

На правах рукописи

Копытова Алена Эдуардовна

**Оценка эффективности фармакологических шаперонов
глюкоцереброзидазы на первичной культуре макрофагов
пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью
Паркинсона**

1.5.4. – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Гатчина – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», отдел молекулярной и радиационной биофизики, лаборатория молекулярной генетики человека, г. Гатчина

Научный руководитель: доктор биологических наук **Пчелина Софья Николаевна**

Официальные оппоненты: **Журавлева Галина Анатольевна** – доктор биологических наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, профессор

Малашичева Анна Борисовна – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, лаборатория регенеративной биомедицины, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2023 года в ___ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д.12) по адресу 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemsfb.ru/external/kopytova-ae/>

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат медицинских наук

Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к снижению ферментативной активности GCase и, как следствие, развитию лизосомной болезни накопления – болезни Гоше (БГ). Фермент GCase расщепляет глюкозилцерамид или глюкозилсфингозин до глюкозы и церамида или сфингозина, соответственно. Дисфункция GCase ведет к нарушению метаболизма лизосфинголипидов с их последующим накоплением в лизосомах клеток. Отмечается, что именно патологическое накопление липидов приводит к клиническому проявлению симптомов БГ (Ferreira, Gahl, 2017). В тоже время мутации в гене *GBA1* являются фактором высокого риска болезни Паркинсона (БП) (риск повышается в 7-8 раз) (Do et al., 2019; Emelyanov et al., 2018; Gan-Or et al., 2015; Sidransky, Lopez, 2012). Важно отметить, что нами и другими авторами ранее было показано, что при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1* у пациентов с БП также наблюдается статистически-значимое снижение активности GCase и повышение концентрации субстрата, но данные нарушения менее выражены по сравнению с пациентами с БГ (Fernandes et al., 2016; Копытова et al., 2021; Pchelina et al., 2018; Yang et al., 2017). Предполагается, что накапливающиеся лизосфинголипиды могут стабилизировать нейротоксичные формы альфа-синуклеина и способствовать нейродегенерации (Taguchi et al., 2017).

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии для БП, а также терапии для БГ с поражением центральной нервной системы (2 и 3 тип БГ). Общность патогенеза заболеваний человека, связанных с дисфункцией GCase, а именно БГ и БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA-БП), позволяет говорить о том, что разрабатываемые таргетные препараты, направленные на повышение активности GCase, могут быть эффективны при обеих нозологиях.

Основной стратегией лечения БГ на данный момент является фермент заместительная терапия (ФЗТ), заключающаяся во внутривенных инъекциях рекомбинантного фермента. Важно отметить, что ФЗТ не эффективна при лечении 2 и 3 типа БГ, так как данные препараты не способны проходить через гематоэнцефалический барьер. Применяют также субстрат-редуцирующую терапию (СРТ), которая заключается в ингибировании биосинтеза глюкозилцерамида. Однако данный подход не получил широкого распространения из-за низкой эффективности и частого развития побочных действий (Weinreb et al., 2013; Senkevich et al., 2022).

В последние годы активно разрабатывается направление терапии БГ на основе фармакологических шаперонов (ФШ) GCase, небольших химических соединений, способствующих правильной сборке мутантных форм фермента и транспортировке его к сайту действия - в лизосому (Thomas, Mehta, Hughes, 2014). На клеточных линиях и на модельных животных с дисфункцией GCase и паркинсонизмом показано, что повышение активности GCase предотвращает нейродегенерацию (Sanchez-Martinez et al., 2016; Sardi et al., 2017; Zunke et al., 2018). Можно предположить, что такие активаторы GCase также могут быть эффективны в повышении активности GCase при GBA-БП.

Степень разработанности темы

ФШ GCase подразделяются на два типа: 1) конкурентные ингибиторы, которые связываются с активным центром GCase и 2) аллостерические ФШ, которые связываются с GCase в аллостерических сайтах на поверхности белка (Tran et al., 2020). Несмотря на многообещающие результаты доклинических исследований в клинических испытаниях, ФШ

конкурентного типа – изофагомин не оказывал положительного эффекта на снижение концентрации субстрата у пациентов с БГ 1 типа, а, следовательно, и на выраженность симптоматики при БГ, что связывают, в том числе, с плохой растворимостью изофагомина (Martinez-Bailen et al., 2022). Предполагается, что ФШ способные связываться с сайтами на поверхности GCase и способствующие её правильному фолдингу, будут более эффективны. На сегодняшний день одним из наиболее многообещающих ФШ GCase является амброксол. С помощью скрининга соединений, одобренных к применению в клинической практике, было показано, что амброксол, используемый в качестве муколитического средства, обладает также свойствами ФШ GCase и способен восстанавливать функцию GCase как *in vitro*, так и *in vivo* (Maegawa et al., 2009; Migdalska-Richards et al., 2017; Silveira et al., 2019; Welsh et al., 2020). Амброксол является рН-зависимым ингибитором смешанного типа, который может связываться как с активным центром, так и с сайтами на поверхности белка в зависимости от значения рН среды (Maegawa et al., 2009; Kopytova et al., 2021), и может использоваться не только при БГ с поражением центральной нервной системы, а также и при ГВА-БП.

Необходимо отметить важность поиска аллостерических ФШ GCase. На данный момент описано лишь несколько ФШ аллостерического типа: S-181, NCGC607 (N07), NCGC758 и LTI-291 (Aflaki et al., 2016a; Aflaki et al., 2016b; Burbulla et al., 2019; Patnaik et al., 2012; Tran et al., 2020).

Лимитирующим фактором подобных исследований, от которого зависят и полученные результаты, является выбор адекватной модели для оценки эффективности соединений, направленных на повышение активности GCase. Ранее большинство исследований по оценке эффективности ФШ GCase проводились в клетках фибробластов пациентов с БГ, однако при данном подходе невозможно оценить влияние ФШ на концентрацию субстрата, так как в фибробластах не наблюдается характерное для БГ накопление лизосфинголипидов (Aflaki et al., 2014). При разработке систем скрининга важно оценить не только влияние ФШ на активность или количество белка GCase в клетках, но и, как основной параметр, снижение концентрации субстрата. В последние годы, в связи с открытием технологии репрограммирования клеточных культур, в качестве модели для изучения дисфункции GCase стали использовать макрофаги и нейроны, полученные путем дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Однако, осуществление подобных экспериментов является финансово затратным и трудоемким процессом, требующим много времени. Использование клеток первичной культуры макрофагов, являющихся основным типом клеток, демонстрирующим фенотип БГ, может быть рассмотрено как наиболее быстрый, чувствительный и менее дорогостоящий подход, позволяющий изучать молекулярно-генетические механизмы дисфункции GCase, а также проводить скрининг потенциальных препаратов, направленных на восстановление функции GCase.

Цель исследования:

Разработать систему скрининга фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы и оценить их эффективность в восстановлении функций глюкоцереброзидазы с использованием пациент-специфичных клеток.

Задачи, решаемые в ходе исследования:

- 1) Сопоставить активность глюкоцереброзидазы и концентрацию гексозилфингозина в периферической крови и в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с мутациями в гене *GBA1* (с болезнью Гоше и ГВА-ассоциированной болезнью Паркинсона).

- 2) Оценить влияние фармакологических шаперонов амброксол, N07 и его модификаций на активность и количество глюкоцереброзидазы, концентрацию гексозилсфингозина, транслокацию глюкоцереброзидазы в лизосомы и степень аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше.
- 3) Оценить влияние фармакологических шаперонов амброксол, N07 и его модификаций на активность глюкоцереброзидазы и концентрацию гексозилсфингозина в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона.
- 4) Оценить влияние фармакологических шаперонов амброксол, N07 и его модификаций на активность и количество глюкоцереброзидазы, концентрацию гексозилсфингозина и транслокацию глюкоцереброзидазы в лизосомы в дофаминергических нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, пациента с GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона.

Научная новизна

В настоящем исследовании разработана система скрининга соединений, направленных на восстановление функции GCase с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с мутациями в гене *GBA1* с оценкой активности и концентрации лизосфинголипидов (гексозилсфингозин (HexSph)) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Впервые показано влияние ФШ амброксол на повышение ферментативной активности GCase и снижение концентрации лизосфинголипидов в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП.

Впервые проведена оценка эффективности аллостерического активатора GCase - N07 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП (носителей гетерозиготных мутаций гена *GBA1*) и дофаминергических (ДА) нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП. Показано, что ФШ N07 повышает активность GCase в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, а также пациентов с GBA-БП, гетерозиготных носителей «легкой» мутации N370S, но не у пациентов с GBA-БП, носителей «тяжелой» мутации L444P. В культивируемых макрофагах пациентов с БГ ФШ N07 повышает количество белка GCase в клетках и степень транслокации GCase в лизосому, а также снижает концентрацию лизосфинголипидов. В ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП ФШ N07 повышает активность и количество белка GCase в клетках.

В рамках исследования проведена оценка влияния химических модификаций ФШ N07 (соединений N2 и N3) на восстановление функции GCase на пациент-специфичных клетках пациентов с БГ и GBA-БП. Соединение N2 отличается большей эффективностью по сравнению с исходным соединением N07 в снижении концентрации лизосфинголипидов в культивируемых макрофагах как пациентов с БГ, так и GBA-БП, а также в повышении степени транслокации GCase в лизосомы в культивируемых макрофагах пациентов с БГ. Использование соединения N2 повышает активность и количество белка GCase в клетках, а также более эффективно, чем исходное соединение N07 повышает степень транслокации GCase в лизосомы в ДА-нейронах пациента с GBA-БП (N370S/WT).

