

УДК 616.248:616-002.5

ЭКЗОСОМЫ ПЛАЗМЫ КРОВИ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМАХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© 2021 г. Д. Г. Кулабухова^{a, b}, Л. А. Гараева^{a, c}, А. К. Емельянов^{a, b}, К. А. Сенкевич^{a, b},
Е. В. Грачева^d, И. В. Милохина^{a, b, d}, Е. Ю. Варфоломеева^{a, c}, А. А. Тимофеева^b,
А. Л. Шварцман^a, Т. А. Штам^{a, c}, С. Н. Пчелина^{a, b, c, d, *}

^aПетербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Научно-исследовательского центра
“Курчатовский институт”, Гатчина, 188300 Россия

^bПервый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, 197022 Россия

^cНаучно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

^dИнститут экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*e-mail: sopchelina@hotmail.com

Поступила в редакцию 07.08.2020 г.

После доработки 07.08.2020 г.

Принята к публикации 10.08.2020 г.

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, патогенез которого связан с накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина в нейронах черной субстанции головного мозга. Обсуждаются прионные свойства альфа-синуклеина. Предполагается, что экзосомы (микровезикулы размером 40–100 нм) могут играть ключевую роль в транспорте патогенных форм данного белка. Описаны наследственные формы заболевания, из которых наиболее распространена БП, ассоциированная с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (GBA-БП) и гене киназы 2, обогащенной лейциновыми повторами (LRRK2-БП). Цель настоящего исследования состояла в определении концентрации и размера экзосом плазмы крови у пациентов с GBA-БП, бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA*, а также влияния мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови. Экзосомы плазмы крови выделяли двумя методами: последовательным ультрацентрифугированием и химической преципитацией; концентрацию и размер экзосом оценивали с помощью анализа траекторий наночастиц (НТА). Уровень альфа-синуклеина экзосом оценивали методом иммуноферментного анализа. В исследование включены пациенты со спорадической формой болезни Паркинсона (сБП), в том числе с деменцией, пациенты с наследственными формами заболевания (GBA-БП и LRRK2-БП), а также бессимптомные носители мутаций в гене *GBA*. Показано повышение концентрации внеклеточных везикул плазмы крови пациентов с GBA-БП по сравнению с сБП, бессимптомными носителями мутации *GBA* и контролем ($p = 0.004, 0.019$ и 0.0001 соответственно), а также увеличение размера везикул плазмы крови у пациентов с GBA-БП по сравнению с бессимптомными носителями мутаций *GBA* и контролем ($p = 0.009$ и 0.0001 соответственно). Различий в концентрации альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови в разных группах не выявлено. Полученные результаты позволяют предположить, что дисфункции лизосомного фермента глюкоцереброзидазы влияют на пул экзосом плазмы крови, а также свидетельствуют об отсутствии корреляции между мутациями в генах *LRRK2* или *GBA* и уровнем альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови человека.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, экзосомы, *LRRK2*, *GBA*

DOI: 10.31857/S0026898421010092

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, частота которого составляет 1–2% среди лиц старше 60 лет. Описаны редкие

моногенные формы БП. Из аутосомно-доминантных форм наиболее распространена (до 7% среди семейных форм) БП, обусловленная мутациями в гене киназы 2, обогащенной лейциновыми

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; СМЖ – спинномозговая жидкость; LRRK2 – обогащенная лейциновыми повторами киназа 2; GBA – глюкоцереброзидаза; БПД – БП с деменцией; GBA-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*; LRRK2-БП – БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2*; сБП – спорадическая форма БП; БН-GBA – бессимптомные носители мутаций в гене *GBA*; УЦ – последовательное ультрацентрифугирование; ХП – химическая преципитация; НТА – анализ траекторий наночастиц; ТЕМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ми повторами (*LRRK2*) [1–3]. Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) считаются фактором высокого риска развития БП. В гомозиготном состоянии мутации приводят к развитию лизосомной болезни накопления — болезни Гоше. Многочисленные исследования, в том числе выполненные в российской популяции, показали, что у носителей мутаций в гене *GBA* риск развития БП повышен в 6–8 раз, эти мутации обнаруживаются у 4–5% пациентов с БП [1, 4].

