

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ПЕТЕРБУРГСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ ИМ. Б.П.  
КОНСТАНТИНОВА НАЦИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО  
ЦЕНТРА «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»**

На правах рукописи

Сенкевич Константин Алексеевич

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В  
ГЕНЕ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ (*GBA*)**

Специальность 03.01.04 – Биохимия

14.01.11 – Нервные болезни

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель –  
доктор биологических наук

Пчелина Софья Николаевна

Научный руководитель –  
кандидат медицинских наук

Милюхина Ирина Валентиновна

Санкт-Петербург – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. Современные представления об этиологии и патогенезе БП (Обзор литературы) .....	11
1.1 Эпидемиология и этиология БП .....	11
1.2 Диагностика БП .....	13
1.3 Генетические основы БП .....	17
1.4 Альфа-синуклеин как центральное звено нейродегенерации при БП .....	22
1.4.1 Функции альфа-синуклеина .....	24
1.4.2 Взаимосвязь накопления альфа-синуклеина и развития БП .....	25
1.4.3 Прионная гипотеза .....	26
1.5 Связь БП и болезни Гоше, мутаций в гене <i>GBA</i> как фактор высокого риска БП .....	27
1.6 Клинические особенности GBA-БП .....	31
1.6.1 Особенности моторной симптоматики у пациентов с GBA-БП .....	31
1.6.2 Когнитивные функции у пациентов с GBA-БП .....	33
1.6.3 Особенности нейропсихологического профиля пациентов с GBA- БП.....	35
1.7 Нейровоспаление при БП .....	36
1.8 Нарушение метаболизма сфинголипидов при БГ. Диагностика БГ .....	39
1.9 Связь между активностью глюкоцереброзидазы и накоплением альфа-синуклеина .....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
2.1 Выделение ДНК из периферической крови человека .....	50
2.2 Идентификация мутаций и полиморфных вариантов в гене <i>GBA</i> .....	51
2.3. Клиническая характеристика обследованных больных .....	54

2.3.1. Неврологический осмотр пациентов .....	55
2.3.2 Оценка когнитивных функций .....	57
2.3.3 Оценка моторных функций .....	57
2.3.4 Оценка тревоги и депрессии .....	58
2.3.5 Другие шкалы .....	59
2.4 Получение плазмы крови .....	59
2.5 Оценка концентрации олигомерного альфа-синуклеина .....	59
2.6 Определение концентрации цитокинов .....	60
2.7 Мультиплексный метод определения активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов в сухом пятне крови .....	61
2.7.1 Измерение активности лизосомных ферментов .....	61
2.7.2 Измерение концентрации лизосфинголипидов .....	65
2.8 Статистическая обработка данных .....	67
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....	69
3.1 Идентификация мутаций и полиморфных вариантов в гене <i>GBA</i> .....	69
3.2 Особенности клинического течения у пациентов с GBA-БП .....	70
3.3 Активность глюкоцереброзидазы у пациентов с GBA-БП .....	74
3.4 Оценка концентрации лизосфинголипидов у пациентов с GBA-БП.....	76
3.5 Концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови пациентов с GBA-БП .....	77
3.6 Цитокиновый профиль пациентов с GBA-БП в плазме крови.....	81
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	99
ВЫВОДЫ .....	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	103
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	104

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования.**

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, в основе патогенеза которого лежит агрегация белка альфа-синуклеина с формированием телец и нейритов Леви. БП характеризуется широким спектром как моторных (брадикинезия, тремор покоя, ригидность, постуральная неустойчивость), так и немоторных (когнитивный дефицит, депрессия, тревога и другие) симптомов. Немоторные симптомы предшествуют развитию моторной симптоматики при БП иногда на десятки лет. Моторная симптоматика БП появляется в связи с прогрессирующей дегенерацией дофаминергических нейронов чёрной субстанции (ЧС) и развивается при разрушении большей их части. В большинстве случаев БП является спорадическим заболеванием (сБП), в 10% случаев наблюдается семейный анамнез [Kalinderi, Vostantjoroulou, Fidani, 2016]. Сегодня известен ряд генов, мутации в которых являются причиной развития наследственных форм БП. Гетерогенность БП является актуальной проблемой, так как приводит к разной эффективности стандартных схем терапии у пациентов на одинаковых стадиях болезни, к сложностям прогнозирования течения болезни, затрудняя индивидуальный подход к лечению и реабилитации пациентов. В настоящее время существует ряд работ, посвящённых выделению отдельных субгрупп пациентов с БП. Выявление групп пациентов со сходным патогенезом развития заболевания позволит, во-первых, разработать профилактические меры и новые препараты, во-вторых, применять для такой группы больных персонализированный подход. Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) являются самым частым генетическим фактором высокого риска БП. Гомозиготные и компаундные гетерозиготные мутации в гене *GBA* приводят к развитию аутосомно-рецессивного заболевания, относящегося к классу лизосомных болезней накопления – болезни Гоше (БГ), характеризующейся резким снижением активности фермента глюкоцереброзидазы (GCase) и

накоплением субстратов, а именно глюкозилцерамида (GlcCer) и глюкозилсфингозина (GlcSph). В ряде популяций, в том числе и в России, было показано, что у гетерозиготных носителей мутации в гене *GBA* риск развития БП возрастает в 6-10 раз [Emelyanov et al., 2011; Sidransky et al., 2009]. В гене *GBA* описано более 300 мутаций. Наиболее частыми являются замены L444P и N370S, составляя до 75% мутантных аллелей. Кроме того, описаны полиморфные варианты (T369M и E326K), не приводящие к развитию БГ, но повышающие риск развития БП в 2 раза [Mallett et al., 2016; Pankratz et al., 2012].

Патогенез БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (GBA-БП), остаётся неясным. Ранее *in vitro* было показано взаимодействие между альфа-синуклеином и GCase в кислой среде характерной для лизосомы [Yap et al., 2011]. На нейрональных культурах при ингибировании активности GCase, а также на индуцированных стволовых клетках пациентов с БГ показано, что недостаточность ферментативной активности GCase приводит к увеличению уровня альфа-синуклеина [Mazzulli et al., 2011]. Более того, *in vitro* было показано, что непосредственно субстрат метаболизма GlcSph приводит к увеличению образования олигомерного альфа-синуклеина [Taguchi et al., 2017]. До настоящего времени было неизвестно, приводит ли гетерозиготное носительство мутаций в гене *GBA* к снижению активности фермента, накоплению субстрата, усилению процесса олигомеризации альфа-синуклеина и индукции воспаления у пациентов с БП. Настоящее исследование посвящено характеристике биохимических параметров крови (активности лизосомальных ферментов, в том числе GCase, концентрации лизосфинголипидов (HexSph) и олигомерного альфа-синуклеина), а также цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, ФНО-альфа, ИФН-гамма) у пациентов с GBA-БП, а также описанию клинического течения данной формы заболевания.

Выяснение молекулярно-генетических и клинических особенностей формы БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA*, является важным шагом к пониманию патогенеза заболевания в целом. Понимание патологических путей, ведущих к развитию заболевания, будет способствовать разработке новых терапевтических средств.

**Цель исследования** – выявление клинических и биохимических особенностей болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (GBA-БП).

**Задачи:**

1. Оценить частоту мутаций ((L444P (rs421016), N370S (rs76763715)) и полиморфных вариантов (E326K (rs75548401), T369M (rs2230288)) гена *GBA* у пациентов с БП в Северо-Западном регионе РФ.
2. Исследовать особенности моторных и немоторных (когнитивные нарушения, тревожные, депрессивные расстройства и расстройства сна) симптомов у пациентов с GBA-БП.
3. Измерить активность GCase и концентрацию гексозилсфингозина HexSph (смесь галактозилсфингозина (GalSph) и глюкозилсфингозина (GlcSph)) в сухих пятнах крови у пациентов с GBA-БП, со спорадической БП и в контрольной группе.
4. Определить концентрацию олигомерного альфа-синуклеина и цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН-гамма, ФНО-альфа) в плазме крови у пациентов с GBA-БП, со спорадической БП и в контрольной группе.

**Научная новизна:**

1. Впервые у носителей полиморфных вариантов E326K и T369M гена *GBA* показана большая выраженность тревоги и депрессии по сравнению со сБП.
2. Впервые показано накопление субстрата метаболизма сфинголипидов (HexSph) в сухих пятнах крови и повышение концентрации олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови при снижении активности GCase у пациентов с GBA-БП по сравнению с контрольной группой и группой пациентов со сБП.
3. Впервые показано повышение уровня ИЛ-1бета, ИЛ-10, ФНО-альфа у пациентов с GBA-БП по сравнению с контрольной группой и ИЛ-1бета и ФНО-альфа по сравнению с группой пациентов со сБП.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в ходе выполнения данного исследования, позволяют дополнить

современные представления о биохимических и молекулярно-генетических основах патогенеза БП.

Выявлены особенности патогенеза GBA-БП. У пациентов с GBA-БП была продемонстрирована повышенная концентрация олигомеров альфа-синуклеина в плазме крови. Также показано снижение активности GCase и повышение концентрации лизосфинголипидов (HexSph) в группе пациентов с GBA-БП. Особенности клинического течения GBA-БП (выраженность когнитивных расстройств, тревоги, депрессии) позволят разрабатывать персонализированные подходы к терапии данной формы БП.

Данные о распределении генетических вариантов *GBA* у пациентов с БП в Северо-Западном регионе РФ будут способствовать разработке стратегии выявления данной формы заболевания, а также групп риска заболевания среди родственников пациентов с GBA-БП. Понимание молекулярных основ патогенеза заболевания (снижение активности GCase, накопление лизосфинголипидов у гетерозиготных носителей мутаций *GBA*) позволяет обсуждать новые стратегии для разработки нейропротекторной терапии GBA-БП, в частности, с использованием молекулярных шаперонов и субстрат-редуцирующей терапии.

#### **Методология и методы исследования.**

Методы исследования, применяемые в данной работе, включали в себя клинический осмотр пациентов с использованием шкал для оценки когнитивных, моторных функций, тревоги, депрессии, психопродуктивной симптоматики, расстройств сна, комплекса немоторных симптомов и качества жизни. Молекулярно-генетические методы и биохимические методы: ПЦР-рестрикционный анализ с целью определения аминокислотных замен в гене *GBA*, оценка ферментативной активности GCase и концентрации HexSph в сухих пятнах крови проводилась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС), концентрация олигомерного альфа-синуклеина и цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН-гамма и ФНО-альфа) в плазме крови оценивалась с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Частота БП, ассоциированной с наличием мутаций (N370S и L444P) и полиморфных вариантов (E326K и T369M) в Северо-Западном регионе РФ среди пациентов с БП, составляет 6,6%.
2. Пациенты с GBA-БП имеют особенности клинической картины заболевания: ранний возраст начала заболевания, выраженный когнитивный дефицит и нейропсихиатрическую симптоматику по сравнению с пациентами со сБП, с отсутствием мутаций в гене *GBA*.
3. Развитие GBA-БП у гетерозиготных носителей мутаций N370S и L444P в гене *GBA* характеризуется снижением активности GCase по сравнению с пациентами со сБП, носителями полиморфных вариантов E326K и T369M и по сравнению с контрольной группой.
4. Наличие мутаций N370S и L444P и полиморфных вариантов E326K и T369M в гене *GBA* у пациентов с БП характеризуется повышением концентрации лизосфинголипидов (HexSph (GlcSph+GalSph) в сухом пятне крови, олигомерных форм альфа-синуклеина и цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-10, ФНО-альфа) в плазме периферической крови по сравнению с контрольной группой.
5. При спорадической БП, не связанной с мутациями в гене *GBA*, не наблюдается изменения концентрации олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови, а также ферментативной активности GCase и концентрации HexSph в сухом пятне крови по сравнению с контрольной группой.

**Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации.** Наблюдение и клинический осмотр пациентов с БП проводились автором на базе научно-клинического центра нейродегенеративных заболеваний клиники ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины». Выделение ДНК выполнялось автором лично. Сбор плазмы, нанесение свежей крови на фильтровальную бумагу выполнялось автором лично. Генотипирование полиморфных вариантов и мутаций в гене *GBA* выполнялось автором лично. Автором проводилась оценка уровня общего белка в лизате клеток, оценка концентрации олигомерного альфа-синуклеина. Измерение активности



лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов проводилось в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра, Москва (руководитель – д.м.н. Захарова Е.Ю.). Полученные данные были статистически обработаны автором лично. Выводы были сформулированы автором лично. Описание исследований, анализ и обсуждение результатов были выполнены автором самостоятельно. Совместно с соавторами и научным руководителем обсуждались все материалы, освещенные в данном исследовании.

### **Степень достоверности результатов.**

Степень достоверности и обоснованности положений, выносимых на защиту, представленных в диссертации, обеспечена применением адекватных и современных биохимических, молекулярно-генетических и клинических методов, достаточным объемом исследованных выборок, а также корректной статистической обработкой полученных результатов исследований.

**Апробация работы.** Полученные в ходе исследования научные результаты докладывались на следующих конференциях:

1. III Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», Санкт-Петербург, 2016.
2. 50-й Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Ленинградская область, 2016.
3. 20-м Международном конгрессе по болезни Паркинсона и двигательным расстройствам, Берлин, 19-23 июня, 2016.
4. 29-м конгрессе европейского сообщества по нейропсихофармакологии, Вена, 17-20 Сентября, 2016.
5. Конференции «Джеймс Паркинсон - Эссе о дрожательном параличе 1817: Празднование 200 лет прогресса», Лондон 10-11 марта, 2017.
6. 3-м конгрессе Европейской академии неврологов, Амстердам, 23-27 Июня, 2017.
7. IV Национальном конгрессе с международным участием по болезни Паркинсона и расстройствам движений, Москва, 2017.

8. III Всероссийской молодежной конференции с международным участием «Нейробиология интегративных функций мозга», Санкт-Петербург, 2017.

**Публикации.** По материалам настоящей диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 печатные работы в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращения и списка литературы (245 источников). Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами, 25 рисунками.

# ГЛАВА 1. Современные представления об этиологии и патогенезе БП (Обзор литературы)

## 1.1 Эпидемиология и этиология БП

БП – распространенное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся двигательными нарушениями, а также развитием ряда немоторных симптомов (когнитивные, вегетативные расстройства и др.). БП является мультифакторным заболеванием. Представления о этиопатогенезе БП формируются более 200 лет, с момента написания Джеймсом Паркинсоном в 1817 году «Эссе о дрожательном параличе». БП возникает в результате клеточной дисфункции на различных уровнях. Патогенез БП включает нарушение работы митохондрий, лизосом, системы протеосомной деградации белков, а также развитие нейровоспаления, окислительного стресса и агрегацию альфа-синуклеина. Доминирует теория взаимодействия генетической предрасположенности и факторов окружающей среды [Fleming, 2017].

Социальная значимость данного заболевания растёт в связи с прогрессирующим старением населения. Распространенность заболевания составляет от 100 до 200 на 100 000 человек, а ежегодная заболеваемость 15 на 100 000 человек. После 60 лет БП заболевает около 1% населения, к 80 годам число заболевших БП достигает 4% от популяции. По расчетам прогрессии БП озвучены неутешительные выводы о вероятности удвоения пациентов с БП к 2030 году [Dorsey et al., 2007].

В большинстве случаев БП носит спорадический характер. В клинических исследованиях показано, что около 10-15% пациентов с БП имеют отягощенную наследственность [Kalinderi, Bostantjopoulou, Fidani, 2016; Lubbe et al., 2016]. Относительный риск развития БП для близких родственников пациентов с БП по разным оценкам составляет от 2,0 до 14,6 [Marder et al., 1996; De Michele. et al., 1996].

Интересно, что популяционные исследования не обнаружили различий в уровне конкордантности между моно- и дизиготными близнецами [Wirdefeldt et al., 2004]. Однако при анализе результатов позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с  $^{18}\text{F}$ -фтордезоксиглюкозой у асимптомных моно- и дизиготных близнецов было выявлено снижение пресинаптической ДОФА-декарбоксилазной активности, таким образом, уровень конкордантности, вероятно, значительно выше [Burn et al., 1992]. Также высокая конкордантность была показана в случаях с ранним дебютом БП, до 50 лет [Tanner et al., 1999]. Позднее, в шведском популяционном исследовании у близнецов показана наследуемость БП [Wirdefeldt et al., 2012].

Известна более высокая распространенность БП в сельской местности. Предполагается, что это связано с использованием в сельском хозяйстве пестицидов и гербицидов, а также с составом родниковой воды [Hubble et al., 1993]. Однако эта тенденция отмечается не во всех популяциях [Zayed et al., 1990]. В ряде исследований показан вклад контакта с пестицидами в риск развития БП с отношением шансов (ОШ) от 1,77 до 7,0 [Golbe, Farrell, Davis, 1990]. *In vitro* показано, что нейротоксины, входящие в состав пестицидов (например, паракват, ротенон), способны провоцировать конформационные изменения молекулы белка альфа-синуклеина и, тем самым, ускорять формирование в нейронах альфа-синуклеиновых фибрилл, которые являются основным субстратом патоморфологических клеточных маркеров БП – телец и нейритов Леви [Priyadarshi et al., 2001].

БП может вызываться рядом токсинов, среди которых 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), используемый сегодня для создания модели паркинсонизма на животных. Следует, однако, отметить, что течение паркинсонизма, вызванного МФТП, отличается от БП как клинически, так и морфологически [Langston et al., 1999].

Fall и соавторы показали профессиональный риск развития БП среди плотников (ОШ=3,9), изготовителей шкафов (ОШ=11) и уборщиков (ОШ=6,7),

что, вероятно, связано с применением нейротоксичных веществ в работе [Fall et al., 1999].

В литературе широко рассмотрена отрицательная ассоциация курения, употребления кофеина и БП [Quik, Perez, Bordia, 2012; Roshan, Tambo, Pace, 2016]. Кроме того, обсуждаются протективные свойства нестероидных противовоспалительных препаратов [Reeset et al., 2007], кальциевых блокаторов [Mullarudi et al. 2016], гиполипидемических препаратов [Bykov et al., 2016]. К основным молекулярным механизмам нейропротекции данными соединениями относят воздействие на центральные аденозиновые и каннабиноидные рецепторы, ингибирование внутриклеточного потока ионов  $Ca^{2+}$  через потенциально зависимые нейрональные каналы L-типа и другие. Необходимо отметить, что умеренно повышенный уровень мочевой кислоты [Wen et al., 2017], физическая активность и средиземноморская диета участвуют в механизмах защиты в отношении развития БП [Cassani et al., 2017].

По результатам метаанализа было показано, что следующие показатели являются значимыми факторами риска БП: наличие в анамнезе родственников с тремором неустановленной этиологии (ОШ=2,74) или БП (ОШ=4,45), запоров, относительный риск 2,34, и отсутствие данных о курении в анамнезе пациентов, относительный риск 0,44. Другие факторы также вносят вклад в развитие БП, но в меньшей степени [Noyse et al., 2012].

## 1.2 Диагностика БП

Более 200 лет назад Джеймс Паркинсон в своём знаменитом «Эссе о дрожательном параличе» (рис. 1) впервые описал пациентов, страдающих данным заболеванием, которое впоследствии Жан-Мартин Шарко предложил назвать в честь Паркинсона. Джеймс Паркинсон так определял заболевание: «непроизвольные, тремороподобные движения со сниженной мышечной силой, частично бездейственные даже при поддержке; со склонностью к сгибанию

туловища вперёд и к переходу от ходьбы к бегущему шагу: чувства и интеллект сохранены» [Parkinson, 1817].

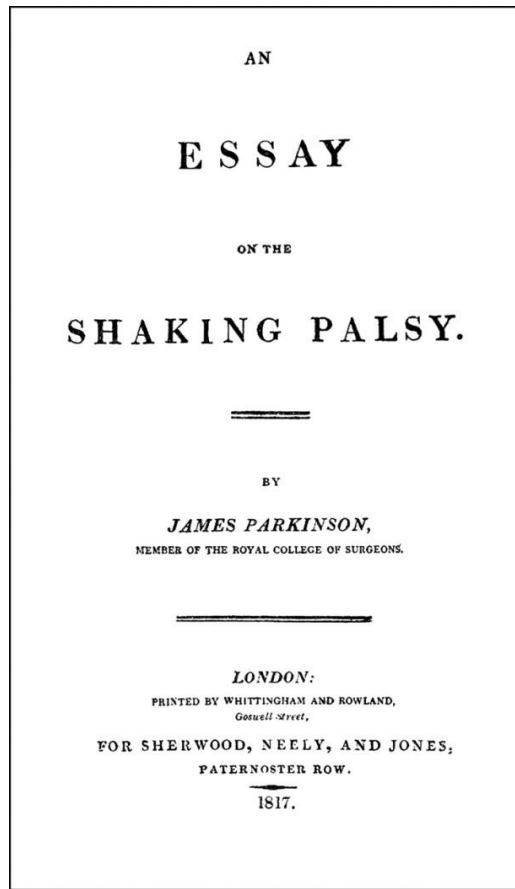


Рисунок 1 – Титульный лист «Эссе о дрожательном параличе», Лондон, 1817 г.

Несмотря на успехи в выявлении генетических основ БП и особенностей нейровизуализационной картины, постановка диагноза БП осуществляется на основании клинических признаков. Диагноз можно подтвердить иммуногистохимически на аутопсийном материале, оценивая нейродегенерацию нейронов ЧС. Дифференциальная диагностика с атипичным паркинсонизмом часто затруднительна и у многих пациентов диагноз изменяют после нескольких лет наблюдения. До настоящего времени, при постановке диагноза преимущественно опирались на критерии Британского банка мозга 1992 года [Hughes et al., 1992]. Важно отметить, что данные критерии базируются только на моторной симптоматике (брадикинезия и один из следующих признаков: тремор, ригидность, постуральная неустойчивость), с учётом исключения ряда атипичных

для БП симптомов, так называемых, «красных флагов» (мозжечковая симптоматика, симптом Бабинского, раннее вовлечение вегетативной нервной системы и других). При этом предполагается, что немоторные симптомы БП начинаются задолго до моторной симптоматики. В связи с изменением концепции представления о БП, выявления ряда немоторных симптомов как основных элементов заболевания, Международное Сообщество по двигательным расстройствам выпустило диагностические критерии, включающие возможность выявления клинически установленных случаев БП и вероятных случаев БП [Postuma et al., 2015].

Диагноз БП, основанный на данных критериях, включает паркинсонизм (брадикинезия с ригидностью или тремором покоя либо их сочетание) совместно с поддерживающими критериями (хороший эффект на дофаминергическую терапию, наличие дискинезий, вызванных приёмом леводопы, наблюдаемый или документированный тремор покоя и потеря обоняния или сердечная симпатическая денервация, доказанная с помощью сцинтиграфии с применением метайодбензилгуанидина) и отсутствие критериев исключения и «красных флагов». Клинически установленный диагноз БП выставляется (точность не менее 90%) при наличии минимум двух поддерживающих критериев, отсутствии абсолютных критериев исключения и «красных флагов». Клинически вероятный диагноз БП (точность не менее 80%) при отсутствии абсолютных критериев исключения, а также при наличии поддерживающих критериев, по крайней мере, равных числу «красных флагов» [Postuma et al., 2015].

Нужно отметить определенные успехи в диагностике БП с использованием методов нейровизуализации. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) с использованием специфических лигандов позволяют продемонстрировать наличие дисфункции дофаминергических нейронов и обмена дофамина при ранних домоторных случаях. ОФЭКТ и ПЭТ предоставляют объективную поддержку в диагностике «дофамин-дефицитного» паркинсонизма в случае клинических сомнений (рис. 2) [Politis, Pagano, Nidccolini, 2017].

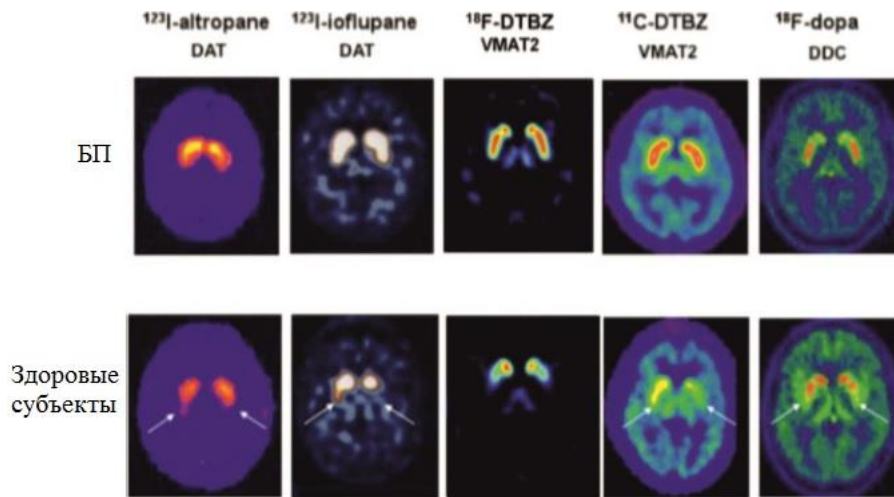


Рисунок 2 – Изображения полосатого тела с beta-CIT ОФЭКТ (DAT), FP-CIT

ОФЭКТ (DAT),  $^{11}\text{C}$ -DTBZPET (VMAT2) и  $^{18}\text{F}$ -дофа ПЭТ (DDC) для здоровых субъектов и пациентов с ранней БП. Можно видеть, что четыре метода визуализации показывают асимметрично уменьшенную дофаминергическую функцию задней части путамена у пациентов с БП [Brooks, Pavese, 2011].

Следует отметить, что так называемый ДАТ-скан, ПЭТ-КТ с использованием лиганда к транспортеру дофамина, не позволяет проводить дифференциальный диагноз между БП и атипичными формами паркинсонизма (мультисистемная атрофия, прогрессирующий надъядерный паралич), однако предоставляет возможности в проведении дифференциальной диагностики БП с атипичными случаями эссенциального тремора и дистонии.

Выявлено снижение гиперинтенсивности ЧС при использовании МРТ мощностью 7 Тесла [Kim et al., 2016]. С помощью транскраниальной сонографии можно определить гиперэхогенность ЧС при БП [Shafieesabet et al., 2017].

В настоящее время новые технологии используются как инструменты для исследований, но в ближайшем будущем могут быть приняты в качестве диагностических критериев в повседневной клинической практике. Использование новых методов визуализации и биохимических маркеров развития БП, поиск которых активно ведется во многих лабораториях, позволит выявлять БП на продромальных стадиях, что даст возможность для применения нейропротективной терапии.



### 1.3 Генетические основы БП

Первым открытым геном, ассоциированным с развитием БП, был ген *SNCA*, кодирующий белок альфа-синуклеин [Polymeropoulos et al., 1997]. С момента описания аутосомно-доминантных форм БП, обусловленных мутациями в гене *SNCA*, прошло 20 лет. В настоящее время выявлен ряд генов, мутации в которых приводят к развитию БП. Среди них важно выделить две большие группы: гены, приводящие к БП и гены, ассоциированные с риском развития БП. Среди мутаций, передающихся по законам Менделя, можно выделить аутосомно-доминантные формы БП (*SNCA*, *LRRK2*, *VPS35* и др.) и аутосомно-рецессивные (*PARKIN*, *PINK1*, *DJ1* и др.) (табл. 1). Также важно отметить гены, мутации в которых являются факторами высокого риска развития БП (ген *GBA*, см. п. 1.8).

Таблица 1 – Гены, ассоциированные с развитием БП, передающейся по законам Менделя

Обозначение	Ген	Локус	Фенотип	Распространенность
<b>Аутосомно-доминантное наследование</b>				
PARK1 PARK4	<i>SNCA</i>	4q21; 4q21– q23	Дупликации: Классический фенотип. Трипликации: Раннее начало с выраженной деменцией	Крайне редки
PARK5	<i>UCHL1</i>	4p13	Классический фенотип	Крайне редки
PARK8	<i>LRRK2</i>	12p12	Классический фенотип (неполная пенетрантность)	До 40% среди евреев ашкенази, 2-3% в остальной популяции

## Продолжение таблицы 1

PARK13	HTRA2	2p12	Классический фенотип	Крайне редки
PARK17	VPS35	16q11.2	Классический фенотип	Крайне редки
PARK18	EIF4G1	3q27.1	Классический фенотип	Крайне редки
<i>PARK21</i>	<i>DNAJC13</i>	<i>3q22.1</i>	БП с поздним началом	Крайне редки
<b>Аутосомно-рецессивное наследование</b>				
<i>PARK2</i>	Parkin	6q25.2- 27	БП с ранним началом	До 8% среди пациентов с ранним началом
PARK6	<i>PINK1</i>	1p35- p36	БП с ранним началом	До 3% среди пациентов с ранним началом
PARK7	<i>DJ-1</i>	1p36.23	БП с ранним началом	До 0,4% среди пациентов с ранним началом
<i>PARK9</i>	<i>ATP13A2</i>	1p36.13	Синдром Куфор- Рахемб, атипичное БП с деменцией, пирамидными симптомами и надъядерным параличом зрения	Крайне редки
<i>PARK14</i>	<i>PLA2G6</i>	<i>22q13.1</i>	Дистония- паркинсонизм с ранним началом	Крайне редки

## Окончание таблицы 1

<i>PARK15</i>	<i>FBX07</i>	<i>22q12–q13</i>	Паркинсонизм с пирамидными симптомами с ранним началом	Крайне редки
<i>PARK19</i>	<i>DNAJC6</i>	<i>1p31.3</i>	Атипичная БП с ювенильным началом	Крайне редки
<i>PARK20</i>	<i>SYNJ1</i>	<i>21q22.11</i>	Атипичная БП с ювенильным началом	Крайне редки

В гене *SNCA* известны точечные мутации, дупликации и трипликации. Первой была описана мутация, приводящая к аминокислотной замене A53T в греко-итальянской семье, с дальнейшим подтверждением в ряде семейных случаев [Puschmann et al., 2009]. Позднее идентифицирована мутация A30P в немецкой семье, в которой было выявлено три пациента с БП и два носителя мутаций, у которых была представлена рассеянная неврологическая симптоматика [Seidel et al., 2010]. Также была обнаружена мутация E46K в семье испанского происхождения, клинический фенотип у данных пациентов характеризуется БП с развитием деменции [Zarranz et al., 2004]. Мутации A30P и E46K были выявлены только в нескольких семьях и в целом не распространены в общей популяции. За последнее время был выявлен ряд новых аминокислотных замен (p.A18T, p.A29S, p.H50Q и p.G51D), встречающихся в единичных семьях [Fujioka et al., 2014]. Фенотипические характеристики чаще всего представлены ювенильным паркинсонизмом с развитием когнитивных нарушений вплоть до деменции. Дупликации и трипликации гена *SNCA* встречаются чаще, чем точечные мутации, однако, в целом, случаи БП, обусловленные мутациями в гене *SNCA*, крайне редки. Фенотипически пациенты с дупликациями гена могут не отличаться от пациентов со сБП, однако у данных пациентов БП присутствует тенденция к развитию когнитивных нарушений. При наличии трипликации гена

характерно развитие ювенильного паркинсонизма с когнитивными нарушениями и развитием психиатрических симптомов [Chartier-Harlin et al., 2004].

В 2004 году открыты мутации в гене обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*, дардарин), приводящие к развитию аутосомно-доминантной формы БП [Zimprich et al., 2004]. Среди мутаций гена *LRRK2* – самая распространенная G2019S. Частота мутации G2019S гена *LRRK2* у североафриканского арабского населения 41% среди пациентов со сБП и 37% при семейных случаях БП [Lesage et al., 2006]. Среди популяции евреев ашкенази с БП частота составляет 18,3% (1,3% в группе контроля) [Ozelius et al., 2006]. В данных популяциях высокая частота мутации G2019S обусловлена эффектом основателя [Kachergus et al., 2005]. При этом частота мутации G2019S достаточно низка в других популяциях. В международном многоцентровом исследовании, проведенном на азиатском и европейском населении, показано, что частота мутации G2019S гена *LRRK2* у пациентов с БП в европейском населении составляет 0,7% [Ross et al., 2011]. В России частота БП, ассоциированной с мутациями в гене *LRRK2*, составляет 3,9% у пациентов с семейными формами БП и 0,6% у пациентов со сБП [Pchelina et al., 2008; Пчелина и др., 2014].

Описан ряд мутаций, приводящих к развитию аутосомно-рецессивной формы БП. В основном они связаны с развитием БП с ранним началом или ювенильного паркинсонизма. Общая частота мутаций среди пациентов с ранним (до 45 лет) началом БП для мутаций в гене *PARK2*, кодирующего белок паркин, составляет 8,6%, для мутаций в гене *PINK1* 3,7% и для мутаций в гене *DJ1* 0,4% [Kilariski et al., 2012].

Выявление мутаций при БП в редких случаях помогает поставить диагноз, базируясь на знаниях корреляции генотипа и фенотипа (рис. 3), особенно в случаях с ранним началом.

