

Министерство Здравоохранения Республики Казахстан
НАО Западно-Казахстанский Медицинский
Университет им. Марата Оспанова

АННОТАЦИЯ

на тему диссертации PhD:

«Совершенствование ранней диагностики болезни Паркинсона с выявлением фосфорилированного альфа-синуклеина в биоптате кожи пациентов»

Специальность: 6D110100- «Медицина»

Докторант: Утегенова А.Б.

Научный консультант: к.м.н.,

рук.каф. неврологии Ермагамбетова А.П.

Зарубежный консультант: MD, PhD,

рук. каф. неврологии и нейрохимии, проф. Славомир Михалак
(Познаньский УМН, Польша)

Актобе, 2023 г.

АННОТАЦИЯ

Утегеновой Айгерим Беркиновны на тему «Совершенствование ранней диагностики болезни Паркинсона с выявлением фосфорилированного альфа-синуклеина в биоптате кожи пациентов», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности «6D110100-Медицина».

Научный консультант: к.м.н., Ермагамбетова А.П.

Зарубежный консультант: MD, PhD, проф. Славомир Михалак

АКТУАЛЬНОСТЬ

Болезнь Паркинсона (БП) является наиболее распространенным видом паркинсонизма. Паркинсонизм объединяет группу неврологических расстройств, при которых наблюдаются двигательные расстройства, такие как замедленность, ригидность и тремор. По частоте встречаемости среди нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) БП уступает болезни Альцгеймера (Armstrong M.J. 2020). Патогенез БП обусловлен накоплением и агрегацией патологического белка - альфа-синуклеина. При этом происходит нарушение пространственной структуры альфа-синуклеина с формированием нерастворимых белковых агрегатов с последующей нейродегенерацией дофаминергических нейронов черной субстанции. В настоящее время БП диагностируется лишь клинически, не существует специфических инструментальных и лабораторных маркеров заболевания (Abbas M. 2018).

БП имеет в своем развитии доклиническую стадию, проявляющуюся немоторными симптомами (запор, потеря обоняния, тревога, депрессия); раннюю (стабильную) и продвинутую стадии, характеризующиеся моторными симптомами (тремор, брадикинезия, ригидность). Наиболее затруднительным является постановка диагноза на доклинической стадии, поскольку немоторные проявления БП, по большей части, являются неспецифическими (Barone P. 2017). Как известно, морфологическая верификация диагноза БП основывается на обнаружении телец Леви в дофаминергических нейронах черной субстанции при аутопсийных исследованиях. В настоящее время представляется возможным прижизненная морфологическая диагностика БП с применением иммуногистохимических методов исследований биоптатов из периферических тканей для выявления альфа-синуклеина, который может выступать в качестве биомаркера БП. При поддержке Фонда Майкла Джей Фокса (Fox Foundation for Parkinson's Research) с 2013 года проводится крупное мультицентровое исследование изучения определения альфа-синуклеина в периферических тканях с целью интеграции результатов и дальнейшая разработка унифицированных методов выявления альфа-синуклеина в биоптате периферических тканей.

Анализ изученных нами литературных данных показал, что в настоящее время актуальной проблемой является разработка критериев диагностики немоторных проявлений БП на доклинической стадии и вопросы дифференциальной диагностики с клинически схожими заболеваниями. Одним из методов, способствующих решению данных вопросов может явиться выявление патологического белка альфа-синуклеина в прижизненной диагностике, что и явилось обоснованием проведения данного исследования.

Цель исследования

На основе изучения клинических проявлений болезни Паркинсона и результатов иммуногистохимического анализа с выявлением фосфорилированного альфа-синуклеина в биоптате кожи пациентов, разработать подходы к ранней диагностике болезни Паркинсона до манифестации моторных проявлений.

Задачи исследования

1. Провести дифференциальную диагностику болезни Паркинсона с клинически схожими заболеваниями у пациентов г. Актобе.
2. Определить взаимосвязь между уровнем альфа-синуклеина в биоптате кожи с тяжестью немоторных и моторных проявлений болезни Паркинсона.
3. Разработать алгоритм ранней диагностики болезни Паркинсона до манифестации моторных проявлений.

Научная новизна

Впервые в Казахстане проведено иммуногистохимическое исследование по выявлению альфа-синуклеина в биоптате кожи пациентов с болезнью Паркинсона с целью ранней и дифференциальной диагностики с клинически схожими заболеваниями. Изучена взаимосвязь экспрессии альфа-синуклеина с выраженностью клинических проявлений болезни Паркинсона, позволяющая использовать альфа-синуклеин в качестве биомаркера болезни Паркинсона.

