

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ)

На правах рукописи

Копытова Алена Эдуардовна

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

Специальность 1.5.4. – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Пчелина Софья Николаевна

Гатчина

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Болезнь Гоше	14
1.1.1 Общая характеристика и эпидемиология.....	14
1.2 Фермент глюкоцереброзидаза	18
1.3 Ген <i>GBA1</i>	21
1.3.1 N370S.....	22
1.3.2 L444P	23
1.4 Болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене <i>GBA1</i>	23
1.5 Подходы для терапии болезни Гоше	28
1.5.1 Фармакологические шапероны	31
1.5.2 Фармакологические шапероны ингибирующего типа.....	33
1.5.3 Фармакологические шапероны неингибирующего типа.....	35
1.6 Модели для изучения патологий, связанных с мутациями в гене <i>GBA1</i> , и скрининга препаратов, повышающих активность GCase	37
1.7 Разработка клеточных моделей для изучения патологий, связанных с дисфункцией GCase, и скрининга потенциальных активаторов ферментативной активности GCase.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1 Характеристика обследуемых групп.....	40
2.2 Получение клеток мононуклеарной фракции из периферической крови	43
2.3 Культивирование мононуклеаров крови с их последующей дифференцировкой в макрофаги	44
2.4 Получение дофаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК	45
2.5 Направленная дифференцировка ИПСК в дофаминергические нейроны	47
2.6 Определение активности GCase и концентрации гексозилсфингозина (HexSph) в цельной крови, клетках первичной культуры макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК.....	50

2.6.1 Экстракция образцов	51
2.6.2 Подготовка проб к анализу	52
2.6.3 Расчет активности ферментов	54
2.6.4 Измерение концентрации лизосфинголипидов	55
2.7 Колориметрическая оценка выживаемости клеток с помощью MTS теста на цитотоксичность.....	55
2.8 Культивирование клеток в присутствии фармакологических шаперонов GCase	57
2.9 Получение лизатов макрофагов и дофаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК, и оценка в них концентрации общего белка ..	59
2.10 Определение относительного уровня GCase с помощью вестерн-блот анализа.....	59
2.11 Оценка колокализации GCase и маркера лизосом LAMP2 в клетках методом иммунофлуоресцентного окрашивания.....	60
2.12 Оценка степени аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов.....	61
2.13 Статистическая обработка данных.....	62
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	63
3.1 Активность GCase и концентрация HexSph в крови пациентов исследуемых групп	63
3.2 Создание <i>in vitro</i> модели для скрининга ФШ GCase в клетках первичной культуры макрофагов	64
3.2.1 Оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ.....	65
3.2.1.1 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ	65
3.2.1.2 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на транслокацию GCase в лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ	72

3.2.1.3 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на количество белка GCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ	75
3.2.1.4 Влияние ФШ N07 и его модификаций на степень аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ	76
3.2.2 Оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП	78
3.2.2.1 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП	78
3.3 Скрининг ФШ GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК	81
3.3.1 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSph в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с ГВА-БП	82
3.3.2 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на количество GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК	85
3.3.3 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на транслокацию GCase в лизосомы в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК	87
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	100
ВЫВОДЫ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	104
ПРИЛОЖЕНИЕ А	128

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомную гидролазу 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, в первую очередь в макрофагах. Отмечается, что именно патологическое накопление липидов приводит к клиническому проявлению симптомов БГ [1]. В тоже время мутации в гене *GBA1* являются фактором высокого риска болезни Паркинсона (БП) (риск повышается в 7-8 раз) [2–6]. Важно отметить, что нами и другими авторами ранее было показано, что при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1* также наблюдается статистически-значимое снижение активности GCase и повышение концентрации субстрата [7–11]. Предполагается, что накапливающиеся лизосфинголипиды могут стабилизировать нейротоксичные формы альфа-синуклеина и способствовать нейродегенерации [12,13].

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии для БП, а также терапии для БГ с поражением 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.

В последние годы активно разрабатывается направление для терапии БГ на основе фармакологических шаперонов (ФС) GCase, небольших химических соединений, способствующих правильной сборке мутантных форм фермента и транспортировке его к сайту действия - в лизосому [14]. На клеточных линиях и на модельных животных с дисфункцией GCase и паркинсонизмом также показано, что восстановление активности GCase предотвращает нейродегенерацию [15–18]. Можно предположить, что такие активаторы GCase также могут быть эффективны в повышении активности GCase при ГВА-БП.

Степень разработанности темы исследования

Среди ФС GCase выделяют два типа: конкурентные ингибиторы, которые связываются с GCase в активном центре, и аллостерические ФС, которые связываются с GCase в аллостерических сайтах на поверхности белка [19,20]. Изофагомин, относящийся к ФС ингибирующего типа, повышал активность и транслокацию GCase в лизосомы на клеточных моделях БГ, однако при проведении клинических испытаний были выявлены существенные недостатки данного соединения, из-за которых клинические испытания были приостановлены. Согласно результатам, изофагомин не оказывал положительного эффекта на снижение концентрации субстрата у пациентов с БГ, а, следовательно, и на выраженность симптоматики БГ, что связывают, в том числе, с плохой растворимостью изофагомина [21]. Ожидается, что использование ФС, способных связываться с сайтами на поверхности GCase и при этом способствовать 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* [22–28]. Предполагается, что амброксол является рН-зависимым шапероном GCase смешанного типа, который может связываться как с активным центром, так и с сайтами на поверхности белка в зависимости от значения рН среды [22], и может использоваться не только при БГ с поражением центральной нервной системы, но и при GBA-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) [8,10,19,20,22,29–34].

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 на фибробластах 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 [35]. При разработке систем скрининга ФШ важно оценить не только влияние соединений на активность или количество белка GCase, но и, как основной параметр, на 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 И ЗАДАЧИ

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

Задачи

- 1) Сопоставить активность глюкоцереброзидазы и концентрацию гексозилсфингозина в периферической крови и в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с мутациями в гене *GBA1* (с болезнью Гоше и GBA-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 в 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 (соединения 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 на 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 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 колониестимулирующего фактора роста макрофагов М-КСФ (M-CSF), 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 вестерн-блот анализа.

Основные 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.

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.

По теме исследования было опубликовано 7 статей в изданиях из утвержденного Высшей аттестационной комиссией при Минобрнауки России перечня рецензируемых научных изданий и 3 статьи в прочих изданиях.

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Болезнь Гоше

1.1.1 Общая характеристика и эпидемиология

Сегодня описаны два заболевания, связанные с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (*GBA1*). Гомозиготное или компаундное гетерозиготное носительство мутаций гена *GBA1* приводит к развитию редкого аутосомно – рецессивного заболевания болезни Гоше (БГ). В тоже время мутации в гене *GBA1* ассоциированы с высоким риском болезни Паркинсона (БП).

Болезнь Гоше (БГ) – генетическая патология с аутосомно-рецессивным типом наследования, относящаяся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН), в основе развития которой лежат мутации в гене *GBA1* [1]. Распространённость БГ составляет 1:50000 в общей популяции и 1:850 в популяции Ашкенази евреев [36,37]. БГ характеризуется дефицитом активности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GCase) и внутриклеточным накоплением лизосфинголипидов в частности глюкозилцерамида (GlcCer) и его деацетилированной формы – глюкозилсфингозина (GlcSph), в первую очередь в лизосомах макрофагов. GCase участвует в процессе деградации лизосфинголипидов (GlcCer и GlcSph) до глюкозы и церамида и сфингозина, соответственно (Рисунок 1) [38,39].

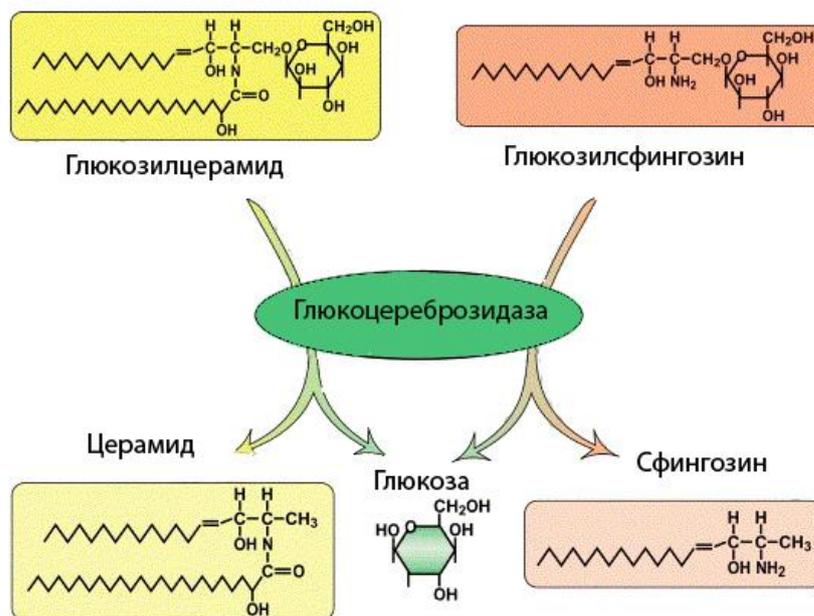


Рисунок 1 — Расщепление глюкозилцерамида (GlcCer) и глюкозилсфингозина (GlcSph) с помощью фермента глюкоцереброзидазы (GCase)

У пациентов с БГ накопление не утилизированных субстратов происходит во всех клетках организма, в первую очередь страдают макрофаги. Накопление субстратов в макрофагах приводит к образованию “клеток Гоше” (Рисунок 2) [40,41].



Рисунок 2 — Преобразование макрофагов в «клетки Гоше»

Наряду с накоплением прямого субстрата, в лизосомах макрофагов также происходит накопление его метаболита - GlcSph, образованного путем деацетилирования GlcCer. Концентрация GlcSph в плазме крови у пациентов с БГ увеличивается в 100 раз, по сравнению с контролем, в то время как уровень GlcCer увеличивается лишь в 5-10 раз. Предполагается что, GlcSph вовлечен в патогенез БГ и коррелирует с тяжестью симптомов и, соответственно, может использоваться в качестве маркера при БГ, а также наряду с активностью GCase, для оценки эффективности терапии [42,43]. Важно отметить, что нами и другими авторами ранее было показано, что при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1* также наблюдается статистически значимое снижение активности GCase и повышение концентрации субстрата, однако они менее выражены, чем у гомозиготных или компауд гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA1* [7,8,10,11,44].

К основным клиническим проявлениям БГ относят развитие органомегалии (преимущественно спленомегалии и гепатомегалии), цитопении, поражение костной системы и вовлечение в 1-10% случаев центральной нервной системы (ЦНС) [45–47]. Диагноз БГ ставится на основании совокупности клинических данных, результатов лабораторного исследования, биохимического и молекулярно-генетического анализа [48,49].

Классификация БГ включает 3 типа и основана на наличии у пациента поражения ЦНС, тяжести и скорости прогрессирования заболевания: 1 тип - ненейропатический, составляет до 90-95% случаев с распространенностью 1:40000-1:70000, 2 тип - острый нейропатический 1-5% случаев, 3 тип - хронический или подострый нейропатический 5-10% случаев [50,51]. Согласно данным литературы в России среди пациентов с БГ 82,6% приходится на 1 тип, 5,2% - 2 тип и 12,2% - 3 тип [52].

БГ 1 типа (ненейропатический тип, OMIM 230800) – является наиболее распространенной формой заболевания. Пациенты с 1 типом БГ характеризуются различной скоростью прогрессирования заболевания, а также значительно

варьирующимся возрастом манифестации (от рождения до 80 лет). Клинические проявления могут включать как практически бессимптомное течение заболевания, так и тяжелое поражение внутренних органов (спленомегалия, гепатомегалия, костные изменения, тромбоцитопения, анемия, задержка роста, хронические боли в костях) [53–55]. БГ 1 типа отличается отсутствием раннего специфического поражения ЦНС. Однако такие неврологические проявления, как периферическая нейропатия и синдром паркинсонизма, наблюдаются у лиц с БГ, что в значительной степени влияет на качество жизни [56,57].

БГ 2 типа (острый нейропатический тип, OMIM 230900) – отличается ранней манифестацией в первое полугодие жизни с тяжелой быстро прогрессирующей неврологической симптоматикой, выраженной гепатоспленомегалией с развитием вторичных инфекционных осложнений, приводящих к ранней смерти пациента [39,58].

БГ 3 типа (подострый нейропатический тип, OMIM23100) – является промежуточной формой между 1 и 2 типом, с поражением как паренхиматозных органов, так и ЦНС. Поражение нервной системы возникают, как правило в возрасте от 6 до 15 лет и менее тяжело выражены по сравнению с 2 типом БГ [53,59–61]. К основным неврологическим проявлениям БГ 3 типа относят: окуломоторные расстройства, снижение интеллекта, экстрапирамидные нарушения (ригидность), расстройства речи и письма, поведенческие изменения, генерализованные тонико-клонические судороги [40,59,60].

В последнее время в классификации БГ 3 типа выделяют несколько подтипов: 3А тип характеризуется преобладанием неврологических проявлений и обычно манифестирует в детском или подростковом возрасте [62]. Пациенты с БГ типа 3В характеризуются поражением внутренних органов и костно-суставной системы, неврологические симптомы могут проявляться только глазодвигательными расстройствами. В большинстве случаев БГ типа 3В манифестирует в раннем возрасте [53,59,60,63]. 3С тип БГ (сердечно-сосудистая форма) – наиболее редкая форма заболевания, отличающаяся наличием

неатеросклеротическим поражением сердца и крупных сосудов в виде кальцификации сердечных клапанов, аорты и коронарных артерий и развитием застойной сердечной недостаточности [64].

Согласно данным литературы пациенты с БГ со сходными клиническими фенотипами имеют значительную гетерогенность генотипа. И наоборот, пациенты с одним и тем же генотипом демонстрируют различные фенотипы заболевания, клиническое течение и ответ на терапию [65–67]. В фенотипическое проявление заболевания вносят вклад как молекулярно-генетические, так и эпигенетические факторы [66,68–70].

1.2 Фермент глюкоцереброзидаза

GCCase играет ключевую роль в метаболизме лизосфинголипидов (GlcCer и GlcSph). GCCase представляет собой мембраносвязанный белок состоящий из 497 аминокислот [71]. Впервые кристаллическая структура GCCase была описана в 2003 году [72]. Белок GCCase структурно состоит из 3 доменов: 1 домен (остатки аминокислот 1-27 и 383-414) содержит 2 N-концевые β -нити и структурную петлю, 2 домен (остатки 30-75 и 431-497) представляет собой иммуноглобулиноподобный домен, состоящий из двух тесно связанных β -листов, и 3 домен (остатки 76-381 и 416-430). 1 домен содержит два дисульфидных мостика (остатки 4-16 и 18-23), которые необходимы для правильного сворачивания белка (Рисунок 3) [72]. Активный центр фермента, располагающийся в 3 домене, представляет собой каталитическую диаду, состоящую из нуклеофильного остатка Glu 340 и общего кислотно-основного остатка Glu 235. Он ограничен 3 петлями, названными Loop 1, Loop 2 и Loop 3. Эти петли обладают гибкостью, чем и объясняется зависимость работы GCCase от pH [73]. Отмечается, что Loop 3 может перестраиваться из удлиненной в спиральную конформацию, которая стабилизируется при кислом pH, придавая GCCase более высокое сродство к субстрату [71]. Домен 3 и домен 1 содержат остатки цистеина, которые, как полагают, важны для активности

фермента; в частности, Cys 342 находится в непосредственной близости от активного центра, поэтому может играть роль в стабилизации белка [74,75].

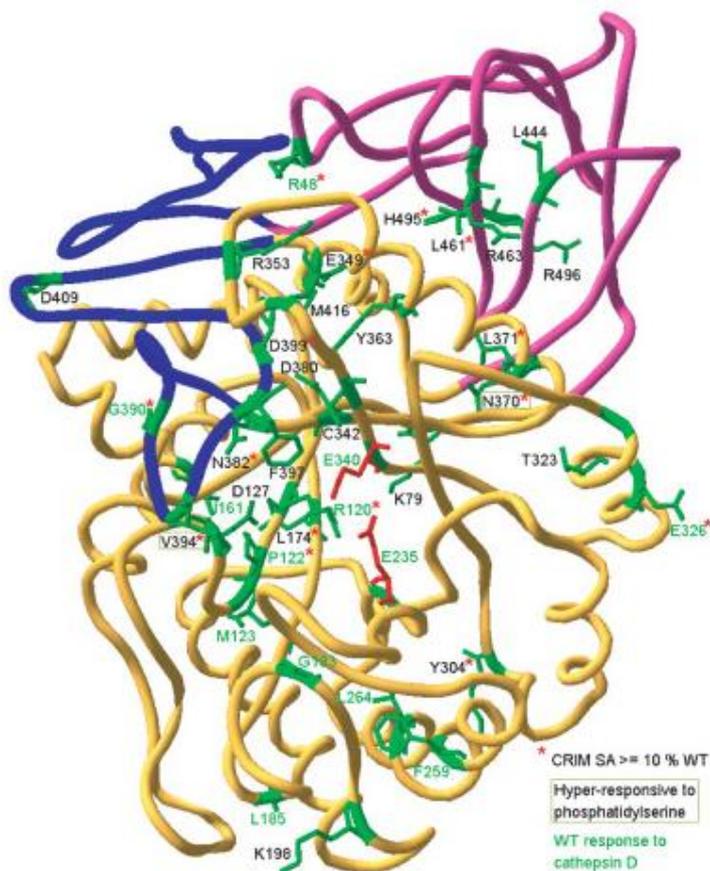


Рисунок 3 — Мутации в гене *GBA1* нанесены на трехмерную структуру GCase. Три домена фермента: синим (домен 1), розовым (домен 2) и желтый (домен 3). Остатки активного центра Glu340 и Glu235 показаны красным цветом [74]

После синтеза в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) для получения каталитически активного конформера белок подвергается котрансляционному гликозилированию в четырех из пяти сайтов N-гликозилирования по остаткам аспарагина (Asn 19, Asn 59, Asn 146, Asn 270 и Asn 462) [75]. Из ЭР GCase транспортируется в лизосому специальным переносчиком - лизосомным интегральным мембранным белком-2 (lysosomal integral membrane protein type-2 (LIMP2)), кодируемым геном *SCARB2* [76]. Находясь связанным с переносчиком LIMP2 GCase является неактивной. Кислая среда лизосом способствует

элюированию переносчика от GCCase, тем самым позволяя активировать фермент. Отмечается, что мутации в гене *SCARB2* могут влиять на фенотип БГ [77].

Для ферментативной активности GCCase необходимо наличие белка-активатора сапозина С, который представляет собой белок из 84 аминокислотных остатков. О важности данного белка кофактора свидетельствует редкий БГ-подобный синдром, вызванный дефицитом сапозина С [75,78]. Сапозин С усиливает связь GCCase с липидной мембраной, увеличивая активность фермента и способствует правильному пространственному взаимодействию и гидролизу субстрата [79]. Находясь в лизосоме, GCCase связывается с мембраной и частично внедряется в нее, включая структурную реорганизацию петель GCCase на границе раздела мембран. Вход в активный центр для наиболее вероятных ориентаций не обращен непосредственно к плоскости бислоя, вместо этого вход находится непосредственно над границей раздела мембрана-вода, где он, по-видимому, остается доступным для липидов и, следовательно, каталитически компетентным. Предполагается, что сапозин С взаимодействует с GCCase [80] вблизи входа в активный центр [81].

Стоит отметить, что деградация GlcCer и GlcSph катализируется не только GCCase, которая имеет лизосомную локализацию, но также и нелизосомальной мембраносвязанной GCCase 2, кодирующейся геном *GBA2*, которая локализуется в цитозоле на мембранах ЭР и аппарата Гольджи [82]. GCCase 2 экспрессируется повсеместно, однако высокие уровни экспрессии обнаружены в печени, головном мозге и семенниках [83]. Цитозольная GCCase 2 гидролизует GlcCer и GlcSph до церамидов, сфингозина и сфингозин-1-фосфата.

Мутации гена *GBA1* приводят к снижению активности и нарушению конформации GCCase и в различной степени влияют на фенотипическое клиническое проявление БГ [84–86]. Эти последствия могут возникать несколькими способами: 1) неспособность белка GCCase выйти из ЭР, 2) неспособность GCCase соединиться со своим транспортером LIMP2, 3) неправильно свернутая и нестабильная форма белка GCCase разрушается в протеосоме, 4)

неспособность GCase выйти из аппарата Гольджи, 5) GCase неактивна из-за мутаций в активном сайте, и 6) активность GCase изменена из-за дефекта Сапозина С [3]. Большинство мутаций гена *GBA1* не затрагивают активный сайт фермента, но в различной степени могут влиять на конформацию, стабильность и активность белка.

1.3 Ген *GBA1*

Ген *GBA1* картирован на длинном плече 1 хромосомы (1q21) и состоит из 11 экзонов и 10 интронов. Согласно международной базе данных по мутациям (The Human Gene Mutation Database, HGMDProfessional 2021.4) описано 480 вариантов, приводящих к развитию заболевания. Из всех патогенных вариантов гена *GBA1* 77% (368) приходится на миссенс и нонсенс-мутации; 13% (64) - делеции и инсерции/дупликации; 5,4% (26) - мутации, влияющие на процесс сплайсинга, и 4,4% (21) - сложные перестройки [87]. Мутации, приводящие к нарушению синтеза GCase в гомозиготном или компаундном гетерозиготном состоянии (с.84dupG/IVS2+1) являются летальными. Например, мутация с.84dupG, приводящая к сдвигу рамки считывания, что препятствует трансляции GCase, и мутация IVS2+1 (нуклеотидная замена G на A в позиции 1067) нарушает сплайсинг первичного транскрипта вследствие удаления из него 2-го экзона, встречаются только в компаундном состоянии с другими, более легкими мутациями [88]. Согласно данным литературы наибольшее число мутантных аллелей выявлены в 5-10 экзонах, последовательности, соответствующие этим экзонам, ответственны за протеолитическую стабильность (5-6 и 9-10 экзоны) и каталитическую активность фермента (8-11 экзоны) [89–91]. К наиболее часто встречающимся мутациям гена *GBA1* относят N370S, L444P, с.84dupG, V394L и R463C, на них приходится до 88-96% патогенных аллелей у евреев-Ашкенази и до 50-75% - у пациентов остальных популяций [89,90]. Частота встречаемости наиболее распространённых мутаций значительно варьируется в зависимости от популяций [92,93]. По данным исследований в России наиболее распространённым генотипом при БГ 1 типа

является N370S/L444P (27.3%) и N370S/другие (15.6%), среди пациентов с БГ 2 и 3 типа наиболее распространены генотипы L444P/L444P (62.9%) и L444P/D409H (23,1%) [52,94]. Большинство пациентов с БГ являются компаунд-гетерозиготами [86,95]. При стратификации мутаций в гене *GBA1* в зависимости от их влияния на фенотип у пациентов с БГ выделяют две группы мутаций: «легкие», ассоциированные с БГ 1 типа, и «тяжелые», как правило связанные с БГ 2 и 3 типов [89,96].

1.3.1 N370S

Мутация N370S является самой распространённой мутацией гена *GBA1* и выявляется у 70-75% пациентов с БГ евреев-ашкенази и у 25-30% пациентов остальных популяций. В гомозиготном состоянии мутация N370S чаще встречается у пациентов с 1 типом БГ и ассоциирована с отсутствием поражения ЦНС [53,97,98]. Для пациентов с генотипом N370S/N370S характерна более поздняя манифестация заболевания и меньшее вовлечение поражения печени, селезенки и костной системы [53,99]. Остаточная активность GCase при гомозиготном носительстве мутации N370S составляет 20-35 % от нормы [100–102]. Нуклеотидная замена пуриновых оснований аденина на гуанин в 1226 положении приводит к аминокислотной замене аспарагина на остаток серина в положении 370 альфа-цепи, расположенной между 2 и 3 доменом GCase [89,91]. В результате аминокислотной замены белок проявляет большую структурную ригидность и неспособность к небольшим изменениям при различном pH по сравнению с WT GCase [103]. Мутация N370S находится вне активного центра, расположенного в 3 домене, однако оказывает влияние на каталитическую активность белка за счет нарушения связывания с субстратом [72]. Согласно *in vitro* и *in silico* исследованиям мутация N370S приводит к нарушению связи GCase с сапозинем С и анионными фосфолипидами мембран, что в свою очередь снижает активность фермента GCase [75,78,79,104]. С помощью рентгеноструктурного анализа кристаллической структуры мутантной N370S GCase было показано, что данная

мутация не приводит к значительным конформационным изменениям в белке, благодаря чему он не подвергается расщеплению в протеасоме [103,105]. *In vitro* на фибробластах пациентов с БГ (N370S/N370S) было показано снижение транспорта GCase в лизосомы по сравнению с GCase WT [106].

1.3.2 L444P

Нуклеотидная замена пиримидиновых оснований в позиции 1448 молекулы ДНК приводит к аминокислотной замене лейцина на остаток пролина в 444 положении [72]. Данная аминокислотная замена расположена в гидрофобном ядре иммуноглобулиноподобного домена 2. Любая мутация в этом домене может привести к образованию нестабильного белка из-за разрушения гидрофобного ядра и измененного сворачивания этого домена [107]. Мутация L444P может быть выявлена у пациентов с БГ всех типов, однако в гомозиготном состоянии ассоциирована с поражением ЦНС (встречается в 50% случаев поражения ЦНС) [89,90,108,109]. Остаточная активность GCase при гомозиготном носительстве мутации L444P составляет ~ 5-10 % от нормы [101,102,110]. Кроме того, аминокислотная замена в 444 положении приводит к нарушению взаимодействия GCase и сапозина С [75,81,104]. Мутация L444P приводит к значительным конформационным изменениям структуры белка, в результате чего мутантный белок подвергается деградации в протеасоме [105]. *In vitro* на фибробластах пациентов с БГ (L444P/L444P) показано значительное снижение транспорта GCase в лизосомы (менее 10% от GCase WT достигает лизосом) [106,111].

1.4 Болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*

БП представляет собой распространенное нейродегенеративное заболевание, которое носит мультисистемный характер и характеризуется гибелью дофаминергических (ДА) нейронов черной субстанции головного мозга [112,113].

Впервые БП была описана Джеймсом Паркинсоном в 1817 году в его работе «Эссе о дрожательном параличе». Клиническая картина БП представлена рядом моторных (брадикинезия, мышечная ригидность, тремор покоя и поструральную неустойчивость) и немоторных симптомов, к которым относятся обонятельная дисфункция, когнитивные нарушения, психические симптомы, расстройства сна, вегетативная дисфункция, боль и усталость [114,115]. Патофизиологической особенностью БП является накопление и олигомеризация белка альфа-синуклеина с образованием телец Леви [112,116,117]. Участие альфа-синуклеина в патогенезе БП было подтверждено, когда были описаны аутосомно-доминантные формы БП, обусловленные мутациями в гене альфа-синуклеина (*SCNA*) [118,119]. В клетке альфа-синуклеин находится в равновесии между растворимой (цитозольной) формой и мембраносвязанной формой [120]. Его функция остается неясной, но предполагается, что он задействован в экзоцитозе, и, вероятно, участвует в пресинаптических нервных передачах к дендритам постсинаптического нейрона [121]. В условиях, когда локальная концентрация альфа-синуклеина высока, он может самособираться с образованием нерастворимых агрегатов альфа-синуклеина и фибрилл. Альфа-синуклеин деградирует в клетке с помощью макроаутофагии и шаперон-опосредованной аутофагии [122]. Предполагается, что превращение физиологически активной растворимой формы альфа-синуклеина в нерастворимую агрегатную форму является одним из многих факторов, способствующих развитию БП и других нейродегенеративных синуклеинопатий.

Распространенность БП в общей популяции составляет 0,3 %, среди лиц старше 60 лет – 1 %, и 4 % среди лиц старше 80 лет [123]. Большинство случаев БП носит спорадический характер, при этом на семейные формы приходится 10-15 % случаев [124]. На сегодняшний день описано около 90 генетических локусов, ассоциированных с БП [125]. Их можно разделить на гены, мутации в которых приводят к развитию моногенных форм БП, и гены, ассоциированные с риском БП. К моногенным формам БП относят аутосомно-доминантные формы (*SNCA*, *LRRK2*, *VPS35* и др.) и аутосомно-рецессивные (*PARKIN*, *PINK1*, *DJ1* и др.) [6,124].

Необходимо отметить, что связь БП и мутаций в гене *GBA1* была выявлена в клинических наблюдениях при описании повышенной частоты развития БП среди родственников пациентов с БГ. Позднее при проведении анализа по типу случай - контроль также, как и при полногеномном анализе ассоциаций (GWAS) была подтверждена ассоциация для ряда генов с БП (*SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *GBA1*) [6,124]. Следует отметить, что из них только мутации в гене *GBA1* являются факторами высокого риска развития БП, риск у носителей мутаций повышается в 6-8 раз [3–6,124]. Носители мутаций в гене *GBA1* среди пациентов с БП демонстрируют широкий фенотипический спектр: раннее начало заболевания, леводопа - чувствительную БП с клиническими проявлениями, характерными при деменции с тельцами Леви [4,126]. Также имеются сообщения о более частом развитии когнитивного дефицита [6].

Молекулярный механизм развития БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA-БП) остается неизвестным, предполагается несколько механизмов вовлеченных в развитие и прогрессирование заболевания, таких как агрегация и накопление альфа-синуклеина, нейровоспаление, митохондриальная и лизосомальная дисфункция, нарушение аутофагии и окислительный стресс [3,12,32,127–129].

Обсуждается, что дисфункция GCase может иметь значение и при спорадической форме БП. Так исследования аутопатов ткани головного мозга показали, что даже в некоторых случаях спорадической БП наблюдается снижение уровня GCase [130,131]. Однако, данное наблюдение подтверждается не всеми авторами [12,132]. В нескольких исследованиях предполагается, что снижение активности GCase может повысить риск развития БП, способствуя накоплению альфа-синуклеина. Деградация большинства белков в клетке, в том числе и альфа-синуклеина происходит посредством процессов аутофагии, протекающих в лизосоме [133]. Дисрегуляция процессов аутофагии наблюдается при всех ЛБН. При БГ происходит нарушение процесса аутофагии на стадии формирования аутофагосом, их накопление, а также накопление нефункциональных и

агрегированных белков, что еще больше усиливает лизосомную дисфункцию [29]. Кроме того, ранее проведенные исследования подчеркивают, что нарушение процессов аутофагии, опосредованное дисфункцией лизосом, приводит к нарушению гомеостаза инфламосом и запускает воспаление [29]. У пациентов с БП также наблюдается нарушение клиренса аутофагии. Так, например, ряд авторов показали, что нейроны как пациентов с БГ, так и GBA-БП характеризуются сниженной активностью GCase, повышенным уровнем альфа-синуклеина и нарушением процесса аутофагии [11,44,134,135].

