

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИНГИБИРОВАНИЯ КИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ LRRK2 НА АКТИВНОСТЬ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ НА ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ КЛЕТКАХ ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ

© 2025 Т.С. Усенко^{1,2*}, К.С. Башарова¹, А.И. Безрукова^{1,2}, В.А. Безруких³, Г.В. Байдакова⁴, Е.Ю. Захарова⁴, С.Н. Пчелина^{1,2}

¹ НИЦ «Курчатовский институт»,
Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова,
188300 Гатчина, Ленинградская обл., Россия; электронная почта: usenko_ts@npi.nrcki.ru

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова Минздрава России,
197341 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова,
115478 Москва, Россия

Поступила в редакцию 19.07.2024

После доработки 21.11.2024

Принята к публикации 12.12.2024

Биаллельные мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к развитию лизосомной болезни накопления, болезни Гоше (БГ), а также являются фактором высокого риска распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП). В большинстве случаев мутации в гене *GBA1* локализуются вне активного сайта и приводят к снижению активности GCase из-за снижения эффективности транспорта фермента с измененной конформацией в лизосому. Препараты, которые применяются для терапии БГ (ферментозаместительная терапия), не способны проходить гематоэнцефалический барьер и не эффективны как для лечения нейрональных форм БГ, так и для БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП). Для терапии БП на сегодняшний день проходят клинические испытания препараты, ингибирующие киназную активность обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). Ранее было показано, что ингибирование киназной активности LRRK2 приводит к увеличению активности GCase в пациент-специфичных клетках при *GBA1*-БП. Мы впервые оценили влияние ингибитора киназной активности LRRK2 (MLi-2) на активность GCase на первичной культуре макрофагов периферической крови, полученной от пациентов с БГ первого типа. Оценку активности GCase и уровня ее субстрата в клетках, культивируемых в присутствии и без MLi-2, проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией. Влияния ингибирования активности LRRK2 на активность GCase в группе пациентов с БГ не выявлено.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Гоше, макрофаги периферической крови, *GBA1*, GCase, ингибитор LRRK2, активность ферментов.

DOI: 10.31857/S0320972525010076 EDN: CPMAQE

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Гоше (БГ) – это редкое аутосомно-рецессивное заболевание, относящееся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН). В основе патогенеза БГ лежит снижение активности лизосомной гидролазы глюкоцереброзидазы (GCase)

посредством биаллельных мутаций в гене *GBA1* (OMIM 606463) [1]. В свою очередь, дисфункция GCase приводит к накоплению субстрата GCase, сфинголипида глюкоцереброзида, преимущественно в лизосомах клеток печени, селезенки и костном мозге. Существуют три основные клинические формы БГ. Тип 1 является наиболее распространенной формой и традиционно считается единственным типом, при котором у паци-

* Адресат для корреспонденции.

ентов обычно не наблюдаются первичные неврологические нарушения. Типы 2 и 3 встречаются довольно редко, связаны с неврологическими нарушениями различной степени и могут приводить к летальному исходу в молодом возрасте, в частности, тип 2 может проявляться перинатально [2, 3]. В зависимости от тяжести течения БГ и выраженности снижения активности GCase мутации в гене *GBA1* классифицируют как «мягкие» (остаточная активность GCase составляет 20–35%), например, p.N370S, p.V394L, p.R463C, и «тяжелые» (остаточная активность GCase составляет 5–10%), например, p.L444P, p.R120W, p.Leu29fs (84GG) [4].

Как гетерозиготные, так и гомозиготные носители мутаций в гене *GBA1* имеют повышенный риск развития распространенного нейродегенеративного заболевания, болезни Паркинсона (БП), в различных популяциях [5]. Нами и другими авторами было показано, что пациенты с БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), характеризуются снижением активности GCase в клетках крови и накоплением субстрата GCase, глюкоцереброзида, который в организме человека претерпевает деацетилирование и превращается в глюкозилсфингозин. Однако при GBA1-БП изменения в активности фермента и концентрации субстрата менее выражены, чем при БГ [6–9].

На сегодняшний день не существует нейропротекторной терапии как для БГ типов 2 и 3, так и для БП, в частности GBA1-БП. Однако общность патогенеза БГ и GBA1-БП как заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, позволяет предположить, что разрабатываемые таргетные препараты, направленные на повышение активности GCase, могут быть эффективны как для GBA1-БП, так и для БГ. Культура макрофагов периферической крови широко используется для изучения патогенеза заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов [10–12].

Нами и другими авторами было показано, что к увеличению активности GCase в пациент-специфичных клетках пациентов с GBA1-БП может приводить ингибирование киназной активности обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2). LRRK2 кодируется геном *LRRK2*, мутации в котором приводят к аутосомно-доминантной форме БП вследствие увеличения киназной активности, что приводит к нарушению функций LRRK2 в клетке, в частности, нарушению клеточного транспорта посредством нарушения фосфорилирования субстратов LRRK2 – GTPаз семей-

ства Rab [13, 14]. В настоящее время ингибиторы киназной активности LRRK2 (DNL201, DNL151, идентификаторы ClinicalTrials.gov NCT04557800, NCT05119790, NCT04056689, NCT05005338, NCT05418673, NCT05348785, NCT 05229562, NCT04551534, NCT03710707 и NEU-723, идентификатор ClinicalTrials.gov NCT05633745; примечание: BIIB122 – альтернативное название для DNL151) и один антисмысловый олигонуклеотид (BIIB094, идентификатор ClinicalTrials.gov NCT03976349) проходят клинические испытания для терапии БП [15].

