



# Активность глюкоцереброзидазы и уровень $\alpha$ -синуклеина в крови у пациентов с GBA1-ассоциированной болезнью Паркинсона и бессимптомных носителей мутаций в гене GBA1

А.К. Емельянов<sup>1,2</sup>, Т.С. Усенко<sup>1,2</sup>, А.Э. Копытова<sup>1,2,3</sup>, И.В. Милюхина<sup>2,4</sup>, А.А. Тимофеева<sup>2</sup>, А.И. Безрукова<sup>1,2</sup>, Д.Г. Кулабухова<sup>1,2</sup>, Г.В. Байдакова<sup>5</sup>, М.А. Николаев<sup>1,2</sup>, А.О. Лавринова<sup>1</sup>, А.В. Кудреватых<sup>4</sup>, А.С. Журавлев<sup>1,2,3</sup>, Е.Ю. Захарова<sup>5</sup>, С.Н. Пчелина<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики имени Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия;

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup>Сургутский государственный университет, Сургут, Россия;

<sup>4</sup>Институт мозга человека имени Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>5</sup>Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия;

<sup>6</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

## Аннотация

**Введение.** Мутации в гене GBA1, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), являются наиболее распространённым генетическим фактором риска развития болезни Паркинсона (БП), в основе патогенеза которой лежит гибель дофаминергических нейронов чёрной субстанции головного мозга, ассоциированная с агрегацией белка  $\alpha$ -синуклеина. Однако не у всех носителей мутаций в гене GBA1 развивается БП в течение жизни.

**Целью** настоящего исследования являлась оценка активности GCase и уровня  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках в крови пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в гене GBA1 (GBA-БП), бессимптомных носителей мутаций в гене GBA1 (GBA-носители) и пациентов со спорадической формой БП (сБП), а также корреляции между изучаемыми параметрами в исследуемых группах.

**Материалы и методы.** В исследование включены пациенты с GBA-БП (n = 25) и сБП (n = 147), GBA-носители (n = 16). Контрольную группу составили здоровые лица (n = 154). Уровень  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках определяли путём иммуноферментного анализа, активность GCase в сухом пятне крови – высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандем-масс-спектрометрией.

**Результаты.** Выявлен повышенный уровень белка  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках крови в группе пациентов с GBA-БП, сБП, а также GBA-носителей по сравнению с контролем (p = 0,0043; p = 0,0002; p = 0,032 соответственно). Активность GCase была снижена у пациентов с GBA-БП и GBA-носителей по сравнению с пациентами с сБП (p = 0,0003; p = 0,003 соответственно) и контролем (p < 0,0001; p < 0,0001 соответственно). Однако обратная корреляция уровня  $\alpha$ -синуклеина и активности GCase наблюдалась только у пациентов с GBA-БП, но не у GBA-носителей.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о возможной функциональной взаимосвязи между активностью GCase и метаболизмом белка  $\alpha$ -синуклеина при БП, ассоциированной с мутациями в гене GBA1.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона; ген GBA1;  $\alpha$ -синуклеин; глюкоцереброзидаза; активность глюкоцереброзидазы; кровь

**Этическое утверждение.** Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации или сопоставимым нормам этики. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН (протокол № 1 от 26.11.2020).

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-123-05, Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 1023031500037-7-1.6.8; 1.6.1; 1.6.2; 1.6.3).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Адрес для корреспонденции:** 188300, Россия, Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1. НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ. E-mail: sopchelina@hotmail.com. Пчелина С.Н.

**Для цитирования:** Емельянов А.К., Усенко Т.С., Копытова А.Э., Милухина И.В., Тимофеева А.А., Безрукова А.И., Кулабухова Д.Г., Байдакова Г.В., Николаев М.А., Лавринова А.О., Кудреватых А.В., Журавлев А.С., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н. Активность глюкоцереброзидазы и уровень альфа-синуклеина в крови у пациентов с GBA1-ассоциированной болезнью Паркинсона и бессимптомных носителей мутаций в гене GBA1. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2024;18(3):50–57.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1106>

Поступила 20.03.2024 / Принята в печать 27.04.2024 / Опубликовано 30.09.2024

# Blood Glucocerebrosidase Activity and $\alpha$ -Synuclein Levels in Patients with GBA1-Associated Parkinson's Disease and Asymptomatic GBA1 Mutation Carriers

Anton K. Emelyanov<sup>1,2</sup>, Tatiana S. Usenko<sup>1,2</sup>, Alena E. Kopytova<sup>1,2,3</sup>, Irina V. Miliukhina<sup>2,4</sup>, Alla A. Timofeeva<sup>2</sup>, Anastasia I. Bezrukova<sup>1,2</sup>, Darya G. Kulabukhova<sup>1,2</sup>, Galina V. Baydakova<sup>5</sup>, Mikhail A. Nikolaev<sup>1,2</sup>, Anna O. Lavrinova<sup>1</sup>, Anastasia V. Kudrevatykh<sup>4</sup>, Alexandr S. Zhuravlev<sup>1,2,3</sup>, Ekaterina Yu. Zakharova<sup>5</sup>, Sofya N. Pchelina<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute named after B.P. Konstantinov, National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia;

<sup>2</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia;

<sup>3</sup>Surgut State University, Surgut, Russia;

<sup>4</sup>N.P. Bekhtereva Institute of the Human Brain, St. Petersburg, Russia;

<sup>5</sup>Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia;

<sup>6</sup>Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia

## Abstract

**Introduction.** Mutations in a GBA1 gene, which encodes a lysosomal enzyme called glucocerebrosidase (GCase), are the most common genetic risk factor for Parkinson's disease (PD). The pathogenesis of PD results from the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the brain, which is associated with the aggregation of  $\alpha$ -synuclein protein. However, not all GBA1 mutation carriers develop PD during their lifetime.

