1997. – V.27. – №2. – P.363-370.
148. Stewart, C.B. The longitudinal progression of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: A 7-year study / C.B. Stewart, D. Ledingham, V.K. Foster et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2023. – V.14. – P.1155669.
149. Stiasny-Kolster, K. The REM sleep behavior disorder screening questionnaire—a new diagnostic instrument / K. Stiasny-Kolster, G. Mayer, S. Schäfer et al. // *Movement Disorders*. – 2007. – V.22. – №16. – P.2386-2393.

150. Sun, F. Impact of α -synuclein spreading on the nigrostriatal dopaminergic pathway depends on the onset of the pathology / F. Sun, A.G. Salinas, S. Filser et al. // *Brain Pathology*. – 2022. – V.32. – №2. – P.e13036.
151. Takahashi, H. Ultrastructural Relationship between Lewy Bodies and Pale Bodies Studied in Locus Ceruleus Neurons of a Non-Parkinsonian Patient / H. Takahashi, K. Iwanaga, S. Egawa et al. // *Neuropathology*. – 1994. – V.14. – №2. – P.73-80.
152. Tang, Y. Cognitive function and quality of life in Parkinson's disease: a cross-sectional study / Y. Tang, X. Liang, L. Han et al. // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2020. – V.10. – №3. – P.1209-1216.
153. Tao, A. Accuracy of transcranial sonography of the substantia nigra for detection of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis / A. Tao, G. Chen, Y. Deng et al. // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2019. – V.45. – №3. – P.628-641.
154. Thobois, S. What a neurologist should know about PET and SPECT functional imaging for parkinsonism: a practical perspective / S. Thobois, S. Prange, C. Scheiber et al. // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2019. – V.59. – P.93-100.
155. Thomas, S. Abnormal intraepidermal nerve fiber density in disease: A scoping review / S. Thomas, J. Enders, A. Kaiser et al. // *Frontiers in Neurology*. – 2023. – V.14. – P.1161077.
156. Toomsoo, T. Effect of age on substantia nigra hyper-echogenicity in Parkinson's disease patients and healthy controls / T. Toomsoo, I. Liepelt-Scarfone, D. Berg et al. // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2019. – V.45. – №1. – P.122-128.
157. Travaglini, R.A. Parkinson disease and the gut: new insights into pathogenesis and clinical relevance / R.A. Travaglini, K.N. Browning, M. Camilleri // *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. – 2020. – V.17. – №11. – P.673-685.

158. Trist, B.G. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease / B.G. Trist, D.J. Hare, K.L. Double // *Aging Cell*. – 2019. – V.18. – №6. – P.e13031.
159. Tsukita, K. Value of in vivo α -synuclein deposits in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis / K. Tsukita, H. Sakamaki-Tsukita, K. Tanaka et al. // *Movement Disorders*. – 2019. – V.34. – №10. – P.1452-1463.
160. Ullah, I. Metal elements and pesticides as risk factors for Parkinson's disease-A review / I. Ullah, L. Zhao, Y. Hai, et al. // *Toxicology Reports*. – 2021. – V.8. – P.607-616.
161. Vallee, A. Circadian rhythms, neuroinflammation and oxidative stress in the story of Parkinson's disease / A. Vallee, Y. Lecarpentier, R. Guillevin, et al. // *Cells*. – 2020. – V.9. – №2. – P.314.
162. Vilas, D. Assessment of α -synuclein in submandibular glands of patients with idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: a case-control study / D. Vilas, A. Iranzo, E. Tolosa, et al. // *The Lancet Neurology*. – 2016. – V.15. – №7. – P.708-718.
163. Virameteekul, S. Clinical diagnostic accuracy of Parkinson's disease: where do we stand? / S. Virameteekul, T. Revesz, Z. Jaunmuktane, et al. // *Movement Disorders*. – 2023. – V.38. – №. 4. – P.558-566.
164. Wakabayashi, K. Where and how alpha-synuclein pathology spreads in Parkinson's disease / K. Wakabayashi // *Neuropathology*. – 2020. – V. 40. – №5. – P.415-425.
165. Wakabayashi, K. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders / K. Wakabayashi, K. Tanji, S. Odagiri, et al. // *Molecular Neurobiology*. – 2013. – V.47. –P.495-508.
166. Wang, J. Molecular mechanisms of glutamate toxicity in Parkinson's disease / J. Wang, F. Wang, D. Mai, et al. // *Frontiers in Neuroscience*. – 2020. – V.14. – P.585584.

167. Wang, N. α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves / N. Wang, C.H. Gibbons, J. Lafo, et al. // *Neurology*. – 2013. – V.81. – №18. – P.1604-1610.
168. Weintraub, D. The neuropsychiatry of Parkinson's disease: advances and challenges / D. Weintraub, D. Aarsland, K.R. Chaudhuri, et al. // *The Lancet Neurology*. – 2022. – V.21. – №1. – P.89-102.
169. WHO International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD). – URL: <https://www.who.int/standards/classifications/classification-of-diseases> (accessed: 18.08.2024)
170. WHO Parkinson disease Fact sheet. – URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/parkinson-disease#:~:text=Global%20estimates%20in%202019%20showed,of%20over%20100%25%20since%202000> (accessed: 18.08.2024).
171. Winter, Y. Incidence of Parkinson's disease and atypical parkinsonism: Russian population-based study / Y. Winter, Y. Bezdolnyy, E. Katunina, et al. // *Movement Disorders*. – 2010. – V.25. – №3. – P.349-356.
172. Xu, D. Relationship between lower urinary tract dysfunction and clinical features in Chinese Parkinson's disease patients / D. Xu, S. Han, J. Wang, et al. // *Parkinson's Disease*. – 2019. – V.2019. – P.6820937
173. Xu, L. Quantitative changes of strong echo in substantia nigra of midbrain in patients with Parkinson's disease detected by transcranial ultrasound / L. Xu, J. Li, Q. Du // *National Medical Journal of China*. – 2018. – V.98. – P.2518–2520.
174. Xu, R. Diagnostic performance of transcranial sonography for evaluating substantia nigra hyper-echogenicity in patients with Parkinson's disease / R. Xu, G. Chen, Z. Mao, et al. // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2020. – V.46. – №5. – P.1208-1215.
175. Zhao, T. Oxidative stress and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE): Implications in the pathogenesis and treatment of aging-related diseases / T Zhao,

J Li, Y. Li, et al. //Journal of Immunology Research. – 2022. – V. 2022. – №. 1. – C. 2233906.

176. Zhang, Y. Advancements in understanding substantia nigra hyperechogenicity via transcranial sonography in Parkinson's disease and its clinical implications / Y. Zhang, X. Jiang, P. Zhu, et al. // Frontiers in Neurology. – 2024. – V.5. – P.1407860.

177. Zhang, N. The heterogeneity of non-motor symptoms of Parkinson's disease / N. Zhang, W. Liu, M. Ye, et al. // Neurological Sciences. – 2015. – V.36. – P.577-584.

178. Zhou, Y. Olfactory dysfunction and its relationship with clinical features of Parkinson's disease / Y. Zhou, R. He, Y. Zhao, et al. // Frontiers in Neurology. – 2020. – V.11. – P.526615.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хачева, К.К. Фосфорилированный α -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 α -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 соав. // 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 соав. // Архив патологии. – 2020. – Т.82. – №.2. – С. 52-56. (ВАК, SCOPUS)