Впервые эффект влияния ингибиторов киназной активности LRRK2 на активность GCase был продемонстрирован Ysselstein et al. [16] на дофаминергических нейронах (ДН), дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и подтвержден в дальнейших исследованиях [16–19]. В свою очередь, нами было показано увеличение активности GCase при ингибировании LRRK2 на первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП [17]. Предполагается, что увеличение активности GCase при ингибировании киназной активности LRRK2 может происходить в результате снижения фосфорилирования белка Rab10, который вовлечен в эндолизосомный транспорт, что в результате приводит к усилению транспорта GCase в лизосомы [16, 17, 19, 20]. Способны ли ингибиторы LRRK2 увеличивать активность при наличии биаллельных мутаций, в частности при БГ, остается неизвестным.

Цель данного исследования заключалась в оценке влияния ингибитора киназной активности LRRK2 (MLi-2) на активность GCase и концентрацию гексозилсфингозина (HexSph) в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ. В качестве групп сравнения в исследование были также включены пациенты с GBA1-БП и группа неврологически здоровых индивидуумов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Характеристика групп, включенных в исследование. В исследование вошло 7 пациентов с БГ, 9 пациентов с GBA1-БП и 8 неврологически здоровых индивидуумов (контроль). Клинические демографические характеристики исследуемых групп представлены в табл. 1. Пациенты с БГ наблюдаются в Национальном медицинском исследовательском центре имени В.А. Алмазова.

Принятые сокращения: БГ – болезнь Гоше; БП – болезнь Паркинсона; ДН – дофаминергические нейроны; ФП – фармакологические шапероны; GBA1-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1*; GCase – глюкоцереброзидаза; HexSph – гексозилсфингозин; LRRK2 – обогащенная лейциновыми повторами киназа 2; MLi-2 – ингибитор киназной активности LRRK2.

Таблица 1. Клинические и демографические характеристики исследуемых групп

Группы	БГ	GBA1-БП	Контроль
Численность (n)	7	9	8
Пол (мужчины/женщины)	4/3	1/8	2/6
Возраст, годы	30,00 (21,00–56,00)	62,50 (48,00–73,00)	62,00 (54,00–72,00)
Мутации в гене <i>GBA1</i>	2 – p.N370S/p.L444P 1 – p.N370S/p.Leu29fs 2 – p.N370S/p.R120W 1 – p.N370S/p.N370S 1 – p.N370S/NA	5 – p.N370S/N 4 – p.L444P/N	–
Активность GCase в крови, ммоль/литр/ч	0,32 (0,01–0,96) p.N370S/p.L444P: 0,43 (0,01–0,51) p.N370S/p.Leu29fs: 0,06 (0,02–0,09) p.N370S/p.R120W: 0,48 (0,18–0,82) p.N370S/p.N370S: 0,96 (0,96–0,96) p.N370S/NA: 0,64 (0,64–0,64)	3,2 (1,42–5,07) p.N370S/N: 3,77 (2,32–5,07) p.L444P/N: 2,78 (1,42–4,96)	4,69 (2,85–12,87)
Концентрация HexSph в крови, нг/мл	223,59 (44,82–737,17) p.N370S/p.L444P: 279,67 (77,7–381,73) p.N370S/p.Leu29fs: 68,14 (47,29–122,28) p.N370S/p.R120W: 597,22 (347,99–737,17) p.N370S/p.N370S: 196,16 (196,16–196,16) p.N370S/NA: 44,82 (44,82–44,82)	4,38 (1,7–6,19) p.N370S/N: 4,15 (1,7–6,19) p.L444P/N: 4,62 (2,36–5,67)	5,42 (1,61–14,47)
Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови, ммоль/литр/ч	0,16 (0,01–2,58) p.N370S/p.L444P: 0,43 (0,01–0,72) p.N370S/p.Leu29fs: 0,01 (0,01–0,09) p.N370S/p.R120W: 0,45 (0,16–0,84) p.N370S/p.N370S: 2,58 (2,58–2,58) p.N370S/NA: 0,01 (0,01–0,01)	6,26 (1,58–15,34) p.N370S/N: 13,04 (8,96–15,34) p.L444P/N: 3,46 (1,58–11,47)	15,94 (2,86–48,24)
Концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови, нг/мл	3,17 (0,01–20,19) p.N370S/p.L444P: 2,95 (2,55–3,32) p.N370S/p.Leu29fs: 16,27 (4,18–20,19) p.N370S/p.R120W: 2,14 (0,01–10,35) p.N370S/p.N370S: 0,99 (0,99–0,99) p.N370S/NA: 1,79 (1,79–1,79)	0,77 (0,08–2,68) p.N370S/N: 1,78 (0,08–2,68) p.L444P/N: 0,68 (0,12–1,96)	0,28 (0,07–1,06)
Примечание. HexSph – гексозилсфингозин; GCase – глюкоцереброзидаза; NA – нет сведений; /N – нормальный (диккий) аллель без мутации.			

