

На правах рукописи

**АНДОСКИН**  
**Павел Александрович**

**Альфа-синуклеин крови как белковый маркер болезни Паркинсона**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2016 год

Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», г. Гатчина.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, **Пчелина Софья Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Шаройко Владимир Владимирович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», межкафедральная лаборатория биомедицинской химии Института химии, ведущий научный сотрудник;

**Горбунова Виктория Николаевна**, доктор биологических наук, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава РФ, кафедра медицинской генетики, профессор

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта».

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.022.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12) по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69/71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, д. 12 и на сайте <http://www.iemrams.spb.ru/russian/dissov03.htm>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
доктор биологических наук

Хныченко Людмила Константиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Болезнь Паркинсона (БП) – второе по частоте нейродегенеративное заболевание человека после болезни Альцгеймера. В большинстве развитых стран в возрасте старше 65 лет БП страдает до 2% населения. Около 10% пациентов имеют семейную форму БП. Описаны редкие моногенные формы заболевания, однако в большинстве случаев заболевание носит спорадический характер (Zhu et al., 2015).

Наиболее значимым фактором риска развития БП являются мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*), повышающие риск развития заболевания в 5-6 раз во всех популяциях (Sidransky et al., 2012). Развитие симптомокомплекса заболевания (тремор, ригидность мышц, брадикинезия, постуральная нестабильность) как при наследственных, так и при спорадических формах БП, коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (ЧС) головного мозга.

Предполагается, что в основе нейродегенерации при БП лежит нейротоксическое действие олигомеров небольшого пресинаптического белка – альфа-синуклеина (*SNCA*), однако механизм нейродегенерации при БП остается неясным (Eller, Williams, 2011). По этой причине не существует лабораторных диагностических тестов БП и доля случаев неправильной постановки диагноза достигает 25%. Диагноз ставится на основании клинического осмотра невролога в то время, когда сохранными остаются около 20% дофаминергических нейронов ЧС, что затрудняет разработку эффективной нейропротекторной терапии. В настоящее время не существует лекарственных средств, способных предотвратить или замедлить процесс нейродегенерации при БП.

Скрининг генетических факторов риска развития БП (в частности мутаций в гене *GBA*) позволяет в ряде случаев выделить группы высокого риска развития БП. Однако даже в этом случае невозможно говорить о сроке манифестации заболевания. Необходимость разработки подходов, направленных на раннее выявление БП, а также её дифференциальную диагностику не вызывает сомнений.

**Степень научной разработанности темы.** В настоящее время ключевым патологическим процессом, лежащим в основе развития БП рассматривается агрегация белка альфа-синуклеина. Описаны моногенные формы БП, обусловленные как точковыми мутациями в гене *SNCA*, так и мультипликацией нормальной последовательности гена. Ряд данных указывает на то, что повышение концентрации альфа-синуклеина является достаточным фактором для формирования его нейротоксичных олигомерных форм. Исследование пациентов с БП, связанной с трипликацией гена *SNCA*, приводящей к увеличению концентрации белка в клетках мозга и крови показали, что такое накопление альфа-синуклеина является достаточным для развития заболевания. Повышенная экспрессия гена *SNCA* в

дофаминергических нейронах *in vitro* и *in vivo* сопровождается формированием олигомерных структур альфа-синуклеина и гибелью нейронов. Модель паркинсонизма на животных, полученная путем гиперэкспрессии гена *SNCA* человека, отражает основные симптоматические и патоморфологические проявления БП – возрастное нарушение моторики, ассоциированное с гибелью дофаминергических нейронов мозга.

В настоящее время высказывается предположение, что измерение уровня альфа-синуклеина периферических жидкостей и тканей может служить прогностическим маркером заболевания.

В данной работе впервые исследуется возможность использования оценки уровня альфа-синуклеина однородной фракции CD45+ клеток крови в качестве прогностического маркера БП, а также изучается влияние дофамина плазмы и однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) в 3'-области гена *SNCA* на уровень мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках.

**Цель исследования.** Исследование ассоциации вариантов гена *SNCA* и уровня белка альфа-синуклеина крови с болезнью Паркинсона.

**Задачи исследования:**

1. Оценить вклад вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена *SNCA* в риск развития БП в России.
2. Оценить уровень мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови у пациентов, находящихся на ранних стадиях БП и не получающих терапию Л-ДОФА-содержащими препаратами, и в контрольной группе.
3. Оценить уровни общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов со спорадической БП, а также уровень олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов с *GBA*-ассоциированной БП и в контрольной группе.
4. Оценить влияние вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена *SNCA* на уровень мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови у пациентов с БП и в контрольной группе.
5. Оценить корреляцию уровня дофамина в плазме крови с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови у пациентов с БП и в контрольной группе.

**Научная новизна:**

1. Впервые в России показана ассоциация носительства варианта G (rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G)) гена *SNCA* с риском развития БП.
2. Впервые показана ассоциация варианта G (rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G)) гена *SNCA* с повышением уровня мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови в контрольной группе.

3. Впервые показано повышение уровня олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов с *GBA*-ассоциированной БП по сравнению с контрольной группой и группой пациентов со sporadicческой БП. Также было показано, что уровень общего альфа-синуклеина однородной фракции CD45+ клеток периферической крови не может рассматриваться в качестве маркера БП.
4. Впервые показана корреляция уровня дофамина в плазме крови с уровнем альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови у лиц контрольной группы и уровнем мРНК гена *SNCA* у пациентов с БП.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Результаты, полученные в ходе выполнения данного исследования, представляют интерес для понимания биохимических и молекулярно-генетических основ патогенеза БП.

Показано, что носительство варианта G (rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G)) гена *SNCA* ассоциировано с повышенным риском развития БП. Также у носителей вышеуказанного варианта гена показано повышение уровня мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках у лиц контрольной группы.

Повышенный уровень олигомеров альфа-синуклеина в плазме выявлен у пациентов с *GBA*-ассоциированной БП.

Полученные данные могут быть полезны для выявления групп риска БП, а также для разработки подходов к ранней диагностике *GBA*-ассоциированной БП.

**Методология и методы исследования.** Исследование уровней различных форм белка альфа-синуклеина, мРНК гена *SNCA*, дофамина, гемоглобина, а также генотипирование были произведены с использованием периферической крови, полученной от пациентов с БП, а также от лиц контрольной группы, не имеющих неврологических расстройств. Вышеперечисленные показатели были исследованы с использованием биохимических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов. Изучены ассоциации вариантов генов с риском развития БП, корреляции уровней изученных параметров друг с другом. Исследование проведено с исключением ряда факторов, влияние которых могло вносить значительные искажения в результаты исследования. Все эксперименты выполнены в строгом соответствии с требованиями инструкций производителей коммерческих наборов, а также в соответствии с ранее описанными в научной литературе методиками.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Вариант G (rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G)) гена *SNCA* повышает риск развития БП и ассоциирован с повышением уровня мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови у лиц контрольной группы.
2. При спорадической БП не наблюдается изменения уровней общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови, а также уровней мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови.
3. Развитие *GBA*-ассоциированной БП характеризуется повышением уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови.
4. Уровень дофамина в плазме крови коррелирует с уровнем альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови у лиц контрольной группы, а также с уровнем мРНК гена *SNCA* в CD45+ клетках у пациентов с БП.