В основе патогенеза БП лежит накопление и агрегация белка альфа-синуклеина в нейронах черной субстанции головного мозга. Альфа-синуклеин обнаружен также в периферических жидкостях организма человека, таких как спинномозговая жидкость (СМЖ), слюна, кровь и ее компоненты и др. Считается, что основной нейротоксический эффект при синуклеинопатиях имеют растворимые, или протофибрилярные формы альфа-синуклеина [5]. На данный момент установлен факт передачи альфа-синуклеина между клетками [6], рассматриваются различные способы переноса патогенных форм этого белка, в том числе в составе экзосом [5, 7]. Экзосомы — внеклеточные везикулы размером около 40–120 нм, секретируемые большинством типов клеток и присутствующие в различных биологических жидкостях (кровь, моча, слюна, СМЖ и др.) [8]. Предполагается, что уровень альфа-синуклеина экзосом периферических жидкостей организма (кровь, СМЖ, слюна) можно рассматривать в качестве потенциального маркера БП [9–11].

Пул экзосом, а также их белковый состав, может меняться при различных заболеваниях, в частности, при нарушении опосредованной лизосомами аутофагии, поскольку предполагается, что экзосомы осуществляют альтернативный лизосомам путь деградации молекул в клетке [12]. Известно, что киназа *LRRK2* участвует в опосредуемой шаперонами аутофагии [13]. Мутации в гене *LRRK2* могут влиять на белковый состав экзосом [14]. На клеточных линиях, а также на модельных животных показано влияние дисфункций *GBA* на биогенез лизосом и процесс аутофагии [15].

Недавно мы охарактеризовали особенности пула внеклеточных везикул у пациентов с болезнью Гоше и выявили изменение физических характеристик экзосом при данной патологии [16]. Влияние

мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на пул внеклеточных везикул при БП и уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови не исследован.

В данной работе определены концентрация и размер экзосом плазмы крови у пациентов с *GBA*-БП и у бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (БН-*GBA*), а также оценен уровень альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови пациентов с БП, включая наследственные формы (мутации в генах *LRRK2*, *GBA*), БП с деменцией (БПД) и БН-*GBA*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемые группы. В исследование вошли 63 пациента с установленным диагнозом БП, включая 15 с БПД, 9 — с *GBA*-БП (носители мутаций в гене *GBA*), пять — с *LRRK2*-БП (носители мутаций в гене *LRRK2*) и 34 пациента с сБП (табл. 1). Диагноз БП поставлен в соответствии с критериями Общества по изучению расстройств движения и БП от 2015 г. [17]. Пациентов обследовали в Научно-клиническом центре нейродегенеративных заболеваний Института экспериментальной медицины и в консультативно-диагностическом центре Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова. Скрининг мутаций L444P, N370S, 84GG в гене *GBA* и G2019S, R1441T/C в гене *LRRK2* проводили с использованием методов ПЦР и рестрикционного анализа или аллельспецифичной ПЦР с зондами TaqMan, описанными ранее [18–22].

Группа БН-*GBA* с отсутствием неврологических заболеваний состояла из 9 индивидов и была сформирована при обследовании родственников первой степени пациентов с болезнью Гоше. Мутации в гене *GBA* в данной выборке подтверждены ранее методом прямого секвенирования.

Контрольная группа, сформированная случайным образом из жителей того же географического региона, что и включенная в анализ группа пациентов с БП, состояла из 30 индивидов. Все члены этой группы проходили обследование у невролога с целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний. Проведение исследования одобрено локальными этическими комитетами указанных медицинских учреждений и проведено при подписании информированного согласия пациента.

Таблица 1. Характеристики исследуемых групп

Общие характеристики	сБП N = 34	GBA-БП N = 9	БН-GBA N = 10	LRRK2-БП N = 5	БПД N = 15	Контроль N = 30
Пол, мужчины, %	15 (44.1%)	4 (44.4%)	3 (33.3%)	1 (20%)	5 (33.3%)	16 (53.3%)
Возраст, лет	62.1 ± 8.5	61.4 ± 11.8	54.1 ± 9.8	71.2 ± 6.6	73.7 ± 8.2	63.5 ± 7.8
Возраст начала заболевания, лет	56.3 ± 7.1	55.4 ± 11.7	—	65.6 ± 7.0	63.5 ± 13.4	—