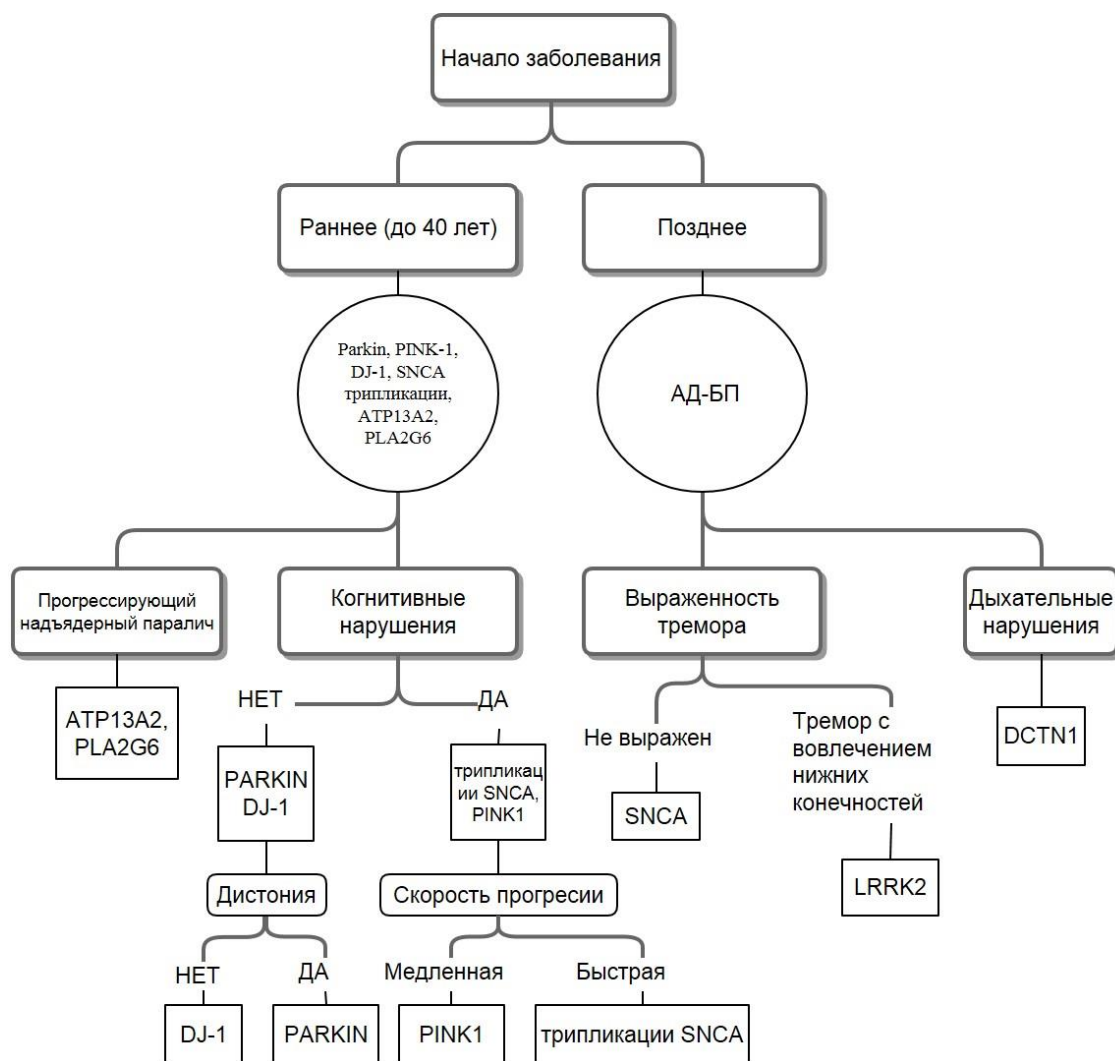


Рисунок 3 – Дифференциальная диагностика генетически, обусловленной БП на основании клинического фенотипа [Olszewska et al., 2016], адаптация

При спорадических формах БП в патогенезе заболевания играют роль генетические факторы риска в сочетании с факторами окружающей среды. Большие успехи в области генетики БП были достигнуты с появлением анализа полногеномных ассоциаций (GWAS), при котором сотни тысяч и даже миллионы кандидатных участков по всему геному оцениваются с использованием высокопроизводительных генных чипов. Генетические варианты, найденные с помощью GWAS, часто не оказывают существенного влияния на фенотип заболевания, однако их выявление играет важную роль в понимании патогенеза заболевания [Kalinderi, Bostantjoropoulou, Fidani, 2016]. Интересно отметить, что как факторы риска развития БП, по результатам исследований GWAS, выявлены

однонуклеотидные замены (ОНП) в локусах генов развития наследственных форм БП. Так, с наиболее высокой значимостью с БП ассоциированы ОНП генов *SNCA* и *LRRK2* [Lill, 2016], указывая на роль данных генов в патогенезе, в том числе и сБП.

#### 1.4 Альфа-синуклеин как центральное звено нейродегенерации при БП

БП классифицируется как синуклеинопатия в связи с накоплением белка - альфа-синуклеина, кодируемого геном *SNCA*. Альфа-синуклеин - белок, состоящий из 140 аминокислот. В растворимом виде не имеет определенной структуры, однако образует альфа-спиральную и бета-складчатую структуру при связывании с липидами, в частности с фосфолипидами мембран клеток. Белок состоит из трех различных областей: N-концевая область (аминокислотные остатки 1-60), содержащая липид-связывающие последовательности аполипопротеина, которые, вероятно, образуют амфифильные спирали, придающие возможность образования альфа-спиральных структур при связывании с мембранами, центральной гидрофобной области (61-95), NAC области, которая обеспечивает возможность формирования бета-складчатой структуры, и С-концевого домена (аминокислоты 96-140). [Amer et al., 2006; Eliezer et al., 2013]. Строение альфа-синуклеина представлено на рисунке 4.

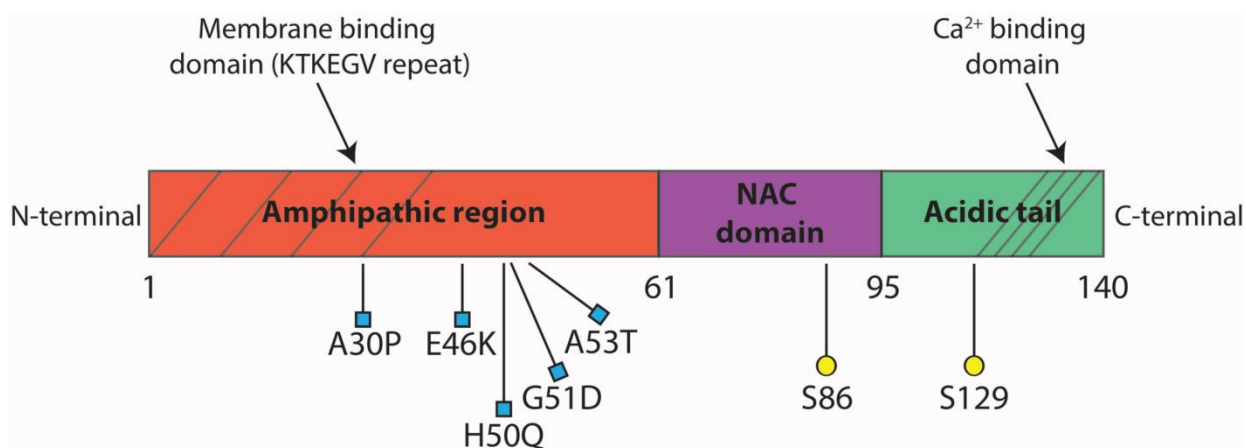


Рисунок 4 – Структура белка альфа-синуклеина\*

\* N-терминальный домен (красный) состоит из повторов KTKEGV, в котором обнаружены мутации, связанные с семейными формами БП. Центральное гидрофобное ядро (фиолетовое) называется NAC-доменом и способствует агрегации белка. С-концевой домен (зеленый) является кислым хвостом, который содержит сайты фосфорилирования (желтые кружки) и сайт связывания кальция. Мутации, приводящие к развитию аутосомно-доминантных форм БП, расположены в N-конце белка, указаны синим [Emanuele, Chierigatti, 2015].

Ген *SNCA* содержит 6 экзонов. Существуют, по меньшей мере, два более коротких альтернативно сплайсированных варианта транскрипта гена *SNCA*, но их физиологические и патологические роли не определены [Beyer, Ariza, 2012]. Альфа-синуклеин относится к семейству синуклеинов, которое также включает бета- и гамма-синуклеин. У млекопитающих и птиц известно три гена синуклеина, у костистых рыб известен четвертый синуклеин (гамма2-синуклеин) [Toni, Cioni, 2015]

Структурным отличием альфа-синуклеина от других белков является наличие NAC региона, участвующего в образовании фибрилл. Альфа-синуклеин может существовать во множестве конформаций, от развернутого мономера до организованных фибрилл внутри телец Леви. Точные механизмы, которые вызывают образование фибрилл, до сих пор не ясны. Считается, что неструктурированные мономеры альфа-синуклеина переходят в фибриллярную структуру, обогащенную бета-листами, через различные промежуточные структурные виды. Среди этих видов можно найти олигомеры, префибриллы, кольцевые и гранулированные структуры [Kostka et al., 2008; Bhak et al., 2009]. Было показано, что фибриллярные формы альфа-синуклеина могут вызывать воспалительный процесс, в то время как олигомерные формы не запускают каскад воспалительных реакций [Gustot et al., 2015]. Однако вопрос о том, какие формы альфа-синуклеина являются наиболее токсичными, остается открытым.

### 1.4.1 Функции альфа-синуклеина

К настоящему времени существует несколько гипотез о функциях альфа-синуклеина. Альфа-синуклеин преимущественно представлен в пресинаптических терминалях и связан с синаптическими везикулами [Burré J. et al., 2015; Fortin et al., 2010]. Предполагается, что функция альфа-синуклеина связана с везикулярным транспортом и регуляцией экзоцитоза везикул [Diao et al., 2013]. Считается, что альфа-синуклеин посредством шаперонподобной функции может участвовать в синергии с белком шапероном CSP-а в сборке комплекса SNARE (от англ. soluble NSF attachment receptor) — большая группа белков, осуществляющих слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной (экзоцитоз) [Chandra et al., 2005]. Таким образом, основная функция альфа-синуклеина - контроль высвобождения нейротрансмиттера через воздействие на комплекс белков SNARE [Burré et al., 2010]. Интересно отметить, что альфа-синуклеин, может функционировать как клеточная ферриредуктаза с использованием иона меди и никотинамидадениндинуклеотида в качестве кофакторов для восстановления Fe (III) до Fe (II) [Davies, Moualla, Brown, 2011].

Альфа-синуклеин составляет до 1 % от общего белка нейронов мозга [Mizuno et al., 2012], обильно представлен в эритроцитах и тромбоцитах, однако его функция в клетках крови не установлена [Barbour et al., 2008].

Предполагается, что альфа-синуклеин существует в равновесии между различными конформационными состояниями и, возможно, в тетрамерной форме [Selkoe и др., 2013]. Тем не менее до сих пор не ясно, вследствие чего происходит агрегация альфа-синуклеина. Одна из существующих гипотез, объясняющих роль альфа-синуклеина в патогенезе БП, заключается в том, что префибриллярные олигомерные соединения могут представлять собой токсичные формы альфа-синуклеина [Villar-Pique et al., 2016], олигомеры альфа-синуклеина также могут приводить к синаптической дисфункции, взаимодействуя с аксональными транспортными белками, такими как синапсин-1 [Scott et al., 2010].



### 1.4.2 Взаимосвязь накопления альфа-синуклеина и развития БП

В 1912 году Фридрих Х. Леви при аутопсии головного мозга впервые описал внутриклеточные белковые включения: тельца Леви и нейриты Леви [Lewy, 1912]. Тот факт, что агрегаты альфа-синуклеина являются основной составляющей телец и нейритов Леви, был описан только в 1997 году, когда было обнаружено, что мутации в гене *SNCA* приводят к развитию наследственной формы БП [Spillantini et al., 1997]. После этого открытия началась современная эра исследований нейропатологии БП.

В своей знаменитой работе Braak и соавторы на основании изучения аутопсийного материала предположили, что при сБП распространение телец Леви протекает стереотипно, в зависимости от стадии заболевания [Braak, Del Tredici, 2008]. На первой стадии тельца Леви представлены преимущественно в обонятельной луковице (и переднем обонятельном ядре) и дорсальном моторном ядре глоссофарингеального и блуждающего нерва. На второй стадии тельца Леви продолжают распространяться к стволу мозга, достигая продолговатого мозга и покрышки моста. На 1 и 2 стадии БП не проявляется клинически, однако могут появляться симптомы-предвестники, такие как anosmia и запоры, а также расстройства фазы быстрого сна. Однако не у всех пациентов с данным набором симптомов развивается БП. На третьей стадии патология распространяется до миндалевидного тела и ЧС. Именно на этой стадии, на фоне появления нейродегенерации дофаминергических нейронов, появляются моторные симптомы. Таким образом, до 3 стадии по Брааку диагноз БП не может быть поставлен клинически. Тельца Леви, и в большей степени нейриты Леви, обнаруживаются в переднем мозге и коре головного мозга на 4 стадии. На 5 и 6 стадиях патологические накопления также появляются в префронтальной коре, первичной сенсорной и моторной коре. Braak и соавторы предположили, что изначально патологические накопления появляются в периферической нервной системе и обонятельной луковице, далее поднимаются к продолговатому и

среднему мозгу, а затем постепенно распространяются на передний мозг [Braak, Del Tredici, 2008]. Существует гипотеза, что БП начинается в кишечнике и распространяется трансинаптическим путем из клетки в клетку через симпатическую и парасимпатическую нервную систему в ЧС и центральную нервную систему (ЦНС) [Mulak, 2015]. Данная гипотеза соответствует гипотезе Браака, согласно которой агрегация альфа-синуклеина начинается в подслизистом сплетении энтеральной нервной системы и распространяется ретроградно в ЦНС через вагусные преганглионарные аксоны дорсального моторного ядра блуждающего нерва.

### 1.4.3 Прионная гипотеза

Прионные белки вызывают развитие трансмиссивных губчатых энцефалопатий. При прионных болезнях нормальный белок, который называется клеточным прионным белком (англ.: cellular prion protein, PrPC), изменяет форму (неправильно сворачивается) и становится патологическим [Prusiner et al., 1998]. Биохимически прионы характеризуются высоким содержанием бета-складчатой структуры и высокой устойчивостью к протеиназе К. Очищенные прионы нерастворимы даже в мягких детергентах и образуют олигомеры и фибриллы, называемые прионными стержнями, которые можно наблюдать с помощью электронной микроскопии [Riesner, 2003]. Помимо самораспространения внутри клеток, прионы передаются от клетки к клетке у индивидуумов и между индивидуумами. В клетках имеется несколько механизмов передачи. Был показан экзосомный механизм и механизм с использованием туннельных нанотрубочек между клетками [Gousset et al., 2009].

Как было установлено, распространение патологических агрегатов альфа-синуклеина тесно коррелирует с развитием БП [Braak, Del Tredici, 2008] и считается основным механизмом прогрессирования заболевания. Первое указание о прионноподобной гипотезе передачи альфа-синуклеина было получено из исследований аутопсии мозга пациентов с БП, которые участвовали в

клинических испытаниях по трансплантации эмбриональных дофаминергических нейронов в мозг [Kordower et al., 2008; Mendez et al., 2008]. В полученных биоптатах мозга исследуемых пациентов обнаружено распространение альфа-синуклеина, в том числе и в трансплантированных клетках. В качестве подтверждения полученных данных был проведен эксперимент, в ходе которого меченые здоровые кортикальные нейроны мыши были инъецированы в мозг модельного животного (мышь с паркинсонизмом). После вскрытия обнаружили накопление альфа-синуклеина в пересаженных нейронах, а в некоторых даже образование телец Леви. Этот эксперимент показал, что альфа-синуклеин передавался непосредственно от хозяина к пересаженным клеткам прионным образом [Desplats et al., 2009]. Повышенная экспрессия прионного белка усиливает распространение альфа-синуклеина и способствует образованию фосфорилированной формы альфа-синуклеина [Urrea et al., 2017]. *In vitro* вероятность передачи альфа-синуклеина от нейрона к нейрону была показана на клеточных культурах [Olanow et al., 2014]. Сообщается о нескольких механизмах межклеточного распространения альфа-синуклеина с использованием тех или иных методов *in vitro*, таких как внеклеточные везикулы и туннельные нанотрубки [Okuda, Uemura, Takahashi, 2017].

### **1.5 Связь БП и болезни Гоше, мутаций в гене *GBA* как фактор высокого риска БП**

БГ названа в честь доктора Филиппа Гоше, который в 1882 году впервые описал заболевание на примере молодой женщины с увеличенной селезенкой. БГ представляет собой наиболее распространенную аутосомно-рецессивную лизосомную болезнь накопления (ЛБН). Наиболее характерным признаком выступает наличие насыщенных глюкоцереброзидом макрофагов (известных как клетки Гоше) в печени, селезенке и костном мозге. БГ возникает в результате гомозиготных или компаундных мутаций в гене *GBA*, которые приводят к снижению активности GCase [Beutler et al., 1971]. БГ является чрезвычайно

гетерогенным заболеванием с мультиорганной патологией. Наиболее частые системные проявления включают гепатоспленомегалию, анемию, тромбоцитопению и костные поражения: остеопению, переломы и болезненные костные кризы [Лукина, 2009].

Выделяют три подтипа БГ в зависимости от тяжести прогрессирования и наличия неврологических проявлений [Jmoudiak, Futerman, 2005]. С момента клинического описания БГ известно о вовлеченности нервной системы при развитии тяжелых клинических форм с ранним началом при II и III типе течения заболевания. Более часто болезнь протекает по I типу с поздним началом и отсутствием вовлечения нервной системы. Интересно отметить, что во многих клинических случаях заболевание протекает доброкачественно, и пациенты могут обойтись без медицинской помощи всю свою жизнь, в то время как другие умирают в младенчестве. Клиническая гетерогенность наиболее характерна для I типа, многие пациенты остаются бессимптомными и диагностируются случайно [Zimran et al., 1989].

Тип II и тип III БГ классифицируются как острая и подострая нейропатические формы БГ, из-за вовлечения центральной нервной системы, включая когнитивные нарушения, судороги и глазодвигательные нарушения [Pastores, 2010]. БГ II типа - наиболее тяжёлая форма БГ, диагностируется в младенчестве, характеризуется быстрым прогрессированием со смертью в течение двух лет [Owada et al., 1977; Stone et al., 2000]. В то время как III тип БГ [Herrlin, Hillborg, 1962] имеет более медленную прогрессию и диагностируется позже, как правило, в течение первых двух десятилетий жизни. Существуют и промежуточные фенотипы между типами II и III. [Goker-Alpan et al., 2003].

На сегодняшний день в гене *GBA* описано более 300 мутаций, приводящих к развитию БГ, в том числе миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания и мутации в зоне сплайсинга [Hruska et al., 2008]. Ген *GBA* локализуется на хромосоме 1q21 [Devine et al., 1982]. Кодировочная часть представлена 11 экзонами [Sorge et al., 1985], а мутации, ассоциированные с БГ, встречаются по всей последовательности. В локусе гена *GBA* существует нефункциональный

псевдоген (*GBAP*), возникший из тандемного дублирования исходного гена и участка размером 16 kb [Horowitz et al., 1989]. Последовательность генов *GBA* и *GBAP* идентична на 96%. Высокая гомология и близкое расстояние между генами могут затруднять молекулярную идентификацию известных и еще не выявленных мутаций, а также могут приводить к возникновению новых мутантных аллелей [Hruska et al., 2008]. В гене описаны мажорные мутации. Для европейских популяций наличие мутации L444P и N370S составляют до 70% мутантных аллелей. Из них мутация L444P является наиболее тяжелой, приводя к снижению активности фермента до 5%. Ее гомозиготное носительство в основном выявляется у пациентов с БГ II типа.

В настоящее время для пациентов с БГ доступны два вида лечения: фермент-заместительная терапия (с использованием имиглуцеразы, велаглуцеразы альфа или талигуклеазы альфа) и субстрат-редуцирующая терапия (с использованием миглустата) [Bennett, Mohan, 2013]. Данные методы лечения эффективно купируют симптомы у пациентов с не нейропатическим типом I, однако они неэффективны для лечения нейропатических симптомов у пациентов с БГ II и III типов, поскольку данные вещества не проникают через гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

Возможная связь между БГ и БП была отмечена достаточно давно. В публикации 1939 года впервые обратили внимание на неврологические симптомы и предположили влияние на дофаминергические пути во взрослых формах БГ I типа [Van Bogaert, Froehlich, 1939]. В семидесятых-восемидесятых годах опубликован целый ряд клинических случаев пациентов с БГ и их родственников, у которых отмечались симптомы паркинсонизма [Neil et al., 1979; Soffer et al., 1980]. Однако взрослые формы атипично протекающей БГ I типа считались поздним началом БГ III типа или несвязанным совпадением симптомов.

При исследовании аутопатов головного мозга пациентов с БП идентифицировали мутации в гене *GBA* у 12 из 57 пациентов (21%) [Lwin et al., 2004]. Это исследование не только подтвердило связь между геном *GBA* и БП, но также показало, что как гетерозиготные, так и гомозиготные мутации в гене *GBA*

могут быть ассоциированы с БП. Данная ассоциация была подтверждена в ряде исследований, в том числе и на российской популяции [Tayebi et al., 2003; Vultron et al., 2010; Emelyanov et al., 2011]. Семейные исследования с пробандами пациентов с БГ показали, что в 25% этих семей был близкий член семьи с диагнозом БП [Halperin et al., 2006]. В первом многоцентровом международном исследовании при сравнении частот у пациентов с БП (n=5691) и контрольной группой (n=4898) было обнаружено, что мутации в гене *GBA* являются наиболее распространенным генетическим фактором риска развития БП с ОШ=5,43 [Sidransky et al., 2009]. Мутации в гене *GBA* также выступают факторами высокого риска развития другого заболевания, относящегося к синуклеопатиям - деменции с тельцами Леви. Как показано в многоцентровом крупномасштабном исследовании, связь мутаций в гене *GBA* даже сильнее для деменции с тельцами Леви (ОШ 8,28), чем для БП [Nalls et al., 2013]. Одним из критериев диагностики деменции с тельцами Леви является развитие деменции до или одновременно с паркинсонизмом [McKeith et al., 2005].

Частота мутаций в гене *GBA* среди пациентов с БП широко варьируется в различных популяциях [Choi et al., 2012; Kumar et al., 2012]. Ранее, при исследовании пациентов с БГ, было обнаружено, что в нееврейских популяциях мутации L444P и N370S являются наиболее распространенными, при этом мутация N370S часто встречается в европейской популяции и отсутствует у азиатского населения, где аллель L444P является наиболее частым.

В гене *GBA* описаны также ОНП T369M и E326K, которые не приводят к развитию БГ, в связи с чем по общемировой практике их принято называть полиморфными вариантами. В течение многих лет происходила дискуссия, вносят ли данные ОНП значимый вклад в развитие БП. В исследовании Horowitz и соавторов [Horowitz et al., 2011] было показано, что E326K встречается в качестве компаундной мутации у пациентов с БГ, кроме того, в исследованиях *in vitro* показано, что наличие данного ОНП снижает активность GCase в разной степени от 60,9% до 26% от базовой активности фермента. Ассоциация ОНП E326K с развитием БП была подтверждена в метаанализе [Pankratz et al., 2012]

В недавно проведенном метаанализе было также показано, что наличие ОНП Т369М гена *GBA* может быть фактором риска развития БП с незначительным эффектом (ОШ=1,78) [Mallett et al., 2016]. Таким образом, риск развития БП среди носителей ОНП Т369М гена *GBA* повышен по сравнению с общей популяцией незначительно, и у подавляющего большинства носителей данных полиморфных вариантов БП, вероятно, не разовьётся.

По результатам метаанализа в европейской популяции частота мутаций в гене *GBA* среди пациентов с БП составила 5,48% с ОШ=4,7 ( $p < 0,001$ ) [Zhao et al., 2016]. Важно учитывать, что в ряде исследований проводился скрининг только мажорных мутаций, без учёта относительно распространенных полиморфных вариантов E326K и T369M.

## 1.6 Клинические особенности GBA-БП

Как было отмечено выше, мутации в гене *GBA* ассоциированы с развитием БП. Интересно, что данная группа пациентов, которая в целом фенотипически неотличима от пациентов со сБП, характеризуется рядом клинических особенностей.

В ходе ряда исследований показано, что возраст начала заболевания у пациентов с GBA-БП меньше по сравнению с пациентами со сБП. В работе Gan-Or и соавторов [Gan-Or et al., 2016] было проанализировано влияние неблагоприятных мутаций гена *GBA* на возраст начала заболевания (ВНЗ). ВНЗ составлял 53,1 ( $\pm 11,2$ ) лет среди носителей неблагоприятных мутации гена *GBA* и 58,1 ( $\pm 10,6$ ) лет среди носителей благоприятных мутаций *GBA*. Таким образом, показано, что ВНЗ носителей неблагоприятных мутаций гена *GBA* был меньше, чем ВНЗ у носителей благоприятных мутаций *GBA*.

### 1.6.1 Особенности моторной симптоматики у пациентов с GBA-БП

Многочисленные исследования показали, что для пациентов с GBA-БП характерны те или иные особенности моторной симптоматики. Так, Gan-Or и соавторы и Lesage и соавторы отметили более выраженную брадикинезию ( $p=0,021$  и  $p<0,014$  соответственно) при первичном осмотре пациентов с GBA-БП по сравнению со сБП [Gan-or et al., 2009; Lesage et al., 2010]. Sidransky и соавторы отметили более низкую частоту асимметрии в симптоматике у пациентов с GBA-БП ( $p<0,0001$ ) [Sidransky et al., 2009]. При исследовании тяжести и скорости прогрессирования моторных симптомов получены противоречивые данные. Sidransky и соавторы сообщали о значительно более низкой частоте брадикинезии, тремора покоя и ригидности у пациентов с GBA-БП по сравнению со сБП [Sidransky et al., 2009]. Wang и соавторы [Wang et al., 2014] обнаружили, что у пациентов с GBA-БП более высокие общие показатели UPDRS и UPDRS-II активности ежедневных показателей жизни, чем у пациентов со сБП. В проспективном 3-летнем исследовании пациентов с GBA-БП наблюдалось более быстрое прогрессирование моторного дефицита при оценке с помощью UPDRS-III и шкалы Хен и Яра [Brockmann et al., 2015]. Кроме того, Brockmann и соавторы показали, что пациентам с GBA-БП требовалась более быстрая эскалация эквивалентной дозы леводопы по сравнению со сБП ( $950 \pm 714,1$  мг против  $687,3 \pm 338,2$  мг,  $p = 0,01$ ). Выявлены более высокие показатели смертности в группе пациентов с GBA-БП (25% против 0%, соответственно,  $p = 0,01$ ). В одном из исследований показано, что у пациентов с GBA-БП чаще развиваются моторные осложнения: дискинезии и флуктуации [Wang et al., 2014]. Это может быть связано с более быстрой прогрессией заболевания и быстрым титрованием дозы леводопы [Pal et al., 2015]. В публикации Davis и соавторов при проспективной оценке со средним периодом наблюдения 3 года пациентов с мутациями и пациентов с полиморфным вариантом E326K в гене *GBA* была выявлена ассоциация с более быстрым нарастанием оценки по MDS-UPDRS III для обеих групп по сравнению со сБП [Davis et al., 2016]. Также у пациентов с мутациями и ОНП гена *GBA* была отмечена более быстрая прогрессия комплексного показателя постуральной нестабильности и нарушений ходьбы. На выборке



пациентов в публикации Jesus и соавторов, после проведения многофакторного анализа получены результаты о взаимосвязи развития дискинезий и наличия благоприятных мутаций в гене *GBA*, о связи как благоприятных, так и неблагоприятных мутаций с развитием флуктуаций [Jesus et al., 2016]. Таким образом, полученные данные о моторных функциях пациентов с *GBA*-БП носят несколько разрозненный и противоречивый характер, что в настоящий момент осложняет проведение системного анализа данных. В то же время данные об особенностях течения важны для выбора тактики терапии и для проведения медико-генетического консультирования членов семей с выявленной мутацией.

### 1.6.2 Когнитивные функции у пациентов с *GBA*-БП

Подробная оценка когнитивных функций у пациентов с *GBA*-БП была проведена в более чем 20 работах. В большинстве работ с использованием нейропсихологического тестирования и клинического обследования показано, что когнитивные функции снижены у пациентов с *GBA*-БП по сравнению со сБП [Alcalay et al., 2010; Alcalay et al., 2012; Brockmann et al., 2011; Chahine et al., 2013]. Подобные данные были продемонстрированы и в крупномасштабном исследовании когнитивных функций у пациентов с мутациями в гене *GBA*. Кроме того, было показано, что у пациентов с мутациями, которые более выражено снижают активность GCase (L444P и др.), существует больший риск развития деменции [Cilia, et al., 2016]. С другой стороны, в нескольких исследованиях показано отсутствие связи когнитивной дисфункции у пациентов с БП с мутациями в гене *GBA* [Kumar et al., 2012; Wang et al., 2014]. В публикации Malec-Litwinowicz и соавторов [Malec-Litwinowicz et al., 2014] было показано более частое развитие деменции в группе *GBA*-БП, однако статистически значимой разницы при оценке когнитивных функций с использованием клинических шкал выявлено не было. Особый интерес представляют проспективные исследования с периодом наблюдения от года до шести лет, результаты которых достаточно гомогенны и подтверждают большую частоту развития когнитивных нарушений у

пациентов с GBA-БП [Goker-Alpan et al., 2008; Brockmann et al., 2014]. В исследовании Jesus и соавторов [Jesus et al., 2016] не было обнаружено ассоциации между благоприятными мутациями и когнитивными нарушениями, в то время как неблагоприятные мутации были ассоциированы с когнитивными расстройствами. В публикации Winder-Rhodes и соавторов [Winder-Rhodes et al., 2013] при первичном осмотре не было найдено отличий в сохранности когнитивных функций между группами пациентов GBA-БП и сБП, однако при длительном проспективном исследовании с медианой наблюдения 5,5 лет у пациентов с мутациями в гене *GBA* деменция развивалась в два раза раньше, чем у пациентов со сБП. Beavan и соавторы [Beavan et al., 2015] в 2015 году провели проспективное исследование 30 пациентов с БГ I типа, 28 здоровых гетерозиготных носителей мутации в гене *GBA* и 26 пациентов в контрольной группе. По результатам базового скрининга, не было выявлено статистически значимых различий между группами по Монреальской шкале когнитивных функций (англ.: Montreal cognitive assessment score, MoCA). При повторном визите через 2 года у пациентов были выявлена статистически значимая разница как по MoCA, так и MMSE. Стоит отметить, что статистически значимой разницы при сравнении результатов оценки по данным шкалам между пациентами с БГ и гетерозиготными носителями мутации в гене *GBA* найдено не было.

Принципиально новый подход к оценке когнитивных функций применили Zokaеi и соавторы [Zokaеi et al., 2014], с целью определения дефицита кратковременной зрительной памяти. У пациентов с GBA-БП ошибки при выполнении теста на кратковременную зрительную память встречались чаще. Интересно, что здоровые носители мутаций в гене *GBA* - без БП также значительно хуже выполнили задание по сравнению с участниками с отсутствием мутаций в гене *GBA*.

К настоящему времени проведено два метаанализа с оценкой когнитивных нарушений у пациентов с GBA-БП. В исследование, проведенное в 2015 году, было включено 6 публикаций, риск развития выраженных когнитивных нарушений составил 3,2 [Zhang et al., 2015]. В ходе метаанализа, включившего

результаты 13 исследований, было показано увеличение риска развития когнитивных нарушений у пациентов с ГВА-БП в 2,4 раза [Creese et al., 2017].

### **1.6.3 Особенности нейропсихологического профиля пациентов с ГВА-БП**

Важным аспектом клинической характеристики ГВА-БП являются особенности нейропсихологического профиля. При всей важности данной составляющей клинической картины БП, она хуже освещена в литературе, чем другие особенности клинической картины.

Говоря о поведенческих расстройствах, в нескольких публикациях показано более частое появление психозов среди пациентов с ГВА-БП. Показана большая частота галлюцинаций и иллюзий, а также другой продуктивной симптоматики среди пациентов с ГВА-БП [Neumann et al., 2009]. В работе Jesus и соавторов [Jesus et al., 2016] мутации, ассоциированные с благоприятным течением, не были связаны с развитием психозов, в то время как мутации, ассоциированные с тяжёлым течением, были связаны с развитием психозов и зрительных галлюцинаций.

Важно учитывать степень когнитивных нарушений у пациентов с выявленной продуктивной симптоматикой, однако в представленных работах подобный анализ не проводился. В ходе метаанализа [Creese et al., 2017] показан повышенный риск развития психозов у пациентов с ГВА-БП (ОШ=1,83). Также у пациентов с ГВА-БП было отмечено более частое развитие тревожно-депрессивных расстройств.