Независимо от степени дефицита GCase у пациентов с GBA-БП наблюдается повышенная агрегация альфа-синуклеина. Анализ аутопатов ткани головного мозга пациентов с БП и БГ [136] показал, что снижение GCase в черной субстанции коррелирует с повышением уровня альфа-синуклеина. Mazzulli и соавт. [12] показали, что снижение активности GCase в культивируемых нейронах приводит к снижению клиренса и последующему повышению уровня альфа-синуклеина. Снижение активности GCase в лизосоме также связано с накоплением субстратов GlcCer и GlcSph, причем GlcSph является более цитотоксичным [137]. Кроме того, было обнаружено, что накопленный субстрат GlcCer непосредственно влияет на конформацию и растворимость альфа-синуклеина путем стабилизации уровней растворимых промежуточных продуктов (Рисунок 4) [138]. Возможно накопление альфа-синуклеина в лизосомах может снижать общую активность GCase в лизосомах, что еще больше усугубляет проблему.

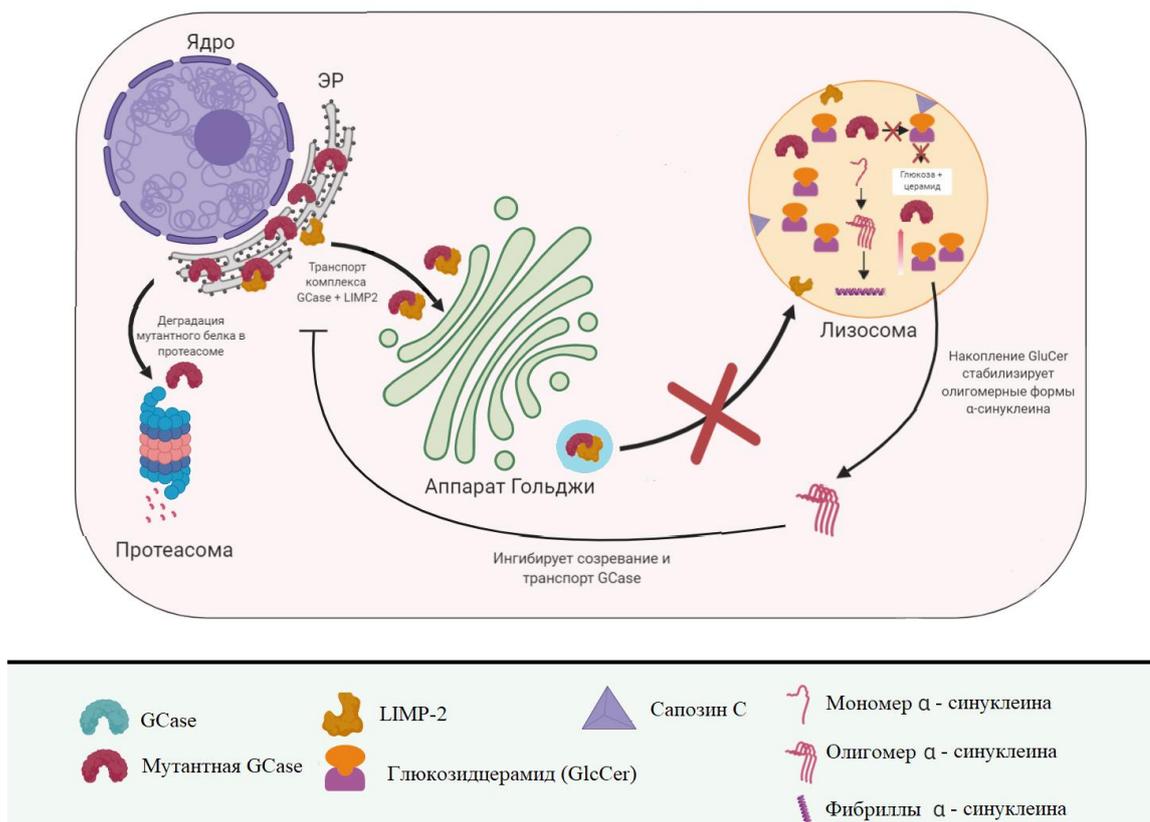


Рисунок 4 — Возможные взаимодействия GCase и альфа-синуклеина. Снижение активности и транспорта GCase в лизосому приводит к нарушению метаболизма GlcCer и GlcSph с их последующим накоплением в лизосомах. Накопление субстратов GCase, в свою очередь, стабилизирует олигомерные формы альфа-синуклеина, что приводит к его накоплению и олигомеризации. Олигомеры альфа-синуклеина способны ингибировать транспорт GCase из ЭР в лизосому.

GCase – глюкоцереброзидаза, GlcCer – глюкоцереброзид, GlcSph – глюкозилсфингозин, ЭР – эндоплазматический ретикулум, LIMP2 - лизосомальный интегральный мембранный белок-2

Нами было показано, что пациенты с БГ характеризуются снижением эффективности транслокации GCase лизосомы в клетках первичной культуры макрофагов [8]. GCase достигает лизосомы, взаимодействуя с белком транспортером - лизосомальным интегральным мембранным белком-2 (LIMP2). Мутации в гене *SCARB2*, кодирующем LIMP2, также могут способствовать снижению активности GCase [139].

Существует гипотеза, согласно которой накопление альфа-синуклеина нарушает транспорт GCase в аппарат Гольджи, создавая двунаправленную петлю обратной связи, при которой снижение активности GCase или увеличение GlcCer приводят к накоплению альфа-синуклеина, что, в свою очередь, усиливает агрегацию альфа-синуклеина [138,139].

Учитывая общность патогенеза БГ и GBA-БП можно предположить, что разрабатываемые стратегии для повышения активности GCase в клетках могут быть эффективны для лечения этих двух заболеваний.

1.5 Подходы для терапии болезни Гоше

На сегодняшний день основной стратегией лечения БГ является фермент заместительная терапия (ФЗТ), основанная на внутривенных инъекциях рекомбинантного фермента. Важно отметить, что ФЗТ не эффективна при лечении 2 и 3 типа БГ, так как рекомбинантный фермент не способен проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Данная терапия, также не может быть применима для нейропротекции при БП. На сегодняшний день в РФ для лечения пациентов с БГ зарегистрировано 2 препарата: Имиглюцераза (Imiglucerase, Cerezyme®) и Велаглюцераза альфа (Velaglucerase alfa, VPRIV) [140–143]. Преимуществом ФЗТ является высокий профиль безопасности и эффективности для купирования основных проявлений БГ, а недостатки обусловлены частыми инфузиями, снижающие качество жизни пациентов и отсутствие влияния на неврологическую симптоматику (даже при высоких дозах) в связи с невозможностью проникновения препарата через ГЭБ [144–146].

Применяют также субстрат-редуцирующую терапию (СРТ), которая заключается в ингибировании биосинтеза GlcCer. Однако данный подход не получил широкого распространения из-за низкой эффективности, частого развития побочных действий и высокой стоимости. Открытие того, что некоторые иминосакхара могут избирательно ингибировать биосинтез лизосфинголипидов,

приводя при этом к снижению количества субстрата до такого уровня, на котором собственная остаточная активность GCase у пациента может катаболизировать лизосфинголипиды и уменьшить нагрузку на клетки, привело к появлению еще одного подхода к лечению БГ. Таким подходом стала СРТ, которая включает введение ингибитора биосинтеза GlcCer посредством инактивации глюкозилцерамидсинтазы, тем самым ограничивая накопление субстрата. В настоящее время в РФ зарегистрировано два препарата для СРТ - миглустат Zavesca® [147] и тартрат элиглустата (Genzyme Corporation [148]), которые применяются только у взрослых пациентов с легкими и среднетяжелыми проявлениями БГ, при невозможности применения ФЗТ. Преимуществами данных препаратов является возможность перорального приема и, у миглустата – проникновение через ГЭБ. Наличие у миглустата ряда недостатков (невозможность применения у лиц с тяжелыми проявлениями БГ; отсутствие влияния на неврологические симптомы; относительно высокая распространенность побочных симптомов и, в ряде случаев, низкий комплаенс пациентов) ограничивает его применение в широкой практике, включая педиатрическую когорту пациентов [149–151].

Основываясь на результатах, свидетельствующих о том, что сфинголипиды могут индуцировать и способствовать накоплению альфа-синуклеина, была выдвинута гипотеза, что ингибирование глюкозилцерамидсинтазы может уменьшить накопление альфа-синуклеина и облегчить симптомы БП [13,18]. Доклинические эксперименты ингибитора глюкозилцерамидсинтазы GZ667161 на мышинных моделях со сверхэкспрессией трансгенного альфа-синуклеина р.А53Т с гомозиготной мутацией гена *GBA1* р.Д409V продемонстрировали уменьшение накопления альфа-синуклеина и улучшение когнитивных симптомов [18]. После чего аналог глюкозилцерамидсинтазы GZ667161 – Венглустат (Venglustat (GZ/SAR402671)) прошел несколько клинических испытаний среди здоровых добровольцев [152]). Профиль безопасности позволил начать плацебо-контролируемое исследование 2-й фазы, включающее 221 пациента с GBA-БП

(clinicaltrials.gov NCT02906020). Несмотря на многообещающие ожидания клиническое исследование было завершено раньше срока в связи с ухудшением двигательной симптоматики и более выраженными когнитивными нарушениями у пациентов [152,153].

Предполагается, что при патологиях, связанных с дисфункцией GCase, для коррекции генетического дефекта возможно использование вирусной конструкции, содержащей нормальную копию гена *GBA1*. Наиболее распространенным типом вирусного вектора, используемым в отношении *GBA1*, является аденоассоциированная вирусная инфекция (Adeno-associated virus (AAV)) [154]. AAV-опосредованная доставка *GBA1*, иначе известная как AAV-*GBA1*, была протестирована на животных моделях для оценки ее влияния на уровни биомаркеров БГ и GBA-БП [155,156]. Независимо от генотипа *gba*, полушария головного мозга мыши, которым вводили AAV-*GBA1*, демонстрировали улучшенную активность GCase, снижение уровня GlcCer и GlcSph и снижение уровня альфа-синуклеина, а также демонстрировали снижение нейродегенерации и нейровоспаления по сравнению с участками мозга, в которые вводили только носитель [156–158].

На настоящий момент препарат PRV-PD101 находится на 2-ой фазе клинического исследования среди пациентов с БГ и GBA-БП (clinicaltrials.gov NCT04411654, NCT04127578, США) [159], однако инъекцию данного препарата в настоящее время получили единичные пациенты.

В последние годы активно разрабатывается направление для терапии БГ на основе фармакологических шаперонов (ФС) GCase - небольших химических соединений, способствующих правильной сборке мутантных форм фермента и транспортировке его к сайту действия в лизосому [14]. Основные стратегии, используемые для терапии БГ изображены на рисунке 5.

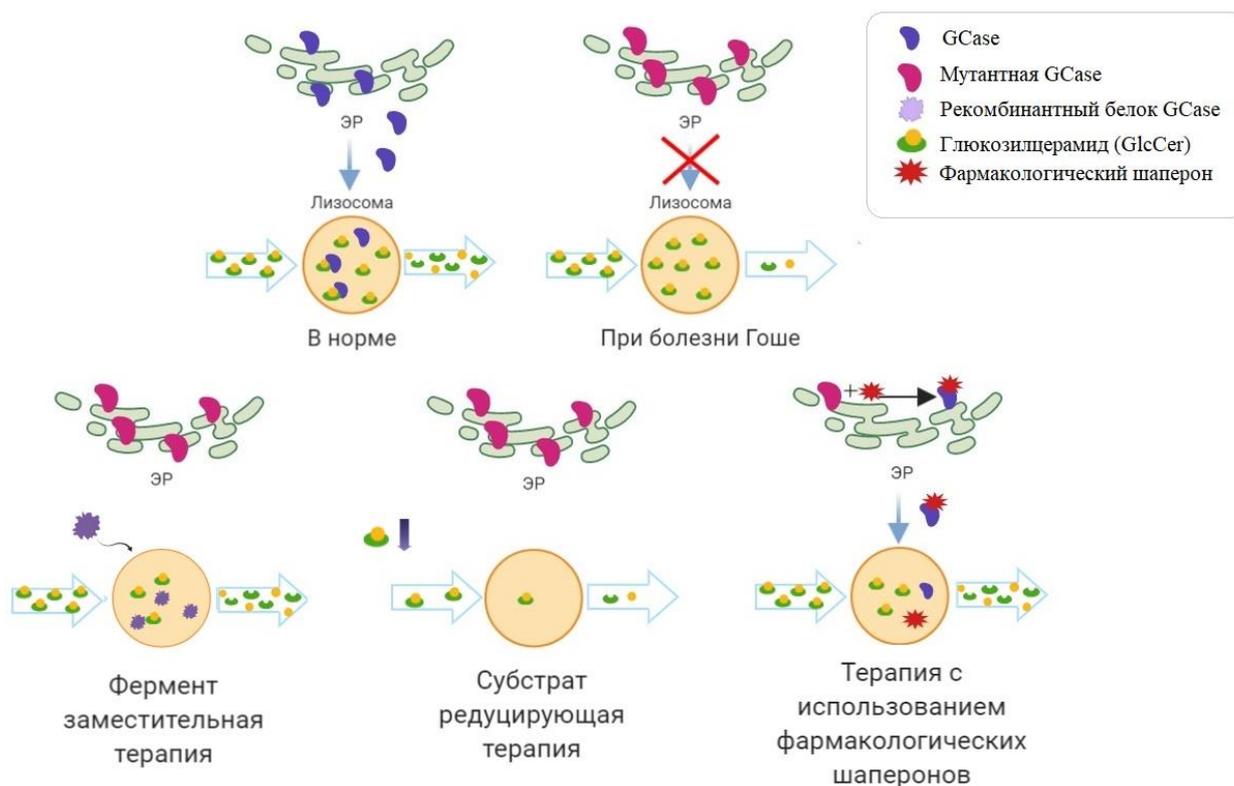


Рисунок 5 — Терапевтические подходы при болезни Гоше

1.5.1 Фармакологические шапероны

В настоящее время наиболее перспективным подходом для терапии патологий, связанных с дисфункцией GCase, является использование химических соединений, способных связываться с белком-мишенью и способствовать правильному фолдингу и транспорту белка, получивших название ФШ. Активно ведется поиск ФШ в качестве альтернативного подхода к лечению БГ и GBA-БП. ФШ GCase стабилизирует конформацию фермента для предотвращения неправильного фолдинга и улучшения точной транслокации белка из ЭР в аппарат Гольджи и лизосому (Рисунок 6) [160,161]. Поскольку большинство мутаций в гене *GBA1*, являются миссенс-мутациями и не затрагивают активный центр фермента, приводящими к неправильному фолдингу белка, ФШ, которые преодолевают ГЭБ, представляют привлекательную терапевтическую стратегию.

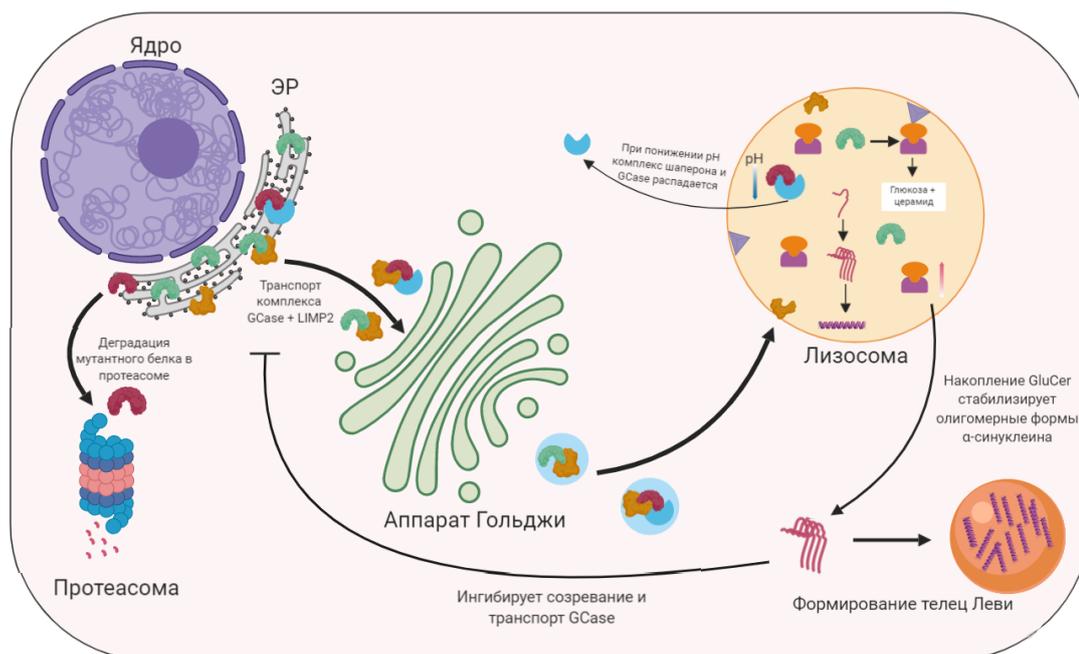


Рисунок 6 — Принцип действия фармакологических шаперонов (ФШ) GCCase. ФШ – химические соединения, способные связываться с мутантной формой GCCase после её синтеза в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), стабилизировать конформацию белка и способствовать его транспорту в лизосому. При попадании в лизосому ФШ элюируется от GCCase при кислотном pH в лизосоме

Существует два типа ФШ: ФШ, выступающие в качестве конкурентных ингибиторов GCCase (связываются с активным центром белка GCCase), и аллостерические активаторы (связываются с аллостерическими сайтами белка) [162]. При попадании в лизосому ФШ элюируется от GCCase из-за низкого pH лизосом, оставляя активный сайт доступным для ферментативного катализа. Степень элюирования зависит от сродства ФШ к субстрату; если сродство слишком велико, то активный сайт останется связанным с ФШ и каталитическая реакция не произойдет.

1.5.2 Фармакологические шапероны ингибирующего типа

В 2002 году Sawkar и соавт. предложили первый ФШ GCase – иминосакхар N-(n-нонил)дезоксиноиримицин (NN-DNJ). Впервые его влияние на активность GCase была показана на фибробластах, полученных от пациентов с WT и носителей мутации N370S гена *GBA1*. Однако NN-DNJ оказывал ингибирующее действие на альфа-глюкозидазу и глюкозилцерамидсинтазы, что затрудняет его использование в качестве ФШ GCase [160,163–166].

Затем в 2007 году в качестве ФШ GCase был предложен другой тип иминосакхара – изофагомин (IFG). Было показано, что IFG связывается с активным сайтом фермента и обладает высокой степенью сродства с GCase и даже внутри лизосомы при pH 4,6 IFG может оставаться связанным с GCase. Доклинические исследования IFG на моделях БП и БГ продемонстрировали эффективность для активации GCase [16,167–169]. Несмотря на наличие доказательств эффективности в доклинических исследованиях, клиническое исследование 2-ой фазы на пациентах с БГ было остановлено из-за отсутствия эффективности (clinicaltrials.gov NCT00446550) [167,169].

Для поиска ФШ GCase были протестированы и другие иминосакхара, но ни одно из соединений не показало благоприятного соотношения шаперон/ингибитор [170]. Иминосакхара имеют два основных ограничения, которые затрудняют их титрование: их нецелевая активность в отношении других лизосомных ферментов (таких как альфа-глюкозидаза, альфа-галактозидаза и бета-гексозаминидаза) и их высокая ингибирующая активность GCase [75].

Одной из наиболее интересных недавних разработок в данной области является открытие шаперонной активности амброксола, препарата, используемого в качестве муколитического средства [22,171]. С помощью высокопроизводительного скрининга химических соединений (Quantitative high throughput screening (qHTS)) с использованием рекомбинантной GCase был проведен скрининг 1040 соединений, одобренных к применению в клинической

практике (NINDS Library at National Institutes of Health), и показано, что амброксол проявляет свойства ФШ GCase [22]. Нами и другими авторами было показано, что амброксол является рН-зависимым ингибитором GCase смешанного типа [8,22]. На фибробластах и лимфобластах пациентов с БГ активность GCase была повышена после обработки амброксолом [22]. Амброксол способен снижать общий и фосфорилированный уровни альфа-синуклеина в головном мозге у трансгенных мышей, сверхэкспрессирующих альфа-синуклеин [26]. В исследовании на приматах ежедневное введение амброксола увеличивало активность GCase в головном мозге [28].

Преимущество амброксола перед другими предполагаемыми агентами заключается в том, что он обладает хорошо зарекомендовавшим себя профилем безопасности. Пилотные исследования показали, что высокие дозы амброксола проникают через ГЭБ, снижают уровень GlcSph в спинномозговой жидкости и улучшают неврологические симптомы у пациентов с нейронопатической БГ [172,173]. На сегодняшний день завершены клинические испытания амброксола в группе пациентов с БП легкой и средней тяжести путем рандомизации участников в группы амброксола с высокой дозой (1050 мг/сут), низкой дозой (525 мг/сут) или плацебо [25]. В клиническом исследовании с участием пациентов с БП, с мутациями в гене *GBA1* и без, было показано повышение активности GCase в крови, а также были достигнуты приемлемые уровни GCase в спинномозговой жидкости [32]. На данный момент проводится несколько клинических испытаний по оценке эффективности амброксола в группе пациентов с GBA-БП (clinicaltrials.gov NCT05287503, Италия), БП с деменцией (clinicaltrials.gov NCT02914366, Канада), деменцией с тельцами Леви (clinicaltrials.gov NCT04405596 Канада; clinicaltrials.gov NCT04588285, Норвегия) и БГ 1 типа (clinicaltrials.gov NCT03950050, Израиль) и 3 типа (jRCTs061190017, JPRN-UMIN000009392, Япония) [174].

1.5.3 Фармакологические шапероны неингибирующего типа

К сегодняшнему дню описано лишь несколько неингибирующих ФШ GCase, способных связываться с аллостерическими сайтами GCase и, способствующих восстановлению активности фермента (S-181, амброксол, NCGC607 (N07), NCGC758 и LTI-291) (Рисунок 7) [8,11,13–21]. При этом для большинства из них до сих пор не описаны сайты связывания с GCase и механизм их действия.

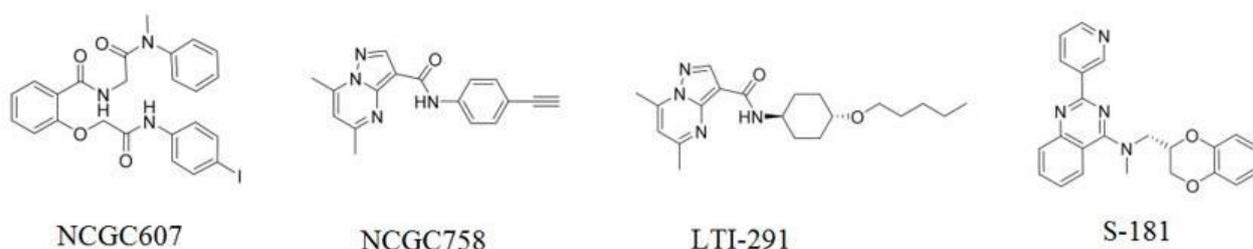


Рисунок 7 — Химические формулы соединений, описанных как ФШ GCase аллостерического типа

В 2012 году Sidransky, Goldin и коллеги методом высокопроизводительного скрининга (qHTS) на гомогенатах селезенки пациента с БГ (N370S/N370S) провели скрининг 250000 соединений и выявили 30 соединений в качестве потенциальных ФШ GCase [175,176]. Однако большинство соединений, выявленных в результате данного qHTS, обладали ингибирующей активностью по отношению к GCase. По результатам qHTS лишь 2 соединения представляли интерес в качестве ФШ GCase неингибирующего типа: 1) 2-(2-((4-бромфенил)амино)-2-оксоэтокси)-N-(2-(метил(фенил)амино)-2-оксоэтил)бензамид (ML266 (или NCGC00182186)), производное салициловой кислоты и 2) N-(4-этинилфенил)-5,7-диметилпиразоло[1,5-а]пиримидин-3-карбоксамид (ML198 (или NCGC00188758 (NCGC758))). На фибробластах пациентов с мутациями гена *GBA1* N370S и L444P данные соединения приводили к повышению ферментативной активности GCase. Кроме того, выявленные соединения показали свою селективность к GCase по

сравнению с альфа-глюкозидазой и альфа-галактозидазой [20,175,176]. Позже Aflaki и соавт. показали эффективность аналога соединения ML266: 2-[2-[(4-иодфенил)амино]-2-оксоэтокси]-N-[2-(метил-фениламино)-2-оксоэтил]-бензамид, он же N07, в качестве аллостерического ФШ GCase на дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) ДА-нейронах и макрофагах пациентов с БГ и GBA-БП (носителей гомозиготных мутаций в гене *GBA1*) [34,177].

Соединение NCGC758 также является одним из многообещающих ФШ GCase неигбирующего типа [33]. NCGC758 показал свою эффективность не только в повышении активности GCase, но также и в снижении уровня лизосфинголипидов и альфа-синуклеина. NCGC758 оказывает влияние на аутофагию и снижает секрецию интерлейкина И-1b на различных клеточных моделях БГ и синуклеинопатий [29,35].

К настоящему моменту, два аналога соединения NCGC758 (**LTI-291** (5,7-диметил-N-((1r,4r)-4-(пентилокси)циклогексил)-пиразоло[1,5-a]пиримидин-3-карбоксамид и **S-181** ((с)-N-((2,3-дигидробензо[б][1,4]диоксин-2-ял)метил)-N-метил-2-(пиридин-3-)хиназолин-Амин) также рассматриваются как ФШ GCase. Соединение LTI-291 является первым неигбирующим ФШ GCase, дошедшим до 2 стадии клинических испытаний в когорте пациентов с GBA-БП [178,179]. Согласно результатам 1 фазы клинических испытаний LTI-291 является безопасным для применения и способен проникать через ГЭБ [180]. В ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациентов со спорадической БП, GBA-БП, LRRK2-ассоциированной БП и PARKIN-ассоциированной БП соединение S-181 приводило к повышению ферментативной активности GCase, снижению уровня лизосфинголипидов и альфа-синуклеина [31,181]. На данный момент лишь для соединения S-181 получены данные рентгеноструктурного анализа закристаллизованного комплекса белка GCase и S-181 и, тем самым, показан механизм его связывания с аллостерическим сайтом GCase [31].

Предполагается, что аллостерические ФШ могут быть более эффективны в клинической практике, поскольку обладают большей селективностью. Актуальными становятся исследования посвященные поиску химических модификаций уже известных ФШ, направленных на увеличение растворимости соединений и повышение их биодоступности. При этом важным остается вопрос по усовершенствованию систем скрининга потенциальных ФШ GCase.

1.6 Модели для изучения патологий, связанных с мутациями в гене *GBA1*, и скрининга препаратов, повышающих активность GCase

Для изучения роли дисфункции GCase на системном уровне сегодня используют различные модельные организмы. Ряд исследований выполнен на *Caenorhabditis elegans* (черви), *Drosophila melanogaster* (плодовая муха) и позвоночная рыба *Oryzias latipes* (медака). Преимуществом этих моделей перед мышинными является то, что животные, гомозиготные по нулевому аллелю *gba*, остаются жизнеспособными, а не демонстрируют неонатально летальный фенотип [182].

Большая работа была проделана для характеристики мышинных моделей GBA-БП, созданных путем отключения или подавления активности GCase [183].

Мышинные модели с мутациями в гене *GBA1* и сверхэкспрессией гена *SNCA* демонстрируют ускоренное накопление альфа-синуклеина и раннее проявление симптомов паркинсонизма. Примером может служить скрещивание мыши *gba1* D409H/D409H и мыши *SNCA* A53T. У мышей с двойной мутацией наблюдается специфическая для черной субстанции нейродегенерация, повышение уровня альфа-синуклеина и нарушение памяти и двигательного поведения [137]. Другой пример, полученный путем введения мышам L444P/+, специфичного для черной субстанции нейротоксина - МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина), демонстрирует более тяжелую паркинсоноподобную патологию, чем мыши, созданные только одним из этих механизмов [169,184]. Химическое

индуцирование Гоше-подобного фенотипа посредством введения кондуритол бета-эпоксида (conduritol B epoxide (CBE)), также используется при моделировании Гоше-подобной патологии [182]. Высокие дозы CBE, которые, как полагают, моделируют нейропатическую БГ, индуцируют повышение уровня мономерного альфа-синуклеина [185]. Более низкие дозы CBE в течение длительного периода времени более напоминают носителей мутации *GBA1* с 50% остаточной активностью GCase и создают паркинсоноподобный фенотип с повышенными уровнями олигомерного альфа-синуклеина, нейродегенерацией всего мозга и активацией микроглии [186].

Все вышеперечисленные модели чаще используются для исследования последствий дисфункций GCase, но не для скрининга таргетных препаратов. Для последующего внедрения в клиническую практику важно оценить воздействие соединений на GCase человека. В связи с чем для скрининга потенциальных препаратов используются именно клеточные линии человека. При этом от правильности выбора клеточной модели могут зависеть и полученные в ходе исследования результаты.

1.7 Разработка клеточных моделей для изучения патологий, связанных с дисфункцией GCase, и скрининга потенциальных активаторов ферментативной активности GCase

Изначально для изучения патологий, связанных с мутациями гена *GBA1* использовались фибробласты, полученные от пациентов с БГ и GBA-БП. Однако в данном типе клеток не происходит накопление лизосфинголипидов [187]. На сегодняшний день для изучения дисфункции GCase активно используется клеточная технология перепрограммирования ИПСК в макрофаги и ДА-нейроны. ИПСК, полученные от пациентов с БГ, перепрограммированные в макрофаги, проявляли сниженную активность GCase, повышенное накопление субстрата и нарушение транслокации GCase в лизосому. Сравнивая эти клетки с

культивируемыми макрофагами, полученными из моноцитов, выделенных у тех же пациентов, наблюдался сходный фенотип, что демонстрирует способность клеток, полученных из ИПСК, фенокопировать первичные клетки [35]. Чтобы изучить невропатологию и роль *GBA1* при паркинсонизме ИПСК, полученные от пациентов с БГ (с и без БП), также были дифференцированы в ДА-нейроны. Нейроны характеризовались дефицитом GCase и накоплением субстрата (GlcCer и GlcSph), что указывает на соответствующий фенотип БГ [34]. В тоже время использование в качестве *in vitro* модели клеток, дифференцированных из ИПСК, отличается значительными финансовыми затратами и длительностью проведения экспериментов.