### **Степень достоверности и апробация материалов исследования.**

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

Предложенные к защите результаты были доложены на II и III Национальном конгрессе с международным участием по болезни Паркинсона и расстройствам движений, Москва, 2011, 2014; Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 2012; Международной Пуцинской школе-конференция молодых ученых, Пущино, 2013; Европейской конференции по генетике человека, Милан, 2014; I Конференции молодых ученых и специалистов ПИЯФ, Гатчина, 2014; Международной медико-биологической конференции молодых исследователей, посвященной двадцатилетию медицинского факультета СПбГУ, Санкт-Петербург, 2015; Российском конгрессе с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное», Санкт-Петербург, 2015.

**Публикации.** Результаты диссертационного исследования отражены в 4 печатных работах соискателя, в том числе опубликованы в 4 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации основных результатов диссертационных исследований.

**Личный вклад автора.** Наблюдение пациентов с БП, забор периферической крови производился сотрудниками ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, центра экстрапирамидных расстройств и нарушения движений клиники ФГБНУ ИЭМ. Выделение ДНК, мРНК выполнялось автором лично.

Сбор плазмы крови, выделение лимфоцитов и однородных CD45+ клеток крови выполнялись автором лично. Генотипирование полиморфных вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена *SNCA*, мутаций в гене *GBA* выполнялось автором лично. Выделение мРНК и измерение относительного уровня мРНК методом ПЦР в режиме реального времени выполнялись автором лично. Совместно с научным руководителем Пчелиной С.Н. проводилась оценка уровня общего белка в лизате клеток, оценка уровня альфа-синуклеина, гемоглобина и дофамина крови методом иммуноферментного анализа (ИФА). Полученные данные были подвержены статистической обработке автором лично. Выводы были сформулированы автором лично. Описание исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно. Совместно с соавторами и научным руководителем обсуждались все материалы, освещенные в данном исследовании.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, содержит 11 таблиц, иллюстрирована 25 рисунками и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения исследования, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 211 научный источник (19 – на русском языке и 192– на иностранном).

**Основное содержание работы.** Глава 1 содержит обзор современной литературы о клинических и патогенетических характеристиках БП, о её наследственных основах, а также характеризует белок альфа-синуклеин, рассматриваемый сегодня в качестве центрального звена патогенеза БП. Глава 2 описывает основные характеристики обследованных групп, а также материалы и методы исследования. В Главе 3 объединены результаты, полученные в рамках данного исследования, а также приводится их обсуждение. Далее приведены заключение, выводы, список сокращений и список литературы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Общая характеристика групп.** Критерием отбора пациентов служило сочетание хотя бы двух фенотипических проявлений, характерных для БП: гипокинезия, ригидность, тремор покоя, постуральная неустойчивость. Пациенты были обследованы в консультативно-диагностическом центре ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова и в центре экстрапирамидных расстройств и нарушения движений клиники ФГБНУ ИЭМ. Всего в исследование вошло 480 пациентов с БП и 262 индивидуума контрольной группы. Для идентификации мутаций в гене *GBA* у пациентов с БП с целью формирования

однородной по этиологии группы пациентов были доступны образцы ДНК 480 пациентов с БП (у 300 из них было проведено генотипирование полиморфного варианта G1093A, приводящего к аминокислотной замене E326K). В исследовании ОНП гена *SNCA* были использованы ДНК 260 пациентов с БП и 262 индивидуумов контрольной группы.

В исследование генетических вариантов гена *SNCA* вошло 260 пациентов с БП (средний возраст  $63,8 \pm 9,8$  лет, 150 мужчин и 110 женщин).

Контрольная группа состояла из 262 индивидуумов (средний возраст  $67,7 \pm 8,8$ , 142 мужчины и 120 женщин), состоящих на учёте в Санкт-Петербургском Городском Гериатрическом Центре. Все члены контрольной группы проходили обследование у невролога с целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний. Данная выборка является случайной и принадлежит к тому же географическому региону, что и включенная в анализ группа лиц с БП. Включенная в исследование группа пациентов не отличалась от контрольной группы по полу и возрасту.

В ходе данного исследования был создан банк плазмы крови и CD45+ клеток крови пациентов с БП (N=43, 12 мужчин, 31 женщина, средний возраст  $60,0 \pm 7,0$  лет) и лиц контрольной группы (N=39, 18 мужчин, 21 женщина, средний возраст  $61,0 \pm 9,0$  лет). Пациенты со спорадической БП, входящие в исследуемые группы по оценке уровня белка альфа-синуклеина в крови не получали терапию Л-ДОФА-содержащими препаратами, что исключает влияние повышенного уровня дофамина на уровень белка альфа-синуклеина, а также уровень мРНК гена *SNCA* в клетках.

Для оценки уровня белка альфа-синуклеина в группу пациентов с *GBA*-ассоциированной БП вошли 17 человек (10 пациентов были доступны для вызова и забора плазмы крови, 7 образцов плазмы крови были предоставлены Научным центром неврологии РАМН (г. Москва)). Средний возраст пациентов с *GBA*-ассоциированной БП составил  $59,7 \pm 5,5$  лет (10 мужчин, 7 женщин). Ряд пациентов с данной формой БП принимал Л-ДОФА-содержащие препараты.

Все индивидуумы контрольной группы прошли осмотр невролога с целью исключения неврологических заболеваний.

Исследование было одобрено этическим комитетом соответствующих клинических учреждений и проводилось при получении информированного согласия.

**Экспериментальные методы.** Забор 10-15 мл периферической крови из локтевой вены у исследуемых осуществлялся в стерильные вакутейнеры, содержащие 100 мкл 0,5М ЭДТА (рН 8,0) в качестве антикоагулянта. Собранная кровь замораживалась и хранилась при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Плазма крови была получена из цельной венозной крови, собранной в вакуумные пробирки с ЭДТА, путем центрифугирования 20 мин при 300 g. Полученные образцы плазмы хранились при  $-70^{\circ}\text{C}$ .



Геномная ДНК была выделена методом фенольно-хлороформной экстракции из лейкоцитов периферической крови (Маниатис и др., 1984).

Для идентификации полиморфного варианта G1093A в гене *GBA*, приводящего к аминокислотной замене E326K, был разработан новый метод, основанный на проведении ПЦР и рестрикционного анализа. Для выявления мутаций A1226G (N370S) и T1448C (L444P) были использованы описанные ранее методы, основанные на проведении ПЦР и рестрикционного анализа (Aharon-Peretz et al., 2004).

Для идентификации ОНП гена *SNCA* - rs356219 и rs356165 были разработаны новые методы на основе ПЦР и рестрикционного анализа (Emelyanov et al., 2013).

CD45+ клетки были выделены из 8 мл периферической крови путём центрифугирования в градиенте плотности раствора фиколла ( $\rho=1,077\pm 0,001$ , Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) и последующим отбором слоя лимфоцитов. С целью очистки лимфоцитарной фракции от других клеток крови была проведена магнитная сепарация лимфоцитарной смеси с использованием магнитного ручного сепаратора MACS (Miltenyi Biotec, США) и колонок miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США).