Все пациенты с БГ получают лечение ферментной заместительной терапией. Забор крови осуществлялся перед введением данной терапии.

Диагноз БГ был поставлен, согласно клиническим рекомендациям (https://cr.minzdrav.gov.ru/recommend/24_2), на основании симптоматики и биохимической оценки активности GCase с последующим выявлением мутаций в гене *GBA1* методом прямого секвенирования по Сенгеру. Биохимический анализ и секвенирование гена *GBA1* у пациентов с БП проводилось в Медико-генетическом научном центре имени Н.П. Бочкова, Москва. Диагноз БГ для одного из всех пациентов был подтвержден только на основе биохимических параметров, в частности по активности GCase и концентрации HexSph, так как в ходе секвенирования гена *GBA1* была выявлена одна мутация в гетерозиготном состоянии.

Пациенты с *GBA1*-БП наблюдаются в институте мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН. Диагноз БП был установлен по ранее опубликованным критериям [21]. Пациенты с *GBA1*-БП были выявлены нами ранее методом скрининга двух мажорных мутаций в гене *GBA1* (p.N370S [NM_000157.4:c.1226A>G], p.L444P [NM_000157.4:c.1448T>C]) среди пациентов с БП по ранее описанному протоколу [5]. Данная группа пациентов описана в нашем исследовании по оценке действия ингибиторов LRRK2 на биохимические характеристики при БП, ассоциированной с мутациями в генах *GBA1* и *LRRK2* на пациент-специфичных клетках [17]. Контроль был набран из добровольцев, которые наблюдаются в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. Все индивидуумы контрольной группы были также проскринированы на две мажорные мутации в гене *GBA1* (p.N370S, p.L444P) с целью исключения носителей данных мутаций. Включенные в исследование группы статистически значимо различались по полу ($p = 0,03$) и возрасту ($p = 0,0002$).

Все участники исследования подписали информированное согласие. У каждого участника исследования был произведен забор крови для дальнейшего получения первичной культуры макрофагов периферической крови.

Культивирование первичной культуры макрофагов периферической крови. Первичная культура макрофагов периферической крови была получена по протоколу, описанному нами ранее, из мононуклеарной фракции, выделенной из цельной крови каждого индивидуума [22]. На четвертые сутки к первичной культуре макрофагов был добавлен селективный ингибитор киназной активности LRRK2, MLi-2 («Abcam», США), в концентрации 100 нМ с последующим куль-

тивированием в течение 4 суток, как было описано нами ранее [17]. Эффективность действия ингибитора MLi-2 была подтверждена по соотношению фосфорилированной в положении Thr73 формы к нефосфорилированной форме белка Rab10, являющегося основным субстратом LRRK2, с помощью вестерн-блоттинга, как было описано нами ранее [17].

Оценка активности GCase и концентрации HexSph. Оценку ферментативной активности GCase и концентрации гексозилсфингозина, представляющего собой смесь двух эпимеров гликозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph), проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на первичной культуре макрофагов периферической группы контроля в присутствии MLi-2 в концентрации 100 нМ и без него по протоколу, описанному ранее в лаборатории наследственных болезней обмена Медико-генетического научного центра имени Н.П. Бочкова, Москва [6, 9]. Все измерения были выполнены в трех повторях.

Статистика. Статистическую обработку полученных данных осуществляли в среде программирования R (версия 4.1.2) с использованием встроенных статистических пакетов. Проверку нормальности распределения данных проводили с использованием теста Шапиро-Уилка. Для анализа различий между группами применяли тест Вилкоксона. В случаях зависимых (парных) выборок использовали парный тест Вилкоксона. Для независимых выборок различия оценивали с применением теста Вилкоксона, дополненного post-hoc-анализом с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Клинические характеристики представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, экспериментальные значения – медиана (минимальное/максимальное).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время не существует подходов для лечения нейрональных форм БГ, так же как и для лечения *GBA1*-БП. Ранее на ДН пациентов с *GBA1*-БП было показано увеличение активности GCase при ингибировании киназной активности LRRK2 [16, 19]. Нами подтверждены полученные ранее данные, и впервые показано влияние ингибирования активности LRRK2 на восстановление активности GCase на первичной культуре макрофагов пациентов с *GBA1*-БП.

