



Оригинальная статья

Катехоламины плазмы крови у пациентов с ранними нелечеными стадиями болезни Паркинсона

Залялова З.А.^{1,2} • Хасанова Д.М.² • Угрюмов М.В.³

Актуальность. Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание с преимущественным вовлечением катехоламин-продуцирующих нейронов центральной и периферической нервных систем. Учитывая относительную доступность и низкую стоимость определения концентраций катехоламинов в плазме крови, целесообразно изучение этих показателей для их использования в качестве биомаркеров начальных стадий БП. **Цель** – определение и сопоставление плазменных концентраций дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у здоровых добровольцев и пациентов с начальными стадиями БП при клинически дифференцированных акинетико-ригидной (АРФ) и дрожательной форм (ДФ). **Материал и методы.** Проведено наблюдательное одномоментное когортное исследование в период с 2012 по 2015 г. В основную группу посредством сплошного отбора включались пациенты, находившиеся на амбулаторном наблюдении в Республиканском консультативно-диагностическом центре экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии (Казань, Россия), с впервые клинически выявленной ранней (I и II стадии по Хен – Яру, 1967) БП разного возраста и пола, ранее не получавшие специфическую

противопаркинсоническую терапию. Группу контроля составили относительно здоровые добровольцы без клинических признаков БП с возможными иными хроническими заболеваниями неэкстрапирамидного генеза. Уровни катехоламинов в плазме крови определяли методом жидкостной хроматографии. **Результаты.** В основную группу исследования были включены 130 пациентов с впервые установленным диагнозом БП (средний возраст $59,34 \pm 8,42$ года, 45,38% мужчин), не леченные ранее. Группу контроля составили 56 человек, сопоставимых по возрасту и полу. Распределение пациентов по формам и стадиям БП: ДФ БП – 56,9%, АРФ БП – 43,1%; I стадия – 76,9%, II стадия – 23,1%. В плазме крови пациентов с БП по сравнению с контролем отмечено снижение концентрации НА вне зависимости от формы и стадии (95% доверительный интервал = 124–216 и 248–428 пкг/мл соответственно, $p < 0,026$). Уровень ДОФА был снижен только у пациентов с АРФ БП ($p = 0,017$), уровень ДОФУК – у пациентов со II стадией БП ($p = 0,008$). Соотношение показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК составило в среднем 1:32:105:64 в группе контроля против 1:62:238:88 у пациентов с ДФ БП (различия статистически значимо для НА, ДОФА, $p < 0,05$) и 1:29:96:32 при АРФ БП ($p > 0,05$). У здоровых добровольцев изменения концентрации ДОФА

определяют 84% изменчивости концентраций ДА и НА; взаимосвязи уровня ДОФУК с другими катехоламинами крови не обнаружено. Пациенты с БП, наоборот, вне зависимости от формы и стадии болезни имеют прямую взаимосвязь уровня ДОФУК с уровнем ДА ($p < 0,04$). У пациентов с ДФ БП сохраняется прямая зависимость плазменных концентраций НА и ДОФА ($p < 0,05$). **Заключение.** Полученные результаты по абсолютным и относительным показателям основного обмена катехоламинов у пациентов с БП начальных стадий поддерживают гипотезу о различном патогенезе дрожательной и акинетико-ригидной форм заболевания.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона идиопатическая, дрожательная форма болезни Паркинсона, акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, катехоламины, биомаркеры

Для цитирования: Залялова ЗА, Хасанова ДМ, Угрюмов МВ. Катехоламины плазмы крови у пациентов с ранними нелечеными стадиями болезни Паркинсона. Альманах клинической медицины. 2018;46(8):792–801. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-792-801.

Поступила 27.06.2018;
принята к публикации 17.12.2018

Блезнь Паркинсона (БП) – полисимптомное нейродегенеративное заболевание, развивающееся в результате мультисистемной дегенерации преимущественно моноаминергических нейронов [1] и характеризующееся целым спектром как двигательных, так и недвигательных клинических проявлений [2]. Установлено, что патологический нейродегенеративный процесс

при БП является системным и нарушает обмен всех катехоламинов в разных структурах головного мозга с преимущественным вовлечением дофаминергических и норадренергических нейронов [3, 4]. Поскольку патологический процесс при БП не ограничивается мозгом, важным представляется изучение функционального состояния периферических органов, синтезирующих катехоламины



[5]. Предпринимаются попытки использовать в качестве биологических маркеров БП уровень концентрации катехоламинов и их производных [6]. Определение их в спинномозговой жидкости, которое ранее рассматривалось как наиболее специфичный лабораторный критерий диагностики БП, сопряжено с манипуляционными рисками и высокой стоимостью процедуры [7]. В качестве биомаркеров начальных стадий БП остаются привлекательными плазменные концентрации катехоламинов в связи с относительной доступностью и дешевизной метода [5].

Основной целью настоящего исследования было определение уровня основных катехоламинов – дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) – в крови нелеченых пациентов с начальными стадиями БП (I и II стадии по Хен – Яру), а также сопоставление с уровнями катехоламинов здоровых людей того же возраста и пола.

Материал и методы

Исследование представляет собой часть работы «Способ диагностики преклинической стадии болезни Паркинсона» – проекта, победившего на конкурсе «Выполнение научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по приоритетным направлениям развития науки и техники» в рамках реализации программы «СТАРТ-2011». Дизайн исследования предусматривал сопоставление клинических и лабораторных данных пациентов с БП в зависимости от пола, формы и стадии заболевания как внутри основной группы, так и с группой контроля.

В основную группу посредством сплошного отбора включались пациенты, находившиеся на амбулаторном наблюдении в Республиканском консультативно-диагностическом центре экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии (РКДЦЭПиБТ, Казань, Россия), с впервые клинически выявленной ранней (I и II стадии по Хен – Яру) БП разного возраста и пола, которые ранее не получали специфическую противопаркинсоническую терапию. Группу контроля составили относительно здоровые добровольцы без клинических признаков БП с возможными иными хроническими заболеваниями неэкстрапирамидного генеза, отбравшиеся на базах Госпиталя ветеранов войн (отделения кардиологии) и РКДЦЭПиБТ в период с 2012 по 2015 г. Пациенты обеих групп не имели тяжелых соматических заболеваний. Все пациенты, участвовавшие в исследовании, подписывали информированное согласие.