Несмотря на разнообразность методов и подходов для изучения дисфункции GCase, использование клеток первичной культуры макрофагов может быть рассмотрено как наиболее быстрый, чувствительный и менее дорогостоящий метод, позволяющий не только проводить скрининг потенциальных препаратов, направленных на повышение активности, но и осуществлять персонализированный подход для поиска терапии. Поскольку макрофаги являются основным типом клеток, поражаемых при всех типах БГ, они являются естественным выбором в качестве модели для изучения данного заболевания [188]. Нами, а также другими авторами, показано, что клетки первичной культуры макрофагов могут быть использованы в качестве модели для изучения патологических механизмов при БГ, отражающей дисфункцию GCase с последующим накоплением субстрата [23,35,189]. Однако вопрос о повышении чувствительности данного подхода, а также его использование для скрининга препаратов для лечения GBA-БП остается открытым.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика обследуемых групп

Пациенты с БГ находятся под наблюдением гематолога в ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», где получают необходимую терапию. В исследование были включены пациенты, получающие как ФЗТ, так и СРТ терапию, а также три пациента с БГ до начала терапии. Постановка диагноза БГ основывалась на результатах биохимического анализа активности GCase, концентрации субстрата в периферической крови и результатах генетического анализа [49]. Забор периферической крови проводили из локтевой вены непосредственно перед инъекцией ФЗТ не ранее, чем через 1 месяц после предыдущей инъекции. 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. Бехтеревой РАН» и ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова. Постановка диагноза БП основывалась на критериях Британского банка мозга [190] и Международного сообщества по двигательным расстройствам [191]. Ранее в лаборатории молекулярной генетики человека, НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, был проведен скрининг мутаций в гене *GBA1* с целью выявления выборки пациентов с GBA-БП. Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», «Институт мозга человека имени Н. П. Бехтеревой РАН», ПСПбГМУ им. ак. И.П.Павлова и Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», перед забором периферической крови все пациенты подписали информированное согласие.

В исследование вошли 19 пациентов с БГ (средний возраст $33,9 \pm 3,3$ лет, 47% мужчин) и 8 пациентов с GBA-БП (средний возраст $56,6 \pm 2,9$ лет, 20% мужчин) и 32 здоровых индивидуума (средний возраст $40,2 \pm 5,6$ лет, 40% мужчин). Клинические характеристики пациентов с БГ и GBA-БП указаны в таблице 1 и 3,

соответственно. В таблице 2 приведена характеристика мутаций гена *GBA1* в зависимости от их тяжести.

Таблица 1. Клинические характеристики пациентов с БГ

Пациент	Тип БГ	Возраст, лет	Пол	<i>GBA1</i> мутации	Терапия	Остаточная активность GCase в крови, %
БГ1	1	45	ж	N370S/G202R	ФТЗ	2,5
БГ2	1	68	ж	N370S/N370S	ФТЗ	1,9
БГ3	1	41	ж	N370S/W184R	ФТЗ	5,1
БГ4	1	54	м	N370S/c.84dupG	ФТЗ	0,4
БГ5	1	29	м	N370S/L444P	СРТ	0,8
БГ6	1	47	ж	N370S/L444P	ФТЗ	2,8
БГ7	1	42	ж	N370S/L444P	ФТЗ	5,8
БГ8	1	28	м	N370S/L444P	ФТЗ	5,9
БГ9	1	8	м	N370S/G202R	ФТЗ	3,7
БГ10	1	18	ж	N370S/L444P	СРТ	9,3
БГ11	1	20	м	L444P/M85T	ФТЗ	2,9
БГ12	1	27	ж	N370S /L444P	ФТЗ	4,7
БГ13	3	12	м	L444P /L444P	ФТЗ	5,1
БГ14	1	35	ж	N370S /R120W	ФТЗ	2,8
БГ15	1	31	ж	N370S /L444P	ФТЗ	3,2
БГ16	1	50	м	N370S /-	ФТЗ	4,8
БГ17	1	26	м	N370S / R120W	-	10,3
БГ18	1	32	ж	N370S/N370S	-	-
БГ19	1	31	м	N370S/V375L	-	10,7

СРТ – субстрат-редуцирующая терапия, ФТЗ – фермент-заместительная терапия
Остаточная активность GCase в крови у пациентов с БГ представлена относительно контроля.

Таблица 2. Характеристика мутаций в гене *GBA1* в зависимости от их тяжести

Изменение аминокислотной последовательности		Изменение в нуклеотидной последовательности	Тяжесть мутаций
Традиционная номенклатура	Номенклатура, рекомендуемая HGVS*		
N370S	N409S	c.1226A>G	Легкая
W184R	W223R	c.667T>C	Легкая
84GG	L29fs	c.84dup	Тяжелая
L444P	L483P	c.1448T>C	Тяжелая
G202R	G241R	c.721G>A	Тяжелая
M85T	M124T	c.371T>C	Тяжелая
R120W	R159W	c.475C>T	Тяжелая
V375L	V414L	c.1240G>T	Легкая

* номенклатура, рекомендуемая Обществом по изучению вариаций человеческого генома (Human Genome Variation Society, HGVS).

Таблица 3. Клинические характеристики пациентов с GBA-БП

Пациент	Возраст, лет	Возраст начала заболевания, лет	Пол	<i>GBA1</i> мутации	Остаточная активность GCase в крови, %
GBA-БП1	65	58	ж	N370S/WT	51
GBA-БП2	57	55	ж	N370S/WT	55
GBA-БП3	64	46	ж	L444P/WT	37
GBA-БП4	61	60	ж	L444P/WT	30
GBA-БП5	60	48	м	L444P/WT	41
GBA-БП6	49	42	ж	L444P/WT	45
GBA-БП7	41	37	м	N370S/WT	84
GBA-БП8	56	50	ж	N370S/WT	38

Остаточная активность GCase в крови у пациентов с GBA-БП представлена относительно контроля.

2.2 Получение клеток мононуклеарной фракции из периферической крови

Образцы цельной венозной крови были собраны в вакуумные пробирки с ЭДТА. Мононуклеарная фракция была получена из 18-27 мл свежесобранной цельной крови методом градиентного центрифугирования в растворе фиколла ($\rho=1,077$, ПанЭко, Россия) при 400 g в течение 40 минут по методике, описанной ранее [189] и дважды отмыта PBS с последующим центрифугированием при 300 g в течение 10 минут (Рисунок 8).

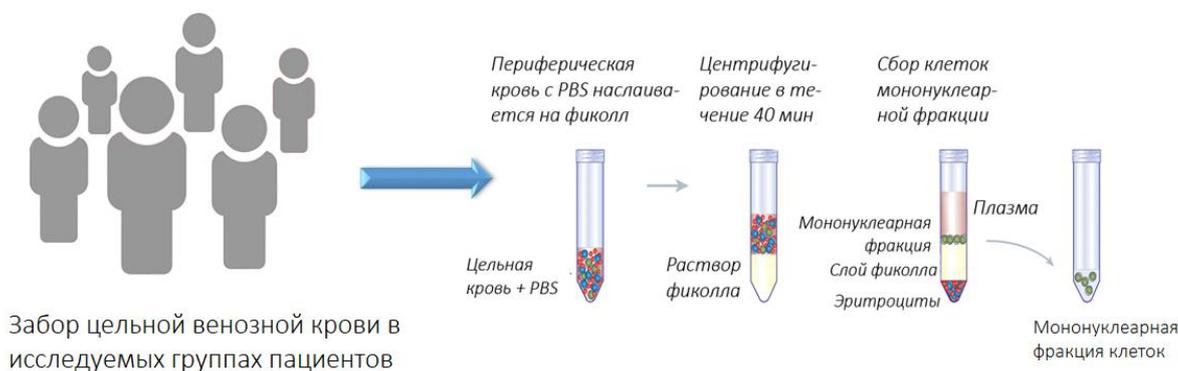


Рисунок 8 — Получение клеток мононуклеарной фракции периферической крови методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла

2.3 Культивирование мононуклеаров крови с их последующей дифференцировкой в макрофаги

Полученные мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640, Corning, США) и культивировали по протоколу, описанному ранее [8,189] с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Fetal bovine serum (FBS)) (Corning, США), 1% гентамицина (Corning, США) в 5% CO₂-инкубаторе при +37⁰C в течение 2 ч. После чего клетки дважды промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в присутствии макрофагального колоние-стимулирующего фактора роста (M-КСФ) (M-CSF, Biolegend, США) в конечной концентрации 10 нг/мл в течение 5 суток в 5% CO₂-инкубаторе при +37⁰C с ежедневной заменой среды.

Фенотипическое созревание макрофагов было подтверждено с помощью световой микроскопии (Рисунок 9) и проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных антител (eBioscience, США), иммуногенных к мембранным белкам CD45⁺ и CD68⁺ лейкоцитов и макрофагов. На световой микроскопии популяция моноцитов характеризовалась значительным числом клеток сферической и овальной форм. Популяция макрофагов отличалась большим размером, присутствием множества клеток неправильной формы.

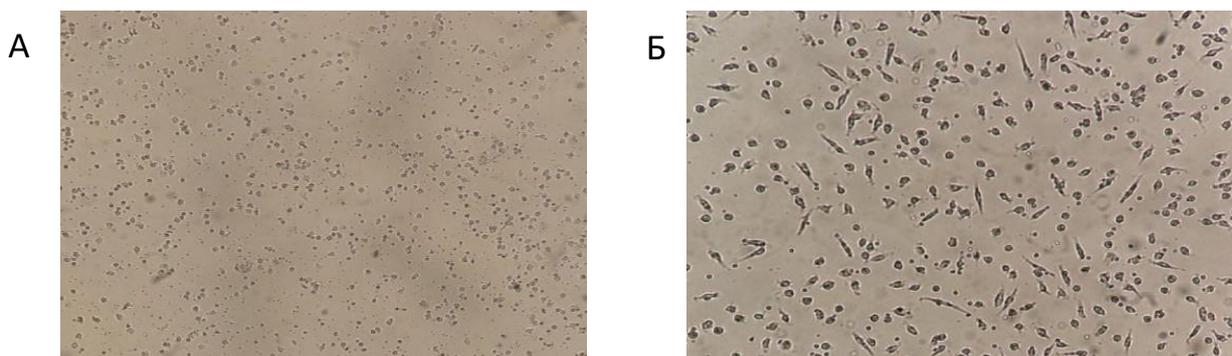


Рисунок 9 — Популяции клеток периферической крови человека: (А) популяция моноцитов в первый день культивирования, (Б) популяция макрофагов на 5ый день культивирования с M-CSF. Приближение 20X/0,40 ∞1,2. Световой микроскоп ЛОМО БЛМ

2.4 Получение дофаминергических нейронов, дифференцированных из ИПСК

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 Сурен Минасович).

Для получения ИПСК использовалась мононуклеарная фракция клеток периферической крови пациента с ГВА-БП (ГВА-БП8) и двух здоровых индивидуумов.

Культивирование мононуклеаров крови проводилось в среде, имеющей следующий состав: StemPro34 Medium (Termo Fisher Scientific, США), Supplement StemPro34 (Termo Fisher Scientific, США), x1 смесь антибиотиков Pen-Strep (Termo Fisher Scientific, США), SCF 50 нг/мл (Peprotech, США), IL-3 10 нг/мл (Peprotech, США), эритропоэтин 3,6 мкг/мл (Биннофарм, Россия), IGF1 40 нг/мл (Peprotech), GM-CSF 25 нг/мл (Peprotech, США), дексаметазон 1 мкМ (Sigma, Германия).

Для получения ИПСК из мононуклеарных клеток был использован метод культивирования на чашках Петри, предварительно покрытых митотически инактивированными эмбриональными фибробластами мыши. Для проведения

нуклеофекции использовался набор Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific, США), содержащий 100 мкл R-буфера и ДНК эписомные вектора (0,5 мкг каждого, AddgeneID), экспрессирующие факторы репрограммирования: OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и Trp53. Затем клетки культивировали в питательной среде DMEM/F12, 1x B-27 supplement, 1x N-2 supplement, 1x GlutaMax, 1x Pen-Strep, 1x MEM NEAA (non-essential amino acids), 1 mM Хепес (Thermo Fisher Scientific, США), 0,1 mM β- меркаптоэтанол (Sigma, Германия), 10 нг/мл basic FGF (SCI Store, Россия). На 9 день меняли состав среды для культивирования ИПСК: 82% среды KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), 15% KoSR, 1x GlutaMAX, 1x Pen-Strep, 1x MEM NEAA, 0,1 mM β- меркаптоэтанол, 10 нг/мл basic FGF.

Через две недели после нуклеофекции наблюдались колонии ИПСК. ИПСК культивировали на подложке митотически инактивированных эмбриональных фибробластов мыши в среде, содержащей 82% среды KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific, США), 15% KoSR, 1x GlutaMAX, 1x Pen-Strep, 1x MEM NEAA, 0,1 mM β-меркаптоэтанол, 10 нг/мл basic FGF и 10 мкМ ингибитора сигнального каскада RHO/ROCK-Y-27632 (ROCK, StemRD, США) при 37 °C в CO₂-инкубаторе во влажной атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа с ежедневной заменой среды. Пересадка клеток осуществлялась в среднем каждые 3-6 дней.

В процессе культивирования от каждого пациента отобрали по 3 линии, которые имели характерную морфологию и активно пролиферировали. Морфология выбранных линий являлась характерной для ИПСК человека. Клетки имеют большое ядерно-цитоплазматическое соотношение, активно пролиферируют, колонии плотные, плоские, однослойные, имеют округлую форму. Для подтверждения плюрипотентного статуса, полученные линии были проверены на экспрессию неспецифического маркера - эндогенной щелочной фосфатазы. Все клетки были положительными к щелочной фосфатазе.

Для проверки плюрипотентного потенциала клеток также был проведен иммунофлуоресцентный анализ на специфические маркеры ИПСК по методике,

описанной ранее [192,193]. Все полученные линии ИПСК экспрессировали маркеры плюрипотентности, среди которых основные транскрипционные факторы, необходимые для поддержания плюрипотентного состояния и самообновления (OCT4, SOX2), а также поверхностные антигены (TRA-1-60, SSEA4), обеспечивающие межклеточные взаимодействия. Для подтверждения наличия мутации N370S гена *GBA1* у GBA-БП8 было проведено секвенирование по Сэнгеру полученных линий ИПСК. У линий, полученных от пациента GBA-БП8 исследуемая мутация была подтверждена, у линий ИПСК, полученных от лиц контрольной группы данная мутация отсутствовала. Линии PD30-4-7, PD30-5-16, PD30-5-27 (полученные из мононуклеаров периферической крови пациента GBA-БП8) были полностью охарактеризованы и зарегистрированы в Европейском реестре стволовых клеток hPSCreg под названием ICGi034-A (<https://hpscereg.eu/user/cellline/edit/ICGi034-A>), ICGi034-B (<https://hpscereg.eu/user/cellline/edit/ICGi034-B>), ICGi034-C (<https://hpscereg.eu/user/cellline/edit/ICGi034-C>), соответственно [192].

2.5 Направленная дифференцировка ИПСК в дофаминергические нейроны

Направленную дифференцировку ИПСК в ДА-нейроны проводили по ранее опубликованному протоколу [194] с модификациями [192,193]. ИПСК рассаживали на hESC-qualified Matrix (Matrigel-ESQ, BD Biosciences, США) и культивировали в среде для нейрональной дифференцировки: F12/DMEM:Neurobasal (Thermo Fisher Scientific, США) 2:1, 1x N2 Supplement, 100 нг/мл LDN193189 гидрохлорид (LDN, Sigma, Германия), 8 мкМ SB431542 (SB, StemRD, США), 4 нг/мл basic FGF, 1x Pen-Strep. Этот день был обозначен как 0 день дифференцировки. Культивировали ИПСК с добавлением факторов: 100 нг/мл SHH(C25II), рекомбинантный мышинный белок (SHH, SystemsRD, США); 2 мкМ Пурморфамин (Stemgent), 3 мкМ CHIR99021 (Stemcell Technologies, Канада). Затем на 11 день ИПСК дезагрегировали с помощью реагента для диссоциации

клеток Accutase (Thermo Fisher Scientific, США) и высевали в соотношении 1: 2 на Matrigel-ESQ, в среду добавляли ROCK ингибитор. С 13 дня клетки культивировали на среде, которая состояла из F12/DMEM:Neurobasal 1:1, 1x B-27 Supplement minus vitamin A (B-27-A, Thermo Fisher Scientific, США), 20 нг/мл рекомбинантного человеческого BDNF (PeproTech, США), 1,1 мМ аскорбиновой кислоты (Sigma, Германия), 1x Pen-Strep, 0,5 мМ dbcAMP (Selleckchem), 20 нг/мл GDNF (PeproTech, США), 2 мг/мл TGF β 3 (PeproTech, США). Для терминальной дифференцировки после 25 дня в среду добавляли 0,1 мкМ Compound E (Millipore, США).

На 52 день дифференцировки клетки уже имели морфологию, характерную для нейронов: небольшое тело с мелким ядром, окаймленным тонким участком цитоплазмы; длинные отростки, формирующие множество межклеточных связей.

Нейроны были охарактеризованы иммунофлуоресцентным окрашиванием и qПЦР на наличие экспрессии специфического маркера ДА-нейронов - белка тирозингидроксилазы (TH), специфических факторов транскрипции LMX1A, LRTM1 и члена суперсемейства ядерных рецепторов факторов транскрипции NURR1 [29], а также общего нейронального маркера тубулина β 3 (TUBB3/TUJ1) (Рисунок 10) по методике, описанной ранее [193].

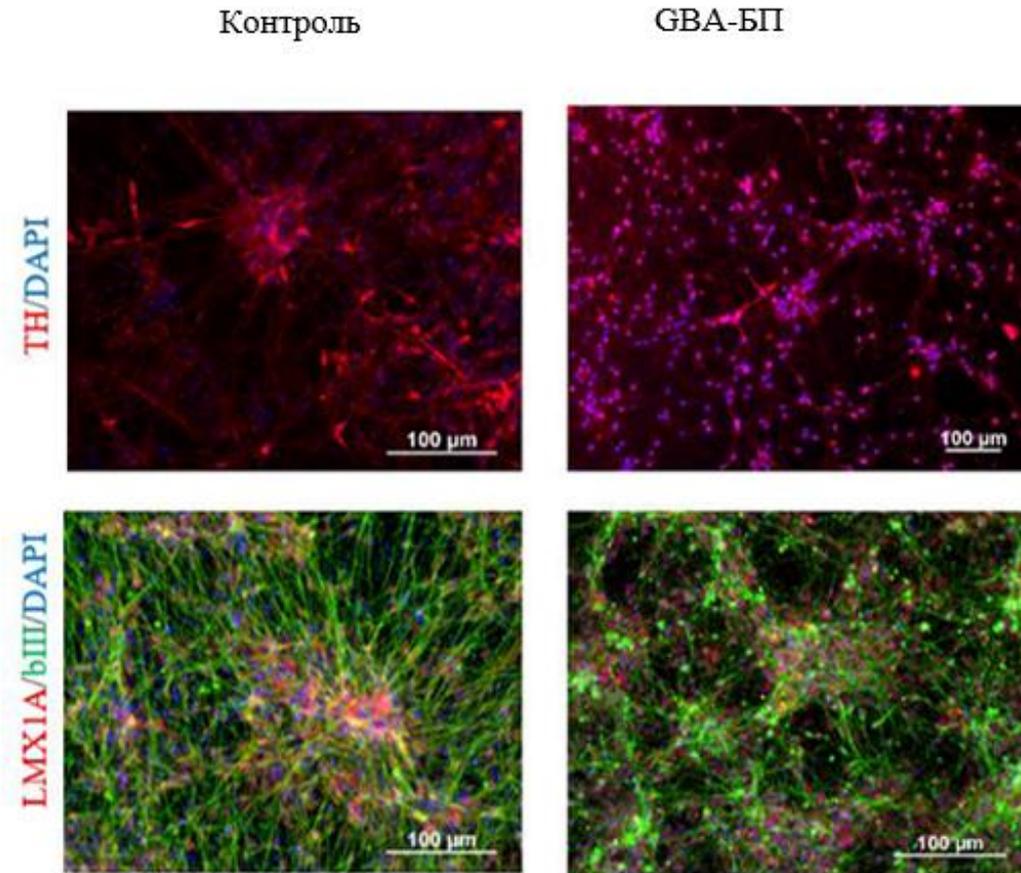


Рисунок 10 — Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры терминально дифференцированных ДА-нейронов: тирозингидроксилазы (ТН, красный сигнал) и транскрипционного фактора LMX1A (красный сигнал). Ядра окрашиваются DAPI (синий сигнал). Шкала – 100 мкм

В результате из мононуклеаров пациента с GBA-БП (N370S/WT) и двух индивидуумов контрольной группы были получены и охарактеризованы клетки ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, которые культивировались по 3 линии в 3х повторах. ДА-нейроны для большинства экспериментов культивировали более 60 дней. Для проведения дальнейших экспериментов клетки ДА-нейронов были лиофилизированы и заморожены при -80°C .

2.6 Определение активности GCase и концентрации гексозилсфингозина в цельной крови, клетках первичной культуры макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК

Выполнение исследований по оценке активности GCase и концентрации гексозилсфингозина (HexSph) проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра им. Н.П. Бочкова, Москва (руководитель - профессор, д.м.н. Захарова Е.Ю.).

Нами проводилась оценка концентрации HexSph, представляющего собой смесь двух эпимеров GlcSph и галактозилсфингозин (GalSph), а не прямого субстрата GCase – GlcCer, так как накопление его метаболита GlcSph является чувствительным маркером, коррелирующим с клиническими симптомами БГ [42,43,195]. У пациентов с БГ наблюдается более выраженное накопление GlcSph, чем GlcCer [42,93]. Концентрация GlcSph является диагностическим маркером БГ, а также используется для оценки эффективности терапии при БГ. GlcSph и GalSph являются эпимерами и для их хроматографического разделения требуется проведение дополнительного исследования с использованием специальной колонки для хроматографии гидрофильных взаимодействий. Накопление GalCer и GalSph, происходящее в результате нарушения работы галактоцереброзидазы, наблюдается при болезни Краббе, при этом у пациентов с БГ активность галактоцереброзидазы и концентрация соответствующего субстрата находится в пределах нормы в связи с чем многие авторы для оценки GlcSph используют оценку HexSph [196,197].

Цельную кровь, а также суспензию макрофагов наносили на специальные круги на фильтровальной бумаге (Whatman 903, Германия) в достаточном для равномерного пропитывания обозначенной области (Рисунок 11). Суспензия клеток наносилась на фильтры в конечной концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл, объем 20

мкл. Далее пятна были высушены в течение 2 часов при комнатной температуре и хранились при + 4 °С до дальнейшего использования не более одного месяца. Клетки ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, в количестве $4 \cdot 10^6$ кл/мл были лиофилизированы и заморожены при -80 °С для дальнейшей оценки активности GCase и концентрации HexSph.

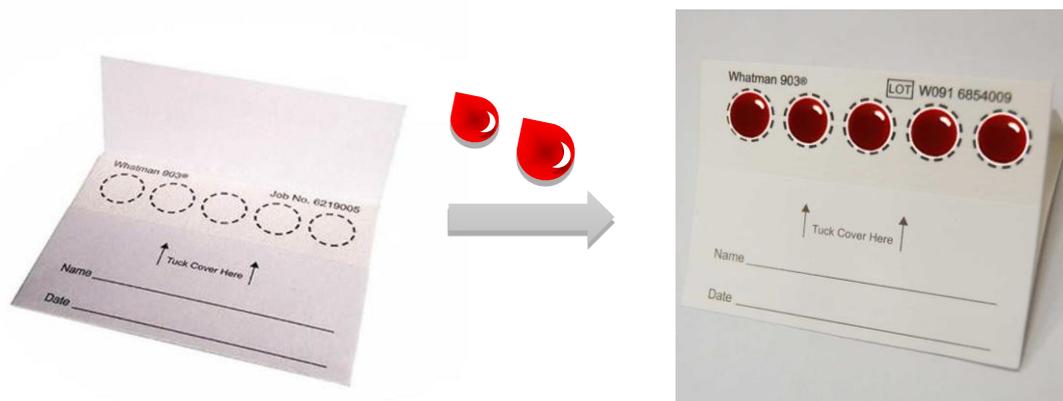


Рисунок 11 — Нанесение исследуемых образцов (периферическая кровь, суспензия клеток) на фильтровальную бумагу для дальнейшего проведения анализа активности ферментатов и концентрации субстратов методом ВЭЖХ-МС/МС

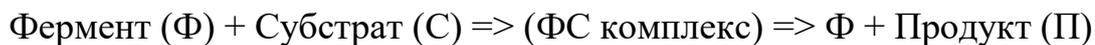
2.6.1 Экстракция образцов

Из каждого сухого пятна образца на фильтровальной карточке пробивалось одно пятно диаметром 3,2 мм в 96-луночный планшет. Для экстракции образцов клетки ДА-нейронов были подвергнуты медленной разморозке. Затем к каждому образцу добавляли 5% NaCl (50 мкл). По 6 мкл каждого образца добавляли в 96-луночный планшет.

Измерение активности GCase проводилась совместно с оценкой еще 5 лизосомных ферментов (α -галактозидазы (GLA), α -глюкозидазы (GAA), галактоцереброзидазы (GALC), сфингомиелиназы (ASM) и α -идуронидазы

(IDUA)) по ранее опубликованному протоколу (с модификациями) [198]. В рамках нашего исследования ферментом интереса являлась GCase.

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



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

2.6.2 Подготовка проб к анализу

К сухим пятнам образцов диаметром 3,2 мм, а также образцам клеток ДА-нейронов добавлялось по 45 мкл 6-плексного коктейля, содержащего мультиплексную смесь из S, IS и буферного раствора. Инкубационный буфер включал (0,1 М буферный раствор формиата аммония (pH 4,4)), акарбозу (8 мкМ) и таурохолат натрия (9,6 г/л).

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

Жидкостная экстракция проводилась путем добавления 400 мкл этилацетата и 300 мкл деионизованной воды с последующим центрифугированием в течение 5 минут при скорости вращения 1000 g. Содержимое ячеек планшета разделялось в результате центрифугирования на верхний органический слой и нижний водный

слой. Далее 300 мкл органического слоя переносилось в новый планшет и высушивалось под потоком азота при 40°C. Высушенный осадок растворяли в растворе ацетонитрил:метанол:деионизованная вода (40%:40%:20%), с содержанием 0,2% муравьиной кислоты. Планшет устанавливался в систему высокоэффективной жидкостной хроматографии Shimadzu LC-20 Prominence. Разделение проводилось на колонке Hypersil GOLD C18 (30 мм*2,1 мм, 5 мкм) в линейном режиме градиента. Для разделения продуктов реакции и внутренних стандартов использовалась следующая программа градиента: изначально 5% подвижной фазы А; 0,5 мин 100% А; 2,5 мин 100% А; 2,51 мин 5% А; 4 мин 5% А. Масс-спектрометрический анализ проводился на тандемном масс-спектрометре API 3200 QTrap (ABSciex, США) в режиме мониторинга множественных реакций (англ.: multiple reaction monitoring - MRM), хроматограмма, демонстрирующая время задержки и пики для продуктов (P) и внутренних стандартов (IS) 6 лизосомальных ферментов представлена на рисунке 12.

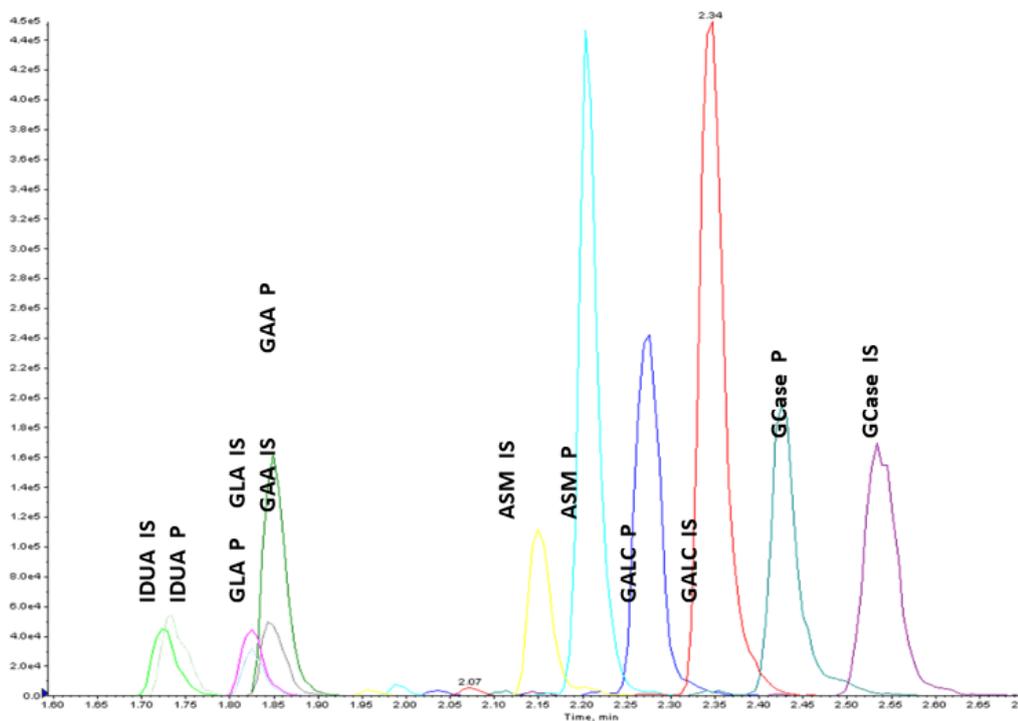


Рисунок 12 — Хроматограмма, демонстрирующая время задержки и пики для продуктов (P) и внутренних стандартов (IS) 6 лизосомальных ферментов

2.6.3 Расчет активности ферментов

Расчет активности ферментов проводили исходя из предположения, что количество полученного продукта прямо пропорционально активности ферментов лизосом в сухом пятне образца. GCase гидролизировала C12- глюкоцереброзид субстрата (S) для получения C12-церамида (P) и глюкозы. МС/МС измеряли относительные количественные показатели P и внутреннего стандарта C14-церамида (IS). Известное количество IS и измеренное амплитудное отношение P к IS использовалось для расчета определенного параметра P, который затем применяется для расчета активности GCase в образце. Количество продукта, образующегося в ходе ферментативной реакции, определяли с использованием отношения площади пика продукта (P) к площади пика внутреннего стандарта (P/IS). Активность фермента (Ae) в единицах мкМ/(ч*л) рассчитывали из количества продукта при условии, что образец сухого пятна крови диаметром 3,2 мм содержит 3,1 мкл исследуемого образца. Расчет основан на следующей формуле:

$$Ae = ((P/IS) \times [IS] \times V_{IS}) / (3,1 \times t_i)$$

V_{IS} – концентрация внутреннего стандарта, мкМ, t_i – время инкубации.