В настоящем исследовании нами впервые оценено влияние селективного ингибитора

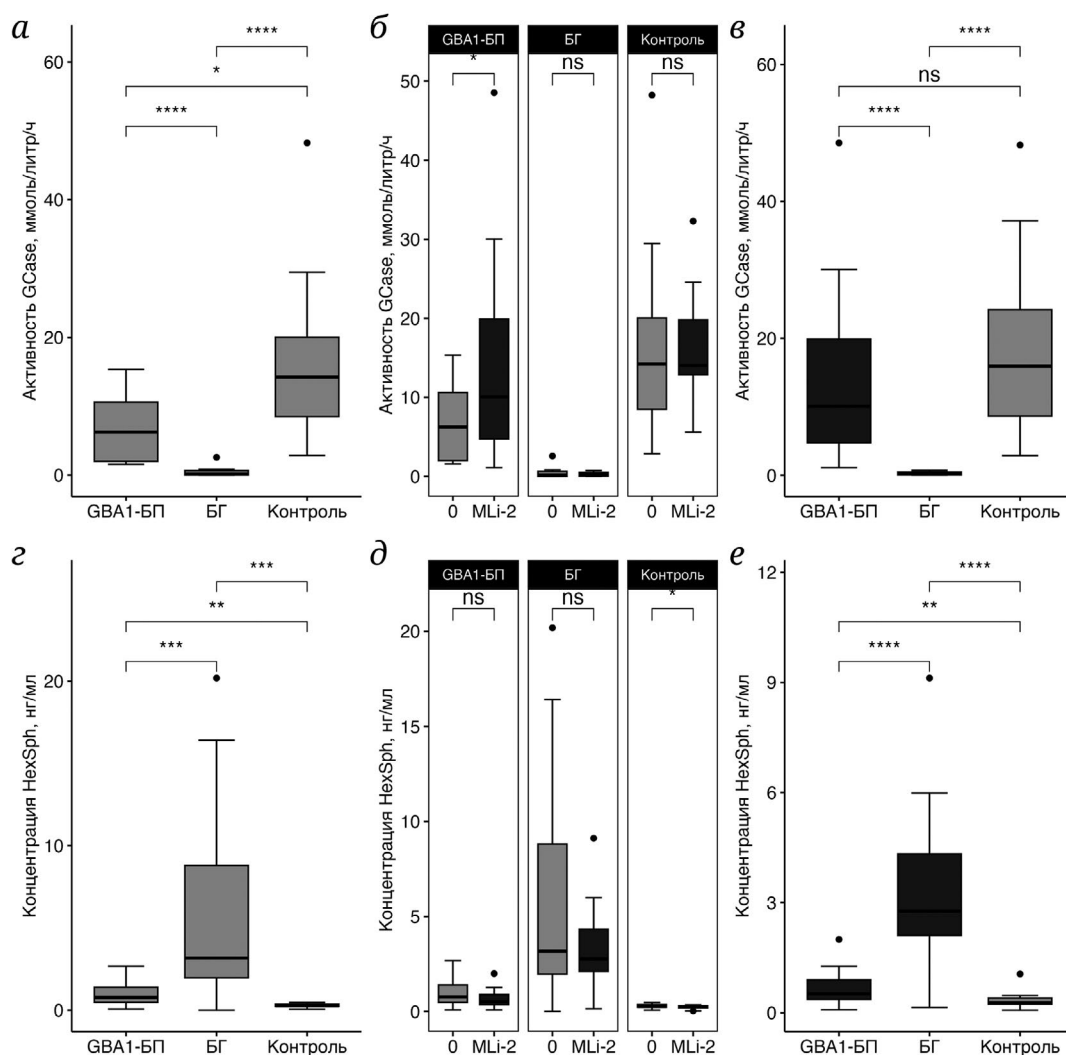


Рис. 1. Уровень активности GCase и HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ, GBA1-БП и контроля. *а* – Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *б* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *в* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2; *г* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *е* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – нет статистической значимости

киназной активности LRRK2 на активность GCase и концентрацию HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ. Первичная культура макрофагов периферической крови широко используется как для изучения патогенеза БГ, так и для скрининга потенциальных лекарственных препаратов, направленных на увеличение активности GCase [10–12]. В настоящем исследовании, так же как и было показано нами ранее, активность GCase была снижена, а концентрация HexSph была повышена в первичной культуре макрофагов пери-

ферической крови пациентов с БГ по сравнению с пациентами с GBA1-БП и контролем (GCase: $p = 0,000043$, $p = 0,0000074$; HexSph: $p = 0,00042$, $p = 0,00012$ соответственно) (рис. 1, *а* и *г*). В то же время пациенты с GBA1-БП с гетерозиготным носительством мутаций в гене *GBA1* характеризовались снижением активности GCase ($p = 0,013$) и увеличением концентрации HexSph ($p = 0,0026$) в первичной культуре макрофагов периферической крови по сравнению с контролем, однако данные изменения были менее выражены (рис. 1, *а* и *г*) [10, 11].