The **aim** of this study was to evaluate GCase activity and  $\alpha$ -synuclein levels in CD45<sup>+</sup> blood cells of patients with PD associated with GBA1 mutations (GBA1-PD), asymptomatic carriers of GBA1 mutations (GBA1-carriers), and patients with sporadic PD (sPD), as well as correlation between the study parameters in the study groups.

**Materials and methods.** The study included patients with GBA1-PD ( $n = 25$ ) and sPD ( $n = 147$ ), and GBA1-carriers ( $n = 16$ ). A control group included healthy volunteers ( $n = 154$ ). The level of  $\alpha$ -synuclein in CD45<sup>+</sup> cells was measured by enzyme-linked immunosorbent assay, and GCase activity in dried blood spots was detected by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

**Results.** Increased level of  $\alpha$ -synuclein protein was detected in CD45<sup>+</sup> blood cells of patients with GBA1-PD, sPD, and GBA1-carriers compared to controls ( $p = 0.0043$ ;  $p = 0.0002$ ;  $p = 0.032$ , respectively). Decreased GCase activity was reported in GBA1-PD patients and GBA1-carriers compared to sPD patients ( $p = 0.0003$ ;  $p = 0.003$ , respectively) and controls ( $p < 0.0001$ ;  $p < 0.0001$ , respectively). However, negative correlation between  $\alpha$ -synuclein levels and GCase activity was observed only in GBA1-PD patients, but not in GBA1-carriers.

**Conclusion.** Our data suggest a possible functional relationship between the activity of GCase and the metabolism of  $\alpha$ -synuclein in PD associated with GBA1 mutations.

**Keywords:** Parkinson's disease; GBA1 gene;  $\alpha$ -synuclein; glucocerebrosidase; glucocerebrosidase activity; blood

**Ethics approval.** All procedures performed in human studies comply with the ethical standards of the National Committee on Research Ethics and the Helsinki Declaration or comparable standards of ethics. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the N.P. Bekhtereva Institute of the Human Brain of the Russian Academy of Sciences (LEK Protocol No. 1, dated November 26, 2020). Informed voluntary consent was obtained from each of the participants included in the study.

**Source of funding.** The reported study was funded by Foundation for Scientific and Technological Development of Yugra according to the research project No. 2023-123-05 and Higher Education of the Russian Federation (1023031500037-7-1.6.8; 1.6.1; 1.6.2; 1.6.3).

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For correspondence:** 1 mkr. Orlova roshcha, Gatchina, 188300, Russia. E-mail: [sopchelina@hotmail.com](mailto:sopchelina@hotmail.com). Pchelina S.N.

**For citation:** Emelyanov A.K., Usenko T.S., Kopytova A.E., Miliukhina I.V., Timofeeva A.A., Bezrukova A.I., Kulabukhova D.G., Baydakova G.V., Nikolaev M.A., Lavrinova A.O., Kudrevatykh A.V., Zhuravlev A.S., Zakharova E.Yu., Pchelina S.N. Blood glucocerebrosidase activity and  $\alpha$ -synuclein levels in patients with *GBA1*-associated Parkinson's disease and asymptomatic *GBA1* mutation carriers. *Annals of clinical and experimental neurology*. 2024;18(3):50–57.

DOI: <https://doi.org/10.17816/ACEN.1106>

Received 20.03.2024 / Accepted 27.04.2024 / Published 30.09.2024

## Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – это распространённое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью дофаминергических нейронов головного мозга и ассоциированное с агрегацией в них белка  $\alpha$ -синуклеина. В основном БП является спорадическим заболеванием, однако в 10% случаев наблюдаетсяотягощённый семейный анамнез. Описан ряд генов, мутации в которых приводят к развитию наследственных форм БП [1, 2]. Мутации в гене *GBA1* являются фактором высокого риска БП и приводят к развитию *GBA*-ассоциированной БП (*GBA*-БП) с распространённостью до 10% среди пациентов с БП в зависимости от популяции [3–5].

Ген *GBA1* кодирует лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), который участвует в расщеплении лизосфинголипида глюкозилцерамида на глюкозу и церамид. Биаллельные мутации в гене *GBA1* приводят к развитию редкого аутосомно-рецессивного заболевания – болезни Гоше, сопровождающейся снижением активности GCase до 5–30% в зависимости от типа мутаций, а также накоплением её субстрата [3, 6, 7]. При гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA1* как у *GBA*-БП, так и у бессимптомных носителей мутаций в данном гене (*GBA*-носители) также наблюдается снижение ферментативной активности GCase и повышение концентрации лизосфинголипида глюкозилцерамида, но данные нарушения выражены в меньшей степени по сравнению с пациентами с болезнью Гоше [8–10]. Следует отметить, что не у всех носителей мутаций в гене *GBA1* происходит манифестация БП в течение жизни, и механизм патогенеза заболевания остаётся неясным.

В настоящее время предполагается двунаправленное влияние дисфункции GCase на уровень  $\alpha$ -синуклеина по механизму прямой–обратной связи [11, 12]. В экспериментах *in vitro* выявлено, что  $\alpha$ -синуклеин способен напрямую взаимодействовать с GCase, приводя к снижению её активности [13].

