

На правах рукописи

**УСЕНКО Татьяна Сергеевна**

**Апоптоз лимфоцитов периферической крови  
у пациентов с болезнью Паркинсона,  
ассоциированной с мутациями  
в генах *LRRK2* и *GBA***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург  
2012

Работа выполнена в Отделении молекулярной и радиационной биофизики Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова», Санкт-Петербург.

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Пчелина Софья Николаевна**,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова».

**Официальные оппоненты:** **Корнилова Елена Сергеевна**,  
доктор биологических наук, профессор,  
Институт цитологии РАН,

**Горбунова Виктория Николаевна**,  
доктор биологических наук, профессор,  
Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта РАМН».

Защита состоится «25» мая 2012 г. в 12 часов на заседании Диссертационного совета Д. 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Адрес электронной почты института: [cellbio@mail.cytspb.rssi.ru](mailto:cellbio@mail.cytspb.rssi.ru)

Факс института: 8 (812) 297-35-41.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан «\_\_» апреля 2012 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность проблемы*

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание. Средний возраст начала заболевания составляет 55 лет. В большинстве развитых стран в возрасте старше 65 лет БП страдает до 2 % населения. При этом в настоящее время в 20 % случаев начало заболевания приходится на трудоспособный возраст – до 50 лет. В большинстве случаев заболевание носит спорадический характер. Однако, по разным данным, около 10–15 % случаев с БП имеют семейную форму (Скоромец и др., 2005). Развитие симптомов (ригидность мускулатуры, тремор, брадикинезия, нарушение позы) коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции мозга, приводя к снижению концентрации дофамина в полосатом теле. Следует отметить, что симптомы БП проявляются при гибели 50–80 % дофаминергических нейронов черной субстанции мозга человека. В настоящее время механизм нейродегенерации остается неизвестным. Несмотря на интенсивное развитие различных подходов к терапии БП, включая направление клеточной терапии заболевания (Кожухарова и др., 2010), не существует лекарственных средств, способных остановить или замедлить процесс нейродегенерации. Выяснение механизма гибели дофаминергических нейронов при БП является важной задачей не только для понимания общего патогенеза заболевания, но и для разработки превентивной терапии.

Нарушение регуляции программируемой клеточной гибели (апоптоза) дофаминергических нейронов черной субстанции рассматривается как один из возможных механизмов их гибели при БП. Признаки апоптоза обнаруживаются как при исследовании аутопсатов пациентов с БП, так и в экспериментах, выполненных на модельных животных (Yamada *et al.*, 2010). Следует, однако, отметить, что не все исследования аутопсийного материала мозга пациентов с БП выявляют морфологические признаки апоптоза. Таким образом, вопрос о механизме гибели нейронов черной субстанции при БП остается открытым. В частности, не исключается возможность участия факторов воспаления и аутофагии (Levy *et al.*, 2009).

Одним из подходов к выявлению механизмов нейродегенерации при БП является исследование моногенных форм заболевания с известной этиологией. Сегодня известно пять генов, мутации в которых приводят к развитию БП: альфа-синуклеин (*SNCA*), паркин (*PARK2*), *DJ-1*, *PINK1* и обогащенная лейциновыми повторами киназа 2 (*LRRK2*) (Nuytemans *et al.*, 2010). Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) ассоциированы с высоким риском развития БП (Hardy, 2010). Механизм патогенеза БП, ассоции-

рованной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, остается неизвестным. При этом исследования *in vitro* предполагают вовлеченность *LRRK2* в генерацию апоптоза (Ho *et al.*, 2009; Iaccarino *et al.*, 2007). Мутации в гене *GBA* приводят к накоплению глюкоцереброзида в лизосомах, последующей дисфункции лизосом, что в свою очередь нарушает деградацию белков и нормальное функционирование клеток (Mazzulli *et al.*, 2011). Остается неизвестным, влияет ли наличие мутаций в генах *LRRK2* и *GBA* на индукцию апоптоза у пациентов с БП.

Изложенные выше данные явились основанием для проведения настоящего исследования.

#### **Цель исследования**

Целью данной работы явились исследования влияния мутаций в генах *LRRK2* и *GBA* у пациентов с БП на апоптоз лимфоцитов периферической крови.

#### **Задачи исследования**

1. Определение частоты мутаций A1226G (N370S) и T1448C (L444P) в гене *GBA* у пациентов с БП в Северо-Западном регионе России.
2. Сопоставление клинического течения БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* и БП отличной этиологии.
3. Оценка уровня спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови в группах пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, со спорадической формой БП и в контроле.
4. Анализ уровня мРНК генов *FAS* и *BCL-2* в группах пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП, со спорадической формой БП и в контроле.
5. Оценка активации каспазы 8 и каспазы 9 при спонтанном апоптозе лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП и в контроле.

#### **Научная новизна**

Впервые у пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, исследован спонтанный и индуцированный апоптоз лимфоцитов периферической крови. Выявлено повышение спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*. Впервые показано увеличение экспрессии гена *FAS* в лимфоцитах периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с группой пациентов со спорадической БП и контролем. Впервые исследована активация каспазы 8 и каспазы 9 в лимфоцитах периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциирован-

ной БП. Показана преимущественная активация каспазы 9 лимфоцитов периферической крови при спонтанном апоптозе у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контролем.

#### ***Практическая значимость работы***

Изучение механизма нейродегенерации при моногенных формах БП, в частности при БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*, позволит ближе подойти к пониманию патогенеза более распространенных спорадических форм БП. Полученные данные представляют интерес для понимания молекулярных основ патогенеза БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*. Выявленная высокая частота БП, ассоциированной с мутацией T1448C (L444P) в гене *GBA*, среди пациентов с ранней формой БП указывает на необходимость скрининга этой мутации среди пациентов с БП и членов их семей с целью формирования групп высокого риска развития БП.