Таким образом, исходя из количества выполненных работ и проведенных метаанализов, очевидно, что ГВА-БП характеризуется тенденцией к развитию когнитивного дефицита. Повышается вероятность развития особенностей нейропсихологического профиля с увеличением частоты зрительных галлюцинаций, психозов, развитием депрессии и тревожных расстройств. Однако следует отметить, что для объективной оценки рисков развития данной симптоматики и оценки возможности профилактического лечения и осмотра

данной группы пациентов необходимо большее количество исследований. Результаты оценки моторной симптоматики носят противоречивый характер. В большом числе публикаций, указывается на необходимость быстрой эскалации дофаминергической терапии, а также большую частоту развития двигательных осложнений (моторных флуктуаций и дискинезии) при лечении препаратами, содержащими леводопу [Brockmann et al., 2015; Pal et al., 2015].

Рассуждая о выявленных особенностях когнитивных функций и расстройствах поведения, необходимо отметить, что данный аспект достаточно изучен у носителей мутаций в гене GBA, в то время как работы по оценке данных нарушений у пациентов с БП, носителей полиморфных вариантов, ассоциированных с риском развития БП, но не приводящих к развитию БГ остаются единичными.

## **1.7 Нейровоспаление при БП**

Нейровоспаление выявляется практически при всех заболеваниях ЦНС и почти во всех структурах мозга [Wohleb, Godbout, 2013]. В настоящее время предполагается, что нейровоспаление может играть существенную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезнь Альцгеймера и БП [Pasqualetti, Brooks, Edison, 2015]. Особо следует отметить недавнее предположение, что при БП триггером нейровоспаления могут являться олигомерные структуры и агрегаты альфа-синуклеина [Gardai et al., 2013]. В то же время обсуждается, что нейровоспаление может играть роль в распространении альфа-синуклеина согласно «прионподобной» теории БП [Emanuele, Chierigatti, 2015].

Данные ряда исследований показывают, что воспалительные реакции, инфильтрация Т-клетками и активация глиальных клеток являются характерными особенностями как для пациентов с БП, так и для животных моделей паркинсонизма, и играют важную роль в дегенерации дофаминергических нейронов [Hirsch et al., 2012], что говорит о возможности разработки

потенциальной терапии для БП путем воздействия на воспалительные процессы [Wang, Liu, Zhou, 2015].

В физиологических условиях периферические иммунные клетки, такие, как Т- и В-лимфоциты, не обнаруживаются в ЦНС. После инфекций или травм тканей быстро активируются моноциты крови и макрофаги. Происходит выделение таких воспалительных цитокинов, как ИЛ-1бета, ФНО-альфа и ИЛ-6, а также хемокинов. Данные цитокины и хемокины могут проникать в мозг и стимулировать микроглию, запуская нейровоспалительную реакцию [Zampronio, Soares, Souza, 2015]. ЦНС считается иммунологически привилегированной системой из-за наличия ГЭБ. ГЭБ ограничивает вход патогенов и периферических иммунных клеток в паренхиму головного мозга. Повреждение ГЭБ приводит к инфильтрации периферических иммунных клеток в ЦНС [Hirsch, Hunot, 2009]. Тесные нейроиммунные взаимодействия приводят к изменению цитокинового профиля при различных нейродегенеративных и психических заболеваниях. Так, при болезни Альцгеймера показано не только увеличение уровня провоспалительных цитокинов в СМЖ, но также выявлена их прямая корреляция с выраженностью когнитивного дефицита с использованием краткой шкалы оценки психического статуса (англ.: Mini-mental State Examination, MMSE) [Hesse et al., 2016; Rizzi, Roriz-Cruz, 2016]. Исследования корреляции выраженности когнитивных расстройств с использованием ряда шкал с цитокиновым профилем при БП остаются единичными [Lindqvist et al., 2013; Милюхина и др., 2013]. *In vitro* показано, что патогенные формы альфа-синуклеина индуцируют выраженную микроглиальную активацию [Su et al., 2008]. Исследования на модельных животных показали, что введение олигомерных форм альфа-синуклеина приводит к активации микроглии и индукции нейровоспаления [Sznejder-Pacholek et al., 2016]. Показано, что нитрованный альфа-синуклеин может проходить ГЭБ и через шейный лимфатический узел вызывать активацию Т-лимфоцитов, и увеличивать экспрессию главного комплекса гистосовместимости класса II у мышей, обработанных МФТП [Benner et al., 2008]. Допускается, что микроглиальные и астроглиальные клетки активируются под

влиянием различных провоспалительных триггеров, в том числе и нейротоксичных форм альфа-синуклеина, в результате чего выделяется ряд цитокинов и активируется система комплемента (рис. 5) [More et al., 2013]. Таким образом, предполагается, что при БП Т-клетки мигрируют в ЦНС, с последующим выделением провоспалительных цитокинов и активацией микроглии. С другой стороны, имеются данные, что олигомерные и фибриллярные формы альфа-синуклеина также оказывают токсическое действие на астроциты, которые, в свою очередь, выделяют ряд цитокинов и участвуют в воспалительной реакции. Особый интерес представляет оценка цитокинового профиля в группах пациентов с БП известной этиологии. Следует отметить, что ген *LRRK2*, ответственный за развитие доминантной формы БП, может играть важную роль в периферическом воспалении [Пчелина, Емельянов, Усенко, 2014; Усенко, 2012]. Богатая лейциновыми повторами киназа 2 (*LRRK2*) представлена в мононуклеарных клетках периферической крови и макрофагах. Уровень экспрессии *LRRK2* значительно увеличивается в процессе дифференциации моноцитов в макрофаги после обработки ИФН-гамма [Gardet et al., 2010].

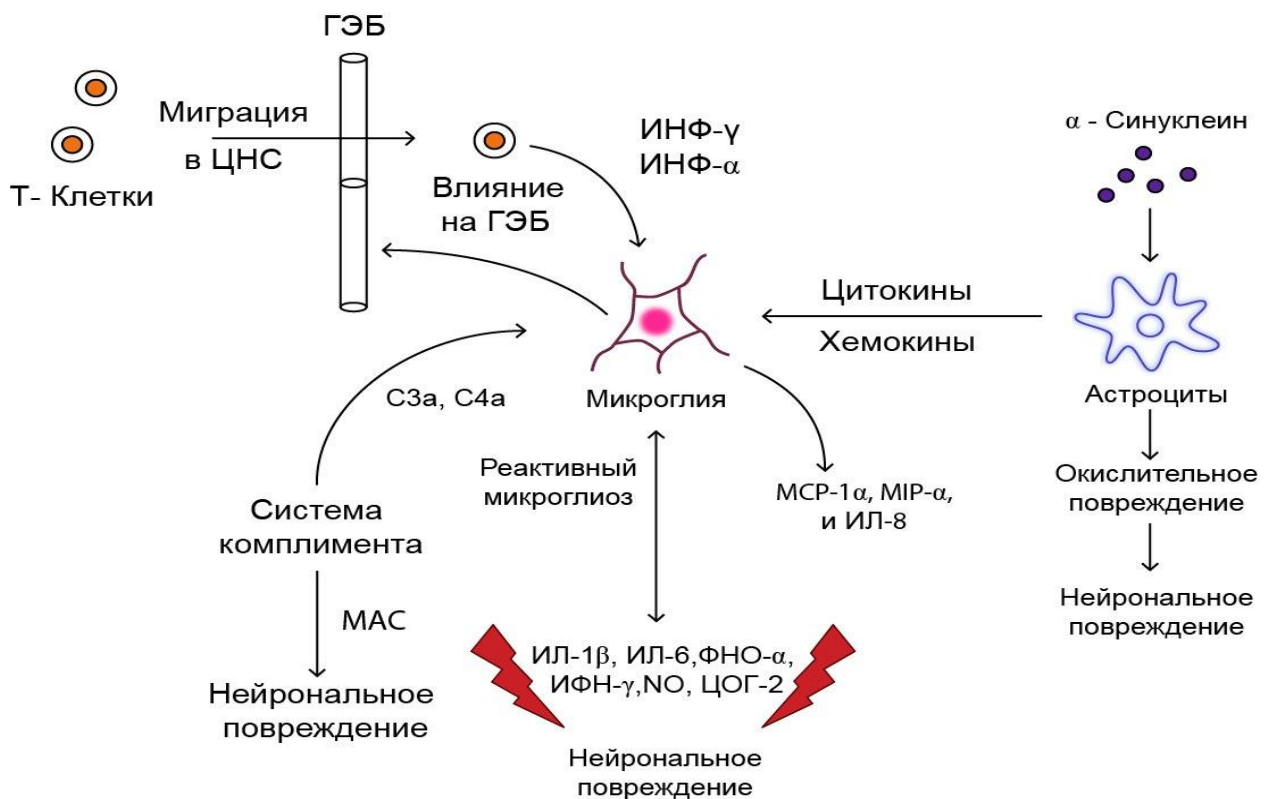


Рисунок 5 – Предполагаемый механизм активации микроглии на фоне хронического воспалительного процесса при БП [More et al., 2013], адаптация

Исследование, проведенное на образцах СМЖ, показало, что концентрация цитокинов (ФНО-альфа, ИЛ-6, ИЛ-10) и олигомеров альфа-синуклеина в СМЖ могут прямо коррелировать между собой при условиях проживания в сильно загрязненных условиях города Мехико [Calderón-Garcidueñas et al., 2016]. У пациентов с БП показано, что уровень ИЛ-6 положительно коррелирует с тяжестью заболевания [Delgado-Alvarado et al., 2017].

### 1.8 Нарушение метаболизма сфинголипидов при БГ. Диагностика БГ

Сфинголипидозы - группа ЛБН, которые вызваны дефектом в лизосомной деградации сфинголипидов. Заболевания данной группы вызваны мутациями в генах, кодирующих лизосомные ферменты (БГ, Ниманна-Пика А/В, Болезнь Фабри, Болезнь Краббе, болезнь Тэя-Сакса, метакроматическая лейкодистрофия, GM2-ганглиозидоз).

Как уже было описано выше, мутации в гене *GBA*, приводящие к снижению активности GCase, приводят к развитию аутосомно-рецессивного заболевания - БГ и ассоциированы с повышенным риском развития БП. GCase катализирует расщепление глюкозилцерамида (GlcCer) на глюкозу и церамид (рис. 6).

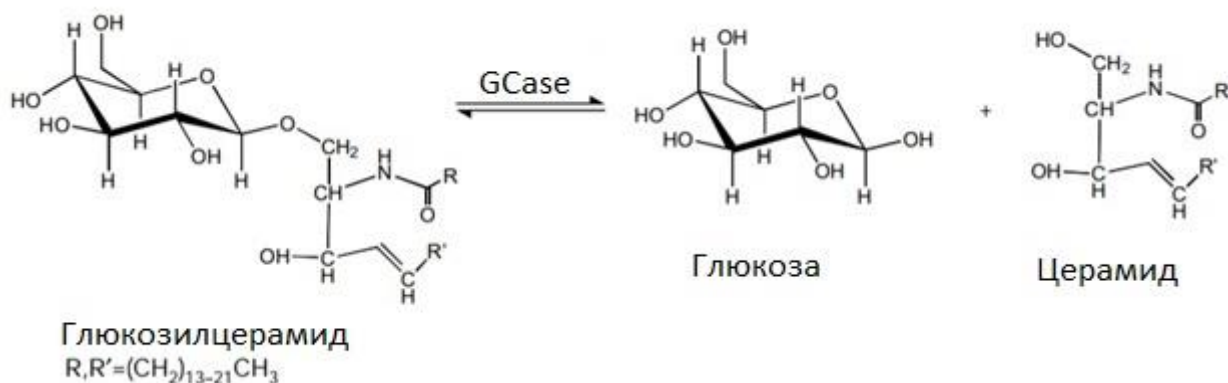


Рисунок 6 – Расщепление глюкозилцерамида (GlcCer) на глюкозу и церамид при участии глюкоцереброзидазы (GCase)

Фермент GCase представляет собой гликопротеин, состоящий из 497 аминокислотных остатков с молекулярной массой от 59 до 69 кДа в зависимости от посттрансляционной модификации белка. Третичная структура белка методом рентгеноструктурного анализа была определена в 2003 году (рис. 7) [Hay Dvir et al., 2003]. Считается, что свободные цистеины (остатки 126, 248 и 342) и цистеины, участвующие в образовании дисульфидной связи в домене I, необходимы для сохранения активности фермента, что позволяет расщеплять GlcCer на глюкозу и церамид и препятствует накоплению субстратов метаболизма [Smith, Mullin, Schapira, 2017].

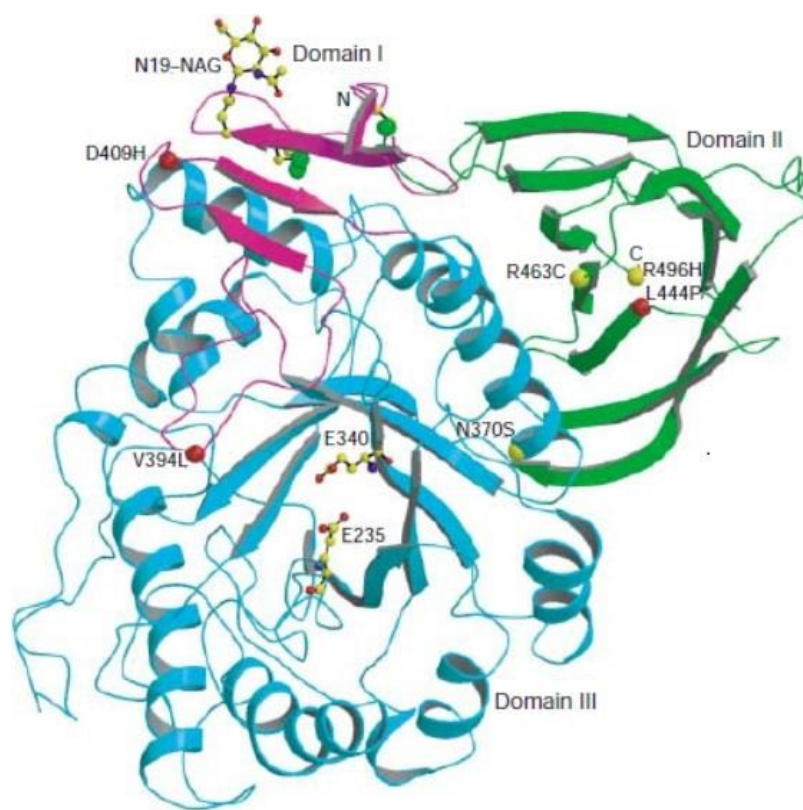


Рисунок 7 – Рентгенструктурный анализ  $\beta$ -глюкоцереброзидазы (GCase)\*

\* Область I показана пурпурной и содержит два дисульфидных мостика, атомы серы в них показаны зелеными шариками. Сайт гликозилирования указан в положении N19. Домен II, который является иммуноглобулиноподобным доменом, показан зеленым цветом. Каталитический домен (домен III) показан синим цветом, а остатки активного участка E235 и E340 показаны как атомные модели. Шесть наиболее распространенных мутаций в гене *GBA* показаны в виде



шариков. Мутации, приводящие к развитию БГ 2 и 3 типа, указаны красным цветом, приводящие к развитию БГ 1 типа - жёлтым цветом. NAG (N-ацетилглюкозамин) [Hay Dvir et al., 2003].

Первичным дефектом при БГ является накопление GlcCer в лизосомах, с образованием измененных макрофагов, так называемых клеток Гоше. При накоплении GlcCer под воздействием кислой церамидазы превращается в глюкозилсфингозин (GlcSph) путем деацетилирования (рис. 8).

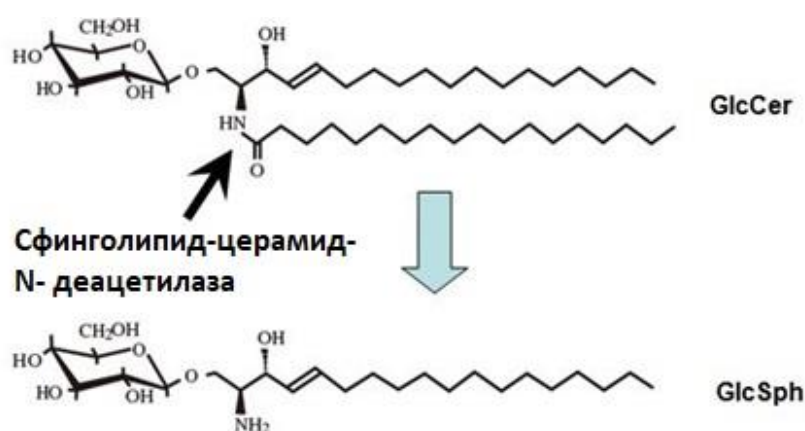


Рисунок 8 – Деацетилирование GlcCer с превращением в GlcSph кислой церамидазой (сфинголипид-церамид-N-деацетилазой) [Zama et al, 2009]

Показано, что GlcSph и GluCer могут покидать лизосомы, Рисунок 9. [Taguchi et al., 2017; Ferraz et al., 2016]. Важно отметить, что кроме фермента GCase существует GCase2, нелизосомная гидролаза, которая участвует в расщеплении цитозольных сфинголипидов. Активность GCase2 не снижена при мутациях в гене *GBA*, так как кодируется другим геном- *GBA2*. В цитозоле происходит гидролиз сфинголипидов на церамид, сфингозин и сфингозин-1-фосфат. При этом не происходит значимого накопления церамида, так как он гидролизуется нейтральной церамидазой. Данное явление отражает низкую чувствительность церамида как биомаркера БГ. Таким образом, как показали исследования последних лет, при БГ накапливается не столько GlcCer, сколько GlcSph, сфингозин и сфингозин-1-фосфат (рис. 9) [Taguchi et al., 2017].

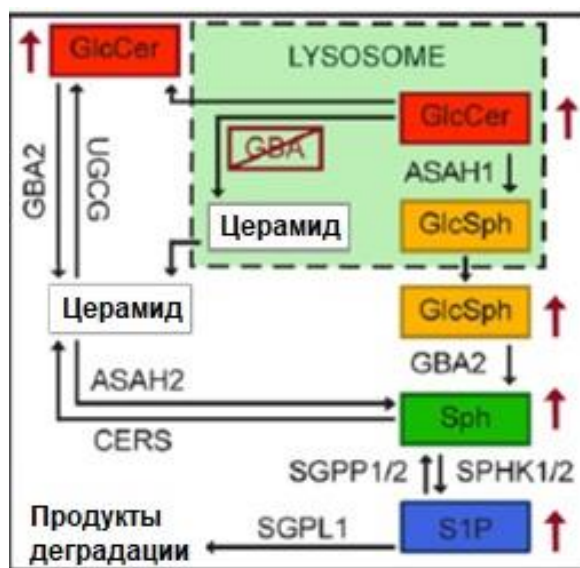


Рисунок 9 – Метаболизм GlcCer у пациентов с БГ\*

\* Поле зеленого цвета- лизосома, белого-цитозоль. Аббревиатуры: ASA1 и 2 – кислая церамидаза 1 и 2, SGPP 1/2 – сфингозин-1-фосфат фосфотаза 1 и 2, SPHK 1/2 – сфингозин киназа 1 и 2, SGPL – сфингозин-1-фосфат лиаза, UGCG – UPD-глюкоза церамид гликозилтрансфераза [Taguchi et al., 2017].

Церамид участвует в образовании не только GlcCer но и ряда веществ, в том числе и галактозилцерамида (GalCer) (рис. 10). Мутации в гене *GALC*, приводящие к снижению активности галактоцереброзидазы, приводят к накоплению GalCer и соответственно к развитию болезни Краббе. GlcCer и GalCer являются эписомерами, и выявление раздельной концентрации создаёт диагностические трудности.

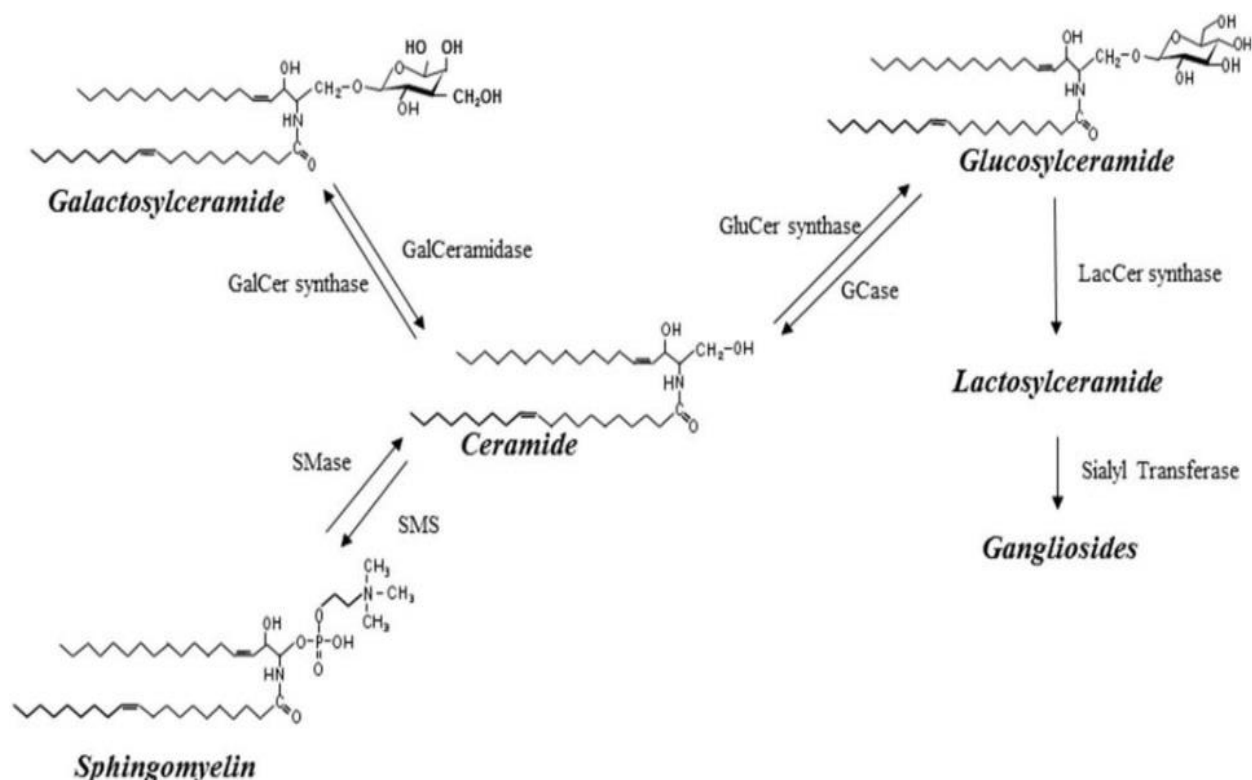


Рисунок 10 – Метаболизм церамида и гликолипидов\*

\* Аббревиатуры: GCase - глюкоцереброзидаза; GalCer synthase - галактозилцерамид; GlcCer synthase - глюкозилцерамид синтаза; GalCeramidase - галактозилцерамид; LacCer synthase - Лактозилцерамид синтаза; SMase: Сфингомиелиназа; SMS - Сфингомиелин синтаза [Mielke et al., 2013].

При этом болезнь Краббе и БГ достаточно значимо отличаются клинически, и с целью экономии средств и времени рационально использовать диагностические методы, при которых определяют их совместную концентрацию, данное сочетание веществ назвали гексозилсфингозин (HexSph) (рис. 11) [Polo et al., 2017].

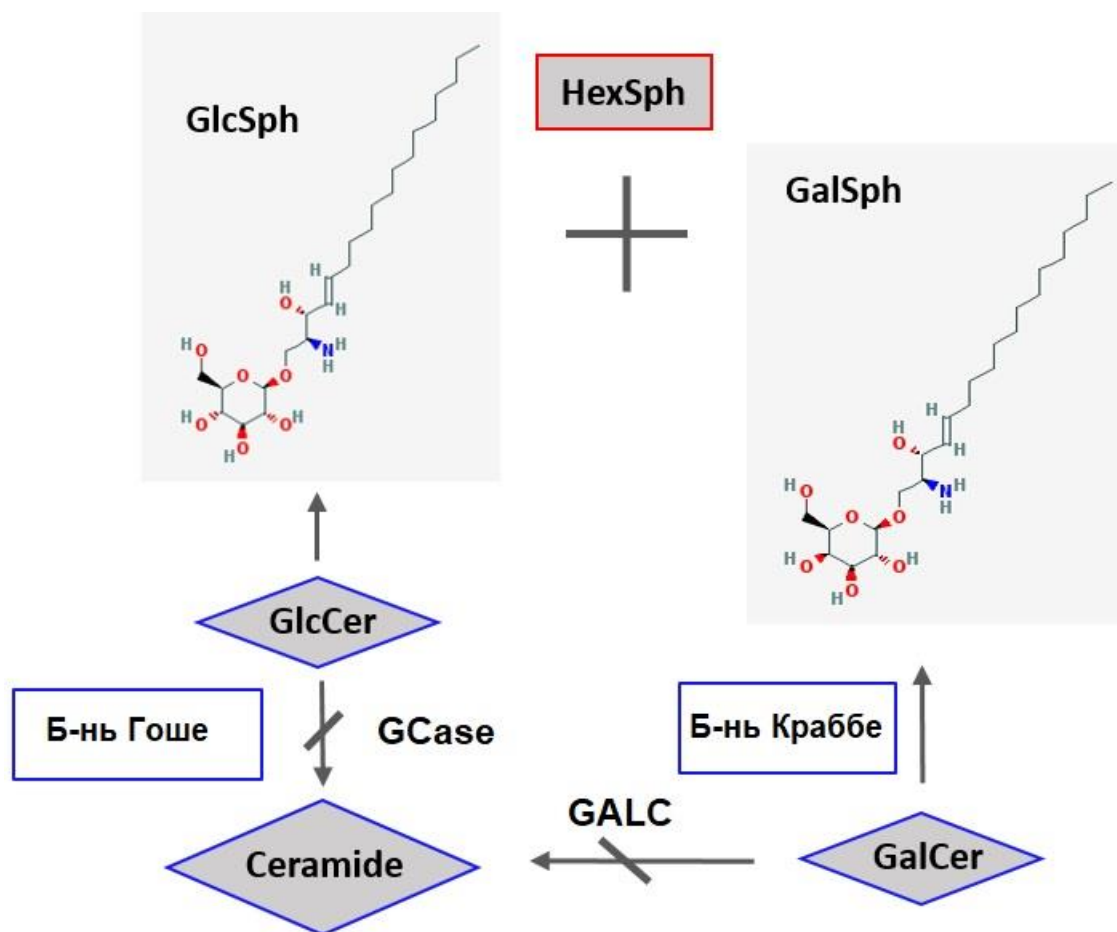


Рисунок 11 – Образование лизосфинголипидов при БГ и болезни Краббе

Первым диагностическим этапом при подозрении на БГ является определение активности GCase в фибробластах, лейкоцитах или из сухих пятен крови. Однако ферментативная активность GCase не может быть использована, чтобы определить тяжесть симптомов или с целью прогноза развития заболевания. Далее диагноз подтверждается генотипированием с обнаружением мутаций в гене *GBA* в гомозиготном статусе или же компаундных гетерозиготных мутаций. Подтверждающими диагнозом биомаркерами являются хитотриозидаза и СС-хемокин лиганд 18 (CCL18), обеспечивающие достаточно высокую чувствительность и специфичность [Zimran et al., 2011]. По данным лабораторных исследований на пациентах с БГ, хитотриозидаза обеспечивает относительно высокой чувствительностью (91,7%) и специфичностью (86,1%), С хемокин лиганд 18 (CCL18) 76,2% и 79,4% соответственно, данные показатели для GlcSph составили 100% [Rolfs et al., 2013].

Рутинно доступные биомаркеры (хитотриозидаза и CCL-18) являются вторичными веществами, образование которых увеличивается при накоплении GlcCer в макрофагах, и они не отражают патогенез заболевания. Было показано что концентрация хитотриозидазы может повышаться и при других заболеваниях, например при болезни Фабри и X-сцепленной церебральной аденолейкодистрофии [Vedder et al., 2006; Orchard et al., 2011]. Более того, дупликация в гене, кодирующем хитотриозидазу, приводит к снижению её концентрации. Таким образом, очевидно, что данное вещество не может являться надежным маркером БГ, а соответственно и БП. Повышение активности CCL18 было показано при ряде воспалительных заболеваний (артрит, атопический дерматит, новообразования) [Schutyser et al., 2005].

Существует необходимость в выявлении надежного биомаркера, который сможет определять риск развития БП, а также прогноз и ответ на терапию. Выявление мутации в гене *GBA* и даже снижение активности GCase не может отражать тяжесть и особенности течения БП, а также являться предиктивным фактором. БП развивается далеко не у всех пациентов с гетерозиготной мутацией в гене *GBA*. Выявление такого биомаркера может также быть актуальным в прогнозировании развития БП у носителей мутаций в гене *GBA*.

## **1.9 Связь между активностью глюкоцереброзидазы и накоплением альфа-синуклеина**

Существует несколько гипотез о прямой или косвенной связи между мутациями в гене *GBA*, приводящими к снижению активности GCase и накоплению альфа-синуклеина [Aflaki, Westbroek, Sidransky, 2017]. Существуют две основные теории о влиянии мутированной GCase на гомеостаз альфа-синуклеина либо через потерю функции, либо путем приобретения токсической функции (англ.: loss or gain of function). Ранее на индуцированных стволовых клетках нейронов человека было показано, что снижение активности GCase нарушает деградацию белков в лизосомах, что приводит к аккумуляции альфа-

синуклеина. В свою очередь, накопление альфа-синуклеина приводит к ингибированию лизосомной активности GCase [Mazzulli et al., 2011].

GCase синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), гликозилируется в аппарате Гольджи и далее транспортируется в лизосому, где она расщепляет глюкозилцереброзид на глюкозу и церамид. Мутации в гене *GBA* приводят к нарушению сборки и созревания GCase, что приводит к её задержке в ЭР и к увеличению ЭР-ассоциированной деградации с помощью протеасом. В зависимости от мутации изменяется накопление GCase в ЭР и, соответственно, при неблагоприятных мутациях, таких, как L444P, нарушается созревание большего количества фермента, что приводит к существенному снижению активности фермента [Bendikov-Bar, Horowitz, 2012; Bendikov-Bar et al., 2011]. Однако механизм влияния GCase на ЭР-ассоциированную деградацию и нарушение деградации альфа-синуклеина требует дальнейших экспериментальных исследований.

Мутантная GCase подвергается протеосомному расщеплению и не транслоцируется в лизосомы. GlcCer накапливается в лизосомах, что впоследствии может приводить к агрегации альфа-синуклеина. В частности, как предполагается, при непосредственной стабилизации олигомеров альфа-синуклеина накапливающимся субстратом является GlcCer [Taguchi et al., 2017]. Предполагаемый механизм взаимосвязи дисфункции GCase и накопления альфа-синуклеина при GBA-БП представлен на рисунке 12.

