

ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ И ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНАХ, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА, У ПАЦИЕНТОВ КРАСНОЯРСКОГО РЕГИОНА

Субботина Т.Н.^{1,2}, Абрамов В.Г.², Разумова А.А.^{1,2}, Кочмарева Г.Ю.¹, Карнюшка А.А.¹, Верецагина С.В.², Похабов Д.В.^{2,3}

¹ФГАОУ ВО Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия

²ФГБУ Федеральный сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства России, Красноярск, Россия

³ФГБОУ ВО Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск, Россия

Резюме

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из распространенных нейродегенеративных заболеваний человека. Известно несколько генов (SNCA, PARK2, PINK1, PARK7 (DJ-1) и LRRK2), мутации в которых имеют патологическое значение в развитии моногенной БП, ассоциация с БП других генов (например, UCHL1, ATRP13A2) требует дальнейшего изучения. Также известны гены (например, GBA), ассоциированные с повышенным риском развития БП.

Цель исследования. Анализ мутаций и полиморфизмов в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1 и GBA среди пациентов Красноярского региона с диагнозом БП.

Материал и методы. В исследование были включены 60 больных со спорадической и семейной формами БП. Для выявления делеций и дупликаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1, а также точечных мутаций A30P в гене SNCA и G2019S в гене LRRK2 использовались наборы SALSA MLPA P051 и P052 («MRC-Holland», The Netherlands). Анализ гена GBA проводился методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. При проведении MLPA-анализа с использованием наборов SALSA MLPA P051 и P052 ни у одного из 60 пациентов не выявлено искомых мутаций. Анализ гена GBA выявил 6 различных вариантов у 9 из 60 обследованных пациентов, в частности L444P («тяжелая» мутация, ассоциированная с БП) — у двух пациентов, D409H («тяжелая» мутация, ассоциированная с БП) — у одного пациента, T369M (полиморфизм, возможно, ассоциированный с БП) — у двух пациентов, E326K (полиморфизм, возможно, ассоциированный с БП) — у одного пациента, V460V (синонимичный вариант, входящий в состав комплексной мутации RecNcil (p.L444P; p.A456P; p.V460V), ассоциированной с БП) — у двух пациентов и вариант с.*92G>A (3'-UTR полиморфизм, возможно, ассоциированный с БП) — у одного пациента. У двоих пациентов встретилось компунд-гетерозиготное носительство двух однонуклеотидных замен.

Заключение. В приведенной работе представлены результаты анализа мутаций и полиморфизмов в генах, ассоциированных с диагнозом БП среди пациентов Красноярского региона. При этом не было выявлено мутаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1 и GCH1. Анализ мутаций и полиморфизмов в гене GBA показал аналогичную частоту встречаемости в выборке пациентов Красноярского региона, что и в европейских популяциях.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, MLPA-анализ, PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1, GBA.

Для цитирования: Субботина Т.Н., Абрамов В.Г., Разумова А.А., Кочмарева Г.Ю., Карнюшка А.А., Верецагина С.В., Похабов Д.В. Анализ мутаций и полиморфизмов в генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона, у пациентов Красноярского региона. *Российский неврологический журнал*. 2021;26(4):15–22. DOI 10.30629/2658-7947-2021-26-4-15-22

Для корреспонденции: Субботина Татьяна Николаевна — к.б.н., доцент кафедры медицинской биологии ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», заведующая научно-практической лабораторией молекулярно-генетических методов исследований ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет» (СФУ), e-mail: stn.25@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовом обеспечении Государственного задания ФМБА России на тему: «Использование молекулярно-генетического анализа для оценки риска раннего развития нейродегенеративных заболеваний», а также с привлечением средств федерального бюджета Сибирского федерального университета.

Информация об авторах

Субботина Т.Н., <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>, e-mail: stn.25@mail.ru

Абрамов В.Г., <https://orcid.org/0000-0002-4063-4951>, e-mail: excalibr@mail.ru

Разумова А.А., <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>, e-mail: anellika@yandex.ru

Кочмарева Г.Ю., <https://orcid.org/0000-0001-7570-0835>, e-mail: galya.kochmaryowa@yandex.ru

Карнюшка А.А., <https://orcid.org/0000-0001-7618-5177>, e-mail: miss.anastasia-box@yandex.ru

Верещагина С.В., <https://orcid.org/0000-0003-4460-8838>, e-mail: vereschagina_sv@skc-fmba.ru
Похабов Д.В., <https://orcid.org/0000-0003-3355-6278>, e-mail: neurodmit@mail.ru

ANALYSIS OF MUTATIONS ASSOCIATED WITH PARKINSON'S DISEASE IN PATIENTS OF THE KRASNOYARSK REGION

Subbotina T.N.^{1,2}, Abramov V.G.², Razumova A.A.^{1,2}, Kochmaryova G.Y.¹, Karnyushka A.A.¹, Vereschagina S.V.², Pokhabov D.V.^{2,3}

¹Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia

²Federal Siberian Research and Clinical Center of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Krasnoyarsk, Russia

³Professor V.F. Voyno-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia

Abstract

Background. Parkinson's disease (PD) is one of the common neurodegenerative diseases. Several genes are known (SNCA, PARK2, PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2), mutations in which have a pathological significance in the development of monogenic PD; association with PD of other genes (for example, UCHL1, ATP13A2) requires further study. It is also known, that GBA gene is associated with an increased risk of PD developing.