Выделение фракции внеклеточных везикул. Плазма периферической крови получена путем центрифугирования в течение 20 мин при 3000 об./мин. Внеклеточные микровезикулы выделяли двумя способами. Для оценки уровня альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови внеклеточные везикулы получали методом химической преципитации (ХП) из 200 мкл плазмы крови с использованием набора EchoPrep (“Lonza”, Эстония) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки размера и концентрации экзосом плазмы крови внеклеточные везикулы выделяли методом последовательного ультрацентрифугирования (УЦ). Образцы плазмы крови (в объеме 3 мл каждый) центрифугировали в течение 1 ч при 4°C при $16000 \times g$, далее супернатант смешивали с раствором PBS в соотношении 1 : 1, центрифугировали в течение 2 ч при 4°C при $100\,000 \times g$, осадок ресуспендировали в растворе PBS и повторно центрифугировали (2 ч при 4°C, $100\,000 \times g$). Полученные образцы внеклеточных везикул плазмы крови ресуспендировали в 100 мкл PBS, замораживали и хранили при -80°C .

Характеристика фракции внеклеточных везикул. Размеры, гомогенность и концентрацию везикул в полученных препаратах оценивали с помощью метода анализа траекторий наночастиц (nano-particle tracking analysis, NTA, “Malvern Instruments”, Великобритания). Количественный анализ экзосомального поверхностного маркера (тетраспанин CD9) на поверхности выделенных внеклеточных везикул проводили с помощью проточной цитометрии с использованием набора Echo-FACS (“Lonza”). Наличие поверхностных маркеров экзосом (CD63, CD81) подтверждено методом вестерн-блоттинга. В работе использовали первичные поликлональные антитела кролика к CD63 (1 : 300; ab216130, “Abcam”, Великобритания), CD81 (1 : 300; ab109201, “Abcam”) и вторичные козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 2500; ab205718, “Abcam”). Вторичные антитела, связанные с соответствующим белком на фрагментах мембраны, идентифицировали с использованием набора Amersham ECL TM PlusSystem (“Amersham”, Великобритания). Прямая визуализация везикул, полученных методом УЦ, проведена методом просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) с использованием цифровой фотокамеры Morada (“Olympus Inc”, Япония).

Оценка концентрации альфа-синуклеина в препаратах экзосом. Лизис экзосом проводили с использованием набора Total Protein Extraction Kit (“Chemicon” (“Milipore”), США). Концентрацию альфа-синуклеина в лизатах экзосом измеряли методом ИФА с использованием набора Sensolyte Anti-alpha-Synuclein Quantitative ELISA Kit (Human) (“AnaSpec”, США) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию альфа-синуклеина в образце определяли в трех повторах.

Концентрацию альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови определяли в 10 мкл лизата и нормировали по содержанию общего белка. Концентрацию общего белка оценивали с использованием набора Pierce BCA Protein Assay kit (“Thermo Scientific”, США).

Статистическая обработка результатов. Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро–Уилка. Различия между группами оценивали с помощью теста Манна–Уитни. Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения SPSS 12.0. Клинические и экспериментальные данные выражали как среднее значение и стандартная ошибка среднего или медиана (min–max) соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Группа пациентов с наследственными формами БП была частично описана нами ранее [1]. В настоящем исследовании проведен скрининг мутаций L444P, N370S гена *GBA* и G2019S, R1441T/C гена *LRRK2* в группе из 300 пациентов с БП. Всего обследовано 1050 пациентов. В исследование вошли 9 пациентов с GBA-БП, из которых пять были носителями мутации L444P, четыре – мутации N370S, и пять пациентов с LRRK2-БП (четверо носителей мутации G2019S и один – мутации R1441T/C). Не выявлено носителей мутации 84GG гена *GBA*. В группе БН-GBA выявлены два носителя мутации L444P, пять – N370S, по одному носителю мутаций G241R и N227S.