IS- внутренний стандарт, P-продукт.

В качестве контроля были использованы образцы с известным уровнем активности ферментов, полученных из центра по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), которые включались в каждый планшет.

Результаты измерения активности лизосомных ферментов в клетках ДА-нейронов далее были нормированы на содержание общего белка в лизатах.

2.6.4 Измерение концентрации лизосфинголипидов

Концентрацию лизосфинголипидов HexSph (смесь GlcSph и GalSph) оценивали по ранее опубликованному протоколу (с модификациями) [196], в частности, измерение проводили с использованием исследуемого образца диаметром 3,2 мм, в качестве внутреннего стандарта использовался лизолактозилсфингозин.

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

Лизосфинголипиды экстрагировали из сухих пятен путем добавления 100 мкл экстракционного растворителя (80% метанола, 15% ацетонитрила и 5% воды), содержащего 10 нг/мл IS, с последующей инкубацией в течение 60 мин (при 30°C, 650 об/мин). Экстрагированные лизосфинголипиды переносили в новый 96-луночный планшет. ВЭЖХ-МС/МС система состояла из ВЭЖХ Shimadzu Nexera и массспектрометра API-5500 QTrap. Разделение метаболитов проводилось на колонке Phenomenex Fusion-RP 4 мкм 2,1x50 мм в линейном режиме градиента. Для разделения метаболитов и внутреннего стандарта использовалась следующая программа градиента: изначально 20% мобильной фазы В; 2,4 мин. 100% В; 3,3 мин. 100% В; 3,31 мин. 20% В; 4 мин. 20% В.

Результаты измерения концентрации лизосфинголипидов в клетках ДА-нейронов далее были нормированы на содержание общего белка в лизатах.

2.7 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 в соответствии с инструкцией производителя (Promega, США). Макрофаги культивировали в течение 4х дней в 96-луночном планшете при ранее описанных условиях. Далее производилась замена среды и добавлялись исследуемые соединения в различной концентрации (конечная концентрация от 0 до 600 мкМ) в трех повторах и культивировали еще в течение 4х дней. На последний день культивирования к клеткам добавлялся CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent в каждую лунку по 20 мкл и культивировали еще 1 час. Измерения проводились на планшетном спектрофотометре xMark (BioRad, США) измеряемая длина волны 490 нм. В качестве контроля использовались клетки без добавления веществ и их светимость была взята за 100% выживаемости. Было принято, что падение выживаемости до 80% от эффективности контроля является не токсичным. Результаты MTS теста для всех используемых в работе соединений (амброксол, N07 и его модификации N2 и N3) представлены на рисунке 13.

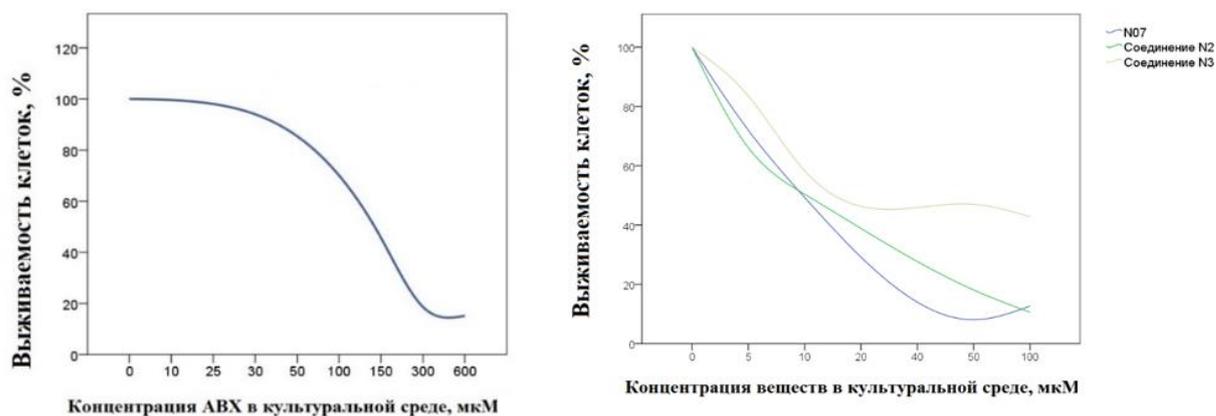


Рисунок 13 — Выживаемость клеток % в зависимости от концентрации добавленных к клеткам потенциальных ФШ GCase. (А) Выживаемость клеток первичной культуры макрофагов при добавлении ФШ амброксол (ABX) в различных концентрациях (от 0 до 600 мкМ). (Б) Выживаемость клеток первичной культуры макрофагов при добавлении ФШ GCase N07 и его модификаций (N2 и N3) в различных концентрациях (от 0 до 100 мкМ)

2.8 Культивирование клеток в присутствии фармакологических шаперонов GCase

ФШ GCase добавлялись в среду на 4й день культивирования макрофагов и затем культивировались еще в течение 4х дней без смены среды. ДА-нейроны культивировали в стандартных условиях в течение 40 дней, затем добавляли ФШ на 21 день. Выбор оптимальной концентрации ФШ проводился на основе MTS теста (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, США)), а также данных литературы. ФШ амброксол (Sigma-Aldrich, Германия) использовался в конечной концентрации 50 мкМ [10,22,23,27].

In silico было показано, что предложенные нами соединения N2 и N3 так же эффективно взаимодействуют с сайтом связывания вблизи аминокислотной замены N370S, как и исходное соединение N07. Исследования проведены в лаборатории молекулярной и клеточной биофизики, НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ, под руководством заведующего лабораторией к.физ.мат.н.

Рычкова Г.Н. Введенные химические модификации повышают растворимость соединений по сравнению с исходным N07. Структурные формулы соединений N2 ((2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)бензоил)-N-фенилгидразинкарбоксамид)) и N3 ((2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(2-оксо-2-(фениламино)этил)бензамид)) представлены на рисунке 14.

Соединение N07 и его модификации 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. Исходя из проведенного MTS теста и данных литературы для соединения N07 и его модификаций была выбрана конечная концентрация 4 мкМ [34]. Все полученные химические соединения были проанализированы с помощью ядерно-магнитного резонанса и масс-спектрометрии.

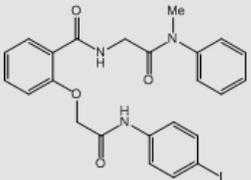
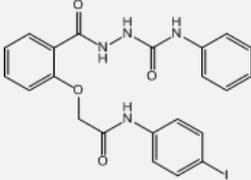
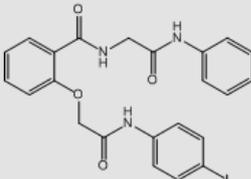
Нумерация соединения	Структура соединения	Химическое название соединения	Дополнение
N07		2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(метил(фенил)амино)-2-оксоэтил)бензамид	C ₂₄ H ₂₂ I ₂ N ₃ O ₄ Exact Mass: 543,0655
N2		2-(2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)бензоил)-N-фенилгидразинкарбоксамид	C ₂₂ H ₁₉ I ₂ N ₃ O ₄ Exact Mass: 530,0451
N3		2-(2-(4-иодофениламино)-2-оксоэтокси)-N-(2-оксо-2-(фениламино)этил)бензамид	C ₂₃ H ₂₀ I ₂ N ₃ O ₄ Exact Mass: 529,0498

Рисунок 14 — Химические формулы соединения N07 и предложенных модификаций в качестве потенциальных фармакологических шаперонов GCase

2.9 Получение лизатов макрофагов и дофаминергических 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 SmartSpec™Plus (BioRad, США). Полученные лизаты хранили при температуре -80 °С.

2.10 Определение относительного уровня GCase с помощью вестерн-блот анализа

Оценка содержания относительного уровня белка GCase в клетках первичной культуре макрофагов и ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, проводилась методом вестерн блоттинга. В качестве референсного белка использовали GAPDH. Лизаты (20 мкг белка для макрофагов и 30 мкг белка для ДА-нейронов) подвергали электрофоретическому разделению по методу Лэммли в полиакриламидном геле (7-10%) в 1X трисглициновом буфере (5X стоковый раствор содержит: 25 mM Tris-HCl pH 8,8, 250 mM глицина (pH 8,3), 0,1 % додецилсульфата) при напряжении 130 В, используя Mini-PROTEAN (Bio-Rad, США). После этого белки переносили на предварительно активированную 100% этанолом в течение 30 сек PVDF мембрану (размер пор 0,2 мкм, BioRad, США) в трансфер буфере, содержащем 1X трисглициновый буфер и 20% этанола, в течение 1 часа при силе тока 90 мА с использованием установки Mini-PROTEAN (BioRad, США). Полученные блоты инкубировали в растворе для блокировки неспецифических связываний (5% растворе обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащим 0,01% Tween-20), затем помещали на ночь при 4°C в раствор первичных антител. В данной работе использовались первичные антитела, разведенные в 5% растворе обезжиренного коровьего молока в PBS, содержащий

0,1% Tween-20: моноклональные антитела кролика против GBA (1:500, ab125065, Abcam, Великобритания), поликлональные антитела кролика против GAPDH (1:18000, SAB2108266, Sigma, Германия). После этого мембрану трижды промывали в холодном растворе PBS и инкубировали в течение 1 часа в растворе вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (1:5000, ab6721, Abcam, Великобритания). Иммунореактивность была визуализирована с помощью хемолюминесцентного субстрата SuperSignal West Pico (Thermo Scientific, США), Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) и системы гель-документации ChemiDoc™ Touch Gel Imaging System (Bio-Rad, США). Данные вестерн-блоттинга анализировали с помощью программы ImageJ (Версия 1,38a для Windows, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Содержание GCase нормировали к содержанию GAPDH.

2.11 Оценка колокализации GCase и маркера лизосом LAMP2 в клетках методом иммунофлуоресцентного окрашивания

Клетки культивировали согласно условиям, описанным выше. На 8 день культивирования макрофагов и 60 день культивирования ДА-нейронов клетки фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 15 минут при комнатной температуре. После фиксации клетки трижды промывали в PBS в течение 5 минут. Пермеабелизацию клеток проводили с помощью 0,1 % Тритон X-100, растворенном в PBS, затем клетки были трижды промыты в PBS в течение 5 минут. Для блокировки неспецифического связывания клетки инкубировали в 1 % БСА, растворенном в PBS, в течение 30 минут, затем клетки инкубировали с первичными мышиными антителами против-GBA (Sigma-Aldrich, Германия) и кроличьими против-LAMP2 (Sigma-Aldrich, Германия) в течение 60 минут при комнатной температуре, в конечной концентрации 7 мкг/мл и 1:500, соответственно. После промывки в PBS клетки инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluore 488 против-мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США) и Cy3 против-кролика (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), используемое разведение 1:400, в

течение 60 минут в темноте при комнатной температуре. После промывки в PBS клетки помещали в монтирующую среду с DAPI (Abcam, Великобритания). Изображения, были получены с помощью лазерного конфокального микроскопа Leica TCS-SP5 (объектив х63) (Leica, Германия). Использовались следующие линии лазеров: аргоновый - 488нм, HeNe – 543 нм и UV – 405 нм). Толщина оптического среза 500 нм. Для определения уровня относительной флуоресценции изображений, полученных при помощи конфокального микроскопа, использовали программу LAS AF Lite. Оценка колокализации проводилась с помощью расчета коэффициента Пирсона в программе Image J с использованием плагина, опубликованного ранее EzColocalization [199]. Коэффициент Пирсона позволяет произвести количественную оценку совместной локализации достигнутой путем объединения распознавания цифровых объектов, вычисления перекрытия областей и комбинации со значением корреляции интенсивности пикселей. Коэффициент Пирсона отражает корреляцию интенсивности флуоресценции между двумя каналами и может варьировать от -1 (отрицательная корреляция) до 1 (положительная корреляция). Расчёт коэффициента Пирсона производился для каждого образца в отдельности (не менее 3х полей зрения, не менее 10 клеток в одном поле зрения).

2.12 Оценка степени аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов

Определение аутофагии проведено с использованием набора Autophagy Detection kit (ab139484, Abcam, Великобритания) по протоколу производителя. С помощью данного набора можно обнаружить аутофагические вакуоли в живых клетках с использованием специфического красителя к аутофагическим вакуолям. Макрофаги культивировали в течение 8 дней с добавлением на 4ые сутки ФШ N07 и соединений N2 и N3 в конечной концентрации 4 мкМ. На 8 день культивирования клетки были дважды промыты в PBS в течение 5 минут при 300 g. Затем к клеткам добавляли green detection reagent, растворенном в DMEM F12 (без фенолового

красного) и инкубировали в течение 30 минут в темноте при 37 °С. После инкубации клетки дважды промыли в PBS в течение 5 минут при 300 g. После центрифугирования забирали супернатант полностью, затем клетки были ресуспендированы в 500 мкл running buffer. Анализ образцов проводился на проточном цитометре FC500 BeckmanCoulter (BeckmanCoulter, США) с использованием лазерного источника длиной волны 488 нм (в зеленом канале FL1).

2.13 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 зависимости от размера выборки.

В случае несоответствия данных нормальному распределению сравнение полученных значений между отдельными группами предполагало использование непараметрического критерия Манна-Уитни. Для сравнения двух переменных, относящихся к одной выборке, в случае несоответствия данных нормальному распределению, использовался критерий Вилкоксона. Для анализа корреляции между количественными характеристиками в случае несоответствия данных нормальному распределению пользовались методом Спирмана. 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 $p < 0,05$. Для представления полученных данных использовали такие показатели описательной статистики, как среднеарифметическое значение, ошибка среднего, медиана с расчётом минимального и максимального значений.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Активность GCase и концентрация HexSph в крови пациентов исследуемых групп

При измерении ферментативной активности GCase и концентрации субстрата HexSph методом ВЭЖХ-МС/МС в крови пациентов исследуемых групп были использованы и дополнены результаты, полученные ранее в лаборатории молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» - ПИЯФ. Для оценки данных параметров были включены пациенты с БГ (N=19), ГВА-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).

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). В крови пациентов с ГВА-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 15Б). С помощью корреляционного анализа было показано, что в крови исследуемых групп пациентов наблюдается отрицательная корреляция активности GCase и концентрации HexSph ($r = -0,500$; $p < 0,0001$). Отрицательная корреляция между исследуемыми параметрами также наблюдается в крови пациентов с БГ и ГВА-БП ($r = -0,661$; $p < 0,0001$).

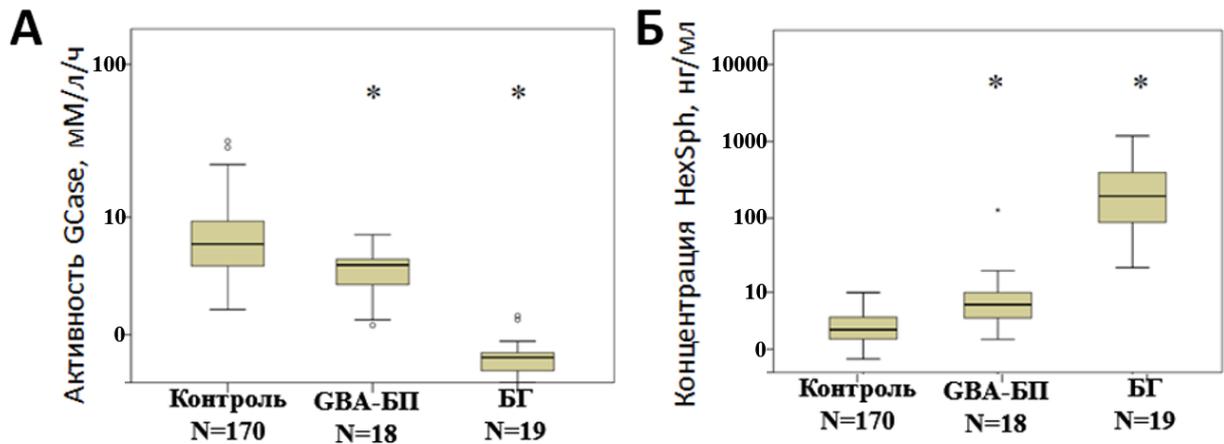


Рисунок 15 — Ферментативная активность GCCase (А) и концентрация HexSph (Б) в периферической крови пациентов. * p-value <0,05 по сравнению с контролем

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

В данном исследовании показано, что в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ наблюдается сниженная активность GCCase 0,52 (0,01-2,58) mM/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) mM/л/ч и 5,27 (0,16-86,6) нг/мл по сравнению с лицами контрольной группы 13,0 (5,17-82,00) mM/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 16), что согласуется с результатами измерений в периферической крови. Кроме того, с помощью корреляционного анализа в культивируемых макрофагах пациентов исследуемых групп показано, что активность GCCase отрицательно коррелирует с концентрацией HexSph ($r = -0,474$; $p < 0,0001$), аналогичная корреляция выявлена в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП ($r = -0,507$; $p = 0,004$).

Полученные результаты показывают, что клетки первичной культуры макрофагов могут отражать изменения ферментативной активности GCCase и концентрации HexSph, наблюдаемые в крови пациентов и могут быть

использованы для скрининга соединений, повышающих активность GCase, в том числе ФШ данного фермента.

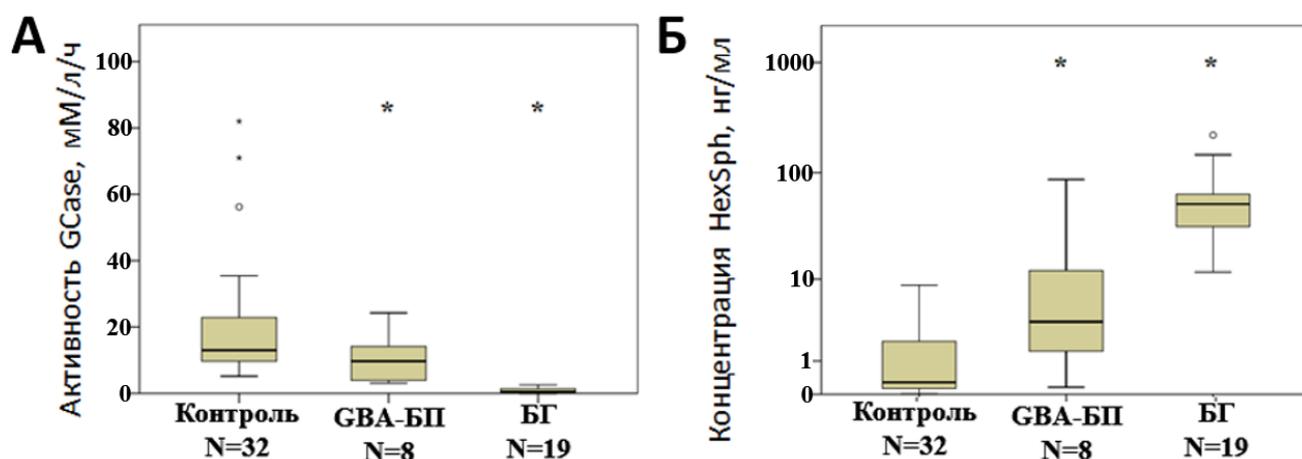


Рисунок 16 — Ферментативная активность GCase (А) и концентрация HexSph (Б) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов исследуемых групп.

* p-value < 0,05 по сравнению с контролем

В настоящей работе проведена оценка эффективности ФШ GCase амброксол, аллостерического ФШ N07 и его модификаций в культивируемых макрофагах пациентов с БГ (N=19), GVA-БП (N=7) и лиц контрольной группы. Проведена оценка влияния ФШ на восстановление активности, количества и транслокации GCase в лизосому, степень аутофагии, а также влияние на снижение концентрации лизосфинголипидов в культивируемых макрофагах.

3.2.1 Оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ

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

Воздействие ФШ амброксол в культивируемых макрофагах пациентов с БГ приводило к повышению ферментативной активности GCase в 3,3-раза по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,0001$) (Рисунок 17А).

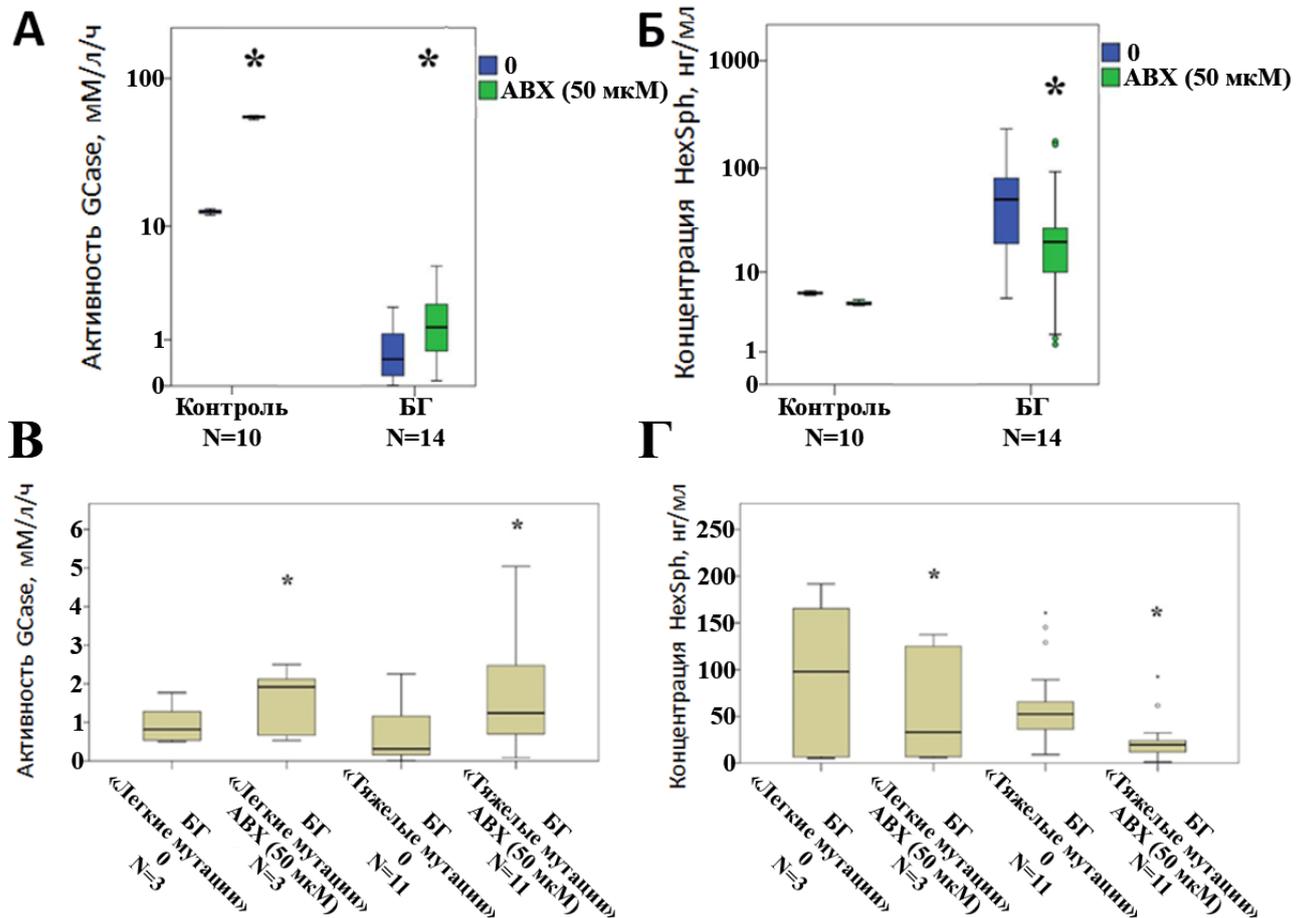


Рисунок 17 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на ферментативную активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. (А) Ферментативная активность GCase и концентрация HexSph (В) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). (Б) Оценка влияния ФШ ABX (50 мкМ) на ферментативную активность GCase и концентрацию HexSph (Г) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ в зависимости от тяжести мутаций в гене *GBA1*. * p -value $< 0,05$ по сравнению с необработанными клетками

При более детальном рассмотрении, при воздействии амброксолом на культивируемые макрофаги пациентов с БГ 1 типа с генотипами L444P/другие активность GCase повысилась в 4,3 раза ($p < 0,0001$), в 2,4-раза ($p < 0,0001$) для пациента с генотипом N370S/c.84dupG и в 2,0 раз ($p < 0,0001$) для пациентов с другими генотипами (Рисунок 18А). Кроме того, мы наблюдали повышение активности GCase в 2,8 раза после воздействия амброксолом в клетках первичной культуры макрофагов пациента с БГ 3 типа (генотип L444P/L444P) (Рисунок 18А). Однако, воздействие амброксола не оказало эффекта на активность GCase в клетках первичной культуры макрофагов пациента БГ11 с генотипом L444P/M124T (Рисунок 18А).

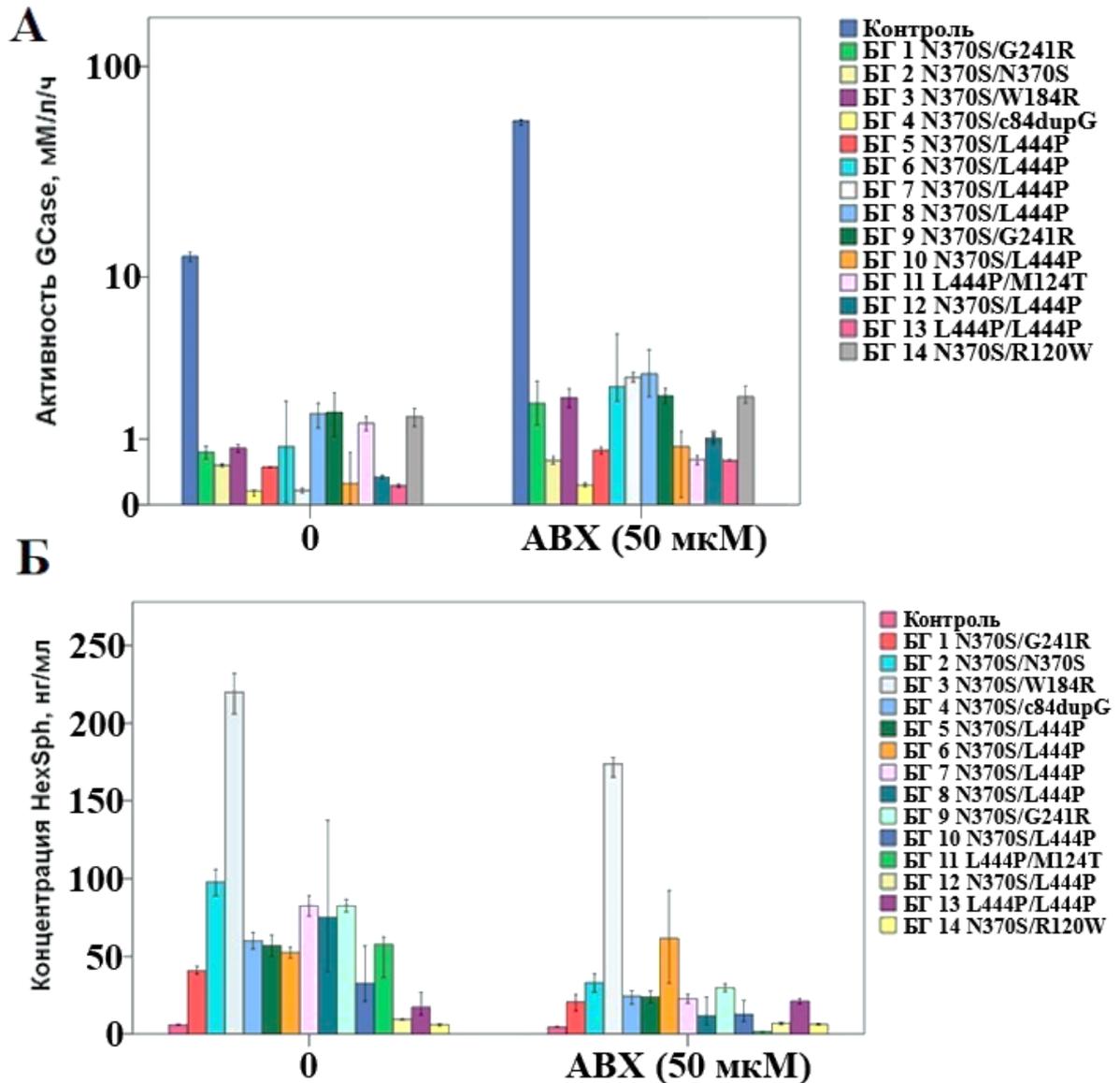


Рисунок 18 — Ферментативная активность GCase (А) и концентрация HexSph (Б) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ в присутствии и без амброксола (ABX) (50 мкМ) для каждого пациента в отдельности. Активность GCase и концентрация HexSph представлена в виде среднего значения \pm SEM

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 2,4-раза, в тоже 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) (Рисунок 17Б).

При оценке эффективности ФШ амброксол в 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 17В).

В клетках первичной культуры макрофагов, полученных от пациентов с БГ 1 типа с генотипами L444P/другие было показано снижение концентрации HexSph при воздействии амброксолом в 2,7 раза ($p<0,0001$), для пациента с генотипом N370S/c.84dupG в 2,5-раза ($p < 0,0001$), и для пациентов с другими генотипами в 1,8-раза ($p<0,0001$) (Рисунок 18Б). Стоит отметить, что в культивируемых макрофагах пациентов БГ8 и БГ11 применение амброксола привело к снижению концентрации HexSph более чем на 80% (Рисунок 18Б). Однако в культивируемых макрофагах пациента БГ3 с генотипом L444P/L444P применение амброксола не оказывало эффекта на концентрацию HexSph. Снижение концентрации HexSph при воздействии амброксола было также выявлено в в культивируемых макрофагах лиц контрольной группы (Рисунок 18Б).

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) (Рисунок 17Г).

В данном исследовании 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.

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 19А). 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 19А).

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 19Б). При этом соединение N2 более эффективно в снижении концентрации HexSph по сравнению с исходным соединением N07 ($p = 0,016$).

Стоит отметить, что эффективность ФШ GCase значительно отличается в зависимости от типа мутаций в гене *GBA1*. 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 ($p = 0,004$) (Рисунок 19В). 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.