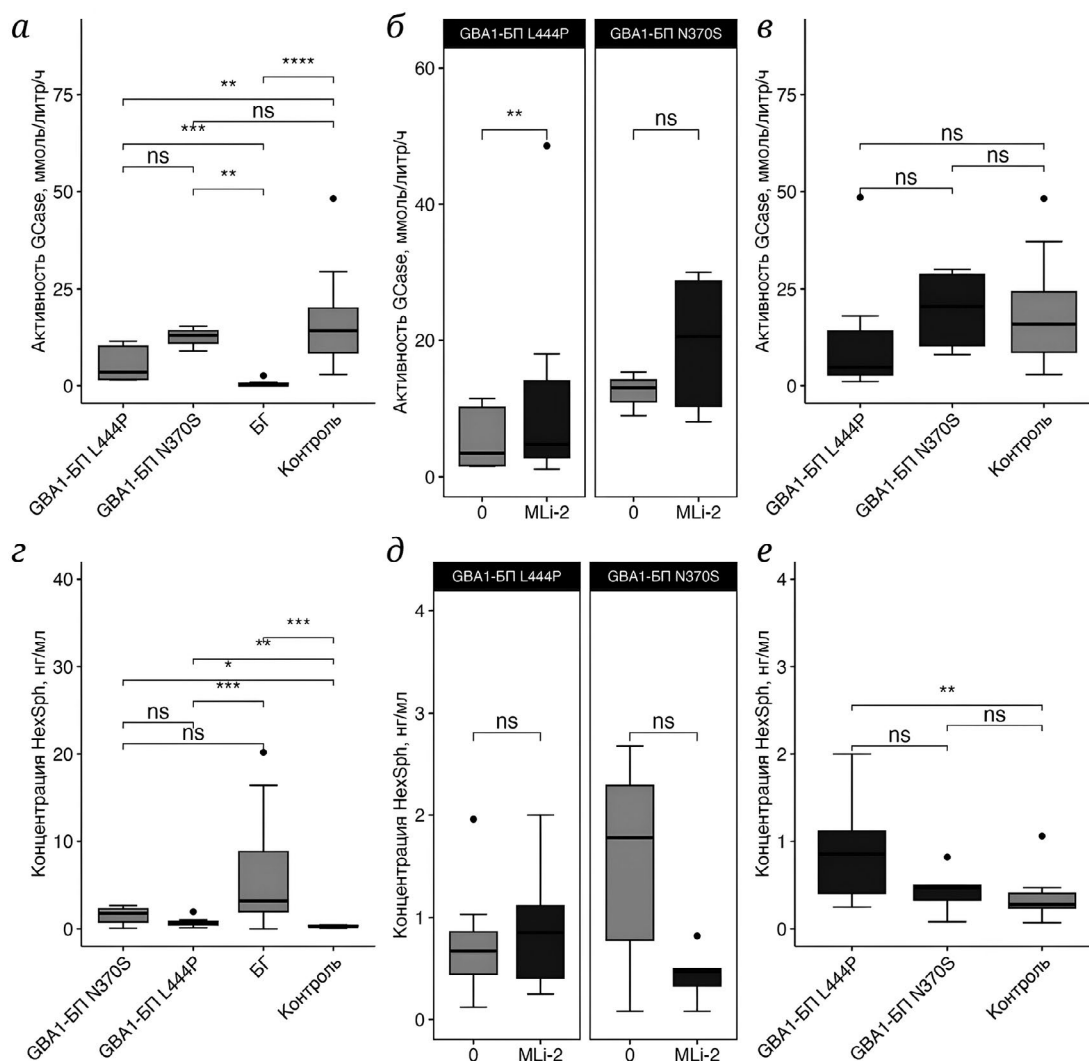


Рис. 2. Уровень активности GCase и HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ, GBA1-БП и контроля в зависимости от мутаций в гене *GBA1* в группе пациентов с GBA1-БП. *а* – Активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *б* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *в* – активность GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2; *г* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп; *д* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови исследуемых групп при культивировании в присутствии и без ингибитора киназной активности LRRK2; *е* – концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП и БГ при культивировании в присутствии киназной активности LRRK2 и контроля без ингибитора киназной активности LRRK2. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – нет статистической значимости

Как было показано нами ранее, ингибирование киназной активности LRRK2 приводило к статистически значимому увеличению активности GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови в группе пациентов с GBA1-БП по сравнению с контролем ($p = 0,012$; рис. 1, б), что соответствует ранее полученным данным на ДН пациентов с GBA1-БП [16, 18, 19]. Предполагается, что изменение киназной активности LRRK2 может влиять на внутриклеточный транспорт, в частности, лизосомных ферментов от эндоплазма-

тического ретикулума в лизосому, посредством изменения уровня фосфорилирования белка Rab10, являющегося основным субстратом LRRK2, что, в свою очередь, приводит к увеличению активности и уровня GCase [16].

Однако в группе пациентов с БГ и контроле изменений в уровне активности GCase при ингибировании LRRK2 выявлено не было ($p > 0,05$; рис. 1, б). Существенно, что при ингибировании активности LRRK2 активность GCase в группе пациентов с GBA1-БП достигала значений активности

GCase в первичной культуре макрофагов периферической крови контроля без ингибитора MLi-2 ($p > 0,05$; рис. 1, в). Интересно отметить, что в группе пациентов с GBA1-БП было также выявлено снижение концентрации HexSph в первичной культуре макрофагов периферической крови при ингибировании киназной активности LRRK2 ингибитором MLi-2, в то же время в контроле было выявлено статистически значимое снижение концентрации HexSph при ингибировании киназной активности LRRK2 ($p = 0,041$; рис. 1, д и е). В группе пациентов с БГ изменений в концентрации HexSph при ингибировании LRRK2 выявлено не было ($p > 0,05$; рис. 1, д и е).