В ходе работы внеклеточные везикулы были выделены из плазмы периферической крови методом ХП и УЦ. Внеклеточные везикулы плазмы крови были охарактеризованы с использованием NTA, ТЕМ. Наличие поверхностных маркеров экзосом (CD9, CD63, CD81) подтверждено с помощью вестерн-блоттинга и проточной цитометрии (рис. 1). Средние размеры и концентрация везикул составили: при выделении методом УЦ – 123.87 ± 24.5 нм и $(18.4 \pm 1.4) \times 10^{12}$ частиц/мл; при выделении методом ХП – 100.38 ± 11.4 нм и $(13.73 \pm 5.29) \times 10^{12}$ частиц/мл. На рис. 1а, б приведены примеры распределения частиц по размеру при выделении везикул методами УЦ и ХП. Поверхностный маркер экзосом – тетраспанин CD9 – выявлен методом проточной цитометрии во всех образцах. На рис. 1в приведен пример визуализации поверхностных маркеров экзосом CD63 и CD81 методом вестерн-блоттинга во внеклеточных везикулах, выделенных методами УЦ и ХП. На рис. 1г представлена цитограмма экзосом, выделенных методом УЦ. Аналогичные данные

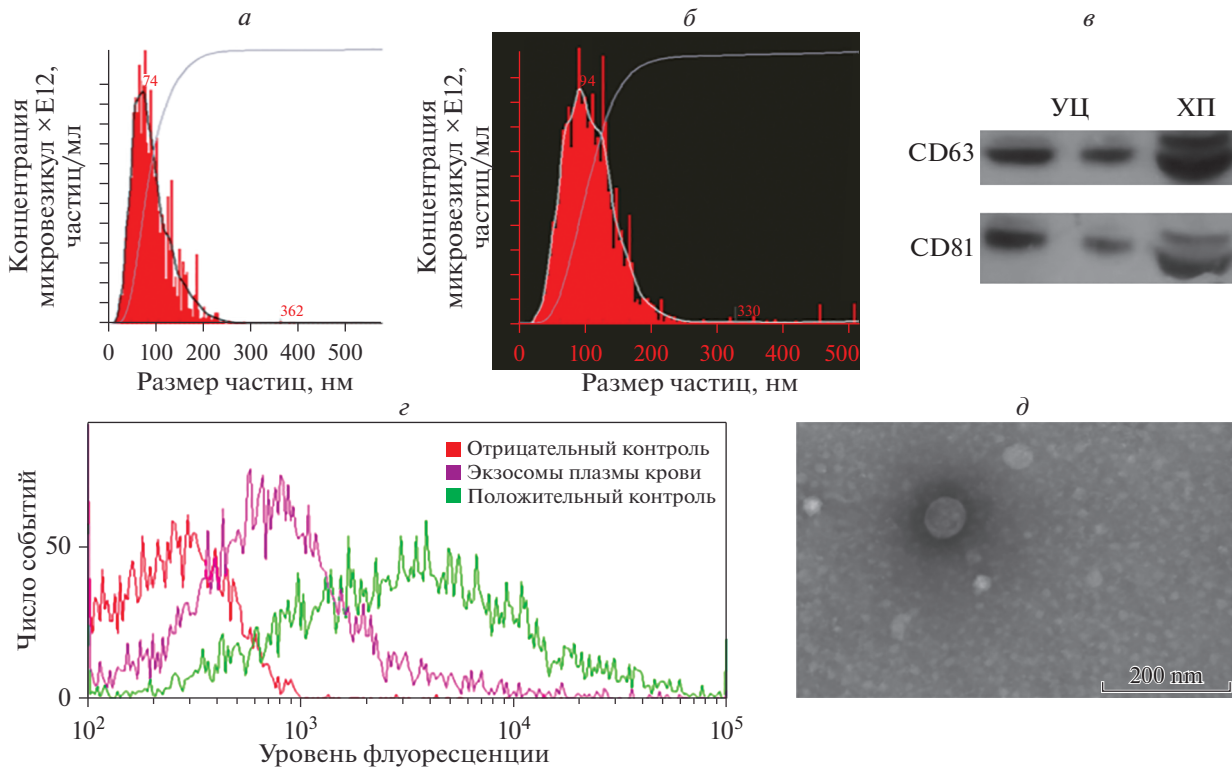


Рис. 1. Характеристика размера и концентрации внеклеточных везикул методом NTA (*a* – экзосомы, полученные методом УЦ, *б* – методом ХП), вестерн-блот тетраспанинов CD63 и CD81 в образцах везикул, полученных методами УЦ и ХП (*в*), количественная оценка поверхностного маркера экзосом, тетраспанина CD9, методом проточной цитометрии (пример экзосом, полученных методом УЦ) (*г*), визуализация экзосом, полученных методом УЦ, с помощью ТЕМ (*д*).