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

1. Мутации гена *GBA* (L444P и N370S) играют важную роль в формировании предрасположенности к развитию БП в Северо-Западном регионе России. Наличие мутации L444P в значительной мере обуславливает риск развития БП в возрасте до 50 лет.

2. Повышение уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови не зависит от этиологии БП и выявляется как у пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, так и в группе пациентов со спорадической формой заболевания.

3. Лимфоциты пациентов с БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*, характеризуются усилением спонтанного апоптоза и стабильным повышенным уровнем мРНК гена *FAS*.

4. Прием умеренных доз Л-ДОФА-содержащих препаратов (до 250 мг/сут) ассоциирован с уменьшением уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов со спорадической формой БП.

#### ***Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации***

Осмотр пациентов, забор у них периферической крови осуществлялся д. м. н., профессором А. Ф. Якимовским. Скрининг мутаций в гене *GBA* среди пациентов с БП проведен автором лично. Оценка спонтанного и индуцированного апоптоза в лимфоцитах периферической крови пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, пациентов со спорадической формой БП и в контроле проведена автором лично. Оценка активации каспазы 8 и каспазы 9, уровня мРНК генов *FAS*, *BCL-2* в лимфоцитах периферической крови пациентов с БП, обусловленной мутациями гена

*LRKK2*, пациентов со спорадической формой БП и в контроле проведена автором лично. Автор провел статистический анализ всех полученных данных и сформулировал выводы. Описание собственных исследований, анализ и обсуждение результатов выполнены автором самостоятельно. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

#### ***Апробация работы***

Предложенные к защите результаты были доложены на 14-й международной Пушкинской школе-конференции молодых ученых (Пушино, 2010); Европейской конференции по генетике человека (Гетеборг, Швеция, 2010); 14-м конгрессе европейской федерации неврологических ассоциаций (Женева, Швейцария, 2010); VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010); 15-м конгрессе Европейской федерации неврологических ассоциаций (Будапешт, Венгрия, 2011), 24-м конгрессе Европейской коллегии по нейропсихофармакологии (Париж, Франция, 2011); II конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений (Москва, 2011), IV Международном молодежном медицинском конгрессе (Санкт-Петербург, 2011).

#### ***Публикации***

Результаты диссертационной работы отражены в 12 печатных работах соискателя, в том числе опубликованы в 4 статьях, из них 3 – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ соискателям ученой степени кандидата биологических наук.

#### ***Структура и объем диссертации***

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 129 страницах машинописного текста, иллюстрирована 15 таблицами, 19 рисунками и фотографиями. Список литературы включает 259 наименований, из них 240 – зарубежные публикации.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

#### **Характеристика обследованных групп**

В исследование вошло 330 пациентов (средний возраст  $63,8 \pm 9,8$  года, средний возраст начала заболевания  $49 \pm 10,9$  года, 180 женщин и 150 мужчин) с четкой симптоматикой, установленным диагнозом БП с отсутствием других нейродегенеративных заболеваний головного мозга.

Критериями отбора служило сочетание хотя бы двух фенотипических проявлений, характерных для БП: гипокинезия, ригидность, тремор покоя, постуральная неустойчивость.

Контрольная группа состояла из 240 индивидуумов (средний возраст  $67,7 \pm 8,8$  года), состоящих на учете в Санкт-Петербургском городском гериатрическом центре. Все члены контрольной группы проходили обследование у невролога с целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний. Данная выборка является случайной и принадлежит к тому же географическому региону, что и включенная в анализ группа лиц с БП. Включенная в исследование группа пациентов не отличалась от контрольной группы по половому и возрастному составу.

Во всех обследованных группах был осуществлен забор крови для последующего проведения молекулярно-генетического анализа и создания банка лимфоцитов периферической крови. Данная работа одобрена этическим комитетом СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова.

#### **Методы исследования**

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции. Однонуклеотидные замены в гене *GBA*, приводящие к аминокислотным заменам N370S и L444P, идентифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и рестрикционного анализа, как описано ранее (Aharon-Peretz *et al.*, 2004).

Лимфоциты выделяли из периферической крови методом градиентного центрифугирования при 1 600 об/мин в растворе Фиколла ( $\rho = 1,077$ , БиоЛот, Санкт-Петербург). Тотальная РНК была выделена с использованием набора для выделения РНК AquaPure RNA Isolation Kit (Bio-Rad Laboratories, 94547, США) или RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104, США). кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США) или iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва).

Определение уровня мРНК генов *FAS* и *BCL-2* проводилось методом количественной ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе ABI7000 Prism (Applied Biosystems, США). В качестве референс-гена использовали ген *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein (G белок)). В экспериментах были использованы разработанные нами олигонуклеотидные праймеры и зонды, синтезированные фирмой «Синтол», Москва.

При исследовании апоптоза лимфоцитов периферической крови клетки ресуспендировали в культуральной среде (RPMI-1640, 10%-я фетальная сыворотка, 5 мкг/мл антибиотика (пенициллин G, стрептомицин). Для индукции апоптоза в питательную среду добавляли 2-дезоксид-рибозу

(DRib) до конечной концентрации 10 ммоль. Клеточную суспензию распределяли в лунки на плашке по  $2 \times 10^6$  клеток в каждую лунку. Клетки культивировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) в течение 48 ч. Количество клеток, вошедших в апоптоз, определяли методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора FITC ANNEXIN V APOPTOSIS DETECTION KIT1 (BD Pharmingen, США) на проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США).