Тотальная РНК была выделена из CD45+ клеток с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104, США) в соответствии с инструкциями изготовителя. кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit (K1622, Thermo scientific, Литва).

Определение уровня мРНК гена *SNCA* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческого набора, содержащего краситель-интеркаллятор SYBRGreen 1 (SsoISyberGreen, Bio-Rad, США) на приборе CFX96 (BioRad, США). В качестве референсного гена был использован конститутивно экспрессирующийся в клетках ген *GNB2L1* (*guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like*). Праймеры для амплификации фрагментов кДНК были разработаны с использованием программы Primer Express.

Уровень общего альфа-синуклеина был оценен в плазме крови и в однородной фракции CD45+ клеток крови. Уровень олигомерного альфа-синуклеина был оценен в плазме крови. Лизис CD45+ клеток крови осуществлялся с использованием набора Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США). Измерение уровня общего белка в клеточных лизатах было проведено с использованием набора Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific, США). В экспериментах были использованы образцы клеточных лизатов, концентрация общего белка в которых была выравнена (по 6 мкг в образце).

Для оценки уровня общего и олигомерного альфа-синуклеина в исследуемых образцах нами был использован метод ИФА с использованием коммерческих наборов. Для определения концентрации общего альфа-синуклеина был использован набор Human alpha-synuclein ELISA kit

(Invitrogen, США), а для определения концентрации олигомерного альфа-синуклеина – набор Human Synuclein OLIGO kit (ajRoboscreen, Германия). Для определения уровня олигомерного альфа-синуклеина был проведен ИФА с использованием специфичных моноклональных антител 5G4B (Kovacs et al., 2012).

Оценку уровня дофамина в плазме крови проводили методом ИФА с использованием набора для исследования дофамина в физиологических жидкостях (Dopamine Research ELISA AE 5300, Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG, США). Для оценки степени гемолиза эритроцитов нами проведено измерение уровня гемоглобина в плазме крови в исследуемых образцах. Оценка уровня гемоглобина в плазме крови проводилась с использованием набора Hemoglobin (Human) ELISAKit (Abnova, США).

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS (версия 12.0) и Graph Pad Prism (версия 4.03). Значения  $p < 0,05$  принимали как статистически значимые. Значения медиан по тексту представлены в виде «медиана (мин, макс)». Все исследуемые группы статистически соответствовали по возрасту и полу.

Определение соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов в популяциях равновесию Харди-Вайнберга проводился с использованием критерия  $\chi^2$ .

Для сравнения распределения генотипов между группами был использован критерий  $\chi^2$ .

Отношение шансов (OR) рассчитывался с 95% доверительным интервалом (CI).

Анализ неравновесного сцепления проводился с использованием программного обеспечения Haploview (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>).

Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро-Уилка. Сравнение вариационных рядов между исследуемыми группами выполняли методом Крускала-Уоллеса. Для сравнения вариационных рядов между двумя группами сравнения использовали t-критерий Стьюдента (в случае соответствия нормальному распределению) или критерий Манна-Уитни (в случае отсутствия соответствия нормальному распределению). Для анализа корреляции между количественными характеристиками пользовались методом Спирмана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Скрининг вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена SNCA в группе пациентов с БП и в контрольной группе.** В настоящем исследовании проведена оценка частот генотипов rs356219 и rs356165 гена SNCA среди пациентов с БП и лиц контрольной группы в Северо-Западном

регионе России. Данные полиморфные варианты, локализованные в 3'-области гена, были выбраны нами для исследования так как по результатам мета-анализа зарубежных GWAS была выявлена их высоко значимая ассоциация с БП.

Частоты генотипов rs356219 и rs356165 гена *SNCA* в группе пациентов с БП и в контрольной группе представлены в Таблице 1. Показано, что в случае ОНП rs356219 носительство варианта G (генотипы GG+AG) ассоциировано с увеличением риска развития БП в 1,56 раз ( $p=0,01$ ), а в случае rs356165 носительство варианта G (генотипы GG+AG) ассоциировано с увеличением риска развития заболевания в 1,53 раза ( $p=0,03$ ).

Таблица 1

Частоты генотипов rs356219 и rs356165 гена *SNCA* в группе пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе

Ген, ОНП, N (БП/контроль)	БП, N (%)			Контроль, N (%)			OR, p
	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
<i>SNCA</i> A/G (rs356219) 260/262	94 (36,2)	127 (48,8)	39 (15,0)	123 (46,9)	110 (42,0)	29 (11,1)	(GG+AG vs. AA)=1,56 [95%CI:1,10-2,22], p=0,01.
<i>SNCA</i> A/G (rs 356165) 260/262	81 (31,2)	135 (51,9)	44 (16,9)	107 (40,8)	122 (46,6)	33 (12,6)	(GG+AG vs. AA) =1,53 [95%CI:1,06-2,19], p=0,03.

A обозначает наиболее распространенный аллель, B – редкий аллель, AA – гомозигота по наиболее распространенному аллелю, AB – гетерозигота, BB – гомозигота по редкому аллелю, OR – отношение шансов.

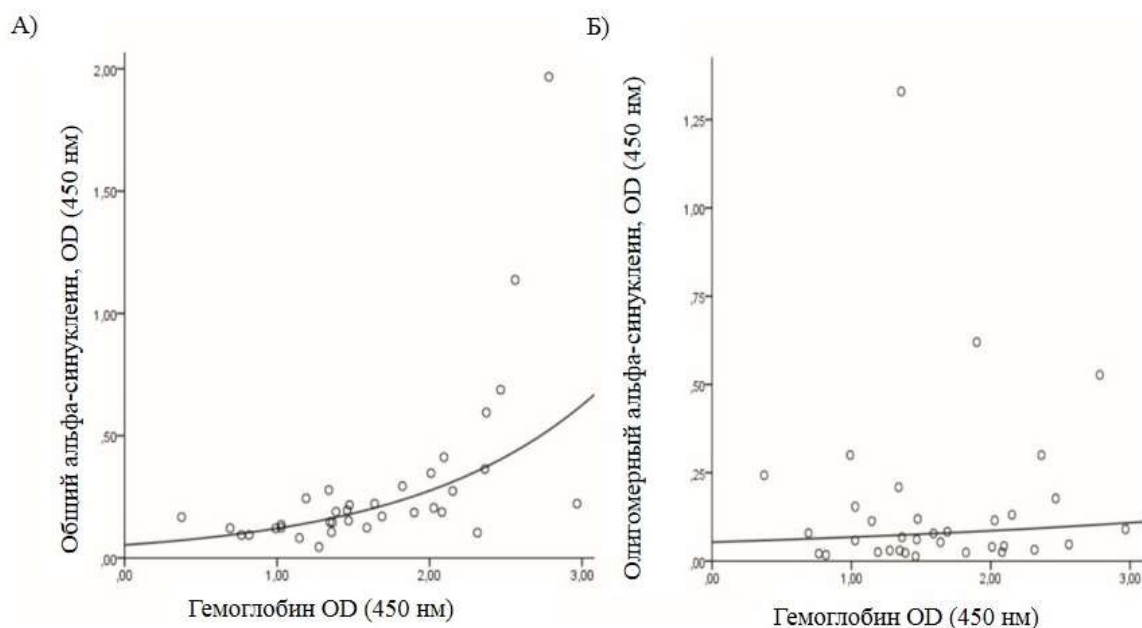
В настоящем исследовании впервые для российской популяции показано увеличение риска развития БП в случае носительства варианта G (rs356219 и rs356165) гена *SNCA*, что согласуется с зарубежными данными. Также подтверждено выявленное ранее высокое неравновесное сцепление аллельных вариантов rs356165 и rs356219 гена *SNCA*. Показатель неравновесного сцепления ( $D'$ ) был рассчитан для общей выборки ( $N=522$ ) и составил 0,926, что свидетельствует о высоком неравновесном сцеплении rs356219 с rs356165 гена *SNCA*.

