

# Сравнительный анализ диагностической значимости иммуногистохимического исследования слюнной железы и ультразвукового исследования чёрной субстанции при болезни Паркинсона

К.К. Хачева<sup>1</sup>, А.В. Карабанов<sup>1</sup>, Р.Р. Богданов<sup>2</sup>, Д.Н. Воронков<sup>1</sup>, В.Б. Соболев<sup>1</sup>, А.О. Четчин<sup>1</sup>, А.Д. Данилова<sup>2</sup>,  
А.М. Сипкин<sup>2</sup>, С.Н. Иллариошкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия;

<sup>2</sup>ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского», Москва, Россия

## Аннотация

**Введение.** Существует необходимость в разработке новых методов инструментальной диагностики болезни Паркинсона (БП). Известным методом ранней диагностики БП является транскраниальная сонография черной субстанции (ТКС ЧС), однако она имеет ряд ограничений. В последние годы для верификации БП предложено прижизненное исследование биоптатов слюнной железы и других тканей на наличие патологических форм  $\alpha$ -синуклеина.

**Материал и методы.** Обследованы 12 пациентов с БП, оценка по шкале Хён-Яра  $2,3 \pm 0,4$ . Всем пациентам проведены клиническая оценка по шкалам UPDRS, NMSQ, NMSS, RBDSQ, PDQ-8, MoCA, HADS; ТКС ЧС; иммуногистохимическое исследование биопсии подъязычной слюнной железы на наличие фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина ( $\text{f-}\alpha$ -син) с автоматизированным морфометрическим анализом его распространённости.

**Результаты.** Гиперэхогенность ЧС отмечена у 75% пациентов, тогда как наличие  $\text{f-}\alpha$ -син по данным биопсии выявлено у 100% пациентов. Площадь эхогенного сигнала от ЧС составила  $0,24 [0,21; 0,3]$  см<sup>2</sup>. Площадь включений  $\text{f-}\alpha$ -син составила от  $28,47 [27,55; 96,26]$  до  $238,77 [234,13; 272,49]$  мкм<sup>2</sup>, а доля  $\text{f-}\alpha$ -син относительно площади нервных волокон — от 13,4% до 93,4% у разных пациентов. Показана связь между долей  $\text{f-}\alpha$ -син и суммой баллов по NMSQ ( $r = 0,8; p < 0,001$ ), NMSS ( $r = 0,9; p < 0,001$ ), PDQ-8 ( $r = 0,7; p = 0,003$ ), UPDRS-I ( $r = 0,7; p = 0,009$ ), UPDRS-II ( $r = 0,6; p = 0,03$ ), HADS (тревога  $r = 0,8; p = 0,002$ ; депрессия  $r = 0,6; p = 0,04$ ).

**Выводы.** Результаты свидетельствуют о более высокой чувствительности биопсийного метода по сравнению с ТКС ЧС. Впервые метод автоматизированного морфометрического анализа применён к оценке распространённости маркера БП  $\text{f-}\alpha$ -син. Результаты иммуногистохимического анализа прямо связаны с выраженностью немоторных симптомов, что позволяет предположить высокую вероятность выявления  $\text{f-}\alpha$ -син и подтверждения диагноза у пациентов на самых ранних стадиях заболевания.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; транскраниальная сонография; биопсия слюнной железы; иммуногистохимия;  $\alpha$ -синуклеин; морфометрия

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 9-5/21 от 13.10.2021).

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность Б.В. Покрепину, инженеру Научно-исследовательского института прикладной механики и электродинамики МАИ, за ценные рекомендации по статистической обработке данных на языке программирования Python.

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Адрес для корреспонденции:** 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80. ФГБНУ «Научный центр неврологии».  
E-mail: christina.khacheva@gmail.com. Хачева К.К.

**Для цитирования:** Хачева К.К., Карабанов А.В., Богданов Р.Р., Воронков Д.Н., Соболев В.Б., Четчин А.О., Данилова А.Д., Сипкин А.М., Иллариошкин С.Н. Сравнительный анализ диагностической значимости иммуногистохимического исследования слюнной железы и ультразвукового исследования чёрной субстанции при болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2023; 17(1): 36–42.

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.1.5>

Поступила 10.08.2022 / Принята в печать 22.09.2022 / Опубликовано 25.03.2023

# Salivary gland immunohistochemistry vs substantia nigra sonography: comparative analysis of diagnostic significance

Kristina K. Khacheva<sup>1</sup>, Alexey V. Karabanov<sup>1</sup>, Rinat R. Bogdanov<sup>2</sup>, Dmitry N. Voronkov<sup>1</sup>, Valery B. Sobolev<sup>1</sup>,  
Andrey O. Chechetkin<sup>1</sup>, Anastasia D. Danilova<sup>2</sup>, Alexander M. Sipkin<sup>2</sup>, Sergey N. Illarioshkin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Center of Neurology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia

## Abstract

**Introduction.** Parkinson's disease (PD) urges for new instrumental methods of diagnosis. Transcranial sonography of the substantia nigra (SN TCS) is an established method for early PD diagnosis but its application is limited. Recently, biopsies (primarily that of salivary gland) and test for abnormal  $\alpha$ -synuclein are suggested to verify PD.