Практическая значимость

1. Полученные результаты клинического и иммуногистохимического исследования позволят разработать критерии ранней диагностики болезни Паркинсона с акцентированием внимания на немоторные симптомы заболевания.
2. Выявление альфа-синуклеина с помощью иммуногистохимического исследования в биоптате кожи пациентов с подозрением на болезнь Паркинсона может рассматриваться в качестве биомаркера болезни Паркинсона.
3. Результаты исследования могут служить основанием для внесения дополнений в клинические протоколы диагностики и лечения болезни Паркинсона и других клинически схожих заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дифференциальная диагностика болезни Паркинсона с клинически схожими заболеваниями - эссенциальный тремор, сосудистый паркинсонизм, синдром паркинсонизма, на этапе амбулаторного звена вызывает определенные трудности. Для диагностики болезни Паркинсона необходимо учитывать объективную оценку немоторных и моторных проявлений заболевания с использованием специфических оценочных шкал и опросников, а также диагностических критериев экстрапирамидных заболеваний.
2. У пациентов с болезнью Паркинсона в дермальном биоптате в 95,7% случаев выявляется патологический альфа-синуклеин. Диагностический тест по выявлению альфа-синуклеина в коже пациентов БП имеет высокую чувствительность и специфичность. Уровень альфа-синуклеина коррелировал с тяжестью заболевания. У пациентов с брадикинезией наблюдался более высокий уровень альфа-синуклеина.

3. При подозрении на болезнь Паркинсона наличие у пациентов вегетативной дисфункции, гипосмии и длительности заболевания менее трех лет риск развития заболевания составляет от 74% до 92,1%.

Апробация работы. Результаты проведенного исследования доложены на:

1. «Abstracts of The IX Annual International Scientific-Practical Conference; Medicine Pressing Questions» May 06-08, 2020, Baku, Azerbaijan. «Клинические проявления болезни Паркинсона на примере пациентов г.Актобе» Утегенова А.Б. ISBN: 978-81-942709-5-9; DOI: 10.21467/abstracts.97.
2. Международная научно-практическая конференция: «Нейродегенеративные заболевания: диагностика, интенсивная терапия, коморбидность, реабилитация». «Вопросы дифференциальной диагностики болезни Паркинсона и эссенциального тремора» 10.12.2020 г. г. Уфа.
3. Международная научно-практическая конференция: «Пожилой пациент на амбулаторном приеме» Башкортостан. 24.02.2021 г. Доклад: «Общие особенности диагностики и лечения пожилого пациента с болезнью Паркинсона: данные международных гайдлайнов».
4. Annals of Anatomy. «Severity of depression in Parkinson's disease on the example of patients in Aktobe». Aigerim B. Utegenova, Volume 230S-2020. Aktobe, Kazakhstan, May 27-31, 2021.

Публикации по теме диссертации. По теме диссертации опубликовано 11 научных печатных работ, из них 2 статьи - в издании индексированном в информационной базе Scopus –«Georgian Medical News»; 4 статьи - в изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки РК; 5 тезисов – в сборниках международных конференций (в том числе зарубежных – 3, из них индексируемых в базе Scopus - 1).

Внедрение результатов исследования. Материалы исследования внедрены в практическое здравоохранение – в работу городской поликлиники №1. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры неврологии (Приложение А).

Исследование проведено в рамках НТП «Определение содержания патологических белков в биоптате кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями с целью разработки алгоритма дифференциальной диагностики с клинически схожими заболеваниями», финансируемого МЗ РК на 2019-2021 гг. 0113РКИ0244 от 29.05.2019 г.

Личный вклад автора. Разработка цели и задач научного исследования, проведение набора данных и обследования пациентов, непосредственный анализ регистрационных карт пациентов, интерпретация результатов иммуногистохимического исследования, статистическая обработка результатов исследования, формулирование выводов и рекомендаций.

Структура и объем диссертации. Объем диссертации – 99 страниц машинописного текста, включая титульный лист, содержание, нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, основная часть, заключение, выводы, практические рекомендации и список использованных источников. В конце диссертации приложения. Структура диссертации: разделов

- 3, рисунков - 30, таблиц - 19. Список использованных источников - 222, из них на английском языке – 219.

Материалы и методы исследования.

Проведено простое одномоментное наблюдательное поперечное исследование в рамках НТП, финансируемым из внутривузовского бюджета «Определение содержания патологических белков в биоптате кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями с целью разработки алгоритма дифференциальной диагностики с клинически схожими заболеваниями». Номер госрегистрации: 0113РКИ0244 от 29.05.2019г.

Участие пациентов в исследовании соответствовало принципам Хельсинкской декларации. Заключение локальной биоэтической комиссии ЗКМУ им. М. Оспанова, №6 от 20.06.2022 г.

Критерии включения в основную группу: лица с БП и с синдромом паркинсонизма (СП) в возрасте старше 18 лет.

В контрольную группу вошли относительно здоровые лица без НДЗ в анамнезе старше 18 лет.

Критерии исключения. Из основной группы исключались лица, страдающие другими неврологическими заболеваниями; с суб- и декомпенсированной соматической патологией; больные инфекционными и онкологическими заболеваниями; больные с заболеваниями крови и кроветворных органов; беременные; лица младше 18 лет.

Из контрольной группы исключались лица, страдающие хроническими заболеваниями нервной системы и тяжелыми соматическими заболеваниями в стадии суб- и декомпенсации; больные инфекционными и онкологическими заболеваниями; больные с заболеваниями крови и кроветворных органов; беременные; лица младше 18 лет.

Первичный осмотр пациентов проводился на кафедре неврологии, во время которого было проведено объективное неврологическое обследование с заполнением специфических шкал и опросников. На втором этапе проводилась биопсия кожи для определения альфа-синуклеина методом иммуногистохимического (ИГХ) анализа.