Активацию каспазы 8 и каспазы 9 оценивали методом вестерн-блоттинга с использованием антител (1:1000, Santa-Cruz Biotechnology inc, США, sc-7890 и 1:500, Santa-Cruz Biotechnology Inc, США, sc-7885 соответственно). Результаты нормировали относительно окрашивания бета-актина (1:5000, Abscam, Великобритания). Лимфоциты лизировали, количество общего белка определяли по методу Лоури с использованием соответствующего набора (Синтакон, Россия) на спектрофотометре SmartСпекТМPlus (BioRad, США). В экспериментах использовали следующие «вторичные антитела»: для каспазы 8, каспазы 9 и бета-актина – „goat anti-rabbit” IgG-H&L (HRP) 1:3000, Abscam, Великобритания. Результаты идентифицировали с использованием набора Lumigen<sup>TM</sup>PS-3 (GE Healthcare UK Limited, Великобритания) и фотопленки KODAK BioMax.

Статистический анализ был проведен с использованием программы SPSS, версия 17.0. Для сравнения распределения генотипов между группами был использован критерий  $\chi^2$ . Отношение шансов (OR) рассчитывали с 95%-м доверительным интервалом (CI) по формуле

$$OR = a/b \times d/c,$$

где a и b – количество больных, имеющих и не имеющих мутантный аллель, c и d – количество человек контрольной группы, имеющих и не имеющих мутантный аллель, соответственно. Границы доверительного интервала вычисляли по формулам

$$OR_{\min} = OR^{(1-1,96/\sqrt{\chi^2})} \text{ и } OR_{\max} = OR^{(1+1,96/\sqrt{\chi^2})},$$

где  $\chi^2 = ((a \times d - b \times c) - 0,5 n)^2 \times (n - 1)/(n_0 \times n_1 \times m_0 \times m_1)$ ;  $n_1 = a + b$ ;  $n_0 = c + d$ ;  $m_1 = a + c$ ;  $m_0 = b + d$ ;  $n = n_1 + n_0 + m_1 + m_0$ .

Сравнение полученных значений между отдельными группами предполагало использование непараметрического критерия Крускала–Уоллеса для K-независимых выборок. В случае обнаружения значимых различий проводилось последующее попарное сравнение вариационных рядов исследуемых групп с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни для двух независимых выборок. Значения  $p < 0,05$  считались статистически значимыми. Средние величины приведены со стандартной ошибкой среднего.



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Частота мутаций A1226G (N370S) и T1448C (L444P) в гене GBA у пациентов с БП

Гомозиготное носительство мутаций в гене *GBA* приводит к развитию редкой патологии, относящейся к болезням обмена – болезни Гоше. Увеличение риска развития БП в 5–6 раз для гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* показано для различных популяций. В ряде популяций в спектре мутаций гена *GBA* выявляются мажорные мутации – A1226G (N370S) и T1448C (L444P) (Velayati *et al.*, 2010). Эти же мутации преобладают в спектре мутаций гена *GBA* среди пациентов с болезнью Гоше в России, составляя 45 и 23 % мутантных аллелей соответственно (Букина и др., 2005). В настоящем исследовании проведен скрининг мутаций T1448C (L444P) и A1226G (N370S) среди 330 пациентов с БП и 240 лиц контрольной группы. Полученные частоты указаны в табл. 1.

Таблица 1

Частоты мутаций A1226G (N370S) и T1448C (L444P) у пациентов с БП и в контрольной группе

Мутации в гене <i>GBA</i>	Пациенты с БП (N = 330)	Пациенты с ранним началом заболевания ( $\leq 50$ лет) (N = 85)	Пациенты с семейной формой (N = 100)	Контрольная группа (N = 240)
L444P	6 (1,8 %)	5 (5,9 %) 14,9 (2,9–77,0) p = 0,001*	3 (3,0 %) 7,4 (0,4–156,9) p = 0,044*	1 (0,4 %)
N370S	3 (0,9 %)	0	0	0
L444P+ N370S	9 (2,7 %) 6,7 (1,05–42,4) p = 0,038*	–	–	–

\* Отношение шансов (95%-й доверительный интервал), p – значение достоверности.

Нами выявлено 9 носителей мутаций гена *GBA* в гетерозиготном состоянии среди пациентов с БП (6 – мутации L444P и 3 – мутации N370S) и 1 носитель мутации L444P в контрольной группе. Риск развития БП для носителей мутаций L444P и N370S составил 6,7. В подгруппе пациентов с БП с ранним началом (начало заболевания до 50 лет включительно), а также среди пациентов с семейной формой БП была выявлена только мутация L444P. Риск развития семейных форм БП для носителей мутации L444P

возрастал более чем в 7 раз, а риск развития БП с ранним началом – в 15 раз (Emelyanov *et al.*, 2012). В нашей выборке пациентов с БП мутация L444P встречалась чаще, чем мутация N370S, что соответствовало результатам, полученным ранее в зарубежных исследованиях для популяций, отличных от популяции евреев ашкенази. Повышенный риск развития БП для носителей анализируемых мутаций в гетерозиготном состоянии был ранее выявлен в ряде популяций, включая Италию, Бразилию, Китай, а также среди евреев ашкенази (Velayati *et al.*, 2010). Во всех цитируемых исследованиях риск развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* возрастал примерно в 5 раз, что сопоставимо с 6-кратным увеличением риска развития БП, полученным нами для носителей мутаций гена *GBA* в настоящем исследовании.

Клиническое течение БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA*, не отличалось от клинического течения БП с отсутствием мажорных мутаций в этом гене (также с отсутствием мутаций в гене *LRRK2*). В нашем исследовании частота мутации L444P была максимальна среди пациентов с началом заболевания до 50 лет. Интересно, что мутация N370S выявлена нами только у пациентов с началом заболевания в возрасте старше 50 лет. Возможно, это объясняется тем, что при аминокислотной замене N370S остаточная активность фермента глюкоцереброзидазы выше, благодаря чему этот вариант ассоциирован с мягким течением заболевания у пациентов с болезнью Гоше, в то время как вариант L444P в гомозиготном состоянии ассоциирован с тяжелой неврологической формой заболевания (Gupta *et al.*, 2011).