Aim. Analysis of mutations and polymorphisms in the PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1 and GBA genes in patients with PD from Krasnoyarsk region.

Material and methods. The 60 patients with sporadic and familial forms of PD were included in the study. The SALSA MLPA Holland P051 and P052 kits («MRC Amsterdam», The Netherlands) were used to detect deletions and duplications in the PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1 genes, as well as point mutations A30P in the SNCA gene and G2019S in the LRRK2 gene. Analysis of the GBA gene was carried out by Sanger sequencing.

Results. None of the 60 patients had mutations that were searched with the SALSA MLPA Holland P051 and P052 kits. 6 different mutations in the GBA gene were found in 9 out of 60 patients with PD. L444P («severe» PD — associated mutation) — in two patients, D409H («severe» PD — associated mutation) — in one patient, T369M (polymorphism, possibly associated with PD) — in two patients, E326K (polymorphism, possibly associated with PD) — in one patient, V460V (synonymous variant, which is part of the composition of the complex RecNcil mutation (p.L444P; p.A456P; p.V460V) associated with PD) — in two patients and variant C.*92g>A (3' — UTR polymorphism, possibly associated with PD) — in one patient. Two patients had compound heterozygous carriers of two variants.

Conclusion. This paper presents the genetic analysis results of the PD associated genes among patients from the Krasnoyarsk region. No mutations were detected in the PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1 and GCH1 genes. Genetic variants analysis of the GBA gene showed similar frequency in the patients from the Krasnoyarsk region as in European populations.

Key words: Parkinson's disease, MLPA analysis, PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL1, GCH1, GBA.

For citation: Subbotina T.N., Abramov V.G., Razumova A.A., Kochmaryova G.Y., Karnyushka A.A., Vereschagina S.V., Pokhabov D.V. Analysis of mutations associated with Parkinson's disease in patients of the Krasnoyarsk region. *Russian Neurological Journal (Rossijskij Nevrologicheskij Zhurnal)*. 2021;26(4):15–22. (In Russian). DOI 10.30629/2658-7947-2021-26-4-15-22

For correspondence: Subbotina T.N.; e-mail: stn.25@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. The study was carried out with the financial support of the State Assignment of the FMBA of Russia on the topic: “The use of molecular genetic analysis to assess the risk of early development of neurodegenerative diseases”, as well as with the involvement of funds from the federal budget of the Siberian Federal University.

Information about authors

Subbotina T.N., <https://orcid.org/0000-0001-7790-5033>, e-mail: stn.25@mail.ru

Abramov V.G., <https://orcid.org/0000-0002-4063-4951>, e-mail: excalibr@mail.ru

Razumova A.A., <https://orcid.org/0000-0002-2505-5978>, e-mail: anellika@yandex.ru

Kochmaryova G.Y., <https://orcid.org/0000-0001-7570-0835>, e-mail: galya.kochmaryowa@yandex.ru

Karnyushka A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7618-5177>, e-mail: miss.anastasia-box@yandex.ru

Vereschagina S.V., <https://orcid.org/0000-0003-4460-8838>, e-mail: vereschagina_sv@skc-fmba.ru

Pokhabov D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3355-6278>, e-mail: neurodmit@mail.ru

Received 14.11.2020

Accepted 27.04.2021

Сокращения: БП — болезнь Паркинсона; БГ — болезнь Гоше; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота; ОНЗ — однонуклеотидная замена; ЧС — черная субстанция; ЭДТА — этилендиаминтетраацетат; MLPA — мультиплексная лигандзависимая

амплификация зонда; NCBI — The National Center for Biotechnology Information.

Введение. Болезнь Паркинсона (БП) является распространенным нейродегенеративным заболеванием, частота встречаемости среди лиц старше

60 лет составляет 1–2%, около 17% случаев заболевания обнаруживается до 50 лет, то есть поражается трудоспособная часть населения [1].

Развитие двигательных симптомов БП (ригидность, тремор, брадикинезия, поздние нарушения) коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (ЧС) мозга, что приводит к падению концентрации дофамина в стриатуме. Симптомы БП проявляются при гибели 80% дофаминергических нейронов ЧС мозга человека [2]. Современная медицина вынуждена ограничиваться симптоматической и заместительной терапией.

Хотя большинство случаев заболевания являются спорадическими, около 15% больных имеют семейную форму БП, когда заболевание имело место у нескольких родственников из одного или разных поколений [3]. Большая часть случаев БП имеет мультифакторную природу. К вероятным эндогенным причинам развития БП относятся мутации около 20 генетических локусов [4,5]. Широко обсуждается роль в патогенезе БП митохондриальной дисфункции и ассоциированных с ней мутаций в генах PARK2, PINK1 (локус PARK6), DJ1 (PARK7), LRRK2 (PARK8). Мутации в тех или иных генах чаще обнаруживаются при раннем развитии заболевания и в семейных случаях.