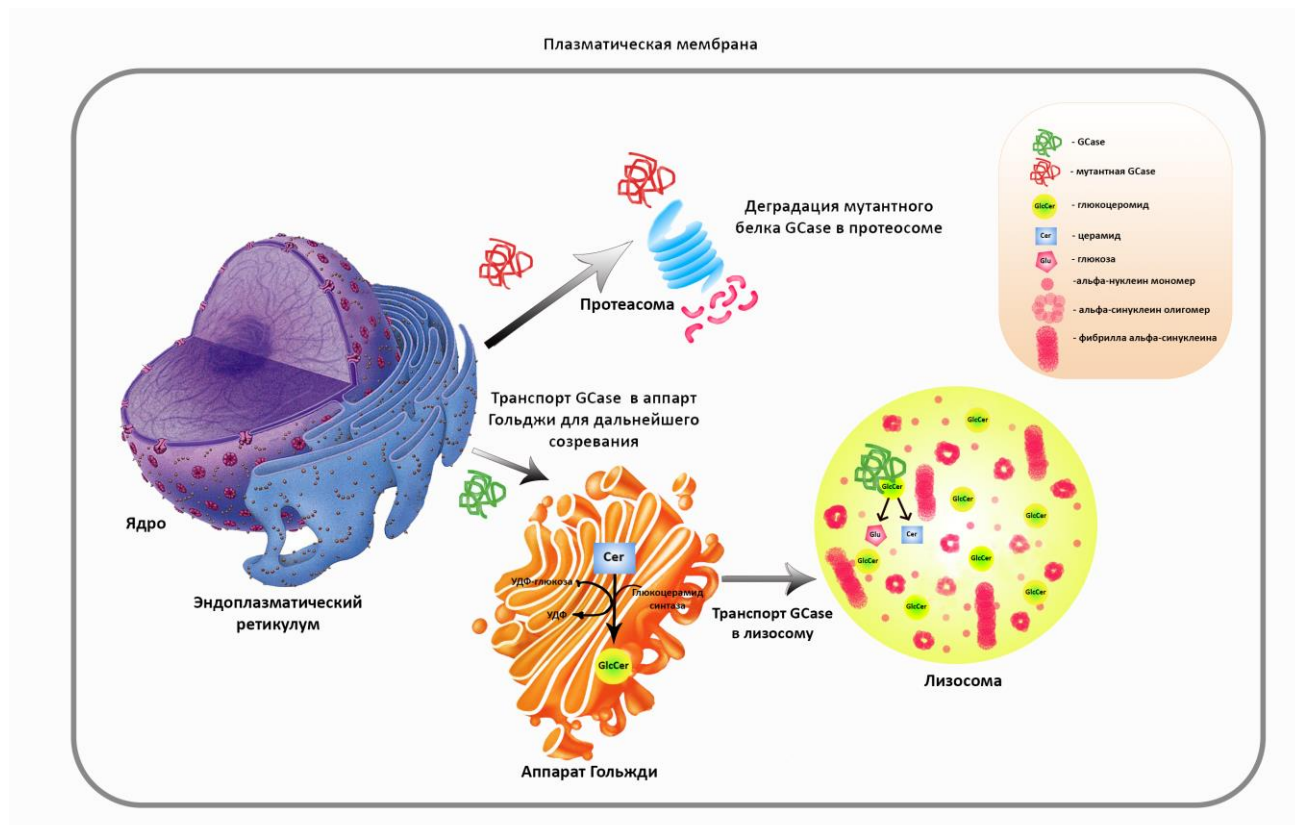


Рисунок 12 – Предполагаемый механизм взаимосвязи дисфункции GCase и накопления альфа-синуклеина при GBA-БП

Обсуждаются другие возможности влияния мутаций в гене *GBA* на олигомеризацию альфа-синуклеина, в том числе рассматривается их физическое взаимодействие. Впервые физическое взаимодействие альфа-синуклеина и GCase было продемонстрировано в 2011 году [Yar et al., 2011] с использованием флуоресценции и ядерной магнитно-резонансной спектроскопии в культуре нейрональных клеток. Показано, что взаимодействие между альфа-синуклеином и GCase происходит только в кислой среде (pH 5,5), но не в нейтральных условиях (pH 7,4), что указывает на то, что взаимодействие может происходить в лизосомах. Также авторы выявили сайт взаимодействия GCase с C-концевыми остатками альфа-синуклеина, (аминокислоты 118-137). Авторами было отмечено, что мутантная форма N370S GCase имеет меньшее сродство к альфа-синуклеину. В двух последующих исследованиях Yar и соавторы продемонстрировали, что связанный с мембраной альфа-синуклеин в его альфа-спиральной конформации является мощным ингибитором GCase [Yar et al., 2013] вследствие отдаления

GCCase от мембраны, что приводит к снижению доступности фермента для субстрата и нарушает его каталитический центр. С другой стороны, связывание GCCase с альфа-синуклеином может также влиять на присоединение альфа-синуклеина к мембране путем перемещения спиральных остатков от бислоя, что может дополнительно мешать его лизосомной деградации [Yap et al., 2015]. Полученные данные свидетельствуют о том, что внутрилизосомное накопление альфа-синуклеина ингибирует активность GCCase посредством образования связанного с мембраной комплекса GCCase-альфа-синуклеин. Структурная перегруппировка альфа-синуклеина на мембране, вызванная связыванием с GCCase, может дополнительно мешать лизосомной деградации фермента, что приводит к усилению агрегации альфа-синуклеина.

GCCase является одним из немногих лизосомных ферментов, который не использует маннозо-6-фосфатный рецептор для попадания в лизосомы, а переносится в лизосомы путем связывания с лизосомным интегральным мембранным белком типа 2 (англ.: lysosomal integral membrane protein type-2 LIMP-2) [Gonzalez et al., 2014]. Недостаток LIMP-2 приводит к снижению активности GCCase, и, следовательно, уровень LIMP-2 также может влиять на взаимодействие между GCCase и альфа-синуклеином. На модели мышей с дефицитом LIMP-2 наблюдалось снижение активности GCCase и увеличение агрегации альфа-синуклеина так же, как и при БП [Rothaug et al., 2014]. Существуют также генетические доказательства того, что LIMP-2 может быть связан с БП [Michelakakis et al., 2012]. Выявлена ассоциация ОНП в гене *SCARB2* (кодирующем LIMP-2) с БП, однако не выявлено влияние данного ОНП на уровень GCCase [Alcalay et al., 2016].

За последние несколько лет вышло несколько публикаций, продемонстрировавших, что мутации в генах, кодирующих другие лизосомные ферменты, также увеличивают риск БП [Dagan et al., 2015; Shachar et al., 2011; Robak et al., 2017]. Таким образом, очевидно, что лизосомная дисфункция является важным фактором развития БП. Пути, связанные с деградацией альфа-синуклеина, особенно через аутофагосомно-лизосомные системы, заслуживают



пристального внимания. В этом процессе могут участвовать различные формы аутофагии. Уровень аутофагосом увеличен в дофаминергических нейронах ЧС пациентов с БП, а лизосомные маркеры, такие как катепсин D, уменьшаются, что косвенно свидетельствует о нарушенном аутофагическом транспорте у пациентов с БП [Chu et al., 2009].

Накопление альфа-синуклеина может быть результатом увеличения его синтеза, снижения скорости деградации или усиления агрегации. Известно, что уровень альфа-синуклеина в ЧС повышается с возрастом [Chu, Kordower, 2007]. Факторами, приводящими к снижению скорости деградации, являются, сниженные уровни катепсинов, белков ответственных за распад альфа-синуклеина, нарушение внутриклеточного обмена альфа-синуклеина и повышенное связывание альфа-синуклеина с мембраной [McGlinchey; Lee, 2015]. Повышенная агрегация может быть вызвана усилением фосфорилирования, стабилизацией агрегатов сфинголипидами, такими как глюкозилцерамид, и другими причинами, связанными с лизосомальной дисфункцией [Aflaki, Westbroek, Sidransky, 2017]. Сообщалось также, что уровень GCase снижается с возрастом [Rocha et al., 2015].

Выяснение причин накопления и агрегации альфа-синуклеина имеет важное значение для понимания патогенеза болезни и разработки методов лечения.

Следует отметить, что в настоящее время не существует однозначного мнения о механизме развития БП при наличии мутаций в гене *GBA*. Остается неясным, может ли умеренное снижение активности GCase, наблюдаемое при гетерозиготном носительстве мутаций у пациентов с БП, приводить к накоплению метаболитов обмена гликофинголипидов и нейротоксических форм альфа-синуклеина. В рамках нашего исследования мы предполагаем, что снижение активности GCase и как следствие накопление GlcSph оказывают влияния на олигомеризацию альфа-синуклеина и индукцию воспаления.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты и контрольная группа отбирались для включения в исследование в научно-клиническом центре нейродегенеративных заболеваний клиники ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» и ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ» и Этическим комитетом ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова, все пациенты подписали информированное согласие. В исследование включили 762 пациента с установленным диагнозом БП согласно критериям Британского банка мозга (Hughes et al., 1992) и Международного сообщества по двигательным расстройствам (Postuma et al., 2015), а также без других нейродегенеративных заболеваний головного мозга. В контрольную группу включили 88 здоровых добровольцев.

### 2.1 Выделение ДНК из периферической крови человека

Забор 8-9 мл периферической крови из локтевой вены у исследуемых осуществлялся в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта. Собранная кровь замораживалась и хранилась при температуре -20<sup>0</sup>С, до момента выделения ДНК.

Выделение проходило в три стадии. На первой стадии кровь размораживалась при комнатной температуре, далее перемешивалась. 500 мкл крови отливалось в пробирку 1,5 мл, далее добавляли 500 мкл раствора Канкеля (29 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% сахароза, 1% тритон X-100). Центрифугировали в течение 10 минут при 5000 об/мин, сливали надосадок. Далее повторно добавляли 500 мкл раствора Канкеля, разбивали осадок с помощью вортекса. Повторно центрифугировали в течение 10 минут при 5000 об/мин, сливали надосадок. Повторно добавляли 500 мкл раствора Канкеля, разбивали с помощью вортекса. Сливали надосадок, удерживая пробирку вверх

дном. Добавляли к осадку 300 мкл TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,01 M NaCl, 0,01 M ЭДТА, pH 8,0), 30 мкл 30% SDS и протеиназу К до конечной концентрации 100 мкг/мл. Полученную смесь инкубировали в термостате при 37<sup>0</sup>С для протеолиза в течение ночи. На второй стадии в получившийся в результате гомогенный раствор добавляли 300 мкл водонасыщенного фенола, с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 5000 об/мин. Далее был отобран верхний слой в чистые пробирки и было добавлено 150 мкл водонасыщенного фенола и 150 мкл хлороформа. Далее в течение 10 минут смесь центрифугировали при 5000 об/мин и отбирали водную фазу, после повторной обработки 150 мкл водонасыщенного фенола и 150 мкл хлороформа проводилось центрифугирование в течение 10 минут при 5000 об/мин, забор водной фазы и далее после добавления 300 мкл хлороформа и повторного центрифугирования 10 минут при 5000 об/мин в полученный надосадок добавляли 30 мкл ацетата натрия и 1000 мкл 96% этилового спирта. На третьей стадии осадок дважды промывали 70% этанолом и, высушив в термостате, растворяли в 100 мкл воды. Концентрация полученного раствора ДНК, выделенной из 500 мкл, находилась в диапазоне 50-100 нг/мкл.

## **2.2 Идентификация мутаций и полиморфных вариантов в гене *GBA***

Идентификация мутаций проводилась с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом [Aharon-Peretz, Rosenbaum, Gershoni-Baruch, 2004]. Для идентификации варианта G1093A (E326K) гена *GBA* был предложен оригинальный метод. Вариант T1223C (T369M) был идентифицирован по ранее описанной методике [Walker et al., 2003]. Последовательности праймеров, условия ПЦР, использованные для выявления мутаций N370S и L444P и полиморфных вариантов E326K и T369M, а также длины фрагментов последовательности ДНК после рестрикции приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Праймеры и условия ПЦР для выявления мутаций A1226G (N370S) и T1448C (L444P) и полиморфных вариантов G1093A (E326K) и T1223C (T369M)

Мутация	Нуклеотидная последовательность праймеров		Температура отжига	Рестриктаза	Размер фрагмента ДНК Пары оснований (п.о.)		
	Прямой	Обратный			°C	ПЦР Фрагмент	После рестрикции (норма)
N370S (rs76763715)	5'GCCTTTGTCCTTACCCTCG-3'	5'GACAAAGTTACGCACCCAA-3'	56	XhoI	105	105	89, 16
L444P (rs421016)	5'GGAGGACCCAATTGGGTGCGT-3'	5'ACGCTGTCTTCAGCCCACTTC-3'	60	NciI	638	638	536, 102
E326K (rs2230288)	5'-GTTGCATTCTTCCCGTCACC-3'	5'-CTGGACAGGAAGGGCTTCTG-3'	60	Alw26I (BsmAI)	418	418	191, 227
T369M (rs75548401)	5'-GTTGCATTCTTCCCGTCACC-3'	5'-CTGGACAGGAAGGGCTTCTG-3'	60	NlaII (Hin1II)	417	191, 140, 86	191, 140, 102 и 86-89

Для идентификации аминокислотных замен N370S и L444P амплификацию проводили в 15 мкл реакционной смеси, содержащей TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermoscientific) и 3-10 нг геномной ДНК. Амплификацию проводили с использованием термоциклера T100 ThermalCycler (BIO-RAD, США). ПЦР включала первоначальную денатурацию в течение 5 минут при 94°C, далее при 94°C в течение 1 минуты денатурация, отжиг праймеров для мутации N370S при 56°C 45 секунд; для мутации L444P и полиморфных вариантов E326K и T369M при 60°C 45 секунд. Элонгация проходила при 72°C 45 секунд. После завершения

30 циклов амплификации проводили заключительный синтез при 72°C в течение 7 минут. Для проведения рестрикционного анализа ПЦР продукт инкубировали с 0,5 ед. эндонуклеазы (для N370S- XhoI («Fermentas»); для L444P- NciI («Fermentas»); для E326K- Alw26I («Fermentas»); для T369M- NlaIII («Fermentas»)) при 37°C в течение ночи. После рестрикции фрагменты ДНК подвергли электрофоретическому разделению в 8% (для N370S и E326K), 6% (для L444P), 8% (для E326K) и 10% (для T369M) в полиакриамидном геле (ПААГ). Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете после окрашивания бромистым этидием (рис. 13–16).

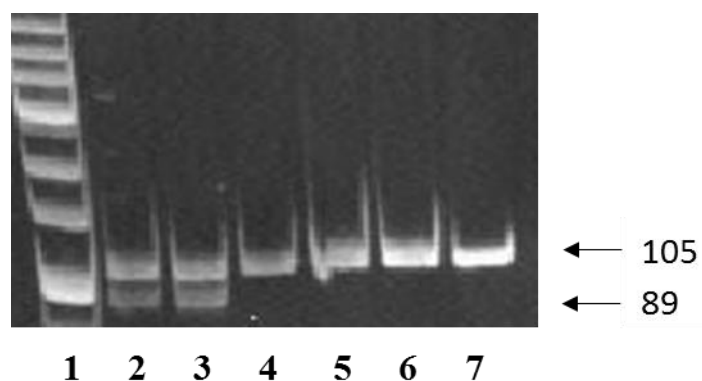


Рисунок 13 – Идентификация мутации N370S (A1226G) в гене *GBA*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК (GeneRuler 50 bp DNA Ladder), 2, 3 – гетерозиготный вариант (AG); 4, 5, 6, 7 – гомозиготный вариант (AA)

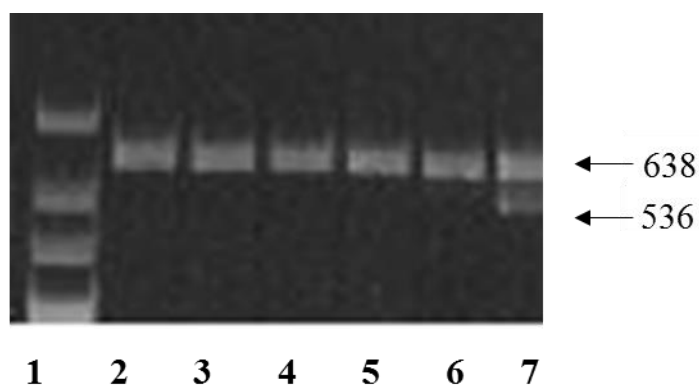


Рисунок 14 – Идентификация мутации L444P (T1448C) в гене *GBA*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК (GeneRuler 50 bp DNA Ladder); 2, 3, 4, 5, 6 – гомозиготный вариант (TT); 7 – гетерозиготный вариант (TC)

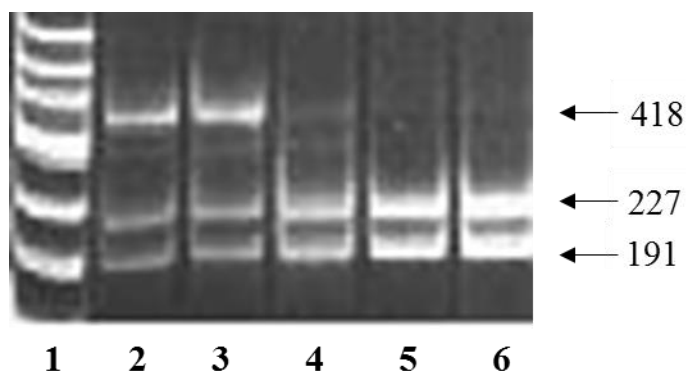


Рисунок 15 – Идентификация полиморфного варианта E326K (G1093A) в гене *GBA*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК (GeneRuler 50 bp DNA Ladder) 2, 3 – гетерозиготный вариант (AG); 4, 5, 6 – гомозиготный вариант (GG)

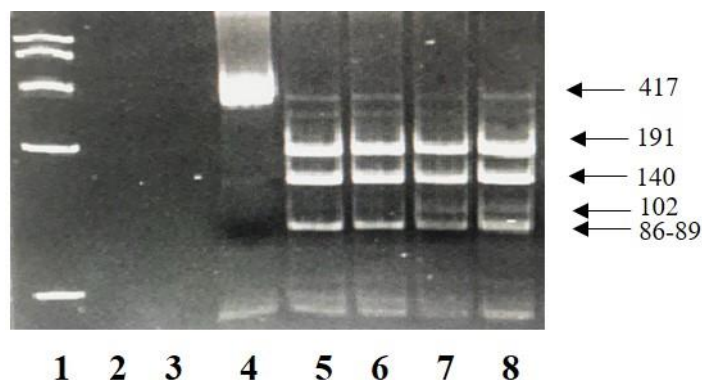


Рисунок 16 – Идентификация полиморфного варианта T369M (T1223C) в гене *GBA*: 1 – маркер молекулярного веса ДНК (GeneRuler 50 bp DNA Ladder), 2, 3 – нулевой контроль 4- ПЦР-продукт, 5, 6 – гомозиготный вариант (ТТ); 7, 8 – гетерозиготный вариант (СТ)

### 2.3. Клиническая характеристика обследованных больных

Все пациенты с GBA-БП были охарактеризованы по эпидемиологическим (пол, возраст, возраст начала болезни) и клиническим (стадия и форма болезни, скорость прогрессирования заболевания, выраженность моторной и немоторной симптоматики, получаемая терапия, длительность леводопотерапии, эквивалентная суточная доза леводопы) показателям. Группа пациентов со сБП являлась случайной выборкой, состояла из неродственных индивидуумов, у

которых были исключены мутации (L444P, N370S) и полиморфные варианты (E326K, T369M) гена *GBA*. Группы сравнения статистически не отличались друг от друга по возрасту и полу. В таблице 3 приведены демографические характеристики пациентов с БП. В исследование включили 762 пациента. Для более подробного описания пациентов с БП, выполнено дополнительное разделение на группу пациентов с ранним началом (до 50 лет) и с началом после 50 лет. Также, среди пациентов с БП дополнительно демографически охарактеризована группа пациентов с положительным семейным анамнезом. Контрольная группа для оценки биохимических показателей (N=88) состояла из здоровых добровольцев, соответствующих по полу и возрасту группе пациентов с БП, в данной группе были исключены мутации (L444P, N370S) и полиморфные варианты (E326K, T369M) гена *GBA*.

Таблица 3 – Демографические и клинические характеристики пациентов с БП

Пациенты	Кол-во, (N)	Возраст ( $\pm$ СКО)	Возраст начала БП ( $\pm$ СКО)	Женщины (%)
БП	762	65 ( $\pm$ 10,9)	58,2 ( $\pm$ 12,7)	58
БП с началом до 50 лет	140	54,3 ( $\pm$ 10,9)	41,9 ( $\pm$ 8,7)	62
БП с началом после 50 лет	622	68,5 ( $\pm$ 7,5)	63,2 ( $\pm$ 7,5)	57
БП с положительным семейным анамнезом	152	63,9 ( $\pm$ 11,6)	55,4 ( $\pm$ 12,5)	60

\*СКО- среднеквадратичное отклонение

### 2.3.1. Неврологический осмотр пациентов

Осмотр пациентов с использованием шкал для оценки когнитивных, моторных функций, тревоги, депрессии, психопродуктивной симптоматики,

расстройств сна, комплекса немоторных симптомов и качества жизни длился 50-80 минут. В случае наличия у пациента флуктуаций, осмотр проводился в период «включения». Список всех шкал, использовавшихся при осмотре пациентов, представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Список шкал, использованных при клиническом осмотре пациентов

Название шкалы	Сокращение	Назначение
Монреальская шкала когнитивных функций	MoCA	Оценка когнитивных функций
Краткая шкала оценки психического статуса	MMSE	
Батарея лобной дисфункции	FAB	
Шкала Хен и Яра в модификации Линдвал	-	Оценка моторных функций
Унифицированная рейтинговая шкала болезни Паркинсона	UPDRS	
Европейский опросник оценки качества жизни	EQ-5D	Оценка качества жизни
Краткая гериатрическая шкала депрессии	GDS-SF	Оценка нейропсихологического статуса
Клиническая шкала тревоги Шихана	ShARS	
Шкала депрессии Бека	BDI	
Госпитальная шкала тревоги и депрессии	HADS	
Нейропсихиатрический опросник	NPI	
Расстройства сна в фазу быстрых движений глаз	RBDSQ	Оценка расстройств сна
Опросник для оценки немоторных симптомов	PD-NMS	Оценка комплекса немоторных симптомов



### 2.3.2 Оценка когнитивных функций

Оценка когнитивных функций проводилась с использованием шкал:

- MoCA [Nasreddine et al., 2005]. Данный тест позволяет провести комплексную оценку когнитивных функций, включая ориентацию в пространстве и времени, кратковременную память, внимание, беглость речи, исполнительные и зрительно-пространственные функции. Оценка по тесту варьирует от 0 до 30, сумму баллов больше 26 принято считать нормой.
- MMSE [Folstein et al., 1975] представляет из себя короткий, структурированный тест с оценкой ориентации во времени и пространстве, кратковременной памяти, внимания, беглость речи и зрительно-пространственные функции. Оценка по тесту варьирует от 0 до 30 баллов. Оценка выше 26 баллов принято считать нормой. В отличие от теста MoCa, в данном тесте отсутствует тест рисования часов и тест связи чисел.

Батарея лобной дисфункции (FAB) [Dubois et al, 2000] использовалась для сравнительной оценки когнитивных нарушений с преимущественным поражением лобной доли или подкорковых структур. Тест включает в себя оценку концептуализации, беглость речи, динамический праксис, реакции выбора и хватательный рефлекс. Состоит из 6 заданий, максимальный балл за каждое 3. Сумма баллов больше 16 считается нормой

### 2.3.3 Оценка моторных функций

Стадия БП оценивалась по шкале Хен и Яра в модификации Линдвал (Hoehn Yahr scale Lindvall modification) [Hoehn-Yahr, 1967]. Данная шкала включает в себя 5 стадий, с дополнительным делением на стадии 1,5 и 2,5. Где 0 – отсутствие признаков паркинсонизма, а 5 – без посторонней помощи прикован к креслу или кровати.

Тяжесть заболевания оценивалась по унифицированной рейтинговой шкале болезни Паркинсона (Unified Parkinson's Disease Rating Scale – UPDRS) [Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's Disease, 2003] части I-IV. В I части данной шкалы оценивается мышление, поведение и настроение на момент осмотра, максимальный балл 16. Во II части производится оценка повседневной активности, максимальный балл 52. В III части производится непосредственно комплексная оценка моторных функций, максимальный балл 56. В IV части оценивается наличие осложнений лечения, максимальный балл 23.

### **2.3.4 Оценка тревоги и депрессии**

Выраженность тревожно-депрессивных нарушений оценивалась по:

- Краткой гериатрической шкале депрессии (Geriatric Depression Scale - short version - GDS-SF) [Yesavage, Sheikh, 1986], краткая шкала из 15 вопросов, в формате «да-нет», оценивающая наличие депрессии.
- Клинической шкале тревоги Шихана (Sheehan Clinical Anxiety Rating Scale – ShARS) [Sheehan, 1989]. Шкала позволяет оценить расстройства тревожного спектра, состоит из 35 вопросов. Максимальный балл 140. Балл выше 30 свидетельствует о наличии тревоги.
- Шкале депрессии Бека (Beck Depression Inventory-II – BDI) [Beck, Steer, Brown, 1996]. Шкала позволяет определить выраженность симптомов депрессии. Максимальный балл 63. Результаты теста до 13 баллов считаются нормой.
- Госпитальной шкале тревоги и депрессии (Hospital anxiety and depression scale-HADS) [Zigmond, 1983]. Состоит из двух подшкал HADS «А» для оценки тревоги и HADS «D». Максимальный балл по каждой из подшкал – 21. До 7 балл по каждой из подшкал считается нормой.
- Нейропсихиатрическому опроснику (NPI) [Cummings, Negarty, 1994]. Опросник оценивает наличие бреда, галлюцинаций, апатии, депрессии. При

наличии данных симптомов оценивалась частота, тяжесть и степень дистресса у ухаживающих за пациентом.

### **2.3.5 Другие шкалы**

Оценка качества жизни проводилась с помощью европейского опросника оценки качества жизни (EQ-5D) [Schrag et al., 2000].

Другие немоторные проявления были оценены по опроснику для оценки немоторных симптомов при БП (Parkinson's disease Non-motor symptoms questionnaire- PD-NMS [Chaudhuri et al., 2006].

Расстройства сна в фазу быстрых движений глаз (БДГ) оценивались с помощью опросника (RBDSQ) [Stiasny-Kolster et al., 2007].

## **2.4 Получение плазмы крови**

Образцы крови центрифугировались при 3000 об /мин в течение 20 минут с целью получения плазмы крови. Далее в отдельные стерильные эппендорфы отбиралась плазма крови и образцы помещались на хранение при  $-80^{\circ}\text{C}$  до проведения эксперимента.

## **2.5 Оценка концентрации олигомерного альфа-синуклеина**

Концентрация олигомерного альфа-синуклеина (пг/мл) оценивалась в плазме крови с помощью ИФА лабораторным набором Human Alpha-Synuclein ELISA kit (Analytik Jena, Germany). Хемилюминесценция оценивалась на планшетном спектрофлуориметре CLARIO Star (BMG Labtech, Германия). Время измерения составляло 20 м/с на лунку. Каждый образец измеряли трижды. Построение стандартной кривой проводили со стандартами из набора. Пример построения стандартной кривой показан на рисунке 17.

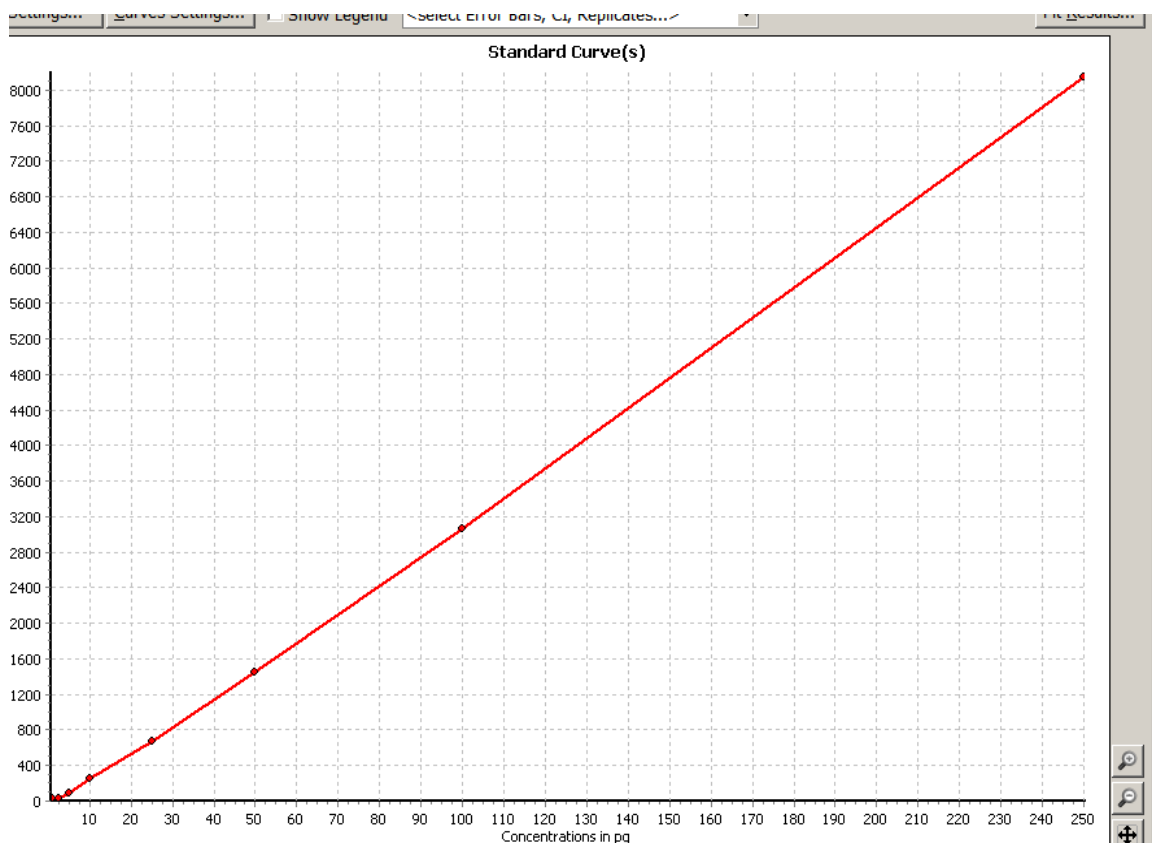


Рисунок 17 – Калибровочная кривая, отражающая зависимость хемилюминесценции раствора от концентрации антигена (олигомеров альфа-синуклеина, пг/мл)

## 2.6 Определение концентрации цитокинов

Концентрация цитокинов в плазме крови (интерлейкин 1-бета (ИЛ-1бета), интерлейкин 6 (ИЛ-6), интерлейкин 10 (ИЛ-10), интерферон гамма (ИФН-гамма) и фактор некроза опухоли альфа (ФНО-альфа)) оценивалась с помощью ИФА. Определение оптической плотности и расчет результатов производились на микропланшетном вертикальном фотометре Thermo Multiskan FC (Thermo Scientific, Финляндия), программное обеспечение для персонального компьютера SkanItSoftware. Для определения уровня цитокинов в плазме крови использовали наборы реагентов «ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Новосибирск). Средние значения и диапазон концентрации цитокинов в крови здоровых доноров (по данным

Вектор-Бест): ИЛ-1бета (1,6 (0-11) пг/мл), ИЛ-6 (2 (0-10) пг/мл), ИЛ-10 (5 (0-20) пг/мл), ИФН-гамма (2 (0-20) пг/мл), ФНО-альфа (0,5 (0-6) пг/мл).

## **2.7 Мультиплексный метод определения активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов в сухом пятне крови**

Выполнение данных исследований проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра, Москва (руководитель – д.м.н. Захарова Е.Ю.). В качестве группы сравнения предоставлены данные оценки активности GCase и уровня субстратов метаболизма (HexSph) пациентов с БГ.

Свежесобранную кровь наносили на специальные круги на фильтровальной бумаге (Whatman 903). Далее пятна крови были высушены в течение 2 часов при комнатной температуре и хранились при + 4 С° до дальнейшего использования не более одного месяца.

### **Экстракция образцов**

Из каждого сухого пятна крови на фильтровальной карточке пробивалось одно пятно диаметром 3,2 мм в 96-луночный планшет.

### **2.7.1 Измерение активности лизосомных ферментов**

Измерение активности GCase проводилась совместно с оценкой еще 5 лизосомных ферментов ( $\alpha$ -галактозидазы (GLA),  $\alpha$ -глюкозидазы (GAA), галактоцереброзидазы (GALC), сфингомиелиназы (ASM) и  $\alpha$ -идурунидазы (IDUA)) по ранее опубликованному протоколу (с модификациями) [Zhang et al., 2008]. В рамках нашего исследования ферментом интереса являлась GCase.

Активность лизосомных ферментов оценивалась в четырех группах: GBA-БП (N = 26), сБП (N = 84), в контрольной группе (N = 71) и у пациентов с БГ (N=47).

Ферментативная активность оценивалась путем измерения концентрации продукта, полученного в результате реакции фермента с субстратом

Фермент (Ф) + Субстрат (С) => (ФС комплекс) => Ф + Продукт (П)

Активность шести лизосомных ферментов оценивалась из участка фильтровальной бумаги диаметром 3,2 мм, в сухом пятне крови. Участки фильтровальной бумаги инкубировались с реакционным коктейлем, содержащим субстраты для лизосомных ферментов (S), внутренние стандарты (IS) и буфер с поддержанием реакционной pH.

### **Подготовка проб к анализу**

К сухим пятнам крови диаметром 3,2 мм, добавлялось по 45 мкл б-плексного коктейля, содержащего мультиплексную смесь из S, IS и буферного раствора. В 10 мл коктейля содержалось 200 μM GAA-S, 2.0 μM GAA-IS, 1000 μM GLA-S, 2 μM GLA-IS, 500 μM IDUA-S, 3.5 μM IDUA-IS, 100 μM ASM-S, 1.8 μM ASM-IS, 300 μM GALC-S, 1.9 μM GALC-IS; 200 μM ABG-S, 3.9 μM ABG-IS. Инкубационный буфер включал (0,1 М буферный раствор формиата аммония (pH 4,4)), акарбозу (8 мкмоль/л) и таурохолат натрия (9,6 г/л). Акарбоза обеспечивала ингибирование мальтазы-глюкоамилазы и сохранение активности GAA.

Планшет инкубировали при 37°C, при скорости вращения 500 об/мин, 18 – 20 часов с использованием планшетного шейкер-инкубатора Elmi ST-3L. После инкубации в каждую лунку добавлялось 100 мкл органического раствора (этилацетат: метанол 1:1) для остановки реакции. Образцы были перенесены в новый планшет.