получены при выделении методом ХП. Визуализация везикул, полученных методом УЦ, проведена с помощью ТЕМ (рис. 1*д*). Везикулы имели округлую форму, при микроскопическом исследовании визуализировалась мембрана. Размер везикул, равный примерно 100 нм, а также представленность специфических поверхностных маркеров CD9, CD63 и CD81 позволили подтвердить присутствие экзосом.

В группах GBA-БП ($N = 9$), сБП ($N = 10$), БН-GBA ($N = 10$) и контроля ($N = 10$) проведено сопоставление количества и размера экзосом, полученных методом УЦ (рис. 2). Показано, что концентрация экзосом плазмы крови у пациентов с GBA-БП ($28.03 (8.89–57.7) \times 10^{12}$ частиц/мл), сБП ($9.8 (2.66–16.47) \times 10^{12}$ частиц/мл) и в группе БН-GBA ($10.4 (1.05–50.8) \times 10^{12}$ частиц/мл) была выше, чем в контроле ($3.05 (1.49–10.37) \times 10^{12}$ частиц/мл, $p = 0.00001, 0.008, 0.02$ соответственно). Размер частиц у пациентов с GBA-БП (127.8 (108.6–208.6) нм) и сБП (123.8 (109.0–204.6) нм) был больше, чем в контрольной группе (107.0 (101.0–117.3) нм, $p = 0.0001, 0.0001$ соответственно) и группе БН-GBA (112.6 (97.3–135.0), $p = 0.009$ и 0.019 соответственно) (рис. 3). Следует отметить, что концентрация и размер внеклеточных

везикул в группе GBA-БП были статистически значимо выше по сравнению с группой БН-GBA ($p = 0.019$ и 0.009 соответственно).

Уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови оценили в группах пациентов с сБП ($N = 34$); GBA-БП ($N = 9$); LRRK2-БП ($N = 5$); БПД ($N = 15$), БН-GBA ($N = 10$) и у представителей контрольной группы ($N = 30$). Не выявлено различий в уровне альфа-синуклеина экзосом плазмы крови в этих группах (рис. 4). Также не выявлено влияния типа мутации как в гене *GBA*, так и в гене *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови лиц с наследственными формами БП (данные не приведены).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании впервые оценена концентрация и размер экзосом, выделенных из плазмы крови пациентов с GBA-БП и БН-GBA. Также определен уровень альфа-синуклеина в лизатах экзосом плазмы крови пациентов с наследственной формой БП (мутации в генах *GBA* и *LRRK2*).

Нами впервые показано увеличение количества и размера экзосом в плазме крови пациентов

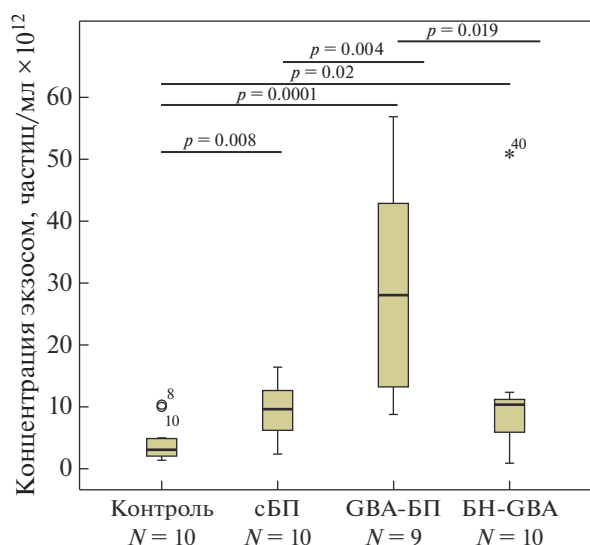


Рис. 2. Концентрация экзосом плазмы крови в контрольной группе, у пациентов с GBA-БП и сБП и в группе БН-GBA.