Исследованные полиморфные варианты локализованы в 3'-области гена *SNCA*. Хотя ассоциация данных полиморфных вариантов с БП показана во многих популяциях мира, механизм повышения риска развития БП у носителей определенных аллелей остается неясным.

**Оценка уровня общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови.** Известно, что содержание альфа-синуклеина в клетках крови различно. Так, наибольших значений концентрация альфа-синуклеина периферической крови достигает в эритроцитах. По причине возможной контаминации плазмы крови эритроцитами, результаты измерений уровня альфа-синуклеина в плазме могут быть искажены из-за гемолиза.

Для оценки степени гемолиза в исследуемых образцах плазмы крови нами проведено измерение уровня гемоглобина у пациентов с БП (N=17) и у лиц контрольной группы (N=18). Уровень гемоглобина варьировал от 12614 до 591041 нг/мл.

В результате проведения корреляционного анализа была выявлена прямая корреляция уровня гемоглобина с уровнем общего альфа-синуклеина в плазме в объединенной группе пациентов с БП и лиц контрольной группы (N=35) ( $r=0,714$ ,  $p<0,0001$ ) (Рисунок 1 (А)). Однако не было обнаружено корреляции между уровнем гемоглобина и олигомерного альфа-синуклеина в указанных группах: для объединенной группы (БП+контрольная группа) ( $r=0,198$ ,  $p=0,46$ ) (Рисунок 1 (Б)).



**Рисунок 1.** Оценка корреляции уровня гемоглобина с уровнем (А) общего альфа-синуклеина и (Б) олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови в объединенной группе пациентов с БП и у лиц контрольной группы.

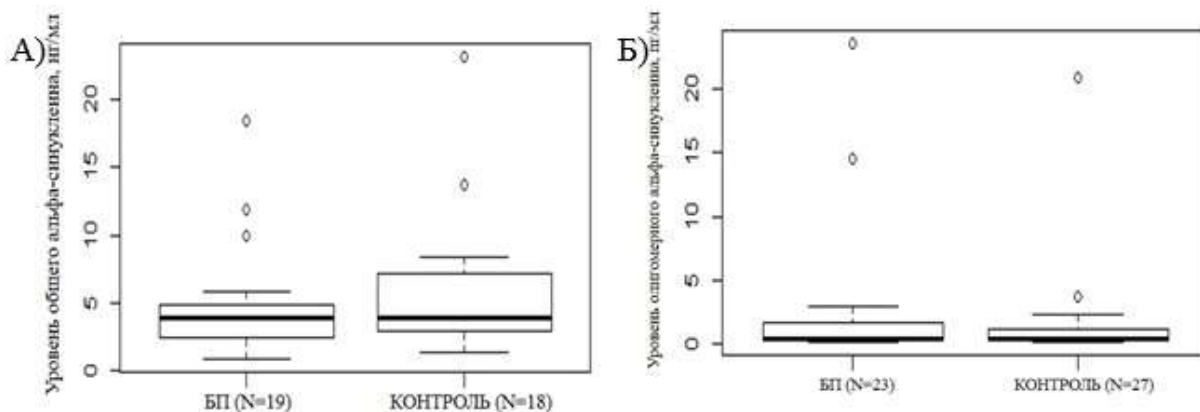
Выявленная нами прямая корреляция уровня гемоглобина и общего альфа-синуклеина в плазме крови неоднократно отмечалась ранее (Shi et al., 2010; Hong et al., 2010; Aerts et al., 2012). При этом сопоставление степени гемолиза с уровнем олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови проведено нами впервые. Корреляции анализируемых параметров выявлено не было. Возможной причиной этого может служить тот факт, что источник олигомеров альфа-синуклеина в биологических жидкостях до сих пор не известен. Полученные данные позволяют предположить, что уровень

олигомерных форм альфа-синуклеина не зависит от гемолиза. В настоящее время именно олигомерные формы альфа-синуклеина считаются нейротоксичными.

При оценке уровня общего альфа-синуклеина в плазме крови среди пациентов с БП медиана концентрации составила (медиана (мин.-макс.), нг/мл) 3,89 (0,80-18,41), в контрольной группе – 3,88 (1,26-23,24). При сопоставлении вариационных рядов полученных значений между группами отличий в уровне общего альфа-синуклеина в плазме крови не выявлено ( $p=0,63$ ) (Рисунок 2 (А)).

При оценке уровня олигомерных форм альфа-синуклеина среди пациентов с БП медиана концентрации олигомерных форм альфа-синуклеина составила (медиана (мин.-макс.), пг/мл) 0,42 (0,16-23,6), в группе соответствующего возрастного контроля медиана составила 0,48 (0,16-20,9). При сопоставлении вариационных рядов полученных значений между группами отличий в уровне олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови также не выявлено ( $p=0,98$ ) (Рисунок 2 (Б)).

Не было выявлено корреляции уровня общего альфа-синуклеина в плазме с возрастом начала заболевания у пациентов с БП и в контрольной группе ( $p=0,76$  и  $p=0,69$  соответственно). Также не было обнаружено корреляции уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме с возрастом в группе пациентов с БП и у лиц контрольной группы ( $p=0,28$  и  $p=0,97$  соответственно).



**Рисунок 2.** Уровень общего (А) и олигомерного (Б) альфа-синуклеина в плазме крови в группе пациентов с БП и в контрольной группе.

Нами, как и в ряде других исследований не показано различия уровня общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови между пациентами с БП и в контрольной группе (Hong et al., 2010; Shi et al., 2010; Foulds et al., 2011; Park et al., 2011).

Суммируя полученные результаты можно предположить, что использование уровня общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови не является перспективным направлением поиска биомаркера заболевания. Анализируя данные литературы, можно сделать вывод об

увеличении уровня олигомерного альфа-синуклеина в спинномозговой жидкости (СМЖ), что свидетельствует о потенциальной возможности рассмотрения данной формы альфа-синуклеина в качестве биомаркера БП, однако это не являлось предметом данного исследования.