**Materials and methods.** We assessed 12 individuals with PD, Hoehn–Yahr  $2.3 \pm 0.4$ . The assessments included: UPDRS, NMSQ, NMSS, RBDSQ, PDQ-8, MoCA, and HADS scoring; SN TCS; and sublingual gland immunohistochemistry for phosphorylated  $\alpha$ -synuclein (PS-129) with automated morphometric analysis.

**Results.** Substantia nigra hyperechogenicity was shown in 75% of patients whereas biopsy revealed PS-129 in 100% of patients. Echogenic area of the substantia nigra was  $0.24 [0.21; 0.3] \text{ cm}^2$ . PS-129 inclusion area varied from  $28.47 [27.55; 96.26]$  to  $238.77 [234.13; 272.49] \mu\text{m}^2$ , and PS-129 proportion varied from 13.4% to 93.4% of the nervous fiber area across the patients. We found relations between PS-129 and NMSQ ( $r = 0.8; p < 0.001$ ), NMSS ( $r = 0.9; p < 0.001$ ), PDQ-8 ( $r = 0.7; p = 0.003$ ), UPDRS-I ( $r = 0.7; p = 0.009$ ), UPDRS-II ( $r = 0.6; p = 0.03$ ), and HADS (anxiety  $r = 0.8; p = 0.002$ ; depression  $r = 0.6; p = 0.04$ ) scores.

**Conclusion.** The results demonstrate a higher biopsy sensitivity as compared to SN TCS. Automated morphometric analysis has been newly applied to assess PS-129 occurrence. Immunohistochemistry results are directly related to non-motor symptom severity, which may indicate high probability of PS-129 presence and diagnosis confirmation in early disease.

**Keywords:** Parkinson's disease; transcranial sonography; salivary gland biopsy; immunohistochemistry;  $\alpha$ -synuclein; morphometry

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research Center of Neurology (protocol No. 9-5/21, October, 13, 2021).

**Acknowledgement.** The authors are grateful to B.V. Pokrepin, engineer of the Research Institute of Applied Mechanics and Electrodynamics of the Moscow Aviation Institute, for valuable recommendations on statistical data processing in the Python programming language.

**Source of funding.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For correspondence:** 125367, Russia, Moscow, Volokolamskoye shosse, 80. Research Center of Neurology.  
E-mail: christina.khacheva@gmail.com. Khacheva K.K.

**For citation:** Khacheva K.K., Karabanov A.V., Bogdanov R.R., Voronkov D.N., Sobolev V.B., Chechetkin A.O., Danilova A.D., Sipkin A.M., Illarioshkin S.N. Salivary gland immunohistochemistry vs substantia nigra sonography: comparative analysis of diagnostic significance. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2023; 17(1): 36–42. (In Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.54101/ACEN.2023.1.5>

Received 10.08.2022 / Accepted 22.09.2022 / Published 25.03.2023

## Введение

Нейродегенеративные заболевания занимают лидирующие позиции в ряду других неврологических патологий в современном обществе [1]. В настоящее время одним из наиболее распространённых нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП), которая в разных странах встречается у 1–4% лиц старше 60 лет [2]. В этиопатогенезе БП решающая роль отводится комбинации генетических и средовых факторов, причём среди последних основное значение придаётся воздействию ряда нейротоксинов (пестициды, тяжёлые металлы, липофильные токсичные химические соединения) [1, 3–6].

Первые симптомы БП, связанные с нарушением движения, проявляются только после гибели более половины нейронов и снижения уровня дофамина более чем на 80% в nigrostriарной системе [8]. Благодаря развитию теории

Н. Браак было найдено объяснение позднему возникновению двигательного дефицита и раннему (часто ретроспективному) выявлению таких немоторных признаков БП, как нарушения поведения в REM-фазе сна, гипсомия, изменения моторики желудочно-кишечного тракта и другие вегетативные нарушения [9–11]. Согласно данной теории первые морфологические изменения, связанные с накоплением в нервной ткани основного патологического субстрата БП — фосфорилированной формы белка  $\alpha$ -синуклеина, происходят в продолговатом мозге, в дорсальном двигательном ядре блуждающего нерва, передних структурах обонятельного анализатора, а также в периферической вегетативной нервной системе, иннервирующей в том числе желудочно-кишечный тракт, слюнные железы (СЖ), сосуды, кожу.

Отсутствие до 2015 г. немоторных симптомов в диагностических критериях Movement Disorder Society (MDS)

приводило к относительно позднему распознаванию БП [12]. Внесение нарушений обоняния и признаков симпатической денервации в новую версию критериев данного заболевания стало важным шагом в совершенствовании диагностики, однако даже в настоящее время диагноз БП, установленный на ранних стадиях в соответствии с критериями MDS-2015, является верным только в 58% случаев [13].