Теоретическая и практическая значимость исследования

В настоящей работе разработан подход для оценки эффективности ФШ GCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с дисфункцией этого фермента (БГ, GBA-БП) с оценкой активности GCase и концентрации лизосфинголипидов методом ВЭЖХ-МС/МС. В ходе исследования была проведена оценка эффективности ФШ GCase, а именно амброксола,

N07 и модификаций соединения N07 – N2 и N3. ФШ N07, а также его модификации, обладающие большей растворимостью, которые в перспективе могут быть использованы для таргетной терапии при патологиях, ассоциированных с мутациями гена *GBA1*.

Методология и методы диссертационного исследования

В ходе работы были использованы современные генетические, биохимические и цитологические методы. В частности, применялись такие методы, как получение клеток мононуклеарной фракции периферической крови с их последующим дифференцированием в макрофаги в присутствии колоние-стимулирующего фактора роста макрофагов, получение и культивирование ИПСК из мононуклеаров периферической крови, направленная дифференцировка ИПСК в ДА-нейроны, иммунофлуоресцентный анализ, проточная цитометрия, конфокальная микроскопия, оценка активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипидов методом ВЭЖХ-МС/МС, количественная оценка белка с помощью анализа вестерн-блот.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Клетки первичной культуры макрофагов как пациентов с болезнью Гоше, так и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона могут быть использованы для оценки эффективности фармакологических шаперонов с оценкой активности глюкоцереброзидазы и концентрации гексозилсфингозина методом масс-спектрометрии.
- 2) Фармакологический шаперон амброксол повышает активность глюкоцереброзидазы и снижает концентрацию гексозилсфингозина в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона.
- 3) Эффективность фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы, показанная в культивируемых макрофагах пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона, зависит от типа мутаций в гене *GBA1*.
- 4) Соединение N2 может рассматриваться как потенциальный фармакологический шаперон, способствующий восстановлению нарушенной функции глюкоцереброзидазы.

Степень достоверности результатов

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

Апробация работы

Полученные в ходе исследования научные результаты были представлены на 17 российских и международных конференциях: «IX Всероссийский молодежный научный форум с международным участием Open Science 2022», Гатчина, 2022; Конгресс международного общества болезни Паркинсона и двигательных расстройств 2022, онлайн, 2022; Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества, Санкт-Петербург, 2022; Гибридный конгресс европейского сообщества по нейропсихофармакологии 2021, онлайн, 2021; «VII СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ с международным участием», Сочи-Дагомыс, 2021; Виртуальная региональная конференция федерации европейских обществ неврологии 2021, онлайн 2021; Онлайн конгресс международного общества болезни Паркинсона и двигательных расстройств, онлайн 2020; Европейский съезд: Вехи терапии при болезни Паркинсона, онлайн, 2020; «VI ежегодный Молодежный научный форум Open Science», Гатчина, 2019; Конгресс международного общества болезни Паркинсона и двигательных расстройств 2019, Ницца, 2019; Региональная конференция федерации европейских обществ

неврологии 2019, Белград, 2019; VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы, Санкт-Петербург, 2019; VIII Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем», Москва, 2018; «V ежегодный Молодежный научный форум Open Science», Гатчина, 2018; Конгресс международного общества болезни Паркинсона и двигательных расстройств, Гонконг, 2018; «IV Национального Конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием)», Москва, 2017; «IV ежегодный Молодежный научный форум Open Science», Гатчина, 2017.

Личный вклад автора в проведение исследований

Наблюдение и клинический осмотр пациентов и лиц контрольной группы, включенных в исследование, проводились на базе ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева РАН», ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова и ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова». Выделение клеток мононуклеарной фракции периферической крови методом градиентного центрифугирования в растворе фиколла с их последующей дифференцировкой в макрофаги выполнялось автором лично. Фенотипическое созревание макрофагов, а также оценка степени аутофагии в культивируемых макрофагах методом проточной цитометрии была выполнена автором лично. Работа по репрограммированию мононуклеаров периферической крови в ИПСК с дальнейшей их дифференцировкой в ДА-нейроны проводилась коллективом лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН (руководитель – профессор, д.б.н. Закиян С.М.). Получение лизатов макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, оценка уровня общего белка в полученных лизатах, оценка концентрации белка GCase методом вестерн-блот анализа была проведена автором лично. Проведение экспериментов по оценке степени транслокации GCase в лизосомы с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и последующей детекцией на конфокальном микроскопе в культивируемых макрофагах и ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, были проведены лично автором. Исследования по молекулярной динамике и молекулярному докингу мутантной формы GCase проведены в лаборатории молекулярной и клеточной биофизики, НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, под руководством заведующего лабораторией к.физ.мат.н. Рычкова Г.Н. Химические соединения, используемые в работе в качестве аллостерических ФШ GCase были получены путем химического синтеза в лаборатории биоорганической и медицинской химии, НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, под руководством заведующего лабораторией к.х.н. Ибатуллина Ф.М. Измерение активности лизосомных ферментов и концентрации соответствующих субстратов проводилось в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра, Москва (руководитель – профессор, д.м.н. Захарова Е.Ю.). Статистическая обработка полученных данных была выполнена автором лично. Описание исследований, анализ и обсуждение результатов были выполнены автором самостоятельно. Совместно с научным руководителем обсуждались все материалы, освещенные в данном исследовании, были сформулированы выводы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту специальности 1.5.4. – Биохимия (биологические науки), как области науки, изучающей теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека,

животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генотерапии и энзимотерапии.

Публикации

По материалам диссертационного исследования было опубликовано 10 публикаций, в том числе 7 статей в изданиях из утвержденного Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных для публикации основных результатов диссертационных исследований для соискания ученой степени кандидата биологических наук и 18 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращения, списка литературы (226 источников) и приложения. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, иллюстрирована 3 таблицами, 32 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В обзоре литературы подробно рассмотрены молекулярно-генетические, этиологические основы БГ и БП, в том числе GBA-ассоциированной БП, современные подходы для терапии БГ. В заключительной части обсуждаются возможности использования пациент-специфичных клеток для поиска и оценки эффективности новых подходов для терапии БГ и GBA-БП с использованием ФШ GCase.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика обследуемых групп

В исследование вошли 19 пациентов с БГ (средний возраст $33,9 \pm 3,3$ лет, 47% мужчин) и 8 пациентов с GBA-БП (гетерозиготные носители мутаций в гене *GBA1*, средний возраст $56,6 \pm 2,9$ лет, 20% мужчин) и 32 здоровых индивидуума (средний возраст $40,2 \pm 5,6$ лет, 40% мужчин). Пациенты с БГ находились под наблюдением гематолога в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», где получали необходимую терапию. Пациенты с БП, а также индивидуумы без неврологических заболеваний (контроль) были обследованы в научно-клиническом центре нейродегенеративных заболеваний клиник ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтерева РАН» и ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова. Ранее в лаборатории молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, был проведен скрининг мутаций в гене *GBA1* с целью выявления пациентов с GBA-БП. Исследование одобрено Этическими комитетами вышеперечисленных учреждений, перед забором периферической крови все пациенты дали свое согласие на участие в исследовании и подписали информированное согласие.

Методы исследования

Получение клеток мононуклеарной фракции периферической крови и их дальнейшая дифференцировка в макрофаги. Мононуклеарная фракция клеток была получена из 18-27 мл свежесобранной цельной крови методом градиентного центрифугирования в растворе фиколла ($\rho=1,077$, ПанЭко, Россия) при 1600 об/мин в течение 40 минут по методике,

описанной ранее (Николаев и др., 2018). Полученные мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640, Corning, США) и культивировали по протоколу, описанному ранее (Корытова et al., 2021; Николаев и др., 2018) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Corning, США), 1% гентамицина (Corning, США) в присутствии колониестимулирующего фактора роста макрофагов (Biolegend, США) в конечной концентрации 10 нг/мл в течение 4х суток в 5% CO₂-инкубаторе при +37⁰С с ежедневной заменой среды. Схема получения клеток первичной культуры макрофагов представлена на рисунке 1. Фенотипическое созревание макрофагов было подтверждено с помощью световой микроскопии и проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных антител (eBioscience, США), иммуногенных к мембранным белкам CD45⁺ и CD68⁺ лейкоцитов и макрофагов.



Рисунок 1 — Схема получения клеток первичной культуры макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, полученных из мононуклеаров периферической крови. (А)

Изображение клеток первичной культуры макрофагов на 5ый день культивирования, полученное с помощью светового микроскопа (приближение 20X/0,40 ∞1,2). (Б) Представлены результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, на маркеры терминально дифференцированных ДА-нейронов: тирозингидроксилазы (ТН, красный сигнал) и транскрипционного фактора LMX1A (красный сигнал), ядра окрашены DAPI (синий сигнал). Шкала – 100 мкм

Получение ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК. Для получения ИПСК использовалась мононуклеарная фракция периферической крови пациента с ГВА-БП (ГВА-БП8, N370S/WT) и двух здоровых индивидуумов по методике, описанной ранее (Grigor'eva et al., 2023). Направленную дифференцировку ИПСК в ДА-нейроны проводили по ранее опубликованному протоколу (Rus Jacquet de, 2019) с модификациями (Grigor'eva et al., 2023; Grigor'eva et al., 2022). Схема получения ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, представлена на рисунке 1.