Первичная культура макрофагов периферической крови пациентов с GBA1-БП характеризовалась снижением активности GCase и увеличением концентрации HexSph независимо от мутаций в гене *GBA1* (рис. 2, а и з). Интересно отметить, что мутация p.L444P не влияет на активность GCase, но снижает стабильность GCase, что приводит к снижению уровня данного белка в клетке [23–25]. В то же время для мутации p.N370S не было показано выраженного влияния на стабильность белка GCase [26]. Предполагается, что в случае мутации p.N370S суммарное снижение активности GCase объясняется изменением сродства фермента к мембранам [24]. Можно предположить, что усиление транспорта GCase в лизосому при ингибировании активности LRRK2 может зависеть от типа мутации. Воздействие ингибитором киназной активности LRRK2 приводило к увеличению активности GCase в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA1-БП только с мутацией p.L444P ($p = 0,0078$) и достижению уровня активности GCase в клетках необработанного контроля, но не в группе пациентов с GBA1-БП с мутацией p.N370S (рис. 2, б и в). Однако влияние ингибитора LRRK2 на уровень HexSph выявлено не было (рис. 2, д и е). В настоящем исследовании все пациенты с БГ являлись компаундными гетерозиготами «легкой» (p.N370S) и одной из «тяжелых» (p.L444P, p.Leu29fs, p.R120W) мутаций.

С другой стороны, нельзя исключить, что одной функциональной копии гена *GBA1* достаточно для увеличения активности GCase за счет усиления транспорта функционально активной GCase в лизосому. Отсутствие изменения уровня активности GCase в группе пациентов с БГ можно обосновать отсутствием функциональных копий гена *GBA1* вследствие биаллельных мутаций в гене *GBA1*. Усиление транспорта фермента GCase в лизосому посредством ингибирования активности LRRK2 при наличии только мутантных форм фермента является недостаточным для увеличения активности GCase. Нужно также учесть, что отсутствие влияния ингибирования LRRK2

при увеличении активности GCase на уровень HexSph в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ может быть связано с недостаточным количеством времени культивирования клеток в присутствии MLi-2 или недостаточной концентрацией ингибитора.

В качестве перспективной стратегии для терапии GBA1-БП и БГ на сегодняшний день разрабатываются небольшие химические соединения, называемые фармакологическими шаперонами (ФШ), которые способны проникать через гематоэнцефалический барьер, селективно связываться с ферментом GCase, стабилизировать его структуру, способствуя его транслокации в лизосому, что в совокупности позволяет восстановить биологическую функцию данного фермента [10, 11]. На пациент-специфичных клетках нами и другими авторами показана эффективность данного класса препаратов в отношении восстановления активности GCase при БГ. В настоящее время ФШ проходят фазу 2 клинических испытаний для терапии БГ (NCT03950050) и фазу 3 клинических испытаний для терапии БП (NCT05778617). Однако в клиническую практику ФШ GCase еще не внедрены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая полученные нами данные, ингибиторы LRRK2 не следует рассматривать в качестве монотерапии БГ, однако представляется важным оценить сочетанное действие ингибиторов LRRK2 с препаратами, способствующими коррекции сборки мутантного фермента, такими как ФШ GCase. Подобный подход может способствовать одновременно усилению транспорта фермента в лизосому и восстановлению активной конформации GCase.

Вклад авторов. Т.С. Усенко – концепция и руководство работой; К.С. Башарова, А.И. Безрукова, Г.В. Байдакова, В.А. Безруких – проведение экспериментов; К.С. Башарова, Е.Ю. Захарова, С.Н. Пчелина, Т.С. Усенко – обсуждение результатов исследования; К.С. Башарова – статистическая обработка данных; К.С. Башарова – графическое представление данных; Т.С. Усенко – написание текста; Т.С. Усенко, С.Н. Пчелина, К.С. Башарова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 24-15-00177).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам нацио-