Залялова Зулейха Абдуллаязовна – д-р мед. наук, профессор кафедры неврологии и реабилитации¹, руководитель²
✉ 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49, Российская Федерация.
Тел.: +7 (917) 267 22 01.
E-mail: z.zalyalova@gmail.com

Хасанова Диана Магомедовна – канд. мед. наук, врач-невролог²

Угрюмов Михаил Вениаминович – академик РАН, д-р биол. наук, заведующий лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций³

Для клинической оценки участников исследования использовали индивидуальные регистрационные карты, включающие паспортные и анамнестические данные. Клинико-неврологическое исследование проводили по стандартной методике. Болезнь Паркинсона оценивали по общепринятой стандартной шкале UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale), шкале Хен – Яра (1967). При клинической оценке состояния больных уточнялась и клиническая форма заболевания: преимущественно акинетико-ригидная (АРФ БП) или преимущественно дрожательная (ДФ БП). Кроме того, пациенты с БП были разделены на группы в зависимости от стадии по классификации Хен – Яра: I и II стадии. Пациенты с более тяжелыми стадиями БП по шкале Хен – Яра в исследование не включались.

Основной конечной точкой исследования было определение концентраций основных катехоламинов плазмы крови участников исследования. Методика забора крови на определение уровня катехоламинов состояла в следующем: кровь из локтевой вены (около 5 мл) собиралась в вакутейнеры с калиевой солью ЭДТА в 8:00 и сразу центрифугировалась при охлаждении до -40 °С и 2500 об/мин в течение 20 минут. Полученная сыворотка переносилась пипеткой в другую пластиковую пробирку и хранилась в течение 1 суток при температуре от +2 до +80 °С. Затем во ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Москва, Россия) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией определялись уровни концентрации ДА, НА, ДОФА, ДОФУК и индекс утилизации дофамина (ДОФУК/ДА).

Этическая экспертиза. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол заседания № 8 от 23.10.2012).

Статистический анализ. Расчет мощности выборки проводили исходя из уровня заболеваемости БП в республике Татарстан и г. Казани – 17 вновь выявленных случаев БП на 100 тыс. населения (по данным РКДЦЭПиБТ [8]), а также из условия ошибки выборки не более 5%. Оценку результатов исследования проводили с помощью программного обеспечения Statistica 12.0 (StatSoft, США), Microsoft Excel 2016 (Microsoft, США). Для оценки связи между признаками непараметрических данных применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r), критерии вероятности корреляции Кендалла (τ) и γ -коэффициент; для параметрических данных – критерий Пирсона.

¹ ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49, Российская Федерация

² Республиканский консультативно-диагностический центр экстрапирамидной патологии и ботулинотерапии; 420029, г. Казань, ул. Исаева, 5, Российская Федерация

³ ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН; 119334, г. Москва, ул. Вавилова, 26, Российская Федерация



Статистическая значимость полученных измерений при сравнении средних величин определялась по критерию Стьюдента (t) с вычислением вероятности ошибки (p) при проверке нормальности распределения и равенства генеральных дисперсий. За статистически значимые изменения принимали уровень достоверности $p < 0,05$. Проверку статистической значимости непараметрических данных (в том числе номинальных и категориальных величин) проводили с помощью критериев Краскела – Уоллиса и Манна – Уитни с установлением уровня достоверности $p < 0,05$. С помощью программного обеспечения Statistica также был проведен многомерный дисперсионный анализ (ANOVA) с построением генерализованных нелинейных моделей, линейный регрессионный анализ и анализ методом логистической регрессии.

Результаты

В исследование были включены 186 человек: 130 пациентов основной группы с впервые установленным диагнозом БП, не леченных ранее, и 56 добровольцев группы контроля. В основной группе было 59 (45,38%) мужчин и 71 (54,62%) женщина, средний возраст составил $59,34 \pm 8,42$ года (от 37 до 82 лет). В группе контроля было 23 (41,1%) мужчины и 33 (58,9%) женщины, средний возраст – $58,8 \pm 9,8$ года (от 36 до 85 лет). Группы исследования были сопоставимы по полу и возрасту.

Таблица 1. Уровень катехоламинов в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых добровольцев

Группа	Показатель, пкг/мл (референсные значения*)			
	ДА (10–100)	НА (95–450)	ДОФА (300–2800)	ДОФУК (320–9600)
Контроль (n=31)	$18,5 \pm 24,4$	$317,1 \pm 244,8$	$1110,1 \pm 1051,5$	$748,6 \pm 683,6$
БП (n=45)	$11,8 \pm 15,9$	$161,8 \pm 131,9^{\dagger}$	$699,0 \pm 973,1$	$433,4 \pm 547,7^{\dagger}$
I стадия** (n=33)	$140 \pm 17,6$	$169,3 \pm 137,8^{\dagger}$	$781,8 \pm 1109,1$	$529,0 \pm 589,3$
II стадия (n=12)	$6,4 \pm 7,5$	$144,7 \pm 113,9^{\dagger}$	$496,1 \pm 337,6$	$171,3 \pm 294,9^{\dagger}$
ДФ БП (n=28)	$13,6 \pm 19,1$	$184,8 \pm 129,8^{\dagger}$	$866,3 \pm 1158,5$	$541,6 \pm 607,8$
I стадия (n=19)	$16,2 \pm 21,6$	$181,2 \pm 140,5$	$969,9 \pm 1348,4$	$661 \pm 654,8$
II стадия (n=9)	$7,1 \pm 9,1$	$193,7 \pm 106,4^{\dagger}$	$607,1 \pm 365,9$	$243,2 \pm 344,5$
АРФ БП (n=17)	$9,3 \pm 7,7$	$125,9 \pm 128,4^{\dagger}$	$441,0 \pm 446^{\dagger}$	$255,5 \pm 383,5^{\dagger}$
I стадия (n=13)	$10,7 \pm 8,3$	$150,3 \pm 137$	$492,3 \pm 501,3$	$325,7 \pm 416,3$
II стадия (n=4)	$4,9 \pm 2,8$	$46,8 \pm 44,2^{\dagger}$	$274,3 \pm 83,1$	$27,6 \pm 26$

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота

* Нормы лаборатории определения (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

** Стадия БП по Хен – Яру (1967)

[†] $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля

Среди пациентов с БП 74 (56,9%) имели ДФ БП и 56 (43,1%) – АРФ БП; с I стадией БП по Хен – Яру было 100 (76,9%) человек, со II стадией – 30 (23,1%).

Анализ концентрации каждого катехоламина при БП выявил ряд существенных особенностей по сравнению с контролем (табл. 1).