Жидкостная экстракция проводилась путем добавления 400 мкл этилацетата и 300 мкл деионизованной воды с последующим центрифугированием 5 минут при скорости вращения 4000 об/мин. Содержимое ячеек планшета разделялось в результате центрифугирования на верхний органический слой и нижний водный слой. Далее 300 мкл органического слоя переносилось в новый планшет и высушивалось под потоком азота при 40°C. Высушенный осадок растворяли в растворе ацетонитрил:метанол:деионизованная вода (40%:40%:20%), с содержанием 0,2% муравьиной кислоты. Планшет устанавливался в систему

высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu LC-20 Prominence. Разделение проводилось на колонке Hypersil GOLD C18 (30 мм\*2.1 мм, 5 мкм) в линейном режиме градиента. Для разделения продуктов реакции и внутренних стандартов использовалась следующая программа градиента: изначально 5% подвижной фазы А; 0,5 мин 100% А; 2,5 мин 100% А; 2,51 мин 5% А; 4 мин 5% А. Масс-спектрометрический анализ проводился на тандемном масс-спектрометре API 3200 QTrap (ABSciex, США) в режиме мониторинга множественных реакций (англ.: multiple reaction monitoring - MRM), параметры представлены в таблице 5, хроматограмма, демонстрирующая время задержки и пики для продуктов (P) и внутренних стандартов (IS) 6 лизосомальных ферментов представлена на рисунке 18.

Таблица 5 – Параметры для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для оценки активности лизосомных ферментов

Параметры жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)		Параметры тандемной масс-спектрометрии (МС/МС)	
Колонка	Hypersil GOLD C18 (30 мм, 2.1 мм, 5 мкм)	Соединение	MRM переход ( $m/z$ )
Температура колонки	60 °С	GAA-P	498.30 → 398.24
Подвижная фаза А	Ацетонитрил:метанол (1:1) + 0.2% Муравьиная кислота	GAA-IS	503.33 → 403.28
Подвижная фаза Б	Деионизированная вода + 0.1% Муравьиная кислота	GLA-P	484.28 → 384.23
Скорость потока	600 мкл/мин	GLA-IS	489.31 → 389.26
Вводимый объем	10 мкл	IDUA-P	391.19 → 291.13
Время анализа	4 мин.	IDUA-IS	377.17 → 277.12

*Окончание таблицы 5*

		ABG-P	482.40 → 264.20
		ABG-IS	510.50 → 264.20

		ASM-P	398.25 → 264.20
		ASM-IS	370.30 → 264.20
		GALC-P	426.30 → 264.20
		GALC-IS	454.40 → 264.20

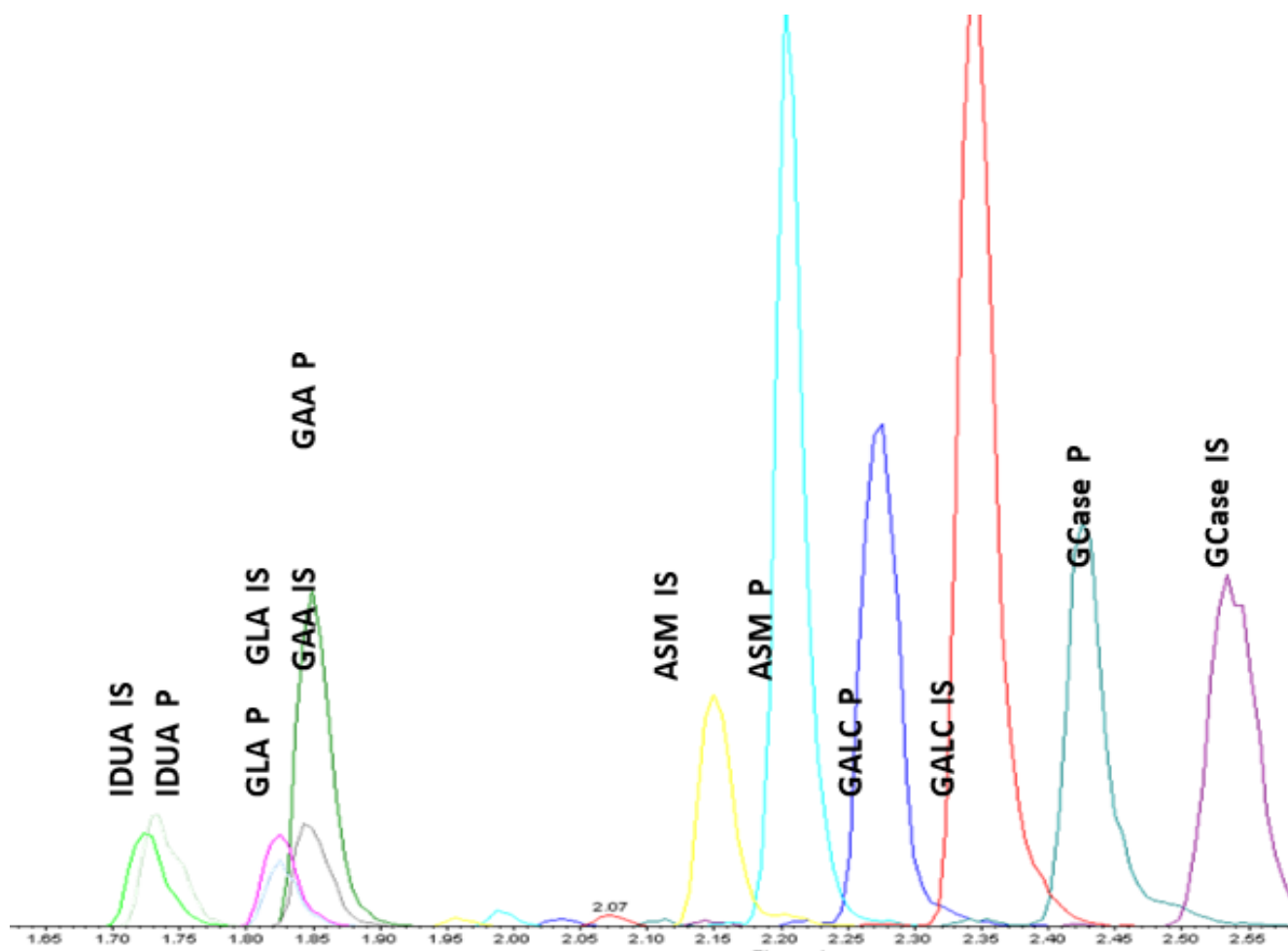


Рисунок 18 – Хроматограмма, демонстрирующая время задержки и пики для продуктов (P) и внутренних стандартов (IS) 6 лизосомальных ферментов

### Расчет активности ферментов

Расчет активности проводили исходя из предположения, что количество полученного продукта прямо пропорционально активности ферментов лизосом в сухом пятне крови. GCaase гидролизировала C12- глюкоцереброзид субстрата (S) для получения C12-церамида (P) и глюкозы. МС/МС измеряли относительные количественные показатели P и внутреннего стандарта C14-церамида (IS). Известное количество IS и измеренное амплитудное отношение P к IS



использовалось для расчета определенного параметра P, который затем применяется для расчета активности GCase в образце. Количество продукта, образующегося в ходе ферментативной реакции, определяли с использованием отношения площади пика продукта (P) к площади пика внутреннего стандарта (P/IS). Активность фермента ( $A_e$ ) в единицах мкмоль/ч\*л рассчитывали из количества продукта при условии, что образец сухого пятна крови диаметром 3,2 мм содержит 3,1 мкл крови. Расчет основан на следующей формуле:

$$A_e = ((P/IS) \times [IS] \times V_{IS}) / (3.1 \times t_i)$$

$V_{IS}$  – концентрация внутреннего стандарта, мкмоль,  $t_i$  – время инкубации. IS- внутренний стандарт, P-продукт. В качестве контроля были использованы образцы с известным уровнем активности ферментов, полученных из центра по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), которые включались в каждый планшет.

### 2.7.2 Измерение концентрации лизосфинголипидов

Концентрацию лизосфинголипидов (гексазилсфингозина (HexSph) (смесь гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph)) оценивали совместно с концентрацией лизосфингомиелина (LysoSM), лизоглоботриаозилсфингозина (LysoGb3), лизосфингомиелина-509 (LysoSM-509)) по ранее опубликованному протоколу (с модификациями) [Polo et al.,2017], в частности, измерение проводили в сухом пятне крови диаметром 3,2 мм, в качестве внутреннего стандарта использовался лизолактозилсфингозин (LysoLC).

В нашем исследовании предметом интереса являлась оценка концентрации HexSph (GlcSph+GalSph). Как упоминалось выше, GlcSph и GalSph являются эписимерами (рис. 11). Для хроматографического разделения GlcSph и GalSph требуется проведение дополнительного исследования с использованием специальной колонки для хроматографии гидрофильных взаимодействий.

Концентрация лизосфинголипидов оценивалась в четырёх группах: GBA-БП (N = 19), сБП (N = 67), в контрольной группе (N = 47) и у пациентов с БГ (N=32).

Лизосфинголипиды экстрагировали из сухих пятен крови путем добавления 100 мкл экстракционного растворителя (80% метанола, 15% ацетонитрила и 5% воды), содержащего 10 нг/мл IS (LysoLC), с последующей инкубацией в течение 60 мин (при 30°C, 650 об/мин).

Экстрагированные лизосфинголипиды переносили в новый 96-луночный планшет. ВЭЖХ-МС/МС система состояла из ВЭЖХ Shimadzu Nexera и масс-спектрометра API-5500 QTrap. Разделение метаболитов проводилось на колонке Phenomenex Fusion-RP 4 мкм 2.1x50 мм в линейном режиме градиента. Для разделения метаболитов и внутреннего стандарта использовалась следующая программа градиента: изначально 20% мобильной фазы В; 2,4 мин. 100% В; 3,3 мин. 100% В; 3,31 мин. 20% В; 4 мин. 20% В. Параметры ВЭЖХ с МС/МС для определения концентрации лизосфинголипидов приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Параметры для проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) для оценки концентрации лизосфинголипидов

Параметры жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)		Параметры тандемной масс-спектрометрии (МС/МС)		
Колонка	Phenomenex Fusion-RP 4 мкм 2.1x50 мм	Соединение	MRM Переход (m/z)	Время удерживания
Температура колонки	50 °C	HexSph (GlcSph+GalSph)	462.2 > 282.4	1.85
Жидкая фаза А	Деионизированная вода + 0.1% Муравьиная кислота	LysoSM	465.4 > 184.1	1.84
Жидкая фаза Б	Ацетонитрил:метанол (1:1) + 0.2%, Муравьиная кислота	LysoGb3	786.5 > 282.4	1.80

Окончание таблицы 6

Скорость потока	0.4 мл/мин	LysoSM-509	509.5 > 184.1	2.63
Вводимый объем	10 мкл	IS (LysoLC)	624.5 > 282.4	1.82
Температура автосамллера	10 °С			
Длительность	4 мин.			

### Калибровочная кривая и контроль качества

GlcSph использовался в качестве стандарта для построения калибровочной кривой, измерение проводили при добавлении различных концентраций данного соединения в образцы крови здоровых добровольцев с дальнейшим их нанесением на фильтр (рис. 19).

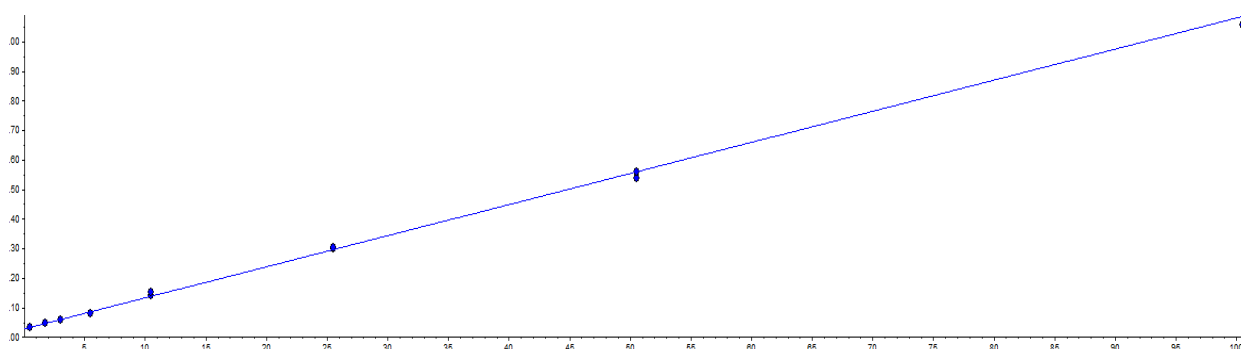


Рисунок 19 – Калибровочная кривая для оценки концентрации HexSph, отражающая зависимость (отношения площади под пиком аналита и площади под пиком внутреннего стандарта к отношению концентрации аналита и концентрации внутреннего стандарта)

## 2.8 Статистическая обработка данных

Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи программы SPSS 21 с использованием теста непараметрических критериев

Манна-Уитни (при сравнении двух независимых выборок) и критерия Краскала-Уоллиса (для оценки значимости различий в трёх и более независимых группах), а также методом Холма. Корреляционный анализ проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ . Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение, ошибка среднего, медиана с расчётом верхнего и нижнего квартилей.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1 Идентификация мутаций и полиморфных вариантов в гене *GBA*

Был проведен скрининг мутаций в гене *GBA* у пациентов с БП. В исследование было включено 2 мажорные мутации L444P и N370S и два полиморфных варианта E326K и T369M гена *GBA*. По итогам проведенного скрининга было выявлено 13 пациентов с мутациями в гене *GBA* (9 – с L444P, 4 – с N370S), 29 пациентов с полиморфными вариантами гена *GBA* (14 – с E326K и 15 – с T369M). Все мутации были обнаружены в гетерозиготном состоянии. Частоты носителей мутаций и полиморфных вариантов отражены в таблице 7. Общая частота нуклеотидных замен среди пациентов с БП составила 6,6%. Частота мутаций L444P и N370S составила 1,7%, частота полиморфных вариантов E326K и T369M составила 4,9%.

Таблица 7 – Частота нуклеотидных замен в гене *GBA* среди пациентов с БП

Мутации в гене <i>GBA</i>	Нуклеотидная замена, rs	Кол-во пациентов с БП, включенных в исследование	Мутации, N (%)
N370S	c.1226A>G, rs76763715	762	4 (0.5)
L444P	c.1448T>C, rs35095275	762	9 (1.2)
Полиморфные варианты в гене <i>GBA</i>	Нуклеотидная замена, rs	Кол-во пациентов с БП, включенных в исследование	Мутации, N (%)
E326K	c.1093G>A, rs2230288	591	14 (2.4)
T369M	c.1223T> C, rs75548401	592	15 (2.5)

### 3.2 Особенности клинического течения у пациентов с GBA-БП

Собраны клинические данные 13 пациентов с мутациями (L444P, N370S) и 21 пациента с полиморфными вариантами (E326K, T369M) гена *GBA*. Пациенты с мутациями в гене *GBA* характеризовались более ранним началом заболевания ( $55,7 \pm 11,5$  лет) по сравнению с пациентами со сБП ( $63,1 \pm 10,5$  лет) ( $p=0,044$ ). В группе пациентов с полиморфными вариантами гена *GBA* была отмечена более высокая средняя эквивалентная доза леводопы, однако различия между группами не достигли статистической значимости ( $p=0,051$ ) (табл. 8).

В расширенное клиническое исследование, с использованием шкал для оценки моторных, когнитивных, эмоциональных, психотических и вегетативных расстройств, были включены 14 пациентов с GBA-БП, которые дали согласие на повторное посещение клиники, 7 пациентов с мутациями (6 - с L444P, 1- с N370S), 7 пациентов с полиморфными вариантами (3 – с T369M, 4 - с E326K) и 33 пациента со сБП. В выбранных группах пациентов не было выявлено статистически значимых отличий в возрасте, поле, стадии БП. Один пациент, у которого было выявлено сочетание мутации G2019S гена *LRRK2* и полиморфного варианта E326K, был исключен из исследования. В дальнейшем группа пациентов с выявленными вариантами гена *GBA* (GBA-БП) была разделена на две подгруппы – носители мутаций (N370S, L444P) – mGBA-БП и носители полиморфных вариантов (E326K, T369M) – pGBA-БП.

Таблица 8 – Демографические данные и клинические характеристики пациентов

Характеристики пациентов с БП	mGBA-БП (n=13)	pGBA-БП (n=21)	сБП (n=33)
Мужчины/женщины, чел (%)	6(46,2)/7(53,8)	10(52,7)/12(47,4)	15(45,5)/18(54,5)
Возраст на момент осмотра, годы, Медиана (мин-макс)	64,0 (42-80)	65,2 (56-74)	68,0 (52-80)

## Окончание таблицы 8

Возраст начала заболевания, годы, Медиана (мин-макс)	60,0 (46-77) p=0,044*	65,0 (54-69)	63,0(33-78)
Длительность заболевания, годы, Медиана (мин-макс)	12 (3-18)	4 (1-9)	4 (1-20)
Средняя эквивалентная доза леводопы, мг, Медиана (мин-макс)	816 (160-1163)	849,5(541-1300)	460,5 (120-981)

\*По сравнению со сБП.

Общая группа пациентов с GBA-БП и группа со сБП не отличались по тяжести моторных симптомов (по данным UPDRS-III, а также по частоте развития и тяжести осложнений по данным UPDRS-IV). Были выявлены статистически значимые различия по I части шкалы UPDRS при сравнении группы пациентов с рGBA-БП и общей группы GBA-БП со сБП (p=0,005 и p=0,013) соответственно (табл. 9).

Таблица 9 – Оценка по шкале UPDRS и шкале Хен и Яра

Шкала, баллы, медиана (мин-макс)	mGBA-БП (n=7)	pGBA-БП (n=7)	GBA-БП (n=14)	сБП (n=33)
UPDRS I	14,5 (4-24)	18,5 (12-25) p=0,005*	16,6 (4-25) p=0,013*	10 (3-25)
UPDRS II	11,5 (5-15)	13,5 (7-27)	12 (5-27)	10,5 (0-33)
UPDRS III	34 (6-48)	36,5 (31-56)	35,5 (6-56)	28,0 (3-62)
UPDRS IV	0 (0-12)	2 (0-12)	2 (0-12)	0 (0-12)
UPDRS, общий балл	67,5 (32-71)	71 (63-106) p=0,033*	69,5 (32-106) p=0,04*	48,5 (22-115)
Хен-Яра	2,5 (1-4)	2,5 (2-4)	2,75 (1-4)	2 (1-4)

\*По сравнению со сБП.

При оценке когнитивных функций по данным шкал MoCA, FAB средний балл при сравнении всех исследуемых групп не отличался. Результаты обследования по шкале MMSE выявили более низкие показатели в группе с mGBA-БП (p=0,022) и общей группе GBA-БП (p=0,033) по сравнению со сБП

(табл. 10). Зрительно-пространственные расстройства по результатам первых заданий теста МоСА в общей группе с ГВА-БП встречались чаще ( $p=0,044$ ), по сравнению со сБП.

Таблица 10 – Результаты оценки когнитивных функций

Шкала, баллы, медиана (мин-макс)	mGBA- БП(n=7)	pGBA- БП(n= 7)	GBA- БП(n=14)	сБП(n=33)
МоСА	23 (19-26)	22,5 (21-28)	22,5 (19-28)	25 (13-30)
MMSE	24,0 (21-27) $p=0,022^*$	25,5 (24-30)	24,5 (21-30) $p=0,033^*$	27,5 (18-30)
FAB	17 (9-17)	15,0 (14-17)	16,5 (9-17)	16,5 (10-18)

\*По сравнению со сБП.

Анализ результатов нейропсихологического тестирования по шкалам выявил более выраженное развитие тревожных расстройств по данным HADS «А», для общей группы ГВА-БП ( $p=0,001$ ), для группы с mGBA-БП ( $p=0,003$ ) и для группы с pGBA-БП ( $p=0,022$ ) по сравнению со сБП. Большой балл выявлен по данным ShARS при сравнении с сБП ( $p=0,001$ ) как для группы ГВА-БП, так и для mGBA-БП.

При сравнении по NPI в общей группе пациентов с ГВА-БП и в группе пациентов с pGBA-БП при сравнении со сБП получен больший общий балл ( $p=0,005$  и  $p=0,012$ ) соответственно. При оценке проявлений депрессии по BDI итоговая сумма баллов была больше в группе pGBA-БП по сравнению со сБП ( $p=0,043$ ). При оценке проявлений депрессии по HADS «D» выявлен более высокий балл в группе pGBA-БП по сравнению со сБП ( $p=0,005$ ). По результатам исследования депрессии по шкале GDS-SF не выявлено достоверных различий (табл. 11).



Таблица 11 – Оценка нейропсихологического статуса

Шкала, баллы, медиана (мин- макс)	mGBA-БП (n=7)	pGBA-БП (n= 7)	GBA-БП (n=14)	сБП (n=33)
NPI	18,5 (4-21)	21 (15-30) p=0,012*	20 (4-30) p=0,005*	9,5 (0-38)
ShARS	35 (20-45) p=0,001*	27,5 (11-66)	32,0 (11-66) p=0,001*	18,5 (1-38)
HADS «А»	10,5 (3-15) p=0,003*	9 (5-11) p=0,022*	9,5 (3-15) p=0,001*	5 (0-10)
HADS «D»	6,5 (3-8)	11 (7-15) p=0,005*	7,5 (3-15)	6,5 (2-14)
BDI	11,5 (5-15)	21,0 (8-25) p=0,043*	13,5 (5-25)	12,5 (2-26)
GDS-SF	5,0 (4-13)	8,0 (4-12)	7,5 (4-13)	6,5 (0-13)

\*По сравнению со сБП.

При оценке результатов опросника RBDSQ для оценки нарушений фазы с БДГ статистически значимой разницы выявлено не было. Качество жизни пациентов, оцениваемое по EQ-5D, в общей группе пациентов с GBA-БП и пациентов с pGBA-БП было более низким по сравнению с группой со сБП (p=0,007 и p=0,006 соответственно). Выраженность немоторных симптомов по результатам опросника PD-NMS оказалась большей у пациентов из общей группы GBA-БП и у пациентов с pGBA-БП (p=0,043) по сравнению со сБП (табл. 12).

Таблица 12 – Оценка качества жизни и немоторных симптомов

Шкала, баллы, медиана (мин-макс)	mGBA-БП (n=7)	pGBA-БП (n= 7)	GBA-БП (n=14)	сБП (n=33)
EQ-5D	10,5 (8-12)	13 (9-15) p=0,006*	11 (8-15) p=0,007*	9 (4-14)
RBDSQ	5,5 (2-8)	6 (2-10)	5,5 (2-10)	4,5 (1-11)
PD NMS	15 (2-25)	17,6 (13-18) p=0,007*	16,5 (2-25) p=0,014*	11 (1-23)

\*По сравнению со сБП.

### 3.3 Активность глюкоцереброзидазы у пациентов с GBA-БП

Оценку ферментативной активности GCase проводили у 26 пациентов с GBA-БП, 84 пациентов со сБП, 47 пациентов с БГ и 71 субъекта контрольной группы. Активность оценивалась в сухом пятне крови с помощью анализа на основе ВЭЖХ-МС/МС.

Активность GCase была ниже у пациентов с GBA-БП по сравнению с индивидуумами контрольной группы ( $p=0,01$ ), а также по сравнению с пациентами со сБП ( $p=0,002$ ) (табл. 13). Наиболее значительное снижение активности GCase было обнаружено у носителей мутаций *GBA* (L444P, N370S) по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,001$ ) и пациентами со сБП ( $p < 0,0001$ ) (рис. 20). У носителей полиморфных вариантов *GBA* (E326K, T369M), ассоциированных с развитием БП, но не БГ, ферментативная активность GCase статистически значимо не отличалась по сравнению с активностью GCase у пациентов со сБП и в контрольной группе. Как и ожидалось, у пациентов с БГ была самая низкая активность GCase. У пациентов с БП и мутациями L444P, N370S было выявлено снижение медианы активности GCase на 50,4% по сравнению со сБП (рис. 20). Активность GCase была снижена у пациентов с БП и мутациями N370S и L444P по сравнению с носителями полиморфных вариантов

Е326К или Т369М ( $p=0,009$ ). Стоит отметить, что активность GCase была снижена у носителей неблагоприятной мутации L444Р ( $n = 5$ ; 4,15 (1,76-7,74)) по сравнению с носителями благоприятной мутации N370S ( $n = 7$ ; 4,75 (1,72-12,18)), однако различия не достигли статистически значимой разницы. Не было выявлено различий в активности GCase между пациентами со сБП и контрольной группой (табл. 13).

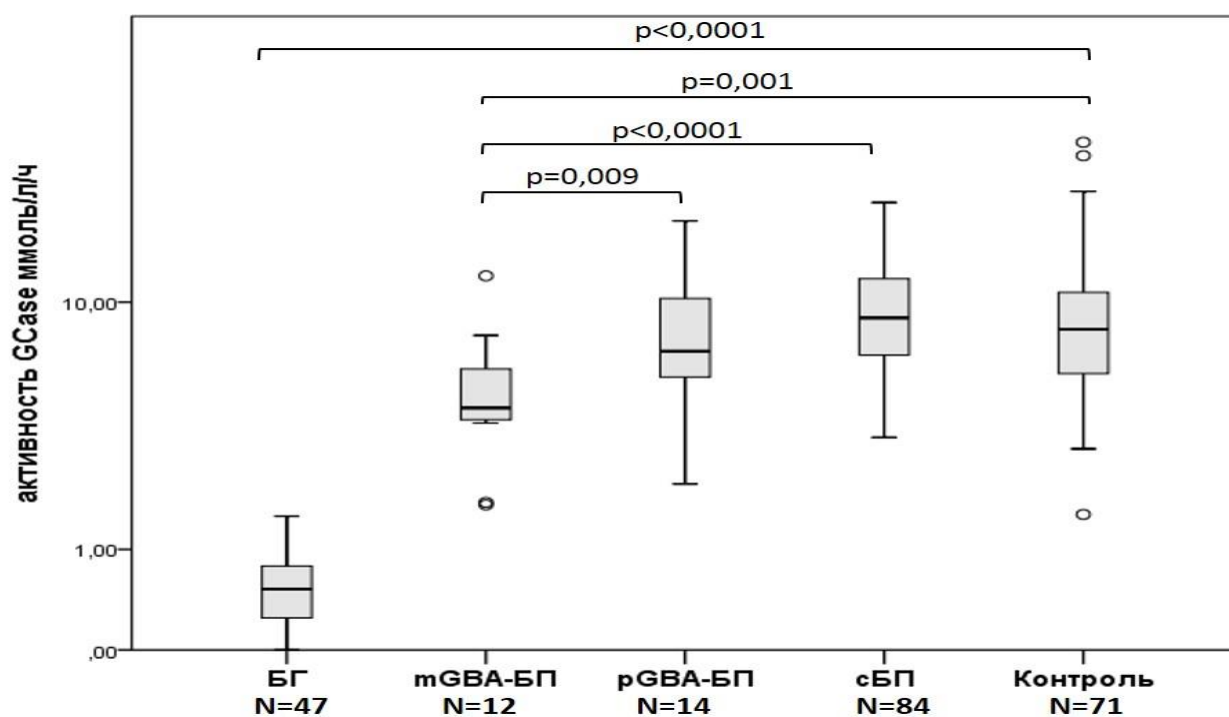


Рисунок 20 – Активность GCase, ммоль/л/ч, измеренная в сухом пятне крови в группах сравнения

Таблица 13 – Ферментативная активность GCase

Ферментативная активность глюкоцереброзидазы (GCase) (ммоль/л/ч), медиана (мин-макс), $p^*$			
Болезнь Гоше N=47	GBA-БП N=26	сБП N=84	Группа контроля N=71
0,45 (0,00-1,51), $p < 0,0001$	5,58 (1,72-18,24), $p = 0,01$	8,87 (3,32-20,87),	8,12 (1,54-32,12)

\* По сравнению с контрольной группой.

### 3.4 Оценка концентрации лизосфинголипидов у пациентов с GBA-БП

В рамках исследования было произведена оценка уровня HexSph в сухом пятне крови методом ВЭЖХ-МС/МС у 32 пациентов с БГ, 23 пациентов с GBA-БП, 105 пациентов со сБП и у 88 субъектов контрольной группы. Как было отмечено выше, HexSph является смесью галактозилсфингозина (GalSph) и глюкозилсфингозина (GlcSph), совместное измерение проводилось по техническим причинам, описанным в материалах и методах. Результаты измерения HexSph представлены в таблице 14.

Как и ожидалось, у пациентов с БГ наблюдалось значительное увеличение концентрации HexSph (рис. 21). В то же время, было обнаружено повышение концентрации HexSph в группе GBA-БП (1,08 нг/мл (0,59-3,18)) по сравнению со сБП (0,92 нг/мл (0,15-1,83)) и контрольной группой (0,86 нг/мл (0,12-2,51)) ( $p=0,001$  и  $p<0,0001$ ) соответственно. Концентрация HexSph в группе сБП не отличалась от концентрации в контрольной группе ( $p=0,085$ ). При сравнении отдельно пациентов с БП и мутациями *GBA* (N370S, L444P) наблюдалось статистически значимое увеличение концентрации HexSph (1,34 нг/мл (0,76-2,01)) по сравнению с контрольной группой ( $p<0,0001$ ) и сБП ( $p=0,001$ ) (рис. 21). Концентрация HexSph крови у пациентов с полиморфными вариантами *GBA* также была выше по сравнению с контрольной группой ( $p=0,044$ ), но не со сБП ( $p=0,196$ ), при применении критерия Холма достоверность сохранялась для всех групп.

Таблица 14 – Концентрация лизосфинголипидов в сухих пятнах крови

Концентрация лизосфинголипидов (HexSph (GlcSph+GalSph)) в крови, медиана (мин-макс), нг/мл, p*			
болезнь Гоше	GBA-БП	сБП	Группа контроля
N= 32	N=23	N=105	N=88

Окончание таблицы 14

125,33 (18,28-306,7025), p<0,0001	1,08 (0,59-3,18), p<0,0001	0,92 (0,15-1,83), p=0,085	0,86 (0,12-2,51)
--------------------------------------	-------------------------------	------------------------------	------------------

\* По сравнению с контрольной группой.

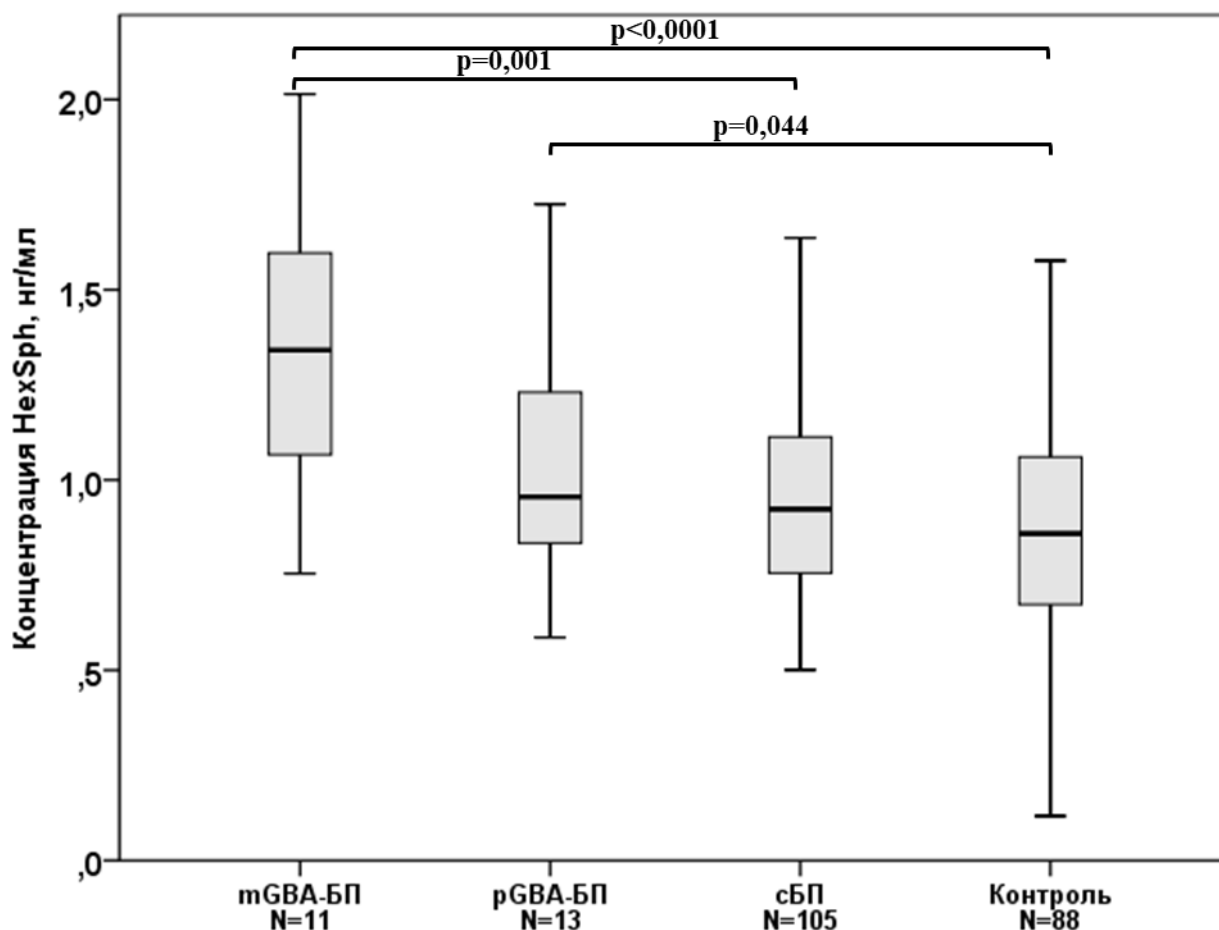


Рисунок 21 – Концентрация HexSph, нг/мл в исследуемых группах

### 3.5 Концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови пациентов с ГВА-БП

Концентрация олигомерного альфа-синуклеина оценивалась с помощью ИФА в трех группах: ГВА-БП (N = 22), сБП (N = 23) и в контрольной группе (N = 27). Данные группы не отличались по полу и возрасту. Результаты измерения

представлены в таблице 15 совместно с активностью GCase. Концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме была выше у пациентов с GBA-БП, по сравнению с пациентами со сБП ( $p = 0,002$ ) и группой контроля ( $p < 0,0001$ ) (табл. 15, рис. 22). Концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме была увеличена у пациентов с БП и мутациями (L444P, N370S), а также у пациентов с БП с полиморфными вариантами *GBA* (E326K, T369M) по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,008$ ,  $p = 0,02$  соответственно). Концентрация олигомеров альфа-синуклеина в плазме была выше у пациентов с GBA-БП по сравнению со сБП, однако наиболее высокая концентрация была у пациентов с БП и мутациями L444P, N370S.