Оценка активности GCase и концентрации гексозилфингозина (HexSph).

Выполнение исследований по оценке активности GCase и концентрации HexSph в периферической крови, в клетках первичной культуры макрофагов и клетках ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) (Николаев и др., 2018; Korytova et al., 2021; Korytova et al., 2023).

Колориметрическая оценка выживаемости клеток с помощью MTS теста на цитотоксичность. Для выбора конечной концентрации ФШ GCase все соединения были исследованы на цитотоксичность при культивировании макрофагов. Оценка цитотоксичности проводилась с использованием набора CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Культивирование клеток в присутствии ФШ GCase. ФШ GCase добавляли в среду на 4й день культивирования макрофагов и затем культивировали еще в течение 4х дней без смены среды. ДА-нейроны культивировали в стандартных условиях в течение 40 дней затем добавляли ФШ на 21 день. ФШ амброксол (Sigma-Aldrich, Германия) использовался в конечной концентрации 50 мкМ (Ivanova et al., 2018; Maegawa et al., 2009; Welsh et al., 2020). Модификации соединения N07 (N2 и N3) (Рисунок 2) были направлены на повышение растворимости соединений. Исходя из проведенного MTS теста и данных литературы для соединения N07 и его модификаций была выбрана конечная концентрация 4 мкМ (Aflaki et al., 2016b).

Нумерация соединения	Структура соединения	Химическое название соединения	Дополнение
N07		2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(2-(метил(фенил)амино)-2-оксоэтил)бензамид	C24H22IN3O4 Exact Mass: 543,0655
N2		2-(2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)бензоил)-N-фенилгидразинкарбоксамид	C22H19IN4O4 Exact Mass: 530,0451
N3		2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(2-оксо-2-(фениламино)этил)бензамид	C23H20IN3O4 Exact Mass: 529,0498

Рисунок 2 — Химические формулы соединения N07 и предложенных модификаций в качестве потенциальных фармакологических шаперонов GCase

Получение лизатов макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, и оценка в них концентрации общего белка. Лизис сухого остатка макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, 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) на спектрофотометре SmartSpecTMPlus (BioRad, США). Полученные лизаты хранили при температуре -80 °С.

Определение относительного уровня GCase с помощью вестерн-блот анализа. Оценка относительного уровня белка GCase в клетках первичной культуры макрофагов и ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, проводилась методом вестерн блоттинга. В качестве

референсного белка использовали GAPDH. В данной работе использовались первичные и вторичные антитела, разведенные в 5% растворе обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащего 0,1% Tween-20: моноклональные антитела кролика против GBA (1:500, ab125065, Abcam, Великобритания), поликлональные антитела кролика против GAPDH (1:18000, SAB2108266, Sigma, Германия), вторичные антитела, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000, ab6721, Abcam, Великобритания). Иммунореактивность была визуализирована с помощью хемоллюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, США) и системы гель-документации ChemiDoc (Bio-Rad, США). Содержание GCase нормировали к содержанию GAPDH.

Оценка колокализации GCase и маркера лизосом LAMP2 в клетках первичной культуры макрофагов и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Оценка колокализации GCase и маркера лизосом LAMP2 проведена в клетках первичной культуры макрофагов и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, методом иммунофлуоресцентного окрашивания по методике, описанной ранее (Корытова et al., 2021; Копытова и др., 2022). В данной работе использовались следующие антитела: первичные мышинные против GBA (Sigma-Aldrich, Германия), первичные кроличьи против LAMP2 (Sigma-Aldrich, Германия), вторичные против мыши Alexa Fluore 488 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) и вторичные против кролика Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США). Изображения получены с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica TCS-SP5 (объектив х63) (Leica, Германия). Для определения уровня относительной флуоресценции изображений, полученных при помощи конфокального микроскопа, была использована программа LAS AF Lite. Оценка колокализации флуоресцентных сигналов GCase (красный) и маркера лизосом LAMP2 (зеленый) проведена в программе Image J с использованием плагина EzColocalization (Stauffer et al., 2018).

Оценка степени аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов. Определение степени аутофагии проведено с использованием набора Autophagy Detection kit (ab139484, Abcam, Великобритания) по протоколу производителя. Анализ образцов проводился на проточном цитометре FC500 BeckmanCoulter (BeckmanCoulter, США) с использованием лазерного источника длинной волны 488 нм (в зеленом канале FL1).

Статистическая обработка данных. Оценку статистической достоверности различий проводили при помощи программы SPSS 21. Соответствие данных нормальному распределению проверялось с помощью критериев Шапиро-Уилка или Колмогорова-Смирнова. В случае несоответствия данных нормальному распределению сравнение полученных значений между отдельными группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для сравнения двух переменных, относящихся к одной выборке, в случае несоответствия данных нормальному распределению, использовался критерий Вилкоксона. Для оценки степени колокализации между маркированными белками был использован коэффициент Пирсона. Для расчета значений коэффициента Пирсона использовали корреляционный поиск порога интенсивности флуоресценции с уровнем значимости $p < 0,05$. Различия считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание *in vitro* модели для скрининга ФШ GCase в клетках первичной культуры макрофагов

В ходе работы была проведена оценка активности GCase и концентрации HexSph в крови пациентов исследуемых групп (БГ (N=19), GBA-БП (N=18), средний возраст $59,9 \pm 2,5$ лет, 41%

мужчин) и лица контрольной группы (N=170, средний возраст $62,6 \pm 10,3$ лет, 41% мужчин). Нами был использован метод ВЭЖХ-МС/МС с модификациями (Корытова et al., 2023; Корытова et al., 2021; Николаев и др., 2018), обладающий высокой специфичностью и точностью по сравнению с флуоресцентными методами анализа. Метод ВЭЖХ-МС/МС позволяет не только четко разделить гомозиготных носителей мутаций в гене *GBA1* от лиц контрольной группы, но также способен детектировать незначительные изменения ферментативной активности GCase у носителей гетерозиготных мутаций гена *GBA1* (Alcalay et al., 2020; Gelb et al., 2017; Wolf et al., 2018).

По результатам проведенного анализа ожидаемо было показано, что пациенты с БГ характеризуются выраженным снижением активности GCase $0,44$ ($0,01$ - $2,50$) мМ/л/ч и повышенной концентрацией HexSph $197,6$ ($21,9$ - $1182,6$) нг/мл в периферической крови по сравнению с лицами контрольной группы $6,39$ ($2,51$ - $32,13$) мМ/л/ч и $2,59$ ($0,49$ - $9,87$) нг/мл ($p < 0,0001$ и $p < 0,0001$, соответственно) (Рисунок 3 А, Б). В крови пациентов с GBA-БП также наблюдается сниженная активность GCase $4,49$ ($1,29$ - $7,53$) мМ/л/ч и повышенная концентрация HexSph $6,65$ ($1,68$ - $127,44$) нг/мл по сравнению с контрольной группой ($p < 0,0001$ и $p < 0,001$, соответственно) (Рисунок 3 А, Б). Мы подтвердили полученные ранее результаты и показали, что в случае наличия мутаций в гене *GBA1* как в гетерозиготном, так и в гомозиготном/компаудном-гетерозиготном состоянии наблюдается снижение активности GCase и накопление лизосфинголипида HexSph в периферической крови (Корытова et al., 2022; Alcalay et al., 2020; Omer et al., 2022; Ortega et al., 2016).