По обращаемости было осмотрено 169 пациентов с направительным диагнозом БП, состоящих на диспансерном учете врачей-неврологов поликлиник г.Актобе. Диагноз БП был подтвержден в 74% (n=125), эссенциальный тремор (ЭТ) – в 20% (n=34), сосудистый паркинсонизм (СП) в 4,7% (n=8) случаях, прогрессирующий надъядерный паралич (ПНП) и деменция с тельцами Леви (ДТЛ) по 1-му случаю.

Средний возраст пациентов составил: БП - 63,73±9,10; ЭТ - 62,94±11,75; СП - 57,62±1,72. Возраст пациентов с ПНП и ДТЛ составил 66 лет и 71 год соответственно. Давность заболевания пациентов: БП - 3,72±3,63; ЭТ - 9,71±8,49; СП - 3,00±2,39 лет; ПНП – 1 год; ДТЛ – 1 год. Количество мужчин и женщин при: БП - 50 и 75; ЭТ – 10 и 24; СП – 5 и 3 соответственно. Случаи ПНП и ДТЛ были представлены женщинами.

Клинические методы исследования:

Клиническое исследование (1-ый этап) включало в себя неврологический осмотр по общепринятой схеме.

Диагноз БП соответствовал критериям «United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank» и диагностических критериев MDS (Movement Disorder Society) 2015г.

Клиническое исследование пациентов с БП включало в себя оценку по шкалам:

- шкала Хен-Яра для определения стадии БП;
- шкала Шваба и Ингланда для определения уровня повседневной активности и способности пациентов к самообслуживанию;
- унифицированная шкала оценки БП, модифицированная Международным обществом изучения двигательных расстройств (MDS-UPDRS) для определения степени выраженности немоторных и моторных проявлений БП;
- Монреальская шкала оценки когнитивных функций (MoCA) для оценки степени когнитивных расстройств;
- госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS) для определения уровня тревоги и депрессии.

Клинический диагноз ЭТ соответствовал критериям Classification of Tremors by the Task Force on Tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society (IPMDS):

1. синдром изолированного кинетического двустороннего тремора верхних конечностей;
2. продолжительность заболевания не менее 3-х лет;
3. с тремором или без тремора в других локализациях (например, головы, голосовых связок или нижних конечностей);
4. отсутствие других неврологических признаков, таких как дистония, атаксия или паркинсонизм.

Клиническое исследование пациентов с ЭТ включало в себя оценку по шкалам: MoCA; HADS.

Клинический диагноз СП соответствовал критериям диагностики сосудистого паркинсонизма: (Левин О.С., 2017):

1. Атипичный характер двигательного расстройства, отличающийся от классической картины паркинсонизма при нейродегенеративных заболеваниях (например, БП) по двигательному рисунку, локализации, наличию сопутствующих синдромов и отражающий логику сосудистого, а не дегенеративного или иного процесса.
 2. Характерное течение: развитие вскоре после инсульта (например, в течение 6 мес.), острое или подострое начало, длительные периоды стабилизации, возможность регресса симптомов, ступенчатое нарастание тяжести синдрома с периодами стабилизации и обратного развития симптомов.
 3. Поражение «стратегических» для паркинсонизма зон, по данным КТ или МРТ.
- Клиническое исследование пациентов с СП включало в себя оценку по шкалам: MoCA; HADS.

Клинический диагноз ПНП выставлялся в соответствии с критериями National Institute of Neurological Disorders and Stroke and the Society for PSP (NINDSSPSP):

- 1) паралич вертикального взора;
- 2) прогрессирующая постуральная неустойчивость с падениями;
- 3) проксимальная акинезия и ригидность, ретроколлиз;
- 4) незначительный ответ на леводопотерапию;
- 5) ранняя дисфагия, дизартрия;
- 6) ранние специфические когнитивные поведенческие черты.

Клиническое исследование пациентки с ПНП включало в себя оценку по шкалам: включало в себя оценку по шкалам: MoCA; HADS.

Клинический диагноз ДТЛ выставлялся в соответствии с диагностическими критериями I. McKeith и соавт. 2005 г.:

1. обязательное прогрессирующее расстройство когнитивных функций, степень которого достаточна для того, чтобы нарушить социальную и профессиональную адаптацию пациента (деменция);
2. мнестические нарушения, необязательные на начальных стадиях заболевания и выраженные при наличии развернутой клинической картины;
3. наличие лобно-подкоркового компонента когнитивных нарушений (нарушение внимания, зрительно-пространственных функций, мышления, регуляторные изменения праксиса и гнозиса);
4. флюктуация когнитивных и эмоционально-аффективных нарушений;
5. преходящие зрительные галлюцинации, подробные, детальные, хорошо очерченные;
6. паркинсонизм, не связанный с предыдущим приемом нейролептиков.

Клиническое исследование пациентки с ДТЛ включало в себя оценку по шкалам: включало в себя оценку по шкалам: MoCA; HADS.

Иммуногистохимические методы исследования

Иммуногистохимический анализ (2-й этап) проводился в лаборатории Познаньского университета медицинских наук (ПУМН, Польша).

