

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT:

Biomarkeri implicați în diagnosticul precoce al bolii Parkinson

Doctorand: **Nicoleta Tohănean**

Conducător științific :**Prof.dr. Lăcrămioara Perju-Dumbravă**

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	17
1. Prezentare generală a bolii Parkinson	19
1.1. Considerații etiopatogenetice	19
1.1.1. Factorii de mediu	20
1.1.2. Disfuncția mitocondrială genetică și BP	22
1.1.3. Genetica mendeliană în BP.	22
1.2. Diagnosticul BP- tabloul clinic clasic(faza motorie)	23
2. Diagnosticul în faza premotorie a BP	25
2.1. Importanța diagnosticului precoce al BP	25
2.2. Simptomele nonmotorii din BP	26
2.2.1. Disfuncția olfactivă din BP	28
2.2.2. Disautonomia în BP premotorie	29
2.2.2.1. Tulburările de motilitate gastrointestinală	29
2.2.2.2. Tulburările genitourinare	30
2.2.2.3. Simptomele cardiovasculare	31
2.2.3. Tulburările afective din BP premotorie	31
2.2.3.1. Depresia	32
2.2.3.2. Anxietatea	33
2.2.4. Tulburările de somn în BP premotorie.	33
2.2.4.1. Tulburările somnului REM	33
2.2.4.2. Somnolența diurnă exagerată	34
3. Investigatii paraclinice	34
3.1. Generalități	34
3.2. Examenul Duplex Trascranian in diagnosticul BP	35
3.2.1. Utilitatea examinării-generalități	35
3.2.2. Cauze ale hiperecogenității substanței negre	36
3.2.3. Aplicarea sonografiei transcraniene în diagnosticul pozitiv al BP	36
3.2.4. Aplicarea sonografiei transcraniene în diagnosticul diferențial al BP	37
3.2.4.1. Sindroamele parkinsoniene atipice	37
3.2.4.2. Alte sindroame parkinsoniene	37
3.2.5. Hiperecogenitatea SN ca marker preclinic al afectării nigrostriatale	38
4. Biomarkeri utili în evaluarea pacientului cu BP incipientă	38
4.1. Utilitatea biomarkerilor în diagnosticul precoce al bolii	38
4.2. Clasificarea biomarkerilor	39
4.3. Biomarkeri clinici	40
4.3.1. Tulburarea idiopatică a somnului REM(RBD)	40
4.3.2. Deficitele olfactive	41
4.3.3. Constipația	41
4.3.4. Scalele clinice motorii sau nonmotorii de evaluare a bolii	42
4.4. Biomarkeri genetici	42
4.5. Biomarkeri serici, din LCR sau tesuturi	42
4.6. Biomarkeri neuroimagingistici	43
4.7. Sindromul PARS	44

CONTRIBUȚII PERSONALE	45
1. Ipoteză de lucru	47
2. Metodologie generală	48
3. Studiu 1: Evaluarea simptomelor nonmotorii la pacienții cu boală Parkinson în stadii incipiente	51
3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteză de lucru	52
3.3. Material și metodă	53
3.4. Rezultate	55
3.4.1. Date demografice ale pacienților	56
3.4.2. Ponderea simptomelor nonmotorii în tabloul clinic al pacienților parkinsonieni la debut.	65
3.4.3. Analize inferențiale pentru simptomele grupate în categorii	79
3.4.4. Gradul global de afectare nonmotorie în BP la debut	90
3.5. Discuții	97
3.6. Concluzii	105
4. Studiul 2: Importanța testării funcției olfactive în diagnosticul bolii Parkinson	107
4.1. Introducere	107
4.2. Ipoteză de lucru	107
4.3. Material și metodă	108
4.4. Rezultate	110
4.4.1. Testarea subiectivă a funcției olfactive	110
4.4.2. Testarea obiectivă a funcției olfactive- analize inferențiale privind corelațiile scorului la olfactometrie	111
4.4.3. Relația între măsurătorile obiective ale simțului olfactiv și cele declarate de pacienți	117
4.5. Discuții	119
4.6. Concluzii	122
5. Studiul 3: Contribuția examinării sonografice transcraniene în diagnosticul de boala Parkinson	123
5.1. Introducere	123
5.2. Ipoteză de lucru	124
5.3. Material și metodă	125
5.4. Rezultate	130
5.4.1. Descrierea eșantionului	130
5.4.2. Analiza comparativă sub aspectul valorilor parametrilor ecografici	130
5.4.3. Analiza discriminativă a celor 4 parametri studiați	132
5.4.4. Analize privind corelațiile între valorile obținute la examinarea ultrasonografică și caracteristicile clinice ale BP	136
5.5. Discuții	138
5.6. Concluzii	140
6. CONCLUZII GENERALE	141
REFERINȚE	143