Несмотря на более низкий уровень ДА и меньший размах возможных значений ДА в плазме крови пациентов с БП ($11,8 \pm 15,9$ против $18,5 \pm 24,4$ пкг/мл), статистически значимых различий в двух группах получено не было ($p > 0,05$). Форма и стадия заболевания также не влияли на уровень статистической значимости результатов сравнения ($p > 0,05$). Доверительные интервалы (95% ДИ) у пациентов с БП и группы контроля перекрываются, что не позволяет определить пороговое для диагностики значение ДА (рис. 1). Анализ зависимости уровня ДА от возраста обследуемых показал, что только здоровые добровольцы имели обратную среднюю корреляцию между этими параметрами ($r = -0,415$). Для пациентов с БП вне зависимости от пола, формы и стадии заболевания такой корреляции не обнаружено ($r = 0,056$). Множественный регрессионный анализ также показал значимую обратную взаимосвязь возраста здоровых добровольцев с концентрацией ДА в плазме крови ($p = 0,0256$, $F = 5,668$, Mult. $R = 0,44$). Следовательно, уровень ДА в плазме крови у пациентов с БП не связан с возрастом и не может быть объяснен функциональным угасанием дофаминергической системы в отличие от здоровых добровольцев, у которых отмечено возрастное снижение этого показателя.

Что касается уровня НА, он у пациентов с БП был статистически значимо ниже, чем в контроле ($p = 0,0008$). При этом относительно контроля уровни концентрации НА оставались низкими у больных и с I стадией БП ($p = 0,0045$), и со II ($p = 0,026$), а также для ДФ БП ($p = 0,014$) и для АРФ БП ($p = 0,0049$). При сравнении форм БП между собой выявлено выраженное снижение уровня НА у пациентов с АРФ БП ($p = 0,049$), при этом наблюдалась тенденция к увеличению данного различия по мере прогрессирования заболевания (статистическая значимость не установлена из-за небольшой степени свободы расчетов). Таким образом, нами обнаружено резкое снижение уровня концентрации НА в крови пациентов с БП вне зависимости от формы и стадии заболевания (рис. 2). В связи с этим был проведен анализ плазменной концентрации НА у добровольцев группы контроля и пациентов с БП с расчетом ДИ. Выяснилось, что 95% пациентов с БП имели значения уровня концентрации НА

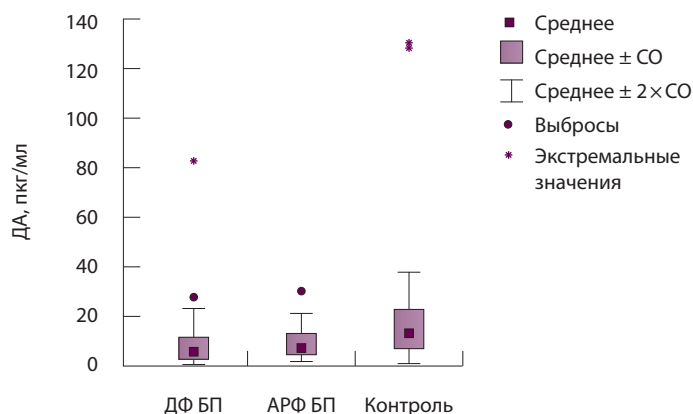


Рис. 1. Уровень дофамина (ДА) в плазме крови пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и группы контроля; CO – стандартное отклонение

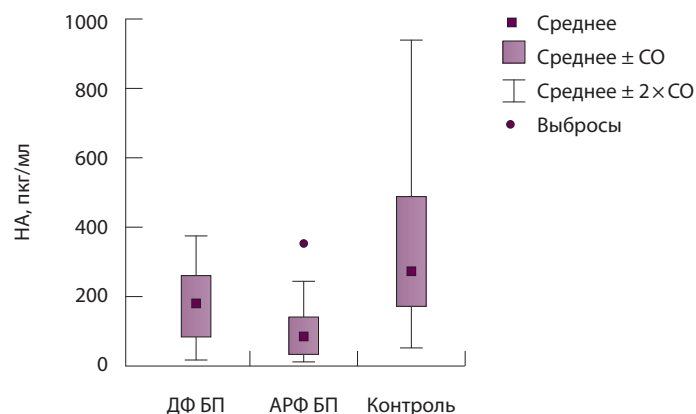


Рис. 2. Уровень норадреналина (НА) в плазме крови пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и группы контроля; CO – стандартное отклонение

в пределах 124–216 пкг/мл (для пациентов с ДФ БП – 125–216 пкг/мл и с АРФ БП – 53–158 пкг/мл, $p > 0,05$); 95% исследуемых из группы контроля – 248–428 пкг/мл (рис. 3). Полученные данные можно использовать для определения референсных значений уровня НА при сомнительном клиническом диагнозе БП. Соответственно, выявленные закономерности могут служить основанием для выделения НА в качестве биомаркера БП.

Статистически значимое снижение уровня ДОФА по сравнению с контролем отмечено только в группе АРФ БП ($p = 0,017$; рис. 4). Плазменная концентрация ДОФУК была статистически значимо снижена в общей группе пациентов с БП по сравнению с контролем ($p = 0,035$). При этом относительно контроля уровень ДОФУК в плазме крови пациентов с БП оставался статистически

значимо ниже лишь у пациентов со II стадией БП ($p = 0,008$), но не с I стадией ($p = 0,18$), тогда как при АРФ БП этот показатель был снижен ($p = 0,012$) вне зависимости от стадии заболевания (рис. 5). Таким образом, у пациентов с БП средний уровень ДОФУК достоверно ниже. Анализ в группах с расчетом ДИ показал, что 95% пациентов с БП имели значения уровня концентрации ДОФУК в пределах 232–507 пкг/мл (с ограничениями, так как ДИ концентрации ДОФА у пациентов с ДФ БП 222–653 пкг/мл может перекрывать нормальные значения; ДИ для пациентов с АРФ БП составил 25–404 пкг/мл); 95% исследуемых из группы контроля имели значения уровня концентрации ДОФУК в пределах 561–954 пкг/мл. Этими данными можно руководствоваться для определения референсных значений уровня ДОФУК