Биопсия кожи. Всем пациентам основной (n=56) и контрольной (n=20) групп проводилась биопсия кожи на бедре, на 15 см выше коленной чашечки с помощью 3-миллиметрового дермопанча (Miltex 33-33 Standard Biopsy Punch, 3,0 mm) под местной анестезией 2% лидокаина. Образцы кожи фиксировали в 4% параформальдегиде, растворенном в 0,1М фосфатном буфере, в пробирках Эппендорфа и транспортировали в лабораторию ПУМН. Биоптаты кожи разрезали на 5-миллиметровые срезы с помощью микротомы Leica (LeicaSM2010R) с последующей депарафинизацией с использованием ксилола и 99%-ного этилового спирта. После промывки дистиллированной водой в течение 5 минут срезы инкубировали в цитратном буфере, состоящем из 0,1 М цитрата натрия и 0,1 М лимонной кислоты (pH=6,0), в течение 15 минут при 90°C для извлечения антигена. Срезы охлаждали в течение 2 часов при комнатной температуре и промывали дважды в течение 5 минут в дистиллированной воде. Далее срезы промывали дважды в течение 10 минут фосфатной буферной солью

(PBS), содержащей 0,25% TritonX (Sigma-Aldrich) и инкубировали в течение 60 минут с 5% бычьим сывороточным альбумином (BSA, Sigma-Aldrich) для блокирования связывания неспецифических антител. Затем инкубировали в течение ночи при 4°C с антителом, конъюгированным с анти-альфа-синуклеином флуоресцентный изотиоцианат (FITC, поликлональные кроличьи антитела Bioss, bs-0968R-FITC) 1:100 в буфере разбавления (1% BSA в PBS). В завершении срезы трижды промывались в течение 5 минут в забуференной фосфатной соли и по окончании - в течение 5 минут дистиллированной водой с последующим помещением их в глицерин.

ИГХ анализ на выявление альфа-синуклеина в биоптатах кожи проводили на основе флуоресцентной микроскопии с использованием микроскопа Z1 Axioimager (Zeiss) и лицензионного программного обеспечения Axiovision (Zeiss). Интенсивность флуоресценции, представляющей экспрессию альфа-синуклеина, оценивали по 4-бальной системе, где общая анализируемая площадь биоптата при 20-кратном увеличении оценивалась как:

- 0 баллов - отсутствие специфической флуоресценции;
- 1 балл- слабая флуоресценция – площадь свечения до 25%;
- 2 балла- умеренная флуоресценция - площадь свечения от 26% до 50%;
- 3 балла- сильная флуоресценция – площадь свечения более 50%.

Статистические методы. Для количественных переменных: среднее значение и стандартное отклонение в виде «M±S», таблица частот, ранговые корреляции Спирмена, непараметрические критерия Манна-Уитни. Сравнения трех и более групп по количественным показателям проводились на основе непараметрического критерия Краскела-Уоллеса. Статистическая достоверность различий групп для бинарных и номинальных шкал определялась с использованием хи-квадрат.

Результаты клинического исследования

У пациентов с БП брадикинезия (100%) проявлялась нарушением мелкой моторики: застегивание пуговиц, использование столовых приборов и проведение гигиенических процедур; потеря или уменьшение активности спонтанных движений, жестикуляций; монотонная и гипофоничная речь; дизартрия; гипомимия; снижение моргания.

Мышечная ригидность (55,2%) характеризовалась гипертонусом по типу «зубчатого колеса» в вовлеченной половине тела. Пациенты отмечали боли и тугоподвижность в крупных суставах; скованность в поясничном отделе позвоночника; затруднение поворотов в постели и вставании. Односторонний тремор покоя по типу «скатывания пилюль» (93,6%) был выражен в дистальных отделах рук. Тремор исчезал во время сна. Постуральная неустойчивость (18,5%) наблюдалась у пациентов с 3-ей стадией и выше по шкале Хен-Яра и являлась причиной падений у пациентов. Постуральные деформации (4,8%) проявлялись аномальными осевыми позами (антероколлис, сколиоз, камптокормия). В 12,8% случаях было выявлено «замораживание» походки (акинезия в начале движения при ходьбе). Вегетативная дисфункция (65,6%) проявлялась запорами, ортостатической гипотензией. Гипосмия или аносмия (50,4%) имела двустороннюю локализацию.

Оценка по шкале Хен-Яра (средний балл $1,69 \pm 0,93$): 1-я стадия БП ($n=72$); 2-я стадия ($n=30$); 3-я стадия ($n=19$); 4-я стадия ($n=3$); 5-я стадия ($n=1$).

Средний балл по шкале **Швааба-Ингланда** составил $81,12 \pm 15,72$ балла, при этом пациентам требовалось больше время на выполнение ежедневных задач по самообслуживанию и поддержанию чистоты в доме.

Оценка немоторных и моторных симптомов по шкале MDS-UPDRS. Общий суммарный балл составил $33,71 \pm 23,62$.

Для оценки немоторных симптомов была использована шкала **MDS-UPDRS (1-я часть)**. У пациентов наблюдалась легкая степень немоторных нарушений со средним баллом $7,37 \pm 5,67$.