Мутации в гене PARK2, кодирующем белок паркин, являются одной из самых частых причин развития аутосомно-рецессивной формы БП с ранним началом (50%), а также часто встречаются при спорадических случаях заболевания с ранним началом (15%). Паркин представляет собой большой ген с более чем 200 известными мутациями, рассеянными по всем двенадцати экзонам. Примерно 50% из них — это небольшие (точечные) мутации, остальные же 50% — это геномные перестройки (крупные делеции и/или дупликации). При исследовании российских пациентов с БП частота встречаемости мутаций в гене паркина составила 35% [6], для китайских пациентов — 75% [7], а для пациентов из Нидерландов — 83% [8].

Среди пациентов с наследственной аутосомно-доминантной формой БП нередко встречаются мультипликации гена SNCA, кодирующего белок α -синуклеин [9]. Тяжесть заболевания коррелирует с числом копий гена: у пациентов с дупликацией гена SNCA начало заболевания приходилось на возраст старше 40 лет и не отличалось от идиопатической БП. При наличии трипликации гена SNCA наблюдается раннее начало БП (до 40 лет). Частота больных семейной формой БП, обусловленной мультипликациями гена SNCA, в различных популяциях в среднем составляет 1,4%. При спорадической форме БП частота больных с дупликациями и трипликациями гена SNCA в среднем составляет 0,3% [10]. Также описаны крайне редко встречающиеся (< 1%) у людей с БП точечные мутации гена (A53T, A30P, E46K). Для российских пациентов с БП была показана частота встречаемости дупликаций SNCA 0,6% [11].

Мутации в гене LRRK2, кодирующем белок дардарин, выявлены в семьях с аутосомно-доминантной

формой БП в различных популяциях. Они обнаруживаются также при спорадической форме заболевания и являются частой генетической причиной развития БП. Наиболее распространенной из всех описанных в гене LRRK2 мутаций среди пациентов с БП является однонуклеотидная замена (ОНЗ) G2019S [12]. В европейских популяциях мутацию G2019S обнаруживают в 5–7% семейных и 0,6–1,6% спорадических случаев БП. В различных популяциях мира суммарная частота мутаций в гене LRRK2 может достигать в среднем 1,7–15% при семейных и 0,4–3,6% при спорадических случаях БП [13, 14]. Более того, эти оценки являются заниженными, поскольку в связи с большим размером гена LRRK2 (51 экзон), проведенный в большинстве исследований скрининг базировался лишь на анализе отдельных наиболее часто мутирующих экзонов либо даже отдельных мутаций. Среди российских пациентов с БП частота LRRK2 G2019S составила 0,7% для спорадической формы и 7,7% для семейной БП [15].

Аутосомно-рецессивные семейные формы БП, обусловленные мутациями в гене PTEN-индуцированной киназы 1-го типа (PINK1), характеризуются ранним началом заболевания. Большинство мутаций в гене PINK1 составляют ОНЗ или небольшие инсерции/делеции. В целом частота встречаемости мутаций в этом гене составляет до 8% у пациентов с БП разных популяций [16].

В редких случаях причиной БП с аутосомно-рецессивным типом наследования, ранним началом и медленным прогрессированием выступают мутации в гене DJ-1 (локус PARK7). Например, делеция экзонов 1–5 гена, полностью блокирующая синтез белка, и миссенс-замена L166P, приводящая к быстрой деградации фермента. В целом мутации в PARK7 встречаются не более чем в 1–2% случаях ранней формы болезни Паркинсона [17]. Согласно исследованию [18], среди российских пациентов также были выявлены случаи делеции экзона 3 гена PARK7.

Также сообщалось о генетических вариантах UCHL1, которые находили в отдельных семьях с БП. Например, ОНЗ I93M была ассоциирована с аутосомно-доминантным типом наследования [28]. В целом остается открытым вопрос о том, насколько существенна роль гена UCHL1 в развитии БП. Тем не менее показано, что нарушение функционирования фермента UCHL1 приводит к развитию процессов нейродегенерации у мышей [19].

Мутации в гене лизосомальной 5P-типа АТФазы (ATP13A2) редко выявляются и ассоциированы с развитием синдрома Куфора–Рейкеба — рецессивного атипичного паркинсонизма с ранним началом, деменцией и прогрессирующей нейродегенерацией.

В некоторых случаях мутации в гене ГТФ циклогидролазы 1 (GCH1), первого фермента цикла биосинтеза тетрагидробиоптерина, приводят к развитию паркинсоноподобного фенотипа — неклассической картине ДОФА-зависимой торзионной дистонии. В исследовании по секвенированию экзона [20] было показано, что частота мутаций в GCH1 была

значительно выше в группе пациентов с БП (0,52%), чем среди здоровых лиц (0,15%).