#### **Апоптоз лимфоцитов периферической крови**

Уровень спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови определяли у четырех пациентов с мутациями в гене *LRRK2* (группа БП-LRRK2: 3 пациента с мутацией G2019S, 1 – с мутацией V1613A), у двух пациентов с мутациями в гене *GBA* (группа БП-GBA: 1 – с мутацией L444P, 1 – с мутацией N370S), у 9 пациентов со спорадической формой БП (сБП) и в контрольной группе, состоящей из 9 человек с отсутствием неврологических заболеваний, через 1, 24 и 48 ч при инкубации лимфоцитов *in vitro* методом проточной цитофлуорометрии с двойным флуоресцентным окрашиванием клеток с аннексином V (Annexin V-FITC) и пропидиум-йодидом (PI). У лиц со спорадической формой БП было исключено наличие наиболее распространенных мутаций в генах *LRRK2* и *GBA* (мутации G2019S, R1441C/G/H, I2020T, I2012T, V1613A и L444P, N370S соответственно).

### Спонтанный апоптоз

Нами выявлено достоверное увеличение уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови во всех исследуемых группах пациентов с БП (табл. 2). У пациентов с мутациями в гене *GBA* усиление спонтанного апоптоза наблюдалось через 1 ч культивирования ( $p = 0,03$ ), в группе пациентов с мутациями в гене *LRRK2* – через 24 и 48 ч ( $p < 0,02$ ,  $p < 0,03$  соответственно), у пациентов со спорадической формой БП – через 24 ч ( $p = 0,007$ ) (Усенко и др., 2012). В качестве примера на рис. 1 представлены цитограммы, полученные при исследовании апоптоза лимфоцитов пациента с мутацией G2019S *LRRK2* и индивидуума контрольной группы

Таблица 2

Уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов в исследуемых группах

Группы		Уровень апоптоза лимфоцитов, %		
		1	24	48
БП-LRRK2	n = 4	6,2 ± 4,5	9,9 ± 3,3 p = 0,02	10,3 ± 3,1 p = 0,03
GBA	n = 2	10,4 ± 2,4 p = 0,03	7,1 ± 3,7	8,9 ± 0,6
сБП	n = 9	4,4 ± 2,4	8,9 ± 3,2 p = 0,007	8,4 ± 2,9
Контроль	n = 9	3,3 ± 2,0	4,8 ± 2,4	6,4 ± 3,3

p – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями в контроле.

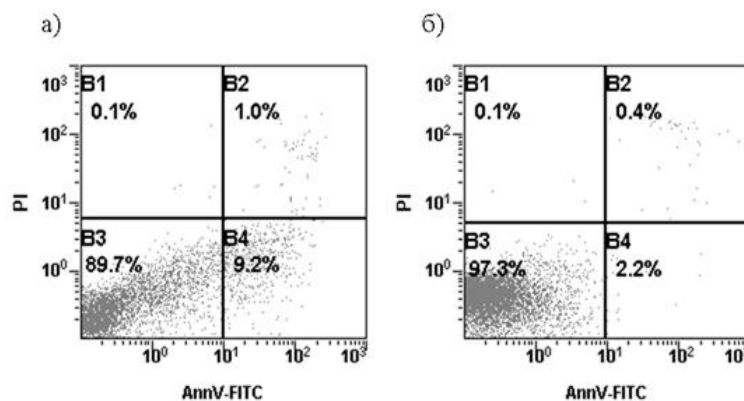


Рис. 1. Пример цитограмм спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациента с мутацией G2019S *LRRK2* (а) и контроля (б). Правый нижний квадрат – клетки, находящиеся на ранних стадиях апоптоза (Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>). Правый верхний квадрат – поздний апоптоз (Annexin-V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>)

### **Индуцированный апоптоз**

В нашем эксперименте уровень индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови достоверно возрастал во всех исследованных группах по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза через 48 ч культивирования лимфоцитов в стандартных условиях с индуктором 2-дезоксид-рибозой ( $p < 0,05$ ). Однако степень индукции была различной. Уровень апоптоза возрастал: в группе БП-LRRK2 – в 3,1 раза, в группе БП-GBA – в 2,9 раза, в группе сБП – в 4,9 раза и в контрольной группе – в 6,2 раза. Таким образом, лимфоциты пациентов с наследственными формами БП (мутации в генах *LRRK2* и *GBA*) проявляли наименьший ответ на индукцию апоптоза. При этом достоверных различий между группами в уровне индуцированного апоптоза не наблюдалось.

Нами впервые исследован уровень спонтанного и индуцированного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*. Ранее повышенный апоптоз лимфоцитов был выявлен у пациентов с мутациями в гене *SNCA* (Battisti *et al.*, 2007). В цитируемое исследование были включены два сибса с мутацией A53T. Достоверные различия в количестве клеток, вошедших в апоптоз, между пациентами и контрольной группой наблюдались через 24, 48 и 72 ч при инкубации лимфоцитов как с индуктором апоптоза (10 ммоль 2-дезоксид-рибозы), так и без него. При этом интересно, что индукция апоптоза происходила значительно сильнее в контроле, чем у пациентов с мутацией в гене *SNCA*, что полностью согласуется с полученными нами данными о менее выраженной индукции апоптоза у пациентов с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*. Суммируя полученные результаты, можно сделать вывод о том, что пациенты с БП, обусловленной мутациями в генах *SNCA*, *LRRK2* и *GBA*, имеют повышенный уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов, но большую «сопротивляемость» окислительному стрессу, вызванному присутствием 2-дезоксид-рибозы.

В настоящем исследовании нами получены данные об усилении спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов со спорадической формой БП по сравнению с контролем. Ранее аналогичные результаты получены в работах отечественных и зарубежных исследователей (Calora *et al.*, 2010; Внуков и др., 2011). Полученные нами результаты, а также данные зарубежных исследователей свидетельствуют об усилении апоптоза лимфоцитов периферической крови при БП.