В ряде других исследований показано, что дисфункция GCase может приводить к накоплению  $\alpha$ -синуклеина в нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [11]. У модельных животных с дисфункцией GCase [14], а также в дофаминергических нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с *GBA*-БП [15, 16] и болезнью Гоше [15, 17] был выявлен повышенный уровень  $\alpha$ -синуклеина.

**Цель работы** – оценить уровень  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках и активность GCase в крови пациентов с *GBA*-БП, *GBA*-носителей, сБП и группы контроля, а также корреляцию между данными показателями в исследуемых группах.

## Материалы и методы

### Группы, включённые в исследование

В исследование были включены пациенты с *GBA*-БП (гетерозиготные носители мутаций в гене *GBA1*;  $n = 25$ ) и сБП ( $n = 147$ ), *GBA*-носители ( $n = 16$ ) и группа контроля ( $n = 154$ ). Постановка диагноза производилась на основании критериев Британского банка мозга [18] и Международного сообщества по двигательным расстройствам [19]. Пациенты с БП проходили обследование в Институте мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН и Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И.П. Павлова. В исследование были включены пациенты с сБП, ранее не принимавшие препараты L-ДОФА. Пациенты с *GBA*-БП получали терапию L-ДОФА.

Группа *GBA*-носителей ( $n = 16$ , неврологически здоровые лица с гетерозиготными мутациями в гене *GBA1*) была составлена из родственников пациентов с болезнью Гоше. Наличие мутаций было подтверждено прямым секвенированием ДНК по Сэнгеру. Все участники исследования проходили клинико-неврологическое обследование для исключения нейродегенеративных заболеваний. Лица контрольной группы ( $n = 154$ ) проходили обследование в Первом Санкт-Петербургском государственном медицинском университете им. акад. И.П. Павлова. У всех пациентов с сБП и лиц контрольной группы отсутствие распространённых мутаций *GBA1* (L444P, N370S, E326K) было подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции и рестрикционного анализа [5]. Контрольная и экспериментальные группы не различались по возрасту и полу.

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам Национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации или сопоставимым нормам этики. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН (протокол № 1 от 26.11.2020).

### Определение уровня $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках

CD45<sup>+</sup>-клетки выделяли из 8 мл периферической крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла («Ficoll-Paque PLUS», «GE Healthcare») с последующей магнитной сортировкой с использованием микрочастиц, конъюгированных с антителами к CD45<sup>+</sup>-рецепторам, и колонок miniMACS типа MS («Miltenyi Biotec»). Клеточную суспензию аликвотировали и замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Клетки лизировали с помощью набора для экстракции общего белка «Chemicon» («Millipore»). Концентрацию общего белка измеряли с помощью набора «Pierce BCA» («Thermo Scientific»). Уровень  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках определяли с помощью иммуоферментного анализа с использованием набора для детекции  $\alpha$ -синуклеина человека («Thermo Fisher Scientific»). Все образцы были выровнены по количеству общего белка (6 мкг) и оценены в 3 повторах. Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного спектрофотометра «XMark» («Bio-Rad»).

### Измерение активности GCase в крови

Активность GCase определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной

масс-спектрометрией в сухих пятнах крови [10]. Ферментативную активность оценивали путём измерения концентрации продукта, полученного в результате реакции фермента с субстратом: фермент (Ф) + субстрат (С) + (ФС комплекс) Ф + продукт.

Масс-спектрометрический анализ проводили на tandemном масс-спектрометре «API 3200 QTrap» («ABSciex») в режиме мониторинга множественных реакций. Активность рассчитывали исходя из предположения, что количество полученного продукта прямо пропорционально активности ферментов лизосом в сухом пятне крови.

В качестве контроля использованы образцы с известным уровнем активности ферментов, полученных из Центра по контролю и профилактике заболеваний США, которые были добавлены в каждый планшет.

### Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения R (версия 3.6.2). Соответствие полученных данных нормальному распределению было проверено с помощью критерия Шапиро–Уилка. Парное сравнение вариационных рядов осуществляли с использованием U-критерия Манна–Уитни. Значения