Таблица 15 – Активность GCase и концентрация олигомерного альфа-синуклеина у пациентов с GBA-БП по сравнению со сБП

Группы	Активность GCase (медиана, мин-макс) ммоль/л/ч	Кол-во, N	p (по сравнению со сБП)	Олигомерный альфа-синуклеин в плазме (медиана, мин-макс), пг/мл	Кол-во, N	p (по сравнению со сБП)
L444P, N370S	4,31 (1,72-12,18)	12	<0,0001	5,3(1,38-2518,81)	11	0,008
E326K, T369M	6,84 (2,14-18,25)	14	0,54	3,50(0,95-623,22)	11	0,02
сБП	8,87 (3,32-20,87)	84	-	0,85(0,32-47,12)	23	-

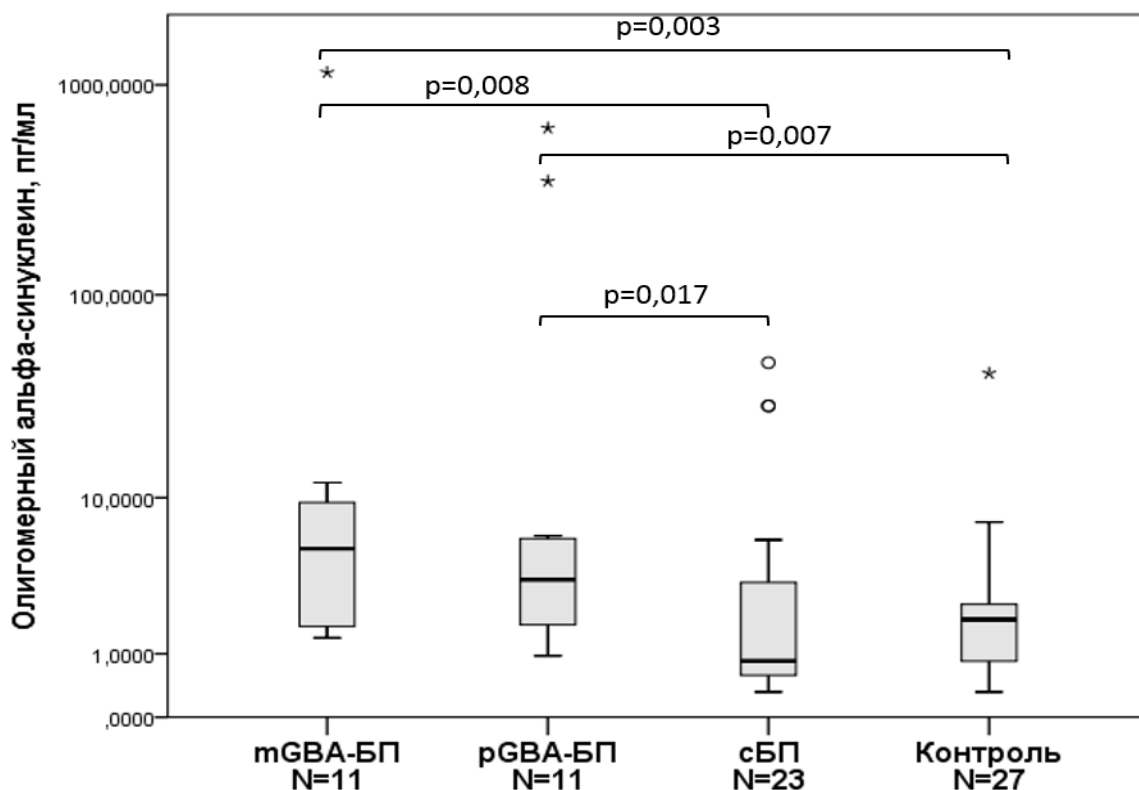


Рисунок 22 – Концентрация олигомерного альфа-синуклеина (пг/мл) в плазме крови в исследуемых группах

У двух пациентов с мутациями в гене *GBA* концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови оценивалась несколько раз в течение нескольких лет (табл. 16). Интересно, что концентрация олигомерного альфа-синуклеина плазмы оказалась относительно стабильна при повторных измерениях. Так, пациент С, с относительно низкой концентрацией альфа-синуклеина, к 77 годам стабилен клинически. Пациент А, 61 года, с высокой концентрацией альфа-синуклеина, с 2013 года бесконтрольно употреблял препараты леводопы в течение двух лет, с развитием осложнений в виде дискенизий «пика дозы», флуктуациями в виде феномена «включения и выключения», также у пациента развились аффективные нарушения (астено-депрессивный синдром), психотические нарушения (зрительные галлюцинации), когнитивные нарушения.

Таблица 16 – Концентрация олигомерного альфа-синуклеина плазмы у двух пациентов с GBA-БП в течение нескольких лет

	Мутации гена <i>GBA</i>	Леводопа, мг (2016 год)	Возраст начала, лет	Возраст, лет	Олигомеры альфа синуклеина, пг/мл 2012	Олигомеры альфа синуклеина, пг/мл 2013	Олигомеры альфа синуклеина, пг/мл 2015
Пациент С (PDM46)	N370S	375	60	77	-	5,6	1,8
Пациент А (PD110)	L444P	500	45	55	518 (без леводопы)	556 (без леводопы)	1145

Нами не было выявлено различий в концентрации олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови между пациентами со сБП и контрольной группой. При проведении корреляционного анализа между активностью лизосомальных гидролаз и концентрацией альфа-синуклеина плазмы у пациентов с GBA-БП, сБП и контрольной группой с использованием коэффициента Спирмена не обнаружено корреляции (рис. 23). Также не было выявлено ассоциации между уровнем альфа-синуклеина и типом мутации гена *GBA*.

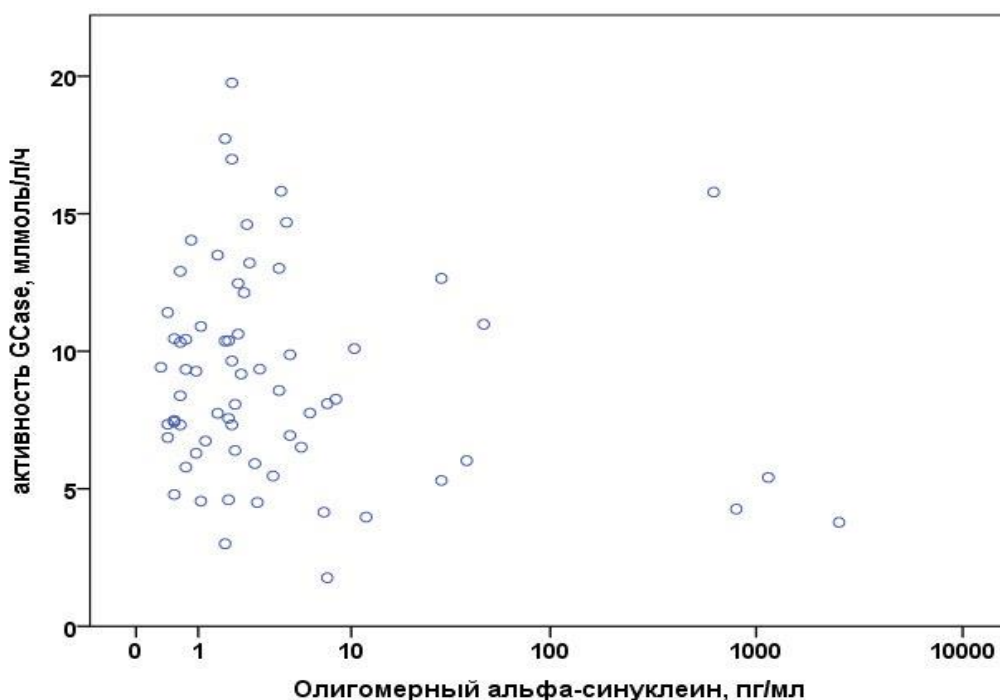


Рисунок 23 – Корреляционный анализ активности GCase, ммоль/л/ч и концентрации альфа-синуклеина, пг/мл



### 3.6 Концентрация цитокинов в плазме крови пациентов с ГВА-БП

Проведено исследование концентрации ряда цитокинов в плазме крови (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН-гамма и ФНО-альфа) в группе пациентов с ГВА-БП (N=18), сБП (N=23) и контрольной группе (N=29).

В группе пациентов с ГВА-БП показано повышение концентрации цитокинов ИЛ-1бета ( $p < 0,001$ ), ИЛ-10 ( $p = 0,004$ ), а также ФНО-альфа ( $p < 0,0001$ ) по сравнению с группой контроля. Интересно отметить, что концентрации ИЛ-1бета, ФНО-альфа были повышены в группе ГВА-БП и по сравнению с пациентами со сБП ( $p < 0,01$ ) и ( $p < 0,0001$ ) (табл. 17).

Таблица 17 – Уровень цитокинов в плазме крови

Цитокины	Уровень цитокинов (пг/мл), медиана (мин-макс), p*		
	сБП (N=23)	Контроль (N=29)	ГВА-БП (N=18)
ИЛ-1бета	0,64 (0,05-3,33), $p < 0,01$	0,61 (0,03-1,92), $p < 0,001$	1,57 (0,38-3,11)
ИЛ-6	1,53 (0,36-6,02)	2,07 (0,24-24,09)	1,58 (0,62-5,91)
ИЛ-10	4,03 (0,1-12,29)	3,58 (0,28-15,63), $p = 0,004$	5,59 (2,43-15,39)
ИФН-гамма	7,66 (0,37-18,57)	2,12 (0,05-19,85)	4,17 (1,34-21,11)
ФНО-альфа	0,39 (0,02-1,03), $p < 0,0001$	0,39 (0,01-1,11), $p < 0,0001$	1,27 (0,01-2,67)

\* По сравнению с группой ГВА-БП.

Для всех пациентов с БП (сБП и ГВА-БП) была обнаружена корреляция между концентрацией ФНО-альфа и суммой баллов по шкале PD-NMS, отражающей выраженность немоторных симптомов  $r = 0,4$  ( $p = 0,02$ ).

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данного исследования проведено обследование пациентов с БП, являющихся носителями мутаций и полиморфных вариантов в гене *GBA*, с использованием генетических, биохимических и клинических методов.

Осуществлен скрининг мажорных мутаций (L444P, N370S) и полиморфных вариантов (T369M, E326K) в гене *GBA* среди пациентов с БП, с выявлением репрезентативной группы пациентов с данными заменами, оценкой клинических особенностей течения болезни у данной группы пациентов, определением активности лизосомных ферментов, концентрации лизосфинголипидов, олигомерного альфа-синуклеина и цитокинов.

Мутации в гене *GBA* являются фактором высокого риска развития БП. Частота мутаций в гене *GBA* значительно варьирует в популяционных исследованиях. В нашем исследовании частота скринируемых мутаций L444P и N370S в гене *GBA* составила 1,7% у пациентов с БП, суммарная частота скринируемых мутаций и полиморфных вариантов в гене *GBA* - 6.6% (см. табл. 7). Наши результаты соответствуют данным полученным ранее в исследовании на сербской популяции (6.7%) [Kresojević et al., 2015]. Интересно отметить, что вариация частот мажорных мутаций присутствует даже в пределах разных регионов одной страны: на шведской популяции в мультицентровом исследовании было показано, что частота мутации L444P в северной Швеции была 4,11%, в то время как в Стокгольме частота составила 0,79% [Ran et al., 2016]. При оценке частот в венгерской популяции была обнаружена только мутация L444P с частотой 2,4% при отсутствии в выборке пациентов с мутацией N370S [Török et al., 2016]. Частота мутации N370S среди пациентов с БП в нашем исследовании составила 0,5 %, L444P- 1,2%. В бельгийской популяции общая частота мутаций в гене *GBA* также была 4,5% [Crosiers et al., 2016]. В британской популяции частота мутаций в гене *GBA* составила 4,18% [Neumann et al., 2009].

По данным метаанализа частота всех мутаций в гене *GBA* у пациентов с БП в азиатской популяции составила 3.64%, в частности в китайской популяции 2,14%. Следует отметить, что риск развития БП в азиатской популяции был показан только для мутации L444P, для азиатского региона характерна низкая частота мутации N370S [Chen et al., 2014].

По данным метаанализа в европейской популяции частота мутаций в гене *GBA* у пациентов с БП составила 5,48% [Zhao et al., 2016]. Не было обнаружено статистических отличий между частотами, полученными нами при скрининге мажорных мутаций, и результатами метаанализа (табл. 18). Ранее было показано [Emelyanov et al., 2011], что мутации L444P или N370S гена *GBA* ассоциированы с повышенным риском развития БП ОШ=6,7 в России. Также было показано, что у носителей мутации L444P гена *GBA* значительно увеличен риск развития БП с ранним началом (до 50 лет) ОШ=14,9.

Таблица 18 – Сравнение частоты мажорных мутаций в гене *GBA* по нашим данным с частотой в европейской популяции по данным метаанализа [Zhao et al., 2016]

Мутации в гене <i>GBA</i>	Северо-Западный регион РФ	Метаанализ на европейской популяции	Хи-квадрат с поправкой Йетса, p
N370S	4/762	93/7555	2,41, p=0,12
L444P	9/762	68/7487	0,32, p=0,56

Частота полиморфных вариантов также значительно варьирует в разных популяциях. В нашем исследовании суммарная частота полиморфных вариантов E326K и T369M составила 4,9%, с практически одинаковой частотой для E326K 2,4% и T369M 2,5% (см. табл. 7). В канадской популяции была показана высокая частота полиморфного варианта T369M среди пациентов с БП 4,89%, частота полиморфного варианта E326K составила 1,78%. [Han et al., 2015]. В

исследовании, проведенном на канадской популяции, показана наибольшая частота аллеля T369M среди всех мировых популяций. В метаанализе частота аллеля T369M в различных популяциях составила 1,1% (112/9728) [Mallett et al., 2016].

На выявленной нами группе пациентов с мутациями (N370S, L444P) и полиморфными вариантами (E326K, T369M) гена *GBA* проведено исследование особенностей клинического течения БП. Нами показано более раннее начало заболевания по сравнению со сБП у пациентов с мутациями, но не с полиморфными вариантами гена *GBA*, что соответствует полученным ранее данным [Mata et al., 2015]. Данные результаты, вероятно, обусловлены большим снижением ферментативной активности глюкоцереброзидазы у пациентов с мутациями, что патогенетически, вероятно, приводит к более активному накоплению альфа-синуклеина и соответственно более раннему началу заболевания. Как было упомянуто выше, помимо возраста начала GBA-БП может характеризоваться рядом других клинических особенностей. Так, в работе Ганькиной и соавторов [Ганькина и др., 2016] у пациентов с мутациями в гене *GBA* по сравнению со сБП была выявлена более низкая сумма баллов по шкале UPDRS и по подшкале UPDRS III, отражающей состояние моторных функций у пациентов с 3-ей стадией по шкале Хен и Яра. В одном из проспективных исследований также продемонстрированы подобные различия [Brockmann et al., 2014]. В отличие от данных работ, нами не было выявлено значимой разницы в выраженности моторных проявлений БП между группой GBA-БП и группой со сБП (см. табл. 9). Также различия в выраженности моторной симптоматики не были выявлены и в другой работе [Alcalay et al., 2012]. Таким образом, данные по выраженности моторных проявлений у пациентов с GBA-БП являются противоречивыми и требуют дальнейшего изучения.

Важными аспектами клинической характеристики GBA-БП являются особенности нейропсихологического профиля. При всей значимости данного компонента клинической картины БП, он менее других освещен в литературе. Для оценки психического статуса пациентов с БП используется большое число шкал,

однако нет достоверных данных о преимуществах той или иной шкалы. Для оценки развития депрессии в большинстве публикаций использовали шкалу BDI [Alcalay et al., 2012; Brockmann et al., 2011; Beavan et al., 2015; Winder-Rhodes et al., 2013]. В других публикациях использовали шкалу депрессии Гамильтона [Kumar et al., 2012; Malec-Litwinowicz et al., 2014], опросник NPI [Brockmann et al., 2011]. В большинстве публикаций обнаружено более частое развитие тревожно-депрессивных расстройств у пациентов с GBA-БП. В нашем исследовании мы использовали широкий спектр шкал для оценки нейропсихологического профиля (см. табл. 4). По результатам тестирования было выявлено, что как у пациентов с мутациями, так и с полиморфными вариантами *GBA*, более выражены нейропсихологические и особенно тревожные расстройства по сравнению с пациентами с отсутствием мутаций в гене *GBA* (см. табл. 11). В нескольких исследованиях проведен анализ частоты развития тревожных расстройств и выявлена большая частота тревожных расстройств среди пациентов с GBA-БП [Brockmann et al., 2011; Swan et al., 2016], в то время как в двух других исследованиях данная тенденция не была подтверждена [Jesus et al., 2016; Wang et al., 2014]. Накопленные литературные данные, несмотря на различия в методах клинической оценки, позволили в ходе проведения метаанализа [Creese et al., 2017] включить 6 исследований с целью оценки ОШ для развития депрессии у пациентов с GBA-БП. У данной группы показано более частое развитие депрессии ОШ=2,16.

Значимый вклад в инвалидизацию пациентов с БП вносят когнитивные нарушения. В данном исследовании была проведена оценка когнитивных функций у пациентов с GBA-БП (см. табл. 10). Ранее с использованием шкалы MMSE был выявлен более низкий балл у пациентов с мутациями, но не полиморфными вариантами гена *GBA* [Malec-Litwinowicz et al., 2014]. По данным ряда статей, при оценке когнитивного статуса как по MMSE, так и с помощью других шкал, разницы в результатах между пациентами с GBA-БП и сБП не выявлено [Kumar et al., 2012; Swan et al., 2016; Wang et al., 2014]. Популяционные данные и проспективные исследования позволили сделать вывод о том, что

когнитивные расстройства статистически чаще развиваются в группе GBA-БП [Brockmann et al., 2014; Beavan et al., 2015; Winder-Rhodes et al., 2013]. Пользуясь шкалами MoCA и FAB при исследовании когнитивных функций, мы не подтвердили данную тенденцию. При использовании шкалы MMSE в общей группе GBA-БП и у пациентов mGBA-БП мы выявили более низкий балл по сравнению со сБП (см. табл. 10). В публикациях Mata и соавторов [Mata et al., 2015] и Davis и соавторов [Davis et al., 2016] проведена наиболее полная и разносторонняя оценка когнитивного дефицита у пациентов с GBA-БП. У данных пациентов было показано влияние на когнитивные функции полиморфного варианта E326K гена *GBA*. При проспективной оценке, авторы отмечали, что у пациентов с полиморфным вариантом E326K гена *GBA*, но не у носителей мутаций, чаще наблюдались умеренные когнитивные расстройства и деменция по сравнению со сБП. Подчеркнуто, что имеет значение прицельное изучение зрительно-пространственных функций у данной группы пациентов.

Говоря о других немоторных симптомах, интересно отметить, что по результатам одной из публикаций [Beavan et al., 2015] были выявлены более частые расстройства в фазу сна с БДГ в продромальном периоде у пациентов с GBA-БП по сравнению со сБП. Результаты, полученные в данном исследовании, не согласуются с нашими данными (см. табл. 12). Учитывая немногочисленность исследований и противоречивость полученных результатов, расстройства сна в фазу БДГ требуют дальнейшего изучения на данной группе пациентов.

При сравнении выраженности как моторных, так и немоторных симптомов, а также на основании тестирования пациентов по шкалам MoCA, FAB, MMSE, UPDRS, GDS-SF, ShARS, BDI, HADS, NPI, PD-NMS, RBDSQ между пациентами с мутациями *GBA* и пациентами с полиморфными вариантами *GBA* не было выявлено статистической разницы ни по одному из исследуемых параметров.

В целом, GBA-БП характеризовалась большей выраженностью немоторных симптомов по сравнению со сБП (рис. 24).



Рисунок 24 – Клинические особенности течения *GBA*-БП

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что, хотя полиморфные варианты гена *GBA* и не приводят к развитию БГ, они могут играть роль в формировании специфического клинического фенотипа БП. Таким образом, к пациентам с БП, носителям вариантов E326K, T369M, требуется повышенное внимание клиницистов. Выраженность тревоги и депрессии определяет не только качество жизни и инвалидизацию пациентов, но и влияет на приверженность к терапии и эффективность немедикаментозного лечения. Знание специфики клинического течения *GBA*-БП позволит своевременно и оптимально подбирать дофаминергическую и недофаминергическую терапию, избегать назначения препаратов, усиливающих риск развития когнитивных и аффективных нарушений, у данной группы больных. Учитывая данные клинические особенности, необходимо регулярное проведение нейропсихологического тестирования для своевременного выявления и коррекции тревожно-депрессивных нарушений у данной группы пациентов.

В рамках данного исследования проведено измерение ферментативной активности GCase с одновременной оценкой концентрации метаболитов HexSph (GlcSph+GalSph) в сухих пятнах крови, а также концентрации альфа-синуклеина и цитокинов в плазме крови у пациентов с *GBA*-БП, у пациентов со сБП и в контроле. Нами показано, что у носителей гетерозиготных мутаций в гене *GBA* более низкая активность GCase по сравнению как с контрольной группой, так и с

пациентами со сБП с отсутствием мутаций в гене *GBA* (см. рис. 20, табл. 13). Ранее было выявлено снижение активности фермента GCase в клетках структур головного мозга у пациентов с БП [Gegg et al., 2012; Murphy et al., 2014]. Высказано предположение, что снижение активности GCase создает петлю положительной обратной связи, приводящую к снижению функциональной активности лизосом и накоплению альфа-синуклеина, что в конечном итоге приводит к развитию нейродегенерации [Mazzulli et al., 2011].

В последние годы появились данные о связи БП с ЛБН [Robak et al., 2017; Shachar et al., 2011]. Таким образом, нарушение функционирования лизосом рассматривается как возможное патологическое звено развития БП [Moors et al., 2016; Xilouri et al., 2016].

Было показано, что тандемная масс-спектрометрия является чувствительным методом для определения активности лизосомных гидролаз [Zhang et al., 2008]. Важно отметить удобство в использовании данной методики: измерение активности и концентрации субстрата из сухих пятен крови можно проводить в течение 3 месяцев с момента забора крови без существенной потери активности и концентрации соответственно [Legini et al., 2011]. Ранее, Alcalay и соавторы показали снижение ферментативной активности GCase как у пациентов с БП с мутациями в гене *GBA*, так и у носителей полиморфных вариантов *GBA*, у которых данное снижение было менее выражено [Alcalay et al., 2015]. В нашем исследовании обнаружили статистически значимое снижение активности GCase у носителей мутаций *GBA* (L444P, N370S) по сравнению как со сБП, так и с контрольной группой, однако активность у носителей полиморфных вариантов (E326K, T369M) *GBA* статистически не отличалась от группы со сБП и контрольной группы (см. рис. 20). Таким образом, исходя из наших данных и данных литературы, можно предположить существование компенсаторных механизмов, которые позволяют сохранять активность GCase, несмотря на наличие данных полиморфных вариантов, приводящих к снижению ферментативной активности *in vitro*, как было показано ранее [Horowitz M. et al., 2011].



В рамках другого исследования, в котором проводилась оценка активности GCase в лейкоцитах методом флюоресценции, показано снижение активности GCase у пациентов с GBA-БП по сравнению со здоровыми носителями мутаций *GBA* [Ortega et al., 2016]. Barkhuizen и соавторы также проводили анализ активности GCase в лейкоцитах аналогичным методом, в данной работе было показано лишь незначительное снижение активности GCase у пациентов с GBA-БП по сравнению с контрольной группой [Barkhuizen et al., 2017]. Подобным методом проводили исследование группа Kim и соавторы [Kim et al., 2016]. В их работе оценена активность GCase у пациентов со сБП, у пациентов с БП и мутациями в гене *PARK2*, а также у пациентов со спиноцеребеллярной атаксией 17 и в контрольной группе. Между активностью GCase в исследуемых группах не было обнаружено статистически значимой разницы. Таким образом, данные полученные при оценке ферментативной активности GCase в лейкоцитах флуоресцентным методом носят противоречивый характер, и, вероятно, метод не обладает достаточной чувствительностью для оценки снижения активности GCase у пациентов с БП и GBA-БП, что свидетельствует в пользу применения ВЭЖХ-МС/МС.

Сообщалось также о сниженной активности GCase в СМЖ у нескольких пациентов с GBA-БП [Parnetti et al., 2014]. Несмотря на то, что к настоящему времени исследования по оценке активности GCase у пациентов с БП, носителей гетерозиготных мутаций *GBA*, остаются единичными, ясно, что носительство мутаций ассоциировано со снижением ферментативной активности GCase при GBA-БП. В работе Alcalay и соавторов также оценивалась активность GCase у 429 пациентов со сБП и 235 лиц контрольной группы в сухом пятне крови. В результате данного исследования было выявлено умеренное снижение активности GCase у пациентов со сБП [Alcalay et al., 2015]. Нами проведено измерение ферментативной активности у пациентов со сБП и не было найдено статистически значимого различия между пациентами со сБП и контрольной группой (см. табл. 13). Активность GCase не отличалась у пациентов со сБП по сравнению с группой контроля и в нескольких других исследованиях [Kim et al., 2016; Ortega et al.,

2016], что соответствуют нашим данным. Суммируя результаты, полученные нами и зарубежными коллегами, можно сделать вывод, что снижение активности GCase в периферической крови, является характерной особенностью пациентов с GBA-БП, но не сБП.

Как уже было упомянуто выше, GCase расщепляет глюкозилцереброзид на церамид и глюкозу. В последние годы, с развитием технологии ВЭЖХ –МС/МС, стала доступна оценка накапливающихся при дисфункции GCase метаболитов в крови. Было показано, что именно GlcSph, а не прямой субстрат, накапливающийся при снижении активности GCase – GlcCer, является чувствительным маркером, коррелирующим с клиническими симптомами БГ [Dekker et al., 2012; Rolfs et al., 2013; Murugesan et al., 2016].

Данный метаболит может использоваться при мониторинге эффективности терапии, так как GlcSph напрямую вовлечен в патогенез БГ и коррелирует с тяжестью симптомов. При лечении пациентов с БГ с помощью фермент-заместительной и субстрат-редуцирующей терапией было показано значимое снижение концентрации данного метаболита. Более того, концентрация GlcSph в плазме была повышена у пациентов с БГ более чем в 100 раз, по сравнению с контролем. В то же самое время концентрация GlcCer в плазме у пациентов с БГ повышается только в 5-10 раз [Dekker et al., 2012; Rolfs et al., 2013]. Таким образом, концентрация GlcSph в плазме является более чувствительным и специфичным биомаркером диагностики БГ. Концентрация данного метаболита у пациентов с БП с мутациями в гене *GBA* ранее не измерялась. Основываясь на данных, полученных у пациентов с БГ, нами было выдвинуто предположение, что у пациентов с БП, носителей гетерозиготных мутации в гене *GBA* концентрация GlcSph может быть повышена. В ходе нашей работы проводилась оценка концентрации HexSph, который является смесью GlcSph и GalSph, по техническим причинам, описанным в разделе 2.5.

В ходе нашего исследования впервые в мире был оценен уровень лизосфингозинов у пациентов с GBA-БП в сухом пятне крови (см. табл. 14, рис. 21). Была показана увеличенная концентрация HexSph у пациентов с GBA-БП по

сравнению со сБП и контрольной группой. Параллельно с нашим исследованием, в работе Guedes и соавторов было также показано увеличение смеси GlcSph и GalSph в плазме крови у пациентов с ГБА-БП [Guedes et al., 2017]. Как упоминалось выше, более неблагоприятные мутации (например, 84GG, L444P) связаны с высоким риском развития БП и с ранним началом БП по сравнению с благоприятными мутациями (например, N370S) и [Gan-Or et al., 2015]. Стоит отметить, что по нашим данным, увеличение концентрации HexSph было значимо у носителей мутаций (L444P, N370S) *GBA*. У носителей полиморфных вариантов (E326K, T369M) было показано статистически значимое повышение концентрации HexSph по сравнению с контрольной группой, но не со сБП. Интересно отметить, что, несмотря на то, что нами не было выявлено снижение активности GCase у пациентов с полиморфными вариантами, было обнаружено увеличение концентрации HexSph. Механизм данной биохимической особенности требует дополнительного изучения. Однако можно предположить, что даже незначительное увеличение концентрации HexSph может увеличивать риск развития БП.

Несмотря на очевидную логическую взаимосвязь между снижением активности фермента и накоплением субстрата (см. рис. 11), даже у пациентов с БГ не существует корреляции между степенью снижения активности GCase и накоплением субстратов метаболизма. Данная особенность может объясняться сложной цепью метаболизма сфинголипидов с участием нескольких ферментов, а также с возможностью транспорта субстратов метаболизма между органеллами и цитозолем (см. рис. 9).

Отсутствие корреляционных связей между активностью GCase, накоплением альфа-синуклеина, а также концентрацией HexSph в нашем исследовании вероятно обусловлено сложным взаимодействием между данными веществами в человеческом организме, с вовлечением ряда биохимических процессов. Так, ранее было показано, что субстраты метаболизма GlcCer и GlcSph выходят из лизосомы, где также подвергаются расщеплению и, таким образом, не существует прямых корреляционных взаимоотношений между субстратом и

ферментом [Taguchi et al., 2017]. Корреляционные же взаимоотношения, показанные в ранних исследованиях, продемонстрированы *in vitro*, на клеточных линиях, а также *post-mortem* на тканях ЦНС [Mazzulli et al., 2011; Gegg et al., 2012] и не могут в полной мере отразить процессы, протекающие в живом организме.

При исследованиях концентрации сфинголипидов в аутоптатах мозга с помощью ВЭЖХ-МС/МС не было обнаружено увеличения концентрации GlcCer в мозге пациентов с БП по сравнению с контрольной группой. Однако наблюдалась тенденция к увеличению концентрации ганглиозидов GM2 и GM3. Ганглиозид GM3 представляет собой сложный липид, участвующий в цепи расщепления цереброзида [Gegg et al., 2015; Boutinet al., 2016]. Ранее, накопление GlcCer было показано в нейронах, полученных из индуцированных стволовых клеток от пациентов с GBA-БП [Schöndorf et al., 2014]. Как уже было сказано, нарушение функции лизосом может являться критическим звеном патогенеза БП, учитывая их роль в деградации альфа-синуклеина. Таким образом, было высказано предположение, что снижение активности лизосомных гидролаз может приводить к нарушению лизосомной аутофагии и, следовательно, к накоплению альфа-синуклеина [Dehay et al., 2013]. В соответствии с этим представляет интерес работа Sardi и соавторов, в которой на животных моделях показан эффект ингибитора GlcCer-синтазы. Ингибирование привело к замедлению накопления альфа-синуклеина и улучшало когнитивные функции животных с паркинсонизмом [Sardi et al, 2017].