Как показано в настоящем исследовании, повышенный спонтанный апоптоз лимфоцитов наблюдается при различных формах БП, т. е. не зависит от этиологии заболевания. Предполагается, что выявленный повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов

с БП может отражать усиленную индукцию апоптоза в нейронах мозга и вносить вклад в патогенез заболевания.

### **Влияние Л-ДОФА-терапии на уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов крови**

Нами проведена оценка влияния приема L-дигидроксифенилаланин-содержащих препаратов (Л-ДОФА-препаратов) на спонтанный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов со sporadic БП и у пациентов с БП, ассоциированной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*. В нашем исследовании группа пациентов со sporadic БП в зависимости от приема Л-ДОФА-содержащих препаратов была разделена на 2 группы: пациенты, принимающие (n = 4) и не принимающие Л-ДОФА-содержащие препараты (n = 5). Группа пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, была разделена также на 2 группы: пациенты, принимающие (n = 4) и не принимающие Л-ДОФА-содержащие препараты (n = 2).

Таблица 3

#### **Уровень спонтанного апоптоза у пациентов со sporadic БП и в контроле**

Группа	Количество лимфоцитов, вошедших в апоптоз, %		
	1	24	48
Время культивирования, ч			
Пациенты со сБП, не принимающие препараты Л-ДОФА (n = 5)	5,2 ± 3,1	9,8 ± 2,9 p1 = 0,009 p2 = 0,05	8,9 ± 3,8
Пациенты со сБП, принимающие препараты Л-ДОФА (n = 4)	3,4 ± 0,7	6,8 ± 1,7	7,7 ± 1,4
Контроль (n = 9)	3,3 ± 2,0	4,8 ± 2,4	6,4 ± 3,3

p1 – по сравнению с контролем;

p2 – по сравнению с пациентами, принимающими препараты Л-ДОФА.

Через 24 ч инкубации лимфоцитов в стандартных условиях был выявлен повышенный спонтанный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов со sporadic БП, не принимающих Л-ДОФА-терапию, в сравнении как с контрольной группой (p < 0,01), так и с пациентами, получающими препараты Л-ДОФА (p < 0,05) (табл. 3) (Пчелина и др., 2012). В то же время у пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, не было выявлено влияние Л-ДОФА препаратов на уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови. Калопа (Calopa) и соавторы также отмечали снижение апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов, принимающих препараты Л-ДОФА, по сравнению с пациентами, не получающими препараты этой группы (Calopa *et al.*,

2010). Напротив, в исследовании Шефера (Schaefer) и соавторов сообщается о том, что прием Л-ДОФА-препаратов может вызывать индукцию проапоптотных белков (Schaefer *et al.*, 2008). Исследования *in vitro* показали зависимость от дозы влияния Л-ДОФА на апоптоз лимфоцитов: высокие концентрации усиливали апоптоз лимфоцитов, а низкие, напротив, замедляли (Colombo *et al.*, 2003).

В нашем исследовании все пациенты со спорадической БП получали лечение низкими дозами Л-ДОФА-препаратов (200–400 мг/сут), что может объяснять наблюдаемое снижение уровня апоптоза лимфоцитов в данной группе и отсутствие влияния на уровень апоптоза в группе пациентов с БП, обусловленной мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*.

### Маркеры апоптоза

К наиболее важным регуляторам апоптоза относятся индукторы гибели клетки, в частности поверхностный рецептор Fas (CD95, APO-1), и белки семейства Bcl-2, ингибирующие апоптоз. Fas относится к классу рецепторов TNF/NGF и является поверхностным белком, который содержит одиночную трансмембранную область и индуцирует гибель клеток путем связывания Fas с Fas-лигандом и активации рецепторного пути апоптоза. Bcl-2 регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны, предотвращая высвобождение цитохрома С из митохондрий и ингибируя митохондриальный путь апоптоза.

### Уровень мРНК генов *FAS* и *BCL-2* в лимфоцитах периферической крови

Уровень мРНК генов *FAS* и *BCL-2* определяли в лимфоцитах периферической крови у 6 пациентов с мутациями в гене *LRRK2* (БП-*LRRK2*): 5 пациентов с мутацией G2019S, 1 – с мутацией V1613A, у 6 пациентов со спорадической БП (сБП) и у 10 индивидуумов контрольной группы (контроль 1). Длительное наблюдение пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП в СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова позволило осуществить повторный забор периферической крови у 4 из 6 пациентов (3 пациента с мутацией G2019S, 1 – с мутацией V1613A) и оценить уровень мРНК гена *FAS* у носителей мутаций гена *LRRK2* с интервалом в три года. В исследования вошла вновь сформированная контрольная группа (контроль 2), состоящая из 9 индивидуумов. Все исследуемые группы были сопоставимы по возрасту и полу. Исследования, проведенные в 2007 году, выявили повышение уровня мРНК гена *FAS* лимфоцитов периферической крови в группе БП-*LRRK2* по сравнению как с группой сБП ( $p = 0,001$ ), так и с контрольной группой ( $p < 0,05$ ) (рис. 2а). При этом различий в уровне мРНК гена *BCL-2* между исследуемыми группами не наблюдалось. В исследовании

2010 года измерение уровня мРНК гена *FAS* проводилось через 1 ч при культивировании лимфоцитов периферической крови в стандартных условиях (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Нами было выявлено статистически значимое увеличение уровня мРНК гена *FAS* лимфоцитов крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,03$ ) (рис. 2б). Таким образом, было выявлено стабильное увеличение экспрессии гена *FAS* у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (Усенко и др., 2012).