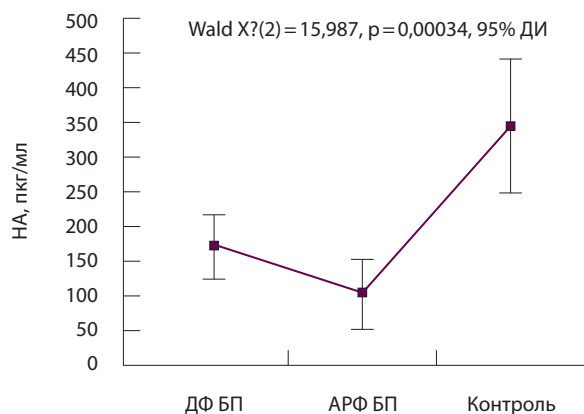


Рис. 3. Доверительные интервалы (ДИ) плазменной концентрации норадреналина (НА) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев

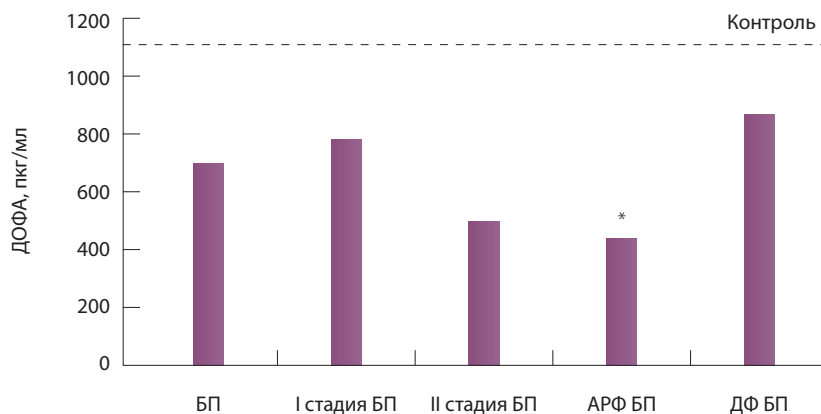


Рис. 4. Сравнение уровня концентрации L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и здоровых добровольцев; АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона; * $p < 0,05$ при сравнении с контролем

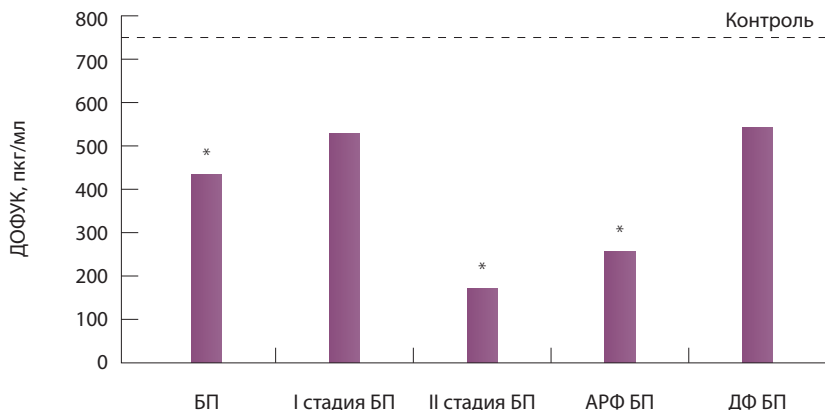


Рис. 5. Сравнение уровня концентрации дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в плазме крови пациентов с болезнью Паркинсона (БП) и здоровых добровольцев; АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона; * $p < 0,05$ при сравнении с контролем

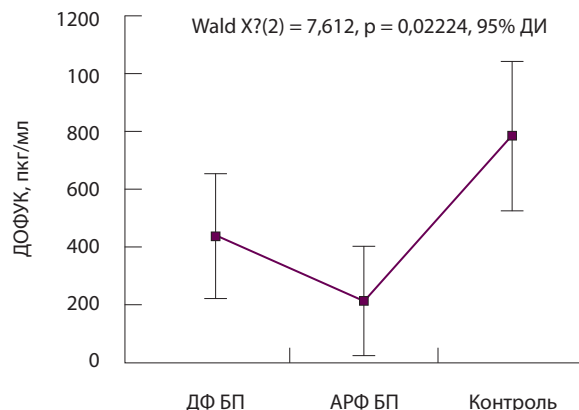


Рис. 6. Доверительные интервалы (ДИ) плазменной концентрации дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев

в случае сомнительного клинического диагноза БП (рис. 6). Кроме того, ДОФУК может выступать поддерживающим фактором при использовании НА в качестве биомаркера БП.

Для оценки взаимосвязи показателей концентрации катехоламинов в плазме крови был проведен анализ их соотношения с расчетом относительных величин: уровень ДА был принят за единицу, остальные показатели вычислены по отношению к нему (табл. 2). У обследованных из группы контроля соотношение показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК в среднем составило 1:32:105:64. Статистически значимых различий между основной группой (все пациенты с БП) и контрольной по этому параметру не получено. Анализ по гендерному признаку также различий с контролем не выявил. Что касается форм БП, увеличение соотношения показателей ДА:НА:ДОФА:ДОФУК обнаружено только для пациентов с ДФ БП – 1:62:238:88, при этом различие было статистически значимым для НА и ДОФА ($p < 0,05$). Такое изменение соотношения показателей у пациентов с ДФ БП может говорить о компенсаторных механизмах у этих больных (рис. 7).

Анализ соотношения показателей катехоламинов, проведенный в подгруппах исследования, показал отсутствие различий в зависимости от пола, но не от стадии и формы заболевания. У пациентов с ДФ БП отмечено статистически значимое увеличение соотношения концентрации НА/ДА в 4,5 раза ($p = 0,035$) и концентрации ДОФА/ДА в 5 раз ($p = 0,022$) во II стадии по Хен – Яру по сравнению с группой контроля. Одновременно наблюдалось резкое снижение

показателей соотношения других определяемых в крови катехоламинов к ДА у пациентов со II стадией АРФ БП, однако различие не было статистически значимым ($p = 0,07$), что можно объяснить недостаточным количеством степеней свободы (рис. 8). Анализ соотношения ДОФУК/ДА (отражает скорость утилизации ДА) выявил некоторые противоречия. Так, если у пациентов с АРФ БП показатель утилизации ДА последовательно снижался (в среднем составил 40 для больных с I стадией и 8,8 – со II) по сравнению с контролем (64 в среднем), то у пациентов с ДФ БП он,

Таблица 2. Соотношение концентраций катехоламинов в крови и дофамина у пациентов с болезнью Паркинсона и здоровых добровольцев

Группа	ДА	НА	ДОФА	ДОФУК
Контроль	1	32	105	64
женщины	1	33	116	70
мужчины	1	32	106	64
БП	1	50	182	63
женщины	1	73	262	82
мужчины	1	23	86	39
I стадия*	1	31	107	54
II стадия	1	100	374	85
ДФ БП	1	62	238	83
I стадия	1	29	108	65
II стадия	1	145	530	123
АРФ БП	1	29	96	32
I стадия	1	34	105	40
II стадия	1	12	64	9