В отдельную группу выделены гены, мутации в которых предрасполагают к развитию заболевания при воздействии дополнительных факторов. На сегодняшний день мутации в гене GBA рассматриваются как один из ведущих генетических факторов, ассоциированный с 5-кратным увеличением риска развития первичного паркинсонизма [21]. Распространенность GBA-ассоциированной формы БП в европейских популяциях составляет 4–5% всех случаев заболевания [22]. В исследовании на российских пациентах частота двух наиболее частых мутаций в гене GBA — N370S и L444P — составила 1,85% [23]. Ген GBA картирован в локусе 1q21, кодирует лизосомальный фермент глюкоцереброзидазу, катализирующую реакцию расщепления гликолипида глюкоцереброзида на глюкозу и церамид. Гомозиготные мутации в данном гене обуславливают развитие болезни Гоше (БГ) — наиболее распространенной из класса лизосомных болезней накопления [24]. В гене GBA известно около 300 мутаций, большинство из них находятся в области экзонов 8–11, и только половина из них являются генетически значимы для БГ [21]. Гетерозиготное же носительство данных мутаций ассоциировано с развитием БП, что показано в многочисленных исследованиях [29–31]. Также известны варианты, в гомозиготном виде не приводящие к развитию БГ, но, вероятно, повышающие риск развития БП в 1,5–2 раза как в гомо-, так и в гетерозиготном вариантах, например E326K и T369M [21].

Цель исследования: анализ мутаций и полиморфизмов в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL, GCH1 и GBA среди пациентов Красноярского региона с диагнозом БП.

Материал и методы

Дизайн исследования: открытое неконтролируемое одноцентровое обсервационное одномоментное исследование.

В исследование включались пациенты, имевшие все критерии включения и не имевшие ни одного критерия исключения. **Критерии включения:** 1) возраст старше 18 лет; 2) пациент способен прочитать информационный листок пациента и добровольно подписать информированное согласие; 3) у пациента установлен диагноз БП в соответствии с «Критериями банка мозга Общества болезни Паркинсона Великобритании»; 4) возраст на момент дебюта заболевания (появления моторных симптомов) до 50 лет и/или указание на наличие БП у кровных родственников. **Критерии исключения:** 1) отказ пациента; 2) данные о наличии у пациента другого нейродегенеративного заболевания, нежели БП; 3) отсутствие технической возможности для проведения венопункции (поражение поверхностных вен, воспаление кожных покровов).

В исследование были включены 60 пациентов с подтвержденным диагнозом БП, поступивших на консультативный прием в ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр

Федерального медико-биологического агентства» (г. Красноярск). Из них 27 пациентов имели семейную форму заболевания, 33 пациента — спорадическую. Молекулярно-генетическая часть работы выполнялась на базе «Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований» Сибирского федерального университета (г. Красноярск).

Исследование проводилось в период с февраля 2019 года по июль 2019 года.

Всем пациентам был осуществлен забор 2 мл цельной венозной крови в пробирку-вакутейнер с антикоагулянтом ЭДТА.

Геномная ДНК выделялась из лейкоцитов цельной крови пациентов с помощью набора Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega»). Исследование ДНК пациентов на наличие мутаций, вовлеченных в патогенез БП, проводили с помощью MLPA-анализа и секвенирования по Сэнгеру. Оба метода проводились на генетическом анализаторе с функцией капиллярного электрофореза AB 3500 («Applied Biosystems»). Для выявления делеций и дупликаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL, GCH1, а также точечных мутаций A30P в гене SNCA и G2019S в гене LRRK2 методом MLPA-анализа использовались коммерческие наборы SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 и SALSA MLPA P052 Parkinson mix 2 («MRC-Holland», The Netherlands). Для анализа мутаций в экзонах 8–11 гена GBA амплифицирующая ПЦР проводилась с использованием TaqMan Fast Advanced Master Mix («Applied Biosystems»). Очистку продуктов ПЦР проводили ферментами ExoSAP-IT («Applied Biosystems»), секвенирующую ПЦР — с использованием набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems»). Чистка продуктов после секвенирующей ПЦР проводилась набором BigDye® X Terminator™ Purification Kit («Applied Biosystems»).

Чтобы исключить влияние на достоверность полученных результатов псевдогена GBAP1, обладающего 96% гомологичностью с последовательностью гена GBA и включающего в свою нормальную последовательность некоторые мутантные для GBA варианты, нами был использован метод вложенной (или гнездовой) ПЦР с участием нескольких пар праймеров (табл. 1).

Проверка специфичности пар праймеров проводилась с помощью программы Primer-BLAST (NCBI).

Этическая экспертиза: проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом при ФГБУ «Федеральный сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Красноярск).

Статистический анализ: размер выборки предварительно не рассчитывался. Для анализа данных MLPA-анализа использовалось программное обеспечение Coffalyser.Net (<https://support.mlpa.com/downloads/files/coffalyser-net-reference-manual>), которое обеспечивает оценку качества для каждой

Таблица 1

Праймеры, используемые при секвенировании гена GBA

Праймер	Forward, 5'–3'	Reverse, 5'–3'
1. ПЦР Экзоны 8–11	TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG	ACCACCTAGAGGGGAAAGTG
2. Секвенирующая ПЦР экзоны 8–9 экзоны 10–11	TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG GGGTGACTTCTTAGATGAGG	GTGATGTAAGCCATCCGATG ACCACCTAGAGGGGAAAGTG

Table 1

Primers used in the GBA gene sequencing

Primer	Forward, 5'–3'	Reverse, 5'–3'
1. PCR of 8–11 exons	TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG	ACCACCTAGAGGGGAAAGTG
2. Sequencing PCR 8–9 exons 10–11 exons	TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG GGGTGACTTCTTAGATGAGG	GTGATGTAAGCCATCCGATG ACCACCTAGAGGGGAAAGTG

реакции и помогает интерпретировать контрольные фрагменты, включенные в каждый набор SALSA MLPA.