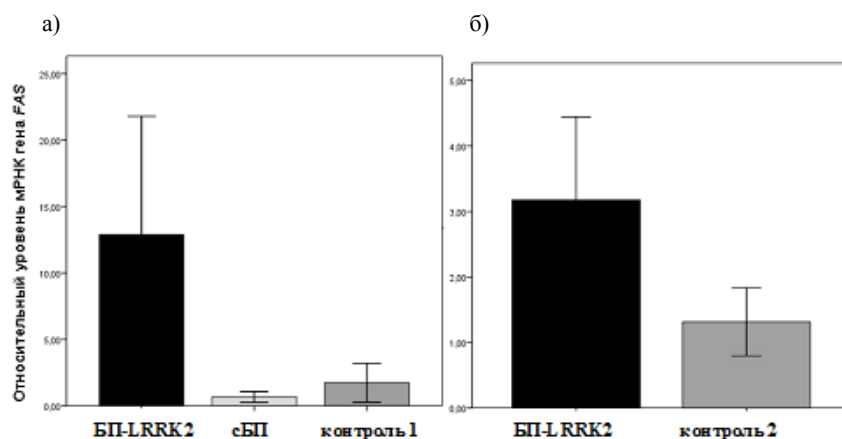


Рис. 2. Относительный уровень мРНК гена *FAS*: а) Относительный уровень мРНК гена *FAS* лимфоцитов периферической крови ( $\pm$ SE) в трех группах: пациенты с *LRRK2*-ассоциированной БП ( $n = 6$ ), со сБП ( $n = 12$ ) и контроль 1 ( $n = 10$ ); б) Относительный уровень мРНК гена *FAS* в лимфоцитах периферической крови ( $\pm$ SE) в группе пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (БП-*LRRK2*) и контроль 2 ( $n = 9$ ). Ось абсцисс – исследуемые группы; ось ординат – относительный уровень мРНК (относительные единицы)

#### Активация каспазы 8 и каспазы 9

При индукции двух сигнальных путей апоптоза происходит протеолитическая активация специфических ферментов – каспаз. При индукции рецепторного пути происходит активация каспазы 8, при запуске митохондриального пути апоптоза – активация каспазы 9.

Оценка активации каспазы 8 и каспазы 9 лимфоцитов периферической крови была проведена с использованием метода вестерн-блоттинга у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП ( $n = 2$ , средний возраст  $66 \pm 12$  лет, 1 муж., 1 жен., оба носители мутации G2019S) и лиц контрольной группы ( $n = 4$ , средний возраст  $68 \pm 7$  лет, 1 муж., 3 жен.).

Нами выявлено нарастание уровня активированной каспазы 8 при культивировании лимфоцитов периферической крови в стандартных условиях в течение 48 ч у двух пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП и в контрольной группе (рис. 3).

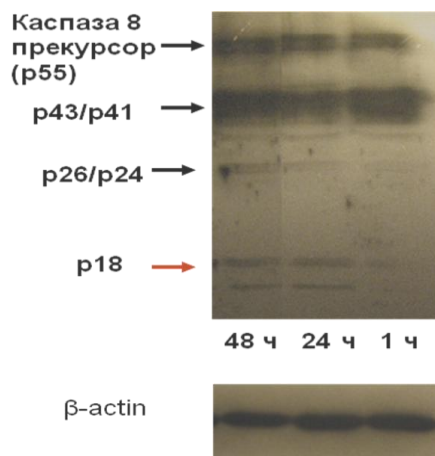


Рис. 3. Результаты вестерн-блоттинга по выявлению активации каспазы 8. Носитель мутации G2019S в гене *LRRK2* через 1, 24 и 48 ч культивирования

Активацию каспазы 8 лимфоцитов периферической крови у пациентов и лиц контрольной группы оценивали по наличию фрагмента с молекулярной массой 18 кДа через 24 ч инкубации лимфоцитов в стандартных условиях. При этом наблюдали активацию каспазы 8 как у обоих пациентов с БП, ассоциированной с мутацией в гене *LRRK2* (G2019S), так и у всех индивидуумов контрольной группы (рис. 4).

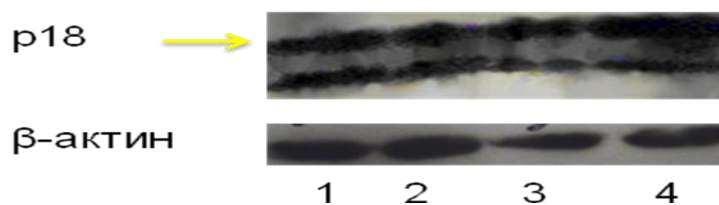


Рис. 4. Результаты вестерн-блоттинга по выявлению активации каспазы 8: 1, 2 – контроль, 3, 4 – носитель мутации G2019S



Активацию каспазы 9 лимфоцитов периферической крови также исследовали через 24 ч инкубации. Активацию каспазы 9 оценивали по наличию фрагмента с молекулярной массой 10 кДа. Активированная каспаза 9 наблюдалась у обоих пациентов с мутацией G2019S в гене *LRRK2*, в то время как в контрольной группе активация каспазы 9 наблюдалась только у одного индивидуума из четырех (рис. 5).

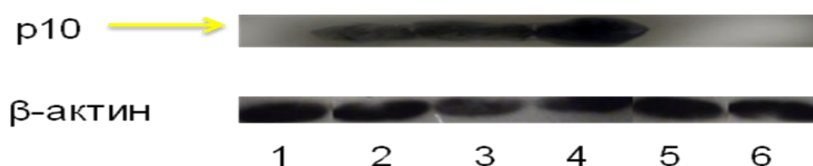


Рис. 5. Результаты вестерн-блоттинга по выявлению активации каспазы 9: 1, 2, 5, 6 – контроль, 3, 4 – носители мутации G2019S

Механизм влияния мутантной формы *LRRK2* на жизнедеятельность и гибель клеток остается малоизученным. Изучение функций *LRRK2* осложняется отсутствием представлений о физиологических субстратах этой киназы. Недавние исследования, выполненные на нейрональных клеточных линиях, позволяют предположить, что мутации в гене *LRRK2*, выявляемые при наследственных формах БП, могут активировать апоптоз, однако вопрос о пути активации апоптоза остается открытым (Iaccarino *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2009). В одном исследовании продемонстрировано взаимодействие *LRRK2* с белком FADD (Fas-associated death domain), приводящее к активации внешнего пути апоптоза (Ho *et al.*, 2009). В то же время существуют данные, свидетельствующие о том, что мутантные формы *LRRK2* могут влиять на высвобождение цитохрома *c* из митохондрии в цитоплазму и последующую активацию внутреннего пути апоптоза (Iaccarino *et al.*, 2007; Vila *et al.*, 2008).