Когнитивные нарушения (89,5%) выражались брадифренией, нарушением краткосрочной памяти, внимания, зрительно-пространственных и исполнительных функций памяти, абстрактного мышления. Галлюцинации и психоз (2,2%) проявлялись зрительными галлюцинациями. Депрессивные расстройства (12,6%) проявлялись подавленным настроением, трудностями в принятии решений. Тревога (89,5%) отмечалась в виде эмоциональной лабильности, боязливости, обидчивости. Апатия (35,8%) проявлялась замкнутостью, ограничением общения, потерей аппетита, безинициативностью. Синдром дофаминовой дисрегуляции (4,4%) появлялся при самостоятельном увеличении дозы препаратов леводопы без назначения врача и проявлялся жалобами со стороны пациентов на неэффективность препаратов, перееданием и пандингом. Нарушения сна (47,7%) выражались инсомниями, ранними пробуждениями и фрагментацией ночного сна. Дневная сонливость (35,8%) была обусловлена недостаточным количеством дневного сна.

В 44,7% случаях были выявлены боли различной локализации и степени выраженности. Дизурия (2,9%) проявлялись недержанием мочи, чувством неполного опорожнения пузыря, императивными позывами на мочеиспускание. Запоры (28,3%) характеризовались отсутствием стула более 3-х дней и требовали использования слабительных средств на регулярной основе. Головокружение при вставании (22,3%) сопровождалось головной болью, мышечной слабостью, потерей координации и шумом в ушах. Усталость (47%) выражалась крайним утомлением, слабостью, истощением, упадком сил при выполнении привычной для больного нагрузки и ограничивающее его функциональную активность.

При оценке моторных аспектов повседневной жизни пациентов по шкале **MDS-UPDRS (2-я часть)** средний балл составил $7,91 \pm 7,03$. При этом отмечалось нарушение речи в виде дизартрии; слюнотечение и ухудшение почерка из-за тремора. Также пациенты отмечали трудности при переодевании, застегивании пуговиц из-за олигокинезии.

При оценке моторных симптомов БП у пациентов по шкале **MDS-UPDRS (3-я часть)** средний балл составил $17,90 \pm 12,38$. При этом отмечались ослабление модуляции голоса, уменьшение частоты мигания, мышечная ригидность, олигокинезия вовлеченной конечности при пробе постукивания пальцами и кистевых движениях.

При оценке моторных осложнений по шкале **MDS-UPDRS (4-я часть)** средний балл составил $0,53 \pm 2,17$. Дискинезия проявлялась мышечными

подергиваниями и спазмами в руках и ногах. Моторные флюктуации в виде дистонии «включения» описывались пациентами как время начала действия противопаркинсонических препаратов.

Оценка когнитивных функций проводилась по шкале **MoCA**. Средний балл составил $21,04 \pm 4,76$ баллов. У 85,7% пациентов отмечались затруднения при выполнении заданий с использованием зрительно-конструктивных и исполнительных навыков. При выполнении задания «Копирование куба» затруднения отмечались в 71,4% случаях. При выполнении теста рисования часов в 64,3% случаев была допущена одна и более ошибок. 57,4% пациентов не смогли назвать носорога при выполнении задания «Называние трех животных». При оценке краткосрочной памяти сразу после называния слов при первой попытке 85,7% пациентов не смогли вспомнить 2 слова из 5 названных; при отсроченном воспроизведении 92,8% пациентов затруднялись вспомнить 2 и более слова.

Задание на внимание (правильное называние озвученного цифрового ряда в прямом порядке) вызывало затруднения в 64,3% случаях. При выполнении задания назвать цифровой ряд в обратном порядке 87,1% пациентов не смогли справиться с заданием и озвучивали цифровой ряд в прямом порядке. Для оценки внимания исследователь прочитывал список букв, а исследуемый должен был хлопнуть в ладоши только при назывании буквы «А». При выполнении задания у пациентов отмечалась замедленная реакция на вербальные команды - 28,5% пациентов производили хлопок ладошами при назывании другой буквы. Выполнение серийного счета (последовательное вычитание 7 из 100) вызвало затруднения у 50% пациентов со второго цикла.

При повторении двух предложений: «Я знаю только одно, что Иван - это тот, кто может сегодня помочь» и «Кошка всегда пряталась под диваном, когда собаки были в комнате» 84,2% пациента пропускали союзы или слова, меняли местами слова. Оценка беглости речи требовала назвать максимальное количество слов (не менее 11), начинающихся на букву «Л» в течение одной минуты. С заданием не справились 82,8% пациентов (называли менее 6 слов). Нарушение абстрактного мышления (34,2%) проявлялось неправильным выполнением задания назвать общий признак между словами «поезд-велосипед», «часы-линейка». Нарушения ориентации во времени и пространстве (5,7%) выявили ошибки при указании текущей даты и года.

Средний балл по **шкале HADS-1 и HADS-2** составил $5,98 \pm 4,00$ и $7,89 \pm 4,26$ соответственно. У пациентов была диагностирована субклиническая депрессия (постоянное ощущение усталости, чувства вины, эмоциональной лабильности, тоски, напряженности, страхе смерти).

Для оценки взаимосвязи между данными возраста, давности заболевания и показателями моторных и немоторных проявлений, уровня тревоги и депрессии, когнитивных расстройств у пациентов с БП применялся корреляционный анализ. Корреляционный анализ свидетельствовал о наличии статистически значимой прямой корреляционной связи между тяжестью БП с давностью заболевания ($R_s=0,64$, $p \leq 0,01$). Выявленная связь имела заметную тесноту по шкале Чеддока. При клинической интерпретации данного результата можно сделать вывод, что

с увеличением продолжительности заболевания тяжесть заболевания БП по шкале Хен-Яра возрастала. Выявлена статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженностью немоторных и моторных проявлений БП с тяжестью заболевания ($R_s=0,74$, $p\leq 0,01$), имевшая высокую тесноту по шкале Чеддока. Таким образом, немоторные и моторные проявления БП по шкале MDS-UPDRS усугублялись с нарастанием тяжести заболевания по шкале Хен-Яра.