Результаты. В исследование были включены 18 (30%) мужчин и 42 (70%) женщины в возрасте от 20 до 83 лет на момент обследования.

При проведении MLPA-анализа с использованием наборов SALSA MLPA P051 и P052 ни у одного из 60 пациентов не выявлено делеций и дупликаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL и GCH1, а также точечных мутаций A30P в гене SNCA и G2019S в гене LRRK2. Анализ гена GBA выявил 6 различных вариантов изменений структуры ДНК в анализируемых экзонах у 9 из 60 обследуемых пациентов (табл. 2).

Обсуждение

В ходе проведения данной работы ни у кого из пациентов с диагнозом БП не было выявлено крупных делеций и дупликаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATP13A2, PARK7, LRRK2, UCHL и GCH1, а также точечных мутаций A30P в гене SNCA и G2019S в гене LRRK2. Нужно отметить, что диапазон ассоциированных с БП мутаций в вышеупомянутых генах очень разнообразен. При этом распространенность крупных делеций и инсерций, хоть и различна для разных генов, форм и возраста начала заболевания, но в целом достаточно высока. Такого типа мутации (крупные делеции и дупликации) не могут быть определены методом секвенирования, но выявляются методом MLPA-анализа. В связи с этим MLPA-анализ часто используется учеными для изучения ассоциированных с БП мутаций. Так, например, иранские исследователи при проведении аналогичной работы с использованием наборов SALSA MLPA P051 и P052 показали, что какие-либо геномные перестройки были обнаружены у 14 из 102 (13,7%) неродственных спорадических пациентов с ранним началом и у 18 из 51 (35,3%) семьи с БП [25]. В работе нидерландских ученых также при использовании наборов SALSA MLPA P051 и P052 показано, что перестройки в гене паркин выявлены у 13 из 116 (11%) пациентов с ранним началом БП [8]. Авторы из Китая при проведении MLPA-анализа для гена паркин показали, что геномные перестройки

обнаружены у 25 из 755 (3,3%) пациентов со спорадическими случаями БП из общей группы пациентов без учета возраста, при этом для пациентов с ранним началом заболевания эта цифра составила 11,4% [7]. При исследовании российских пациентов с использованием набора SALSA MLPA P051 частота встречаемости соответствующих мутаций составила 6,5%, хотя в группе обследованных больных была несколько большая доля случаев с ранним началом и с отягощенным семейным анамнезом по БП, поэтому полученные значения могут рассматриваться как ориентировочные [26].

Известно, что для гена GBA наиболее распространенными ОНЗ, ассоциированными с БП, являются L444P («тяжелая» мутация, в значительной мере снижающая активность β-глюкоцереброзидазы) и N370S («мягкая» мутация, которая приводит к незначительному уменьшению активности кодируемого фермента) [21]. По этой причине во многих аналогичных исследованиях проводился поиск только этих двух мутаций, однако в настоящем исследовании мутация N370S не была обнаружена ни у одного пациента, что может являться генотипической особенностью сибирской популяции. Относительная частота полиморфного варианта T369M среди пациентов нашей выборки составила 5% и оказалась наиболее высокой по сравнению с относительными частотами остальных вариантов.

Среди 60 обследованных нами пациентов какие-либо изменения первичной структуры ДНК в гене GBA выявлены у 9 пациентов. Так, у пациентки №1 была выявлена одна из наиболее значимых «тяжелых», то есть в значительной степени снижающих активность β-глюкоцереброзидазы, мутаций в экзоне 10 GBA — L444P в гетерозиготном состоянии. Кроме этого, в экзоне 8 обнаружен полиморфный вариант T369M в гетерозиготном состоянии, который незначительно снижает активность фермента и в гомозиготном виде не приводит к БГ. У данной пациентки наблюдается ранний возраст манифестации заболевания — 45 лет, длительность заболевания составляет 5 лет. У пациента №2 также выявлена «тяжелая» мутация L444P в гетерозиготном состоянии и в экзоне 8 GBA обнаружен полиморфный вариант