### Клинические характеристики и изучаемые параметры индивидуумов исследуемых групп

#### Clinical characteristics and study parameters of participants in study groups

Параметр   Parameter	Контроль Control	сБП   sPD	GBA-носители GBA carriers	GBA-БП, мутации   GBA-PD, mutations N370S, L444P, E326K	GBA-PD, mutations N370S, L444P
N	154 <sup>a</sup> 68 <sup>g</sup>	147 <sup>a</sup> 40 <sup>g</sup>	16 <sup>a</sup> 15 <sup>g</sup>	25	15
Пол (м/ж) Gender (M/F)	75/79 <sup>a</sup> 32/36 <sup>g</sup>	61/86 <sup>a</sup> 16/24 <sup>g</sup>	5/11 <sup>a</sup> 5/10 <sup>g</sup>	15/10	9/6
Возраст, лет Age, years (M ± SD)	62,02 ± 9,06 <sup>a</sup> 59,68 ± 8,76 <sup>g</sup>	63,36 ± 9,26 <sup>a</sup> 61,57 ± 8,56 <sup>g</sup>	53,93 ± 8,19 <sup>a</sup> 53,26 ± 8,31 <sup>g</sup>	61,74 ± 9,91	62,71 ± 11,19
Возраст начала, лет Age of onset, years (M ± SD)	N/A	59,32 ± 10,00 <sup>a</sup> 57,17 ± 8,91 <sup>g</sup>	N/A	57,32 ± 9,91	57,00 ± 11,20
Мутации в гене GBA1 GBA1 mutations	N/A	N/A	5 L444P/N <sup>a, g</sup> , 4 N370S/N <sup>a, g</sup> , 1 L326P/N <sup>a, g</sup> , 1 N227S/N <sup>a, g</sup> , 1 R159W/N <sup>a, g</sup> , 4 E326K/N <sup>a, g</sup> /3 E326K/N <sup>g</sup>	8 L444P/N, 7 N370S/N, 10 E326K/N	8 L444P/N, 7 N370S/N
Уровень $\alpha$ -синуклеина, нг/мл Levels of $\alpha$ -synuclein, ng/mL	6,56 (0,46–45,70)	9,28 (0,63–65,60), $p^* = 0,0002$	12,80 (1,22–41,30) $p^* = 0,032$	10,80 (0,68–51,40), $p^* = 0,0043$	12,90 (2,92–37,50), $p^* = 0,0014$
Активность GCase, мМ/л/ч GCase activity, mM/L/h	8,14 (1,55–32,10)	7,60 (3,33–14,70)	4,67 (2,33–10,40) $p^* = 3,9e-05$ $p^{**} = 0,003$	4,28 (1,51–13,20) $p^* = 5,1e-06$ $p^{**} = 0,00027$	4,40 (1,51–6,13) $p^* = 1,5e-06$ $p^{**} = 9,9e-05$

Примечание. <sup>a</sup>Исследование по оценке уровня  $\alpha$ -синуклеина; <sup>g</sup>исследование по оценке активности GCase. N/A — не определяли. \* $p$  — по сравнению с контролем; \*\* $p$  — по сравнению с сБП.

Note. <sup>a</sup>Assay of  $\alpha$ -synuclein levels; <sup>g</sup>Assay of GCase activity. N/A, not assessed. \* $p$  compared to the control group; \*\* $p$  compared to sPD patients.

$p < 0,05$  считали статистически значимыми. Корреляцию между исследуемыми группами оценивали с использованием коэффициента Спирмена. Клинические и экспериментальные данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ) и медиана (минимум–максимум) соответственно.

## Результаты

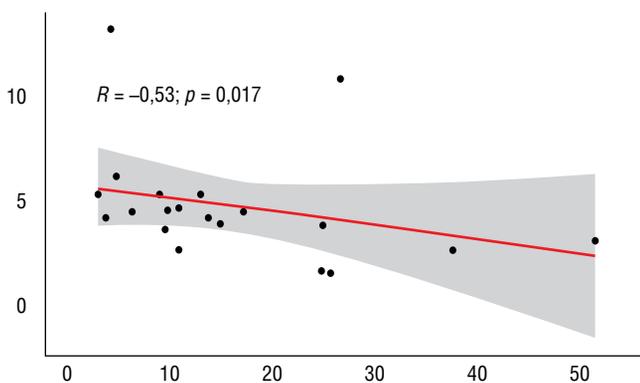
Клинические характеристики пациентов и лиц контрольной группы, участвовавших в исследовании, представлены в таблице. Поскольку риск БП у носителей мутаций *N370S*, *L444P* гена *GBA1* повышен в 6–7 раз, а в случае мутации *E326K* – в 2 раза, уровень  $\alpha$ -синуклеина и активность GCase были проанализированы как в группе пациентов с мутациями *N370S*, *L444P* (GBA-БП – *N370S*, *L444P*), так и в общей группе, включающей пациентов с БП с мутациями *N370S*, *L444P* и *E326K* (все\_GBA-БП).

В результате проведённого исследования показано, что уровень  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках пациентов групп все\_GBA-БП и GBA-БП, а также у GBA-носителей был повышен по сравнению с индивидуумами контрольной группы ( $p = 0,0043$ ;  $p = 0,0014$ ;  $p = 0,032$  соответственно;

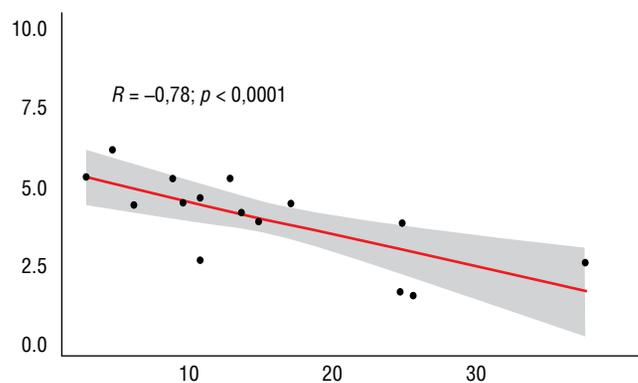
таблица). Уровень  $\alpha$ -синуклеина также был повышен у пациентов с сБП по сравнению с контрольной группой ( $p = 0,0002$ ). У пациентов с GBA-БП, а также у GBA-носителей наблюдалось снижение активности GCase по сравнению с пациентами с сБП ( $p = 0,0003$ ;  $p = 0,003$ ) и контрольной группой ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$ ; таблица), что согласуется с полученными ранее результатами [2].