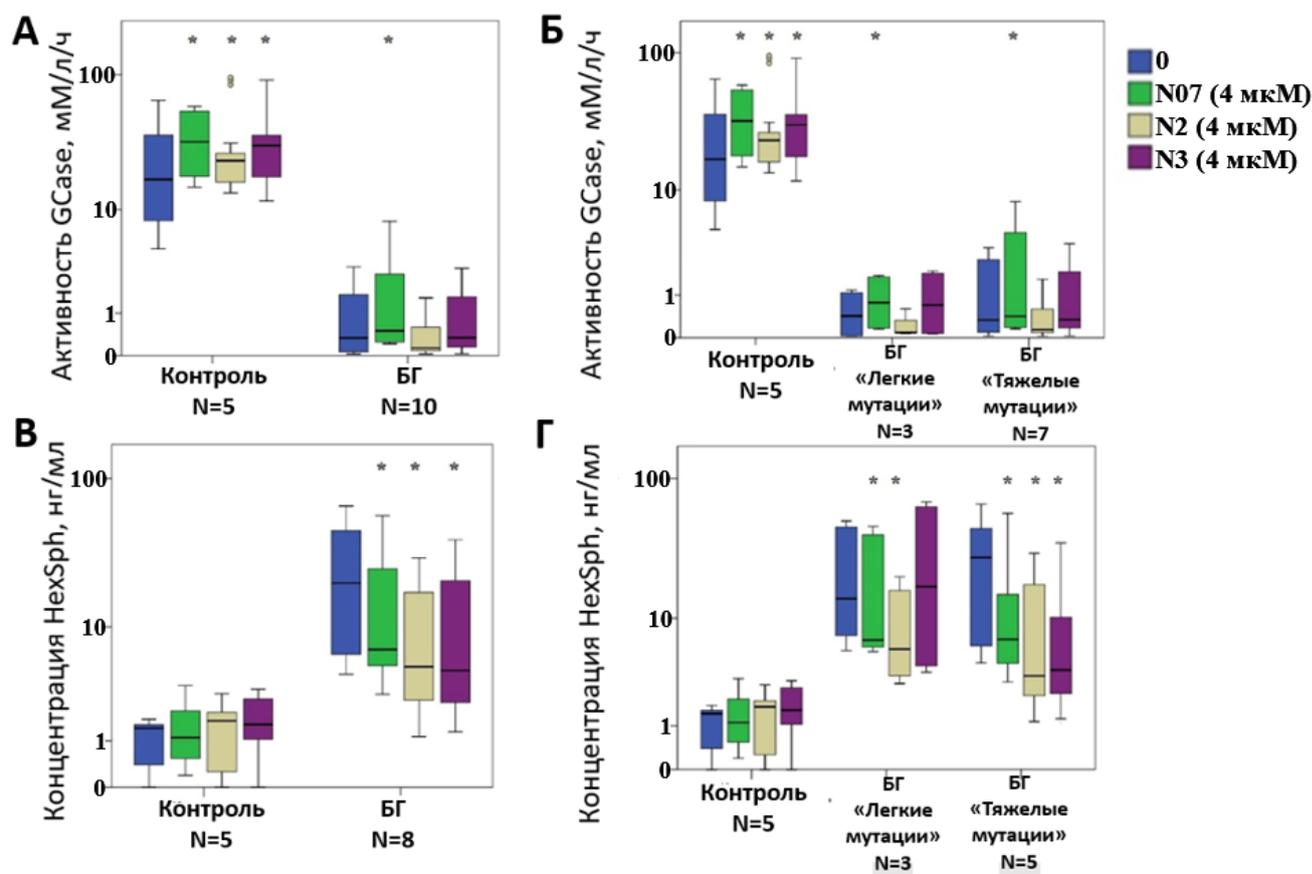


Рисунок 19 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase и уровень лизосфинголипидов в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. Активность GCase (А) и концентрация HexSph (Б). Активность GCase (В) и концентрация HexSph (Г) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ в зависимости от типа мутаций в гене *GBA1*. Для построения графиков использована логарифмическая шкала. * p-value < 0,05 по сравнению с необработанными клетками

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) (Рисунок 19Г).

3.2.1.2 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 культивируемых макрофагах пациентов с БГ использовался метод иммунофлуоресцентного окрашивания и последующей детекции с помощью конфокальной микроскопии. Степень колокализации белков определялась с помощью расчета коэффициента Пирсона (рассчитанного в программе ImageJ) для каждой клетки в отдельности в одном поле зрения (не менее 10 клеток в одном поле зрения, не менее трех полей зрения для каждого образца). Использование ФШ амброксол в культивируемых макрофагах пациентов с БГ привело к повышению колокализации белка GCase (красный сигнал) и лизосомного маркера LAMP2 (зеленый сигнал) (Рисунок 1 Приложения А). Показано статистически значимое повышение коэффициента Пирсона в 1,25-раз при воздействии ФШ амброксол в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ по сравнению с необработанными клетками ($p<0,0001$) (Рисунок 20).

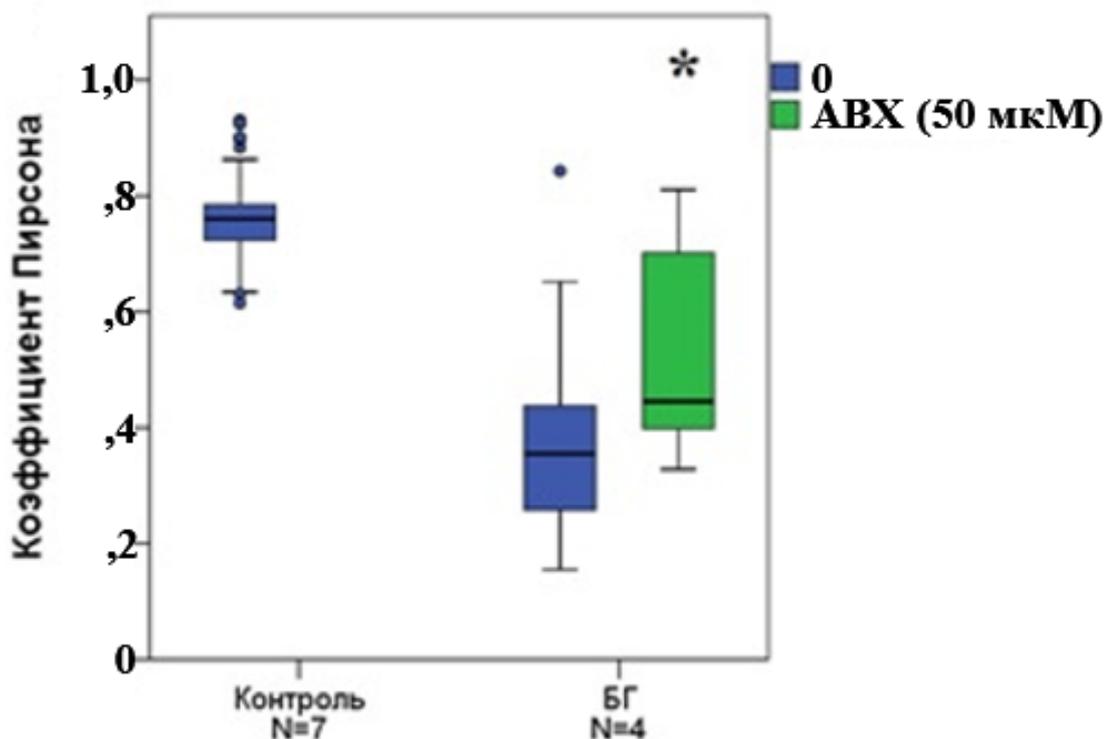


Рисунок 20 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на колокализацию GCase и маркера лизосом LAMP2 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Коэффициент Пирсона, рассчитанный для культивируемых макрофагов пациентов с БГ в присутствии ФШ ABX. * p-value <0,05 по сравнению с необработанными клетками

На рисунке 2 Приложения А показаны полученные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ в присутствии ФШ N07 и его модификаций N2 и N3. 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 ($p < 0,0001$)) (Рисунок 21А-Б). При этом наиболее эффективным было соединение N2, как по сравнению с исходным соединением, так и с N3 ($p = 0,0003$ и $p = 0,033$) (Рисунок 21Б). Повышение степени транслокации GCase при воздействии ФШ N07 и его модификациями в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ наблюдалось у всех пациентов, кроме БГ16 с генотипом N370S/- .

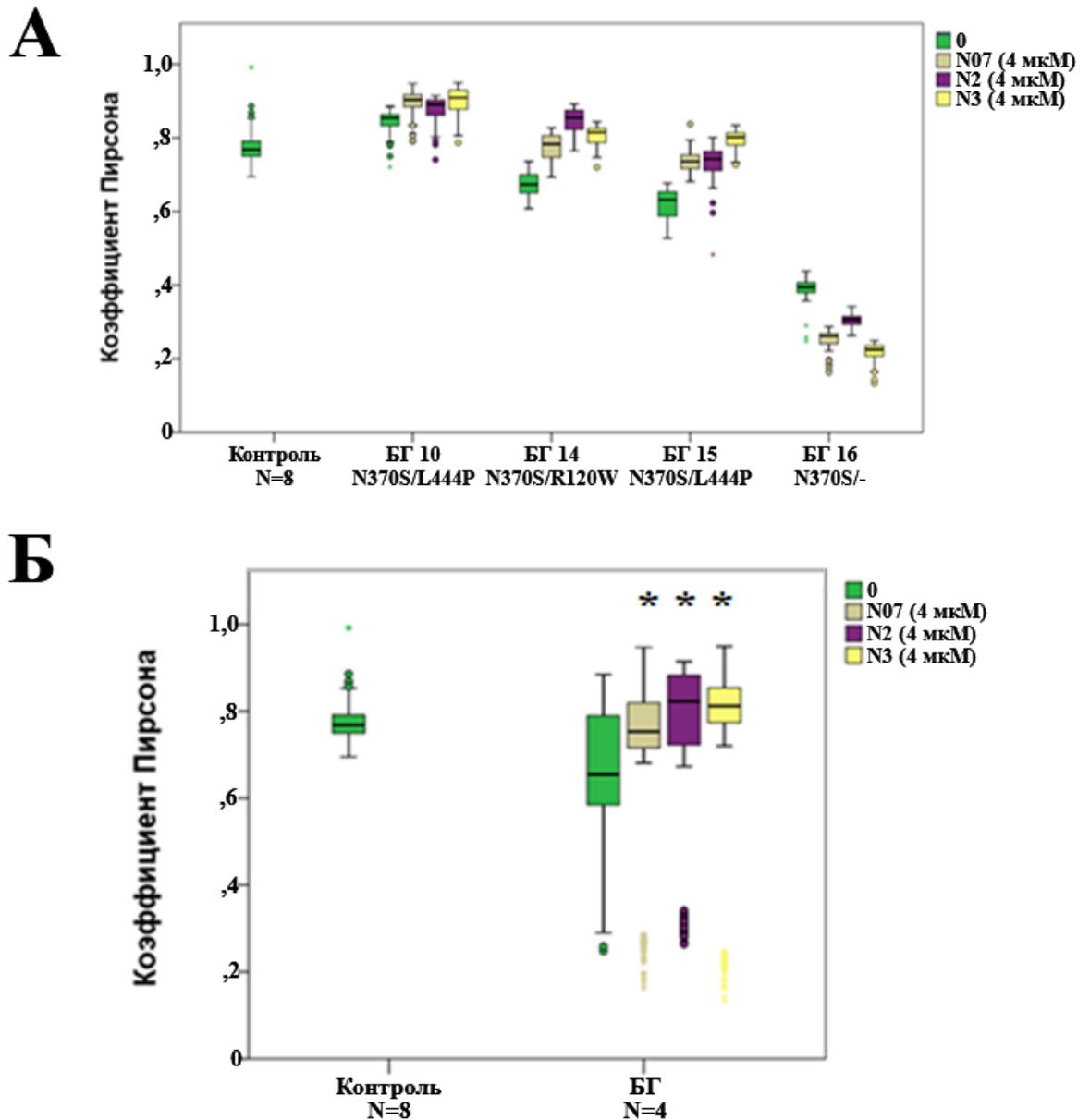


Рисунок 21 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций – N2 и N3 на колокализацию GCaSe и маркера лизосом LAMP2 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ методом иммунофлуоресцентного окрашивания. (А) Для оценки степени колокализации белков GCaSe и маркера лизосом LAMP2 был рассчитан коэффициент Пирсона для каждого пациента с БГ в присутствии ФШ N07 и его модификаций – N2 и N3 (более 10 клеток в одном поле зрения). (Б) Коэффициент Пирсона, рассчитанный для макрофагов пациентов с БГ в присутствии ФШ N07 и его модификаций – N2 и N3. * p-value <0,05 по сравнению с необработанными клетками

3.2.1.3 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 22).

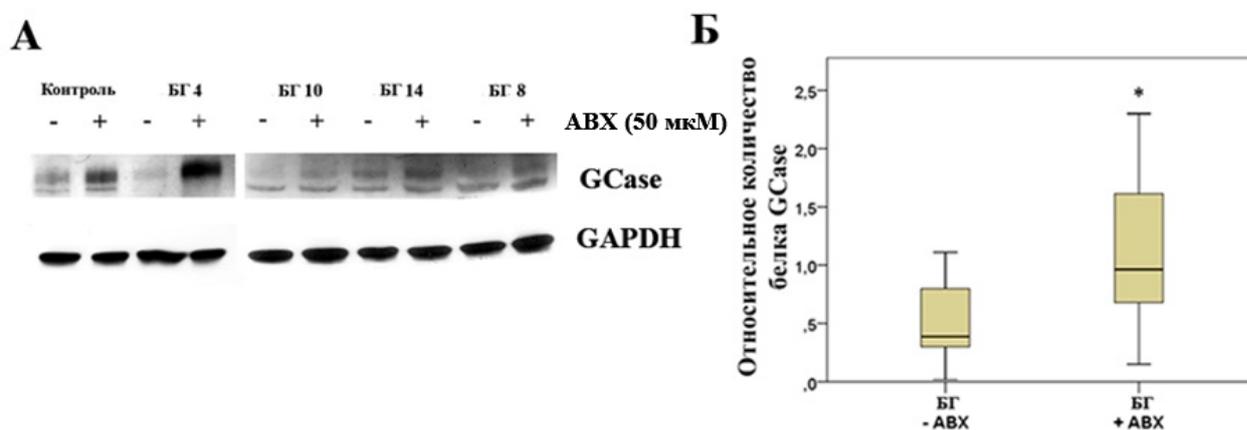


Рисунок 22 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на количество белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. (А) Вестерн-блот анализ относительного уровня белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). В качестве референсного белка использован белок GAPDH. (Б) Относительный уровень белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). * p -value $< 0,05$ по сравнению с необработанными клетками

При воздействии ФШ N07 и N2 было выявлено повышение относительного уровня GCCase 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) (Рисунок 23). В данной работе не было выявлено статистически

значимых различий в относительном уровне GCCase при воздействии ФШ N3 в культивируемых макрофагах пациентов с БГ (Рисунок 23).

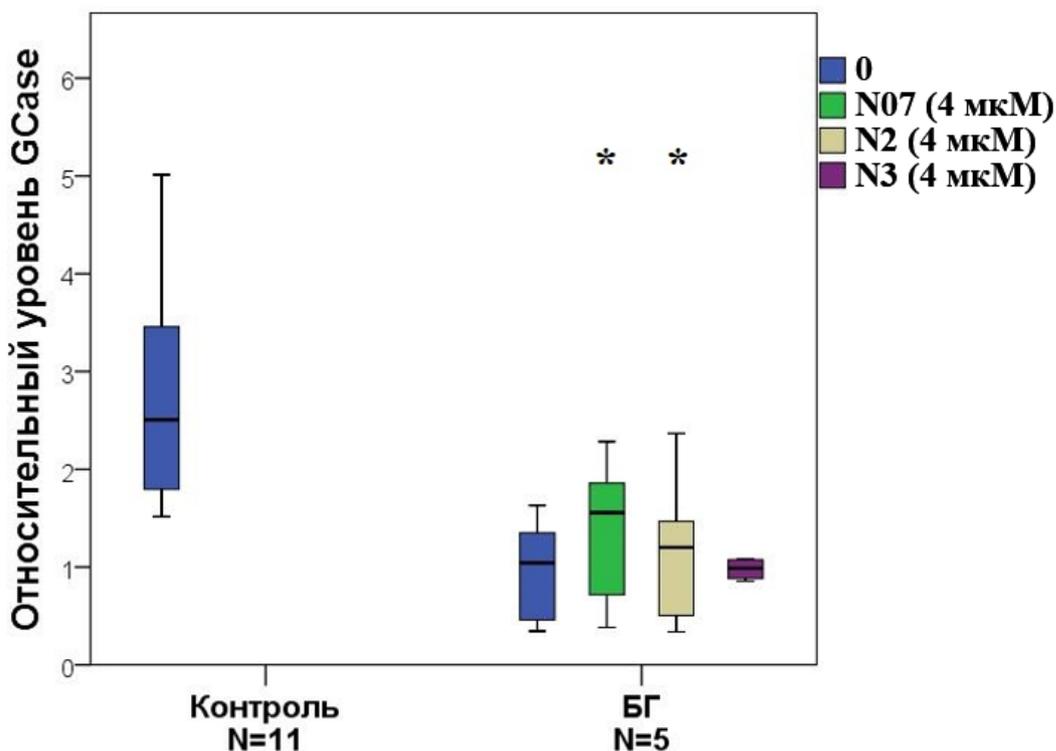


Рисунок 23 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 на количество белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ. (А) Вестерн-блот анализ относительного уровня белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ N07 и его модификаций N2 и N3. В качестве референсного белка использован белок GAPDH. (Б) Относительный уровень белка GCCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ.

* p-value <0,05 по сравнению с необработанными клетками

3.2.1.4 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 (Рисунок 24). 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 7,8 (4,7-12,7) у.е. в клетках без добавления ФШ. При этом средняя интенсивность флуоресценции маркера аутофагосом в культивируемых макрофагах пациентов с БГ была снижена в 1,4-раза по сравнению с контролем ($p=0,024$).

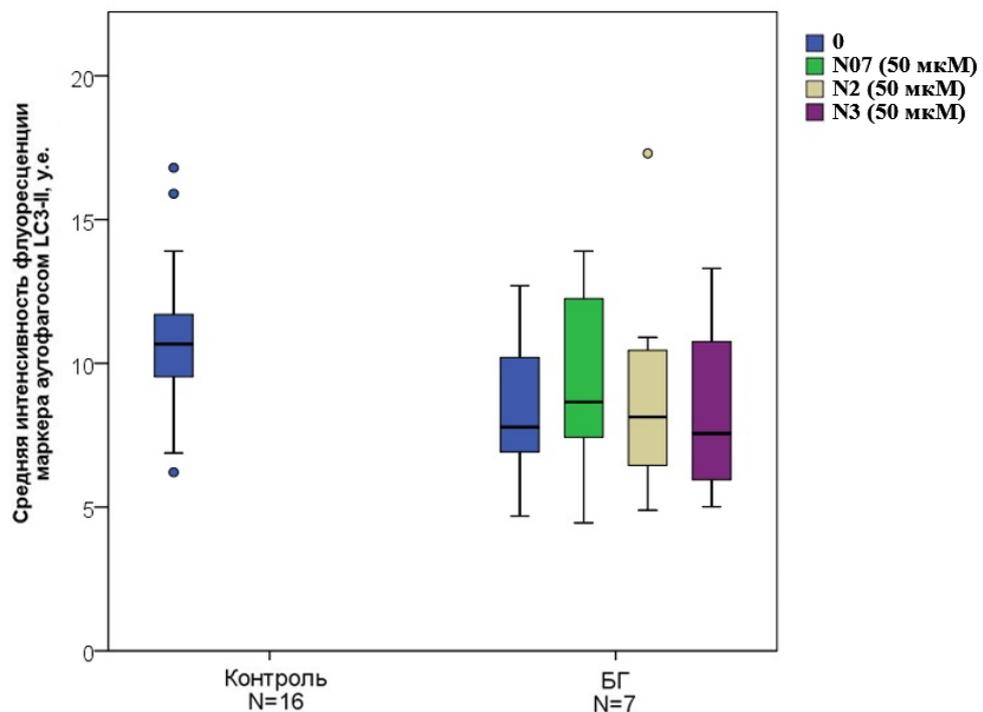


Рисунок 24 — Оценка степени аутофагии в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы при воздействии ФШ N07 и его модификациями N2 и N3. Количество аутофагосом определяли при помощи измерения средней интенсивности флуоресценции специфического красителя маркера аутофагических вакуолей на проточном цитометре

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

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

В клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП нами показано увеличение активности GCase в 3,5-раза после воздействия ФШ амброксол по сравнению с необработанными клетками ($p < 0,0001$) (Рисунок 25А).

У пациентов с GBA-БП в культивируемых макрофагах наблюдалось снижение концентрации HexSph в 1,6-раза при добавлении амброксола по сравнению с необработанными клетками ($p = 0,001$) (Рисунок 25В).

Важно отметить, что эффективность амброксола в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП варьируется в зависимости от типа мутаций гена *GBA1* (Рисунок 25Б,Г). 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 $p = 0,009$) (Рисунок 25Б). 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 $p = 0,028$) (Рисунок 25Г).

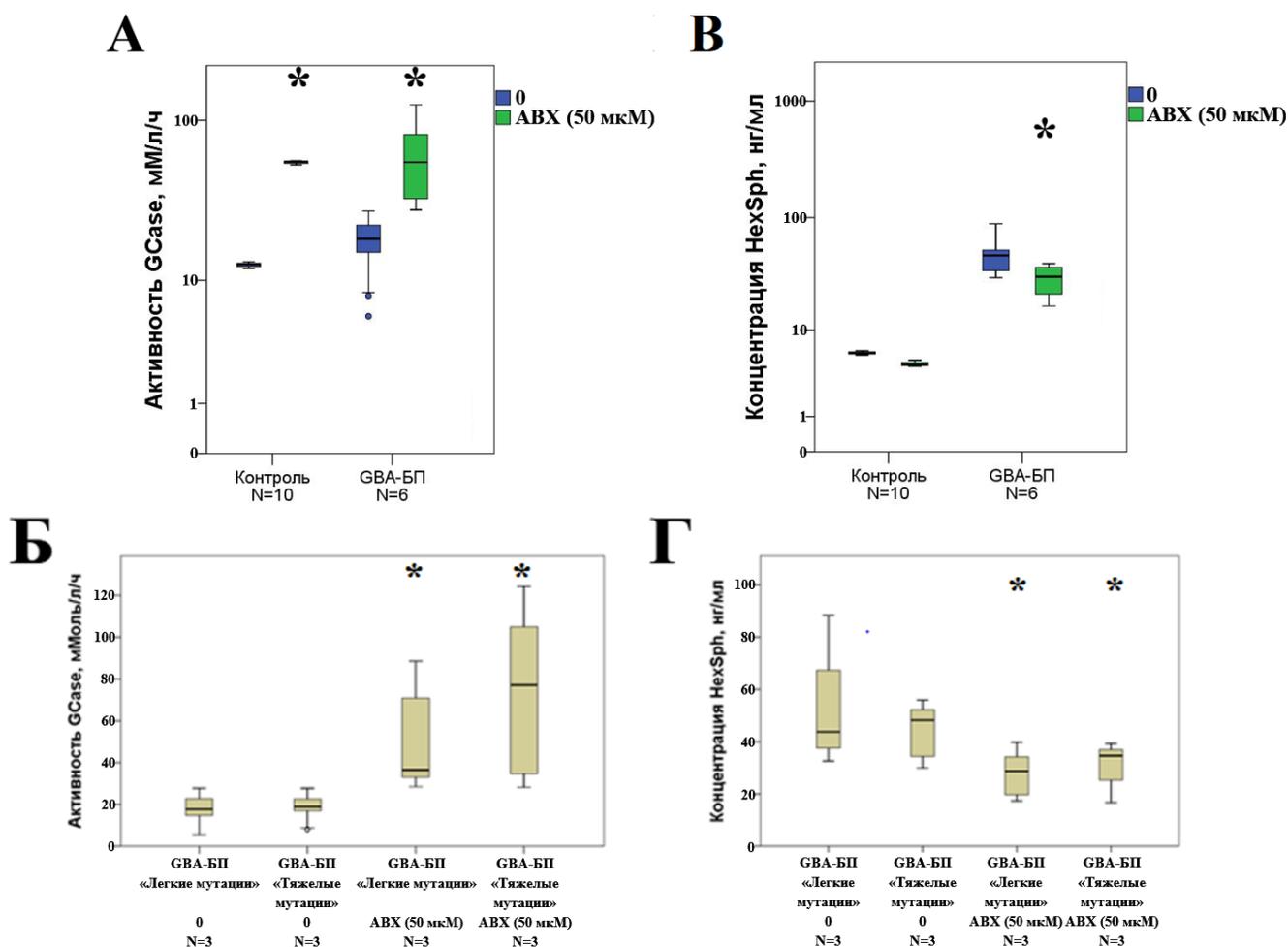


Рисунок 25 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на ферментативную активность GCase и концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП. (А) Активность GCase и концентрация HexSph (В) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). (Б) Оценка влияния ФШ ABX (50 мкМ) на ферментативную активность GCase и концентрацию HexSph (Г) в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП в зависимости от тяжести мутаций в гене *GBA1*. * p-value <0,05 по сравнению с необработанными клетками

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 26А), в то время как соединение N2 приводило к повышению активности GCase в 1,5-раза по сравнению с необработанными клетками ($p=0,012$) (Рисунок 26А).

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 26Б). 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 $p=0,008$) (Рисунок 26В). 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) ($p=0,008$) (Рисунок 26В). Соединение N3 снижало концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП, носителей «тяжелой» мутации *GBA1* (L444P), в 4,1-раза ($p=0,011$) (Рисунок 26В).

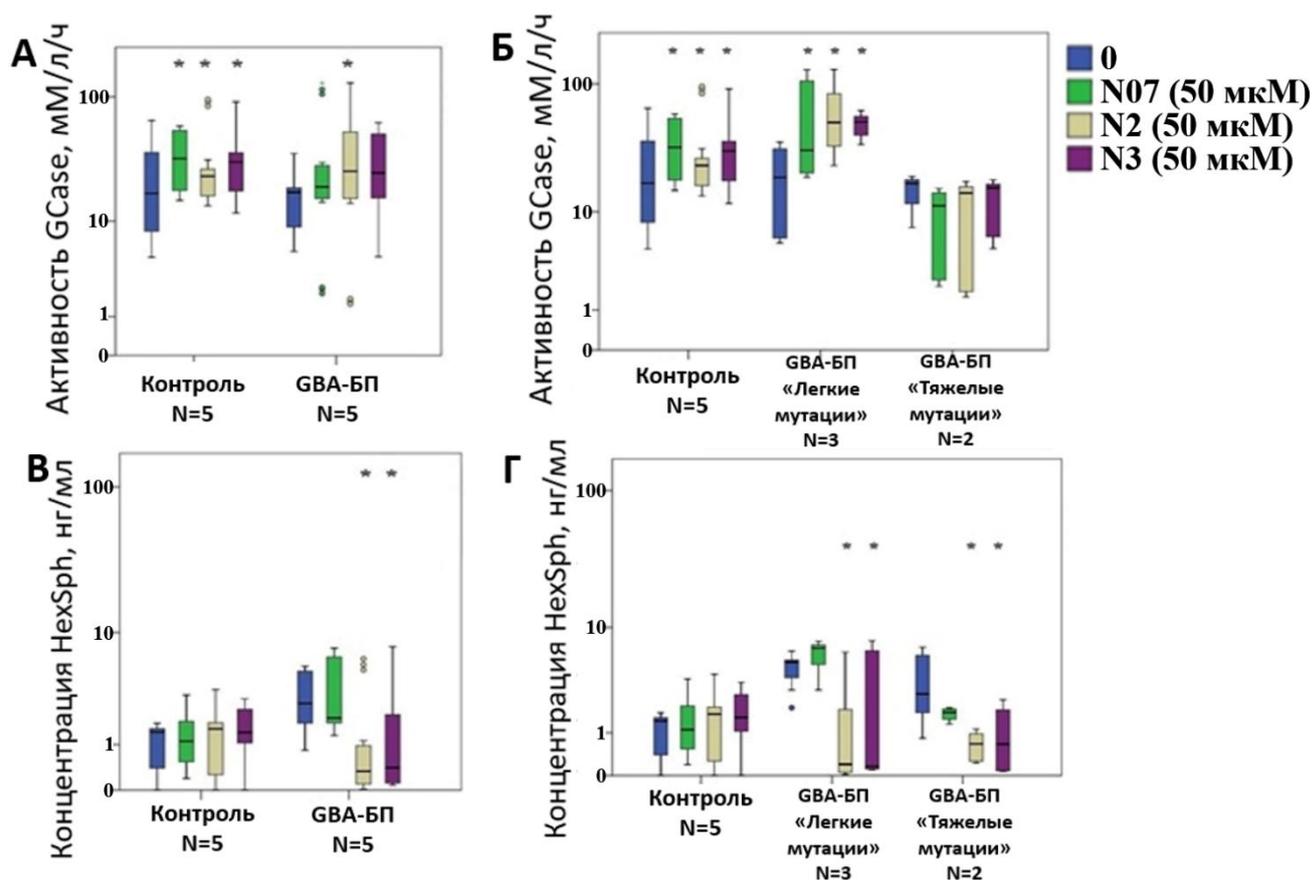


Рисунок 26 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase и уровень лизосфинголипидов в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП. Активность GCase (А) и концентрация HexSph (Б). Активность GCase (В) и концентрация HexSph (Г) в клетках первичной культуры макрофагов в зависимости от типа мутаций в гене *GBA1*. Для построения графиков использована логарифмическая шкала. * p-value <0,05 по сравнению с необработанными клетками

3.3 Скрининг ФШ GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК

С использованием ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП (N370S/WT, 56 лет, женский) и индивидуумов контрольной группы (N=2, средний возраст лет $36,0 \pm 6,0$ лет, 100% женщин) была проведена оценка влияния ФШ GCase амброксол, N07 и его модификаций на активность и количество GCase

в клетках, концентрацию лизосфинголипидов и степень транслокации GCase в лизосомы.

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 ($p < 0,0001$) (Рисунок 27А). Однако при оценке концентрации HexSprh 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 ($p > 0,05$) (Рисунок 27Б).