С использованием лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП мы показали, что мутации в гене *LRRK2* (G2019S, V1613A) усиливают апоптоз и ассоциированы с повышенной экспрессией гена *FAS* и вероятной активацией каспазы 9. Предполагается, что выявляемые изменения могут отражать индукцию апоптоза в нейронах мозга.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования нами была выявлена повышенная частота мутаций гена *GBA* A1226G (N370S) и T1448C (L444P) среди пациентов с БП в Северо-Западном регионе России. Полученные результаты указы-

вают на целесообразность скрининга мажорных мутаций в гене *GBA* (L444P и N370S) для выявления групп высокого риска развития БП среди родственников пациентов с выявленной молекулярной этиологией заболевания. Впервые измерен уровень спонтанного, индуцированного апоптоза, а также исследованы маркеры апоптоза (уровень мРНК генов *FAS* и *BCL-2*, активация каспазы 8 и каспазы 9) в однородной по этиологии группе пациентов с БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*. Выявленный в настоящем исследовании повышенный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2*, наряду со стабильным повышением уровня мРНК гена *FAS* и преимущественной активацией каспазы 9 могут свидетельствовать о том, что мутации в гене *LRRK2* вероятно приводят к индукции как внешнего, так и внутреннего путей апоптоза. Выявленные нарушения могут отражать нарушения индукции апоптоза в нейронах мозга и вносить вклад в патогенез.

#### **ВЫВОДЫ**

1. Мутации в гене *GBA* (A1226G (N370S) и T1448C (L444P)) являются факторами высокого риска развития БП. Наибольшее влияние оказывает мутация L444P на риск развития болезни Паркинсона с началом до 50 лет.

2. Повышение уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови не зависит от этиологии болезни Паркинсона и обнаруживается как у пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в генах *LRRK2* и *GBA*, так и у пациентов со спорадической формой заболевания.

3. Болезнь Паркинсона, обусловленная мутациями в гене *LRRK2*, характеризуется повышенным уровнем мРНК гена *FAS* в лимфоцитах периферической крови по сравнению со спорадической болезнью Паркинсона и контрольной группой.

4. Прием умеренных (до 250 мг/сут) доз Л-ДОФА-содержащих препаратов ассоциирован с уменьшением уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона.

5. Спонтанный апоптоз лимфоцитов пациентов с болезнью Паркинсона, обусловленной мутацией G2019S *LRRK2*, характеризуется преимущественной активацией каспазы 9 относительно контроля.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации

#### Статьи:

1. Emelyanov A., Boukina T., Yakimovskii A., **Usenko T.**, Drosdova A., Zakharchuk A., Andoskin P., Dubina M., Schwarzman A., Pchelina S. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia // *Mov Disord.* 2012.-Vol. 27.- №1.- p. 158-159.
2. **Усенко Т.С.**, Емельянов А.К., Якимовский А.Ф., Боганькова Н.А., Вавилова Т.В. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона // *Цитология.*2012.- Т.54.- №1- с. 44-48.
3. Пчелина С.Н. **Усенко Т.С.**, Боганькова Н.А., Якимовский А.Ф., Емельянов А.К., Вавилова Т.В., Шварцман А.Л. Повышенный спонтанный апоптоз лимфоцитов у пациентов с болезнью Паркинсона // *Медицинская иммунология.* 2012.- Т.14.- №1-2- с.141-144.
4. Статьи в сборниках:
5. **Усенко Т.С.**, Боганькова Н.А., Пчелина С.Н. Использование метода окрашивания на аннексин V для оценки раннего апоптоза лимфоцитов у пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона // Сборник «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике», (под ред. Масленникова А.Б.). выпуск 15. г. Новосибирск: «Альфа Виста».- 2010.- с. 44-54.

#### Тезисы:

1. **Usenko T. S.** Yakimovskii A. F., Emelyanov A. K., Boganykova N. A., Vavilova T. V., Pchelina S. N. . Stable elevation of *FAS* mRNA level in peripheral blood lymphocytes of patients with LRRK2-associated Parkinson's disease over time // *Eur J Human Genetic.*- 2011.- 19(Suppl 2).- p.312.
2. **Usenko T.S.** , Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., N.A. Bogankova, Vavilova T.V., Pchelina S.N. Increased spontaneous apoptosis of peripheral blood lymphocytes of patient with Parkinson's disease // *EFNS European Journal of Neurology.*- 2011.- 18 (Suppl. 2).-p.513.
3. Emelyanov A.K., Bukina T.M., Yakimovskii A.F., **Usenko T.S.**, Drosdova A.S., Zakharchuk A., Zakharova E., Pchelina S. N. Association of GBA L444P and N370S mutations with early onset Parkinson's disease // *EFNS European Journal of Neurology.*- 2011.-18 (Suppl. 2).-p.552.
4. Емельянов А.К., **Усенко Т. С.**, Дроздова А.С., Якимовский А.Ф., Боганькова Н.А., Букина Т.М., Пчелина С.Н. Спонтанный апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене глюкоцереброзидазы // *Руководство для врачей по материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений: сб. науч. тр.- Москва.-2011.- с.379.*