Таблица 2

Выявленные варианты мутаций и полиморфизмов в гене GBA

№	Возраст	Пол	Возраст дебюта (длительность, лет)	Мутация или полиморфизм	Характер заболевания	Кол-во пациентов
1	49	ж	44 (5)	L444P (rs421016, экзон 10, гетерозиготный вариант) — «тяжелая» мутация, ассоциированная с БП; T369M (rs75548401, экзон 8, гетерозиготный вариант) полиморфизм, возможно ассоциированный с БП	спорадический	1 (1,66%)
2	33	м	30 (3)	L444P (rs421016, экзон 10, гетерозиготный вариант) — «тяжелая» мутация, ассоциированная с БП; E326K (rs2230288, экзон 8, гетерозиготный вариант) — полиморфизм, возможно ассоциированный с БП	семейный	1 (1,66%)
3	47	м	44 (3)	D409H (rs1064651, экзон 9, гетерозиготный вариант) — «тяжелая» мутация, ассоциированная с БП	семейный	1 (1,66%)
4	53	м	51 (2)	T369M (rs75548401, экзон 8, гетерозиготный вариант) — полиморфизм, возможно ассоциированный с БП	семейный	3 (5%)
5	79	ж	65 (14)		семейный	
6	50	ж	45 (5)		спорадический	
7	61	ж	55 (6)	V460V (c.1497G > C, rs1135675, экзон 10) — часть комплексной мутации RecNcil, (p.L444P; p.A456P; p.V460V), ассоциированной с БП	гетерозиготный вариант	2 (3,33%)
8	37	ж	36 (1)		гомозиготный вариант	
9	66	ж	56 (10)	c.*92G > A (rs708606, экзон 11, гетерозиготный вариант) — 3'-UTR полиморфизм, возможно ассоциированный с БП	спорадический	1 (1,66%)

Table 2

Detected variants of mutations and polymorphisms in the GBA gene

№	Age	П Sex	Onset age (duration, years)	Mutation or polymorphism	Nature of disease	Number of patients
1	49	F	44 (5)	L444P (rs421016, exon 10, heterozygous variant) — “severe” mutation associated with PD; T369M (rs75548401, exon 8, heterozygous variant) polymorphism, possibly associated with PD	sporadic	1 (1.66%)
2	33	M	30 (3)	L444P (rs421016, exon 10, heterozygous variant) — “severe” mutation associated with PD; E326K (rs2230288, exon 8, heterozygous variant) — polymorphism, possibly associated with PD	familial	1 (1.66%)
3	47	M	44 (3)	D409H (rs1064651, exon 9, heterozygous variant) — «severe» mutation associated with PD	familial	1 (1.66%)
4	53	M	51 (2)	T369M (rs75548401, exon 8, heterozygous variant) — polymorphism, possibly associated with PD	familial	3 (5%)
5	79	F	65 (14)		familial	
6	50	F	45 (5)		sporadic	
7	61	F	55 (6)	V460V (c.1497G > C, rs1135675, exon 10.) — part of RecNcil macromutation, (p.L444P; p.A456P; p.V460V) associated with PD	heterozygous variant	2 (3.33%)
8	37	F	36 (1)		homozygous variant	
9	66	F	56 (10)	c.*92G > A (rs708606, exon 11, heterozygous variant) — 3'-UTR polymorphism, possibly associated with PD	sporadic	1 (1.66%)

E326K в гетерозиготном состоянии, который так же, как и вариант T369M, снижает активность фермента в незначительной степени и в гомозиготном виде не приводит к БГ. У пациента имеет место раннее начало заболевания — 30 лет, длительность заболевания составляет 3 года. Отец больного наблюдался с диагнозом БП, дебют заболевания в 52 года, течение болезни тяжелое, в течение 4 лет инвалидизировался, умер в 60 лет. У пациента №3 выявлена мутация D409H в гетерозиготном состоянии, которая тоже расценивается как «тяжелый», ассоциированный с БП вариант. Манифестация заболевания в 44 года, длительность заболевания составляет 3 года. У трех пациенток: №4, №5 и №6 был обнаружен полиморфный вариант T369M в гетерозиготном состоянии. Возраст манифестации заболевания у данных

пациенток — 51, 65 и 50 лет, длительность заболевания составляет 2, 14 и 5 лет, соответственно. Пациентке №4 помимо клинических методов обследования была проведена транскраниальная сонография черной субстанции, выявившая гиперэхогенность в объеме 0,22 см³ слева (справа гиперэхогенность не определяется). У пациентки №7 обнаружен синонимичный вариант V460V в гетерозиготном состоянии, входящий в состав комплексной мутации RecNcil (p.L444P; p.A456P; p.V460V), образованной в результате рекомбинации между геном и псевдогеном. Двух других ОНЗ p.L444P и p.A456P, входящих в состав RecNcil, у пациентки не выявлено. По литературным данным, RecNcil в гомозиготном состоянии ассоциирована с БГ, но в то же время мы не встретили данных об ассоциации отдельно V460V с БП, как

показано для некоторых других вариантов (например, L444P и N370S). При мутации V460V происходит замена третьего нуклеотида в триплете GTG (G меняется на C) и из-за вырожденности генетического кода не происходит замены аминокислоты. У данной пациентки №7 имеется подтвержденный диагноз БП, возраст начала заболевания пациентки — 55 лет, длительность заболевания составляет 6 лет. У пациентки №8 также выявлен вариант V460V, но в гомозиготном состоянии. Двух других вариантов p.L444P и p.A456P, входящих в состав RecNciI, также не выявлено. У пациентки имеется подтвержденный диагноз БП, манифестация заболевания произошла в 36 лет, длительность заболевания составляет 1 год. У пациентки №9 выявлена ОНЗ с.*92G>A, о связи которой с БП лишь недавно появилась информация в научной литературе. Так, согласно исследованию V. Matheus и соавт. [27], подобные пограничные мутации (т.е. расположенные на границе экзон–интрон) также могут быть причиной развития двигательных симптомов БП. В приведенном исследовании у 8 пациентов с БП из 23 была обнаружена данная мутация, и у всех 8 пациентов был как минимум один двигательный симптом БП, однако не было значимой ассоциации между заменой и клиническими и лабораторными параметрами. Манифестация заболевания у данной пациентки произошла в 56 лет, длительность заболевания составляет 10 лет.