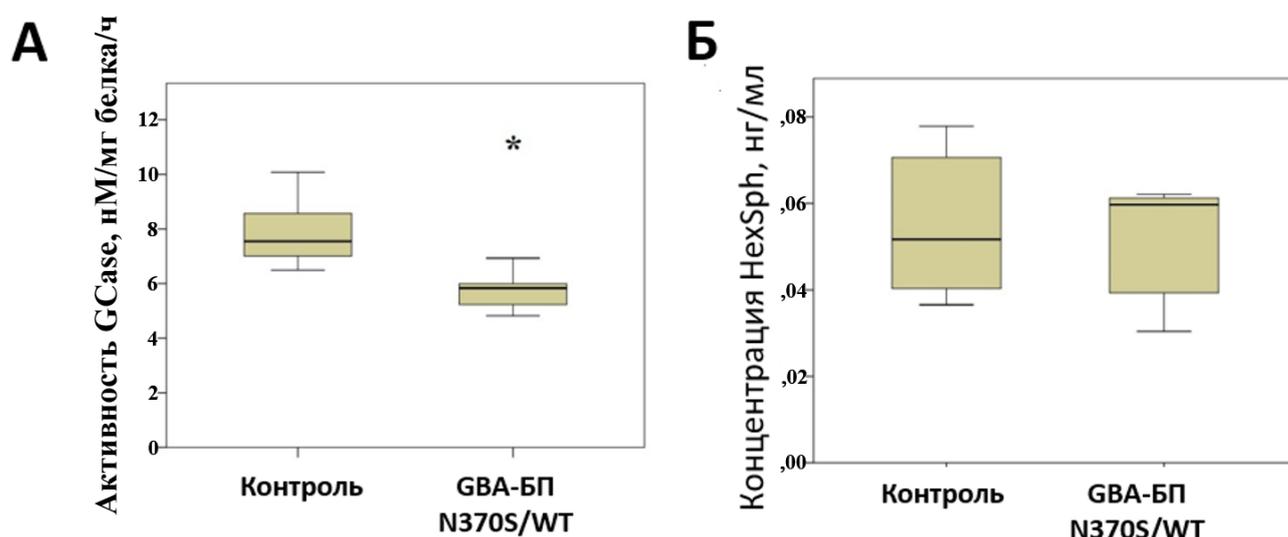


Рисунок 27 — Ферментативная активность GCase (А) и концентрация HexSprh (Б) в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП (N370S/WT) и лиц контрольной группы. * p -value $< 0,05$ по сравнению с контролем

3.3.1 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на активность GCase и концентрацию HexSprh 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 показано увеличение активности GCase при воздействии амброксолом (50 мкМ) в течение 21 дня.

Амброксол повышает активность GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с ГВА-БП (N370S/WT) в 1,7 - раза по сравнению с клетками без добавления амброксола ($p=0,002$) (Рисунок 28А). Кроме того, амброксол повышает активность GCase и в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, лиц контрольной группы в 1,4 – раза ($p=0,002$) (Рисунок 28А).

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

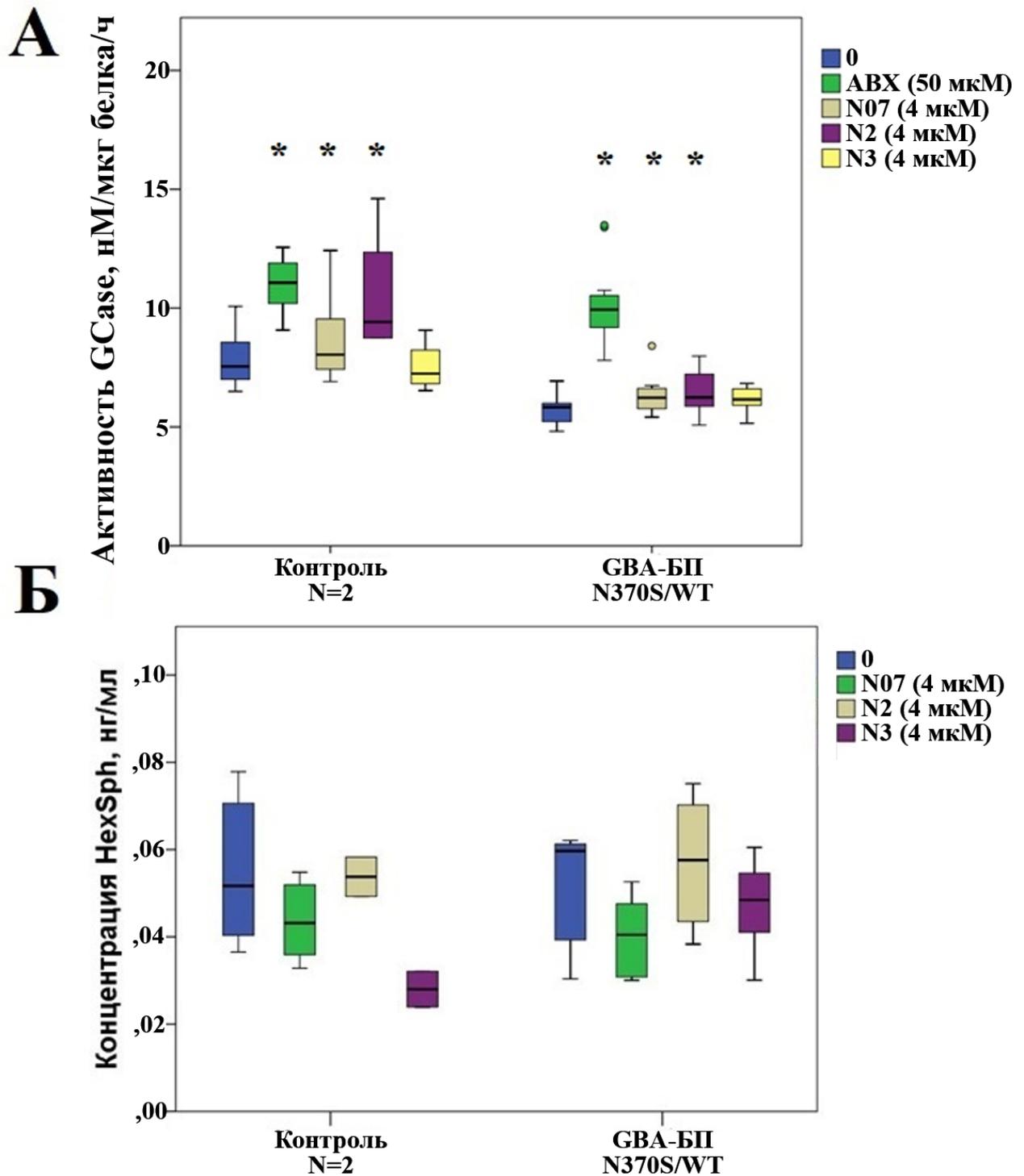


Рисунок 28 — Оценка влияния ФШ амброксол, N07 и его модификаций - N2 и N3 на активность GCase и уровень лизосфинголипидов в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП и лиц контрольной группы. Активность GCase (А) и концентрация HexSph (Б) в ДА-нейронах. * p-value <0,05 по сравнению с 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 28А). Кроме того, ФШ N07 и соединение 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 28А).

Исследуемые соединения не оказывали влияния на концентрацию HexSph в ДА-нейронах как пациента с GBA-БП (N370S/WT), так и лиц контрольной группы (Рисунок 28Б).

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

При оценке влияния ФШ амброксол на количество GCase в 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 29).

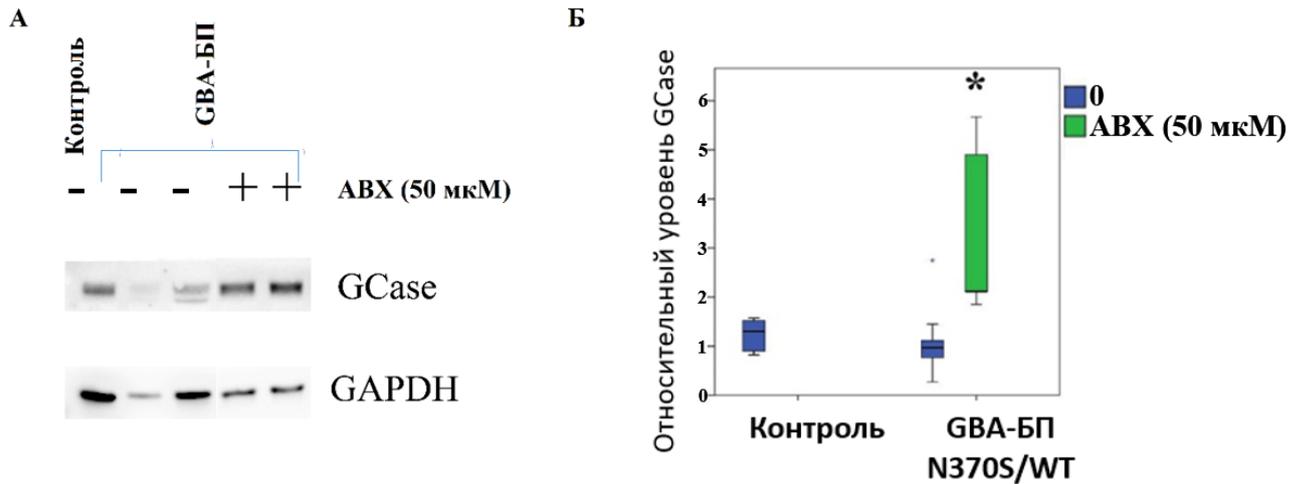


Рисунок 29 — Оценка влияния ФШ амброксол (ABX) на количество белка GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП. (А) Вестерн-блот анализ белка GCase в ДА-нейронах при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). В качестве референсного белка использован белок GAPDH. (Б) Относительный уровень белка GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП при воздействии ФШ ABX (50 мкМ). * p -value $< 0,05$ по сравнению с необработанными клетками

С помощью вестерн блот анализа показано, что ФШ N07 и соединение 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 30).

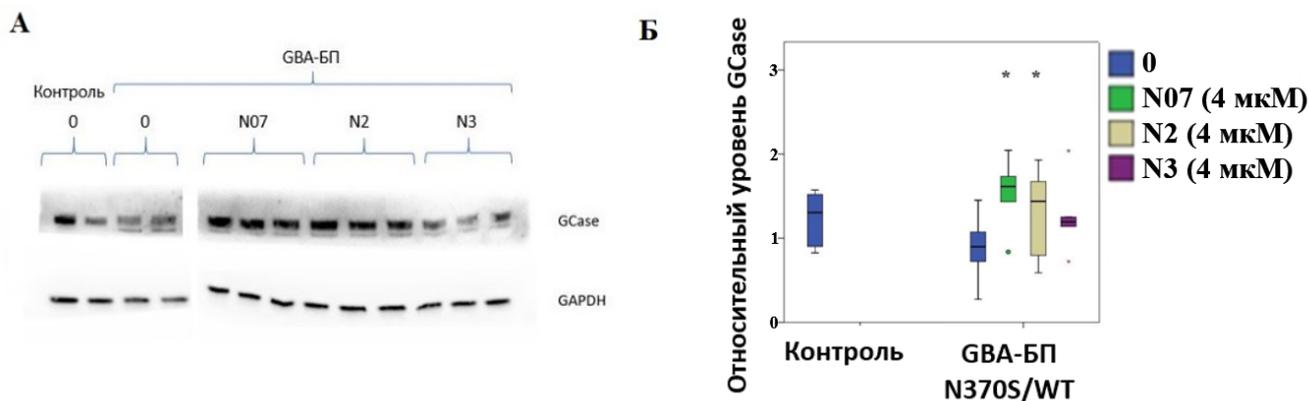


Рисунок 30 — Оценка влияния ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 на количество белка GCase в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП. (А) Вестерн-блот анализ белка GCase в ДА-нейронах при воздействии ФШ N07 и его модификаций N2 и N3. В качестве референсного белка использован белок GAPDH. (Б) Относительный уровень белка GCase в ДА-нейронах пациента с GBA-БП и лиц контрольной группы при воздействии ФШ. * p-value < 0,05 по сравнению с необработанными клетками

3.3.3 Влияние ФШ амброксол, N07 и его модификаций на транслокацию GCase в лизосомы в 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 GBA-БП нами не было выявлено статистически значимых различий (Рисунок 31).

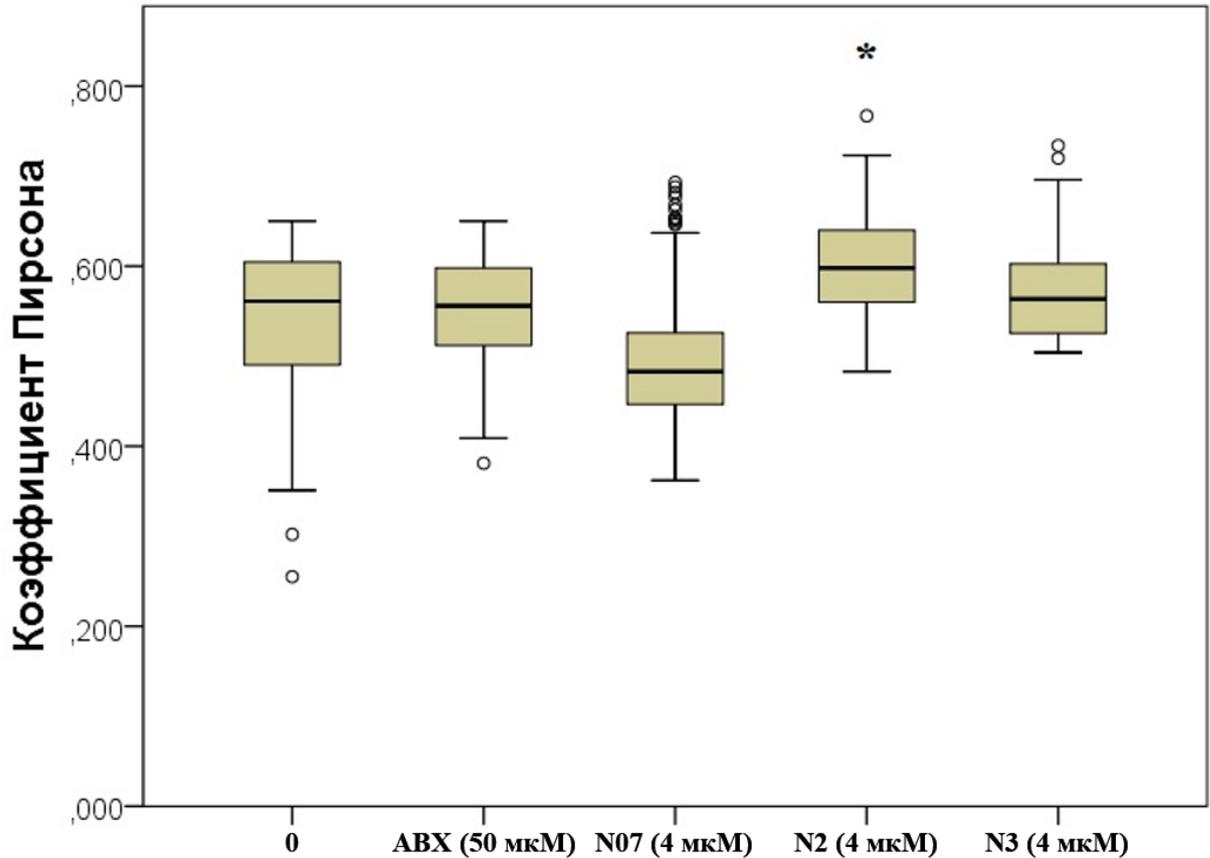


Рисунок 31 — Оценка колокализации GCase и маркера лизосом LAMP2 в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП при воздействии ФШ амброксол, N07 и его модификациями методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Коэффициент Пирсона, рассчитанный для оценки степени колокализации между белками GCase (красный) и LAMP2 (зеленый) в ДА-нейронах пациента с GBA-БП

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 ($p < 0,0001$) (Рисунок 31). В то время как ФШ N07 и его модификация N3 не оказывали положительного влияния на степень транслокации GCase.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Для скрининга соединений, направленных на повышение активности GCase были использованы клетки первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП, а также ДА-нейроны, дифференцированные из ИПСК, пациента с GBA-БП. Выбор *in vitro* модели, а также разработка алгоритма скрининга, является одним из наиболее важных и критичных параметров, от которого зависят полученные результаты при изучении дисфункции GCase и поиска таргетных препаратов, направленных на восстановление работы.

Показано, что у пациентов с БГ и GBA-БП наблюдается снижение активности GCase и накопление лизосфинголипидов HexSph в периферической крови [200]. Большинство исследовательских групп для измерения активности GCase используют метод с использованием флуоресцентномеченного субстрата. Ранее было показано, что использование флуоресцентного метода анализа активности GCase не позволяет четко разделить по исследуемому параметру пациентов с БГ и лиц контрольной группы, а также гетерозиготных носителей мутаций гена *GBA1* [201–203]. Для решения проблемы низкой специфичности нами был использован метод ВЭЖХ-МС/МС с модификациями [7,8,189], обладающий высокой специфичностью и точностью по сравнению с флуоресцентными методами анализа. Метод ВЭЖХ-МС/МС позволяет не только четко разделить гомозиготных носителей мутаций гена *GBA1* от лиц контрольной группы, но также способен детектировать незначительные изменения ферментативной активности GCase у носителей гетерозиготных мутаций гена *GBA1* [201–204]. Еще одним преимуществом метода ВЭЖХ-МС/МС является то, что для исследования необходимо незначительное количество исследуемого образца. Снижение активности GCase ранее были показаны и другими авторами в крови у пациентов с БП с мутациями в гене *GBA1* [205–208], так и у носителей полиморфных вариантов *GBA1*, у которых данное снижение было менее выражено [204,207]. В данной

работе мы провели исследование на расширенной выборке пациентов с GBA-БП и лиц контрольной группы. 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 [209]. Аналогично полученным нами результатам ранее снижение активности GCase в периферической крови у пациентов с GBA-БП были показаны и изучены зарубежными авторами [204–206]. Omer N. и соавторы в 2022 году показали, что у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA1* не зависимо от статуса БП наблюдается снижение активности GCase, измеренной в крови и моноцитах периферической крови [205]. В последние годы несколько исследований указывают на то, что накапливающиеся при дисфункции GCase лизосфинголипиды могут влиять на агрегацию альфа-синуклеина в клетке. В частности, на агрегацию альфа-синуклеина *in vitro* одинаково влияло добавление экстраклеточных везикул, выделенные из культуры нейробластомы с нормальной и повышенной экспрессией альфа-синуклеина [210], указывая на то, что триггером агрегации могут являться не накапливающиеся формы альфа-синуклеина, а изменения в липидном профиле экстраклеточных везикул. В других исследованиях показано, что сфинголипиды при непосредственном взаимодействии с альфа-синуклеином могут индуцировать его агрегацию [15,211]. Кроме того, было показано увеличение уровня сфинголипидов не только при БП [12,130,131,186,212–214], но и других синуклеинопатиях [215,216]. Предполагается, что именно оценка концентрации лизосфинголипидов (HexSph), а не активности GCase с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС может использоваться как чувствительный и специфичный маркер при дисфункции GCase [196,197].

Мы предполагаем, что снижение уровня сфинголипидов может использоваться как параметр оценки эффективности ФШ GCase.

Макрофаги являются основным типом клеток, проявляющих фенотип заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, благодаря высокому уровню

экспрессии гена *GBA1* в данном типе клеток. 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. Клетки первичной культуры макрофагов отражают изменения ферментативной активности GCase и концентрации субстрата HexSph, измеренных методом ВЭЖХ-МС/МС [189]. Нами была выбрана оптимальная концентрация клеток первичной культуры макрофагов (наносимых на фильтровальную бумагу) для последующей оценки активности лизосомных ферментов и концентрации лизосфинголипдов, измеренных методом ВЭЖХ-МС/МС, при которой сохранялась линейная зависимость анализируемой активности GCase и концентрации субстрата. Суспензия клеток макрофагов в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл/мл наносилась на фильтры для дальнейшего анализа [189]. Нами было показано, что клетки первичной культуры макрофагов как пациентов GBA-БП так и с БГ характеризуются сниженной ферментативной активностью GCase и накоплением лизосфинголипдов [8,189].

В тоже время для изучения механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний актуальным является исследование пациент-специфичных ИПСК, проходящих направленную дифференцировку *in vitro* в узкоспециализированный тип нейронов [217]. 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 эффективности ФШ GCase. Используя ДА-нейроны, дифференцированные из ИПСК, мы показали снижение активности GCase у пациента с GBA-БП по сравнению с лицами контрольной группы [193].

Ранее в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ было показано снижение активности GCase, нарушение транслокации GCase в лизосомы [27,35,218] и накопление субстрата [23,35]. Аналогичные результаты были показаны на макрофагах, дифференцированных из ИПСК пациентов с БГ, также БГ с паркинсонизмом [34,35,219,220]. Нами впервые показано, что в клетках

первичной культуры макрофагов пациентов с ГВА-БП также наблюдается незначительное снижение активности GCase с сопутствующим накоплением субстрата [8,189]. Ранее на фибробластах пациентов с БГ и ГВА-БП было показано снижение активности и относительного уровня GCase, нарушение транслокации GCase в лизосомы [10,16,22]. В нейрональных клетках, дифференцированных из ИПСК, пациентов с БГ было показано нарушение работы GCase включающее снижение активности и относительного уровня GCase, накопление лизосфинголипидов и нарушение транспорта GCase в лизосомы [34,221–223]. Аналогичные результаты были получены и с использованием клеток ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с ГВА-БП [11,44,134], что согласуется с полученными нами результатами.

В рамках данной работы нами разработана система оценки эффективности таргетных препаратов, направленных на восстановление функции GCase *in vitro* с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и ГВА-БП с оценкой ферментативной активности GCase и концентрации субстрата методом ВЭЖХ-МС/МС (Рисунок 32).

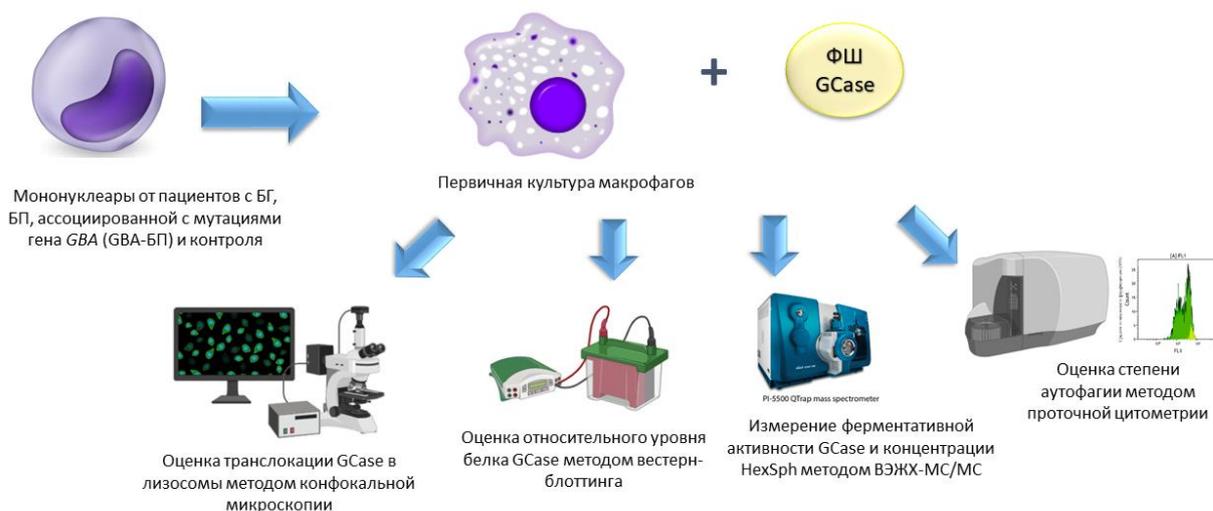


Рисунок 32 — Схема скрининга ФШ GCCase с использованием клеток первичной культуры макрофагов с оценкой активности и относительного уровня GCCase, степени транслокации GCCase в лизосомы, концентрации лизосфинголипидов и степени аутофагии

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 GCCase 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 [187]. Aflaki и соавт., 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 GCCase, накопление субстрата и нарушение функции макрофагов) [35]. Использование клеток первичной культуры макрофагов позволяет обеспечить персонафицированный подход в поиске терапии и оценке ее

эффективности, клетки сохраняют генетические и фенотипические особенности пациента, кроме того данный подход отличается легкодоступностью получения биологического материала. При работе с культивируемыми макрофагами, полученными путем дифференцировки мононуклеаров периферической крови, клетки не способны к пролиферации, в связи с чем для проведения масштабных исследований необходимо большое количество биоматериала, что в некоторых случаях может быть затруднительно. Получение макрофагов, дифференцированных из ИПСК, является более дорогостоящим и трудоемким методом, однако за счет способности клеток к пролиферации у исследователей есть возможность получить достаточное количество макрофагов [35].

Поскольку ряд мутаций в гене *GBA1* расположены вне активного сайта фермента, а снижение активности происходит вследствие нарушения фолдинга GCase и деградации мутантного белка в протеасоме, представляется перспективным использование химических соединений - ФШ, которые способствуют правильной сборке белка GCase и его последующей транслокации в лизосому [19,20]. Наиболее вероятным кандидатом ФШ для применения в качестве нейропротекторного средства при БГ и БП является амброксол. В фармакологии амброксол используется более 50 лет в качестве муколитического средства [171]. Несмотря на многочисленные эксперименты и исследования эффектов амброксола как ФШ GCase, до сих пор не был описан точный механизм взаимодействия амброксола и GCase. Нами *in silico* была построена гликозилированная модель мутантной N370S GCase и описано 7 потенциальных сайтов связывания для ФШ на поверхности белка [8]. Используя полученную модель мутантной N370S GCase, методами молекулярной динамики и докинга был описан и охарактеризован сайт связывания амброксола и GCase на поверхности фермента [8]. Наша работа подтверждает, что амброксол является рН-зависимым ФШ GCase смешанного типа и может связываться с GCase как в активном сайте, так и на поверхности фермента, в описанном нами сайте связывания вблизи аминокислотной замены N370S.

В данной работе с использованием клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП нами проведена оценка эффективности амброксола как ФШ GCase. Нами показано, что применение амброксола в культивируемых макрофагах пациентов с БГ приводит к повышению ферментативной активности и количества GCase в клетках (Рисунок 17А, 22). Амброксол не только повышает активность фермента, но также и способствует его дальнейшему транспорту в лизосому (Рисунок 20). В нашей работе использование амброксола приводит к снижению концентрации HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП (Рисунок 17В, 25В) [8].

Нами впервые проведена оценка эффективности ФШ амброксол в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП. Применение амброксола приводило к увеличению ферментативной активности GCase, а также к снижению концентрации лизосфинголипидов HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП (Рисунок 25А,В). Используя *in vitro* модель ДА-нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с GBA-БП было показано, что амброксол повышает активность и количество GCase в клетках (Рисунок 28, 29), что согласуется с полученными ранее данными других исследований. 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 [22]. Кроме того, применение амброксола приводило к увеличению экспрессии гена *GBA1*, улучшению лизосомной функции и повышению активности GCase в культивируемых фибробластах пациентов с БГ, GBA-БП и лиц контрольной группы [10,16]. Welsh N. и соавторы в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ оценили эффективность амброксола в снижении концентрации субстрата GCase и сопоставили её с препаратом, относящегося к препаратам ФЗТ – имиглуцеразой. Использование амброксола приводило к значительному снижению концентрации субстрата в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ всех типов, кроме того эффективность амброксола сопоставима с имиглуцеразой и в

некоторых случаях даже превосходит её [23]. С использованием ДА- и холинергических нейронов, дифференцированных из ИПСК, пациентов с GBA-БП было показано, что амброксол повышает активность и относительный уровень GCase, а также снижает количество белка альфа-синуклеина в клетках [44,224].

В данной работе мы показали, что эффективность амброксола значительно зависит от тяжести мутаций гена *GBA1* у пациентов. Мы наблюдали более выраженную эффективность амброксола в повышении ферментативной активности GCase в культивируемых макрофагах пациентов с «тяжелыми» мутациями гена *GBA1*, в то время как снижение субстрата было более выражено у носителей «легких» мутаций (Рисунок 17Б,Г, 25Б,Г). 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* [27,218]. Полученные нами и зарубежными коллегами результаты подчеркивают необходимость персонализированного подхода при использовании ФШ в качестве терапии, способствующей повышению активности GCase. Можно ожидать, что разработанный нами метод с использованием клеток первичной культуры макрофагов будет востребован для скрининга препаратов и существенно упростит персонафикацию терапии в виду возможности получения данных линий от каждого пациента.

На сегодняшний день активно ведется поиск новых молекул, способных выступать в качестве ФШ аллостерического типа. Описано лишь несколько соединений, способных выступать в качестве ФШ GCase аллостерического типа (S-181, N07, NCGC758 и LTI-291) [8,11,13–21]. При этом для большинства из них до сих пор не описаны сайты связывания с GCase и механизм их действия.

Перспективным аллостерическим активатором GCase является соединение N07, аналог соединения ML266, выявленный в процессе скрининга на гомогенатах

селезенки пациента с БГ [177]. Aflaki и соавторы в макрофагах и ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациентов с БГ 1 и 2 типов и БГ с паркинсонизмом показали, 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 [34]. Aflaki и соавторы показали возможность использования ФШ N07 в качестве нейропротекторного средства при БП и БГ с поражением нервной системы.

С помощью методов молекулярной динамики и докинга нами впервые были описаны потенциальные сайты связывания ФШ N07 на поверхности GCase, что доказывает, что соединение N07 является ФШ аллостерического типа [225]. С целью повышения растворимости соединения нами были предложены химические модификации ФШ N07 – N2 и N3. На сегодняшний день при создании терапевтических средств одним из главных параметров является их биодоступность. Растворимость играет существенную роль в действии лекарственных средств, прежде всего предназначенных для перорального приема. Улучшение таких параметров как растворимость фармацевтических препаратов может оказать значительное влияние на их биодоступность и последующее внедрение в клиническую практику. Так, например, ранее показывающий многообещающие результаты ФШ ингибирующего типа IFG был снят со 2 фазы клинических испытаний из-за неспособности снижать концентрацию лизосфинголипдов, что вероятно связано с его высокой гидрофобностью и, как следствие, низкой растворимостью [21].