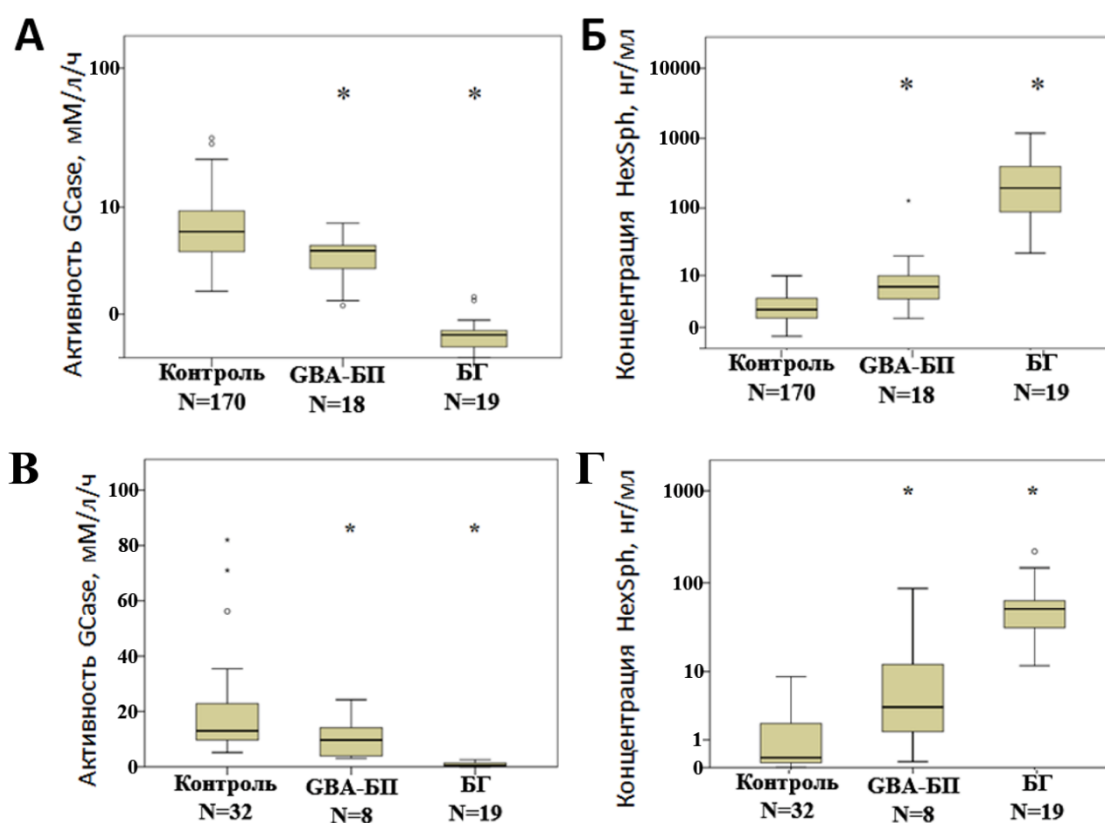


Рисунок 3 — Ферментативная активность GCase в периферической крови (А) и клетках первичной культуры макрофагов (В) пациентов исследуемых групп. Концентрация HexSph в периферической крови (Б) и клетках первичной культуры макрофагов (Г) пациентов исследуемых групп. * p-value < 0.05 по сравнению с контролем

Ранее для изучения патогенеза БГ, а также скрининга лекарственных препаратов использовались фибробласты, полученные от пациентов с БГ. Несмотря на то, что фибробласты отражают изменения ферментативной активности GCase у пациентов с БГ и GBA-БП, их использование имеет один критический недостаток – неспособность накапливать лизосфинголипиды в лизосомах, что является основным фенотипическим проявлением при БГ (Saito, Rosenberg, 1985). Макрофаги являются основным типом клеток, проявляющих фенотип заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, благодаря высокому уровню экспрессии гена *GBA1* в данном типе клеток. В связи с чем, выбор макрофагов в качестве модели для изучения молекулярных механизмов БГ является очевидным. Aflaki и соавторы, проведя ряд исследований по сравнению двух моделей *in vitro* на основе макрофагов, показали, что клетки первичной культуры макрофагов, полученные из периферической крови пациентов с БГ, а также макрофаги, дифференцированные из ИПСК пациентов с БГ, моделируют характерные признаки БГ (снижение активности GCase, накопление субстрата и нарушение функции макрофагов) (Aflaki et al., 2014).

В данном исследовании показано, что в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ наблюдается сниженная активность GCase 0,52 (0,01-2,58) мМ/л/ч и повышенная концентрация HexSph 51,5 (11,7-219,9) нг/мл, так же как и у пациентов с GBA-БП 10,21 (3,1-24,28) мМ/л/ч и 5,27 (0,16-86,6) нг/мл по сравнению с лицами контрольной группы 13,0 (5,17-82,00) мМ/л/ч и 0,27 (0,01-8,69) нг/мл ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ и $p = 0,05$, $p < 0,0001$ соответственно) (Рисунок 3 В, Г), что согласуется с результатами измерений в периферической крови. В данной работе впервые показано снижение активности GCase и накопление HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП (гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA1*).

Клетки первичной культуры макрофагов отражают изменения ферментативной активности GCase и концентрации субстрата HexSph, измеренных методом ВЭЖХ-МС/МС (Николаев и др., 2018). Нами впервые показано, что клетки первичной культуры макрофагов, полученные из периферической крови, могут быть использованы для изучения дисфункции GCase и поиска таргетной терапии не только для БГ, но также и GBA-БП. Для оценки эффективности действия ФШ GCase разработана схема с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП с оценкой в них активности GCase и концентрации HexSph, относительного уровня белка GCase в клетках, транслокации GCase в лизосомы и степени аутофагии (Рисунок 4).

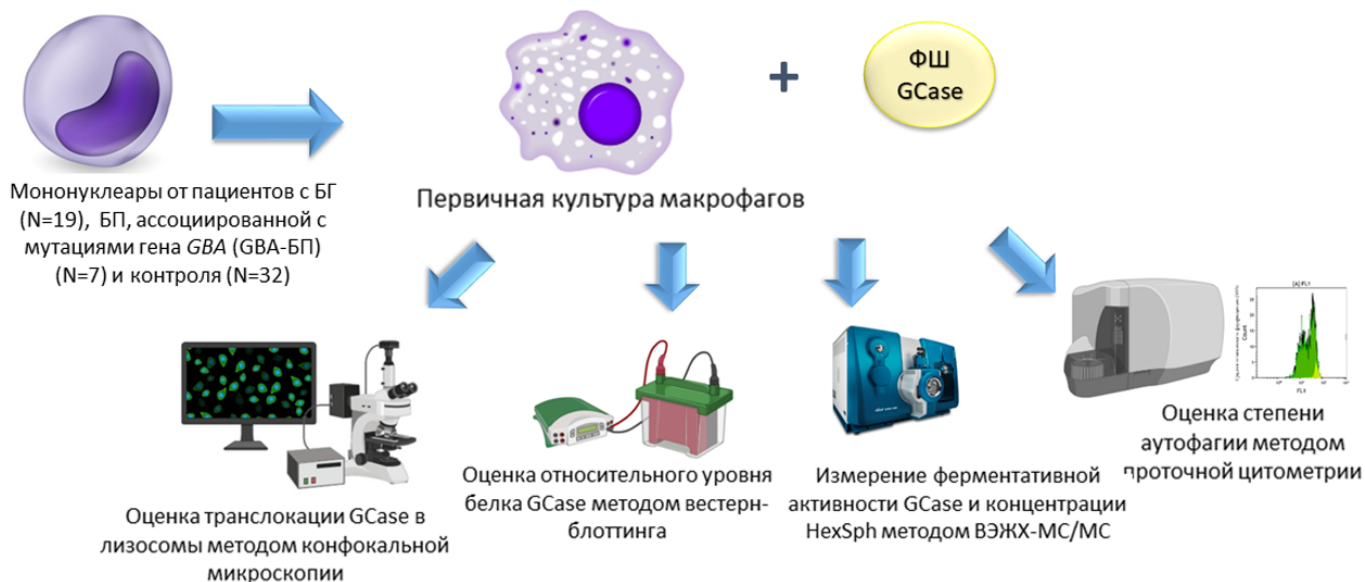


Рисунок 4 — Схема скрининга ФШ GCCase с использованием клеток первичной культуры макрофагов с оценкой активности и относительного уровня GCCase, степени транслокации GCCase в лизосомы, концентрации HexSph и степени аутофагии

Оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций на первичной культуре макрофагов пациентов с БГ

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCCase и концентрацию HexSph на первичной культуре макрофагов пациентов с БГ

Используя предложенную схему скрининга соединений, восстанавливающих функцию GCCase (Рисунок 4), мы впервые оценили влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций, а также влияние ФШ, в культивируемых макрофагах пациентов с БГ. Воздействие ФШ амброксол в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ приводило к повышению ферментативной активности GCCase в 3,3-раза по сравнению с необработанными клетками ($p < 0.0001$) (Рисунок 5 А).

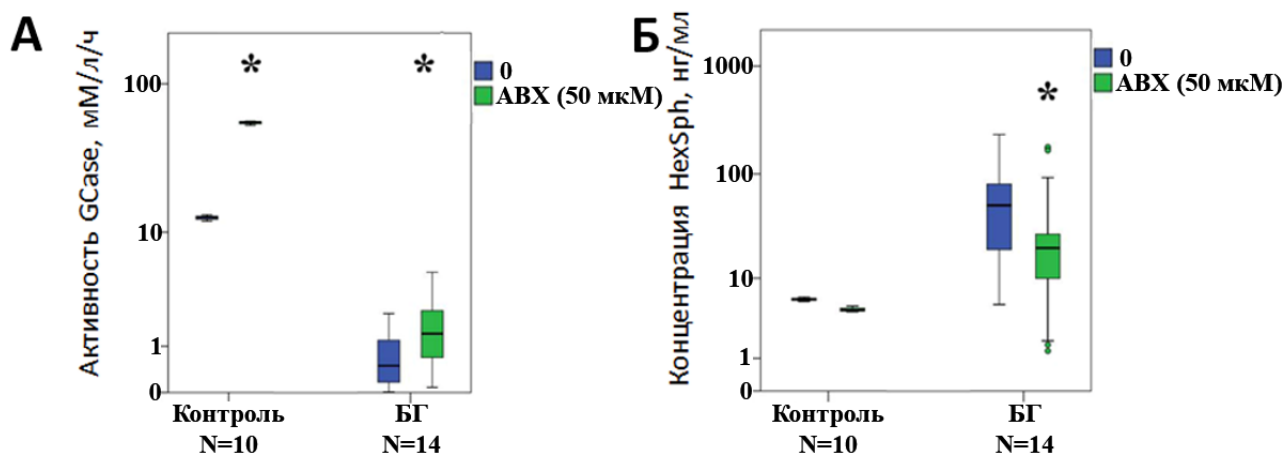


Рисунок 5 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на активность GCCase (А) и концентрацию HexSph (Б) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ.