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота

* Стадия БП по Хен – Яру

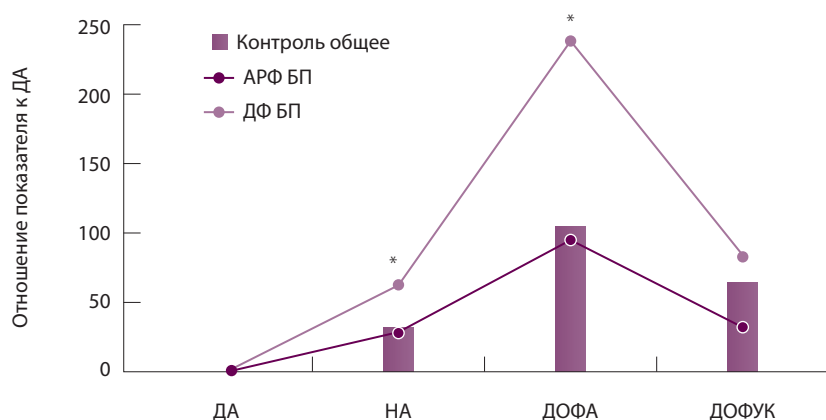


Рис. 7. Показатели соотношения дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона и здоровых добровольцев; * $p < 0,05$ при сравнении с контролем

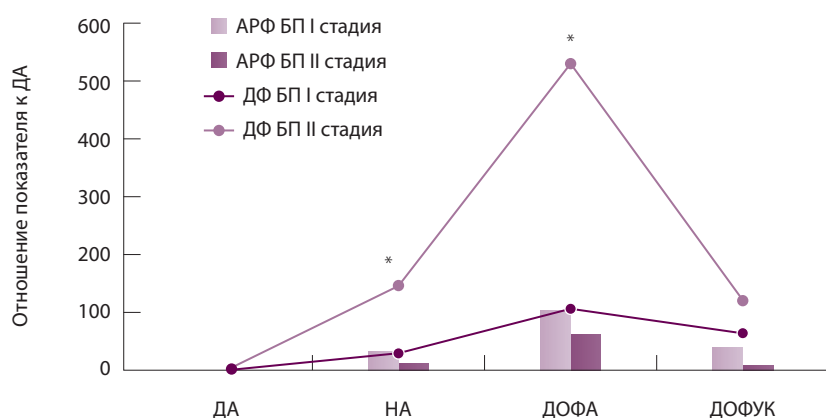


Рис. 8. Показатели соотношения дофамина (ДА), норадреналина (НА), L-3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА) и дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) у пациентов с дрожательной (ДФ БП) и акинетико-ригидной (АРФ БП) формами болезни Паркинсона в зависимости от стадии по Хен – Яру; * $p < 0,05$ при сравнении с контролем

наоборот, увеличивался (в среднем 65 для больных с I стадией и 123 – со II). Установлено, что 95% пациентов с ДФ БП имели значения скорости утилизации ДА в пределах 35,69–148,78, а с АРФ БП – 9,37–50,91, тогда как 95% исследуемых из группы контроля имели значения ДОФУК/ДА в пределах 35,12–102. Соответственно, можно говорить о разнонаправленном изменении скорости утилизации ДА в зависимости от формы БП (рис. 9). Одно из объяснений этого феномена – различия в патофизиологии подтипов БП. У пациентов с ДФ БП концентрация ДА в крови снижается, при этом другие звенья дофаминергического метаболизма не страдают, а возможно, даже пытаются компенсировать дофаминовый дефицит. Данные изменения могут быть

обусловлены как генетической предрасположенностью, так и средовыми факторами, что требует дальнейшего изучения. У пациентов с АРФ БП происходит одновременное снижение всех показателей дофаминергического обмена. Предположительно, это свидетельствует об истощении систем синтеза и утилизации. Таким образом, показатель скорости утилизации ДА может помочь в формировании прогноза заболевания.

Мы провели множественный регрессионный анализ, позволивший определить профиль зависимости концентраций катехоламинов в крови у пациентов разных групп. У здоровых добровольцев была выявлена прямая статистически значимая взаимосвязь концентраций ДА и ДОФА в плазме крови ($p = 0,013$), уровня НА и ДОФА ($p = 0,014$). Согласно полученным результатам, более 84% изменчивости концентраций ДА и НА объясняется изменениями концентрации предшественника данных катехоламинов. При этом уровни ДА и НА связаны между собой статистически значимой обратной взаимосвязью ($p = 0,004$). Так, увеличение концентрации НА ведет к снижению концентрации ДА, что, вероятно, указывает на буферную роль ДА в плазме крови. Уровень ДОФУК не имел корреляции с уровнями других катехоламинов. В литературе описано отсутствие связи концентрации ДОФУК с другими катехоламинами в плазме крови здоровых людей [5, 8, 9].

У пациентов с БП происходит выраженное изменение нормальных взаимосвязей концентраций катехоламинов в крови. Все пациенты

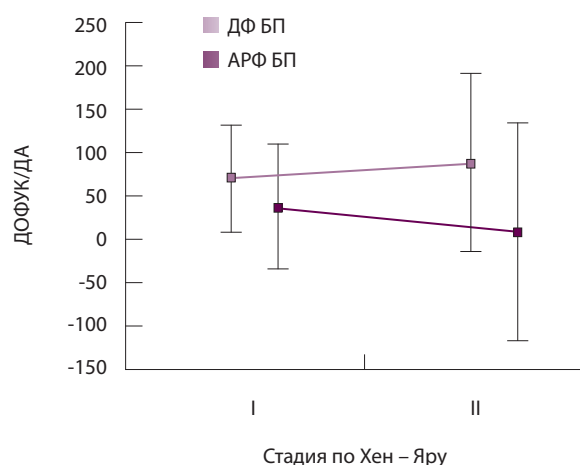


Рис. 9. Сравнение скорости утилизации дофамина (ДА) у пациентов с болезнью Паркинсона в зависимости от формы и стадии; ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона

**Таблица 3.** Клинико-лабораторная дифференциальная диагностика дрожательной и акинетико-ригидной форм болезни Паркинсона