Cuvinte cheie: biomarkeri, simptome nonmotorii, disfuncție olfactivă, ecografie transcraniană, hiperecogenitatea substanței negre

Ultimii ani de cercetări clinice, patogenetice și morfopatologice au revoluționat noțiunile clasice de boală Parkinson ca entitate motorie, vorbindu-se de o **fază premotorie** ce precede diagnosticul clasic motor, fază în care tabloul clinic este dominat de simptomele nonmotorii. Există în literatura de specialitate recentă, termenul de **sindrom la risc de a dezvolta boală Parkinson- sindromul PARS**, ce cuprinde această fază a bolii prediagnostică, tot mai bine conturată prin markeri clinici, genetici și imagistici, în care se încearcă să se stabilească diagnosticul și să se inițieze o terapie neuroprotectivă.

Simptomatologia nonmotorie în BP este variată, numeroasă și nespecifică, este prezentă încă din stadiile preclinice de boală și poate contribui la diagnosticarea precoce a bolii. Aceste simptome premotorii includ disfuncția olfactivă, disautonomiile (constipația, hipotensiunea ortostatică), tulburările de somn (RBD) și depresia.

Hiposmia reprezintă un simptom cvasiprezent, ce predează simptomele clasice de boală, a cărei importanță rezidă din ușurința obiectivării și costul mic al testării, precum și aportului pe care disfuncția olfactivă îl poate juca în diagnosticul diferențial al sindroamelor parkinsoniene.

Ecografia transcraniană a fost utilizat inițial în patologia cerebrală pentru a evalua afecțiunile cerebrovasculare dar în ultima perioadă a început să fie utilizată cu succes pentru a evidenția modificări la nivelul structurilor dopaminergice la pacienții cu boală Parkinson. Datele a multiple studii efectuate susțin utilitatea acestei metode în diagnosticul pozitiv și diferențial al bolii Parkinson, **hiperecogenitatea substanței negre** indicând cu o precizie ridicată, diagnosticul de boală Parkinson idiopatică.

Comparativ cu alte metode neuroimagistice structurale, metoda se remarcă prin faptul că este noninvasivă, repetabilă, ușor accesibilă și ieftină. Sensibilitatea și specificitatea metodei este ridicată, depinzând doar de performanțele investigatorului și ale aparatului. Important este și faptul că modificările sonografice predează debutul simptomelor nonmotorii, examinarea având potențialul de a fi utilizată pentru a ajuta la diagnosticarea precoce a bolii în stadiul premotor.

Examinarea poate fi recomandată fără limitări, ca instrument de diagnostic adițional în cadrul testării de rutină la pacienții ce se prezintă cu semne parkinsoniene.

Lucrarea de față are ca obiectiv principal elaborarea unui **protocol diagnostic(-clinic)** prin identificarea simptomelor nonmotorii, insistându-se pe simptomatologia autonomă și disfuncția olfactivă și **-paraclinic** prin decelarea modificărilor ecografice la sonografia transcraniană și cuantificarea tulburărilor olfactive prin olfactometrie). Acest protocol poate fi aplicat în mod standard în diagnosticul precoce la pacienții cu suspiciune de BP urmărindu-se depistarea bolii în faza premotorie și inițierea cât mai rapidă a unei terapii adecvate.

Lotul de pacienți înrolați în studiu a totalizat un număr de 43 de pacienți internați sau consultați ambulator consecutiv, în perioada 1.01.2010 –31.12.2010 în Clinica Neurologie I, prezentând clinic un sindrom parkinsonian la debut, respectiv diagnosticați cu BP incipientă(durata de maxim 3 ani de la diagnostic, BP în stadiile de boală 1; 1,5 și 2 H&Y).

Studiul 1: Evaluarea simptomelor nonmotorii la pacienții cu boală Parkinson în stadii incipiente

S-a urmărit într-o primă etapă identificarea și stabilirea unor predispoziții generale pentru dezvoltarea BP, precum: vârsta înaintată, sexul masculin, istoricul familial de BP, mediul rural, expunerea la substanțe toxice, statusul de nonfumător.