Выявлена обратная корреляция между активностью GCase и уровнем  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках в крови у пациентов групп все\_GBA-БП ( $R = -0,53$ ;  $p = 0,017$ ), GBA-БП ( $R = -0,78$ ;  $p < 0,0001$ ), но не в группе GBA-носителей ( $R = -0,39$ ;  $p = 0,15$ ; рисунок). В группе пациентов с сБП на грани статистической значимости была выявлена обратная корреляция между активностью GCase и уровнем  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках ( $R = -0,3$ ;  $p = 0,057$ ; рисунок). В то же время в контрольной группе корреляции между исследуемыми параметрами не выявлено.

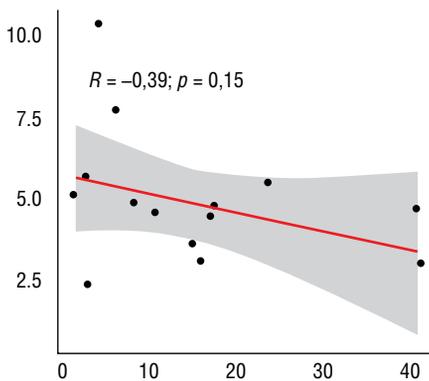
Корреляция между уровнем  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках и активностью GCase в крови пациентов групп все\_GBA-БП (A;  $n = 25$ ), GBA-БП (B;  $n = 15$ ), GBA-носителей (C;  $n = 15$ ), сБП (D;  $n = 40$ ) и группы контроля (E;  $n = 68$ ).



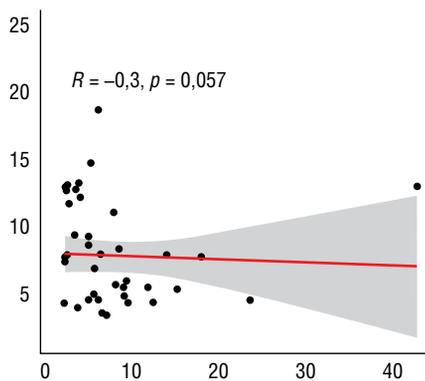
A



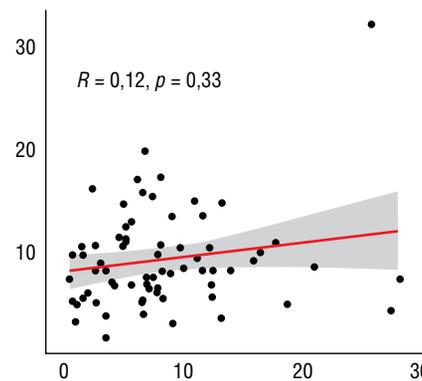
B



C



D



E

Корреляция между уровнем  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках и активностью GCase в крови пациентов групп все\_GBA-БП (A;  $n = 25$ ), GBA-БП (B;  $n = 15$ ), GBA-носителей (C;  $n = 15$ ), сБП (D;  $n = 40$ ) и группы контроля (E;  $n = 68$ ). По осям абсцисс – уровень  $\alpha$ -синуклеина, нг/мл, по осям ординат – активность GCase, мМ/л/ч.

Correlation between the level of  $\alpha$ -synuclein in CD45<sup>+</sup> blood cells and GCase activity in the all-GBA-PD group (A;  $n = 25$ ), the GBA-PD group (B;  $n = 15$ ), GBA carriers (C;  $n = 15$ ), sPD patients (D;  $n = 40$ ) and controls (E;  $n = 68$ ). Abscissa: level of  $\alpha$ -synuclein, ng/mL; ordinata: GCase activity, mM/L/h.

## Обсуждение

Молекулярный механизм развития GBA-БП остаётся неизвестным, однако предполагается, что дисфункция GCase и олигомеризация  $\alpha$ -синуклеина в клетках могут быть взаимосвязаны. В то же время мало изучен вопрос: снижение активности GCase и накопление лизосфинголипидов, а также изменение уровня  $\alpha$ -синуклеина в периферической крови предшествует развитию заболевания у носителей мутаций в гене *GBA1* или является следствием развития заболевания. В то же время изучение БП с известной этиологией, а также факторов, предшествующих и/или влияющих на развитие заболевания у носителей мутаций в гене *GBA1*, является крайне важным, поскольку позволит выделить биомаркеры заболевания и сформировать группы риска развития БП среди носителей *GBA1*-мутаций для включения данной когорты пациентов в клинические исследования с использованием таргетных препаратов, направленных на повышение активности GCase [3].

Нами впервые показано, что на фоне увеличения уровня  $\alpha$ -синуклеина и снижения активности GCase в клетках крови пациентов как с GBA-БП, так и GBA-носителей обратная корреляция уровня  $\alpha$ -синуклеина и активности GCase была характерна только для пациентов с GBA-БП, но не для GBA-носителей.

Следует отметить, что повышение уровня  $\alpha$ -синуклеина, а также снижение активности GCase в периферической крови ранее было выявлено в исследованиях пациентов с БП с мутациями в гене *GBA1* [8, 10, 15]. Так, M. Avenali и соавт. обнаружили повышение уровня  $\alpha$ -синуклеина в лимфоцитах периферической крови в группе GBA-БП по сравнению с пациентами с сБП и контролем [15]. Ранее нами показано повышение уровня олигомерного  $\alpha$ -синуклеина в плазме крови как у пациентов с болезнью Гоше, так и у пациентов с БП с мутациями гена *GBA1* и полиморфными вариантами гена *GBA1* по сравнению с контролем [9].