В нашем исследовании впервые проведена оценка концентрации олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови и впервые показано повышение концентрации альфа-синуклеина у пациентов с БП, гетерозиготных носителей мутации в гене *GBA* (рис. 22, табл. 15). Интересно, что повышение концентрации олигомерного альфа-синуклеина наблюдалось как у гетерозиготных носителей мутаций (L444P, N370S), так и у пациентов с БП и полиморфными вариантами *GBA* (E326K, T369M), которые являются факторами риска развития БП, но не ассоциированы с развитием БГ. Корреляция между ферментативной активностью GCase и накоплением альфа-синуклеина была продемонстрирована ранее на

клеточных и животных моделях БП [Cleeter et al., 2013; Manning-Bog, Schüle, Langston, 2009; Mazzulli et al., 2011]. Также было показано повышение концентрации олигомерного и димерного альфа-синуклеина в образцах крови пациентов с БГ [Argyriou et al., 2012; Pchelina et al., 2014] и была установлена отрицательная корреляция между концентрацией олигомерного альфа-синуклеина в плазме и активностью GCase в лейкоцитах у пациентов с БГ [Nuzhnyi et al., 2015]. Таким образом, в данных работах показано, что снижение активности GCase и наличие лизосомальных нарушений у пациентов с БГ может приводить к накоплению и олигомеризации альфа-синуклеина.

Посмертные исследования тканей головного мозга пациентов со сБП без мутаций *GBA* показали, что даже на ранних стадиях заболевания снижение активности GCase связано со снижением шаперон-опосредованной аутофагии, уменьшением концентрации церамида и увеличением концентрации альфа-синуклеина [Murphy et al., 2014]. Стоит отметить, что в нашем исследовании проводилась оценка концентрации альфа-синуклеина в плазме крови и активности GCase и концентрации HexSph из сухих пятен крови. Несмотря на обнаружение нами ряда биохимических особенностей, очевидно, что данные измерения достоверно не отражают патофизиологические процессы, происходящие в ЦНС. Однако в связи с их низкой инвазивностью и показанной эффективностью рекомендуется их дальнейшая разработка и апробация в разных группах пациентов с БП.

Ранее был показан неизменный уровень олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови у неврологически здоровых субъектов с мутациями *GBA* [Pchelina et al., 2014], что соответствует последним данным, свидетельствующим об отсутствии изменений активности GCase у здоровых носителей мутаций *GBA* [Ortega et al., 2016]. Стоит отметить, что в настоящем исследовании не найдено корреляций между уровнем олигомерного альфа-синуклеина и ферментативной активностью GCase в группе *GBA*-БП. Более того, не у всех пациентов с БП с мутациями в гене *GBA* была выявлена повышенная концентрация альфа-синуклеина в плазме. Сходные результаты были получены и в исследовании

Parnetti и соавторов, где концентрация олигомерного альфа-синуклеина были оценены в СМЖ пациентов с GBA-БП [Parnetti et al., 2014]. Эти наблюдения позволяют предположить, что снижение ферментативной активности GCase может быть недостаточным для олигомеризации альфа-синуклеина, и данный процесс может зависеть и от других факторов. Dermentzaki и соавторы воздействовали на культуры нейрональных клеток кондуритол-b-эпоксидом, специфическим фармакологическим ингибитором GCase, в течение 7 дней и не обнаружили изменений в концентрации альфа-синуклеина [G. Dermentzaki et al., 2013]. Стоит отметить, что при БГ пациенты с идентичным генотипом могут характеризоваться фенотипически различными особенностями заболевания [Siebert, Sidransky, Westbroek, 2014].

Существует вероятность того, что концентрация альфа-синуклеина в плазме крови не отражает накопление альфа-синуклеина в тканях головного мозга. Многочисленные исследования, оценивающие потенциал использования концентрации альфа-синуклеина в крови или СМЖ, в качестве возможного биомаркера развития БП, показали противоречивые результаты [Andersen et al., 2016].

Хорошо известно, что загрязнение плазмы, возникающее в результате гемолиза, является неизбежной проблемой, которая может препятствовать точной оценке изменения уровня альфа-синуклеина в СМЖ и плазме [Shi et al., 2010]. Показано, что гемолиз влияет на уровень общего, но не олигомерного альфа-синуклеина плазмы [Emelyanov, Andoskin, Pchelina, 2017]. По полученным нами данным можно предположить, что концентрация олигомерного альфа-синуклеина в плазме может быть использована в качестве биомаркера GBA-БП. Однако необходимы дальнейшие исследования на больших группах пациентов с GBA-БП. В ходе нашего исследования выявлено увеличение концентрации олигомерного альфа-синуклеина наряду со сниженной активностью GCase и повышенным накоплением HexSph в группе пациентов с GBA-БП.

Воспаление рассматривается как одно из ключевых звеньев патогенеза нейродегенеративных заболеваний. Возможность индукции воспаления

нейротоксичными олигомерными формами альфа-синуклеина многократно показана *in vitro* и на модельных животных [Lee et al., 2010]. Высказано предположение о том, что олигомерные структуры и агрегаты альфа-синуклеина могут являться триггером нейровоспаления при развитии синуклеопатий. В свою очередь, нейровоспаление может по цепи положительной обратной связи усиливать агрегацию альфа-синуклеина. На клеточных линиях было показано, что накопление GlcCer при дисфункции GCase вызывает активацию миелоидных клеток и индуцирует выделение воспалительных цитокинов [Nagata et al., 2017]. Нами проведено измерение концентрации ряда цитокинов (ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН-гамма, ФНО-альфа) в плазме крови пациентов с GBA-БП, сБП и в контрольной группе (см. табл. 17). Было показано повышение концентрации цитокинов (ИЛ-1 бета, ИЛ-10, ФНО-альфа) у пациентов с GBA-БП по сравнению с контрольной группой, также показано повышение ИЛ-1бета и ФНО-альфа по сравнению со сБП. Важно отметить, что ИЛ-1бета и ФНО-альфа являются провоспалительными, в то время как ИЛ-10 является противовоспалительным цитокином. Ранее, повышение концентрации ИЛ-10 у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой было продемонстрировано в нескольких работах [Brodacki et al., 2008; Милюхина и др., 2013]. Повышение концентрации ИЛ-10 может свидетельствовать об активации компенсаторных механизмов, на фоне повышения провоспалительных цитокинов [King et al., 2017].

У пациентов со сБП выявлено статистически значимое увеличение концентрации ИФН-гамма по сравнению с контрольной группой.

Повышенная концентрация ФНО-альфа и ИЛ-1бета у пациентов с GBA-БП по сравнению с пациентами со сБП может свидетельствовать о хроническом воспалительном процессе. На основании полученных нами данных и анализа литературы можно сделать выводы, что накопление GlcCer и GlcSph в макрофагах при БП может вызвать хроническое системное воспаление.

Оценка цитокинового профиля в группах пациентов с БП известной этиологии представляет особый интерес. Так, Brockmann с соавторами показан цитокиновый профиль в плазме крови пациентов с БП, обусловленной мутациями

в гене *LRRK2*. Как у пациентов с мутациями в гене *LRRK2*, так и у пациентов со сБП обнаружено увеличение как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов [Brockmann et al., 2016].

Нейровоспаление является звеном патогенеза в развитии нейродегенерации, выше были обсуждены возможные механизмы транспорта Т-клеток в ЦНС, исходя из чего предполагается, что постоянное повышение концентрации цитокинов может либо инициировать, либо усиливать процесс развития нейродегенерации. Как уже отмечалось выше, пациенты с ГВА-БП характеризуются более ранним началом заболевания по сравнению со сБП, а также развитием ряда немоторных симптомов, что может быть отчасти обусловлено повышением провоспалительных цитокинов, по сравнению со сБП. Показано, что наличие системной воспалительной реакции на фоне увеличения активности ФНО-альфа может быть ассоциировано с развитием когнитивного дефицита [Kempuraj et al., 2017].

Несмотря на то, что референсный уровень измеряемых цитокинов не был превышен при измерении, даже в группе с ГВА-БП, тем не менее повышение концентрации цитокинов по сравнению с контрольной группой и группой пациентов со сБП для ГВА-БП с высокой статистической значимостью может косвенно свидетельствовать о хроническом воспалительном процессе. Цитокины являются короткоживущими белками, концентрация которых динамически изменяется под воздействием множества факторов. В связи с чем в исследованиях авторы ориентируются не на референсные значения, а на сравнение с контрольной группой.

В частности, в публикации Shahine и соавторов группой сравнения пациентов с ГВА-БП являлись только пациенты с БП с отсутствием мутаций в гене *GBA*. Необходимо отметить, что в указанном исследовании отсутствовала группа контроля. Была проведена корреляция клинической картины и концентрации 40 различных белков плазмы крови, включая некоторые цитокины, у пациентов с мутациями в гене *GBA* [Shahine et al., 2013]. Авторами были получены данные о повышении нескольких моноцит-ассоциированных



провоспалительных цитокинов (интерлейкин 8 (ИЛ-8), белок хемотаксиса моноцитов 1 (MCP-1), воспалительный белок макрофагов 1-альфа (MIP1 $\alpha$ ), воспалительный белок макрофагов 1  $\beta$  (MIP1 $\beta$ ), фактор стволовых клеток (SCF), легочный хемокин, регулируемый активацией (PARC)). Исследователями была проведена повторная оценка концентрации данных цитокинов на другой когорте, и было выявлено повышение только ИЛ-8. Также нужно отметить, что у пациентов с БГ ранее было показано увеличение ряда цитокинов, в том числе ИЛ-1бета, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО-альфа [Barak et al., 1999; Allen et al., 1997]. Нами показана корреляция между уровнем ФНО-альфа и суммой баллов по шкале PD-NMS. Можно предположить, что преимущественная активация воспалительных факторов и наличие хронического воспалительного процесса у пациентов с GBA-БП может приводить к усилению когнитивного дефицита и других немоторных симптомов у данной группы пациентов.

В данном исследовании показано повышение олигомеров альфа-синуклеина в плазме у пациентов с мутациями в гене *GBA* как по сравнению с контролем, так и по сравнению с группой сБП. Нами также проведено исследование концентрации ряда маркеров воспаления плазмы крови у пациентов с мутациями в гене *GBA*. Однако не было выявлено корреляционных взаимоотношений между данными показателями, что не удивительно, так как было упомянуто выше, что цитокины являются нестабильными белками, и их концентрация изменяется под воздействием ряда факторов. Тем не менее показанное нами повышение концентрации олигомерного альфа-синуклеина и цитокинов в плазме крови у пациентов с GBA-БП по сравнению как со сБП так и с контрольной группой позволяет выдвинуть предположение об усиленном воспалении у данной группы пациентов.

Предполагается, что стратегии, направленные на восстановление активности GCase, могут быть эффективными при лечении GBA-БП. Препараты, применяемые с целью фермент-заместительной терапии, остающиеся стандартным лечением висцеральных симптомов БГ, не проходят через ГЭБ и поэтому не влияют на ЦНС. Альтернативой фермент-заместительной терапии для

лечения БГ является субстрат-редуцирующая терапия, которая осуществляется путем ингибирования синтеза гликофинголипидов. Используемые в настоящее время препараты (элиглулат, миглулат) имеют ограниченную эффективность у пациентов с нейропатической формой БГ, также из-за их неспособности проходить через ГЭБ [Sybertz, Krainc, 2014]. В настоящее время проводится глобальное исследование препарата GZ/SAR402671, во 2 фазе, также известного как ибиглулат, в качестве потенциальной терапии для пациентов с GBA-БП. Ибиглулат является ингибитором GluCer-синтазы и способен проходить через ГЭБ. Разрабатывается концепция о применении молекулярных шаперонов, которые проходят через ГЭБ и способствуют сборке GCase и транспортировке в лизосомы. В настоящее время проводится исследование молекулярного шаперона с целью лечения пациентов с GBA-БП. Результаты клинического исследования можно ожидать после 2022 года [A Global Study to Assess the Drug Dynamics, Efficacy, and Safety of GZ/SAR402671 in Parkinson's Disease Patients Carrying a Glucocerebrosidase (GBA) Gene Mutation (MOVES-PD). URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02906020?cond=gba+parkinson&rank=3>].

Таким образом, выявление данной группы пациентов позволит предоставить индивидуализированный подход и в ближайшем будущем новые методы терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы выявлена репрезентативная группа пациентов с ГВА-БП, выполнена оценка как клинических особенностей течения болезни, так и ряда биохимических показателей. Впервые показано влияние гетерозиготных мутаций в гене *GBA* на снижение активности GCase, а также на накопление субстратов метаболизма сфинголипидов HexSph. Также показано повышение концентрации альфа-синуклеина и ряда цитокинов плазмы крови в данной группе пациентов (рис. 25).



Рисунок 25 – Молекулярно-генетические и клинические особенности ГВА-БП

Полученные данные позволили прояснить предполагаемые молекулярные механизмы ГВА-БП, что открывает новые возможности для разработки терапевтических препаратов. Результаты исследования показали, что наличие мутаций в гене *GBA* в гетерозиготном состоянии приводит к снижению активности GCase и накоплению субстрата метаболизма HexSph,

Выявленные биохимические особенности, полученные в нашей работе, могут служить биомаркерами эффективности новых патогенетических методов терапии. Таким образом, выявление данной группы пациентов позволит обеспечить индивидуальный подход в клинической практике, а именно своевременную коррекцию когнитивных нарушений и тревожно-депрессивных расстройств.

## ВЫВОДЫ

1. Частота мутаций (L444P и N370S) и полиморфных вариантов (E326K и T369M) гена *GBA* среди пациентов с БП в Северо-Западном регионе России составила 1,7% и 4,9% соответственно.
2. У пациентов с GBA-БП заболевание развивается раньше и протекает с большей выраженностью немоторных симптомов: когнитивного дефицита, тревожно-депрессивных расстройств, чем при спорадических формах БП.
3. Ферментативная активность GCase крови пациентов с БП при наличии мутаций L444P и N370S в гене *GBA* снижена по сравнению с пациентами со сБП, носителями полиморфных вариантов E326K и T369M и по сравнению с контрольной группой.
4. Концентрация лизосфинголипидов HexSph (GlcSph+GalSph) в крови и олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме повышена у пациентов с БП при наличии мутаций L444P и N370S и полиморфных вариантов E326K и T369M по сравнению с пациентами со сБП и контрольной группой.
5. GBA-БП характеризуется повышением концентрации цитокинов ИЛ-1бета, ФНО-альфа в плазме крови, по сравнению со сБП.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Рекомендуется проводить скрининг мутаций L444P и N370S и полиморфных вариантов E326K и T369M гена *GBA* среди пациентов с БП, с целью формирования групп риска развития заболевания среди родственников пробандов с выявленными генетическими вариантами и прогноза развития заболевания.
2. Выявленные биохимические особенности GBA-БП (GCase, повышение HexSph, олигомерный альфа-синуклеин) могут служить биомаркерами эффективности новых методов лечения при клинических исследованиях молекулярных шаперонов и субстрат-редуцирующей терапии у пациентов с GBA-БП.
3. Пациенты с полиморфными вариантами, также, как и пациенты с мутациями в гене *GBA*, нуждаются в персонализированном подходе к подбору терапии. Следует оптимально подбирать дофаминергическую и недофаминергическую терапию, избегать назначения препаратов, усиливающих риск развития когнитивных и аффективных нарушений у данной группы больных.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БГ – болезнь Гоше

БП – болезнь Паркинсона

ВНЗ – возраст начала заболевания

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЛБН – лизосомальные болезни накопления

МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6 – тетрагидропиридин

ОНП – однонуклеотидный полиморфизм

ОШ – отношение шансов

ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография

сБП – спорадическая БП

ЦНС – центральная нервная система

ЧС – черная субстанция

*GBA* – ген, кодирующий глюкоцереброзидазу

*GBA*-БП – болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*

*GCase* – фермент глюкоцереброзидаза

*GlcCer* – глюкозилцерамид

*GlcSph* – гликозилсфингозина

*GalSph* – галактозилсфингозин

*GWAS* – анализ полногеномных ассоциаций

*HexSph* – гексозилсфингозин (галактозилсфингозин и глюкозилсфингозин)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганькина, О.А. Особенности течения болезни Паркинсона при гетерозиготном носительстве мутаций в гене глюкоцереброзидазы А / О.А. Ганькина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2016. - Т. 116. - №6. - С. 71-76.
2. Лукина, Е.А. Болезнь Гоше: Современная диагностика и лечения / Е.А. Лукина // Онкогематология. - 2009. - Т. 2. - № 2. - С. 196-199.
3. Милюхина, И.В. Роль воспаления в патогенезе болезни Паркинсона / И.В. Милюхина [и др.] // Неврологический журнал. - 2013. - Т. 18. - № 3. - С. 51-55.
4. Пчелина, С.Н., Емельянов, А.К., Усенко, Т.С. Молекулярные основы болезни паркинсона, обусловленной мутациями в гене *LRRK2* / С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов, Т.С. Усенко // Молекулярная биология. – 2014. - Т.48. - №1. - С. 1-12.
5. Усенко, Т.С. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*: автореферат дис. ... кандидата биологических наук: 03.03.04 / Т.С. Усенко. - Санкт-Петербург, 2012. - 21 с.
6. A Global Study to Assess the Drug Dynamics, Efficacy, and Safety of GZ/SAR402671 in Parkinson's Disease Patients Carrying a Glucocerebrosidase (GBA) Gene Mutation (MOVES-PD) [Electronic resource] // clinicaltrials.gov. – Stable URL:  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02906020?cond=gba+parkinson&rank=3>
7. Aflaki, E., Westbroek, W., Sidransky, E. The Complicated Relationship between Gaucher Disease and Parkinsonism: Insights from a Rare Disease / E. Aflaki, W. Westbroek, E. Sidransky // Neuron. – 2017. – Vol. 93. – № 4. – P. 737-746.
8. Aharon-Peretz, J., Rosenbaum, H., Gershoni-Baruch, R. Mutations in the Glucocerebrosidase Gene and Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews / J. Aharon-



- Peretz, H. Rosenbaum, R. Gershoni-Baruch // *New England Journal of Medicine*. – 2004. - Vol. 351.- № 19. – P. 1972-1977.
9. Alcalay, R. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: The CORE-PD study / R. Alcalay [et al.] // *Neurology*. – 2012. - Vol. 78. – № 18. – P. 1434-1440.
  10. Alcalay, R. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations // R. Alcalay [et al.] // *Brain*. – 2015. – Vol. 138. – № 9. – P. 2648-2658.
  11. Alcalay, R. SCARB2 variants and glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease // R. Alcalay [et al.] // *NPJ Parkinson's Disease*. – 2016. – Vol. 2. – № 1. – P. 16004.
  12. Alcalay, R. Self-report of cognitive impairment and mini-mental state examination performance in PRKN, LRRK2, and GBA carriers with early onset Parkinson's disease / R. Alcalay [et al.]// *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*. – 2010. – Vol. 32. – № 7. – P. 775-779.
  13. Allen, M. Pro-inflammatory cytokines and the pathogenesis of Gaucher's disease: increased level of Interleukin-6 and interleukin-10 / M. Allen [et al.]// *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. – 1997. – Vol. 90. – № 1. – P. 19-25.
  14. Amer, D., Irvine, G., El-Agnaf, O. Inhibitors of  $\alpha$ -synuclein oligomerization and toxicity: a future therapeutic strategy for Parkinson's disease and related disorders / D. Amer, G. Irvine, O. El-Agnaf // *Experimental Brain Research*. – 2006. – Vol. 173. – № 2. – P. 223-233.
  15. Andersen, A. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson's disease – a systematic review / A. Andersen [et al.] // *Acta Neurologica Scandinavica*. – 2016. – Vol. 135. – № 1. – P. 34-56.
  16. Argyriou, A. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging / A. Argyriou [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2012. – Vol. 528. – № 2. – P. 205-209.

17. Balducci, C. Lysosomal hydrolases in cerebrospinal fluid from subjects with Parkinson's disease / C. Balducci [et al.] // *Movement Disorders*. – 2007. – Vol. 22. – № 10. – P. 1481-1484.
18. Barak, V. Cytokines in Gaucher's disease / V. Barak [et al.] // *European cytokine network*. – 1999. – Vol. 10. – № 2. – P. 205-210
19. Barbour, R. Red Blood Cells Are the Major Source of Alpha-Synuclein in Blood / R. Barbour [et al.] // *Neurodegenerative Diseases*. – 2008. – Vol. 5. – № 2. – P. 55-59.
20. Barkhuizen, M. A molecular analysis of the GBA gene in Caucasian South Africans with Parkinson's disease / M. Barkhuizen [et al.] // *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. – 2017. – Vol. 5. – № 2. – P. 147-156.
21. Beavan, M. Evolution of Prodromal Clinical Markers of Parkinson Disease in a GBA Mutation-Positive Cohort / M. Beavan [et al.] // *JAMA Neurology*. – 2015. – Vol. 72. – № 2. – P. 201.
22. Beck, A., Steer, R., Brown, G. BDI-II. San Antonio / A. Beck, R. Steer, G. Brown. – Psychological Corp., 1996.
23. Bendikov-Bar, I. Characterization of the ERAD process of the L444P mutant glucocerebrosidase variant / I. Bendikov-Bar [et al.] // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2011. – Vol. 46. – № 1. – P. 4-10.
24. Bendikov-Bar, I., Horowitz, M. Gaucher disease paradigm: From ERAD to comorbidity // *Human Mutation*. 2012. – Vol. 33. № 10. P. 1398-1407.
25. Benner E. и др. Nitrated  $\alpha$ -Synuclein Immunity Accelerates Degeneration of Nigral Dopaminergic Neurons // I. Bendikov-Bar [et al.] // *PLoS ONE*. – 2008. - Vol. 3. – № 1. – P. e1376.
26. Beutler, E., Kuhl, W. The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of b-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes / E. Beutler, W. Kuhl // *J Clinics in Laboratory Medicine*. – 1970. – Vol. 76. – P. 747-755.

27. Beyer, K., Ariza, A. Alpha-Synuclein Posttranslational Modification and Alternative Splicing as a Trigger for Neurodegeneration / K. Beyer, A. Ariza // *Molecular Neurobiology*. – 2012. – Vol. 47. – № 2. – P. 509-524.
28. Bhak, G. Granular Assembly of  $\alpha$ -Synuclein Leading to the Accelerated Amyloid Fibril Formation with Shear Stress / G. Bhak [et al.] // *PLoS ONE*. – 2009. – Vol. 4. – № 1. – P. e4177.
29. Bogaert, Van L., Froehlich, A. Un cas de maladie de Gaucher de l'adulte avec syndrome de Raynaud, pigmentation et rigidite de type extra-pyramidal aux membres inferieurs / L. Van Bogaert, A. Froehlich // *Ann. Med.* – 1939. – Vol. 45. – P. 57-70.
30. Boutin, M. Tandem Mass Spectrometry Multiplex Analysis of Glucosylceramide and Galactosylceramide Isoforms in Brain Tissues at Different Stages of Parkinson Disease / M. Boutin [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88. – № 3. – P. 1856-1863.
31. Braak, H., Del Tredici, K. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease / H. Braak, K. Del Tredici // *Neurology*. – 2008. – Vol. 70. – № 20. – P. 1916-1925.
32. Brockmann, K. GBA-associated Parkinson's disease: Reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study / K. Brockmann [et al.] // *Movement Disorders*. – 2014. – Vol. 30. – № 3. – P. 407-411.
33. Brockmann, K. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics / K. Brockmann [et al.] // *Neurology*. – 2011. – Vol. 77. – № 3. – P. 276-280.
34. Brockmann, K. Inflammatory profile in LRRK2-associated prodromal and clinical PD / K. Brockmann [et al.] // *Journal of Neuroinflammation*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 122.
35. Brodacki, B. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF $\alpha$ , and INF $\gamma$  concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism / B. Brodacki [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2008. – Vol. 441. – № 2. – P. 158-162.

36. Brooks, D. Imaging Approaches to Parkinson Disease / D. Brooks // *Journal of Nuclear Medicine*. – 2010. – Vol. 51. – № 4. – P. 596-609.
37. Brooks, D., Pavese, N. Imaging biomarkers in Parkinson's disease / D. Brooks, N. Pavese // *Progress in Neurobiology*. – 2011. – Vol. 95. – № 4. – P. 614-628.
38. Bultron, G. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease / G. Bultron [et al.] // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2010. – Vol. 33. – № 2. – P. 167-173.
39. Burn, D. Parkinson's disease in twins studied with 18F-dopa and positron emission tomography / D. Burn [et al.] // *Neurology*. – 1992. – Vol. 42. – № 10. – P. 1894-1894.
40. Burré, J. The Synaptic Function of  $\alpha$ -Synuclein / J. Burré // *Journal of Parkinson's Disease*. – 2015. – Vol. 5. – № 4. – P. 699-713.
41. Burre, J.  $\alpha$ -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in Vivo and in Vitro / J. Burre [et al.] // *Science*. – 2010. – Vol. 329. – № 5999. – P. 1663-1667.
42. Bykov, K. Confounding of the association between statins and Parkinson disease: systematic review and meta-analysis / K. Bykov [et al.] // *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*. – 2016. – Vol. 26. – № 3. – P. 294-300.
43. Calderón-Garcidueñas, L. Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Highly Exposed PM2.5 Urbanites: The Risk of Alzheimer's and Parkinson's Diseases in Young Mexico City Residents / L. Calderón-Garcidueñas [et al.] // *Journal of Alzheimer's Disease*. – 2016. – Vol. 54. – № 2. – P. 597-613.
44. Cassani, E. Dietary habits in Parkinson's disease: Adherence to Mediterranean diet / E. Cassani [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2017. – Vol. 42. – P. 40-46.
45. Chahine, L. Clinical and Biochemical Differences in Patients Having Parkinson Disease With vs With out GBA Mutations / L. Chahine [et al.] // *JAMA Neurology*. – 2013. – Vol. 70. – № 7. – P. 852.
46. Chandra, S.  $\alpha$ -Synuclein Cooperates with CSP $\alpha$  in Preventing Neurodegeneration / S. Chandra [et al.] // *Cell*. – 2005. – Vol. 123. – № 3. – P. 383-396.

47. Chartier-Harlin, M.  $\alpha$ -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease / M. Chartier-Harlin [et al.] // *The Lancet*. – 2004. – Vol. 364. – № 9440. – P. 1167-1169.
48. Chaudhuri, K. International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: The NMSQuest study / K. Chaudhuri [et al.] // *Movement Disorders*. – 2006. – Vol. 21. – № 7. – P. 916-923.
49. Chen, J. Glucocerebrosidase Gene Mutations Associated with Parkinson's Disease: A Meta-Analysis in a Chinese population / J. Chen [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – Vol. 9. – № 12. – P. e115747.
50. Chérin, P. The neurological manifestations of Gaucher disease type 1: the French Observatoire on Gaucher disease (FROG) / P. Chérin [et al.] // *Journal of Inherited Metabolic Disease*. – 2010. – Vol. 33. – № 4. – P. 331-338.
51. Choi, J. Association of mutations in the glucocerebrosidase gene with Parkinson disease in a Korean population / J. Choi [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2012. – Vol. 514. – № 1. – P. 12-15.
52. Chu, Y. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions / Y. Chu [et al.] // *Neurobiology of Disease*. – 2009. – Vol. 35. – № 3. – P. 385-398.
53. Chu, Y., Kordower, J. Age-associated increases of  $\alpha$ -synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? / Y. Chu, J. Kordower // *Neurobiology of Disease*. – 2007. – Vol. 25. – № 1. – P. 134-149.
54. Cilia, R. Survival and dementia In GBA-associated Parkinson's disease: The mutation matters / R. Cilia [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2016. – Vol. 80. – № 5. – P. 662-673.
55. Cleeter, M. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage / M. Cleeter [et al.] // *Neurochemistry International*. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 1-7.

56. Creese, B. Glucocerebrosidase mutations and neuropsychiatric phenotypes in Parkinson's disease and Lewy body dementias: Review and meta-analyses / B. Creese [et al.] // American Journal of Medical Genetics. Part B: Neuropsychiatric Genetics. – 2017. – Vol. 177. – Issue 2. – P. 232-241.
57. Crosiers, D. Mutations in glucocerebrosidase are a major genetic risk factor for Parkinson's disease and increase susceptibility to dementia in a Flanders-Belgian cohort / D. Crosiers [et al.] // Neuroscience Letters. – 2016. – Vol. 629. – P. 160-164.
58. Cummings, J., Hegarty, A. Neurology, psychiatry, and neuropsychiatry / J. Cummings, A. Hegarty // Neurology. – 1994. – Vol. 44. – № 2. – P. 209-209.
59. Dagan, E. The contribution of Niemann-Pick SMPD1 mutations to Parkinson disease in Ashkenazi Jews / E. Dagan [et al.] // Parkinsonism & Related Disorders. – 2015. – Vol. 21. – № 9. – P. 1067-1071.
60. Davies, P., Moualla, D., Brown, D. Alpha-Synuclein Is a Cellular Ferrireductase / P. Davies, D. Moualla, D. Brown // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – № 1. – P. e15814.
61. Davis, M. Association of GBA Mutations and the E326K Polymorphism With Motor and Cognitive Progression in Parkinson Disease / M. Davis [et al.] // JAMA Neurology. – 2016. – Vol. 73. – № 10. – P. 1217.
62. De Michele, G. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: A case-control study in southern Italy / G. De Michele [et al.] // Movement Disorders. – 1996. – Vol. 11. – № 1. – P. 17-23.
63. Dehay, B. Lysosomal impairment in Parkinson's disease / B. Dehay [et al.] // Movement Disorders. – 2013. – Vol. 28. – № 6. – P. 725-732.
64. Dekker, N. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response / N. Dekker [et al.] // Blood. – 2011. – Vol. 118. – № 16. P. 118-127.
65. Deleidi, M., Gasser, T. The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease / M. Deleidi, T. Gasser // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2013. – Vol. 70. – № 22. – P. 4259-4273.

66. Delgado-Alvarado, M. Tau/ $\alpha$ -synuclein ratio and inflammatory proteins in Parkinson's disease: An exploratory study / M. Delgado-Alvarado [et al.] // *Movement Disorders*. – 2017. – Vol. 32. – № 7. – P. 1066-1073.
67. Dermentzaki, G. Loss of  $\beta$ -Glucocerebrosidase Activity Does Not Affect Alpha-Synuclein Levels or Lysosomal Function in Neuronal Cells / G. Dermentzaki [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – № 4. – P. e60674.
68. Desplats, P. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein / P. Desplats [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2009. – Vol. 106. – № 31. – P. 13010-13015.
69. Devine, E.A. Chromosomal localization of the gene for Gaucher disease / E.A. Devine [et al.] // *Progress in clinical and biological research*. - 1998. – Vol. 95. – P. 511-534.
70. Diao, J. Native  $\alpha$ -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2 [Electronic resource] / J. Diao [et al.] // *eLife*. – 2013. – Vol. 2. – Stable URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638301>.
71. Dorsey, E. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030 / E. Dorsey [et al.] // *Neurology*. – 2006. – Vol. 68. – № 5. – P. 384-386.
72. Dubois, B. The FAB: A frontal assessment battery at bedside / B. Dubois [et al.] // *Neurology*. – 2000. – Vol. 55. – № 11. – P. 1621-1626.
73. Dvir, H. X-ray structure of human acid- $\beta$ -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease / H. Dvir [et al.] // *EMBO reports*. – 2003. – Vol. 4. – № 7. – P. 704-709.
74. Eliezer, D. The Mysterious C-Terminal Tail of Alpha-Synuclein: Nanobody's Guess / D. Eliezer // *Journal of Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 425. – № 14. – P. 2393-2396.
75. Emanuele, M., Chierigatti, E. Mechanisms of Alpha-Synuclein Action on Neurotransmission: Cell-Autonomous and Non-Cell Autonomous Role / M. Emanuele, E. Chierigatti, // *Biomolecules*. – 2015. – Vol. 5. – № 2. – P. 865-892.

76. Emelyanov, A. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia / A. Emelyanov [et al.] // *Movement Disorders*. – 2011. – Vol. 27. – № 1. – P. 158-159.
77. Emelyanov, A., Andoskin, P., Pchelina, S. Dataset of total, oligomeric alpha-synuclein and hemoglobin levels in plasma in Parkinson's disease / A. Emelyanov [et al.] // *Data in Brief*. – 2017. – Vol. 10. – P. 182-185.
78. Fall, P. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: A case-control study in southeastern Sweden / P. Fall // *Movement Disorders*. – 1999. – Vol. 14. – № 1. – P. 28-37.
79. Ferraz, M. Lysosomal glycosphingolipid catabolism by acid ceramidase: formation of glycosphingoid bases during deficiency of glycosidases / M. Ferraz [et al.] // *FEBS Letters*. – 2016. – Vol. 590. – № 6. – P. 716-725.
80. Fleming, S. Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease / S. Fleming // *Current Environmental Health Reports*. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 192-199.
81. Folstein, M., Folstein, S., McHugh, P. "Mini-mental state" / M. Folstein, S. Folstein, P. McHugh // *Journal of Psychiatric Research*. – 1975. – Vol. 12. – № 3. – P. 189-198.
82. Fortin, D. The behavior of  $\alpha$ -synuclein in neurons / D. Fortin [et al.] // *Movement Disorders*. – 2010. – Vol. 25. – № S1. – P. S21-S26.
83. Fujioka, S. Update on novel familial forms of Parkinson's disease and multiple system atrophy / S. Fujioka [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2014. – Vol. 20. – P. S29-S34.
84. Gan-Or, Z. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease / Z. Gan-Or [et al.] // *Neurology*. – 2015. – Vol. 84. – № 9. – P. 880-887.
85. Gan-Or, Z. LRRK2 and GBA mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease / Z. Gan-Or [et al.] // *Neurogenetics*. – 2009. – Vol. 11. – № 1. – P. 121-125.