Отмечалась статистически значимая обратная корреляционная связь между уровнем повседневной активности с выраженностью моторных и немоторных проявлений БП ($R_s=(-0,8)$, $p\leq 0,01$) с высокой теснотой по шкале Чеддока. Таким образом, пациенты с более высоким уровнем повседневной активности имели менее выраженные моторные проявления. Была установлена статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженности немоторных симптомов с уровнем депрессии ($R_s=0,54$, $p\leq 0,01$) с заметной теснотой по шкале Чеддока. Так, при возрастании выраженности депрессии по шкале HADS отмечался рост немоторных проявлений по шкале MDS-UPDRS 1.

Выявлена статистически значимая прямая корреляционная связь между выраженностью двигательных нарушений с тяжестью заболевания ($R_s=0,69$, $p\leq 0,01$). Выявленная связь имела заметную тесноту по шкале Чеддока, что свидетельствовало об усугублении выраженности двигательных симптомов БП по шкале MDS-UPDRS-3 с прогрессированием тяжести заболевания по шкале Хен-Яра. Была установлена статистически значимая обратная корреляционная связь между выраженностью когнитивных нарушений с возрастом исследованных пациентов с БП ($R_s=-0,33$, $p\leq 0,01$), имевшая умеренную тесноту по шкале Чеддока. Таким образом, с увеличением возраста исследованных лиц отмечалось снижение когнитивных показателей по шкале MoCA. Также была выявлена статистически значимая обратная корреляционная связь между выраженностью когнитивных нарушений и уровнем моторных аспектов повседневной жизни ($R_s=-0,42$, $p\leq 0,01$) с умеренной теснотой по шкале Чеддока. В данном случае у пациентов с высокими показателями когнитивных функций по шкале MoCA наблюдались менее выраженные нарушения моторных аспектов повседневной жизни по шкале MDS-UPDRS-2.

Результаты клинической дифференциальной диагностики БП с клинически схожими заболеваниями

Диагноз ЭТ установлен 34-м пациентам из 169 направленных на исследование. При этом не было выявлено моторных симптомов, формирующих клиническое ядро БП (брадикинезия, мышечная ригидность, поструральная неустойчивость). Тремор (100%) проявлялся симметричным, кинетическим или поструральным билатеральным дрожанием верхних конечностей в сочетании с тремором по типу «да-да» или «нет-нет» головы. По одному случаю были выявлены гипосмия и вегетативная дисфункция (гипотония и запоры). Средний балл по шкале HADS-1 и HADS-2 составил $4,03\pm 4,22$ и $5,44\pm 3,92$ соответственно и демонстрировали снижение когнитивных функций ($22,76\pm 5,79$). При исследовании корреляционной связи между возрастом пациентов с ЭТ со степенью когнитивных функций по шкале MoCA была установлена

статистически значимая обратная корреляционная связь ($R_s = -0,46$, $p \leq 0,01$). Выявленная связь имела умеренную тесноту по шкале Чеддока. Полученный результат показал, что с увеличением возраста пациентов с ЭТ отмечалось снижение когнитивных функций.

В результате клинической диагностики нами был выставлен диагноз СП в 8 случаях. При этом, брадикинезия (100%) проявлялась замедленностью ходьбы, «примагничиванием» стоп при инициации ходьбы. Тремор (75%) наблюдался в нижних конечностях. Постуральная неустойчивость (50%) характеризовалась нарушением равновесия, падениями и латеропульсией. Мышечная ригидность (62,5%) характеризовалась сочетанием гипертонуса по пластическому и спастическому типу.

Вегетативная дисфункция (62,5%) проявлялась артериальной гипотензией и запорами. Наличие гипосмии оценивалось по результатам опроса пациентов (37,5%). Средний балл по шкале HADS-1 и HADS-2 составил $5,75 \pm 3,65$ и $9,50 \pm 4,57$ соответственно. Была диагностирована клиническая депрессия (постоянное ощущение усталости, чувство вины, эмоциональная лабильность, тоска, напряженность, страх смерти). Оценка когнитивных функций по шкале MoCA выявила их снижение ($21,50 \pm 3,82$).

Сравнительный анализ клинических проявлений БП, ЭТ, СП.

В результате проведенного сравнительного анализа статистически значимых различий возраста в зависимости от диагноза выявлено не было. Отмечались статистически значимые различия давности заболевания в зависимости от диагноза ($p = 0,005$). При сравнении групп попарно было установлено, что давность заболевания у пациентов с ЭТ была существенно выше, чем при БП ($p = 0,006$). При сравнении частоты тремора, ригидности, брадикинезии, постуральной неустойчивости, гипосмии и вегетативной дисфункции в зависимости от диагноза исследуемых были получены статистически значимые различия. Наиболее значимые различия обнаружены для показателя гипосмии у пациентов с БП по отношению к пациентам с ЭТ (превышение на 47,5%; $P < 0,0001$); брадикинезии у пациентов с СП по отношению к пациентам с ЭТ (превышение на 100,0%; $P < 0,0001$); ригидности у пациентов с СП по отношению к пациентам с ЭТ (превышение на 62,5%; $P < 0,0001$).