В настоящее время обсуждается наличие взаимосвязи между дисфункцией GCase и накоплением белка  $\alpha$ -синуклеина [11]. В исследованиях *in vitro* доказано прямое влияние лизосфинголипидов на агрегацию  $\alpha$ -синуклеина [12, 20]. Так, с использованием  $\alpha$ -синуклеина, выделенного из дофаминергических нейронов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, было показано, что субстрат GCase глюкозилцерамид индуцировал агрегацию  $\alpha$ -синуклеина, способствуя превращению его олигомерных форм в токсичные агрегаты определённой конформации [21]. Интересно отметить, что для оценки таких конформеров  $\alpha$ -синуклеина в биологических жидкостях организма человека при синуклеинопатиях в последние годы всё чаще применяется метод циклической амплификации белков с нарушенной конформацией [22]. В частности, применение этого подхода позволило M. Shah Nawaz и соавт. обнаружить специфические конформеры  $\alpha$ -синуклеина в образцах ликвора пациентов с синуклеинопатиями при отсутствии их в контроле [23]. В связи с этим можно предположить, что наблюдаемая нами обратная

корреляция активности GCase и уровня  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках крови пациентов с GBA-БП, а также отсутствие её в группе GBA-носителей могут быть обусловлены наличием в биологических образцах пациентов с БП патологических форм  $\alpha$ -синуклеина, чувствительных к снижению активности GCase. Обнаруженная нами обратная корреляция между активностью GCase и уровнем  $\alpha$ -синуклеина в крови на грани статистической значимости у пациентов с сБП, но не в контрольной группе, также может подтверждать данное предположение.

Данные по активности GCase в крови при сБП носят противоречивый характер [8, 24]. Нами было выявлено отсутствие различий в активности GCase у пациентов с сБП по сравнению с лицами контрольной группы.

В то же время обнаружено увеличение уровня  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках пациентов с сБП по сравнению с контролем, что согласуется с полученными ранее результатами [16]. В последние десятилетия обсуждается, что уровень  $\alpha$ -синуклеина периферических тканей может быть использован в качестве потенциального биомаркера БП [25], однако результаты многочисленных исследований противоречивы, что может объясняться различиями в применяемых методах, используемых антителах, а также других сопутствующих проведению эксперимента факторов. Несмотря на показанное в нашем исследовании повышение уровня  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках пациентов с сБП, использование данного маркера для дифференциальной диагностики БП не представляется возможным, поскольку полученные значения перекрываются между исследуемыми группами, а в группе здоровых носителей мутаций в гене *GBA1* выявлен даже более высокий уровень  $\alpha$ -синуклеина в CD45<sup>+</sup>-клетках, чем у пациентов с сБП. В ранее опубликованных исследованиях по оценке уровня  $\alpha$ -синуклеина в мононуклеарных клетках периферической крови не обнаружено различий в группе пациентов с сБП по сравнению с контрольной группой [15, 26, 27]. В связи с этим для оценки влияния уровня  $\alpha$ -синуклеина в мононуклеарных клетках периферической крови на развитие и прогрессирование БП необходимо проведение дальнейших исследований.

Следует отметить, что наше исследование обладает рядом как преимуществ, так и недостатков. Основным преимуществом является включение в него бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA1*, что позволило провести сравнительную характеристику исследуемых параметров в группе GBA-носителей с наличием БП и при его отсутствии. Использование гомогенной фракции CD45<sup>+</sup>-клеток периферической крови индивидуумов исследуемых групп для оценки уровня  $\alpha$ -синуклеина позволило нивелировать эффект влияния на него гемолиза эритроцитов. Ранее было показано, что при получении мононуклеарных клеток периферической крови с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола в них может обнаруживаться примесь эритроцитов, содержащих более 99% общего  $\alpha$ -синуклеина из всех клеток крови [28]. Кроме того, в наше исследование были включены па-

циенты с БП, не принимающие пре-параты L-ДОФА, что позволило исключить потенциальное влияние данных лекарственных средств на экспрессию гена  $\alpha$ -синуклеина [29]. Следует отметить, что в большинстве проведённых ранее исследований по оценке уровня  $\alpha$ -синуклеина в мононуклеарных клетках крови при БП влияние  $\alpha$ -синуклеина эритроцитов, а также приёма пациентами с БП L-ДОФА-содержащих препаратов не учитывалось.

Основным ограничением нашей работы является небольшой размер групп GBA-БП и GBA-носителей. Несмотря на то что средний возраст в группах GBA-БП и GBA-носителей

не различается, мы не можем исключить возможность того, что у кого-то из GBA-носителей проявятся клинические симптомы БП в течение жизни.

## Заключение

Полученные данные о наличии обратной корреляции уровня  $\alpha$ -синуклеина и активности GCase в крови носителей мутаций гена *GBA1* с БП, но не бессимптомных GBA-носителей позволяют предположить, что изменение уровня  $\alpha$ -синуклеина и активности GCase в крови носителей мутаций в гене *GBA1* может наблюдаться при появлении клинических проявлений БП.