* p -value < 0.05 по сравнению с необработанными клетками

Стоит отметить, что эффективность амброксола в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ в значительной степени зависела от типа мутации в гене *GBA1*. При стратификации пациентов с БГ в группы в зависимости от тяжести мутаций в гене *GBA1* было показано, что в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, носителей «легких» мутаций в гене *GBA1*, применение амброксола приводило к повышению ферментативной активности GCase в 2,4-раза, в то же время, у пациентов с «тяжелыми» мутациями активность GCase увеличивалась в 4,0-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,008$ и $p<0,0001$, соответственно).

При оценке эффективности ФШ амброксол в культивируемых макрофагах пациентов с БГ было показано статистически значимое снижение концентрации HexSph в 2,1-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,0003$) (Рисунок 5 Б). Полученные нами результаты согласуются с данными зарубежных исследователей. Так в независимых исследованиях Maegawa G. и McNeill с соавторами в культивируемых фибробластах пациентов с БГ и GBA-БП показали, что амброксол повышает активность и транслокацию GCase в лизосому (Maegawa et al., 2009; McNeill et al., 2014). Welsh N. и соавторы в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ всех типов показали, что амброксол эффективно снижает концентрацию субстрата GCase (Welsh et al., 2020). При оценке влияния амброксола на снижение уровня лизосфинголипидов в зависимости от типа мутаций в гене *GBA1* было показано, что в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, носителей «легких» мутаций, наблюдается снижение концентрации HexSph в 2,9-раза, в то время как у носителей «тяжелых» мутаций концентрация HexSph снизилась в 2,6-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,012$ и $p<0,0001$, соответственно).

В данном исследовании впервые была проведена оценка влияния аллостерического ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 на активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. Соединения N2 и N3 обладают такими же значениями константы связываемости с GCase, однако являются более растворимыми, чем исходное соединение.

Ранее эффективность соединения N07 в качестве неингибирующего ФШ GCase была продемонстрирована Aflaki и соавторами в макрофагах и ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациентов с БГ 1 и 2 типов и БГ с паркинсонизмом. Было показано, что использование ФШ N07 не только повышает уровень и активность GCase, но и способствует повышению транслокации GCase в лизосому, снижению концентрации GlcCer и повышению клиренса олигомерного альфа-синуклеина (Aflaki et al., 2016a). Aflaki и соавторы показали возможность использования ФШ N07 в качестве нейропротекторного средства при БП и БГ с поражением нервной системы (Aflaki et al., 2016a).

Нами было показано, что в культивируемых макрофагах пациентов с БГ ФШ N07 повышает ферментативную активность GCase в 1,2-раза по сравнению с необработанными клетками ($p<0,0001$) (Рисунок 6 А). При оценке эффективности соединений N2 и N3 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ нами не было выявлено положительного влияния на активность GCase. При исследовании эффективности ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 в культивируемых макрофагах лиц контрольной группы показано увеличение активности GCase в 2,1-, 1,4- и 1,7-раза, соответственно ($p<0,05$) (Рисунок 6 А).

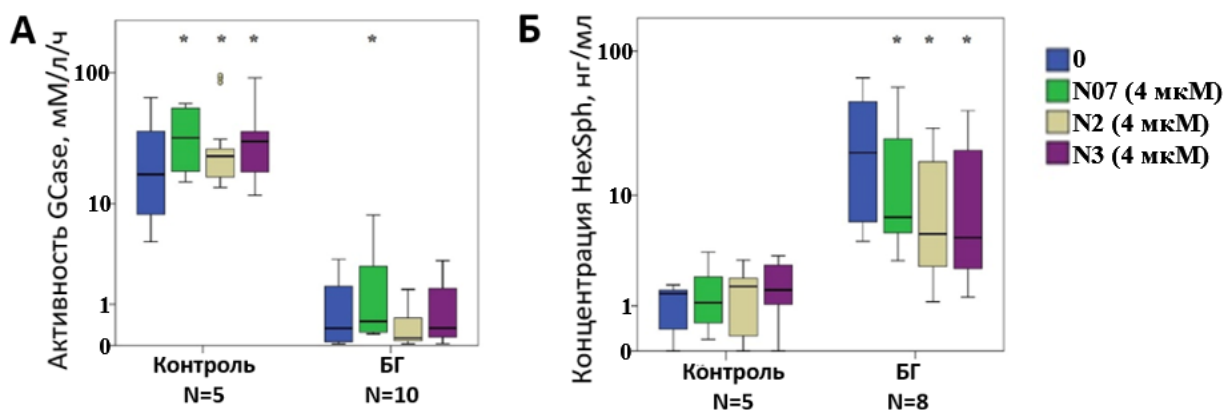


Рисунок 6 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase (А) и концентрацию HexSph (Б) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ.

* p-value <0.05 по сравнению с необработанными клетками

Использование ФШ N07 снижает концентрацию HexSph в 2,9-раза в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ ($p < 0,0001$). При этом использование соединений N2 и N3 приводило к снижению концентрации HexSph в 3,9- и 4,2-раза в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ по сравнению с клетками без добавления ФШ ($p < 0,0001$ и $p = 0,006$, соответственно) (Рисунок 6 Б). Соединение N2 было более эффективно в снижении концентрации HexSph по сравнению с исходным соединением N07 ($p = 0,016$).

При стратификации пациентов в группы в зависимости от типа мутаций *GBA1* мы выявили статистически значимое повышение активности GCase при воздействии ФШ N07 в 1,8-раза ($p = 0,028$) в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, носителей «легких» мутаций гена *GBA1*, в то время как у пациентов с БГ, носителей «тяжелых» мутаций, наблюдалось повышение активности в 1,3-раза ($p = 0,004$). Разницы в эффективности воздействия соединениями N2 и N3 на активность GCase в культивируемых макрофагах пациентов с БГ в зависимости от тяжести мутаций гена *GBA1* нами выявлено не было. Кроме того, в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, носителей «легких» мутаций в гене *GBA1* воздействие соединениями N07 и N2 приводило к снижению концентрации HexSph в 2,0- и 2,4-раза по сравнению с необработанными клетками ($p = 0,05$ и $p = 0,008$, соответственно). Также в культивируемых макрофагах пациентов с БГ, носителей «тяжелых» мутаций гена *GBA1*, было показано снижение концентрации HexSph при воздействии ФШ N07 и его модификациями N2 и N3 в 4,1-, 8,2- и 7,3-раза ($p = 0,001$, $p = 0,001$, $p = 0,001$, соответственно).

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на транслокацию GCase в лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ

Для оценки влияния ФШ амброксол, N07 и его модификаций N2 и N3 на транслокацию GCase в лизосомы в лизосомы в культивируемых макрофагах пациентов с БГ использовался метод иммунофлуоресцентного окрашивания, изображения были получены с помощью конфокальной микроскопии. Показано статистически значимое повышение коэффициента Пирсона в 1,25-раз при воздействии ФШ амброксол в культивируемых макрофагах пациентов с БГ по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,0001$). Ранее аналогичные результаты повышения степени транслокации GCase в лизосомы при воздействии амброксолом были показаны в клетках фибробластов и лимфобластов пациентов с БГ (Maegawa et al., 2009; McNeill et al., 2014).

По результатам проделанной работы ФШ N07 и его модификации N2 и N3 повышали эффективность транслокации GCase в лизосому (N07 в 1,15-раз, N2 в 1,3-раза и N3 в 1,23-раза

($p < 0,0001$). При этом наиболее эффективным было соединение N2, как по сравнению с исходным соединением N07, так и с N3 ($p = 0,0003$ и $p = 0,033$). Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания клеток первичной культуры макрофагов пациента с БГ и контроля представлены на рисунке 7. Ранее Aflaki и соавторы с использованием макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с БГ, а также БГ с паркинсонизмом показали, что ФШ N07 повышает транслокацию GCCase в лизосомы (Aflaki et al., 2016).