В качестве дополнительных диагностических инструментов для подтверждения диагноза БП используются высокопольная МРТ в режиме Susceptibility Weighted Imaging и транскраниальная сонография чёрной субстанции (ТКС ЧС). Метод ТКС ЧС по сравнению МРТ является более доступным вследствие его меньшей стоимости, быстроты проведения и отсутствия противопоказаний. Тем не менее существенным ограничением метода является зависимость от качества височного ультразвукового окна (оно отсутствует по меньшей мере в 10% случаев в популяции и вероятность этого значительно возрастает у лиц старше 60 лет), квалификации специалиста, класса используемой аппаратуры [2]. При ТКС ЧС высока вероятность обнаружения артефактов [14]. По данным зарубежных источников, чувствительность ТКС ЧС при БП составляет 85%, специфичность — 71% [15], в связи с чем продолжают поиски высокочувствительного, специфичного и максимально объективного метода прижизненной диагностики БП.

В литературе описаны подходы к прижизненному изучению материала органов с обильной вегетативной иннервацией (прямой кишки и кожи пациентов с БП, а также СЖ), полученных с помощью методов тонкоигольной биопсии с целью иммуногистохимического выявления патологических форм  $\alpha$ -синуклеина. По данным систематического обзора, чувствительность биопсийного метода составляет 90%, специфичность — до 100% [16]. В то же время биопсийный метод имеет ряд ограничений и требует специальных условий и возможностей для его проведения. Так, исследование биопсий прямой кишки сопряжено со сложной предварительной подготовкой к процедуре, риском прободения кишки в процессе получения материала и другими осложнениями, а результаты биопсии кожи характеризуются относительно низкой частотой выявления патологических форм  $\alpha$ -синуклеина и значительно зависят от области взятия материала [17, 18]. Недостатками использования тонкоигольной биопсии в исследовании крупных СЖ и инцизионной биопсии малых СЖ являются небольшое количество получаемого материала (что не позволяет в полной мере оценить распределение маркера заболевания) и высокая вероятность взятия ткани соседствующих с СЖ структур (жировой ткани, ткани лимфатических узлов) вместо собственно саливарных структур [19]. С целью минимизации этих ограничений в 2017 г. было предложено использование инцизионной биопсии подъязычной СЖ в качестве объекта для иммуногистохимического изучения патологического фосфорилированного  $\alpha$ -синуклеина (ф- $\alpha$ -син), с последующей разработкой деталей методики проведения исследования [17, 20]. Преимуществами данного метода является отсутствие необходимости сложной предварительной подготовки к процедуре, минимальные риски осложнений и высокая вероятность нахождения специфических изменений благодаря оптимальному объёму морфологически сохранной ткани крупной СЖ.

**Целью** настоящей работы явилось изучение диагностической значимости иммуногистохимического исследования подъязычной СЖ пациентов с БП в сопоставлении с методом ТКС ЧС, а также оценка возможных взаимосвязей между клиническими данными и результатами инструментальных исследований.

## Материалы и методы

В открытом проспективном исследовании участвовали пациенты в возрасте 40–80 лет с диагнозом БП (МКБ-10 G.20), установленным в соответствии с критериями MDS 2015. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ НЦН (протокол № 9-5/21). Все пациенты подписывали форму информированного согласия до включения в исследование. Пациенты, имеющие другое неврологическое заболевание, тяжёлую соматическую и/или психическую патологию, выраженные когнитивные нарушения (деменция, Montreal Cognitive Assessment (MoCA) < 17 баллов) не включались в исследование.

Проводились клиническая оценка неврологического статуса пациентов, оценка стадии БП по функциональной шкале Хён–Яра, моторных и немоторных симптомов БП по шкалам Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), Non-Motor Symptoms Questionnaire (NMQ), Non-Motor Symptoms Scale (NMSS), оценка качества жизни по опроснику Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-8), оценка когнитивного статуса по шкале MoCA, тревоги и депрессии по шкале The Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS), REM-фазы сна REM по опроснику Sleep Behavior Disorder Screening Questionnaire (RBDSQ).

ТКС ЧС осуществляли в лаборатории ультразвуковой диагностики ФГБНУ НЦН на приборе «Philips CX 50» («Philips») фазированным секторным датчиком S5-1 по общепринятой методике [2]. В случае обнаружения гиперэхогенности ЧС эту область обводили вручную курсором с последующим автоматическим расчётом площади (см<sup>2</sup>). Из показателей площади гиперэхогенности с двух сторон для статистического анализа выбирали одно максимальное значение. Расчёт площади гиперэхогенности ЧС проводился автоматически после выделения её границ вручную.

В отделении челюстно-лицевой хирургии МОНИКИ им М.Ф. Владимирского всем пациентам в амбулаторных условиях проводилась биопсия подъязычной СЖ. Под аппликационной анестезией осуществляли катетеризацию выводного протока подчелюстной СЖ. Далее, ориентируясь на его локализацию, производили инфильтрационную анестезию и разрез длиной 1 см, на 0,5–1,0 см латеральнее проекции протока на слизистую оболочку подъязычной области и параллельно ему. Выделяли часть подъязычной СЖ и забирали фрагмент размером 0,5 × 0,5 × 0,5 мм. Слизистую оболочку ушивали 1–2 швами, которые снимали через 7 дней после биопсии. Все пациенты получали рекомендации от челюстно-лицевого хирурга по уходу за областью биопсии. В течение 12 мес после биопсии проводилось динамическое наблюдение за состоянием пациентов с целью оценки возникновения нежелательных явлений.