## Список источников / References

- Balestrino R., Schapira A.H.V. Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* 2020;27(1):27–42. DOI: 10.1111/ene.14108
- Lill C.M. Genetics of Parkinson's disease. *Mol. Cell. Probes.* 2016;30(6):386–396. DOI: 10.1016/j.mcp.2016.11.001
- Do J., McKinney C., Sharma P., Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol. Neurodegener.* 2019;14(1):36. DOI: 10.1186/s13024-019-0336-2
- Sidransky E., Nalls M.A., Aasly J.O. et al. Multi-center analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(17):1651–1661. DOI: 10.1056/NEJMOA0901281
- Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C. et al. Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiol. Aging.* 2018;71:267e7–267e10. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.027
- Horowitz M., Pasmannik-Chor M., Ron I., Kolodny E.H. The enigma of the E326K mutation in acid  $\beta$ -glucocerebrosidase. *Mol. Genet. Metab.* 2011;104(1-2):35–38. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.07.002
- Montfort M., Chabás A., Vilageliu L., Grinberg D. Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: pathogenic changes and “modifier” polymorphisms. *Hum. Mutat.* 2004;23(6):567–575. DOI: 10.1002/HUMU.20043
- Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C. et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* 2015;138(Pt 9):2648–2658. DOI: 10.1093/BRAIN/AWV179
- Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G. et al. Oligomeric  $\alpha$ -synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 2017;636:70–76. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.10.039
- Kopytova A.E., Usenko T.S., Baydakova G.V. et al. Could blood hexosyl-sphingosine be a marker for Parkinson's disease linked with GBA1 mutations? *Mov. Disord.* 2022;37(8):1779–1781. DOI: 10.1002/MDS.29132
- Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y. et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and  $\alpha$ -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell.* 2011;146(1):37–52. DOI: 10.1016/j.cell.2011.06.001
- Fredriksen K., Aivazidis S., Sharma K. et al. Pathological  $\alpha$ -syn aggregation is mediated by glycosphingolipid chain length and the physiological state of  $\alpha$ -syn in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021;118(50):e2108489118. DOI: 10.1073/PNAS.2108489118/-/DCSUPPLEMENTAL
- Yap T.L., Velayati A., Sidransky E., Lee J.C. Membrane-bound  $\alpha$ -synuclein interacts with glucocerebrosidase and inhibits enzyme activity. *Mol. Genet. Metab.* 2013;108(1):56–64. DOI: 10.1016/j.ymgme.2012.11.010
- Mus L., Siani F., Giuliano C. et al. Development and biochemical characterization of a mouse model of Parkinson's disease bearing defective glucocerebrosidase activity. *Neurobiol. Dis.* 2019;124:289–296. DOI: 10.1016/j.nbd.2018.12.001
- Avenali M., Cerri S., Ongari G. et al. Profiling the biochemical signature of GBA-related Parkinson's disease in peripheral blood mononuclear cells. *Mov. Disord.* 2021;36(5):1267–1272. DOI: 10.1002/mds.28496
- Emelyanov A., Usenko T., Nikolaev M. et al. Increased  $\alpha$ -synuclein level in CD45<sup>+</sup> blood cells in asymptomatic carriers of GBA mutations. *Mov. Disord.* 2021;36(8):1997–1998. DOI: 10.1002/MDS.28688
- Fernandes H.J.R., Hartfield E.M., Christian H.C. et al. ER stress and autophagic perturbations lead to elevated extracellular  $\alpha$ -synuclein in GBA-N370S Parkinson's iPSC-derived dopamine neurons. *Stem. Cell Reports.* 2016;6(3):342–356. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.01.013
- Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1992;55(3):181–184. DOI: 10.1136/JNPNP.55.3.181
- Postuma R.B., Berg D., Stern M. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2015;30(12):1591–1601. DOI: 10.1002/MDS.26424
- Abdelkarim H., Marshall M.S., Scesa G. et al.  $\alpha$ -Synuclein interacts directly but reversibly with psychosine: implications for  $\alpha$ -synucleinopathies. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12462. DOI: 10.1038/s41598-018-30808-9
- Zunke F., Moise A.C., Belur N.R. et al. Reversible conformational conversion of  $\alpha$ -synuclein into toxic assemblies by glucosylceramide. *Neuron.* 2018;97(1):92–107.e10. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.12.012
- Bellomo G., De Luca C.M.G., Paoletti F.P. et al.  $\alpha$ -Synuclein seed amplification assays for diagnosing synucleinopathies: the way forward. *Neurology.* 2022;99(5):195–205. DOI: 10.1212/WNL.000000000000200878
- Shahnaawaz M., Mukherjee A., Pritzkow S. et al. Discriminating  $\alpha$ -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature.* 2020;578(7794):273–277. DOI: 10.1038/s41586-020-1984-7
- Alcalay R.N., Wolf P., Chiang M.S.R. et al. Longitudinal measurements of glucocerebrosidase activity in Parkinson's patients. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2020;7(10):1816–1830. DOI: 10.1002/ACN3.51164
- Abd Elhadi S., Grigoletto J., Poli M. et al.  $\alpha$ -Synuclein in blood cells differentiates Parkinson's disease from healthy controls. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2019;6(12):2426–2436. DOI: 10.1002/acn3.50944
- Fuchs J., Tichopad A., Golub Y. et al. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J.* 2008;22(5):1327–1334. DOI: 10.1096/fj.07-9348com
- Miki Y., Shimoyama S., Kon T. et al. Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging.* 2018;63:33–43. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.11.006
- Barbour R., Kling K., Anderson J.P. et al. Red blood cells are the major source of alpha-synuclein in blood. *Neurodegener. Dis.* 2008;5(2):55–59. DOI: 10.1159/000112832
- Schmitt I., Kaut O., Khazneh H. et al. (2015) L-DOPA increases  $\alpha$ -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients in vivo and in vitro. *Mov. Disord.* 30(13):1794–1801. DOI: 10.1002/mds.26319