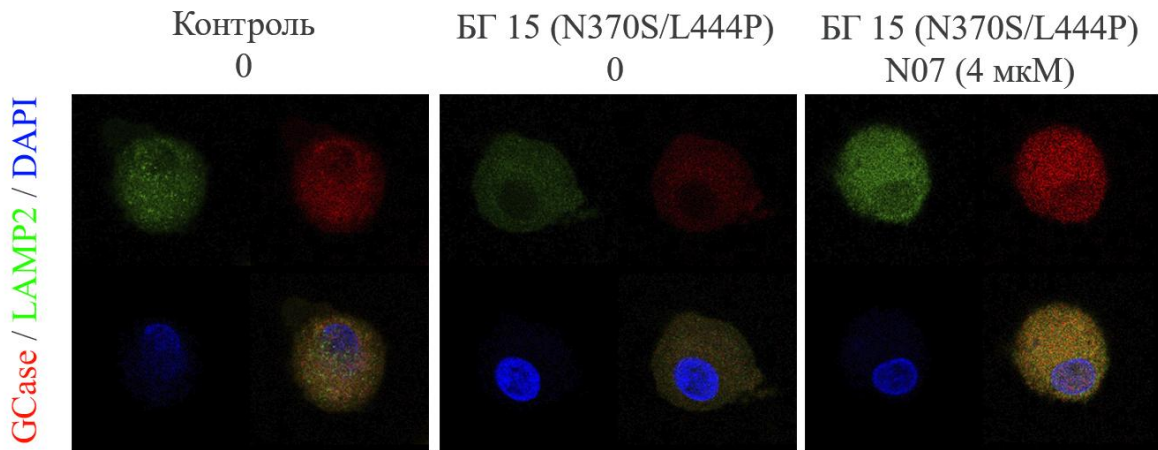


Рисунок 7 — Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток первичной культуры макрофагов пациента с БГ и лиц контрольной группы в присутствии ФШ N07 (4 мкМ) с помощью антител, специфичным к LAMP2 (зеленый сигнал), GCCase (красный сигнал). Ядра окрашены DAPI (синий сигнал). Изображения получены с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica TCS-SP5 (объектив х63). Для каждого изображения представлены сигналы по отдельным каналам и изображения с совмещенными сигналами

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на количество белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ

С использованием анализа вестерн блот было выявлено повышение количества белка GCCase в 2,5-раза в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ при воздействии ФШ амброксол (50 мкМ) по сравнению с необработанными клетками ($p = 0,028$) (Рисунок 8).

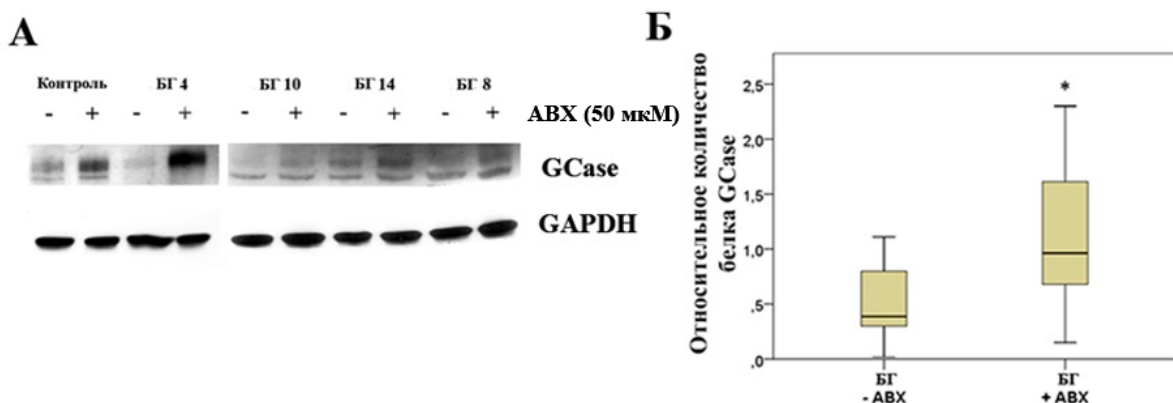


Рисунок 8 — (А) Вестерн-блот анализ относительного уровня белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ АВХ. (Б) Относительный уровень белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ АВХ. * p -value $< 0,05$ по сравнению с необработанными клетками

При воздействии ФШ N07 и N2 было выявлено повышение относительного уровня GCase в 1,5- и 1,2 - раза в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ по сравнению с клетками без ФШ ($p=0,003$ и $p=0,043$, соответственно). В данной работе не было выявлено статистически значимых различий в относительном уровне GCase при воздействии ФШ N3 на первичной культуре макрофагов пациентов с БГ.

Влияние ФШ N07 и его модификаций на степень аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ

В данной работе проведена оценка влияния ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 на аутофагию в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. По результатам проведенного анализа нами не выявлено статистически значимого различия средней интенсивности флуоресценции маркера аутофагосом в культивируемых макрофагах пациентов с БГ при воздействии исследуемыми соединениями. Медианы средней интенсивности флуоресценции аутофагосом при воздействии ФШ N07 и его модификациями N2 и N3 составили 8,7 (4,5-13,9) у.е., 8,1 (4,9-17,3) у.е., 7,6 (5,0-13,3) у.е. и в клетках без добавления ФШ 7,8 (4,7-12,7) у.е.

Оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП

Используя предложенную схему скрининга соединений, восстанавливающих функцию GCase (Рисунок 4), мы впервые оценили влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций в культивируемых макрофагах пациентов с ГВА-БП. В клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП нами показано увеличение активности GCase в 3,5-раза после воздействия ФШ амброксол по сравнению с необработанными клетками ($p<0,0001$) (Рисунок 9 А). У пациентов с ГВА-БП в культивируемых макрофагах наблюдалось снижение концентрации HexSph в 1,6-раза при добавлении амброксола по сравнению с необработанными клетками ($p=0,001$) (Рисунок 9 Б).

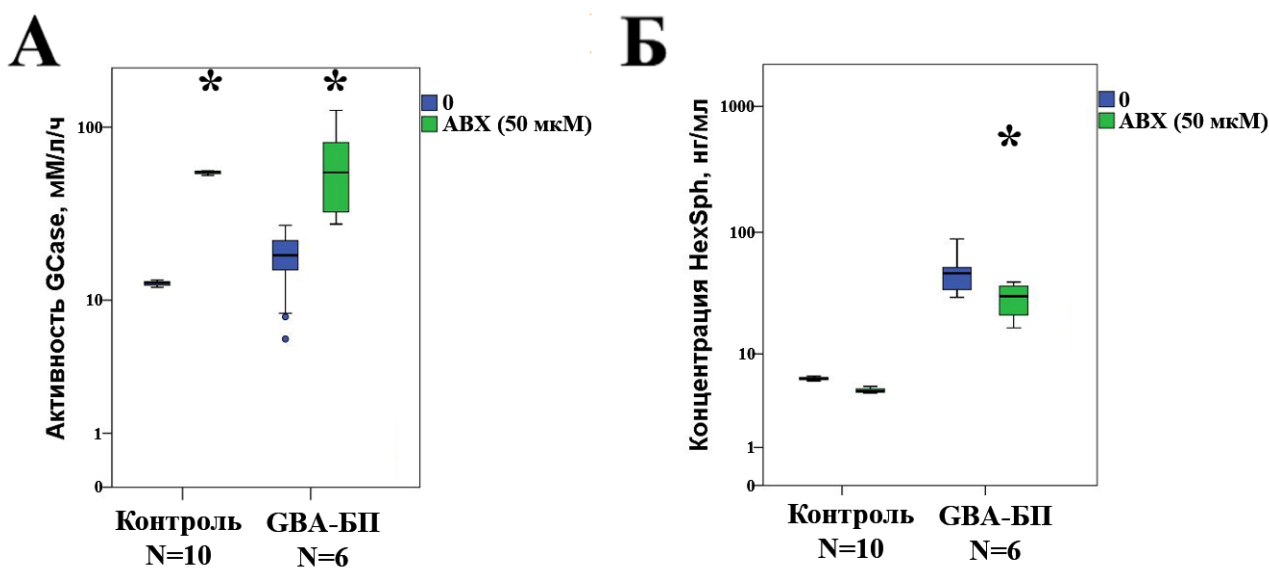


Рисунок 9 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на активность GCase (А) и концентрацию HexSph (Б) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП.

* p -value <0.05 по сравнению с необработанными клетками

Эффективность амброксола в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП варьируется в зависимости от типа мутаций гена *GBA1*. В культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, носителей «легких» мутаций в гене *GBA1*, активность GCase после воздействия амброксолом повысилась в 2,1-раза, в тоже время у носителей «тяжелых» мутаций активность GCase увеличилась в 4,1-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,008$ и $p=0,009$, соответственно). В культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, носителей «легких» мутаций в гене *GBA1*, концентрация HexSph при воздействии амброксолом снизилась в 1,5-раза, и в 1,4-раза у носителей «тяжелых» мутаций по сравнению с необработанными клетками ($p=0,008$ и $p=0,028$, соответственно). Интересно отметить, что данный эффект амброксола мы наблюдаем в культивируемых макрофагах пациентов как с БГ, так и GBA-БП. Ivanova M. и соавторы получили аналогичные результаты и показали, что амброксол повышает ферментативную активность GCase в культивируемых макрофагах пациентов с БГ 2 и 3 типа, и также наблюдалась зависимость эффективности амброксола от типа мутаций гена *GBA1* (Ivanova et al., 2018; Ivanova et al., 2021). Полученные нами и зарубежными коллегами результаты подчеркивают необходимость персонализированного подхода при использовании ФШ в качестве терапии, способствующей повышению активности GCase.

При оценке эффективности аллостерического ФШ N07 и его модификаций в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП было показано, что применение ФШ N07 не оказывает влияние на активность GCase ($p=0,948$) (Рисунок 10 А), в то время как соединение N2 приводило к повышению активности GCase в 1,5-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,012$) (Рисунок 10 А).