86. Gardai, S. Elevated Alpha-Synuclein Impairs Innate Immune Cell Function and Provides a Potential Peripheral Biomarker for Parkinson's Disease / S. Gardai [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. e71634.
87. Gardet, A. LRRK2 Is Involved in the IFN- Response and Host Response to Pathogens / A. Gardet [et al.] // The Journal of Immunology. – 2010. – Vol. 185. – № 9. – P. 5577-5585.
88. Gegg, M. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains / M. Gegg [et al.] // Annals of Neurology. – 2012. – Vol. 72. – № 3. – P. 455-463.
89. Gegg, M. No evidence for substrate accumulation in Parkinson brains with GBA mutations / M. Gegg [et al.] // Movement Disorders. – 2015. – Vol. 30. – № 8. – P. 1085-1089.
90. Goker-Alpan, O. Phenotypic continuum in neuronopathic gaucher disease: an intermediate phenotype between type 2 and type 3 / O. Goker-Alpan [et al.] // The Journal of Pediatrics. – 2003. – Vol. 143. – № 2. – P. 273-276.
91. Goker-Alpan, O. The Spectrum of Parkinsonian Manifestations Associated With Glucocerebrosidase Mutations / O. Goker-Alpan [et al.] // Archives of Neurology. – 2008. – Vol. 65. – № 10. – P. 1353-1357.
92. Golbe, L., Farrell, T., Davis, P. Follow-up study of early-life protective and risk factors in Parkinson's disease / L. Golbe, T. Farrell, P. Davis // Movement Disorders. – 1990. – Vol. 5. – № 1. – P. 66-70.
93. Gonzalez, A. Lysosomal integral membrane protein-2: A new player in lysosome-related pathology / A. Gonzalez [et al.] // Molecular Genetics and Metabolism. – 2014. – Vol. 111. – № 2. – P. 84-91.
94. Gousset, K. Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread / K. Gousset [et al.] // Nature Cell Biology. – 2009. – Vol. 11. – № 3. – P. 328-336.
95. Guedes, L. Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease / L. Guedes [et al.] // Parkinsonism & related disorders. – 2015. – Vol. 44. – P. 58-65.

96. Gustot, A. Amyloid fibrils are the molecular trigger of inflammation in Parkinson's disease / A. Gustot [et al.] // *Biochemical Journal*. – 2015. – Vol. 471. – № 3. – P. 323-333.
97. Halperin, A., Elstein, D., Zimran, A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease / A. Halperin, D. Elstein, A. Zimran // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2006. – Vol. 36. – № 3. – P. 426-428.
98. Han, F. Mutations in the glucocerebrosidase gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada / F. Han [et al.] // *International Journal of Neuroscience*. – 2015. – Vol. 126. – № 5. – P. 415-421.
99. Herrlin, K., Hillborg, P. Neurological Signs in a Juvenile Form of Gaucher's Disease / K.Herrlin, P. Hillborg // *Acta Paediatrica*.- 1962. – Vol. 51. – № 2. – P. 137-154.
100. Hesse, R. Decreased IL-8 levels in CSF and serum of AD patients and negative correlation of MMSE and IL-1 $\beta$  / R. Hesse [et al.] // *BMC Neurology*. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 185.
101. Hirsch, E., Hunot, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? / E. Hirsch, S. Hunot // *The Lancet Neurology*. – 2009. – Vol. 8. – № 4. – P. 382-397.
102. Hirsch, E., Vyas, S., Hunot, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease / E. Hirsch, S. Vyas, S.Hunot // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2012. – Vol. 18. – P. S210-S212.
103. Hoehn, M., Yahr, M. Parkinsonism: onset, progression, and mortality / M. Hoehn, M. Yahr, // *Neurology*. – 1967. – Vol. 17. – № 5. – P. 427-427.
104. Horowitz, M. The enigma of the E326K mutation in acid  $\beta$ -glucocerebrosidase / M. Horowitz [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2011. – Vol. 104. – № 1-2. – P. 35-38.
105. Horowitz, M. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution / M. Horowitz [et al.] // *Genomics*. – 1989. – Vol. 4. – № 1. – P. 87-96.

106. Hruska, K. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA) / K. Hruska [et al.] // *Human Mutation*. – 2008. – Vol. 29. – № 5. – P. 567-583.
107. Hubble, J.P. Risk factors for Parkinson's disease / J.P. Hubble [et al.] // *Neurology*. – 1993. – Vol. 43. - № 9. – P. 1693-1697.
108. Hughes, A. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases / A. Hughes [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 1992. – Vol. 55. – № 3. – P. 181-184.
109. Jesús, S. GBA Variants Influence Motor and Non-Motor Features of Parkinson's Disease / S. Jesús [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 12. – P. e0167749.
110. Jmoudiak, M., Futerman, A. Gaucher disease: pathological mechanisms and modern management / M. Jmoudiak, A. Futerman // *British Journal of Haematology*. – 2005. – Vol. 129. – № 2. – P. 178-188.
111. Kachergus, J. Identification of a Novel LRRK2 Mutation Linked to Autosomal Dominant Parkinsonism: Evidence of a Common Founder across European Populations / J. Kachergus [et al.] // *The American Journal of Human Genetics*. – 2005. – Vol. 76. – № 4. – P. 672-680.
112. Kalinderi, K., Bostantjopoulou, S., Fidani, L. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects / K. Kalinderi, S. Bostantjopoulou, L. Fidani // *Acta Neurologica Scandinavica*. – 2016. – Vol. 134. – № 5. – P. 314-326.
113. Kempuraj, D. Brain and Peripheral Atypical Inflammatory Mediators Potentiate Neuroinflammation and Neurodegeneration / D. Kempuraj [et al.] // *Front Cell Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. - P. 216.
114. Kilarski, L. Systematic Review and UK-Based Study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease / L. Kilarski [et al.] // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27. – № 12. – P. 1522-1529.

115. Kim, H. Leukocyte glucocerebrosidase and  $\beta$ -hexosaminidase activity in sporadic and genetic Parkinson disease / H. Kim [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. 2016. – Vol. 23. – P. 99-101.
116. Kim, J. Loss of substantia nigra hyperintensity on 7 Tesla MRI of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy / J. Kim [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2016. – Vol. 26. – P. 47-54.
117. King, E., Thomas, A. Systemic Inflammation in Lewy Body Diseases / E. King, A. Thomas // *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. – 2017. – Vol. 31. – № 4. – P. 346-356.
118. Kordower, J. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease / J. Kordower [et al.] // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 5. – P. 504-506.
119. Kostka, M. Single Particle Characterization of Iron-induced Pore-forming  $\alpha$ -Synuclein Oligomers / M. Kostka [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 16. – P. 10992-11003.
120. Kresojević, N. Presenting symptoms of GBA-related Parkinson's disease / N. Kresojević [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2015. – Vol. 21. – № 7. – P. 804-807.
121. Kumar, K. Glucocerebrosidasemutations in a Serbian Parkinson's disease population / K. Kumar [et al.] // *European Journal of Neurology*. – 2012. – Vol. 20. – № 2. – P. 402-405.
122. Langston, J. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure / J. Langston [et al.] // *Annals of Neurology*. – 1999. – Vol. 46. – № 4. – P. 598-605.
123. Lee, H. Direct Transfer of  $\alpha$ -Synuclein from Neuron to Astroglia Causes Inflammatory Responses in Synucleinopathies / H. Lee [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285. – № 12. – P. 9262-9272.
124. Legini, E. Analysis of glucocerebrosidase activity in dry blood spots using tandem mass spectrometry / E. Legini [et al.] // *Clinica Chimica Acta*. – 2011. – Vol. 412. – № 3-4. – P. 343-346.

125. Lehri-Boufala, S. New Roles of Glycosaminoglycans in  $\alpha$ -Synuclein Aggregation in a Cellular Model of Parkinson Disease / S. Lehri-Boufala [et al.] // PLOS ONE. – 2015. - Vol. 10. – № 1. – P. e0116641.
126. Lesage, S. Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? / S. Lesage [et al.] // Neurology. – 2008. – Vol. 71. – № 19. – P. 1550-1552.
127. Lesage, S. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease / / S. Lesage [et al.] // Human Molecular Genetics. – 2010. – Vol. 20. – № 1. - P. 202-210.
128. Lewy, F.H. Paralysis agitans. I. Pathologische anatomie / F.H. Lewy // Handbuch der Neurologie. – 1912. – Vol. 3. – P. 920-958.
129. Lieberman, R. Effects of pH and Iminosugar Pharmacological Chaperones on Lysosomal Glycosidase Structure and Stability / R. Lieberman [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – № 22. – P. 4816-4827. Lill C. Genetics of Parkinson's disease // Molecular and Cellular Probes. 2016. T. 30. № 6. C. 386-396.
130. Lill, C. Genetics of Parkinson's disease // Molecular and Cellular Probes. – 2016. – Vol. 30. – №. 6. – P. 386-396.
131. Lindqvist, D. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease – Associations with depression, fatigue, and cognitive impairment / D. Lindqvist [et al.] // Brain, Behavior, and Immunity. – 2013. – Vol. 33. – P. 183-189.
132. Lubbe, S. Additional rare variant analysis in Parkinson's disease cases with and without known pathogenic mutations: evidence for oligogenic inheritance / S. Lubbe [et al.] // Human molecular genetics. – 2016. – Vol. 25. – №. 24. – P. 5483-5489.
133. Lwin, A. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism / A. Lwin // Molecular Genetics and Metabolism. – 2004. – Vol. 81. – № 1. – P. 70-73.
134. Malec-Litwinowicz, M. Cognitive impairment in carriers of glucocerebrosidase gene mutation in Parkinson disease patients / M. Malec-Litwinowicz [et al.] // Neurologia i Neurochirurgia Polska. – 2014. – Vol. 48. – № 4. – P. 258-261.

135. Mallett, V. GBAP.T369M substitution in Parkinson disease: Polymorphism or association? A meta-analysis / V. Mallett [et al.] // *Neurology Genetics*. – 2016. – Vol. 2. – № 5. – P. e104.
136. Manning-Boğ, A., Schüle, B., Langston, J. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: A biological link between Gaucher disease and parkinsonism / A. Manning-Boğ, B. Schüle, J. Langston // *NeuroToxicology*. – 2009. – Vol. 30. – № 6. – P. 1127-1132.
137. Marder, K. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study / K. Marder [et al.] // *Neurology*. – 1996. – Vol. 47. – № 1. – P. 155-160.
138. Mata, I. GBA Variants are associated with a distinct pattern of cognitive deficits in Parkinson's disease / I. Mata [et al.] // *Movement Disorders*. – 2015. – Vol. 31. – № 1. – P. 95-102.
139. Mazzulli, J. Activation of Glucocerebrosidase Reduces Pathological  $\alpha$ -Synuclein and Restores Lysosomal Function in Parkinson's Patient Midbrain Neurons / J. Mazzulli [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36. – № 29. – P. 7693-7706.
140. Mazzulli, J. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and  $\alpha$ -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies / J. Mazzulli [et al.] // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – № 1. – P. 37-52.
141. McGlinchey, R., Lee, J. Cysteine cathepsins are essential in lysosomal degradation of  $\alpha$ -synuclein / R. McGlinchey, J. Lee // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Vol. 112. – № 30. – P. 9322-9327.
142. McKeith, I. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Third report of the DLB consortium / I. McKeith [et al.] // *Neurology*. – 2005. – Vol. 65. – № 12. – P. 1863-1872.
143. Mendez, I. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years / I. Mendez [et al.] // *Nature Medicine*. – 2008. – Vol. 14. – № 5. – P. 507-509.

144. Michelakakis, H. Evidence of an association between the scavenger receptor class B member 2 gene and Parkinson's disease / H. Michelakakis [et al.] // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27. – № 3. – P. 400-405.
145. Mielke, M.M. Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study / M.M. Mielke [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 9. – P. e73094.
146. Mizuno, N. Remodeling of Lipid Vesicles into Cylindrical Micelles by  $\alpha$ -Synuclein in an Extended  $\alpha$ -Helical Conformation / N. Mizuno [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 35. – P. 29301-29311.
147. More, S. Cellular and Molecular Mediators of Neuroinflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease / S. More [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2013. – Vol. 2013. – P. 1-12.
148. Mulak, A. Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease / A. Mulak // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21. – № 37. – P. 10609.
149. Mullapudi, A. Risk of Parkinson's Disease in the Users of Antihypertensive Agents: An Evidence from the Meta-Analysis of Observational Studies [Electronic resource] / A. Mullapudi [et al.] // *Journal of Neurodegenerative Diseases*. – 2016. – Stable URL: <https://www.hindawi.com/journals/jnd/2016/5780809/>.
150. Murphy, K. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased  $\alpha$ -synuclein in sporadic Parkinson's disease / K. Murphy [et al.] // *Brain*. – 2014. – Vol. 137. – № 3. – P. 834-848.
151. Murugesan, V. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease / V. Murugesan [et al.] // *American Journal of Hematology*. – 2016. Vol. 91. – № 11. – P. 1082-1089.
152. Nalls, M. A Multicenter Study of Glucocerebrosidase Mutations in Dementia With Lewy Bodies / M. Nalls [et al.] // *JAMA Neurology*. – 2013. – Vol. 70. – № 6. – P. 727.

153. Nagata, M. Intracellular metabolite  $\beta$ -glucosylceramide is an endogenous Mincle ligand possessing immunostimulatory activity / M, Nagata [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2013. – Vol. 114. – № 16. – P. 3285-3294.
154. Nasreddine, Z. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A Brief Screening Tool For Mild Cognitive Impairment / Z. Nasreddine [et al.] // Journal of the American Geriatrics Society. – 2005. – Vol. 53. – № 4. – P. 695-699.
155. Neil, J., Glew, R., Peters, S. Familial Psychosis and Diverse Neurologic Abnormalities in Adult-Onset Gaucher's Disease / J. Neil, R. Glew, S. Peters // Archives of Neurology. – 1979. – Vol. 36. – № 2. – P. 95-99.
156. Neumann, J. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease / J. Neumann [et al.] // Brain. – 2009. – Vol. 132. – № 7. – P. 1783-1794.
157. Nuzhnyi, E. Plasma Oligomeric Alpha-Synuclein Is Associated With Glucocerebrosidase Activity in Gaucher Disease / E. Nuzhnyi [et al.] // Movement Disorders. – 2015. – Vol. 30. – № 7. – P. 989-991.
158. Okuda, S., Uemura, N., Takahashi, R. Alpha-synuclein fibrils propagate through tunneling nanotubes / S. Okuda, N. Uemura, R. Takahashi // Movement Disorders. – 2017. – Vol. 32. – № 3. – P. 394-394.
159. Olanow, C. Do prions cause Parkinson disease?: The evidence accumulates / C. Olanow // Annals of Neurology. – 2014. – Vol. 75. – № 3. – P. 331-333.
160. Olszewska, D.A. Recognising the phenotype of genetic forms of Parkinson's disease in clinical practice / D.A. Olszewska [et al.] // ACNR. – 2015. – Vol. 15. – № 3. – P. 5-9.
161. Orchard, P.J. Chitotriosidase as a biomarker of cerebral adrenoleukodystrophy / P.J. Orchard [et al.] // Journal of neuroinflammation. – 2011. – Vol. 8. – №. 1. – P. 144.
162. Ortega, R. Glucocerebrosidase enzyme activity in GBA mutation Parkinson's disease / R. Ortega [et al.] // Journal of Clinical Neuroscience. – 2016. – Vol. 28. – P. 185-186.



163. Owada, M., Sakiyama, T., Kitagawa, T. Neuropathic Gaucher's Disease with Normal 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -glucosidase Activity in the Liver / M. Owada, T. Sakiyama, T. Kitagawa // *Pediatric Research*. – 1977. – Vol. 11. – № 5. – P. 641-646.
164. Pal, G. The Neuropsychiatric and Motor Profile of GBA-Associated Parkinson's Disease: A Review / G. Pal [et al.] // *Movement Disorders Clinical Practice*. – 2015. – Vol. 3. – № 1. – P. 4-8.
165. Pankratz, N. Meta-analysis of Parkinson's Disease: Identification of a novel locus, RIT2 / N. Pankratz [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2012. – Vol. 71. – № 3. – P. 370-384.
166. Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy / J. Parkinson. – London: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, 1817.
167. Parnetti, L. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease / L. Parnetti [et al.] // *Movement Disorders*. – 2014. – Vol. 29. – № 8. – P. 1019-1027.
168. Pasqualetti, G., Brooks, D., Edison, P. The Role of Neuroinflammation in Dementias / G. Pasqualetti, D. Brooks, P. Edison // *Current Neurology and Neuroscience Reports*. – 2015. – Vol. 15. – № 4. – P. 17.
169. Pastores, G. Neuropathic Gaucher disease / G. Pastores // *Wiener Medizinische Wochenschrift*. – 2010. – Vol. 160. – № 23-24. – P. 605-608.
170. Pchelina, S. G2019S LRRK2 mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia / S. Pchelina [et al.] // *Movement Disorders*. – 2006. – Vol. 21. – № 12. – P. 2234-2236.
171. Pchelina, S. Increased plasma oligomeric alpha-synuclein in patients with lysosomal storage diseases / S. Pchelina [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2014. – Vol. 583. – P. 188-193.
172. Politis, M., Pagano, G., Niccolini, F. Imaging in Parkinson's Disease / M. Politis, G. Pagano, F. Niccolini // *International Review of Neurobiology*. – 2016. – Vol. 10 (1). – P. 233-274.

173. Polo, G. Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS / G. Polo [et al.] // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. – 2017. – Vol. 55. – № 3. – P. 403-414.
174. Polymeropoulos, M. Mutation in the  $\alpha$ -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease / M. Polymeropoulos // *Science*. – 1997. – Vol. 276. – № 5321. – P. 2045-2047.
175. Postuma, R. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / R. Postuma [et al.] // *Movement Disorders*. – 2015. – Vol. 30. – № 12. – P. 1591-1601.
176. Priyadarshi, A. Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis / A. Priyadarshi [et al.] // *Environmental Research*. – 2001. – Vol. 86. – № 2. – P. 122-127.
177. Prusiner, S. Prion Protein Biology / S. Prusiner [et al.] // *Cell*. – 1998. – Vol. 93. – № 3. – P. 337-348.
178. Puschmann, A. A Swedish family with de novo  $\alpha$ -synuclein A53T mutation: Evidence for early cortical dysfunction / A. Puschmann [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2009. – Vol. 15. – № 9. – P. 627-632.
179. Quik, M., Perez, X., Bordia, T. Nicotine as a potential neuroprotective agent for Parkinson's disease / M. Quik, X. Perez, T. Bordia // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27. – № 8. – P. 947-957.
180. Ran, C. Strong association between glucocerebrosidase mutations and Parkinson's disease in Sweden / C. Ran [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2016. – Vol. 45. – P. 212.e5-212.e11.
181. Rees, K. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies [Electronic resource] / K. Rees [et al.] // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2011. – Stable URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22071848>.
182. Riesner, D. Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc) / D. Riesner // *British Medical Bulletin*. – 2003. – Vol. 66 – P. 21–33.

183. Rizzi, L., Roriz-Cruz, M. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in amnesic mild cognitive impairment / L. Rizzi, M. Roriz-Cruz // *Geriatrics & Gerontology International*. – 2016. – Vol. 17. – № 2. – P. 239-245.
184. Robak, L. Excessive burden of lysosomal storage disorder gene variants in Parkinson's disease / L. Robak [et al.] // *Brain*. – 2017. – Vol. 140 – № 12. – P. 3191-3203.
185. Rocha, E. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease / E. Rocha [et al.] // *Annals of Clinical and Translational Neurology*. – 2015. – Vol. 2. – № 4. – P. 433-438.
186. Rolfs, A. Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients / A. Rolfs [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – №. 11. – P. e79732.
187. Roshan, M., Tambo, A., Pace, N. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease / M. Roshan, A. Tambo, N. Pace // *The Open Neurology Journal*. – 2016. – Vol. 10. – № 1. – P. 42-58.
188. Rothaug, M. LIMP-2 expression is critical for -glucocerebrosidase activity and -synuclein clearance / M. Rothaug [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – Vol. 111. – № 43. – P. 15573-15578.
189. Sardi, S. Glucosylceramide synthase inhibition alleviates aberrations in synucleinopathy models / S. Sardi [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2017. – Vol. 114. – № 10. – P. 2699-2704.
190. Schöndorf, D. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis [Electronic resource] / D. Schöndorf [et al.] // *Nature Communications*. – 2014. – Vol. 5. – Stable URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24905578>.
191. Schrag, A. The EQ-5D – a generic quality of life measure is a useful instrument to measure quality of life in patients with Parkinson's disease / A. Schrag // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2000. – Vol. 69. – № 1. – P. 67-73.

192. Schutyser, E., Richmond, A., Van Damme, J. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes / E. Schutyser, A. Richmond, J. Van Damme // *Journal of leukocyte biology*. – 2005. – Vol. 78. – №. 1. – P. 14.
193. Scott, D. A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in  $\alpha$ -Synuclein-Induced Neurodegeneration / D. Scott [et al.] // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30. – № 24. – P. 8083-8095.
194. Seidel, K. First appraisal of brain pathology owing to A30P mutant alpha-synuclein / K. Seidel // *Annals of Neurology*. – 2010. – Vol. 67 – №6. – P. 841.
195. Selkoe, D. Defining the Native State of  $\alpha$ -Synuclein / D. Selkoe [et al.] // *Neurodegenerative Diseases*. – 2013. – Vol. 13. – № 2-3. – P. 114-117.
196. Shachar, T. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond / T. Shachar [et al.] // *Movement Disorders*. – 2011. – Vol. 26. – № 9. – P. 1593-1604.
197. Shafieesabet, A. Hyperechogenicity of substantia nigra for differential diagnosis of Parkinson's disease: A meta-analysis / A. Shafieesabet [et al.] // *Parkinsonism & Related Disorders*. – 2017. – Vol. 42. – P. 1-11.
198. Sheehan Clinical Anxiety Rating Scale – ShARS // *Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorder: A Physician's Handbook* / T.J. McGlynn, H.L. Metcalf. – Washington, DC: American Psychiatric Press Inc, 1989. – P. 98-99.
199. Shi, M. Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson's disease / M. Shi [et al.] // *Neuroscience Letters*. – 2010. – Vol. 480. – № 1. – P. 78-82.
200. Sidransky, E. Multicenter Analysis of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson's Disease / E. Sidransky [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Vol. 361. – № 17. – P. 1651-1661.
201. Siebert, M., Sidransky, E., Westbroek, W. Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies / M. Siebert, E. Sidransky, W. Westbroek // *Brain*. – 2014. – Vol. 137. – № 5. – P. 1304-1322.

202. Smith, L., Mullin, S., Schapira, A. Insights into the structural biology of Gaucher disease / L. Smith, S. Mullin, A. Schapira // *Experimental Neurology*. – 2017. – Vol. 298. – P. 180-190.
203. Soffer, D. Central nervous system involvement in adult-onset Gaucher's disease / D. Soffer [et al.] // *Acta Neuropathologica*. – 1980. – Vol. 49. – № 1. – P. 1-6.
204. Sorge, J. Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA / J. Sorge [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1985. – Vol. 82. – № 21. – P. 7289-7293.
205. Spillantini, M.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies / M. Spillantini [et al.] // *Nature*. – 1997. - Vol. 388. – № 6645. – P. 839-840.
206. Stiasny-Kolster, K. Diagnostic value of the REM sleep behavior disorder screening questionnaire in Parkinson's disease / K. Stiasny-Kolster [et al.] // *Sleep Medicine*. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 186-189.
207. Stone, D. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease / D. Stone [et al.] // *Human Mutation*. – 2000. – Vol. 15. – № 2. – P. 181-188.
208. Su, X. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease / X. Su // *Neurobiology of Aging*. – 2008. – Vol. 29. – № 11. – P. 1690-1701.
209. Swan, M. Neuropsychiatric characteristics of GBA-associated Parkinson disease / M. Swan [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2016. – Vol. 370. – P. 63-69.
210. Sybertz, E., Krainc, D. Development of targeted therapies for Parkinson's disease and related synucleinopathies / E. Sybertz, D. Krainc // *Journal of Lipid Research*. – 2014. – Vol. 55. – № 10. – P. 1996-2003.
211. Szejder-Pacholek, A. The effect of  $\alpha$ -synuclein on gliosis and IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TGF $\beta$  expression in murine brain / A. Szejder-Pacholek [et al.] // *Pharmacological Reports*. – 2017. – Vol. 69. – № 2. – P. 242-251.
212. Taguchi, V. Glucosylsphingosine Promotes  $\alpha$ -Synuclein Pathology in Mutant GBA-Associated Parkinson's Disease / V. Taguchi [et al.] // *The Journal of Neuroscience*. – 2017. – Vol. 37. – № 40. – P. 9617-9631.

213. Tanner, C.M. Parkinson disease in twins: an etiologic study / C.M. Tanner [et al.] // JAMA. – 1999. – Vol. 281 – №4. – P. 341-346.
214. Tayebi, N. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? / N. Tayebi // Molecular Genetics and Metabolism. – 2003. – Vol. 79. – № 2. – P. 104-109.
215. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): Status and recommendations // Movement Disorders. – 2003. – Vol. 18. – № 7. – P. 738-750.
216. Toni, M., Cioni, C. Fish Synucleins: An Update / M. Toni, C. Cioni // Marine Drugs. – 2015. – Vol. 13. – № 12. – P. 6665-6686.
217. Török, R. An assessment of the frequency of mutations in the GBA and VPS35 genes in Hungarian patients with sporadic Parkinson's disease / R. Török [et al.] // Neuroscience Letters. – 2016. – Vol. 610. – P. 135-138.
218. Urrea, L. The cellular prion protein (PrPC) as neuronal receptor for  $\alpha$ -synuclein / L. Urrea [et al.] // Prion. – 2017. – Vol. 11. – № 4. – P. 226-233.
219. Vedder, A.C. Plasma chitotriosidase in male Fabry patients: a marker for monitoring lipid-laden macrophages and their correction by enzyme replacement therapy / A.C. Vedder [et al.] // Molecular genetics and metabolism. – 2006. – Vol. 89. – №. 3. – P. 239-244.
220. Villar-Piqué, A., Lopes da Fonseca, T., Outeiro, T. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies / A. Villar-Piqué, T. Lopes da Fonseca, T. Outeiro // Journal of Neurochemistry. – 2015. – Vol. 139. – P. 240-255.
221. Wang, C. Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common leucine-rich repeat kinase 2 and glucocerebrosidase genetic variants in Chinese individuals / C. Wang [et al.] // Neurobiology of Aging. – 2014. - Vol. 35. – № 3. – P. 725.e1-725.e6.
222. Wen, M. Serum uric acid levels in patients with Parkinson's disease: A meta-analysis / M. Wen [et al.] // PLOS ONE. – 2017. - Vol. 12. – № 3. – P. e0173731.

223. Winder-Rhodes, S. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort / S. Winder-Rhodes [et al.] // *Brain*. – 2013. - Vol. 136. – № 2. – P. 392-399.
224. Wirdefeldt, K. Heritability of Parkinson disease in Swedish twins: a longitudinal study / K. Wirdefeldt [et al.] // *Neurobiology of Aging*. – 2011. - Vol. 32. – № 10. – P. 1923.e1-1923.e8.
225. Wirdefeldt, K. No evidence for heritability of Parkinson disease in Swedish twins / K. Wirdefeldt [et al.] // *Neurology*. – 2004. - Vol. 63. – № 2. – P. 305-311.
226. Wohleb, E., Godbout, J. Basic Aspects of the Immunology of Neuroinflammation / E. Wohleb, J. Godbout // *Inflammation in Psychiatry*. – 2013. – Vol. 28. – P. 1-19.
227. Wu, G. Decreased activities of lysosomal acid alpha-D-galactosidase A in the leukocytes of sporadic Parkinson's disease / G. Wu [et al.] // *Journal of the Neurological Sciences*. – 2008. - Vol. 271. – № 1-2. – P. 168-173.
228. Wu, G. Decreased Expression of Lysosomal Alpha-Galactosidase A Gene in Sporadic Parkinson's Disease / G. Wu [et al.] // *Neurochemical Research*. – 2011. - Vol. 36. – № 10. – P. 1939-1944.
229. Xilouri, M., Brekk, O., Stefanis, L. Autophagy and Alpha-Synuclein: Relevance to Parkinson's Disease and Related Synucleopathies / M. Xilouri, O. Brekk, L. Stefanis // *Movement Disorders*. – 2016. - Vol. 31. – № 2. – P. 178-192.
230. Yap, T. Membrane-bound  $\alpha$ -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity / T. Yap [et al.] // *Molecular Genetics and Metabolism*. – 2013. - Vol. 108. – № 1. – P. 56-64.
231. Yap, T. Structural Features of Membrane-bound Glucocerebrosidase and  $\alpha$ -Synuclein Probed by Neutron Reflectometry and Fluorescence Spectroscopy / T. Yap [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. - Vol. 290. – № 2. – P. 744-754.
232. Yap, T.  $\alpha$ -Synuclein Interacts with Glucocerebrosidase Providing a Molecular Link between Parkinson and Gaucher Diseases / T. Yap [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. - Vol. 286. – № 32. – P. 28080-28088.

233. Yesavage, J., Sheikh, J. Geriatric Depression Scale (GDS) / J. Yesavage, J. Sheikh // *Clinical Gerontologist*. – 1986. - Vol. 5. – № 1-2. – P. 165-173.
234. Zama, K. Simultaneous quantification of glucosylceramide and galactosylceramide by normal-phase HPLC using O-phtalaldehyde derivatives prepared with sphingolipid ceramide N-deacylase / K. Zama [et al.] // *Glycobiology*. – 2009. – Vol. 19. – № 7. – P. 767-775.
235. Zampronio, A., Soares, D., Souza, G. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs / A. Zampronio, D. Soares, G. Souza // *Temperature*. – 2015. - Vol. 2. – № 4. – P. 506-521.
236. Zarranz, J. The new mutation, E46K, of  $\alpha$ -synuclein causes parkinson and Lewy body dementia / J. Zarranz [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2003. - Vol. 55. – № 2. – P. 164-173.
237. Zayed, J *Canadian Journal of Neurological Sciences* / J. Zayed [et al.] // *Journal Canadien des Sciences Neurologiques*. – 1990. - Vol. 17. – №3. – P. 286-291.
238. Zhang, X. Multiplex Enzyme Assay Screening of Dried Blood Spots for Lysosomal Storage Disorders by Using Tandem Mass Spectrometry / X. Zhang [et al.] // *Clinical Chemistry*. – 2008. – Vol. 54. – № 10. – P. 1725-1728.
239. Zhang, Y. Effect of GBA Mutations on Phenotype of Parkinson's Disease: A Study on Chinese Population and a Meta-Analysis / Y. Zhang [et al.] // *Parkinson's Disease*. – 2015. - Vol. 2015. – P. 1-10.
240. Zhao, F. Mutations of glucocerebrosidase gene and susceptibility to Parkinson's disease: An updated meta-analysis in a European population / F. Zhao [et al.] // *Neuroscience*. – 2016. - Vol. 320. – P. 239-246.
241. Zigmond, A., Snaith, R. The Hospital Anxiety and Depression Scale / A. Zigmond, R. Snaith // *Acta Psychiatrica Scandinavica*. – 1983. - Vol. 67. – № 6. – P. 361-370.
242. Zimprich, A. Mutations in LRRK2 Cause Autosomal-Dominant Parkinsonism with Pleomorphic Pathology / A. Zimprich [et al.] // *Neuron*. – 2004. - Vol. 44. – № 4. – P. 601-607.



243. Zimran, A. How I treat Gaucher disease / A. Zimran [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118. – № 6. – P. 1463-1471.
244. Zimran, A. Prediction of severity of Gaucher's disease by identification of mutation at DNA level / A. Zimran [et al.] // *The Lancet*. – 1989. - Vol. 334. – № 8659. – P. 349-352.
245. Zokaei, N. Visual short-term memory deficits associated with GBA mutation and Parkinson's disease / N. Zokaei [et al.] // *Brain*. – 2014. - Vol. 137. – № 8. – P. 2303-2311.