**Выявление *GBA*-ассоциированной БП и оценка уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов с *GBA*-ассоциированной БП.** С целью выявления однородной по этиологии БП с наличием мутаций в гене *GBA* (*GBA*-БП) среди пациентов был проведен скрининг двух мутаций в гене *GBA* (мутации A1226G, приводящей к аминокислотной замене N370S и мутации T1448C, приводящей к аминокислотной замене L444P). Указанные мутации являются мажорными и в сумме составляют 70% мутантных аллелей гена *GBA* (Lesage et al., 2011). Их наличие приводит к снижению активности фермента *GBA* до 13% в случае замены A1226G и до 5% в случае T1448C.

Всего для выявления вышеуказанных мутаций было произведено генотипирование у 480 пациентов с БП, в результате которого было выявлено 13 носителей. Из них носителей мутации T1448C (L444P) – 10 человек (частота – 2,1%) и носителей мутации A1226G (N370S) – 3 человека (частота – 0,6%).

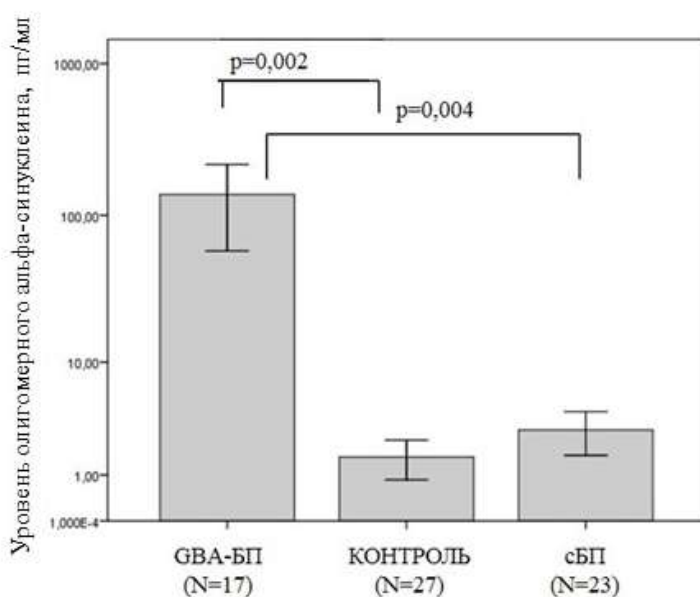
Скрининг полиморфного варианта G1093A (E326K) был проведен среди 300 пациентов с БП. В результате было выявлено 11 носителей (частота 3,67%). Полученные частоты соответствуют аналогичным для европейских популяций (Lesage et al., 2011), а также согласуются с полученными нами ранее данными по Северо-Западному региону России (Emelyanov et al., 2012). Необходимо отметить, что при проведении прямого секвенирования кодирующей области гена *GBA* частота выявления *GBA*-БП увеличивается незначительно. Так в Европе *GBA*-БП составляет 4-5% всех случаев заболевания. Суммарная частота носительства мутаций в гене *GBA* у пациентов со sporadicческой БП в России 4,1%.

Высокий риск БП у носителей мутаций в гене *GBA* (риск повышается в 5-6 раз) был ранее выявлен во многих популяциях мира, включая отечественную. При этом отмечается ряд особенностей клинического течения *GBA*-БП. Так, многократно показано, что для *GBA*-БП характерно раннее начало заболевания, однако по симптоматике *GBA*-БП не отличается от sporadicческой БП.

В нашем исследовании из 17 пациентов с *GBA*-БП, вошедших в исследование по оценке уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме, 6 пациентов имели раннее начало БП (до 50 лет).

Медиана концентрации олигомерного альфа-синуклеина в группе пациентов с *GBA*-БП составила (медиана (мин., макс.) - 1,75 (0,48 - 1259,41)). Было получено статистически значимое увеличение уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме у пациентов с *GBA*-БП по сравнению с лицами

контрольной группы ( $p=0,002$ ) и пациентами со спорадической БП ( $p=0,004$ ) (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Уровень олигомерного альфа-синуклеина в плазме у пациентов с GBA-БП, у лиц контрольной группы и у лиц со спорадической БП (сБП).

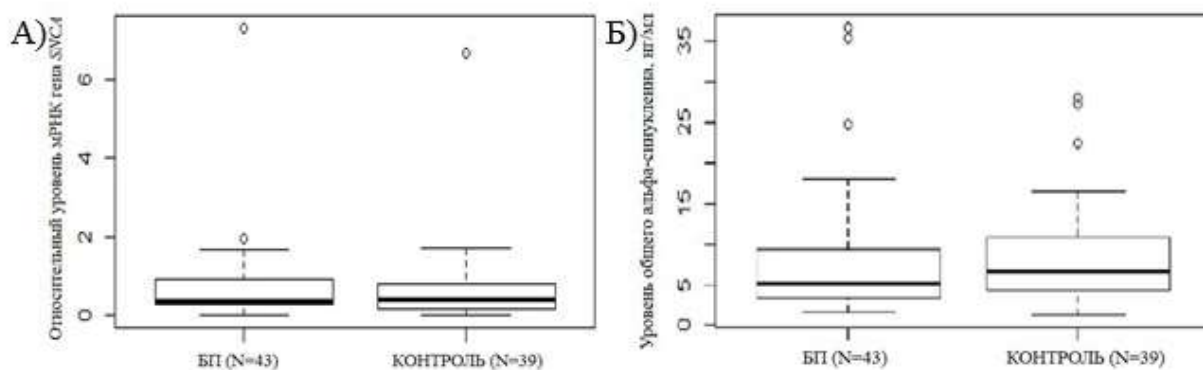
В ходе настоящего исследования мы впервые показали, что, по крайней мере, в некоторых случаях однородная по этиологии моногенная форма БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*, может характеризоваться повышенным уровнем олигомерных форм альфа-синуклеина. Необходимо отметить, что ранее увеличение олигомеров и димеров альфа-синуклеина в плазме крови было показано у гомозиготных носителей мутаций в гене *GBA* (пациенты с болезнью Гоше (Argyriou et al., 2012; Pchelina et al., 2014)). Более того, уровень олигомеров альфа-синуклеина в плазме у пациентов с болезнью Гоше обратно коррелировал с активностью *GBA*. В сумме полученные данные позволяют предполагать повышение нейротоксичных форм альфа-синуклеина при дисфункции *GBA*, что дает возможность высказывать предположение о том, что для лечения *GBA*-ассоциированной БП могут быть эффективны подходы, повышающие активность *GBA*, в частности применение фармакологических шаперонов *GBA*.

**Оценка уровня мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови.** Метод фикольного центрифугирования обладает недостаточной полнотой фильтрации клеток периферической крови, и примесь эритроцитов в получаемой над фиколом лимфоцитарной фракции по данным литературы составляет  $5\pm 2\%$ . С целью исключения контаминации фракции лимфоцитов эритроцитами, нами с использованием метода магнитного сортирования была получена однородная фракция CD45+ клеток периферической крови. Фракция CD45+ клеток крови была получена от пациентов с БП (N=43) и лиц контрольной группы (N=39). В указанных

группах мы провели оценку уровня мРНК гена *SNCA* и уровня белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови.