Признак	ДФ БП		АРФ БП	
	I стадия*	II стадия	I стадия	II стадия
Возраст начала БП, годы	63,73 ± 7,19		57,5 ± 8,83	
НА	↓		↓↓	
	↓	–	↓	↓↓
ДОФА	–		↓↓	
	–	↓	↓	↓↓
ДОФУК	–		↓↓	
	–	↓	↓	↓↓
ДА:НА:ДОФА:ДОФУК	1:62:238:82		1:29:96:32	
	1:29:108:65	1:145:530:123	1:34:105:40	1:12:64:9

БП – болезнь Паркинсона, ДФ БП – дрожательная форма болезни Паркинсона, АРФ БП – акинетико-ригидная форма болезни Паркинсона, ДА – дофамин, НА – норадреналин, ДОФА – L-3,4-дигидроксифенилаланин, ДОФУК – дигидроксифенилуксусная кислота; ↓ – показатель снижен, ↓↓ – показатель снижен выражено

* Стадия БП по Хен – Яру

с БП вне зависимости от формы и стадии болезни имели прямую значимую взаимосвязь уровня ДОФУК с уровнем ДА ($p < 0,04$): 62% изменчивости концентрации ДОФУК у пациентов с ДФ и 78% изменчивости концентрации ДОФУК у пациентов с АРФ БП связано с изменением концентрации ДА в плазме крови. Данный факт говорит о повышенном уровне деградации ДА, который может влиять на уровень концентрации ДОФУК в крови, в норме не подверженный такому влиянию. У пациентов с АРФ БП других взаимосвязей уровня концентрации катехоламинов обнаружено не было. В группе ДФ БП была выявлена значимая обратная взаимосвязь уровней ДА и ДОФА в крови пациентов ($r = -0,4399$, $p = 0,047$), что, вероятно, свидетельствует об усилении синтеза ДА из неизменных запасов ДОФА в организме. Следовательно, при ДФ БП происходит усиление обмена катехоламинов с целью компенсации нехватки основного нейромедиатора. При этом у пациентов с ДФ БП, как у здоровых добровольцев, сохраняется прямая статистически значимая зависимость уровней НА и ДОФА в плазме крови ($p < 0,05$). Таким образом, результаты многомерного регрессионного анализа также позволяют сделать вывод о различиях в изменении обмена катехоламинов у пациентов в зависимости от формы БП.

Обсуждение

Полученные нами основные результаты, а именно: отсутствие снижения концентрации предшественника дофамина – ДОФА – и его метаболита – ДОФУК – на I стадии у всех пациентов с БП и снижение концентрации ДОФА и ДОФУК в плазме у пациентов со II стадией АРФ БП, резкое снижение уровня концентрации НА в плазме крови пациентов с БП, более значительное у пациентов с АРФ БП, а также разнонаправленное изменение относительных показателей катехоламинов в плазме крови при разных формах БП требуют их отдельного рассмотрения при АРФ БП и ДФ БП.

Выявленные особенности уровней катехоламинов в плазме крови пациентов с БП по сравнению с контролем позволяют сделать предположения о возможном патогенезе данных различий. Во всех группах пациентов, разделенных по признаку пола, формы или стадии БП, отмечено снижение концентрации ДА в крови, но ни в одном из случаев оно не было статистически значимым. В ряде подгрупп это может быть связано с недостаточным объемом выборки пациентов и нуждается в дополнительной проверке на большем объеме пациентов. Вероятно, стабилизация уровня ДА в плазме крови происходит за счет компенсаторных механизмов. Одним из них может быть наличие дополнительных источников ДА на периферии: APUD-клетки, локализованные в разных органах человека и нейроэндокринные хромоафинные клетки мозгового слоя надпочечников содержат ферменты, необходимые для синтеза ДА из тирозина [10–12]. Они могут служить своеобразной нейроэндокринной буферной системой. Аналогично, отсутствие статистически значимого снижения концентрации ДОФА и ДОФУК на I стадии БП у пациентов как с АРФ БП, так и с ДФ БП обусловлено компенсаторными возможностями дополнительных дофаминергических клеток на периферии. Ко II стадии у пациентов с АРФ БП эти возможности истощаются – тогда наблюдается статистически значимое снижение концентрации ДОФУК и ДОФА в плазме крови. У пациентов со II стадией ДФ БП такого снижения не происходит, что свидетельствует о сохранных компенсаторных возможностях организма.

Обнаруженное нами резкое снижение уровня концентрации НА в плазме крови пациентов с БП вне зависимости от формы и стадии заболевания согласуется с теорией Н. Вракк и соавт. о последовательном каудо-ростральном поражении головного мозга при БП с более ранней дегенерацией



голубого пятна по сравнению с черной субстанцией [13]. Теория «двойного удара» предполагает поражение симпатических нервов периферической нервной системы [14], которые являются одним из ключевых источников НА плазмы крови, что также соотносится с результатами нашего исследования. Следует отметить, что дополнительных источников НА на периферии, за исключением хромоафинных клеток надпочечников, нет. При этом у пациентов с АРФ БП снижение уровня НА было более значительным, чем у пациентов с ДФ БП, и увеличивалось по мере прогрессирования заболевания вне зависимости от формы.

Накапливается все больше доказательств различного патогенеза АРФ БП и ДФ БП, которые отличаются как по клиническим проявлениям [15–18], так и по нейровизуализационным признакам поражения катехоламиновых систем [19–21]. По данным нашего исследования, уровень НА у пациентов с ДФ БП по отношению к ДА не снижался по мере прогрессирования заболевания, а рос. Это может говорить о возможной компенсаторной роли НА, поскольку известно, что НА оказывает нейропротекторное действие на нейроны, в том числе дофаминергическое, защищая их от нейродегенеративного процесса [4]. Клинически это может проявляться в более медленном прогрессировании БП. При АРФ БП, напротив, уровни всех катехоламинов снижались, что отражает одновременное равномерное вовлечение всех катехоламиновых систем в патологический процесс. Возможно, именно поэтому пациенты с АРФ БП имеют широкий спектр клинических проявлений, в первую очередь, за счет разнообразных немоторных симптомов. То же можно сказать о ДОФА и ДОФУК, которые аналогично НА уменьшались по отношению к ДА у пациентов с АРФ БП и увеличивались при ДФ БП. Объяснением данного феномена могут быть различия в патогенезе нарушений разных форм БП. При ДФ БП наблюдается преимущественное

поражение черной субстанции, что избирательно ухудшает синтез ДА без нарушения его утилизации и продукции предшественников. У пациентов с АРФ БП, как указано выше, происходит параллельная дегенерация биологического субстрата всех катехоламиновых функциональных систем. Выявленные закономерности изменения концентрации катехоламинов плазмы в крови пациентов с различными формами и стадиями БП представлены в табл. 3.