нального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное

добровольное согласие. Исследование одобрено Этическим комитетом Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (протокол № 275 от 04.09.2023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stirnemann, J., Belmatoug, N., Camou, F., Serratrice, C., Froissart, R., Caillaud, C., Levade, T., Astudillo, L., Serratrice, J., Brassier, A., Rose, C., Billette de Villemeur, T., and Berger, M. G. (2017) A review of Gaucher disease pathophysiology, clinical presentation and treatments, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 441, <https://doi.org/10.3390/ijms18020441>.
2. Gupta, P., and Pastores, G. (2018) Pharmacological treatment of pediatric Gaucher disease, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **11**, 1183-1194, <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1549486>.
3. Gupta, N., Oppenheim, I. M., Kauvar, E. F., Tayebi, N., and Sidransky, E. (2011) Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity, *Blood Cells Mol. Dis.*, **46**, 75-84, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.08.012>.
4. Parlar, S. C., Grenn, F. P., Kim, J. J., Baluwendrat, C., and Gan-Or, Z. (2023) Classification of GBA1 variants in Parkinson's disease: the GBA1-PD browser, *Mov. Disord.*, **38**, 489-495, <https://doi.org/10.1002/mds.29314>.
5. Emelyanov, A. K., Usenko, T. S., Tesson, C., Senkevich, K. A., Nikolaev, M. A., Miliukhina, I. V., Kopytova, A. E., Timofeeva, A. A., Yakimovsky, A. F., Lesage, S., Brice, A., and Pchelina, S. N. (2018) Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set, *Neurobiol. Aging*, **71**, 267.e7-267.e10, <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.027>.
6. Pchelina, S., Baydakova, G., Nikolaev, M., Senkevich, K., Emelyanov, A., Kopytova, A., Miliukhina, I., Yakimovskii, A., Timofeeva, A., Berkovich, O., Fedotova, E., Illarioshkin, S., and Zakharova, E. (2018) Blood lysosphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations, *Mov. Disord.*, **33**, 1325-1330, <https://doi.org/10.1002/mds.27393>.
7. Kopytova, A. E., Usenko, T. S., Baydakova, G. V., Nikolaev, M. A., Senkevich, K. A., Izyumchenko, A. D., Tyurin, A. A., Miliukhina, I. V., Emelyanov, A. K., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2022) Could blood hexosylsphingosine be a marker for Parkinson's disease linked with GBA1 mutations? *Mov. Disord.*, **37**, 1779-1781, <https://doi.org/10.1002/mds.29132>.
8. Alcalay, R. N., Levy, O. A., Waters, C. C., Fahn, S., Ford, B., Kuo, S. H., Mazzoni, P., Pauciulo, M. W., Nichols, W. C., Gan-Or, Z., Rouleau, G. A., Chung, W. K., Wolf, P., Oliva, P., Keutzer, J., Marder, K., and Zhang, X. (2015) Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations, *Brain*, **138**, 2648-2658, <https://doi.org/10.1093/brain/awv179>.
9. Polo, G., Burlina, A. P., Kolamunnage, T. B., Zampieri, M., Dionisi-Vici, C., Strisciuglio, P., Zaninotto, M., Plebani, M., and Burlina, A. B. (2017) Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **55**, 403-414, <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0340>.
10. Kopytova, A. E., Rychkov, G. N., Nikolaev, M. A., Baydakova, G. V., Cheblov, A. A., Senkevich, K. A., Bogdanova, D. A., Bolshakova, O. I., Miliukhina, I. V., Bezrukikh, V. A., Salogub, G. N., Sarantseva, S. V., Usenko, T. C., Zakharova, E. Y., Emelyanov, A. K., and Pchelina, S. N. (2011) Ambroxol increases glucocerebrosidase (GCase) activity and restores GCase translocation in primary patient-derived macrophages in Gaucher disease and parkinsonism, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **84**, 112-121, <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.02.003>.
11. Kopytova, A. E., Rychkov, G. N., Cheblov, A. A., Grigor'eva, E. V., Nikolaev, M. A., Yarkova, E. S., Sorogina, D. A., Ibatullin, F. M., Baydakova, G. V., Izyumchenko, A. D., Bogdanova, D. A., Boitsov, V. M., Rybakov, A. V., Miliukhina, I. V., Bezrukikh, V. A., Salogub, G. N., Zakharova, E. Y., Pchelina, S. N., and Emelyanov, A. K. (2023) 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, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 91-105, <https://doi.org/10.3390/ijms24109105>.
12. Aflaki, E., Stubblefield, B. K., Maniawang, E., Lopez, G., Moaven, N., Goldin, E., Marugan, J., Patnaik, S., Dutra, A., Southall, N., Zheng, W., Tayebi, N., and Sidransky, E. (2014) Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 240ra73, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008659>.
13. Liu, Z., Bryant, N., Kumaran, R., Beilina, A., Abeliovich, A., Cookson, M. R., and West, A. B. (2018) LRRK2 phosphorylates membrane-bound Rabs and is activated by GTP-Bound Rab7L1 to promote recruitment to the trans-Golgi network, *Hum. Mol. Genet.*, **27**, 385-395, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx410>.