La toți pacienții înrolați în studiu a fost aplicat chestionarul NMS–PD QUEST și au fost identificate simptomele nonmotorii, stabilindu-se frecvența acestora și s-a efectuat o grupare pe domenii de afectare și interpretarea lor în contextul bolii.

Chestionarul este elaborat de un grup multidisciplinar de experți conduși de K.R. Chaudhuri, a fost validat în 2006 într-un studiu multicentric internațional și cuprinde 30 întrebări de autoevaluare, referitoare la existența unor acuze nonmotorii(vegetative și psihiatrice). Chestionarul NMS-PD QUEST este un instrument de screening destinat să atragă atenția asupra posibilității prezenței simptomelor nonmotorii și eventual să se indice investigații suplimentare în direcția respectivă.

Au fost incluși pacienți cu BP incipientă cu simptome minore și s-a observat o distribuție uniformă a cazurilor în ce privește stadiu, vârstă și sex. Vârsta medie a pacienților a fost de 64,06 ani(dev. std= 9,68) iar repartiția pe sexe a pacienților a fost într-un raport F:B de 1,53.

Cele mai frecvente simptome nonmotorii raportate la chestionar au fost cele autonome(nicturie-83,72%, micțiuni imperioase- 76,74%, hipotensiune ortostatică- 72,09%), dar și tulburările psihice(depresie- 81,39%, tulburări de atenție- 79,06%, tulburări de memorie- 74,41%) și cele legate de afectarea somnului(insomnie- 69,76%).

Toți pacienții chestionați au raportat cel puțin un simptom nonmotor, nicturia și depresia fiind cel mai frecvent raportate simptome.

Constipația a fost simptomul gastrointestinal cel mai frecvent decelat într-un procent de 65,11%. Nu au existat diferențe semnificative ale tulburărilor digestive în funcție de sex, vârstă, expunerea la toxice sau fumat, tratament, mediu de proveniență dar s-au corelat semnificativ cu istoricul familial de BP. Simptomele digestive sunt mai frecvente pe măsura progresiei bolii atât ca vechime cât și ca severitate și nu variază în funcție de tipul clinic de boală.

Simptomele cardiovasculare reprezentate de hipotensiune ortostatică(72,09%) și căderi(41,86%) au fost decelate în procente ridicate, nu s-au corelat cu variabilele urmărite și au fost ușor mai frecvente în forma mixtă de boală.

Din punct de vedere al simptomelor urinare, nicturia a fost simptomul nonmotor cel mai frecvent raportat(83,72%), alături de micțiunile imperioase(76,74%). Tulburările urinare au fost semnificativ mai frecvente în forma tremorigenă de boală, nu au variat în funcție de mediul de

proveniență, AHC, expunere la toxice sau fumat, tratament dar s-a observat o relație direct proporțională între prevalența acestora și vârsta pacientului ($r=0,43$) dar nu și cu vechimea sau stadiul bolii.

Dintre simptomele autonome, tulburările sexuale au fost cel mai puțin raportate la chestionar și acestea au fost mai frecvente în mediu urban față de cel rural, fără a se depista alte corelații semnificative cu ceilalți parametri urmăriți.

Acuzele psihiatrice au ocupat un rol important întrucât nu au existat pacienți care să nu prezinte măcar un simptom psihic și în majoritatea cazurilor pacienții au descris un complex de mai multe simptome asociate: aproximativ o treime din pacienții de ambele sexe acuză concomitent câte 5 acuze de acest gen.

În cadrul domeniului psihiatric prevalența cea mai mare a aparținut tulburărilor afective, depresive-81,39%, urmate de tulburările de atenție și concentrare-79,06%, tulburările de memorie-74,41% și anxietate-60,46%. Singura corelație semnificativă statistic a fost cu istoricul familial de BP ($p=0,05$) care s-a asociat cu o prevalență mai mare a simptomelor psihiatrice.

Domeniul tulburărilor de somn a fost bine reprezentat prin insomnie, prezentă în 69,76% din cazuri, urmată de EDS și somn cu coșmaruri în procente egale de 46,51%, acestea asociindu-se frecvent. Tulburările de somn s-au decelat în procente mai ridicate în forma akinetic- rigidă de boală și sunt în relație direct proporțională cu stadiul bolii H&Y ($p=0,01$). Nu s-au decelat alte corelații semnificative între prevalența tulburărilor de somn și celelalte variabile studiate.