В данной работе впервые проведена оценка эффективности аллостерического ФШ N07 в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП, а также в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП. Мы показали, что в культивируемых макрофагах пациентов с БГ ФШ N07 повышает ферментативную активность GCase (Рисунок 19А). Соединения N2 и N3 не оказывали влияния на активность GCase в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ, в то время как в культивируемых макрофагах

пациентов с GBA-БП соединение N2 повышало активность GCase (Рисунок 26А). Нами было показано, что использование ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 снижает концентрацию HexSph в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ, при этом в клетках пациентов с GBA-БП только соединения N2 и N3 снижают концентрацию HexSph (Рисунок 19Б, 26Б). При этом соединение N2 (как по сравнению с N07, так и N3) было более эффективно в снижении концентрации HexSph как в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ, так и GBA-БП. Эффективность ФШ N07 и его модификаций N2 и N3 в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП зависела от тяжести мутаций в гене *GBA1*. В клетках первичной культуры макрофагов пациентов с GBA-БП, носителей «легких» мутаций в гене *GBA1*, ФШ N07 и его модификации N2 и N3 приводили к статистически значимому повышению активности GCase, в то время как в клетках пациентов с «тяжелыми» мутациями исследуемые соединения не оказывали влияния на ферментативную активность GCase (Рисунок 26В). Кроме того, при оценке эффективности ФШ аллостерического типа N07 и N2 было показано, что данные соединения наиболее эффективно снижают концентрацию субстрата в культивируемых макрофагах у носителей «тяжелых» мутаций в гене *GBA1* (Рисунок 19). В тоже время восстановление активности GCase при воздействии ФШ N07 было более выраженным у носителей «легких» мутаций в гене *GBA1* (Рисунок 19).

Важной задачей ФШ GCase также является его способность повышать степень транслокации GCase в лизосомы. В культивируемых макрофагах пациентов с БГ нами показано, что ФШ N07 и его модификации N2 и N3 повышают степень транслокации GCase в лизосому, однако наибольший эффект наблюдался при использовании соединения N2 (Рисунок 21). Стоит отметить, что в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП нами также показано повышение активности и количества GCase при воздействии ФШ N07 и N2 (Рисунок 30А, 28). Кроме того, соединение N2 также повышает степень транслокации GCase в лизосомы (Рисунок 31).

Согласно полученным результатам предложенное нами соединение N2 обладает большей эффективностью в повышении активности GCase в культивируемых макрофагах пациентов с GBA-БП, снижении концентрации лизосфинголипидов HexSprh как в клетках пациентов с БГ, так и GBA-БП, а также обладает большей эффективностью в повышении транслокации GCase в лизосому по сравнению как с исходным соединением N07, так и N3. При оценке эффективности соединения N2 в ДА-нейронах, дифференцированных из ИПСК, пациента с GBA-БП было показано, что данное соединение способно не только повышать ферментативную активность и количество белка GCase, но также обладало большей эффективностью в повышении транслокации GCase в лизосому. Таким образом нами разработан новый ФШ GCase, показывающий лучшие качества в восстановлении функции GCase.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании нами разработан подход для оценки эффективности соединений, направленных на восстановление функции GCCase в клетках первичной культуры макрофагов с оценкой активности GCCase 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 GCCase, а также оценки эффективности таргетной терапии не только для БГ, но и GBA-БП. *In vitro* в клетках первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП нами проведена оценка эффективности амброксола, аллостерического ФШ N07 и его модификаций в качестве ФШ GCCase. Новый ФШ GCCase (соединение N2), показал большую эффективность в восстановлении функции GCCase по сравнению с исходным соединением, а именно при его воздействии снижение субстрата GCCase и увеличение транслокации GCCase 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 GBA-БП, было показано, что исследуемая *in vitro* модель может быть использована для оценки эффективности ФШ GCCase при БП. В ДА-нейронах пациента с GBA-БП проведена оценка эффективности ФШ амброксол, N07 и его модификаций. ФШ N2 показал большую эффективность в повышении активности GCCase 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 [225,226] и позволила предложить новый ФШ GCCase, обладающий большей эффективностью в снижении концентрации субстрата.

ВЫВОДЫ

- 1) Клетки первичной культуры макрофагов пациентов с болезнью Гоше и GBA-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 GBA-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 СОКРАЩЕНИЙ

- AAV (Adeno-associated dependoparvovirus A) – аденоассоциированная вирусная инфекция
- CBE (Conduritol B epoxide) – кондуритол бета эпоксид
- FBS (Fetal bovine serum) – бычья эмбриональная сыворотка
- GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- GBA 1* – ген лизосомной глюкоцереброзиды
- GBA 2* – ген цитозольной глюкоцереброзиды 2
- GBA-БП – болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*
- GCase (Glucocerebrosidase) – лизосомная глюкоцереброзидаза
- GCase 2 (Cytosolic glucocerebrosidase) – цитозольная глюкоцереброзидаза 2
- GlcCer (glucosylceramide) – глюкозилцерамида
- GlcSph (glucosylsphingosine) – глюкозилсфингозин
- GWAS (Genome-wide association studies) - полногеномный поиск ассоциаций
- HexSph (hexosylsphingosine) – гексозинсфингозин
- qHTS (High-throughput screening) – высокопроизводительный скрининг
- IFG (Isofagomine) – изофагомин
- LIMP-2 (Lysosomal integral membrane protein-2) – лизосомный интегральный мембранный белок-2
- LRRK 2* (Leucine-rich repeat kinase 2) – киназа 2 с высоким содержанием лейцина
- 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)
- NN-DNJ – иминосахар N-(n-нонил)дезоксиноиримицин

OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) – база данных « Менделевское наследование у человека»

PBS (Phosphate-buffered saline) – фосфатно-солевой буфер

SCARB 2 – ген лизосомного интегрального мембранного белка-2

SNCA – ген альфа-синуклеина

БГ – болезнь Гоше

БП – болезнь Паркинсона

ВЭЖХ-МС/МС – метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДА – дофаминергические

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

М-КСФ – колониестимулирующий фактор роста макрофагов

СРТ – субстрат-редуцирующая терапия

ФЗТ – фермент заместительная терапия

ФШ – фармакологический шаперон

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferreira C.R., Gahl W.A. Lysosomal storage diseases / C.R. Ferreira, W.A. Gahl // *Transl. Sci. Rare Dis.* – 2017. – Vol. 2. – № 1–2. – P. 1.
2. Sidransky E., Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism / E. Sidransky, G. Lopez // *Lancet. Neurol.* – 2012. – Vol. 11. – № 11. – P. 986.
3. Do J. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease / J. Do [et al] // *Mol. Neurodegener.* – 2019. – Vol. 14. – № 1.
4. Gan-Or Z. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease / Z. Gan-Or [et al] // *Neurology.* – 2015. – Vol. 84. – № 9. – P. 880–887.
5. Emelyanov A.K. Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set / A.K. Emelyanov [et al] // *Neurobiol. Aging.* – 2018. – Vol. 71. – P. 267.e7–267.e10.
6. Sidransky E. Multi-center analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease / E. Sidransky [et al] // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – Vol. 361. – № 17. – P. 1651.
7. Pchelina S. Blood lysosphingolipids accumulation in patients with parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations / S. Pchelina [et al] // *Mov. Disord.* – 2018. – Vol. 33. – № 8. – P. 1325–1330.
8. 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 [et al] // *Park. Relat. Disord.* – 2021. – Vol. 84. – P. 112–121.
9. Yang S.Y. A Human Neural Crest Stem Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Model Recapitulates Biochemical Abnormalities in GBA1 Mutation Carriers / S.Y. Yang [et al] // *Stem Cell Reports.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 728–742.
10. McNeill A. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells / A. McNeill [et al] // *Brain.* – 2014. – Vol. 137. – № 5. – P. 1481–1495.

11. Fernandes H.J.R. ER Stress and Autophagic Perturbations Lead to Elevated Extracellular α -Synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-Derived Dopamine Neurons / H.J.R. Fernandes [et al] // *Stem Cell Reports*. – 2016. – Vol. 6. – № 3. – P. 342–356.
12. Mazzulli J.R. Gaucher's Disease Glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies / J.R. Mazzulli [et al] // *Cell*. – 2011. – Vol. 146. – № 1. – P. 37.
13. Taguchi Y. V. Glucosylsphingosine promotes α -synuclein pathology in mutant GBA-associated parkinson's disease / Y.V. Taguchi [et al] // *J. Neurosci*. – 2017. – Vol. 37. – № 40. – P. 9617–9631.
14. Thomas A.S., Mehta A., Hughes D.A. Gaucher disease: haematological presentations and complications / A.S. Thomas, A. Mehta, D.A. Hughes // *Br. J. Haematol*. – 2014. – Vol. 165. – № 4. – P. 427–440.
15. Zunke F. Reversible Conformational Conversion of α -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide / F. Zunke [et al] // *Neuron*. – 2018. – Vol. 97. – № 1. – P. 92-107.e10.
16. Sanchez-Martinez A. Parkinson disease-linked GBA mutation effects reversed by molecular chaperones in human cell and fly models / A. Sanchez-Martinez [et al] // *Sci. Rep*. – 2016. – Vol. 6.
17. Davis M.Y. Glucocerebrosidase Deficiency in *Drosophila* Results in α -Synuclein-Independent Protein Aggregation and Neurodegeneration / M.Y. Davis [et al] // *PLoS Genet*. – 2016. – Vol. 12. – № 3.
18. Sardi S.P. Glucosylceramide synthase inhibition alleviates aberrations in synucleinopathy models / S.P. Sardi [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2017. – Vol. 114. – № 10. – P. 2699–2704.
19. Han T.U., Sam R., Sidransky E. Small Molecule Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease and GBA1-Associated Parkinson Disease / T.U. Han, R. Sam, E. Sidransky // *Front. Cell Dev. Biol*. – 2020. – Vol. 8.
20. Tran M.L. Second-Generation Pharmacological Chaperones: Beyond Inhibitors /

- M.L. Tran [et al] // *Mol.* –2020. – Vol. 25. – № 14. – P. 3145.
21. Martínez-Bailén M. GCase Enhancers: A Potential Therapeutic Option for Gaucher Disease and Other Neurological Disorders / M. Martínez-Bailén [et al] // *Pharm.* – 2022. – Vol. 15. – № 7. – P. 823.
 22. Maegawa G.H.B. Identification and characterization of ambroxol as an enzyme enhancement agent for Gaucher disease / G.H.B. Maegawa [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. – № 35. – P. 23502–23516.
 23. Welsh N.J. Functional assessment of glucocerebrosidase modulator efficacy in primary patient-derived macrophages is essential for drug development and patient stratification / N.J. Welsh [et al] // *Haematologica.* – 2020. – Vol. 105. – № 5. – P. e206.
 24. Luan Z. The chaperone activity and toxicity of ambroxol on Gaucher cells and normal mice / Z. Luan [et al] // *Brain Dev.* – 2013. – Vol. 35. – № 4. – P. 317–322.
 25. Silveira C.R.A. Ambroxol as a novel disease-modifying treatment for Parkinson's disease dementia: protocol for a single-centre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / C.R.A. Silveira [et al] // *BMC Neurol.* – 2019. – Vol. 19. – № 1.
 26. Migdalska-Richards A. Ambroxol effects in glucocerebrosidase and α -synuclein transgenic mice / A. Migdalska-Richards [et al] // *Ann. Neurol.* – 2016. – Vol. 80. – № 5. – P. 766.
 27. Ivanova M.M. Individualized screening for chaperone activity in gaucher disease using multiple patient derived primary cell lines / M.M. Ivanova [et al] // *Am. J. Transl. Res.* – 2018. – Vol. 10. – № 11. – P. 3750–3761.
 28. Migdalska-Richards A. Oral ambroxol increases brain glucocerebrosidase activity in a nonhuman primate / A. Migdalska-Richards [et al] // *Synapse. Wiley-Blackwell.* – 2017. – Vol. 71. – № 7.
 29. Aflaki E. Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages / E. Aflaki [et al] // *Aging Cell.* 2016. – Vol. 15. – № 1. – P. 77–88.
 30. Yang S. Glucocerebrosidase activity, cathepsin D and monomeric α -synuclein

- interactions in a stem cell derived neuronal model of a PD associated GBA1 mutation / S. Yang [et al] // *Neurobiol. Dis.* – 2020. – Vol. 134. – P. 104620.
31. Burbulla L.F. A modulator of wild-type glucocerebrosidase improves pathogenic phenotypes in dopaminergic neuronal models of Parkinson's disease / L.F. Burbulla [et al] // *Sci. Transl. Med.* 2019. – Vol. 11. – № 514. – P. 1–12.
 32. Mullin S. Ambroxol for the Treatment of Patients with Parkinson Disease with and Without Glucocerebrosidase Gene Mutations: A Nonrandomized, Noncontrolled Trial / S. Mullin [et al] // *JAMA Neurol.* 2020. – Vol. 77. – № 4. – P. 427–434.
 33. Patnaik S. Discovery, SAR, and Biological evaluation of Non-Inhibitory Small Molecule Chaperones of Glucocerebrosidase / S. Patnaik [et al] // *J. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 55. – № 12. – P. 5734.
 34. Aflaki E. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α -Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism / E. Aflaki [et al] // *J. Neurosci.* – 2016. – Vol. 36. – № 28. – P. 7441–7452.
 35. Aflaki E. Macrophage Models of Gaucher Disease for Evaluating Disease Pathogenesis and Candidate Drugs / E. Aflaki [et al] // *Sci. Transl. Med.* – 2014. – Vol. 6. – № 240. – P. 240ra73.
 36. Nalysnyk L. Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the literature / L. Nalysnyk [et al] // *Hematology.* – 2017. – Vol. 22. – № 2. – P. 65–73.
 37. Castillon G., Chang S.C., Moride Y. Global Incidence and Prevalence of Gaucher Disease: A Targeted Literature Review / G. Castillon, S.C. Chang, Y. Moride // *J. Clin. Med.* – 2022. – Vol. 22. – №;2. – P. 85.
 38. Beutler E., Grabowski G.A. Gaucher disease [Electronic resource] / E. Beutler, G.A. Grabowski // In Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. and Valle D., Eds., *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* – P.3635-3668. – URL: [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=749935](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=749935) (accessed: 16.05.2022).

39. Лукина, Е.А. Болезнь Гоше: Современная диагностика и лечения / Е.А. Лукина // Онкогематология. - 2009. – Т. 2. – № 2. – С. 196-199.
40. Baris H.N., Cohen I.J., Mistry P.K. Gaucher Disease: The Metabolic Defect, Pathophysiology, Phenotypes And Natural History / H.N. Baris, I.J. Cohen, P.K. Mistry // *Pediatr. Endocrinol. Rev.* – 2014. – Vol. 12. – № 0 1. – P. 72.
41. Dandana A. Gaucher Disease: Clinical, Biological and Therapeutic Aspects / A. Dandana [et al] // *Pathobiology.* – 2016. – Vol. 83. – № 1. – P. 13–23.
42. Dekker N. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response / N. Dekker [et al] // *Blood.* – 2011. – Vol. 118. – № 16. – P. e118–e127.
43. Murugesan V. Glucosylsphingosine is a key biomarker of Gaucher disease / V. Murugesan [et al] // *Am. J. Hematol.* – 2016. – Vol. 91. – № 11. – P. 1082–1089.
44. Yang S.Y. A Human Neural Crest Stem Cell-Derived Dopaminergic Neuronal Model Recapitulates Biochemical Abnormalities in GBA1 Mutation Carriers / S.Y. Yang [et al] // *Stem Cell Reports.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. 728–742.
45. Cassinerio E., Graziadei G., Poggiali E. Gaucher disease: a diagnostic challenge for internists / E. Cassinerio, G. Graziadei, E. Poggiali // *Eur. J. Intern. Med.* – 2014. – Vol. 25. – № 2. – P. 117–124.
46. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей / К.Д. Краснопольская. М.: Фохат. – 2005. – 364 с.
47. Mignot C., Gelot A., De Villemeur T.B. Gaucher disease / C. Mignot, A. Gelot, T.B. De Villemeur // *Handb. Clin. Neurol.* – 2013. – Vol. 113. – P. 1709–1715.
48. Grabowski G.A. Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: Presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements / G.A. Grabowski // *Eur. J. Pediatr.* 2004. – Vol. 163. – № 2. – P. 58–66.
49. Мовсисян Г.Б. Оптимизация оказания медицинской помощи детям с болезнью Гоше в Российской Федерации // дис. канд. мед. наук: 14.01.08 – Педиатрия. – 2018. – 185 с. 50. Nagral A. Gaucher Disease // *J. Clin. Exp. Hepatol.* Elsevier, 2014. Vol. 4, № 1. P. 37.

50. Nagral A. Gaucher Disease / A. Nagral // *J. Clin. Exp. Hepatol.* – 2014. – Vol. 4. – № 1. – P. 37.
51. Stirnemann J.Ô. A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments / J.Ô. Stirnemann [et al] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – № 2.
52. Мовсисян Г.Б. Демографическая и клинико-генетическая характеристика детей с болезнью Гоше в Российской Федерации: данные педиатрического регистра / Г.Б. Мовсисян // *Педиатрическая фармакология.* – 2016. – Vol. 13. – № 4. – P. 354–361.
53. Grabowski G.A., Zimran A., Ida H. Gaucher disease types 1 and 3: Phenotypic characterization of large populations from the ICGG Gaucher Registry / G.A. Grabowski, A. Zimran, H. Ida // *Am. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 90 – Suppl 1. – № S1. – P. S12–S18.
54. Kaplan P. The clinical and demographic characteristics of nonneuronopathic Gaucher disease in 887 children at diagnosis / P. Kaplan [et al] // *Arch. Pediatr. Adolesc.* – 2006. – Vol. 160. – № 6. – P. 603–608.
55. Pastores G.M., Patel M.J., Firooznia H. Bone and joint complications related to Gaucher disease / G.M. Pastores, M.J. Patel, H. Firooznia // *Curr. Rheumatol. Rep.* – 2000. – Vol. 2. – № 2. – P. 175–180.
56. Bultron G. The risk of Parkinson’s disease in type 1 Gaucher disease / G. Bultron [et al] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2010. – Vol. 33. – № 2. – P. 167.
57. Pastores G.M. A neurological symptom survey of patients with type I Gaucher disease / G.M. Pastores [et al] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2003. – Vol. 26. – № 7. – P. 641–645.
58. Weiss K. The clinical management of Type 2 Gaucher disease / K. Weiss [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2015. – Vol. 114. – № 2. – P. 110–122.
59. Tylki-Szymańska A. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry / A. Tylki-Szymańska [et al] // *J. Inherit.*

- Metab. Dis. – 2010. – Vol. 33. – № 4. – P. 339–346.
60. Vellodi A. Lysosomal storage disorders / A. Vellodi // *Br. J. Haematol.* – 2005. – Vol. 128. – № 4. – P. 413–431.
61. Huang W.J., Zhang X., Chen W.W. Gaucher disease: a lysosomal neurodegenerative disorder. / W.J. Huang, X. Zhang, W.W. Chen // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2015. – Vol. 19. – № 7. – P. 1219–1226.
62. Botross N.P. Chronic neuronopathic type of Gaucher's disease with progressive myoclonic epilepsy in the absence of visceromegaly and bone involvement / N.P. Botross [et al] // *Scott. Med. J.* – 2014. – Vol. 59. – № 2. – P. e1–e6.
63. Tyłki-Szymańska A., Keddache M., Grabowski G.A. Characterization of neuronopathic Gaucher disease among ethnic Poles/ A. Tyłki-Szymańska, M. Keddache, G.A. Grabowski // *Genet. Med.* – 2006. – Vol. 8. – № 1. – P. 8–15.
64. Bohlega S. Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascular calcification (Gaucher type IIIC) / S. Bohlega [et al] // *Neurology.* – 2000. – Vol. 54. – № 1. – P. 261–263.
65. Amaral O. Molecular characterisation of type 1 Gaucher disease families and patients: intrafamilial heterogeneity at the clinical level. / O. Amaral [et al] // *J. Med. Genet. BMJ Publishing Group*, 1994. – Vol. 31. – № 5. – P. 401.
66. Biegstraaten M. A monozygotic twin pair with highly discordant Gaucher phenotypes / M. A Biegstraaten [et al] // *Blood Cells. Mol. Dis.* – 2011. – Vol. 46. – № 1. – P. 39.
67. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder / E. Sidransky // *Mol. Genet. Metab.* – 2004. – Vol. 83. – № 1–2. – P. 6–15.
68. Hassan S., Sidransky E., Tayebi N. The role of epigenetics in lysosomal storage disorders: Uncharted territory / S. Hassan, E. Sidransky, N. Tayebi // *Mol. Genet. Metab.* – 2017. – Vol. 122. – № 3. – P. 10–18.
69. Modak D. Type 1 and Type 3 Gaucher Disease in Two Siblings in A Family: 2 Unusual Case Reports / D. Modak [et al] // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2015. – Vol. 9. – № 2. – P. OD01.

70. Weinreb N.J. Life expectancy in Gaucher disease type 1 / N.J. Weinreb [et al] // *Am. J. Hematol.* – 2008. – Vol. 83. – № 12. – P. 896.
71. Lieberman R.L. A guided tour of the structural biology of gaucher disease: Acid- β -glucosidase and saposin C / R.L. Lieberman // *Enzyme Res.* 2011. – Vol. 2011. – № 1.
72. Dvir H. X-ray structure of human acid- β -glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease / H. Dvir [et al] // *EMBO Rep.* – 2003. – Vol. 4. – № 7. – P. 704.
73. Kacher Y. Acid β -glucosidase: Insights from structural analysis and relevance to Gaucher disease therapy / Y. Kacher [et al] // *Biol. Chem.* 2008. – Vol. 389. – № 11. – P. 1361–1369.
74. Liou B. Analyses of Variant Acid β -Glucosidases: EFFECTS OF GAUCHER DISEASE MUTATIONS / B. Liou [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – № 7. – P. 4242–4253.
75. Toffoli M., Smith L., Schapira A.H.V. The biochemical basis of interactions between Glucocerebrosidase and alpha-synuclein in GBA1 mutation carriers / M. Toffoli, L. Smith, A.H.V. Schapira // *J. Neurochem.* – 2020. – Vol. 154. – № 1. – P. 11–24.
76. Reczek D. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase / D. Reczek [et al] // *Cell.* – 2007. – Vol. 131. – № 4. – P. 770–783.
77. Velayati A. A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease / A. Velayati [et al] // *Hum. Mutat.* – 2011. – Vol. 32. – № 11. – P. 1232.
78. Tamargo R.J. The role of saposin C in Gaucher disease / R.J. Tamargo [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. – Vol. 106. – № 3. – P. 257.
79. Salvioli R. The N370S (Asn370→Ser) mutation affects the capacity of glucosylceramidase to interact with anionic phospholipid-containing membranes and saposin C / R. Salvioli [et al] // *Biochem. J.* – 2005. – Vol. 390. – № Pt 1. – P. 95.
80. Kolter T., Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of

- sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids / T. Kolter, K. Sandhoff // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2005. – Vol. 21. – P. 81–103.
81. Atrian S. An evolutionary and structure-based docking model for glucocerebrosidase–saposin C and glucocerebrosidase–substrate interactions—Relevance for Gaucher disease / S. Atrian [et al] // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2008. – Vol. 70. – № 3. – P. 882–891.
 82. Körschen H.G. The Non-lysosomal β -Glucosidase GBA2 Is a Non-integral Membrane-associated Protein at the Endoplasmic Reticulum (ER) and Golgi / H.G. Körschen [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 5. – P. 3381.
 83. Matern H. Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver / H. Matern [et al] // *J. Biol. Chem. J Biol Chem*, 1997. – Vol. 272. – № 17. – P. 11261–11267.
 84. Sobreira E. Phenotypic and genotypic heterogeneity in Gaucher disease type 1: a comparison between Brazil and the rest of the world / E. Sobreira [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2007. – Vol. 90. – № 1. – P. 81–86.
 85. Hassan S. Alleles with more than one mutation can complicate genotype/phenotype studies in Mendelian disorders: Lessons from Gaucher disease / S. Hassan [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2018. – Vol. 125. – № 1–2. – P. 1.
 86. Grabowski G.A. Gaucher Disease: Gene Frequencies and Genotype/Phenotype Correlations / G.A. Grabowski // *Genetic Testing.* – 2009. – Vol. 1, – № 1. – P. 5–12.
 87. The Human Gene Mutation Database. HGMD professional 2021.4.1 [Electronic resource] // Дата обращения 05.03.2022: <https://www.hgmd.cf.ac.uk>.
 88. Beutler E., Demina A., Gelbart T. Glucocerebrosidase mutations in Gaucher disease. / E. Beutler, A. Demina, T. Gelbart // *Mol. Med. The Feinstein Institute for Medical Research*, 1994. – Vol. 1. – № 1. – P. 82.
 89. Hruska K.S. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA) / K.S. Hruska [et al] // *Hum. Mutat.* 2008. – Vol.

29. – № 5. – P. 567–583.
90. Koprivica V. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. / V. Koprivica [et al] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2000. – Vol. 66. – № 6. – P. 1777.
91. Букина Т.М. Биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика болезни Гоше у российских пациентов // дис. ... канд. биол. наук: 3.00.15. М. – 2005. – 114 с.
92. Choi J.M. Association of mutations in the glucocerebrosidase gene with Parkinson disease in a Korean population / J.M. Choi [et al] // *Neurosci. Lett.* – 2012. – Vol. 514. – № 1. – P. 12–15.
93. Kumar K.R. Glucocerebrosidase mutations in a Serbian Parkinson's disease population / K.R. Kumar [et al] // *Eur. J. Neurol.* – 2013. – Vol. 20. – № 2. – P. 402–405.
94. Лукина К.А. Молекулярно-генетическая диагностика болезни Гоше I типа / К.А. Лукина [и др] // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2014. – №1. – P. 53-55.
95. Sibille A. Phenotype/genotype correlations in Gaucher disease type I: clinical and therapeutic implications. / A. Sibille [et al] // *Am. J. Hum. Genet. Elsevier*, 1993. – Vol. 52. – № 6. – P. 1094.
96. Lesage S. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease / S. Lesage [et al] // *Hum. Mol. Genet.* – 2011. – Vol. 20. – № 1. – P. 202–210.
97. Di Rocco M. Minimal disease activity in Gaucher disease: Criteria for definition / M. Di Rocco [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2012. – Vol. 107. – № 3. – P. 521–525.
98. Букина Т. М., Цветкова И.В. Характеристика мутаций гена кислой β -d-глюкозидазы (GBA) среди 68 российских пациентов с болезнью гоше / Т. М. Букина, И.В. Цветкова // *Биомедицинская химия.* – 2007. – Vol. 53. – № 5. – P. 593–602.
99. Fairley C. Phenotypic heterogeneity of N370S homozygotes with type I Gaucher

- disease: an analysis of 798 patients from the ICGG Gaucher Registry / C. Fairley [et al] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2008. – Vol. 31. – № 6. – P. 738–744.
100. Vieira S.R.L., Anthony, Schapira H. V. Glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease / S.R.L. Vieira, Anthony, H.V. Schapira // *J. Neural Transm.* 2022. – Vol. 129. – P. 1105–1117.
101. Montfort M. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and “modifier” polymorphisms / M. Montfort [et al] // *Hum. Mutat.* – 2004. – Vol. 23. – № 6. – P. 567–575.
102. Horowitz M. The enigma of the E326K mutation in acid β -glucocerebrosidase / M. Horowitz [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 104. – № 1–2. – P. 35–38.
103. Wei R.R. X-ray and Biochemical Analysis of N370S Mutant Human Acid β -Glucosidase / R.R. Wei [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286. – № 1. – P. 299–308.
104. Romero R. Mechanism of glucocerebrosidase activation and dysfunction in Gaucher disease unraveled by molecular dynamics and deep learning / R. Romero [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2019. – Vol. 116. – № 11. – P. 5086–5095.
105. Smith L., Mullin S., Schapira A.H.V. Insights into the structural biology of Gaucher disease / L. Smith, S. Mullin, A.H.V. Schapira // *Exp. Neurol.* – 2017. – Vol. 298. – P. 180–190.
106. Schmitz M. Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher’s disease / M. Schmitz [et al] // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37. – № 11. – P. 2310–2320.
107. Grace M.E. Analysis of Human Acid P-Glucosidase by Site-directed Mutagenesis and Heterologous Expression / M.E. Grace [et al] // *J. Biol. Chem.* 1994. – Vol. 269. – № 3. – P. 2283–2291.
108. Beutler E., Beutler L., West C. Mutations in the gene encoding cytosolic β -glucosidase in Gaucher disease / E. Beutler, L. Beutler, C. West // *J. Lab. Clin. Med.* – 2004. – Vol. 144. – № 2. – P. 65–68.
109. Díaz-Font A. Gene rearrangements in the glucocerebrosidase-metaxin region giving

- rise to disease-causing mutations and polymorphisms. Analysis of 25 Rec NciI alleles in Gaucher disease patients / A. Díaz-Font [et al] // *Hum. Genet.* – 2003. – Vol. 112. – № 4. – P. 426–429.
110. Сенкевич К.А. Болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене GBA: молекулярные аспекты и возможные подходы к лечению / К.А. Сенкевич [и др] // *Acta Naturae.* – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 70–78.
111. Ben Bdira F. Stabilization of Glucocerebrosidase by Active Site Occupancy / F. Ben Bdira [et al] // *ACS Chem. Biol.* – 2017. – Vol. 12. – № 7. – P. 1830–1841.
112. Dickson D.W. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria / D.W. Dickson [et al] // *Lancet Neurol.* – 2009. – Vol. 8. – № 12. – P. 1150–1157.
113. Левин О.С., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона / О.С. Левин и Н.В. Федорова // М: МЕДпресс-информ. – 2012.
114. Postuma R.B. Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease / R.B. Postuma [et al] // *Mov. Disord.* – 2012. – Vol. 27. – № 5. – P. 617–626.
115. Fleming S.M. Mechanisms of Gene-Environment Interactions in Parkinson's Disease / S.M. Fleming // *Curr. Environ. Heal. reports.* – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 192–199.
116. Kalia L.V., Kalia S.K. α -Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease / L.V Kalia., S.K. Kalia // *Curr. Opin. Neurol.* – 2015. – Vol. 28. – № 4. – P. 375–381.
117. Cremades N. Direct Observation of the Interconversion of Normal and Toxic Forms of α -Synuclein / N. Cremades [et al] // *Cell.* – 2012. – Vol. 149. – № 5. – P. 1048.
118. Conway K.A., Harper J.D., Lansbury P.T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease / K.A. Conway, J.D. Harper, P.T. Lansbury // *Nat. Med. Nat Med*, 1998. – Vol. 4. – № 11. – P. 1318–1320.
119. Polymeropoulos M.H. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with