Биопсийный материал для иммуногистохимического исследования обрабатывали по методике [17]. Образцы материала фиксировали в 4% растворе формалина, приго-

товленном на фосфатном буфере. После этого материал дегидратировали в этиловом, изопропиловом спиртах, смеси изопропилового спирта с хлороформом и заключали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 10 мкм помещали на стёкла (по 8 срезов на 1 стекло), покрытые адгезивной средой, и проводили их иммуногистохимическое (иммуноферментное) окрашивание антителами к ф- $\alpha$ -син (clone 81A, ab184674, «Abcam») и к маркеру нервных волокон PGP-9.5 (ab108986, «Abcam»). Для реакции использовали 16 срезов. Демаскировку антигена проводили с помощью теплового метода — нагревания в микроволновой печи мощностью 600 Вт в течение 10 мин в цитратном буферном растворе (0,1 М, pH 6,0). В работе применяли иммуноферментный метод детекции связывания антител. Для выявления двойной метки использовали набор «MultiVision TL-012-MARH» («Thermo Scientific»), основанный на полимерной системе детекции. В качестве негативного контроля использовали окрашивание на срезах без обработки первичными антителами. Для морфологического контроля сохранности материала до проведения иммуногистохимического исследования 16 срезов с каждой биопсии окрашивали гематоксилином и эозином. Независимую оценку полученных препаратов осуществляли три исследователя. Препараты изучали и фотографировали под микроскопом «Leica DMLB» при 100-кратном увеличении. С каждого среза на препарате было случайным образом выбрано по одному полю зрения для получения микрофотографий, которые в дальнейшем использовались для морфометрического анализа.

Автоматизированный морфометрический анализ проводили с помощью программы, написанной на языке программирования Python 3.9 с использованием библиотеки Open CV для расчётов и scikit-image для обработки фотографий по методике, принципиально основанной на работе И.С. Гуменюк и соавт., в которой была продемонстрирована эффективность автоматизированного метода в оценке белков внеклеточного матрикса на материале сердца приматов и опухоли яичника у человека [21]. После нормализации экспозиции проведена цветовая деконволюция изображений. Пороговое значение для каждого цвета маркера, а также пороговое расстояние между маркерами ( $\leq 10$  пикселей или  $\leq 0,069$  мкм) было определено вручную на основании данных анализа множества микрофотографий, окрашенных аналогичными красителями, из библиотеки изображений лаборатории нейроморфологии ФГБНУ НЦН. Для каждого изображения рассчитывали общую площадь включений ф- $\alpha$ -син в мкм (1 пиксель = 0,0069 мкм), общую площадь нервных волокон и отношение площади включений к площади нервных волокон (в процентах). В результате анализа всех микрофотографий материала каждого пациента получали среднее значение площади включений ф- $\alpha$ -син в мкм.

Демографические и клинические данные пациентов обрабатывали с помощью языка программирования Python и модуля SciPy. Для оценки нормальности распределения использовали тест Шапиро–Уилка. Наличие связей между явлениями определяли в корреляционном анализе Спирмена. Данные представлены в виде среднего ( $M$ ) и ошибки среднего ( $SD$ ) или медианы и квартилей [ $Q_1$ ,  $Q_3$ ] в зависимости от нормальности их распределения. В качестве границы уровня значимости принято значение  $p = 0,05$ .

## Результаты

В исследование были включены 12 пациентов (8 мужчин и 4 женщины) в возрасте 44–77 лет (средний возраст  $58,7 \pm 7,8$  года) с диагнозом БП, соответствующим критериям MDS-UPDRS 2015. Средняя длительность заболевания с момента постановки диагноза составила  $5,3 \pm 3,6$  года.

Несколько пациентов имели в анамнезе указание на наличие от 1 до 3 факторов риска развития БП, в том числе 6 человек перенесли в прошлом травму головы, 2 пациента длительно находились в условиях экспозиции различными химическими веществами (фенол, хлористый аммоний, красители, алюминиевый порошок, уран). Ни один из пациентов не имел родственников с нейродегенеративными заболеваниями.

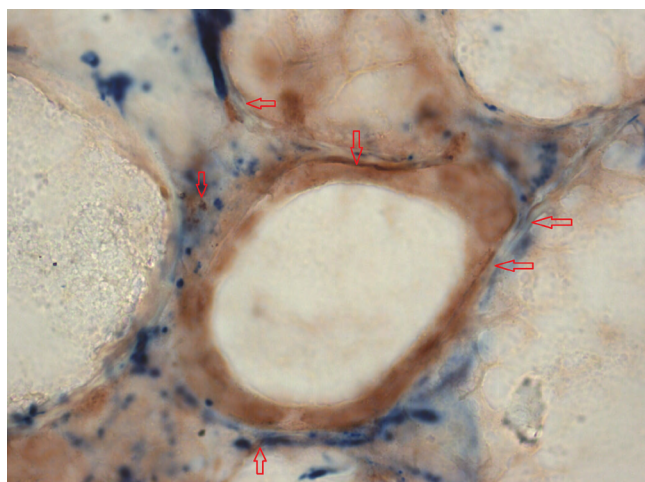
Наиболее распространённая смешанная форма БП была диагностирована у 9 (75%) пациентов, акинетико-ригидная форма — у 2 (16,6%), дрожательная — у 1 (8,3%). Средняя стадия БП по шкале Хён–Яра составила  $2,3 \pm 0,4$ .