Simptomele senzitive s-au decelat în procente importante, respectiv: durerea fără o cauză definită- 53,48% și paresteziile membrelor- 69,76%. Media simptomelor senzitive la sexul feminin a fost mai ridicată față de bărbați, de asemeni aceasta a fost mai mare în mediul rural și nu a variat în funcție de ceilalți parametri urmăriți.

Prezența hipersudorației, a edemelor sau a diplopiei nu se asociază semnificativ cu nici una din variabilele testate.

În studiul efectuat, media scorului simptomelor nonmotorii a fost ridicată, respectiv 14,48 (dev. std.=4,73) cu limitele de 6 și 25.

Scorul total nu a variat semnificativ în funcție de vârsta și sexul pacienților, mediul de proveniență, expunerea la fumat sau toxice, istoricul familial sau tratament. S-a decelat o relație direct proporțională semnificativă statistic între scorul nonmotor și durata bolii, respectiv stadiul H&Y, în sensul progresiei simptomatologiei nonmotorii pe parcursul evoluției bolii, atât ca vechime cât și ca severitate. Nu s-a observat o legătură între subtipul clinic de boală și amploarea simptomatologiei nonmotorii.

La lotul studiat, nu au existat pacienți care să nu prezinte afectare nonmotorie: peste jumătate din pacienți (57,5%) prezintă gradul 3 moderat de afectare nonmotorie și un procent important de 37,5% se găsesc într-un stadiu de afectare ușoară.

Rezultatele expuse subliniază importanța chestionării pacienților cu privire la acuzele nonmotorii încă de la debutul bolii.

Studiu 2: Importanța testării funcției olfactive în diagnosticul bolii Parkinson

Disfuncția olfactivă aparține varietății de simptome nonmotorii ce apare înaintea simptomelor motorii clasice de BP și poate ajuta în stabilirea unui diagnostic precoce de BP.

Funcția olfactivă a fost evaluată utilizând **12-marker Smell Test : Sniffin' Sticks-Screening 12**. Acest test este o metodă validată în studii clinice pentru practica curentă și permite decelarea pacienților cu disfuncție olfactivă, servind ca **prim diagnostic de orientare**. Testul evaluează **capacitatea de identificare olfactivă a pacientului** și se efectuează ușor și rapid.

Hipoosmia reprezintă o caracteristică comună a BP cu o prevalență înaltă încă din stadiile incipiente ale bolii, fapt evidențiat și de frecvențele obținute pe lotul studiat : 93% la testarea obiectivă.

Afectarea olfactivă este severă încă de la debutul bolii, scorul mediu obținut cu 12 markers Smell test fiind de 5,97.

Nu s-au identificat diferențe între performanțele olfactive ale celor 2 sexe sau în funcție de vârsta pacientului.

Variabilele urmărite de tipul-mediul de proveniență, statusul de fumător , expunerea la toxice, istoricul familial nu reprezintă factori care să afecteze semnificativ gradul disfuncției olfactive din BP.

La grupul studiat, procentul sumat al pacienților cu deficit olfactiv a fost important și nu s-a găsit o corelație între funcția olfactivă și progresia bolii(exprimată prin durata de la diagnosticarea bolii) sau severitatea bolii(cuantificată prin stadiul H&Y).

Deficitul olfactiv nu a variat semnificativ în funcție de subtipul clinic de boală, astfel nu există diferențe între forma tremorigenă, akinetic-rigidă și cea mixtă de BP.

Scorul de disfuncție olfactivă se corelează semnificativ cu scorul total al simptomelor nonmotorii($p=0,01$), hipoosmia aparținând complexului de simptome nonmotorii ce preced apariția BP.

Testarea obiectivă a olfacției(hipoosmie în procent de 93%) este mai sensibilă decât simpla chestionare a pacientului(procent de 43%), pacienții neconștientizând frecvent pierderea olfactivă.

Sniffin Sticks test este o metodă rapidă, ușor de efectuat și cu rezultate bune, putând reprezenta un instrument util de diagnosticare a hiposmiei din BP.

Hiposmia este un simptom cardinal precoce al BP și poate reprezenta un marker important al fazei premotorii a bolii.

Studiu 3: Contribuția examinării sonografice transcraniene în diagnosticul de boala Parkinson

S-a realizat un substudiu pe 12 pacienți cu diagnostic de BP din lotul inițial, la care s-a efectuat examenul ecografic transcranian al trunchiului cerebral prin fereastra temporală și s-au identificat structurile anatomice, măsurându-se parametrii ecografici bilaterali: diametrul ventriculului lateral, gradul de ecogenitate și dimensiunea SN, aspectul rafeului, diametrul

ventriculului III. Datele au fost comparate cu cele ale unui grup de control alcătuit din 10 subiecți fără diagnostic de BP.