Считается, что GBA-ассоциированная БП не отличается фенотипически от идиопатической БП. Мы сравнили клиническое течение заболевания между группами пациентов с БП, имеющими и не имеющими какие-либо изменения в первичной структуре гена GBA. Каких-либо особенностей в клинической картине заболевания обнаружено не было, что согласуется с данными других исследований [21].

В литературе отмечается ассоциация «тяжелых» мутаций с ранним дебютом БП (до 50 лет), что подтверждается полученными нами данными, в частности для пациентов с мутациями L444P и D409H.

В целом можно отметить, что частота встречаемости патогенетически значимых вариантов гена GBA (L444P и D409H) в представленной когорте пациентов составила 5%, что соответствует литературным данным.

Заключение

В работе представлены данные генетического обследования 60 пациентов с БП из Красноярского региона. Анализ протяженных делеций и дупликаций в генах PARK2, PINK1, SNCA, ATRP3A2, PARK7, LRRK2, UCHL1 и GCH1, а также точечных мутаций A30P в гене SNCA и G2019S в гене LRRK2 проводился методом MLPA-анализа с использованием коммерческих наборов реагентов, разработанных фирмой MRC-Holland. Мутации в анализируемых генах среди обследованных пациентов не выявлены. Нужно учесть, что использованные нами коммерческие наборы позволяют анализировать не все возможные варианты мутаций в вышеперечисленных генах.

Анализ мутаций гена GBA в выборке пациентов Красноярского региона показал их сопоставимую с европейскими популяциями частоту встречаемости. При этом из двух мажорных мутаций гена GBA в нашей выборке пациентов не была выявлена мутация N370S. У одного пациента был выявлен редкий вариант rs708606, находящийся на границе экзон–интрон в некодирующей области гена, но возможно вносящий вклад в развитие БП. На сегодняшний день механизм влияния данной ОНЗ не выяснен.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовом обеспечении Государственного задания ФМБА России на тему: «Использование молекулярно-генетического анализа для оценки риска раннего развития нейродегенеративных заболеваний», а также с привлечением средств федерального бюджета Сибирского федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Левин О.С., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона. М.; МЕДпресс-информ, 2012:351. [Levin O.S., Fedorova N.V. Parkinson's disease. M., MEDpress-inform, 2012:351. (In Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=19562937>
2. Пчелина С.Н., Емельянов А.К., Усенко Т.С. Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене LRRK2. *Молекулярная биология*. 2014;48(1):1–10. [Pchelina S.N., Emelyanov A.K., Usenko T.S. Molecular basis of Parkinson's disease linked to LRRK2 mutations. *Molecular biology*. 2014;48(1):1–10. (in Russ.)]. https://elibrary.ru/download/elibrary_21141356_68298623.pdf
3. Gasser T. Update on the Genetics of Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 2007;22:343–350. <https://doi.org/10.1002/mds.21676>
4. Klein C., Lohmann-Hedrich K., Rogaeva E., Schlossmacher G.M., Lang E.A. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007;6:652–662. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70174-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70174-6)
5. Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov. Disord.* 2013;28:14–23. <https://doi.org/10.1002/mds.25249>
6. Illarioshkin S.N., Periquet M., Rawal N. Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Mov. Disord.* 2003;18(8):914–919. <https://doi.org/10.1002/mds.10467>
7. Guo J.-F., Dong X.-L., Xu Q., Li N., Yan X.-X., Xia K. et al. Exon dosage analysis of parkin gene in Chinese sporadic Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2015;604:47–51. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.07.046>
8. Elfferich P., Verleun-Mooijman M.C., Anneke Maat-Kievit J., van de Warrenburg B.P.C., Abdo W.F., Eshuis S.A. et al. Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogenetics*. 2011;12(4):263–271. <https://doi.org/10.1007/s10048-011-0302-9>
9. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003;302:841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>
10. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* 2009;18(1):48–59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp012>
11. Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрин М.И. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2007;1(1):23–31. [Illarioshkin S.N., Slominskiy P.A., Shadrina M.I. Heterogeneity of