## Информация об авторах

*Емельянов Антон Константинович* – канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; с. н. с. лаб. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3249-7889>  
*Усенко Татьяна Сергеевна* – канд. биол. наук, с. н. с. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; с. н. с. лаб. нанотехнологий ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5132-2283>

*Копытова Алена Эдуардовна* – канд. биол. наук, м. н. с. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; м. н. с. лаб. молекулярной биологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; м. н. с. Медицинского института Сургутского государственного университета, Сургут, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6557-0253>

*Милухина Ирина Валентиновна* – канд. мед. наук, руководитель Центра нейродегенеративных заболеваний Института мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия; с. н. с. лаб. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6433-542X>

*Тимофеева Алла Аркадьевна* – канд. мед. наук, доцент, руководитель Центра экстрапирамидных заболеваний кафедры неврологии ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1661-7753>

*Безрукова Анастасия Игоревна* – лаборант-исследователь лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; м.н.с. лаб. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3939-0758>  
*Кулабухова Дарья Геннадьевна* – канд. биол. наук, стажер-исследователь лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; м. н. с. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9700-0095>

*Байдакова Галина Викторовна* – канд. биол. наук, в. н. с. лаб. наследственных болезней обмена веществ Медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8806-5287>

*Николаев Михаил Андреевич* – м. н. с. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; м. н. с. лаб. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1952-4678>

*Лавринова Анна Олеговна* – м. н. с. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия, <https://orcid.org/0009-0007-2824-5762>

*Кудреватых Анастасия Владимировна* – канд. мед. наук, врач-невролог Центра нейродегенеративных заболеваний Института мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-1706-1718>

*Журавлев Александр Сергеевич* – лаборант-исследователь лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; м.н.с. лаб. медицинской генетики ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; лаборант-исследователь Медицинского института Сургутского государственного университета, Сургут, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-8495-5581>

*Захарова Екатерина Юрьевна* – д-р мед. наук, зав. лаб. наследственных болезней обмена веществ Медико-генетического научного центра им. акад. Н.П. Бочкова, Москва, Россия, <http://orcid.org/0000-0001-7938-7196>

*Пчелина Софья Николаевна* – д-р биол. наук, зав. лаб. молекулярной генетики человека НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ, Гатчина, Россия; зав. отделом молекулярно-генетических и нанобиологических технологий ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия; в. н. с. отдела биохимии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия <https://orcid.org/0000-0001-7431-6014>

**Вклад авторов:** Емельянов А.К., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н. – концепция и руководство работой; Копытова А.Э., Кулабухова Д.Г., Безрукова А.И., Байдакова Г.В., Николаев М.А., Лавринова А.О., Тимофеева А.А., Кудреватых А.В., Журавлев А.С., Милухина И.В. – проведение экспериментов и обсуждение результатов; Емельянов А.К., Усенко Т.С. – обработка данных, формальный анализ; Емельянов А.К., Усенко Т.С., Копытова А.Э., Пчелина С.Н. – написание текста, редактирование текста статьи.

## Information about the authors

*Anton K. Emelyanov* – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; senior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3249-7889>

*Tatiana S. Usenko* – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; senior researcher, Laboratory of nanotechnology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5132-2283>

*Alena E. Kopytova* – Cand. Sci. (Biol.), junior researcher, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; junior researcher, Laboratory of molecular biology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; junior researcher, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6557-0253>

*Irina V. Miliukhina* – Cand. Sci. (Med.), Head, Center for neurodegenerative diseases, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, Saint-Petersburg, Russia; senior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6433-542X>

*Alla A. Timofeeva* – Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof., Head, Center for extrapyramidal diseases, Department of neurology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1661-7753>

*Anastasia I. Bezrukova* – research assistant, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; junior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3939-0758>

*Darya G. Kulabukhova* – Cand. Sci. (Biol.), research intern, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; junior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9700-0095>

*Galina V. Baidakova* – Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of hereditary metabolic diseases, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8806-5287>

*Mikhail A. Nikolaev* – junior researcher, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; junior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1952-4678>

*Anna O. Lavrinova* – junior researcher, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia, <https://orcid.org/0009-0007-2824-5762>

*Anastasia V. Kudrevatykh* – Cand. Sci. (Med.), neurologist, N.P. Bechtereva Institute of the Human Brain, Saint-Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-1706-1718>

*Alexandr S. Zhuravlev* – research assistant, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; junior researcher, Laboratory of medical genetics, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; laboratory assistant, Medical Institute, Surgut State University, Surgut, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-8495-5581>

*Ekaterina Yu. Zakharova* – D. Sci. (Med), Head, Laboratory of hereditary metabolic diseases, Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7938-7196>

*Sofya N. Pchelina* – D. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of human molecular genetics, NRC “Kurchatov Institute” – PNPI, Gatchina, Russia; Head, Department of molecular genetics and nanobiological technologies, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia; leading researcher, Biochemistry department, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7431-6014>

**Author contribution:** Emelyanov A.K., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. – project administration, supervision, conceptualization; Kopytova A.E., Kulabukhova D.G., Bezrukova A.I., Baydakova G.V., Nikolaev M.A., Lavrinova A.O., Timofeeva A.A., Kudrevatykh A.V., Zhuravlev A.S., Miliukhina I.V. – investigation; Emelyanov A.K., Usenko T.S. – formal analysis, data curation; Emelyanov A.K., Usenko T.S., Kopytova A.E., Pchelina S.N. – writing, review, editing.