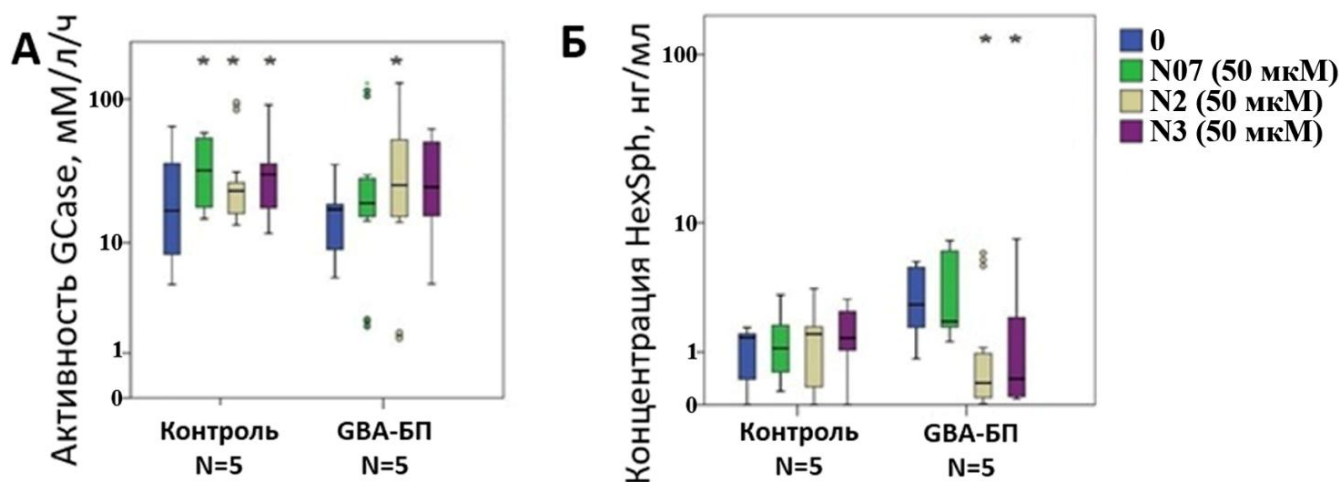


Рисунок 10 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase (А) и концентрацию HexSph (Б) в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП.

* p -value < 0.05 по сравнению с необработанными клетками

Кроме того, использование соединений N2 и N3 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП приводило к снижению концентрации HexSph в 14,5- и 11,6-раза по сравнению с клетками без добавления ФШ ($p=0,012$ и $p=0,043$, соответственно) (Рисунок 10 Б). При этом соединение N2 более эффективно в снижении концентрации HexSph по сравнению с исходным соединением N07 ($p=0,001$).

В культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, носителей «легкой» мутации *GBA1* (N370S), использование ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 приводило к увеличению ферментативной активности GCase в 1,5-, 2,8- и 2,7-раз ($p=0,008$, $p=0,050$ и $p=0,008$). В культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, носителей «тяжелой» мутации *GBA1*

(L444P), ФШ N07 и его модификации N2 и N3 не оказывали влияния на восстановление ферментативной активности GCase в клетках первичной культуры макрофагов. В клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП, носителей «легкой» мутации *GBA1* (N370S), соединение N2 снижало концентрацию HexSph в 26,0-раз ($p=0,010$) и в 4,1-раза у носителей «тяжелой» мутации *GBA1* (L444P) ($p=0,008$). Соединение N3 снижало концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП, носителей «тяжелой» мутации *GBA1* (L444P), в 4,1-раза ($p=0,011$).

Скрининг ФШ GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК

Для изучения механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний актуальным является исследование пациент-специфичных ИПСК, проходящих направленную дифференцировку *in vitro* в узкоспециализированный тип нейронов. Поскольку при БП происходит гибель ДА-нейронов чёрной субстанции, в рамках данного исследования была осуществлена направленная нейрональная дифференцировка в данный тип нейронов с последующей оценкой активности GCase и концентрации HexSph.

В ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП было показано статистически значимое снижение активности GCase 5,83 (4,82-6,93) нМ/мг белка/ч по сравнению с лицами контрольной группы 7,54 (6,50-10,08) нМ/мг белка/ч ($p<0,0001$). Однако при оценке концентрации HexSph нами не было показано статистически значимых различий в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП 0,06 (0,03-0,06) нг/мл по сравнению с контролем 0,05 (0,04-0,08) нг/мл ($p>0,05$) (Grigor'eva et al., 2023). Аналогичные результаты были получены и с использованием клеток ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с GBA-БП (Fernandes et al., 2016; Schondorf et al., 2014; Yang et al., 2017), что согласуется с полученными нами результатами.

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSph в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП

Используя клетки ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП (N370S/WT) и лиц контрольной группы нами было оценено влияние ФШ GCase (амброксол, N07 и его модификаций) на активность и относительный уровень GCase в клетках, концентрацию HexSph и степень транслокации GCase в лизосомы.

Амброксол повышал активность GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП (N370S/WT) в 1,7 - раза по сравнению с клетками без добавления амброксола ($p=0,002$) (Рисунок 11 А). Кроме того, амброксол повышает активность GCase и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, лиц контрольной группы в 1,4 – раза ($p=0,002$) (Рисунок 11 А).

Однако при оценке влияния амброксола на концентрацию лизосфинголипдов в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, как пациента с GBA-БП (N370S/WT), так и лиц контрольной группы мы не выявили статистически значимых различий.

Yang и соавторы с использованием ДА- и холинергических нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с GBA-БП показали, что амброксол повышает активность и относительный уровень GCase, а также снижает количество белка альфа-синуклеина в клетках (Yang et al., 2017; Yang et al., 2022).

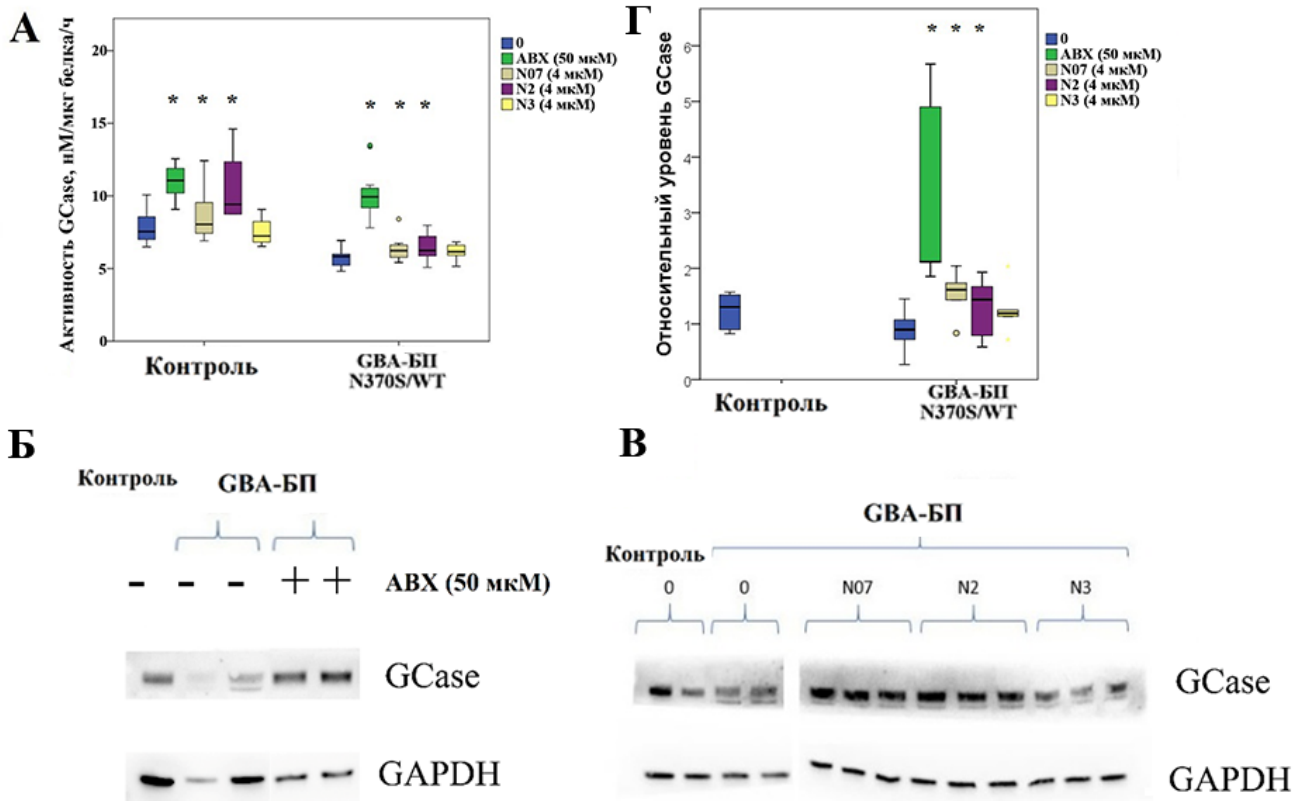


Рисунок 11 — Оценка влияния ФШ амброксол, N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase (А) и относительный уровень GCase (Б, В, Г) в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП и лиц контрольной группы. Вестерн-блот анализ белка GCase в ДА-нейронах при воздействии ФШ ABX (Б) и N07 и его модификациями (В). Относительный уровень белка GCase (Г) в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП при воздействии исследуемыми ФШ. * p-value <0.05 по сравнению с необработанными клетками

Использование ФШ N07 и соединения N2 повышает активность GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП (N370S/WT) в 1,1– и 1,14 – раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,026$ и $p=0,003$, соответственно) (Рисунок 11 А). Кроме того, ФШ N07 и соединения N2 повышает активность GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, лиц контрольной группы в 1,1- и 1,2-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,010$ и $p=0,043$, соответственно) (Рисунок 11 А).