Тяжесть моторных нарушений у пациентов в среднем составила  $30,75 \pm 9,08$  балла по подшкале UPDRS-III. Субъективные нарушения повседневной активности отмечались у всех пациентов, их выраженность в среднем составила  $6,5$  [4,75; 14,25] балла по подшкале UPDRS-II. Корреляционный анализ выявил наличие сильной положительной связи между выраженностью моторных нарушений по UPDRS-III и стадией болезни по шкале Хён–Яра ( $r = 0,8$ ;  $p = 0,0009$ ). Выраженность немоторных нарушений при оценке по подшкале UPDRS-I составила  $10,5$  [8; 14,25] балла, по шкале NMSS —  $49,5 \pm 35,5$  балла, по NMSQ —  $9,40 \pm 5,05$  балла. Расстройство REM-фазы сна по опроснику RBDSQ (суммарный балл  $\geq 5$ ) были характерны для 6 пациентов, средний балл RBDSQ по всей выборке исследованных пациентов составил  $5,5$  [2,75; 8,25] балла. В целом пациенты не имели значимых когнитивных нарушений (средний показатель по шкале MoCA  $26,5 \pm 1,6$  балла) и психоэмоциональных расстройств (HADS-тревога —  $5,4 \pm 3,9$  балла; HADS-депрессия —  $4,5 \pm 3,2$ ). Средний показатель качества жизни по шкале PDQ-8 составил  $27,3 \pm 25,6$ , что свидетельствовало об относительно высоком качестве жизни пациентов. Анализ по Спирмену продемонстрировал наличие сильной и очень сильной положительной связи между данными шкал качества жизни (PDQ-8), немоторных симптомов (NMSS, NMSQ) и субъективной оценки нарушения повседневной активности (UPDRS-II): NMSS–PDQ-8 —  $r = 0,75$ ;  $p = 0,005$ ; NMSS–UPDRS2 —  $r = 0,6$ ;  $p = 0,03$ ; NMSQ–PDQ-8 —  $r = 0,75$ ;  $p = 0,005$ ; NMSQ–UPDRS2 —  $r = 0,6$ ;  $p = 0,04$ .

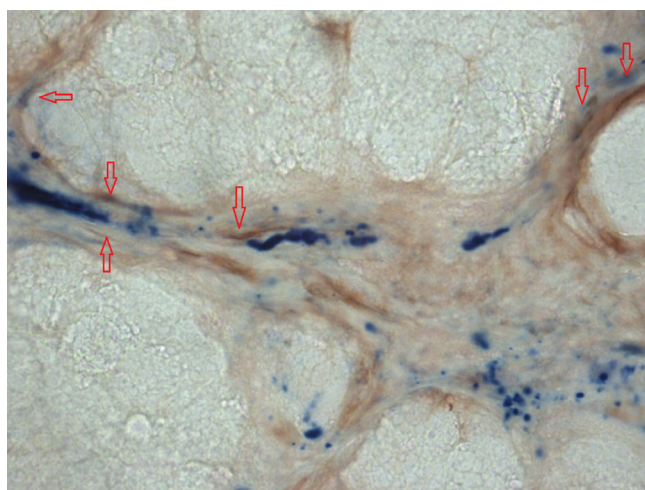
Все пациенты принимали противопаркинсоническую терапию, из них препараты леводопы получали 6 человек в течение  $3,75$  [0,75; 6,75] года. Трое пациентов к моменту осмотра имели осложнения леводопа-терапии, средний балл по подшкале UPDRS-IV составил  $4,0$  [2,5; 4,0] балла.

Результаты ТКС ЧС свидетельствовали о наличии гиперэхогенности ЧС (величина площади сигнала  $\geq 0,20$  см<sup>2</sup>) у 9 (75%) пациентов. Средняя площадь эхогенности у пациентов с положительным результатом ТКС ЧС составила  $0,24$  [0,21; 0,3] см<sup>2</sup>. Площадь гиперэхогенного сигнала от ЧС имела положительную связь ( $r = 0,9$ ;  $p = 0,0002$ ) только





A



B

#### Подъязычная СЖ, увеличение $\times 100$ , иммуноферментное окрашивание.

A — пациент П., 77 лет, стадия по шкале Хён–Яра 2,5, длительность заболевания 10 лет, площадь нервных волокон  $726,5 \mu\text{m}^2$ , площадь включений ф- $\alpha$ -син  $666,9 \mu\text{m}^2$ . B — пациентка Т., 55 лет, стадия по шкале Хён–Яра 2,0, длительность заболевания 3 года, площадь нервных волокон  $523,8 \mu\text{m}^2$ , площадь включений ф- $\alpha$ -син  $131,1 \mu\text{m}^2$ .