Studiul a fost de tip caz-control, experimental, de evaluare a unui procedeu diagnostic.

Prevalența modificărilor la nivelul structurilor dopaminergice în BP este ridicată: hiperecogenitatea SN bilaterală peste valorile limită de 0,20 cm² a fost detectată la 100% din pacienții cu BP și la niciun subiect din lotul de control.

Gradul hiperecogenității SN a fost important, fiind cuantificat după măsurare ca moderat la 60% din pacienți și marcat la restul de 40%.

La toți pacienții urmăriți s-au decelat valori peste limita normală a diametrului ventriculului lateral iar la 80% s-a descris un aspect patologic al rafeului.

Modificările ultrasonografice sunt importante încă din stadiile precoce ale bolii.

Sensibilitatea și specificitatea metodei ecografice a fost de 100% pentru precizarea diagnosticului de BP. Toate cele 4 variabile urmărite(dimensiunea SN și diametrul VL bilateral) au o valoare discriminativă ridicată.

Nu s-au observat corelații semnificative între hiperecogenitatea SN și nici una din caracteristicile clinice urmărite(sex, vârstă, vechimea bolii, tipul sau stadiul bolii).

Hiperecogenitatea SN este stabilă pe măsura progresiei bolii, dimensiunile acesteia nu variază semnificativ în funcție de vechimea sau severitatea bolii.

Examenul sonografic transcranian a SN de la nivelul trunchiului cerebral s-a dovedit a fi o metodă utilă în diagnosticul pozitiv al BP.

Identificarea simptomelor nonmotorii, obiectivarea modificărilor ecografice la sonografia transcraniană și cuantificarea tulburărilor olfactive pot fi introduse în protocolul de diagnostic precoce al BP în scopul depistării cât mai precoce a bolii.

PhD Thesis:

The role of biomarkers in the early diagnosis of Parkinson's disease

PhD candidate: **Nicoleta Tohănean**

Scientific coordinator :**Prof.dr. Lăcrămioara Perju-Dumbravă**

CONTENT

INTRODUCTION	15
CURRENT STADE OF KNOWLEDGE	17
1. Overview of Parkinson’s disease	19
1.1. Etiopathogenic considerations	19
1.1.1. Environmental factors	20
1.1.2. Genetic mitochondrial dysfunction and BP	22
1.1.3. Mendelian Genetics in BP.	22
1.2. Diagnosis of BP- classic clinical diagnosis (phase motor)	23
2. Premotor stage diagnosis of BP	25
2.1. Importance of early diagnosis of PD	25
2.2. Nonmotor symptoms of PD	26
2.2.1. Olfactory dysfunction in PD	28
2.2.2. Dysautonomia in premotor PD	29
2.2.2.1. Gastrointestinal motility disturbances	29
2.2.2.2. Genitourinary disturbances	30
2.2.2.3. Cardiovascular symptoms	31
2.2.3. Affective disorders in premotor BP	31
2.2.3.1. Depression	32
2.2.3.2. Anxiety	33
2.2.4. Sleep disorders in premotor BP	33
2.2.4.1. REM sleep disorders	33
2.2.4.2. Excessive daytime sleepiness	34
3. Paraclinical investigations	34
3.1. Overview	34
3.2. Trascranian Duplex examination in the diagnosis of BP	35
3.2.1. Usefulness of examination	35
3.2.2. Causes of SN hyperecogenity	36
3.2.3. Application of transcranial sonography in the positive diagnosis of BP	36
3.2.4. Application of transcranial sonography in the differential diagnosis of BP	37
3.2.4.1. Atypical Parkinsonian Syndromes	37
3.2.4.2. Other parkinsonian syndromes	37
3.2.5. SN hyperecogenity as marker of preclinical nigrostriatal damage	38
4. Biomarkers useful in evaluating patients with early PD	38
4.1. Use of biomarkers for early diagnosis of disease	38
4.2. Classification of biomarkers	39
4.3. Clinical biomarkers	40
4.3.1. REM behaviour disorder(RBD)	40
4.3.2. Olfactory deficits	41
4.3.3. Constipation	41
4.3.4. Clinical scales motor or nonmotor for disease assessment	42
4.4. Genetic biomarkers	42