Исследуемые соединения не оказывали влияния на концентрацию HexSph в ДА-нейронах как пациента с GBA-БП (N370S/WT), так и лиц контрольной группы.

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на количество GCase на ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК

При оценке влияния ФШ амброксол на количество GCase на ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, нами показано увеличение относительного уровня GCase в 3,8 – раза в ДА-нейронах пациента с GBA-БП (N370S/WT) по сравнению с необработанными клетками ($p=0,038$) (Рисунок 11 Б, Г).

С помощью анализа вестерн блот показано, что ФШ N07 и соединения N2 повышают относительный уровень GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП в 1,7- и 1,4-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,023$, $p=0,049$ соответственно) (Рисунок 11 В, Г).

Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на транслокацию GCase в лизосомы на ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК

При оценке влияния амброксола на степень колокализации белков GCase и маркера лизосом LAMP2 в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с ГВА-БП нами не было выявлено статистически значимых различий. При оценке влияния ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 на степень транслокации GCase в лизосому было показано, что соединение N2 повышает степень транслокации GCase в лизосому в 1,06-раза по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,0001$). В то время как ФШ N07 и его модификация N3 не оказывали положительного влияния на степень транслокации GCase.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании нами разработан подход для оценки эффективности соединений, направленных на восстановление функции GCase в клетках первичной культуры макрофагов с оценкой активности GCase и концентрации лизосфинголипидов методом ВЭЖХ-МС/МС. Нами впервые показано, что клетки первичной культуры макрофагов периферической крови человека могут использоваться в качестве *in vitro* модели для изучения патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, а также оценки эффективности таргетной терапии не только для БГ, но и ГВА-БП.

In vitro в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и ГВА-БП нами проведена оценка эффективности амброксола, аллостерического ФШ N07 и его модификаций в качестве ФШ GCase. Новый ФШ GCase (соединение N2), показал большую эффективность в восстановлении функции GCase по сравнению с исходным соединением, а именно при его воздействии снижение субстрата GCase и увеличение транслокации GCase в лизосомы по сравнению с соединением N07 было более выраженным. Кроме того, в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, полученных из мононуклеаров периферической крови пациента с ГВА-БП, было показано, что исследуемая *in vitro* модель может быть использована для оценки эффективности ФШ GCase при БП. В ДА-нейронах пациента с ГВА-БП проведена оценка влияния ФШ амброксол, N07 и его модификаций на восстановление функции GCase. ФШ N2 показал большую эффективность в повышении активности GCase и её транслокации в лизосомы по сравнению с исходным соединением N07. В целом, проведенное исследование подтвердило эффективность соединения N07 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов (Kopytova et al., 2023; Копытова и др., 2022) и позволила предложить новый ФШ GCase, обладающий большей эффективностью в снижении концентрации субстрата.

ВЫВОДЫ

- 1) Клетки первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше и ГВА-ассоциированной болезнью Паркинсона отражают изменения активности глюкоцереброзидазы и концентрации гексозилсфингозина, наблюдаемые в периферической крови при данных заболеваниях.
- 2) Воздействие фармакологическим шапероном амброксол приводит к повышению активности глюкоцереброзидазы и снижению концентрации гексозилсфингозина в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-ассоциированной болезнью Паркинсона.

- 3) Эффективность фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы в клетках первичной культуры макрофагов зависела от типа мутаций в гене *GBA1*. Амброксол, шаперон глюкоцереброзидазы смешанного типа, более эффективно повышает активность фермента у носителей «тяжелых» мутаций в гене *GBA1*, тогда как степень снижения субстрата более выражена у носителей «легких» мутаций. В тоже время, фармакологические шапероны аллостерического типа N07 и N2 более эффективно снижают концентрацию субстрата у носителей «тяжелых» мутаций в гене *GBA1*.
- 4) По сравнению с исходным соединением N07, N2 более эффективно снижает концентрацию гексозилсфингозина в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона, а также более эффективно повышает транслокацию глюкоцереброзидазы в лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше и дофаминергических нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, пациента с GBA-ассоциированной болезнью Паркинсона.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации

1. **Kopytova A.** The pharmacological chaperone NCGC00241607 binds to allosteric sites of mutant β -glucocerebrosidase and improves its activity in human cells / **A. Kopytova**, G. Rychkov, A. Cheblokov, E. Grigor'eva, M. Nikolaev, E. Yarkova, D. Sorogina, F. Ibatullin, G. Baydakova, A. Izymchenko, D. Bogdanova, V. Boitsov, I. Miliukhina, V. Bezrukikh, G. Salogub, E. Zakharova, S. Pchelina, A. Emelyanov // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – №10. – P. 9105.
2. Grigor'eva E. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease / E. Grigor'eva, **A. Kopytova**, E. Yarkova, S. Pavlova, D. Sorogina, A. Malakhova, T. Malankhanova, G. Baydakova, E. Zakharova, S. Medvedev, S. Pchelina, S. Zakian // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol.24. – №5. – P. 4437.
3. **Kopytova A.E.** Could blood hexosylsphingosine be a marker for Parkinson's disease linked with GBA1 mutations? / **A.E. Kopytova**, T.S. Usenko, G.V. Baydakova, M.A. Nikolaev, K.A. Senkevich, A.D. Izymchenko, A.A. Tyurin, I.V. Miliukhina, A.K. Emelyanov, E.Y. Zakharova, S.N. Pchelina // *Movement Disorders*. – 2022. – Vol. 37. – № 8. – P. 1779-1781.
4. **Kopytova A.E.** Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and Parkinsonism / **A.E. Kopytova**, G.N. Rychkov, M.A. Nikolaev, G.V. Baydakova, A.A. Cheblokov, K.A. Senkevich, D.A. Bogdanova, O.I. Bolshakova, I.V. Miliukhina, V.A. Bezrukikh, G.N. Salogub, S.V. Sarantseva, T.C. Usenko, E.Y. Zakharova, A. K. Emelyanov and S.N. Pchelina // *Parkinsonism Relat Disord*. – 2021. – Vol. 10. – №84. – P. 112-121.
5. Сенкевич К.А. Болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене GBA: молекулярно-генетические аспекты и возможные подходы к лечению / К.А. Сенкевич, **А.Э. Копытова**, Т.С. Усенко, А.К. Емельянов, С.Н. Пчелина // *Acta Naturae*. – 2021. – Т. 13. – № 2(49). – С. 78-80.

6. Николаев М.А. Макрофаги периферической крови человека как модель изучения дисфункции глюкоцереброзидазы / М.А. Николаев, А.Э. Копытова, Г.В. Байдакова, А.К. Емельянов, Г.Н. Салогуб, К.А. Сенкевич, Т.С. Усенко, М.В. Горчакова, Ю.П. Ковальчук, О.А. Беркович, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 12. – С. 1022-1028.
7. Pchelina S. Blood lysosphingolipids accumulation in patients with parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations / S. Pchelina G. Baydakova, M. Nikolaev, K. Senkevich, A. Emelyanov, А. Копытова, I. Miliukhina, A. Yakimovskii, A. Timofeeva, O. Berkovich, E. Fedotova, S. Ilarioshkin, E. Zakharova // Mov Disord. – 2018. – Vol. 33. – № 8. – P.1325-1330.

Список основных публикаций в других изданиях

8. Копытова А.Э. Таргетная терапия болезни Паркинсона / А.Э. Копытова, Т.С. Усенко, А.К. Емельянов, Г.В. Байдакова, Е.В. Григорьева, Г.Н. Рычков, Ф.М. Ибатуллин, Е.Ю. Захарова, С.М. Закиян, С.Н. Пчелина // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2022. – № 2. – С. 103-110.
9. Копытова А.Э. Поиск фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гоше / А.Э. Копытова, М.А. Николаев, Д.А. Богданова, К.А. Сенкевич, Г.В. Байдакова, О.И. Большакова, С.В. Саранцева, Г.Н. Рычков, А.А. Чеблоков, Ф.М. Ибатуллин, И.В. Милюхина, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, А.К. Емельянов // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19. – № 7. – С. 83-84.
10. Копытова А.Э. Разработка подходов к лечению болезни Гоше и болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене глюкоцереброзидазы / А.Э. Копытова, К.А. Сенкевич, С.Н. Пчелина // Сборник: Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск. – 2019. – С. 72-86.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	БГ – болезнь Гоше
<i>GBA 1</i> – ген глюкоцереброзидазы	БП – болезнь Паркинсона
<i>GBA</i> -БП – болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене <i>GBA1</i>	ВЭЖХ-МС/МС – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией
GCase – глюкоцереброзидаза	ДА – дофаминергические
GlcCer – глюкозилцерамид	ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
GlcSph – глюкозилсфингозин	ФС – фармакологический шаперон
HexSph – гексозинсфингозин	
N07 – соединение NCGC607 - 2-[2-[(4-иодфенил)амино]-2-оксоэтокси]-N-[2-(метил-фениламино)-2-оксоэтил]-бензамид	
N2 – соединение 2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)бензоил)-N-фенилгидразинкарбоксамид	
N3 – соединение 2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(2-оксо-2-(фениламино)этил) бензамид	