- Parkinson's Disease / M.H. Polymeropoulos [et al] // Science (80-.). American Association for the Advancement of Science, 1997. – Vol. 276. – № 5321. – P. 2045–2047.
120. Lee H.J., Choi C., Lee S.J. Membrane-bound α -Synuclein Has a High Aggregation Propensity and the Ability to Seed the Aggregation of the Cytosolic Form / H.J. Lee, C. Choi, S.J. Lee // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – № 1. – P. 671–678.
121. Benskey M.J., Perez R.G., Manfredsson F.P. The contribution of alpha synuclein to neuronal survival and function – Implications for Parkinson's disease / M.J. Benskey, R.G.Perez, F.P. Manfredsson // J. Neurochem. – 2016. – Vol. 137. – № 3. – P. 331.
122. Mak S.K. Lysosomal Degradation of α -Synuclein in Vivo / S.K. Mak [et al] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285. – № 18. – P. 13621.
123. Lee A., Gilbert R.M. Epidemiology of Parkinson Disease / A. Lee, R.M. Gilbert // Neurol. Clin. – 2016. – Vol. 34. – № 4. – P. 955–965.
124. Day J.O., Mullin S. The Genetics of Parkinson's Disease and Implications for Clinical Practice / J.O. Day, S. Mullin // Genes. – 2021. – Vol. 12. – № 7. – P. 1006.
125. Tolosa E. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease / E. Tolosa [et al] // Lancet. Neurol. – 2021. – Vol. 20. – № 5. – P. 385.
126. Ганькина, О.А. Особенности течения болезни Паркинсона при гетерозиготном носительстве мутаций в гене глюкоцереброзидазы А / О.А. Ганькина [и др] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски. - 2016. – Т. 116. – №6. – С. 71-76.
127. Blandini F. Glucocerebrosidase mutations and synucleinopathies: Toward a model of precision medicine / F. Blandini [et al] // Mov. Disord. 2019. – Vol. 34. – № 1. – P. 9–21.
128. Schapira A.H.V., Tolosa E. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment / A.H.V. Schapira, E. Tolosa // Nat. Rev. Neurol. – 2010. – Vol. 6. – № 6. – P. 309–317.
129. Halperin A., Elstein D., Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among

- relatives of patients with Gaucher disease / A. Halperin, D. Elstein, A. Zimran // *Blood Cells. Mol. Dis.* – 2006. – Vol. 36. – № 3. – P. 426–428.
130. Murphy K.E. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease / K.E. Murphy [et al] // *Brain.* – 2014. – Vol. 137. – № 3. – P. 834.
131. Gegg M.E. Glucocerebrosidase Deficiency in Substantia Nigra of Parkinson Disease Brains / M.E. Gegg [et al] // *Ann. Neurol.* – 2012. – Vol. 72. – № 3. – P. 455.
132. Kurzawa-Akanbi M. Glucocerebrosidase Mutations alter the endoplasmic reticulum and lysosomes in Lewy body disease / M. Kurzawa-Akanbi [et al] // *J. Neurochem.* – 2012. – Vol. 123. – № 2. – P. 298.
133. Ebrahimi-Fakhari D., McLean P.J., Unni V.K. Alpha-synuclein's degradation in vivo: opening a new (cranial) window on the roles of degradation pathways in Parkinson disease / D. Ebrahimi-Fakhari, P.J. McLean, V.K. Unni // *Autophagy.* – 2012. – Vol. 8. – № 2. – P. 281–283.
134. Schöndorf D.C. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis / D.C. Schöndorf [et al] // *Nat. Commun.* 2014. – Vol. 5.
135. Maor G. The contribution of mutant GBA to the development of Parkinson disease in *Drosophila* / G. Maor [et al] // *Hum. Mol. Genet.* – 2016. – Vol. 25. – № 13. – P. 2712.
136. Gündner A.L. Path mediation analysis reveals GBA impacts Lewy body disease status by increasing α -synuclein levels / A.L. Gündner [et al] // *Neurobiol. Dis.* – 2019. – Vol. 121. – P. 205–213.
137. Kim S. GBA1 deficiency negatively affects physiological α -synuclein tetramers and related multimers / S. Kim [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2018. – Vol. 115. – № 4. – P. 798–803.
138. Mazzulli J.R. Gaucher's Disease Glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies / J.R. Mazzulli [et al] // *Cell.* –

2011. – Vol. 146. – № 1. – P. 37.
139. Wong Y.C., Krainc D. Lysosomal trafficking defects link Parkinson's disease with Gaucher's disease / Y.C. Wong, D. Krainc // *Mov. Disord.* – 2016. – Vol. 31. – № 11. – P. 1610.
140. Weinreb N.J. Imiglucerase and its use for the treatment of Gaucher's disease / N.J. Weinreb // *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* – 2008. – Vol. 9. – № 11. – P. 1987–2000.
141. Turkia H.B. Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease / H.B. Turkia [et al] // *Am. J. Hematol.* – 2013. – Vol. 88. – № 3. – P. 179–184.
142. Andersson H. Eight-Year Clinical Outcomes of Long-Term Enzyme Replacement Therapy for 884 Children With Gaucher Disease Type 1 /H. Andersson [et al] // *Pediatrics.* – 2008. – Vol. 122. – № 6. – P. 1182–1190.
143. Weinreb N.J. Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment / N.J. Weinreb [et al] // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2013. – Vol. 36. – № 3. – P. 543.
144. Starzyk K. The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease / K. Starzyk [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2007. Vol. 90. – № 2. –P. 157–163.
145. Weinreb N.J., Kaplan P. The history and accomplishments of the ICGG Gaucher registry / N.J. Weinreb, P. Kaplan // *Am. J. Hematol.* – 2015. – Vol. 90. – № S1. – P. S2–S5.
146. Weinreb N.J. Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry / N.J. Weinreb [et al] // *Am. J. Med.* – 2002. – Vol. 113. – № 2. – P. 112–119.
147. Futerman A.H., Hannun Y.A. The complex life of simple sphingolipids / A.H. Futerman, Y.A. Hannun // *EMBO Rep.* – 2004. – Vol. 5. – № 8. – P. 777.
148. Zeller J.L., Burke A.E., Glass R.M. Gaucher Disease / J.L. Zeller, A.E. Burke, R.M.

- Glass// JAMA. – 2007. – Vol. 298. – № 11. – P. 1358–1358.
149. Ficicioglu C. Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1 / C. Ficicioglu // Ther. Clin. Risk Manag. – 2008. – Vol. 4. – № 2. – P. 425.
 150. Hollak C.E.M. Miglustat (Zavesca®) in type 1 Gaucher disease: 5-year results of a post-authorisation safety surveillance programme / C.E.M. Hollak [et al] // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. – 2009. – Vol. 18. – № 9. – P. 770–777.
 151. Kuter D.J. Miglustat therapy in type 1 Gaucher disease: clinical and safety outcomes in a multicenter retrospective cohort study / D.J. Kuter [et al] // Blood Cells. Mol. Dis. – 2013. – Vol. 51. – № 2. – P. 116–124.
 152. Peterschmitt J. Effect of Venglustat by GBA Mutation Severity in Patients With Parkinson's Disease - MDS Abstracts / J. Peterschmitt [et al] // Mov. Disord. – 2021. – Vol. 36. – P. 190.
 153. Peterschmitt M.J. Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Oral Venglustat in Patients with Parkinson's Disease and a GBA Mutation: Results from Part 1 of the Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled MOVES-PD Trial / M.J. Peterschmitt [et al] // J. Parkinsons. Dis. – 2022. – Vol. 12. – № 2. – P. 557–570.
 154. Daya S., Berns K.I. Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors / S. Daya, K.I. Berns // Clin. Microbiol. Rev. – 2008. – Vol. 21. – № 4. – P. 583.
 155. Sardi S.P. CNS expression of glucocerebrosidase corrects α -synuclein pathology and memory in a mouse model of Gaucher-related synucleinopathy / S.P. Sardi [et al] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2011. – Vol. 108. – № 29. – P. 12101–12106.
 156. Massaro G. Fetal gene therapy for neurodegenerative disease of infants / G. Massaro [et al] // Nat. Med. – 2018. – Vol. 24. – № 9. P. 1317.
 157. Marshall J. Demonstration of feasibility of in vivo gene therapy for Gaucher disease using a chemically induced mouse model / J. Marshall [et al] // Mol. Ther. – 2002. Vol. 6. – № 2. – P. 179–189.
 158. Sardi S.P. Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies / S.P. Sardi [et al] //

- Proc. Natl. Acad. Sci. – 2013. – Vol. 110. – № 9. –P. 3537–3542.
159. Senkevich K., Rudakou U., Gan-Or Z. New therapeutic approaches to Parkinson's disease targeting GBA, LRRK2 and Parkin / K. Senkevich, U. Rudakou, Z. Gan-Or // *Neuropharmacology*. – 2022. – Vol. 202. – P. 108822.
160. Compain P. Design and Synthesis of Highly Potent and Selective Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher's disease / P. Compain [et al] // *ChemBioChem*. – 2006. – Vol. 7. – № 9. –P. 1356–1359.
161. Lieberman R.L. Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease / R.L. Lieberman [et al] // *Nat. Chem. Biol.* – 2007. – Vol. 3. – № 2. – P. 101–107.
162. Jung O. Progress and potential of non-inhibitory small molecule chaperones for the treatment of Gaucher disease and its implications for Parkinson disease / O. Jung [et al] // *Expert Review of Proteomics*. – 2016. – Vol. 13. – № 5. – P. 471–479.
163. Sawkar A.R. et al. Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S β -glucosidase: A therapeutic strategy for Gaucher disease / A.R. Sawkar [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 99. – № 24. – P. 15428.
164. Luan Z. A Fluorescent sp²-iminosugar with pharmacological chaperone activity for gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies / Z. Luan [et al] // *Chembiochem*. – 2010. – Vol. 11. – № 17. – P. 2453–2464.
165. Luan Z. Chaperone Activity of Bicyclic Nojirimycin Analogues for Gaucher Mutations in Comparison with N-(n-nonyl)Deoxynojirimycin / Z. Luan [et al] // *ChemBioChem*. – 2009. – Vol. 10. – № 17. – P. 2780–2792.
166. Tiscornia G. Neuronopathic Gaucher's disease: induced pluripotent stem cells for disease modelling and testing chaperone activity of small compounds / G. Tiscornia [et al] // *Hum. Mol. Genet.* – 2013. – Vol. 22. – № 4. – P. 633–645.
167. Khanna R. The Pharmacological Chaperone Isofagomine Increases Activity of the Gaucher Disease L444P Mutant Form of β -Glucosidase /R. Khanna [et al] // *FEBS J.* – 2010. – Vol. 277. – № 7. – P. 1618.
168. Richter F. A GCase Chaperone Improves Motor Function in a Mouse Model of

- Synucleinopathy / F. Richter [et al] // *Neurotherapeutics*. – 2014. – Vol. 11. – № 4. – P. 840.
169. Sun Y. Ex Vivo and in Vivo Effects of Isofagomine on Acid β -Glucosidase Variants and Substrate Levels in Gaucher Disease / Y. Sun [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2012. Vol. 287. – № 6. – P. 4275.
170. Mena-Barragán T. Inhibitor versus chaperone behaviour of d-fagomine, DAB and LAB sp2-iminosugar conjugates against glycosidases: A structure–activity relationship study in Gaucher fibroblasts / T. Mena-Barragán [et al] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 121. – P. 880–891.
171. Wauer R.R. The antenatal use of ambroxol (bromhexine metabolite VIII) to prevent hyaline membrane disease: a controlled double-blind study - PubMed / R.R. Wauer [et al] // *Int J Biol Res Pregnancy* . – 1982. – Vol. 3. – № 2. – P. 84–91.
172. Narita A. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study / A. Narita [et al] // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* – 2016. – Vol. 3. – № 3. – P. 200–215.
173. Pawlinski L., Malecki M.T., Kiec-Wilk B. The additive effect on the antiepileptic treatment of ambroxol in type 3 Gaucher patient. The early observation / L. Pawlinsk, M.T. Malecki, B. Kiec-Wilk // *Blood Cells, Mol. Dis.* – 2018. – Vol. 68. – P. 192–193.
174. ClinicalTrials.gov [Electronic resource] // Дата обращения 05.03.2022.
175. Goldin E. High Throughput Screening for Small Molecule Therapy for Gaucher Disease Using Patient Tissue as the Source of Mutant Glucocerebrosidase / E. Goldin [et al] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – № 1. – P. e29861.
176. Rogers S. Discovery, SAR, and Biological Evaluation of Non-inhibitory Chaperones of Glucocerebrosidase / S. Rogers [et al] // *Probe Reports from NIH Mol. Libr. Progr. National Center for Biotechnology Information (US)*. – 2013.
177. Aflaki E. Salicylic acid derivatives useful as glucocerebrosidase activators / E. Aflaki [et al] // *U.S. Patent*. – US2015065469A1. – 2015.
178. Skerlj R.T. Methods of treatment and combination therapies using gcase activator

- heterobicyclic and related compounds / R.T. Skerlj [et al] // U.S. Patent. – WO2017192841A1. –2017.
179. Hilt D.C. LBA8 A Dose Ranging, Placebo-Controlled, 28-Day, Safety and Biomarker Phase 2a Study in GBA-PD Patients with the Selective GCase Activator, LTI-291. In Proceedings of the International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders / D.C. Hilt [et al] // *Mov. Disord. Late-Breaking Abstracts* – 2019. – LBA 8.
180. den Heijer J.M. A randomized single and multiple ascending dose study in healthy volunteers of LTI-291, a centrally penetrant glucocerebrosidase activator / J.M. den Heijer [et al] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2021. – Vol. 87. – № 9. – P. 3561–3573.
181. Mazzulli J.R. Activation of β -glucocerebrosidase reduces pathological α -synuclein and restores lysosomal function in Parkinson's patient midbrain neurons / J.R. Mazzulli [et al] // *J. Neurosci.* – 2016. – Vol. 36. – № 29. – P. 7693–7706.
182. Farfel-Becker T., Vitner E.B., Futerman A.H. Animal models for Gaucher disease research / T. Farfel-Becker, E.B. Vitner, A.H. Futerman // *Dis. Model. Mech.* – 2011. – Vol. 4. – № 6. – P. 746.
183. Farfel-Becker T. Can GBA1-Associated Parkinson Disease Be Modeled in the Mouse? / T. Farfel-Becker [et al] // *Trends Neurosci.* – 2019. – Vol. 42. – № 9. – P. 631–643.
184. Tayebi N. Glucocerebrosidase haploinsufficiency in A53T α -synuclein mice impacts disease onset and course / N. Tayebi [et al] // *Mol. Genet. Metab.* – 2017. – Vol. 122. – № 4. – P. 198.
185. Manning-Boğ A.B., Schüle B., Langston J.W. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: A biological link between Gaucher disease and parkinsonism / A.B. Manning-Boğ, B. Schüle, J.W. Langston // *Neurotoxicology.* – 2009. – Vol. 30. – № 6. – P. 1127–1132.
186. Rocha E.M. Sustained Systemic Glucocerebrosidase Inhibition Induces Brain α -Synuclein Aggregation, Microglia and Complement C1q Activation in Mice / E.M. Rocha [et al] // *Antioxid. Redox Signal.* – 2015. – Vol. 23. – № 6. – P. 550.

187. Saito M., Rosenberg A. The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal beta-glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts. / M. Saito, A. Rosenberg // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol. 260. – № 4. – P. 2295–2300.
188. Pandey M.K., Grabowski G.A. Immunological Cells and Functions in Gaucher Disease / M.K. Pandey, G.A. Grabowski // *Crit. Rev.* – 2013. – Vol. 18. – № 3. – P. 197.
189. Николаев М.А. Макрофаги периферической крови человека как модель изучения дисфункции глюкоцереброзидазы / М.А. Николаев [и др] // *Цитология.* – 2018. – Vol. 12. – № 60. – P. 1022–1028.
190. Hughes A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. / A.J. Hughes [et al] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 1992. – Vol. 55. – № 3. – P. 181.
191. Postuma R.B. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease / R.B. Postuma [et al] // *Mov. Disord.* – 2015. – Vol. 30. – № 12. – P. 1591–1601.
192. Grigor'eva E. V. Generation of induced pluripotent stem cell line, ICGi034-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with Parkinson's disease associated with GBA mutation / E.V. Grigor'eva [et al] // *Stem Cell Res.* – 2022. – Vol. 59. – P. 102651.
193. Grigor'eva E. V. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease / E.V. Grigor'eva [et al] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. № 12. – P. 4437.
194. de Rus Jacquet A. Preparation and Co-Culture of iPSC-Derived Dopaminergic Neurons and Astrocytes / A. de Rus Jacquet [et al] // *Curr. Protoc. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 85. – № 1. – P. e98.
195. Rolfs A. Glucosylsphingosine Is a Highly Sensitive and Specific Biomarker for Primary Diagnostic and Follow-Up Monitoring in Gaucher Disease in a Non-Jewish, Caucasian Cohort of Gaucher Disease Patients / A. Rolfs [et al] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – № 11. – P. e79732.

196. Polo G. Diagnosis of sphingolipidoses: A new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS / G. Polo [et al] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2017. – Vol. 55. – № 3. – P. 403–414.
197. Polo G. Plasma and dried blood spot lysosphingolipids for the diagnosis of different sphingolipidoses: A comparative study / G. Polo [et al] // Clin. Chem. Lab. Med. – 2019. – Vol. 57. – № 12. – P. 1863–1874.
198. Zhang X.K. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry / X. K. Zhang [et al.] // Clinical Chemistry. – 2008. – Vol. 54(10). – P. 1725-1728.
199. Stauffer W., Sheng H., Lim H.N. EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms / W. Stauffer, H. Sheng, H.N. Lim // Sci. Reports 2018 81. –2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1–13.
200. Сенкевич К.А. Молекулярно-генетические и клинические аспекты болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (GBA) // дис. канд. мед. наук: 03.01.04 Биохимия, 14.01.11 Нервные болезни / Сенкевич Константин Алексеевич. – 2018. – 129 с.
201. Wolf P. Tandem mass spectrometry assay of β -Glucocerebrosidase activity in dried blood spots eliminates false positives detected in fluorescence assay / P. Wolf [et al] // Mol. Genet. Metab. – 2018. – Vol. 123. – № 2. – P. 135.
202. Gelb M.H. et al. Comparison of tandem mass spectrometry to fluorimetry for newborn screening of LSDs // Mol. Genet. Metab. Reports. – 2017. – Vol. 12. – P. 80.
203. Liao H.C. Mass Spectrometry but not Fluorimetry Distinguishes Affected and Pseudodeficiencies in Newborn Screening for Pompe Disease / H.C. Liao [et al] // Clin. Chem. – 2017. – Vol. 63. – № 7. – P. 1271.
204. Alcalay R.N. Longitudinal Measurements of Glucocerebrosidase activity in Parkinson's patients / R.N. Alcalay [et al] // Ann. Clin. Transl. Neurol. –2020. – Vol. 7. – № 10. – P. 1816–1830.
205. Omer N. Glucocerebrosidase Activity is not Associated with Parkinson's Disease

- Risk or Severity / N. Omer [et al] // *Mov. Disord.* – 2022. – Vol. 37. – № 1. – P. 190–195.
206. Ortega R.A. Glucocerebrosidase Enzyme Activity in GBA Mutation Parkinson Disease HHS Public Access / R.A. Ortega [et al] // *J Clin Neurosci.* – 2016. – Vol. 28. – P. 185–186.
207. Alcalay R.N. et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations / R.N. Alcalay [et al] // *Brain.* – 2015. – Vol. 138. – № 9. – P. 2648.
208. Avenali M. Evolution of prodromal parkinsonian features in a cohort of GBA mutation-positive individuals: a 6-year longitudinal study / M. Avenali [et al] // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* – 2019. – Vol. 90. – № 10. – P. 1091–1097.
209. Kopytova A.E. Could Blood Hexosylsphingosine Be a Marker for Parkinson's Disease Linked with GBA1 Mutations? / A.E. Kopytova [et al] // *Mov. Disord.* – 2022. – Vol. 37(8). – P. 1779-1781.
210. Marie G. Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes / G. Marie [et al] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290. – № 5. – P. 2969–2982.
211. Fredriksen K. Pathological α -syn aggregation is mediated by glycosphingolipid chain length and the physiological state of α -syn in vivo / K. Fredfiksien [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. NLM (Medline).* – 2021. – Vol. 118. – № 50. – P. e2108489118.
212. Galper J. Lipid pathway dysfunction is prevalent in patients with Parkinson's disease / J. Galper [et al] // *Brain.* – 2022. – Vol. 145. – № 10. – P. 3472–3487.
213. Lerche S. The Mutation Matters: CSF Profiles of GCase, Sphingolipids, α -Synuclein in PD GBA / S. Lerche [et al] // *Mov. Disord.* – 2021. – Vol. 36. – № 5. – P. 1216–1228.
214. Esfandiary A. Clinical Sphingolipids Pathway in Parkinson's Disease: From GCase to Integrated-Biomarker Discovery / A. Esfandiary [et al] // *Cells.* – 2022. – Vol. 11. – № 8. – P. 1353.
215. Usenko T.S. Impaired Sphingolipid Hydrolase Activities in Dementia with Lewy

- Bodies and Multiple System Atrophy / T.S. Usenko [et al] // *Mol. Neurobiol. Mol Neurobiol.* – 2022. – Vol. 59. – № 4. – P. 2277–2287.
216. Oizumi H. Plasma sphingolipid abnormalities in neurodegenerative diseases / H. Oizumi [et al.] // *PLoS One.* – 2022. – Vol. 17. – № 12. – P. e0279315.
217. Малахова А.А. Линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi023-A, полученная от пациента с полиморфизмами в генах LRRK2 И PINK1, ассоциированными с болезнью Паркинсона / А.А. Малахова [и др] // *ОНТОГЕНЕЗ.* – 2023. – Vol. 54. – № 1. – P. 96–104.
218. Ivanova M.M. Cellular and biochemical response to chaperone versus substrate reduction therapies in neuropathic Gaucher disease / M.M. Ivanova [et al] // *PLoS One.* – 2021. – Vol. 16. – № 10. – P. e0247211.
219. Panicker L.M. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease / L.M. Panicker [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. Proc Natl Acad Sci U S A,* 2012. – Vol. 109. – № 44. – P. 18054–18059.
220. Panicker L.M. Gaucher iPSC-derived macrophages produce elevated levels of inflammatory mediators and serve as a new platform for therapeutic development / L.M. Panicker [et al] // *Stem Cells.* – 2014. – Vol. 32. – № 9. – P. 2338–2349.
221. Awad O. Altered TFEB-mediated lysosomal biogenesis in Gaucher disease iPSC-derived neuronal cells / O. Award [et al] // *Hum. Mol. Genet.* – 2015. Vol. 24. – № 20. – P. 5775–5788.
222. Sun Y. Properties of Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Gaucher Disease Type 2 Patient Fibroblasts: Potential Role in Neuropathology / Y. Sun [et al] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. e0118771.
223. Aflaki E. A characterization of Gaucher iPSC-derived astrocytes: Potential implications for Parkinson’s disease / E. Aflaki [et al] // *Neurobiol. Dis.* – 2020. – Vol. 134. – P. 104647.
224. Yang S.Y. Ambroxol reverses tau and α -synuclein accumulation in a cholinergic N370S GBA1 mutation model / S.Y. Yang [et al] // *Hum. Mol. Genet. Hum Mol Genet.* – 2022. – Vol. 31.– № 14. – P. 2396–2405.

225. Копытова А.Э. Таргетная терапия болезни Паркинсона / А.Э. Копытова [и др] // Бюллетень Национального общества по изучению болезни Паркинсона и расстройств движений. – 2022. – Vol. 2. – P. 103–110.
226. Kopytova A.E. Potential binding sites of pharmacological chaperone NCGC00241607 on mutant β -glucocerebrosidase and its efficacy on patient-derived cell cultures in Gaucher and Parkinson's disease / A.E. Kopytova [et al] // Int. J. Mol. Sci. – 2023. – № 24.

Приложение А

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

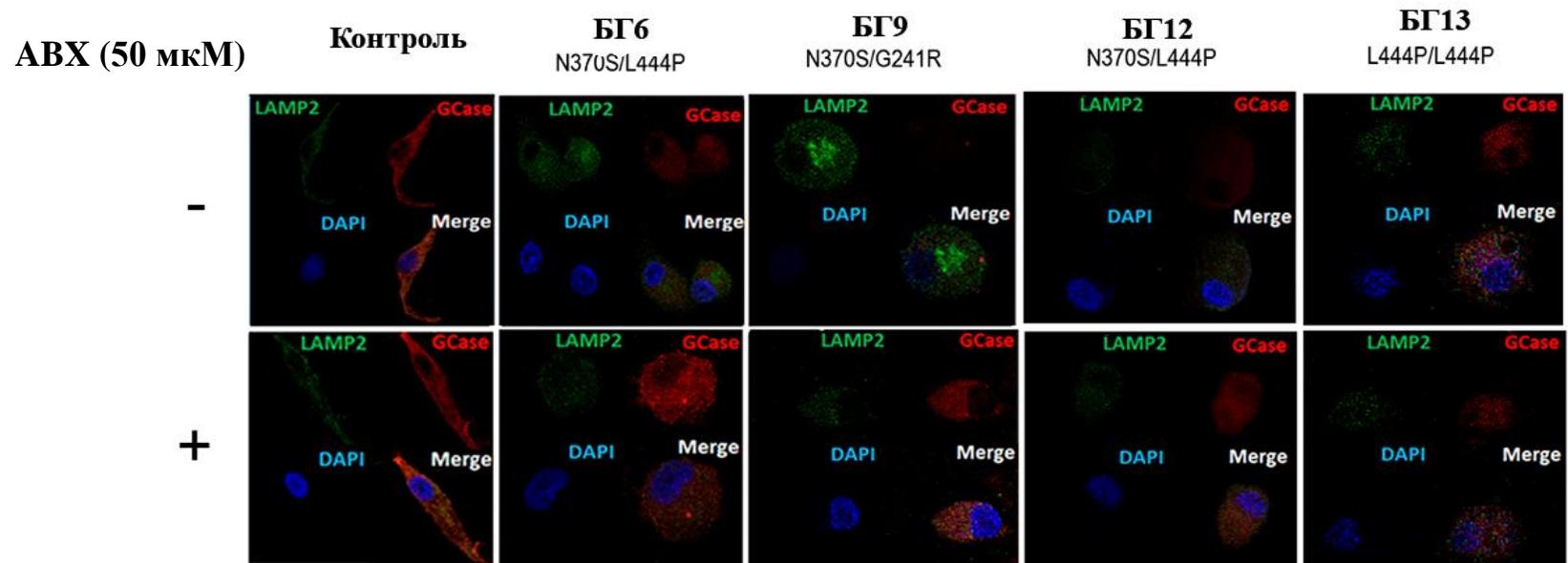


Рисунок 1 — Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы до и после воздействия ФШ амброксол (ABX) с помощью антител, специфичным к LAMP2 (зеленый), GCase (красный), ядру (синий). Изображения получены с помощью конфокального микроскопа. Для каждого изображения представлены сигналы по отдельным каналам и изображения с совмещенными сигналами

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

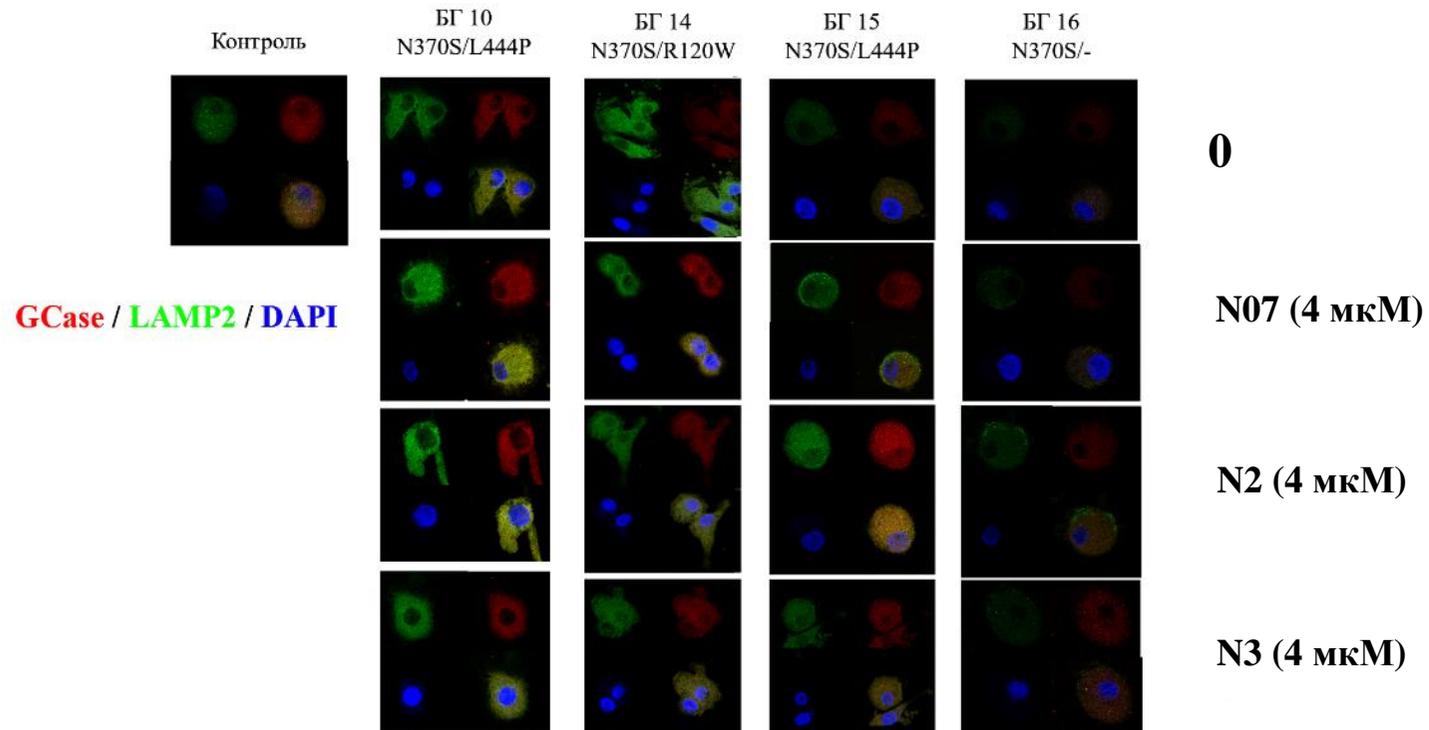


Рисунок 2 — Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток первичной культуры макрофагов пациентов с БГ и лиц контрольной группы в присутствии ФШ N07 и его модификаций – N2 и N3 (4 мкМ) с помощью антител, специфичным к LAMP2 (зеленый), GCCase (красный), ядру (синий). Изображения получены с помощью конфокального микроскопа. Для каждого изображения представлены сигналы по отдельным каналам и изображения с совмещенными сигналами