Красными стрелками отмечены места совместной локализации маркеров ф- $\alpha$ -син и нервных волокон. Коричневые включения — ф- $\alpha$ -син, синие включения — нервные волокна, маркер PGP-9.5.

#### Sublingual gland, magnitude $\times 100$ , enzyme immunostaining.

A — patient P, 77 years old, Hoehn–Yahr 2.5, disease duration 10 years, nervous fiber area  $726.5 \mu\text{m}^2$ , PS-129 inclusion area  $666.9 \mu\text{m}^2$ . B — patient T, 55 years old, Hoehn–Yahr 2.0, disease duration 3 years, nervous fiber area  $523.8 \mu\text{m}^2$ , PS-129 inclusion area  $131.1 \mu\text{m}^2$ .

Red arrows indicate co-localization of PS-129 markers and nervous fibers. Brown inclusions indicate PS-129 while blue inclusions indicate nervous fibers, PGP-9.5 staining.

с длительностью заболевания, которая у этих пациентов составила более 5 лет.

Биопсийный материал подъязычной СЖ характеризовался высокой морфологической сохранностью всех характерных структур согласно анализу срезов, окрашенных гематоксилином и эозином. Результаты иммуногистохимического исследования показали наличие в материале ф- $\alpha$ -син,

колокализованного с нейромаркером PGP 9.5, у всех 12 пациентов. Агрегаты ф- $\alpha$ -син определялись в виде включений округлой, овальной или веретеновидной формы, располагающихся в непосредственной близости от нервных волокон, которые визуализировались в виде извитых тяжей (при продольном срезе) или округлых пучков (при прохождении среза поперёк волокна). Нервные волокна, меченные PGP 9.5, располагались в стенках кровеносных сосудов, кровоснабжающих СЖ, и в составе междольковой соединительной ткани (рисунк).

По результатам морфометрии площадь включений ф- $\alpha$ -син, колокализованного с маркером нервных волокон PGP-9.5, составила от  $28,47 [27,55; 96,26] \mu\text{m}^2$  до  $238,77 [234,13; 272,49] \mu\text{m}^2$ , доля ф- $\alpha$ -син относительно площади нервных волокон (распространённость накопления ф- $\alpha$ -син в нервных волокнах) — от 13,4% до 93,4% у разных пациентов. Анализ по Спирмену показал наличие положительной связи между долей ф- $\alpha$ -син и результатами балльной оценки немоторных признаков БП: NMSQ ( $r = 0,8; p < 0,001$ ), NMSS ( $r = 0,9; p < 0,001$ ), PDQ-8 ( $r = 0,7; p = 0,003$ ), UPDRS-I ( $r = 0,7; p = 0,009$ ), UPDRS-II ( $r = 0,6; p = 0,03$ ), а также выраженностью тревоги и депрессии по шкале HADS (тревога  $r = 0,8; p = 0,002$ ; депрессия  $r = 0,6; p = 0,04$ ). Не обнаружено значимой корреляции между распространённостью накопления ф- $\alpha$ -син и тяжестью двигательных нарушений по UPDRS-III, стадией по шкале Хён–Яра, длительностью заболевания, возрастом, суммой баллов по шкале MoCA, продолжительностью леводопа-терапии и результатами ТКК ЧС (для пациентов с выявленной гиперэхогенностью ЧС).

Наблюдение за пациентами в течение 12 мес после биопсии СЖ не выявило признаков развития нежелательных явлений.

## Обсуждение

В проведённой работе впервые в России был применён автоматизированный морфометрический метод для оценки распространённости ф- $\alpha$ -син у пациентов с БП, основным преимуществом которого является возможность достаточно быстрой и точной оценки распространённости тех или иных маркеров. Ранее подобный метод применялся исключительно в отношении анализа материала животных и в онкологических исследованиях, где зарекомендовал себя как эффективный способ оценки результатов иммуногистохимического исследования [21].

В результате сопоставления различных диагностических методов — биопсийного и ТКК ЧС — были получены данные, свидетельствующие о более высокой чувствительности биопсийного метода по сравнению с ТКК ЧС, — характерная для БП гиперэхогенность ЧС была выявлена у 75% пациентов, в то время как биопсийный метод установил накопление маркера заболевания — ф- $\alpha$ -син у всех обследованных пациентов с БП. Важно отметить, что распространённость ф- $\alpha$ -син в материале СЖ не имеет связи ни с длительностью заболевания, ни с возрастом пациента, ни с выраженностью двигательных нарушений, но находится в прямой корреляционной связи с выраженностью немоторных симптомов (по шкалам NMSS, NMSQ, HADS) и нарушений повседневной активности (по UPDRS-II), находящихся в прямой зависимости от тяжести немоторных симптомов; это показывает высокую вероятность выяв-

ления иммуногистохимического маркера БП и подтверждения диагноза у пациентов на ранних стадиях заболевания, когда ещё нет выраженных признаков двигательного дефицита. Результаты нашего исследования согласуются с данными о наличии корреляции между выраженностью немоторных симптомов и распространённостью агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в головном мозге у пациентов с БП, а также между тревожно-депрессивным поведением и дозой мутантного гена  $\alpha$ -синуклеина у лабораторных животных — носителей синуклеиновой мутации A53T [22, 23]. Связь между наличием агрегатов  $\alpha$ -синуклеина в мозге пациентов и когнитивными нарушениями, описанная L.V. Kalia и соавт. [22], нами не обнаружена.