Относительный уровень мРНК гена *SNCA* составил для пациентов с БП (медиана (мин-макс)) – 0,53 (0,0006–7,33) и для индивидуумов контрольной группы – 0,71 (0,01–6,67). Статистически значимых отличий в уровне мРНК гена *SNCA* между исследуемыми группами выявлено не было ( $p=0,48$ ) (Рисунок 4 (А)).

Уровень белка альфа-синуклеина в исследуемых группах составил (медиана (мин-макс), нг/мл): у пациентов с БП – 5,05 (1,59–36,80), в соответствующей по возрасту контрольной группе – 6,59 (1,21–28,10) соответственно. Статистически значимых отличий в уровне белка альфа-синуклеина между группой пациентов с БП и контрольной группой также выявлено не было ( $p=0,28$ ) (Рисунок 4 (Б)).



**Рисунок 4.** Относительный уровень мРНК гена *SNCA* (А) и уровень общего альфа-синуклеина (Б) в CD45+ клетках периферической крови у пациентов с БП и у лиц контрольной группы.

В результате исследования показано отсутствие корреляции уровня мРНК гена *SNCA* с возрастом как в группе пациентов с БП ( $p=0,37$ ), так и в контрольной группе ( $p=0,65$ ). Также в данных группах отсутствовала корреляция уровня альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови с возрастом пациентов и лиц контрольной группы на момент обследования ( $p=0,36$  и  $p=0,94$  соответственно). Ранее были получены данные о возрастании экспрессии гена *SNCA* с возрастом, однако в настоящем исследовании возрастной диапазон пациентов и лиц контроля был небольшим, что, вероятно, не позволило выявить данные закономерности.

В ходе исследования не было выявлено корреляции уровня альфа-синуклеина с относительным уровнем мРНК гена *SNCA* в CD45+ клетках крови у пациентов с БП ( $p=0,44$ ) и у лиц контрольной группы ( $p=0,61$ ).

Нами впервые был оценен уровень альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови. Данный объект исследования (мононуклеары крови) является общепринятым и наиболее доступным при изучении молекулярных основ БП. В CD45+ клетках крови человека реализуются процессы синтеза

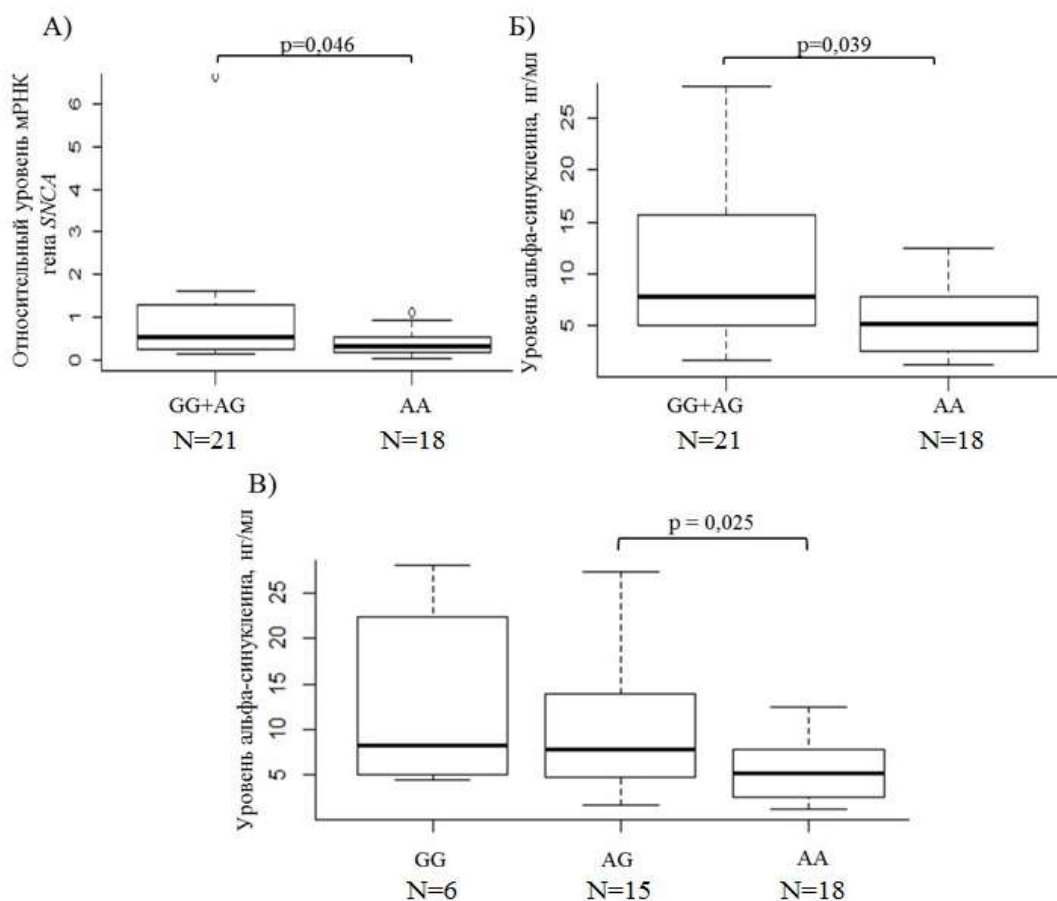


дофамина, альфа-синуклеина и на их мембране представлены рецепторы дофамина и дофаминовый транспортер. Также следует отметить схожесть процессов синтеза и метаболизма дофамина в лимфоцитах и дофаминергических нейронах, что позволяет предположить возможность влияния дофамина на внутриклеточные процессы (Marazziti et al., 2008). CD45+ клетки крови схожи с дофаминергическими нейронами по ряду биохимических изменений, происходящих в результате развития БП, такими как снижение протеасомной активности, повышение активности каспаз, изменение содержания дофамина и дофаминовых транспортеров.

**Оценка влияния полиморфных вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена SNCA на уровень мРНК SNCA и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови.** В результате оценки ассоциации вариантов rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G) гена SNCA с уровнем мРНК гена SNCA и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках в группе пациентов с БП и в контрольной группе было показано повышение уровня как мРНК гена SNCA, так и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови у носителей варианта G (GG+AG), ассоциированного с риском БП, по сравнению с носителями генотипа AA среди лиц контрольной группы ( $p=0,046$  и  $p=0,039$  соответственно) (Рисунок 5 (А, Б)).

Нами было также проведено сопоставление уровня белка альфа-синуклеина и мРНК гена SNCA в CD45+ клетках крови у носителей различных генотипов ОНП rs356219 и rs356165 гена SNCA (генотипы AA, GG, AG) в группе пациентов с БП и в контрольной группе.

Было обнаружено увеличение уровня белка альфа-синуклеина в контрольной группе у носителей генотипа AG по сравнению с носителями генотипа AA ( $p=0,025$ ), а также у носителей генотипа GG по сравнению с носителями генотипа AA rs356219 и rs356165 отмечалось увеличение уровня белка альфа-синуклеина на границе статистической значимости ( $p=0,07$ ) (Рисунок 5 (В)).



**Рисунок 5.** Относительный уровень мРНК гена *SNCA* (А) и уровень белка альфа-синуклеина (Б) в CD45+ клетках периферической крови у носителей варианта G (генотипы GG+AG) и генотипа AA; (В) уровень белка альфа-синуклеина у носителей различных генотипов (rs356219 и rs356165) гена *SNCA* в контрольной группе.