5. **Усенко Т.С.**, Боганькова Н.А., Якимовский А.Ф., Емельянов А.К., Вавилова Т.В., Пчелина С.Н. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона // Руководство для врачей по материалам II Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений: сб. науч. тр.- Москва.- 2011.-с.382.
6. Pchelina S. N., Yakimovskii A.F., **Usenko T.S.**, Emelyanov A.K., Drosdova A.S., Bogankova N.A., Vavilova T.V., Schwarzman A.L. *LRRK2*-linked Parkinson's disease: genetic and biochemical studies // 24th ECNP Congress.- 2011.- France.- p.10.
7. Пчелина С.Н., Емельянов А.К., **Усенко Т.С.**, Боганькова Н.А., Вавилова Т.В., Якимовский А.Ф., Шварцман А.Л. Экспрессия альфа-синуклеина и уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной болезнью Паркинсона // Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Медицинская генетика. -2010.- с.150.
8. Пчелина С.Н., Якимовский А.Ф., Емельянов А.К., Иванова О.Н., **Усенко Т.С.**, Дроздова А.С., Шварцман А.Л. Наследственные формы болезни Паркинсона // Материалы Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное. Клинико-лабораторный консилиум.- 2010.- 2-3.-с.167.
9. **Usenko T.S.** , Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., N.A. Bogankova3, Vavilova T.V., Pchelina S.N. Increased spontaneous apoptosis of peripheral blood lymphocytes of patient with Parkinson's disease // EFNS European Journal of Neurology.- 2011.- 18 (Suppl. 2).- p.513.
10. **Usenko T.S.**, Taraskina A.E., Emelyanov A.K., Yakimovsky A.F., Pchelina S.N. Increased level of FAS mRNA gene in peripheral blood lymphocytes of patients with LRRK2-associated Parkinson's disease // Eur J Neurol.- 2010.- 18(Suppl). – p.239
11. **Usenko T.S.**, Taraskina A.E., Emelyanov A.K., Yakimovsky A.F., Pchelina S.N. *FAS* and *BCL-2* mRNA levels in peripheral blood lymphocytes of patients with LRRK2-associated Parkinson's disease // In abstracts of the 14th congress of the European federation of neurological societies.- 2010.- Switzerland.-p.121.
12. **Усенко Т.С.**, Тараскина А.Е., Якимовский А.Ф., Емельянов А.К., Пчелина С.Н. Повышенный уровень мРНК гена FAS в лимфоцитах периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона, обусловленной мутациями в гене Лейцин богатой киназы (LRRK2) // Сб. тез. 14-й международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века».- Том 2.- с.190.

#### Список цитируемой литературы

1. Букина Т. М. Автореферат на соискание кандидата биологических наук. 2005. 22 с.
2. Внукон В. В., Даниленко А. О., Головатенко О. И. Валеология. 2011. № 1 45 с.
3. Кожухарова И. В., Фридлянская И. И., Земелько В. И., Ковалева З. В., Пуговкина Н. А., Алексеенко Л. Л., Харченко М. В., Аксенов Н. Д., Шатрова А. Н., Гринчук Т. М., Анисимов С. В., Никольский Н. Н. Цитология. 2010. Т. 52, № 10. С. 875–882.
4. Скоромец А. А., Скоромец А. П., Скоромец Т. А. МЕДпресс-информ. 2005. 544 с.
5. Aharon-Peretz J., Rosenbaum H., Gershoni-Baruch R. 2004. V. 351, № 19. P. 1972–1977.
6. Battisti C., Formichi P., Radi E., Federico A. J. *Neurol Sci.* 2007. V. 267, № 1–2. P. 120–124.
7. Calopa M., Bas J., Callén A., Mestre M. *Neurobiol Dis.* 2010. V. 38, № 1. P. 1–7.
8. Colombo C., Cosentino M., Marino F., Rasini E., Ossola M., Blandini F., Mangiagalli A., Samuele A., Ferrari M., Bombelli R., Lecchini S., Nappi G., Frigo G. *Ann N Y Acad Sci.* 2003. V. 1010. С. 679–682.
9. Fukae J., Sato S., Shiba K., Sato K., Mori H., Sharp P. A., Mizuno Y., Hattori N. *FEBS Lett.* 2009. V. 3. P. 521–525.
10. Gupta N., Oppenheim I. M., Kauvar E. F., Tayebi N., Sidransky E. *Blood Cells Mol Dis.* 2011. V. 46, № 1. P. 75–84.
11. Hardy J., Lewis Pees A., Paisan-Ruiz C. *Curr Opin Genet.* 2009. V. 9. P. 254–265.
12. Ho C. C., Rideout H. J., Ribe E., Troy C. M. *J Neurosci.* 2009. P. 1011–1016.
13. Iaccarino C., Crosio C., Vitale C., Sanna G. *Hum. Mol. Genetics* 2007. V. 16. P. 1319–1326.
14. Levy O. A., Malagelada C., Greene L. A. *Apoptosis.* 2009. V. 14. P. 478–500.
15. Mazzulli J. R., Xu Y. H., Sun Y., Knight A. L., McLean P. J., Caldwell G. A., Sidransky E., Grabowski G. A., Krainc D. *Cell.* 2011. V. 146, № 1. P. 37–52.
16. Nuytemans K., Theuns J., Cruts M., Van Broeckhoven C. *Hum Mutat.* 2010. V. 31, № 7. P. 763–780.
17. Schaefer S., Vogt T., Nowak T., Kann P.H. *J Neuroendocrinol.* 2008. V. 20, № 1. P. 104–109.
18. Velayati A., Yu W.H., Sidransky E. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2010. V. 10, № 3. P. 190–198.
19. Vila M., Perier C. *Parkinsonism Relat Disord.* 2008. V. 14, № 2. P. S176–S179.
20. Yamada M., Kida K., Amutuhair W., Ichinose F., Kaneki M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010. V. 402, № 2. P. 312–318.