- sporadic Parkinson's disease: molecular approach to solving the problem. *Annals of Clinical and Experimental Neurology*. 2007;1(1):23–31. (in Russ.).
12. Vitte J., Traver S., Maués De Paula A., Lesage S., Rovelli G., Corti O. et al. Leucinerich repeat kinase 2 is associated with the endoplasmic reticulum in dopaminergic neurons and accumulates in the core of Lewy bodies in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2010;69(9):959–972. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181efc01c>
13. Berg D., Schweitzer K.J., Leitner P., Zimprich A., Lichtner P., Belcredi P. et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2005;128:3000–3011. <https://doi.org/10.1093/brain/awh666>
14. Paisan-Ruiz C., Lang A.E., Kawarai T., Sato C., Salehi-Rad S., Fisman G.K. et al. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology*. 2005;65:696–700. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000167552.79769.b3>
15. Illarioshkin S.N., Shadrina M.I., Slominsky P.A. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *European Journal of Neurology*. 2007;14:413–417. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01685.x>
16. Tan E.-K., Yew K., Chua E., Puvan K., Shen H., Lee E. et al. PINK1 mutations in sporadic earlyonset Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2006;21:789–93. <https://doi.org/10.1002/mds.20810>
17. Hedrich K., Djarmati A., Schafer N., Hering R., Wellenbrock C., Weiss P.H. et al. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology*. 2004;62:389–394. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000113022.51739.88>
18. Филатова Е.В., Алиева А.Х., Шадрина М.И. Анализ мутаций у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014;1:3–4. [Filatova E.V., Alieva A.H., Shadrina M.I. Analysis of Mutations in Patients with Suspected Autosomal Dominant Form of the Parkinson Disease. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014;1:3–4. (in Russ.)].
19. Saigoh K., Wang Y.-L., Suh J.-G., Yamanishi T., Sakai Y., Kiyosawa H. et al. Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat. Genet.* 1999;23(1):47–51. <https://doi.org/10.1038/12647>
20. Mencacci N., Isaias I., Reich M., Ganos C., Polke J., Bras J. et al. Mutations in the GCH1 Gene Are Associated with Parkinson Disease. *Neurology*. 2014;82(10):17–23. https://n.neurology.org/content/82/10_Supplement/S17.001
21. Иллариошкин С.Н., Левин О.С. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Москва: «ЗАО РКИ Соверо пресс», 2014:405. [Illarioshkin S.N., Levin O.S. Parkinson's disease and movement disorders. Moskva: ЗАО «РКИ Соверо press», 2014:405. (In Russ.)]. <http://www.parkinsonizm.ru/?page=148>
22. Иллариошкин С.Н., Левин О.С. Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Москва, 2017:381 с. [Illarioshkin S.N., Levin O.S. Parkinson's disease and movement disorders. Moskva, 2017:381 p. (In Russ.)]. <http://www.parkinsonizm.ru/?page=171>
23. Ганькина О.А., Васенина Е.Е., Левин О.С. Особенности течения болезни Паркинсона при гетерозиготном носительстве мутаций в гене глюкоцеребросидазы А. *Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова*. 2016;6(2):71–76. [Gankina O.A., Vasenina E.E., Levin O.S. Characteristics of Parkinson's disease course in the heterozygous carriage of mutations in the glucocerebrosidase A gene. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016;6(2):71–76. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/jnevro20161166271-76>
24. Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Багыева Г.Х., Ключников С.А., Иванова-Смоленская И.А., Иллариошкин С.Н. Мутации в гене GBA при болезни Паркинсона. *Медицинская генетика*. 2011;10(5):22–27. [Abramycheva N.Y., Fedotova E.Y., Bagyeva G.K., Klyushnikov S.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Illarioshkin S.N. Mutations in the GBA gene in Parkinson's disease. *Medical Genetics*. 2011;10(5):22–27. (in Russ.)]. <https://elibrary.ru/item.asp?id=23026341>
25. Darvish H., Movafagh A., Omrani M.D., Firouzabadi S.G., Azargashb E., Jamshidi J. et al. B. Detection of copy number changes in genes associated with Parkinson's disease in Iranian patients. *Neuroscience Letters*. 2013;551:75–78. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.07.013>
26. Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Степанова М.С. Новый подход к молекулярно-генетическому скринингу у пациентов с болезнью Паркинсона. *Неврологический журнал*. 2016;1:13–16. [Abramycheva N.Y., Fedotova E.Y., Stepanova M.S. New approach to molecular and genetic screening of patients with Parkinson's disease. *Neurological journal*. 2016;1:13–16. (in Russ.)]. <https://doi.org/10.18821/1560-9545-2016-21-1-13-16>
27. Wilke M.V.M.B., Dornelles A.D., Schuh A.S., Vairo F.P., Basgalupp S.P., Siebert M. et al. Evaluation of the frequency of non-motor symptoms of Parkinson's disease in adult patients with Gaucher disease type 1. *Orphanet J Rare Dis*. 2019;14:103. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1079-4>
28. Leroy E., Boyer R., Auburger G. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*. 1998;395:451–452. <https://doi.org/10.1038/26652>
29. Clark L.N., Ross B.M., Wang Y., Mejia-Santana H., Harris J., Louis E.D. et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69:1270–1277. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02>
30. Mata I.F., Ali Samii, Schneer S.H. Roberts J.W., Griffith A., Leis B.C. et al. Glucocerebrosidase gene mutations: A risk factor for Lewy body disorders. *Arch. Neurol.* 2008;65:379–382. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.68>
31. Mitsui J., Mizuta I., Toyoda A., Ashida R., Takahashi Y., Goto J. et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2009;66:571–576. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.72>