4.5.	Serum, CSF or tissue biomarkers	42
4.6.	Neuroimagicistic biomarkers	43
4.7.	PARS syndrome	44
PERSONAL CONTRIBUTIONS		45
1.	Working hypothesis	47
2.	General methodology	48
3.	Study 1: Assesment of nonmotor symptoms at patients in early stages of Parkinson's disease	51
3.1.	Introduction	51
3.2.	Working hypothesis	52
3.3.	Material and method	53
3.4.	Results	55
3.4.1.	Demographic data of patients	56
3.4.2.	The share of nonmotor symptoms in the clinical picture of parkinsonian patients at onset	65
3.4.3.	Inferential analysis for symptoms grouped into categories	79
3.4.4.	The global degree of nonmotor impairment in BP at onset	90
3.5.	Discussions	97
3.6.	Conclusions	105
4.	Study 2: The importance of olfactory function testing in the diagnosis of Parkinson' s disease	107
4.1.	Introduction	107
4.2.	Working hypothesis	107
4.3.	Material and method	108
4.4.	Results	110
4.4.1.	Subjective testing of olfactory function	110
4.4.2.	Objective testing of olfactory function, inferential analysis concerning the correlation of score at olfactometry	111
4.4.3.	Relationship between objective measures of olfaction and those patient reported	117
4.5.	Discussions	119
4.6.	Conclusions	122
5.	Study 3: The contribution of transcranial sonographic examination in the diagnosis of Parkinson's disease	123
5.1.	Introduction	123
5.2.	Working hypothesis	124
5.3.	Material and method	125
5.4.	Results	130
5.4.1.	Sample description	130
5.4.2.	Comparative analysis under the aspect of the ultrasound parameters	130
5.4.3.	Discriminative analysis of the 4 studied parameters	132
5.4.4.	Analysis concerning the correlation between the values obtained from ultrasonography and clinical features of BP	136
5.5.	Discussions	138
5.6.	Conclusions	140
6.	GENERAL CONCLUSIONS	141
REFERENCES		143

Keywords: biomarkers, nonmotor symptoms , olfactory dysfunction, transcranial ultrasound, hyperecogenity of substantia nigra.

The recent years of clinical, pathogenetic and pathological studies have revolutionized the traditional concepts of Parkinson Disease(PD) as a motor entity, talking more about premotor phase who precedes the classical motor phase and when the clinical picture is dominated by nonmotor symptoms.

Also recent literature data describe **the syndrome at risk of developing Parkinson disease- syndrome PARS**, which includes this prediagnostic disease phase, that is represented by clinical, genetic and imaging markers, attempting to establish the diagnosis in order to initiate a neuroprotective therapy.

Nonmotors symptoms of PD are varied, numerous and nonspecific, which are present even in the preclinical stages of disease and which could contribute to early diagnosis of the disease. These premotors symptoms are represented by olfactory dysfunction, autonomic dysfunction (constipation, orthostatic hypotension), sleep disorders (RBD) and depression.

Hyposmia represents a common symptom that pre-dates classical symptoms of the disease. Hyposmia's importance lies in the easiness, low cost of testing and the contribution that olfactory dysfunction can play in the differential diagnosis of parkinsonian syndromes.

Transcranial ultrasound was initially used in brain pathology to evaluate cerebrovascular disease. However this technique has only recently started to be successfully used to highlight changes in the dopaminergic structures at PD patients.

The data from multiple studies support the utility of this method in positive and differential diagnosis of PD. As a consequence, the **hyperecogenity of substantia nigra** is indicatind with high accuracy the diagnostic of idiopathic PD.

In comparison with other structural neuroimaging methods, the method mentioned above does differentiate itself by the fact that it is non-invasive, repeatable, easily available and inexpensive. Also, this method has a high sensitivity and specificity, which only depends on the investigator's performance and the type of device that was used.

Due to the important fact the sonographic changes pre-date the onset of the non-motor symptoms, the examination does have the potential to be used in the early premotor diagnosis of the disease.

Therefore, this examination would be recommended without limitations as an additional diagnostic tool, which would be used in routine testing for patients who presents parkinsonian signs.

The present work has as two-folded **main objective** the development of a **diagnostic protocol**. On the one hand, the objective is clinical, which would focus to identify nonmotors symptoms, insisting on olfactory dysfunction and autonomic symptoms. On the other hand, the other objective is **paraclinical**, which would focus to detect transcranial ultrasound sonography changes and to quantify olfactory dysfunction by the use of olfactometry. The protocol could be applied in standard early diagnosis for patients with suspected PD, which has the aim to detect the disease in premotor phase and to initiate, as fast as possible, the appropriate therapies.