Ограничения исследования. При правильном выполнении методики забора крови из вены для анализа концентрации катехоламинов в плазме крови ограничений к исследованию нет. Однако нужно учитывать методику взятия НА из кубитальной вены: пациент должен находиться в расслабленном лежачем положении, кровь забирается не сразу после пункции, а через 10–30 минут. Эта предосторожность направлена на уменьшение влияния внешних факторов (в том числе вкола иглы в вену руки), которые быстро и значительно могут поднять уровень НА в крови (в 5–10 раз). Кроме того, пациент должен быть предупрежден о необходимости взятия крови натощак, так как некоторые препараты и пища могут вызвать повышение концентрации НА и ДОФУК в крови.

Заключение

Результаты нашего исследования поддерживают гипотезу о различном патогенезе ДФ БП и АРФ БП, чем и определяется разница в абсолютных и относительных показателях концентрации катехоламинов в плазме крови. Мы выявили некоторые значительные различия в относительных показателях основного обмена катехоламинов: резкое снижение уровня обмена (синтеза и утилизации ДА) у пациентов с АРФ БП и относительно сохранные показатели и взаимосвязи показателей катехоламинов у пациентов с ДФ БП. Полученные данные нуждаются в дальнейшем углубленном изучении. ©

Конфликт интересов

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

Финансирование

Данная исследовательская инициатива финансировалась Инвестиционно-венчурным фондом Республики Татарстан (ИВФ РТ) и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (ФСРМФП) (Договор о научном сотрудничестве, п. 1, от 21.03.2011).

Литература

- Goldman JG, Postuma R. Premotor and non-motor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2014;27(4):434–41. doi: 10.1097/WCO.0000000000000112.
- Залялова ЗА, Хасанова ДМ. Депрессия у пациентов с ранними стадиями болезни Паркинсона. *Трудный пациент.* 2016;(4–5): 22–8.
- Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1900–13. doi: 10.1093/brain/aws055.
- Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:31. doi: 10.3389/fn-sys.2011.00031.
- Угрюмов МВ, ред. *Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма.* Т. 1. М.: Научный мир; 2014; 580 с.
- Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
- Eldrup E, Mogensen P, Jacobsen J, Pakkenberg H, Christensen NJ. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epi-



- nephrine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995;92(2):116–21. doi: 10.1111/j.1600-0404.1995.tb01023.x.
8. Lewitt PA. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1(1):4. doi: 10.1186/2047-9158-1-4.
9. Веселова ИА, Сергеева ЕА, Македонская МИ, Еремина ОЕ, Калмыков СН, Шеховцова ТН. Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики. *Журнал аналитической химии.* 2016;71(12):1235–49. doi: 10.7868/S0044450216120124.
10. Goldstein DS, Holmes C. Neuronal source of plasma dopamine. *Clin Chem.* 2008;54(11):1864–71. doi: 10.1373/clinchem.2008.107193.
11. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(5):303–13. doi: 10.1177/17.5.303.
12. Wahbe F, Hagege J, Loreau N, Ardaillou R. Endogenous dopamine synthesis and dopa-decarboxylase activity in rat renal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 1982;27(1):45–54. doi: 10.1016/0303-7207(82)90061-2.
13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 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.
14. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(20):1916–25. doi: 10.1212/01.wnl.0000312279.49272.9f.
15. Селихова МВ, Коган БВ, Серкин ГВ, Гусев ЕИ. Обмен катехоламинов при разных формах болезни Паркинсона. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2002;102(9):37–40.
16. Marras C, Chaudhuri KR. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. *Mov Disord.* 2016;31(8):1095–102. doi: 10.1002/mds.26510.
17. Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain.* 2009;132(Pt 11):2947–57. doi: 10.1093/brain/awp234.
18. Thenganatt MA, Jankovic J. Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):499–504. doi: 10.1001/jamaneuro.2013.6233.
19. Siderowf A, Newberg A, Chou KL, Lloyd M, Colcher A, Hurtig HI, Stern MB, Doty RL, Mozley PD, Winterson N, Duda JE, Weintraub D, Moberg PJ. [99mTc]TRODAT-1 SPECT imaging correlates with odor identification in early Parkinson disease. *Neurology.* 2005;64(10):1716–20. doi: 10.1212/01.WNL.0000161874.52302.5D.
20. Niethammer M, Feigin A, Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a009274. doi: 10.1101/cshperspect.a009274.
21. Залялова ЗА. Дрожательные фенотипы болезни Паркинсона. В: Иллариошкин СН, Левин ОС, ред. *Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием).* М.: Серебряные нити; 2011. с. 55–9.
1. Goldman JG, Postuma R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2014;27(4):434–41. doi: 10.1097/WCO.0000000000000112.
2. Zalyalova ZA, Khasanova DM. Depression in patients with early stage Parkinson disease. *Difficult Patient.* 2016;(4–5):22–8. Russian.
3. Goldstein DS, Holmes C, Sharabi Y. Cerebrospinal fluid biomarkers of central catecholamine deficiency in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1900–13. doi: 10.1093/brain/awo055.
4. Delaville C, Deurwaerdere PD, Benazzouz A. Noradrenaline and Parkinson's disease. *Front Syst Neurosci.* 2011;5:31. doi: 10.3389/fn-sys.2011.00031.
5. Ugrumov MV, editor. *Neurodegenerative diseases: from genome to the whole organism.* Vol. 1. Moscow: Nauchnyy mir; 2014. 580 p. Russian.
6. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989.
7. Eldrup E, Mogensen P, Jacobsen J, Pakkenberg H, Christensen NJ. CSF and plasma concentrations of free norepinephrine, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA), and epinephrine in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* 1995;92(2):116–21. doi: 10.1111/j.1600-0404.1995.tb01023.x.
8. Lewitt PA. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener.* 2012;1(1):4. doi: 10.1186/2047-9158-1-4.
9. Veselova IA, Sergeeva EA, Makedonskaya MI, Eremina OE, Kalmykov SN, Shekhovtsova TN. Methods for determining neurotransmitter metabolism markers for clinical diagnostics. *J Anal Chem.* 2016;71(12):1155–68. doi: 10.1134/S1061934816120108.
10. Goldstein DS, Holmes C. Neuronal source of plasma dopamine. *Clin Chem.* 2008;54(11):1864–71. doi: 10.1373/clinchem.2008.107193.
11. Pearse AG. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem.* 1969;17(5):303–13. doi: 10.1177/17.5.303.
12. Wahbe F, Hagege J, Loreau N, Ardaillou R. Endogenous dopamine synthesis and dopa-decarboxylase activity in rat renal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 1982;27(1):45–54. doi: 10.1016/0303-7207(82)90061-2.
13. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. 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.
14. Braak H, Del Tredici K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. *Neurology.* 2008;70(20):1916–25. doi: 10.1212/01.wnl.0000312279.49272.9f.
15. Selikhova MV, Kogan BV, Serkin GV, Gusev EI. Catecholamines' metabolism in different forms of Parkinson disease. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2002;102(9):37–40. Russian.
16. Marras C, Chaudhuri KR. Nonmotor features of Parkinson's disease subtypes. *Mov Disord.* 2016;31(8):1095–102. doi: 10.1002/mds.26510.
17. Selikhova M, Williams DR, Kempster PA, Holton JL, Revesz T, Lees AJ. A clinico-pathological study of subtypes in Parkinson's disease. *Brain.* 2009;132(Pt 11):2947–57. doi: 10.1093/brain/awp234.
18. Thenganatt MA, Jankovic J. Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol.* 2014;71(4):499–504. doi: 10.1001/jamaneuro.2013.6233.
19. Siderowf A, Newberg A, Chou KL, Lloyd M, Colcher A, Hurtig HI, Stern MB, Doty RL, Mozley PD, Winterson N, Duda JE, Weintraub D, Moberg PJ. [99mTc]TRODAT-1 SPECT imaging correlates with odor identification in early Parkinson disease. *Neurology.* 2005;64(10):1716–20. doi: 10.1212/01.WNL.0000161874.52302.5D.
20. Niethammer M, Feigin A, Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(5):a009274. doi: 10.1101/cshperspect.a009274.
21. Zalyalova ZA. Shaking phenotypes of Parkinson's disease. In: Illarioshkin SN, Levin OS, editors. *Parkinson's disease and movement disorders: Guide for Physicians based on the proceedings of the II National Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders.* Moscow: Serebryanye niti; 2011. p. 55–9. Russian.