Были выявлены статистически значимые различия показателей тревожности ($p = 0,0020$) и депрессии ($p = 0,0012$) в зависимости от диагноза. При сравнении групп попарно было установлено, что в группах пациентов с ЭТ и БП статистически значимые различия были выявлены между показателями тревожности (HADS-1; $p = 0,0024$) и депрессии (HADS-2; $p = 0,0041$) пациентов. В группах пациентов с ЭТ и СП были выявлены статистически значимые различия по показателю депрессии (HADS-2; $p = 0,0278$).

В группах пациентов с БП и СП статистически значимых различий по данным возраста, давности заболевания, уровню тревожности и депрессии выявлено не было, что может указывать на возможную общность патогенетических механизмов БП и СП и приводить к трудностям дифференциальной диагностики между ними.

Результаты иммуногистохимического исследования

Во 2-м этапе исследования участвовали 56 пациентов: БП (n=47), ЭТ (n=6), СП(n=3) и 20 здоровых лиц контрольной группы. Контрольная группа состояла из здоровых добровольцев без НДЗ в момент исследования и в анамнезе. Количество женщин в основной группе - 36 человек (64%), мужчин - 20 (36%). Количество женщин в контрольной группе - 15 (75%), мужчин - 5 (25%). Средний возраст в основной и контрольной группах составил $61,41 \pm 8,45$ и $61,45 \pm 10,2$ соответственно. Основная и контрольная группы были сопоставимы по возрастным показателям ($P=0,98$).

Экспрессия альфа-синуклеина классифицировалась с точки зрения качественной оценки. Классификация основана на анализах контрольной группы и статистической оценке нормальных значений для экспрессии альфа-синуклеина. Нормальным значением была интенсивность иммуногистохимической реакции ниже 95 доверительного интервала (ДИ) медианы в контроле. Референсные значения для экспрессии альфа-синуклеина в эпидермисе и дерме составили 0 баллов. Данные значения представляют собой 95% ДИ для медианы в контрольной группе.

Иммуногистохимический анализ выявил отложения альфа-синуклеина в биоптатах кожи у лиц основной и контрольной групп в 96,43% и 15% случаях соответственно. Количественные показатели альфа-синуклеина в биоптатах кожи оценивались по интенсивности флюоресценции альфа-синуклеина (от 0 до 3 баллов) и имели статистически значимые различия между основной и контрольной группами ($p < 0,0001$).

Для оценки клинической информативности прогностической значимости качественного и количественного показателя альфа-синуклеина в биоптате кожи пациентов с БП был проведен ROC-анализ (receiver operating analysis). Экспрессия альфа-синуклеина в биоптатах кожи показала $AUC=0,993$, $P < 0,001$ с чувствительностью 90,9% и специфичностью 100%. Уровень отсечки (cut-off) показателя альфа-синуклеина составил 1. Индекс Юдена=0,8571.

Результаты клинико-иммуногистохимического анализа. При оценке экспрессии альфа-синуклеина в биоптатах кожи исследованных лиц были выявлены статистически значимые различия экспрессии белка у пациентов с БП (Me 3; IQR 1-3), СП (Me 2; IQR 2-3) и ЭТ (Me 2; IQR 1-3) по сравнению с контрольной группой (Me 0; IQR 0-1) ($P < 0,000001$). Экспрессия альфа-синуклеина у пациентов с БП была значительно ($P < 0,000001$) выше по сравнению с пациентами с ЭТ. Наблюдалась тенденция к более высоким показателям альфа-синуклеина (Me 3) у пациентов более старшего возраста (Me 65; IQR 57,5 - 69,5), в то время как у более молодых пациентов (Me 56; IQR 41,5 - 63,2; $P = 0,0571$) были выявлены более низкие показатели альфа-синуклеина (Me 2). Не было выявлено корреляции между интенсивностью экспрессии альфа-синуклеина и длительностью заболевания.

Установлено, что у пациентов с брадикинезией уровень альфа-синуклеина был выше, чем у пациентов без таковой: $2,46 \pm 0,65$ и $2,06 \pm 0,66$ соответственно ($p=0,041$). При сравнении экспрессии альфа-синуклеина у пациентов с вегетативной дисфункцией с экспрессией альфа-синуклеина у пациентов без

вегетативной дисфункции наблюдалась тенденция к более высокой экспрессии альфа-синуклеина у пациентов с вегетативной дисфункцией ($p=0,0548$). По мере прогрессирования заболевания отмечалась более выраженная экспрессия белка альфа-синуклеина. При этом была выявлена экспрессия альфа синуклеина с оценкой в 3 и 2 балла у пациентов со стадиями заболевания по шкале Хен-Яра (Me 1,25; IQR 1,0-2,0) и (Me 1,0; 0,0-1,5) соответственно ($p=0,0273$).