The group of patients enrolled in the study included a number of 43 patients, who were either consecutively hospitalized or being referred from ambulatory consultation in the period 1.01.2010 -31.12.2010 in Neurological Clinic I. These patients were either presenting a clinical onset of parkinsonian syndrome, or were diagnosed with early PD (duration of up to 3 years after diagnosis, PD stages of disease 1, 1.5 and 2 H & Y).

Study 1: Assessment of nonmotor symptoms at patients in early stages of Parkinson's disease

The initially study target was to identify and establish general predispositions to the development of PD, such as older age, male gender, family history of PD, rural areas, exposure to toxic substances, the non-smoker status.

For all patients enrolled in the study were applied the questionnaire NMS-PD QUEST and were identified the nonmotor symptoms, setting their frequency and classification on areas of involvement and was performed on their interpretation in the context of disease.

The questionnaire was developed by a multidisciplinary group of experts led by KR Chaudhuri, which was validated in 2006 by an international multicenter study. The questionnaire includes 30 self-assessment questions, which refer to the existence of nonmotor complaints (vegetative and psychiatric). NMS-PD QUEST questionnaire is a screening tool to draw attention to the possible occurrence of nonmotor symptoms and eventually indicates further investigation in that direction.

Early PD patients with mild symptoms were enrolled and there was a uniform distribution of cases regarding stage, age and sex. The mean age of patients was 64.06 years (std dev.- 9.68) and gender distribution of the patients was in a ratio F: B of 1.53.

The most common nonmotor symptoms reported by the questionnaire were the autonomous (nocturia-83, 72%, urinary urgency- 76,74%, orthostatic hypotension- 72.09%), psychiatric (depression- 81.39%, attention -79.06%, memory problems- 74.41%) and those related to impaired sleep (insomnia- 69.76%).

All surveyed patients reported at least one nonmotor symptom, where nocturia and depression were the most frequently reported symptoms.

Constipation was the most frequent gastrointestinal symptom, which was detected in a percentage of 65.11%. There were no significant differences of digestive dysfunctions by gender, age, exposure to toxic or smoking, treatment, environment but were significantly correlated with family history of PD. The digestive symptoms are becoming more common as the disease progresses, both in duration and in severity and did not vary according to the clinical type of disease.

Cardiovascular symptoms represented by orthostatic hypotension (72.09%) and falls (41.86%) were found in high proportions, but were not correlated with tracked variables and were slightly more frequent in the mixed form of the disease.

In terms of urinary symptoms, nocturia was the most frequently reported nonmotor symptom (83.72%), together with urinary urgency (76.74%). Urinary disorders were significantly

more common in tremor-dominant form of the disease, did not vary by environment, history of toxic or smoking exposure, treatment but there was a direct relationship between their prevalence and patient age ($r = 0,43$), and not with the duration and stage of the disease.

Amongst the autonomous symptoms, sexual disorders were the least reported in the questionnaire and they were more common in the urban over rural areas, without detecting other significant correlations with other aforementioned parameters.

Psychiatric complaints play an important role as there were no patients who did not present at least one psychiatric symptom and in most cases patients have described a complex of associated symptoms: roughly one third of the patients of both genders complain about 5 symptoms of each of this type, simultaneously.

Within the psychiatric field, the most prevalent symptom belonged to affective disorders- depression-81, 39%, followed by disorders of attention and concentration-79, 06%, memory impairment-74,41% and 60,46%. The only statistically significant correlation was with family history of PD ($p = 0.05$) which was associated with a higher prevalence of psychiatric symptoms.

The field of sleep disorders was well represented by insomnia, present in 69.76% of cases, which was followed by EDS and sleep with nightmares in equal percentages of 46.51%. Sleep disorders were detected in higher percentages in akinetic-rigid form of the disease and are related directly proportional to H & Y stage of disease ($p = 0,01$). No other significant correlation was detected between the prevalence of sleep disorders and the other variables studied.

Sensory symptoms were detected in significant percentages, respectively: pain without a defined cause- 53.48% and limb paresthesia- 69.76%. The average of the sensory symptoms for women was higher than in men, as well as it was higher in rural areas. However, it did not vary according to other parameters, which are taken into account.

The presence of sweating, edema or diplopia is not associated significantly with any of the variables tested.

In the study, the average of non-motor symptoms score was higher, namely 14.48 (std. dev. = 4.73) with limits of 6 and 25.