Проведённое нами исследование и установленные клинические корреляции подтвердили отчётливое негативное влияние немоторных симптомов на показатели повседневной активности и качества жизни. Для 50% участников было характерно наличие такого известного фактора риска БП, как черепно-мозговая травма в анамнезе, что со-

гласуется с данными метаанализа о связи травмы головы с развитием заболевания [24].

Определённым ограничением проведённой работы является относительно небольшое количество пациентов, которое не позволяет рассчитывать на получение статистической значимости при оценке корреляций между некоторыми параметрами (связь размеров зоны гиперэхогенности ЧС с тяжестью моторного дефицита, связь стадии болезни с повседневной активностью и качеством жизни). Однако при таком анализе прослеживался ряд отчётливых тенденций, которые могут достигнуть уровня значимости при увеличении выборки и продолжении настоящего исследования (включая возможность мониторинга ряда показателей в динамике).

Таким образом, проведённое исследование показало высокую диагностическую чувствительность биопсийного метода определения ф- $\alpha$ -син в ткани подъязычной СЖ и возможность его использования для раннего подтверждения диагноза БП.

## Список источников / References

- Иллариошкин С.Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2015; 20(4): 4–13. Illarioshkin S.N. Modern view on etiology of Parkinson's disease. *Neurological Journal*. 2015; 20(4): 4–13. (In Russ.)
- Федотова Е.Ю., Четчин А.О., Иллариошкин С.Н. Возможности транскраниальной сонографии в диагностике экстрапирамидных заболеваний. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2010; 4(4): 43–50. Fedotova E.Y., Chechetkin A.O., Illarioshkin S.N. Possibilities of transcranial sonography in extrapyramidal disorders. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2010; 4(4): 43–50. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.17816/psaic322>
- Bjorklund G., Stejskal V., Urbina M.A. et al. Metals and Parkinson's disease: mechanisms and biochemical processes. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(19): 2198–2214.
- Jeong S., Jang W., Shin D.W. Association of statin use with Parkinson's disease: dose-response relationship. *Mov. Disord.* 2019; 34(7):1014–1021. doi: 10.1002/mds.27681
- Azizova T.V., Banikova M.V., Grigoryeva E.S. et al. Occupational exposure to chronic ionizing radiation increases risk of Parkinson's disease incidence in Russian Mayak workers. *Int. J. Epidemiol.* 2020; 49(2): 435–447. doi: 10.1093/ije/dyz230
- Benassi B., Filomeni G., Montagna C. et al. Extremely low frequency magnetic field (ELF-MF) exposure sensitizes SH-SY5Y cells to the pro-Parkinson's disease toxin MPP+. *Mol. Neurobiol.* 2016; 53(6): 4247–4260. doi: 10.1007/s12035-015-9354-4
- Avanipully J.N., Thekkekkara D., Sahyadri M. et al. The role of olfactory system in the etiology of Parkinson's diseases: an overview. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2022; 13(1): 31–39. doi: 10.1177/0976500X221085802
- Spillantini M.G., Goedert M. Synucleinopathies: past, present and future. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016; 42(1): 3–5. doi: 10.1111/nan.12311
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*. 2003; 24(2): 197–211. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9
- Jellinger K.A. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. *J. Neurol. Sci.* 2011; 310(1–2): 107–111. doi: 10.1016/j.jns.2011.04.012
- Сальков В.Н., Воронков Д.Н., Хачева К.К. и др. Клинико-морфологический анализ случая болезни Паркинсона. *Архив патологии*. 2020; 82(2): 52–56. Sal'kov V.N., Voronkov D.N., Khacheva K.K. et al. Clinical and morphological analysis of a case of Parkinson's disease. *Pathology Archive*. 2020; 82(2): 52–56. (In Russ.) doi: 10.17116/patol20208202152
- Postuma R.B., Berg D., Stern M. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2015; 30(12): 1591–1601. doi: 10.1002/mds.26424
- Beach T.G., Adler C.H. Importance of low diagnostic accuracy for early Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2018; 33(10): 1551–1554. doi: 10.1002/mds.27485
- Кравченко М.А., Четчин А.О. К вопросу об изучении природы ультразвукового феномена гиперэхогенности черной субстанции. *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений*. 2019; (3): 15–20. Kravchenko M.A., Chechetkin A.O. On the question of studying the nature of the ultrasonic phenomenon of hyperechogenicity of the substantia nigra. *Bulletin of the National Society for the Study of Parkinson's Disease and Movement Disorders*. 2019; (3): 15–20. (In Russ.) doi: 10.24411/2226-079X-2019-12128
- Mei Y.L., Yang J., Wu Z.R. et al. Transcranial sonography of the substantia nigra for the differential diagnosis of Parkinson's disease and other movement disorders: a meta-analysis. *Parkinsons Dis.* 2021; 2021: 8891874. doi: 10.1155/2021/8891874
- Visanji N.P., Mollenhauer B., Beach T.G. et al. The systemic synuclein sampling study: toward a biomarker for Parkinson's disease. *Biomark. Med.* 2017; 11(4): 359–368. doi: 10.2217/bmm-2016-0366
- Соболев В.Б., Худоерков Р.М. Иммуногистохимическое выявление  $\alpha$ -синуклеина в слюнной железе как биомаркер болезни Паркинсона. *Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений*. 2017; (2): 16–23. Sobolev V.B., Khudoyerkov R.M. Immunohistochemical detection of  $\alpha$ -synuclein in the salivary gland as a biomarker of Parkinson's disease. *Bulletin of the National Society for the Study of Parkinson's Disease and Movement Disorders*. 2017; (2): 16–23. (In Russ.)
- Poucllet H., Lebouvier T., Coron E. et al. A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2012; 45(1): 305–309. doi: 10.1016/j.nbd.2011.08.014
- Adler C.H., Dugger B.N., Hinni M.L. et al. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Neurology*. 2014; 82(10): 858–864. doi: 10.1212/WNL.0000000000000204
- Sobolev V.B., Voronkov D.N., Khudoyerkov R.M. Treatment of histological material for the detection phosphotyrlated and unphosphorylated apha-synuclein. *Asymmetry*. 2016; 10(4): 77–84.
- Гуменюк И.С., Чуприненко Л.М., Сотниченко А.С. и др. Автоматизированный морфометрический анализ как метод определения содержания компонентов внеклеточного матрикса и количественной оценки ядерных антигенов. *Архив патологии*. 2017; 79(5): 49–56. Gumenyuk I.S., Chuprinenko L.M., Sotnichenko A.S. et al. Automatic morphometric analysis as a method for determining the level of extracellular matrix components and for quantifying nuclear antigens. *Pathology Archive*. 2017; 79(5): 49–56. (In Russ.) doi: 10.17116/patol201779549-56
- Kalia L.V., Lang A.E., Hazrati L.N. et al. Clinical correlations with Lewy body pathology in LRRK2-related Parkinson disease. *JAMA Neurol.* 2015; 72(1): 100–105. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.2704
- Wang W., Song N., Jia F. et al. Genomic DNA levels of mutant alpha-synuclein correlate with non-motor symptoms in an A53T Parkinson's disease mouse model. *Neurochem. Int.* 2018; 114: 71–79. doi: 10.1016/j.neuint.2018.01.006
- Jafari S., Etmiman M., Aminzadeh F., Samii A. Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 2013; 28(9): 1222–1229. doi: 10.1002/mds.25458