При оценке ассоциации rs356219 и rs356165 гена *SNCA* с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках у пациентов с БП статистически значимых различий между группами носителей генотипов GG+AG и AA, а также и между группами пациентов - носителей генотипов GG, AG и AA показано не было ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, нами проведена оценка ассоциации вариантов rs356219 и rs356165 с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в однородной фракции CD45+ клеток периферической крови у пациентов с БП и в контроле.

В настоящем исследовании нами впервые показана ассоциация варианта G rs356219 и варианта G rs356165 с повышением уровня экспрессии гена *SNCA* в CD45+ клетках крови у лиц контрольной группы. В тоже время нами не было выявлено ассоциации данных ОНП с изменением уровня измеряемых параметров в группе пациентов с БП. В аналогичном исследовании Fuchs с соавторами (2008) по изучению влияния rs356219 на экспрессию гена *SNCA* и уровень белка альфа-синуклеина в лимфоцитарной фракции периферической крови как у пациентов с БП, так и в контроле

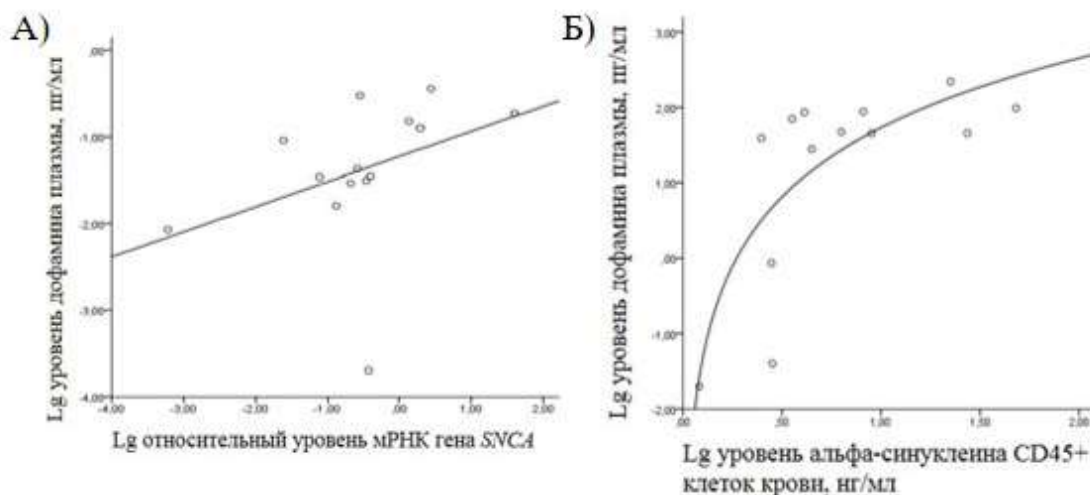
значимых различий не наблюдалось. Однако в данном исследовании не учитывалась контаминация образцов эритроцитами, что могло вносить возможную погрешность в полученные ими результаты.

Полученные нами данные предполагают, что варианты G (rs356219) и G (rs356165) гена *SNCA* могут влиять на риск развития БП в результате их ассоциации с повышением экспрессии гена *SNCA*, и повышенным уровнем белка альфа-синуклеина.

**Оценка корреляции уровня дофамина плазмы крови с уровнем мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови.** В ходе настоящего исследования нами был оценен уровень дофамина плазмы крови у пациентов с БП и в контрольной группе. Статистически значимых различий в уровне дофамина между группами выявлено не было ( $p=0,74$ ). Медианы концентраций составили: медиана (мин-макс), пг/мл: пациенты с БП -139,54 (0,2-363,16), лица контрольной группы - 45,56 (0,02–219,8).

Корреляцию уровня дофамина плазмы крови с уровнем мРНК гена *SNCA* в CD45+ клетках крови и уровнем общего альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови оценивали в группе пациентов с БП (N=13) и контрольной группе (N=13).

Нами выявлена прямая корреляция уровня дофамина плазмы крови с относительным уровнем мРНК гена *SNCA* в CD45+ клетках крови в группе пациентов с БП ( $r=0,68$ ,  $p=0,01$ ) (Рисунок 6 (А)), а также прямая корреляция уровня дофамина плазмы крови с уровнем общего альфа-синуклеина CD45+ клеток крови у лиц контрольной группы ( $r=0,71$ ,  $p=0,007$ ) (Рисунок 6 (Б)).



**Рисунок 6.** Корреляция уровня дофамина плазмы крови с (А) относительным уровнем мРНК гена *SNCA* в CD45+ клетках крови в группе пациентов с БП и (Б) уровнем общего альфа-синуклеина в CD45+ клетках в контрольной группе.

В настоящем исследовании мы оценивали уровень общего альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови. Оценка уровня

олигомерных форм альфа-синуклеина в данной клеточной фракции нами не проводилась. Однако наблюдаемая корреляция уровня дофамина с уровнем мРНК гена *SNCA* у пациентов с БП и уровнем белка альфа-синуклеина у лиц контрольной группы согласуется с результатами исследований *in vitro* о влиянии дофамина на уровень экспрессии гена *SNCA* (Matsumoto et al., 2010). Следует отметить, однако, что нельзя исключать и обратного влияния альфа-синуклеина на дофамин по той причине, что альфа-синуклеин является ингибитором ключевого фермента синтеза дофамина – тирозингидроксилазы.

Обобщая полученные данные, необходимо подчеркнуть важное значение наблюдаемой корреляции, связывающей дофамин и альфа-синуклеин. Наличие этой связи может способствовать пониманию молекулярных механизмов БП и объяснению селективной гибели дофаминергических нейронов, наблюдаемой при БП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании изучена возможность использования оценки уровня альфа-синуклеина в плазме крови, а также однородной фракции CD45+ клеток крови в качестве прогностического маркера БП. Было показано, что оценка как общего, так и олигомерного альфа-синуклеина периферической крови не может быть использована в качестве маркера БП. В ходе эксперимента нами был исключен фактор гемолиза, обследованы пациенты с БП, находящиеся на ранней стадии заболевания, не получавшие терапию Л-ДОФА-содержащими препаратами. Полученные данные позволили предположить, что на уровень альфа-синуклеина в плазме и в мононуклеарах крови влияют как генетические факторы, включенные в настоящее исследование ОНП, локализованные в 3'-области гена *SNCA*, так и уровень дофамина в плазме крови, этиология заболевания. В рамках исследования нами впервые было показано, что *GBA*-ассоциированная БП характеризуется повышенным уровнем олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови. Полученные данные позволяют предположить, что высокий риск развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* может объясняться накоплением нейротоксичных олигомерных форм альфа-синуклеина.