Total score did not vary significantly by age and patients' gender, origin, smoking or toxic exposure, family history or treatment. A significant statistical relationship between the nonmotor score and disease duration or H & Y stage was detected directly proportional, within the meaning of progression of nonmotor symptomatology during the course of the disease, both in the age and severity. It was not identified any relationship between clinical subtype and the extent of nonmotor symptoms.

In the study group, all patients have presented nonmotor involvement: more than half of patients (57.5%) presents the grade 3-moderate of nonmotor involvement and a significant percentage of 37.5% are found in a state of mild impairment.

The results presented highlights the importance of questioning the patients about nonmotor complaints from the very beginning of the diagnostic process.

Study 2: The importance of olfactory function testing in the diagnosis of Parkinson's disease

Olfactory dysfunction belongs to the variety of nonmotor symptoms which appears before the classical motor symptoms of PD and, as a consequence, would help may help in early diagnosis of PD.

Olfactory function was evaluated using the **12-marker Smell Test: Sniffin 'Sticks Screening 12**. This test is one of the validated methods in clinical studies for clinical practice, which allows detection of patients with olfactory dysfunction, serving as **a guidance for the first diagnostic**. The test evaluates patient's ability of olfactory identification and it is performed easily and quickly.

Hypoosmia is a common feature of PD with a high prevalence since the early stages of the disease, as assessed in the frequencies obtained on the study group: 93% in objective testing.

Olfactory impairment is severe from the very onset, the average score obtained by 12 markers Smell test being 5.97.

No differences were identified between olfactory performance of the two sexes or in relation to the patient age.

The variables tracked as the environment of origin, status of smokers, exposure to toxic, and family history do not significantly affect the level of olfactory dysfunction in PD.

In the study group, the percentage of patients with olfactory deficit was important. However, a correlation between the olfactory function and the disease progression –expressed as time to diagnose the disease or the disease severity – quantified by H & Y stage - was not found.

Olfactory deficit did not vary significantly according to clinical subtypes of the disease, so are no statistical differences between tremor-dominant, akinetic-rigid and the mixed-type of PD.

Olfactory dysfunction score correlates significantly with the total score of nonmotor symptoms ($p = 0.01$). Hypoosmia belongs to the complex of nonmotor symptoms that precede the occurrence of PD.

Objective test of olfactory function (hypoosmie in 93%) is more sensitive than simple patient questionnaires (43%), as patients are often not aware of the olfactory loss.

Sniffin Sticks is a quick, easy to perform and with good results method and can be a useful diagnostic tool of hyposmia of PD.

Hypoosmia is an early cardinal symptom of PD and may be an important marker of disease premotor phase.

Study 3: The contribution of transcranial sonographic examination in the diagnosis of Parkinson's disease

A substudy was performed on 12 patients from the initial group with a diagnosis of PD, on which we performed transcranial ultrasound examination of the brainstem through the temporal window. The study has been identified the anatomical structures by measuring bilateral the ultrasound parameters: diameter of the lateral ventricles, the degree of echogenicity

and size of SN, raphe aspect, the diameter of third ventricle. These data sets compared with those of a control group of 10 subjects who have not had a diagnosis of PD.

The study was experimentally, case- controlled, in order to evaluate a diagnosis procedure.

The prevalence of the changes in the dopaminergic structures in BP is high: bilateral hyperecogenity of substantia nigra over limit values of 0.20 cm² was detected in 100% of patients with BP and no subject from the control group.

The degree of SN hyperecogenity was important, quantified as moderate in 60% of patients and severe for the remaining 40%.

All patients have had detected values above the limit for the lateral ventricle diameter and at 80% have been describing a pathological aspect of the raphe.

The sonographic changes are important even in the early stages of the disease.

The sensitivity and specificity of ultrasound method was 100% for the diagnosis of BP. All 4 variables tracked (SN size and diameter of VL) have a high discriminative value.

No significant correlations were observed between SN hyperecogenity and clinical characteristics (sex, age, duration of disease, type and stage of disease).

SN hyperecogenity is stable during disease progression, its size is not significant and it varies depending on age or disease severity.

SN transcranial sonographic examination of the brainstem was found to be a useful tool in the positive diagnosis of BP.

The changes in ultrasound sonography, the quantification of olfactory dysfunctions do contribute towards the identification of nonmotor symptoms, which can be entered into the protocol for early diagnosis of BP in order to detect the disease as early as possible.