**Информация об авторах**

*Хачева Кристина Константиновна* — врач-невролог, лаборант-исследователь лаб. нейроморфологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9441-4797>

*Карабанов Алексей Вячеславович* — к.м.н., врач-невролог ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2174-2412>

*Богданов Ринат Равильевич* — д.м.н., доцент, профессор каф. неврологии факультета усовершенствования врачей ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, eLibrary SPIN-код: 4439-3165

*Воронков Дмитрий Николаевич* — к.м.н., с.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

*Соболев Валерий Борисович* — м.н.с. лаб. нейроморфологии ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7704-1092>

*Чечеткин Андрей Олегович* — д.м.н., зав. лаб. ультразвуковых исследований ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-8726-8928>

*Данилова Анастасия Дмитриевна* — к.м.н., челюстно-лицевой хирург, с.н.с. отд. челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4217-6736>

*Сипкин Александр Михайлович* — д.м.н., в.н.с., рук. отд. челюстно-лицевой хирургии ГБУЗ МО МНИКИ им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8287-741X>

*Иллариошкин Сергей Николаевич* — академик РАН, д.м.н., профессор, директор Института мозга, зам. директора по научной работе ФГБНУ НЦН, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2704-6282>

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

**Information about the authors**

*Kristina K. Khacheva* — neurologist, research assistant, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9441-4797>

*Alexey V. Karabanov* — Cand. Sci. (Med.), neurologist, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2174-2412>

*Rinat R. Bogdanov* — D. Sci. (Med.), Professor, Department of neurology, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, eLibrary SPIN-code: 4439-3165

*Dmitry N. Voronkov* — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5222-5322>

*Valery B. Sobolev* — junior researcher, Laboratory of neuromorphology, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7704-1092>

*Andrey O. Chechetkin* — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of ultrasound studies, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-8726-8928>

*Anastasia D. Danilova* — Cand. Sci. (Med.), maxillo-facial surgeon, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4217-6736>

*Alexander M. Sipkin* — D. Sci. (Med.), leading researcher, Head, Maxillo-facial surgery department, M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8287-741X>

*Sergey N. Illarionov* — D. Sci. (Med.), Prof., RAS Full Member, Director, Brain Institute, Deputy director for science, Research Center of Neurology, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2704-6282>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.