При оценке результатов корреляционного анализа были выявлены прямые статистически значимые умеренной тесноты связи (r Spearman = 0,307; $P=0,0237$) экспрессии альфа-синуклеина со стадией прогрессирования заболевания по шкале Хен-Яра. У пациентов с БП с более высокой степенью повседневной активности по шкале Швааба и Ингланда отмечалась более выраженная экспрессия белка альфа-синуклеина. Так, отмечалась тенденция к более высокой экспрессии альфа-синуклеина (Me 3) у пациентов с оценкой по шкале Швааба-Ингланда (Me 80; IQR 60,0-85,0) и (Me 2) у пациентов с оценкой по шкале Швааба-Ингланда (Me 70; IQR 0,0-80,0) ($P=0,0542$).

В результате иммуногистохимического анализа экспрессии альфа-синуклеина в биоптатах слоев кожи было выявлено отсутствие альфа-синуклеина в эпидермисе, потовых железах, мышцах выпрямляющих волоски - *m. arrector pili*. В сосудах слоев кожи также не было обнаружено патологических накоплений белка альфа-синуклеина. Экспрессия альфа-синуклеина наблюдалась только в нервных окончаниях дермальной стромы.

Формирование рискованных классов развития БП

С целью разработки алгоритма ранней диагностики БП было проведено многофакторное прогнозирование целевой переменной – «дерево решений». По результатам исследования было выявлено три влияющих фактора, комбинация которых определяла показатель «БП, есть»: «Вегетативная дисфункция», «Давность заболевания» и «Гипосмия».

На основе данного метода для целевого показателя «БП, есть» было выделено 4 рискованных класса с уровнями риска от 20,0% до 92,1% с помощью трёх основных влияющих факторов: «Вегетативная дисфункция»; «Давность заболевания»; «Гипосмия»). Наиболее высокий риск 92,1% ($n=89$) демонстрировал показатель «БП, есть» у пациентов с фактором: «Вегетативная дисфункция (Есть)».

Наименьший уровень риска 20,0% ($n=30$) развития показателя «БП, есть» наблюдался при комбинации факторов: «Вегетативная дисфункция (Нет)» и «Давность заболевания $\geq 3,0$ ». Прогнозное качество данной построенной модели имеет высокий уровень.

ROC-анализ и прогнозные показатели качества построенного дерева решений для целевого показателя «БП, есть». Значение AuROC (0,85) свидетельствовало о высоком прогнозном качестве смоделированного дерева решений. При оценке риска $\geq 63,3\%$ ожидался положительный результат; в противном случае - отрицательный. Так, в 94,3% случаях идентифицирован положительный результат и в 70,6% случаях - отрицательный.

На основании метода дерева решений нами был разработан пошаговый алгоритм ранней диагностики БП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании полученных результатов проведенного нами исследования можно сделать следующие **выводы**:

1. В результате клинической диагностики с использованием диагностических критериев Банка головного мозга и критериев MDS-2015, из всех исследованных 169 (100%) пациентов с направительным диагнозом болезнь Паркинсона, данный диагноз был подтвержден в 125 случаях (74%). В остальных случаях клинически были установлены: эссенциальный тремор – n=34 (20%), сосудистый паркинсонизм – n=8 (4,7%), прогрессирующий надъядерный паралич и деменция с тельцами Леви по 1-му случаю.

2. Альфа-синуклеин в биоптате кожи пациентов с болезнью Паркинсона был выявлен в 95,7% случаях, что свидетельствует о наличии взаимосвязи развития болезни Паркинсона с отложениями патологического альфа-синуклеина в коже пациентов. Диагностический тест по выявлению альфа-синуклеина в коже пациентов БП имеет высокую чувствительность и специфичность в 90,9% и 100% соответственно, что позволяет рассматривать альфа-синуклеин в качестве биомаркера болезни Паркинсона. У пациентов с брадикинезией уровень альфа-синуклеина был выше, чем у пациентов без брадикинезии ($P=0,041^*$). Уровень альфа-синуклеина имел прямую корреляционную связь умеренной тесноты с тяжестью заболевания по шкале Хен-Яра ($r = 0,307$; $P=0,0237$).

3. На основе многофакторного прогнозирования выявлены комбинации трёх влияющих факторов: «Вегетативная дисфункция (есть)», «Давность заболевания < 3,0 лет» и «Гипосмия (есть)», при наличии которых риск развития болезни Паркинсона составляет от 74,0% до 92,1%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью улучшения диагностики и дифференциальной диагностики болезни Паркинсона необходимо проведение консультаций и динамического наблюдения пациентов в условиях специализированных кабинетов / центров дегенеративных заболеваний нервной системы.

2. Выявление фосфорилированного альфа-синуклеина в биоптате коже пациентов может рассматривать альфа-синуклеин в качестве биомаркера при диагностике болезни Паркинсона.

3. При первичном обращении пациентов с подозрением на БП врачам-неврологам амбулаторного звена рекомендуется использование диаграммы «дерева решений» для показателя «БП, есть» на основе комбинации трёх влияющих факторов: «Вегетативная дисфункция (есть)», «Давность заболевания < 3,0 лет» и «Гипосмия (есть)» и разработанного пошагового алгоритма ранней диагностики БП.

4. Полученные результаты научного исследования могут быть использованы в оформлении методических рекомендаций для врачей-неврологов и в образовательной программе резидентуры «Неврология взрослая, детская».