14. Vides, E. G., Adhikari, A., Chiang, C. Y., Lis, P., Purlyte, E., Limouse, C., Shumate, J. L., Spínola-Lasso, E., Dhekne, H. S., Alessi, D. R., and Pfeffer, S. R. (2022) A feed-forward pathway drives LRRK2 kinase membrane recruitment and activation, *Elife*, **11**, e79771, <https://doi.org/10.7554/eLife.79771>.
15. Taymans, J. M., Fell, M., Greenamyre, T., Hirst, W. D., Mamais, A., Padmanabhan, S., Peter, I., Rideout, H., and Thaler, A. (2023) Perspective on the current state of the LRRK2 field, *NPJ Parkinsons Dis.*, **9**, 104, <https://doi.org/10.1038/s41531-023-00544-7>.
16. Ysselstein, D., Nguyen, M., Young, T. J., Severino, A., Schwake, M., Merchant, K., and Krainc, D. (2019) LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients, *Nat. Commun.*, **10**, 5570, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13413-w>.
17. Усенко Т. С., Башарова К. С., Безрукова А. И., Николаев М. А., Милыхина И. В., Байдакова Г. В., Захарова Е. Ю., Пчелина С. Н. (2022) Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона, *Мед. Генет.*, **21**, 26-29, <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.26-29>.
18. Kedariti, M., Frattini, E., Baden, P., Cogo, S., Civiero, L., Ziviani, E., Zilio, G., Bertoli, F., Aureli, M., Kaganovich, A., Cookson, M. R., Stefanis, L., Surface, M., Deleidi, M., Di Fonzo, A., Alcalay, R. N., Rideout, H., Greggio, E., and Plotegher, N. (2022) LRRK2 kinase activity regulates GCase level and enzymatic activity differently depending on cell type in Parkinson's disease, *NPJ Parkinsons Dis.*, **8**, 92, <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00354-3>.
19. Sanyal, A., Novis, H. S., Gasser, E., Lin, S., and LaVoie, M. J. (2020) LRRK2 kinase inhibition rescues deficits in lysosome function due to heterozygous GBA1 expression in human iPSC-derived neurons, *Front. Neurosci.*, **14**, 442, <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00442>.
20. Mamais, A., Sanyal, A., Fajfer, A., Zykoski, C. G., Guldin, M., Riley-DiPaolo, A., Subrahmanian, N., Gibbs, W., Lin, S., and LaVoie, M. J. (2023) The LRRK2 kinase substrates Rab8a and Rab10 contribute complementary but distinct disease-relevant phenotypes in human neurons, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2023.04.30.538317>.
21. Rao, G., Fisch, L., Srinivasan, S., D'Amico, F., Okada, T., Eaton, C., and Robbins, C. (2023) Does this patient have Parkinson disease? *JAMA*, **289**, 347-353, <https://doi.org/10.1001/jama.289.3.347>.
22. Nikolaev, M. A., Kopytova, A. E., Baidakova, G. V., Emel'yanov, A. K., Salogub, G. N., Senkevich, K. A., Usenko, T. S., Gorchakova, M. V., Koval'chuk, Yu. P., Berkovich, O. A., Zakharova, E. Y., and Pchelina, S. N. (2019) Human peripheral blood macrophages as a model for studying glucocerebrosidase dysfunction, *Cell Tissue Biol.*, **13**, 100-106, <https://doi.org/10.1134/S1990519X19020081>.
23. Tan, Y. L., Genereux, J. C., Pankow, S., Aerts, J. M., Yates, J. R., and Kelly, J. W. (2014) ERdj3 is an endoplasmic reticulum degradation factor for mutant glucocerebrosidase variants linked to Gaucher's disease, *Chem. Biol.*, **21**, 967-976, <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.06.008>.
24. Sawkar, A. R., Schmitz, M., Zimmer, K. P., Reczek, D., Edmunds, T., Balch, W. E., and Kelly, J. W. (2006) Chemical chaperones and permissive temperatures alter localization of Gaucher disease associated glucocerebrosidase variants, *ACS Chem. Biol.*, **1**, 235-251, <https://doi.org/10.1021/cb600187q>.
25. Liou, B., Kazimierczuk, A., Zhang, M., Scott, C. R., Hegde, R. S., and Grabowski, G. A. (2006) Analyses of variant acid beta-glucosidases: effects of Gaucher disease mutations, *J. Biol. Chem.*, **281**, 4242-4253, <https://doi.org/10.1074/jbc.M511110200>.
26. Yap, T. L., Gruschus, J. M., Velayati, A., Westbroek, W., Goldin, E., Moaven, N., Sidransky, E., and Lee, J. C. (2011) α -Synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28080-28088, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237859>.

EVALUATION OF THE EFFECT OF INHIBITION OF LRRK2 KINASE ACTIVITY ON GLUCOCEREBROSIDASE ACTIVITY ON PATIENT-SPECIFIC CELLS FROM PATIENTS WITH GAUCHER DISEASE

**T. S. Usenko^{1,2*}, K. S. Basharova¹, A. I. Bezrukova^{1,2}, V. A. Bezrukikh³,
G. V. Baydakova⁴, E. Y. Zakharova⁴, and S. N. Pchelina^{1,2}**

¹ Petersburg Institute of Nuclear Physics Named after B. P. Konstantinov
Research Center "Kurchatov Institute", 188300 Gatchina, Russia; e-mail: usenko_ts@npni.nrcki.ru

² First St. Petersburg State Medical University Named after acad. I.P. Pavlova,
197022 St. Petersburg, Russia

³ National Medical Research Center Named after V. A. Almazov, 197341 St. Petersburg, Russia

⁴ Medical Genetic Research Center Named after acad. N. P. Bochkov, 115478 Moscow, Russia

Biallelic mutations in the *GBA1* gene, encoding the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase), lead to the development of a lysosomal storage disease, Gaucher disease (GD), and are also a high risk factor for a common neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD). In most cases, mutations in the *GBA1* gene are localized outside the active site and lead to a decrease in GCase activity due to a decrease in the efficiency of transport of the enzyme with an altered conformation into the lysosome. Drugs that are used to treat GD (enzyme replacement therapy) are not able to cross the blood-brain barrier and are not effective for the treatment of neuronal forms of GD or PD associated with mutations in the *GBA1* gene (GBA1-PD). For the treatment of PD, drugs that inhibit the kinase activity of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) are currently undergoing clinical trials. It was previously shown that inhibition of LRRK2 kinase activity leads to an increase in GCase activity in patient-specific GBA1-PD cells. We first assessed the effect of the kinase activity inhibitor LRRK2 (MLi-2) on GCase activity in a primary culture of peripheral blood macrophages obtained from patients with type 1 GD. Assessment of GCase activity and its substrate levels in cells cultured with and without MLi-2 was performed using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. There was no effect of inhibition of LRRK2 activity on GCase activity in the group of patients with GD.

Keywords: Gaucher disease, peripheral blood macrophages, *GBA1*, GCase, LRRK2, inhibitor, enzyme activity