## ВЫВОДЫ

1. Вариант G (rs356219) и вариант G (rs356165) гена *SNCA* повышают риск развития болезни Паркинсона в 1,56 и 1,53 раза соответственно.
2. Повышение уровня олигомерного альфа-синуклеина в плазме может рассматриваться в качестве маркера *GBA*-ассоциированной БП.
3. Уровень общего и олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови, а также уровень общего альфа-синуклеина CD45+ клеток крови у пациентов с БП не являются маркером спорадических форм БП.
4. Для носителей вариантов G (rs356219 и rs356165) гена *SNCA* характерны повышенный уровень экспрессии гена и уровень белка альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови в контрольной группе.
5. Показана прямая корреляция уровня дофамина в плазме крови с уровнем альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови в контрольной группе, а также уровня дофамина в плазме крови с относительным уровнем мРНК гена *SNCA* у пациентов с БП.

## НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Для дальнейшего исследования механизма развития *GBA*-ассоциированной БП целесообразно провести исследования корреляции активности фермента *GBA* у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* с уровнем олигомерных форм альфа-синуклеина у пациентов с диагнозом БП и у лиц без неврологических расстройств. Необходимо также проводить дальнейшее изучение клинических особенностей *GBA*-ассоциированной формы БП и осуществлять поиск факторов, модифицирующих проявление заболевания у носителей мутаций. Подобные исследования необходимы для проведения медико-генетического консультирования пациентов с мутациями в гене *GBA*, для разработки подходов к лечению заболевания и поисков маркеров ответа на терапию.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Emelyanov, A. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia / A. Emelyanov, T. Bukina, T. Usenko, A. Drosdova, A. Zakharchuk, **P. Andoskin**, M. Dubina, A. Schwarzman, S. Pchelina // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 1. – P.158-159.
2. Emelyanov, A. SNCA, LRRK2, MAPT polymorphisms and Parkinson's disease in Russia / A. Emelyanov, **P. Andoskin**, A. Yakimovskii, T. Usenko, E. Nuzhnyi, M. Nikolaev, S. Pchelina // *Parkinsonism Relat Disord*. – 2013. – Vol.19. – N11. – P.1064-5.

3. **Андоскин, П.А.** Влияние дофамина плазмы на уровень альфа-синуклеина CD45+ клеток крови при болезни Паркинсона / **П.А. Андоскин, А.К. Емельянов, М.А. Николаев, К.А. Сенкевич, В.П. Шилин, А.А. Тимофеева, А.Ф. Якимовский, С.Н. Пчелина** // Ученые записки СПбГМУ им. ак. И.П.Павлова. – 2015. – Т.XXII. – №2. – С.14–17.
4. Емельянов, А.К. Ассоциация rs356219 и rs356165 с болезнью Паркинсона и повышенной экспрессией гена альфа-синуклеина в CD45+ клетках крови // А.К. Емельянов, **П.А. Андоскин, И.В. Милюхина, А.А. Тимофеева, А.Ф. Якимовский, К.А. Сенкевич, Т.С. Усенко, М.А. Николаев, С.Н. Пчелина** // Цитология. – 2016. – Т.58. – №2. – С.99-104.

Тезисы:

1. Емельянов, А.К. Биохимические и генетические маркеры болезни Паркинсона / А.К. Емельянов, **П.А. Андоскин, Е.П. Нужный, М.А. Николаев, Т.С. Усенко, А.Ф. Якимовский, С.Н. Пчелина** // II Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное»: сборник материалов. – Санкт-Петербург. – 2012. – С.130.
2. **Андоскин, П.А.** Уровень олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона / **П.А. Андоскин, А.К. Емельянов, А.Ф. Якимовский, А.А. Тимофеева, С.Н. Пчелина** // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 17-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых: сборник тезисов. – Пушино. – 2013. – С.173.
3. **Andoskin, P.** Association of SNPs rs356219 (SNCA) and rs1052553 (MAPT) with Parkinson's disease in Russia / **P. Andoskin, A. Emelyanov, T. Usenko, E. Nuzhnyi, M. Nikolaev, A. Yakimovskii, S. Pchelina** // European Journal of Neurology. – 2012. – Vol.19. – Issue Supplement s1. – P. 327.
4. **Andoskin, P.A.** Oligomeric alpha-synuclein levels in blood plasma in LRRK2 – linked Parkinson's disease / **P.A. Andoskin, A.K. Emelyanov, A.F. Yakimovsky, A.A. Timofeeva, S.N. Pchelina** // European Journal of Human Genetics. – 2013. – Vol. 21. – Supplement 2. – P. 513.
5. **Андоскин, П. А.** Уровень альфа-синуклеина в плазме крови у пациентов с болезнью Паркинсона и пациентов с лизосомными болезнями накопления / **П.А. Андоскин, Е.П. Нужный, А.К. Емельянов, М.А. Николаев, А.Ф. Якимовский, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина** // Болезнь Паркинсона и расстройства движений: сборник тезисов. – Москва. – 2014. – С. 323.
6. Емельянов, А.К. Уровень альфа-синуклеина в CD45+ клетках периферической крови при болезни Паркинсона / А.К. Емельянов, **П.А. Андоскин, А.Ф. Якимовский, А.А. Тимофеева, М.А. Николаев, С.Н.**

- Пчелина // Болезнь Паркинсона и расстройства движений: сборник тезисов. – Москва. – 2014. – С.327.
7. **Андоскин, П.А.** Альфа-синуклеин крови как маркер риска развития нейродегенеративных заболеваний человека / **П.А. Андоскин, Е.П. Нужный, А.К. Емельянов, М.А. Николаев, А.Ф. Якимовский, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина** // I Конференция молодых ученых и специалистов ПИЯФ: сборник тезисов. – Гатчина. – 2014. – С. 57.
  8. Emelyanov, A.K. The CD45+ blood cells alpha-synuclein level in Parkinson's disease / A.K. Emelyanov, **P. Andoskin**, A. Yakimovskii, A. Timofeeva, S. Pchelina // European Journal of human genetics. – 2014. – Vol. 22. – Supplement 1. – P.193.
  9. **Andoskin, P.A.** Red blood cells hemolysis influences the level of total but not oligomeric plasma alpha-synuclein in Parkinson's disease patients and controls / **P.A. Andoskin, A.K. Emelyanov, A.F. Yakimovsky, A.A. Timofeeva, S.N. Pchelina** // Journal of human genetics. – 2014. – Vol. 22. – Supplement 1. – P.440.
  10. **Андоскин, П.А.** Белок альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона / **П.А. Андоскин, А.К. Емельянов, М.А. Николаев, В.П. Шилин** // Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье: сборник тезисов. – СПб. – 2015. – С. 31.
  11. **Андоскин, П.А.** Альфа-синуклеин крови как биомаркер болезни Паркинсона / **П.А. Андоскин, А.К. Емельянов, М.А. Николаев, А.Ф. Якимовский, А.А. Тимофеева, С.Н. Пчелина** // Мультидисциплинарные аспекты молекулярной медицины: сборник материалов 3-го Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». – СПб. – 2015. – С. 43.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БП - болезнь Паркинсона  
Л-ДОФА - диоксифенилаланин  
мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота  
ОНП – однонуклеотидный полиморфизм  
ПЦР - полимеразная цепная реакция  
ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
СМЖ – спинномозговая жидкость  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
CI – confidence interval (доверительный интервал)  
GBA – глюкоцереброзидаза  
OR – odds ratio (отношение шансов)