Plasma catecholamine levels in the early stages of treatment-naïve Parkinson's disease

Z.A. Zalyalova^{1,2} • D.M. Khasanova² • M.V. Ugrumov³

Rationale: Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder with predominant involvement of catecholamine-producing neurons of the central and peripheral nervous system. Taking into account the relative availability and low costs of plasma catecholamine measurements, it is worthwhile to study these parameters as biomarkers of the early stages of PD. **Aim:** To determine whether plasma levels of dopamine (DA), norepinephrine (NE), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in patients with early stages of PD are related with akinetic-rigid and tremor-dominant variants and to compare the results to healthy volunteers. **Materials and methods:** This was an observational cross-sectional cohort study performed from 2012 to 2015. The main study group included unselected outpatients who attended the Republican Consultative and Diagnostic Center of Movement Disorders and Botulinotherapy (Kazan, Russia) with newly diagnosed early PD (Hoehn and Yahr stages I and II, 1967), of various ages and both genders, who had not been given any specific antiparkinsonian treatment. The control group included healthy volunteers with no clinical signs of PD (they could have other chronic diseases of the non-extrapyramidal origin). Plasma catecholamine levels were measured by gas liquid chromatography. **Results:** One hundred and thirty (130) treatment-naïve patients with newly diagnosed PD (mean age 59.34±8.42 years, male gender 45.38%) were enrolled into the main study group. The control group included 56 healthy volunteers matched for age and gender. The distribution of various PD forms and stages was as follows: PD tremor-dominant variant 56.9%, PD akinetic-rigid variant 43.1%; PD stage I 76.9%, PD stage II 23.1%. Irrespective of the variant and stage, the PD patients demonstrated decreased NE levels, compared to the

controls (95% confidence intervals 124–216 and 248–428 pg/mL, respectively, $p < 0.026$). DOPA plasma level was reduced only in the patients with akinetic-rigid PD variant ($p = 0.017$), while DOPAC level in the patients with PD stage II ($p = 0.008$). The average DA:NE:DOPA:DOPAC ratio was 1:32:105:64 in the control group, 1:62:238:88 in the patients with PD tremor-dominant variant (the difference is significant for NE and DOPA, $p < 0.05$), and 1:29:96:32 in those with PD akinetic-rigid variant ($p > 0.05$). In the healthy controls the changes in DOPA levels account for 84% of the DA and NE variability; no correlation between DOPAC and other catecholamines was found. On the contrary, in the PD patients regardless of the stage and the disease variant, DOPAC levels directly correlated with DA ($p < 0.04$). The PD tremor-dominant variant patients demonstrated a direct correlation between plasma NE and DOPA levels ($p < 0.05$). **Conclusion:** The results obtained on absolute and relative parameters catecholamine turnover in the patients with early PD stages support the hypothesis on different pathophysiology of the tremor-dominant and akinetic-rigid variants of PD.

Key words: idiopathic Parkinson's disease, Parkinson's disease tremor-dominant variant, Parkinson's disease akinetic-rigid variant, catecholamine, biomarker

For citation: Zalyalova ZA, Khasanova DM, Ugrumov MV. Plasma catecholamine levels in the early stages of treatment-naïve Parkinson's disease. *Almanac of Clinical Medicine*. 2018;46(8):792–801. doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-8-792-801.

Received 27 June 2018;
accepted 17 December 2018

Zuleykha A. Zalyalova – MD, PhD, Professor, Neurology and Rehabilitation Department¹, Head²
✉ 49 Butlerova ul., Kazan, 420012, Russian Federation. Tel.: +7 (917) 267 22 01.
E-mail: z.zalyalova@gmail.com

Diana M. Khasanova – MD, PhD, Neurologist²

Michael V. Ugrumov – Member of Russian Academy of Sciences, ScD in Biology, Head of Laboratory of Neural and Neuroendocrine Regulations³

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Funding

This research initiative was financially supported by the Investment and venture fund of the Republic of Tatarstan (IVF RT) and the Foundation for promotion of the development of small enterprises in the research and technical area (FPDSE) (Research Collaboration Agreement, art. 1, from 21.03.2011).

¹ Kazan State Medical University; 49 Butlerova ul., Kazan, 420012, Russian Federation

² Republican Consultative and Diagnostic Center of Movement Disorders and Botulinotherapy; 5 Isaeva ul., Kazan, 420029, Russian Federation

³ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences; 26 Vavilova ul., Moscow, 119334, Russian Federation