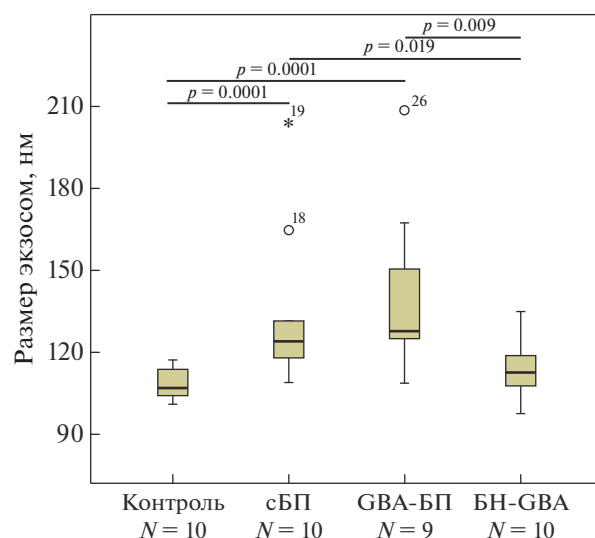


Рис. 3. Размер экзосом плазмы крови в группе контроля, у пациентов с GBA-БП и сБП и в группе БН-GBA.

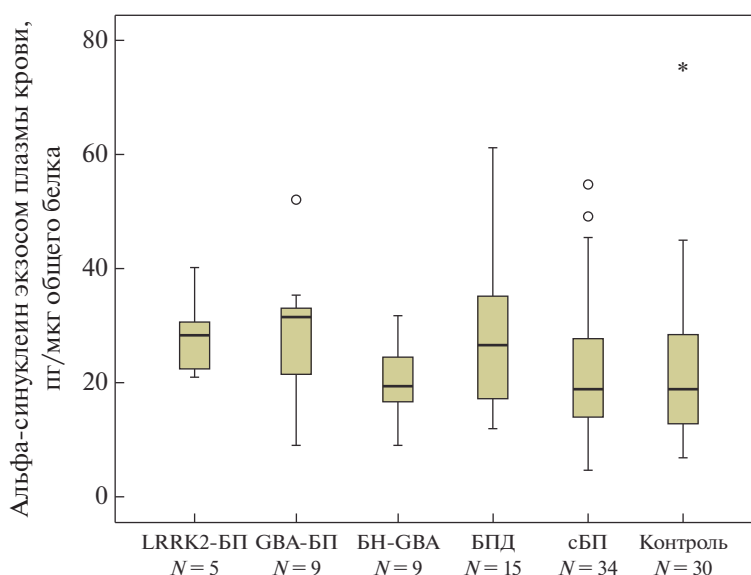


Рис. 4. Концентрация альфа-синуклеина экзосом плазмы крови в группе пациентов с LRRK2-БП, GBA-БП, в группе БН-GBA, у пациентов с БПД, сБП и в контроле.

с БП, несущих мутацию в гене *GBA*. Как показано нами и другими исследователями ранее, при GBA-БП наблюдается снижение активности GBA, а также накопление лизосфинголипидов в крови [12, 15, 19, 23–25]. Известно, что дисфункция GBA приводит к нарушению рециркуляции лизосом в процессе аутофагии [15]. Сохранность функции лизосом необходима для формирования аутолизосомы, в частности, для удаления дефектных белков из клетки. Предполагается, что нарушение эндосомно-лизосомного пути может приводить к повышенной секреции экзосом в составе

мультивезикулярных телец [12]. В исследованиях *in vitro* установлено, что ингибирование функции лизосом увеличивает секрецию внеклеточных везикул клетками [26].

На модельных животных показано, что при подавлении активности GBA селективным ингибитором кондуритол-В-эпоксидом (СВЕ) увеличивается секреция экзосом клетками головного мозга мыши [27]. Ранее нарушение аутофагии отмечали в первичной культуре макрофагов, полученных от пациентов с болезнью Гоше [28].

Недавно с использованием методов НТА, динамического светорассеяния и криоэлектронной микроскопии мы охарактеризовали пул внеклеточных везикул плазмы крови пациентов с болезнью Гоше [16]. Показано, что в пуле внеклеточных везикул пациентов уровень экзосомальных маркеров (CD9, CD63, CD81, HSP70) выше, чем в контроле, увеличен также размер везикул и изменена их морфология. Большинство везикул имело многослойную мембрану [16]. В сумме полученные нами результаты подтверждают предположение о том, что нарушение метаболизма церамидов может влиять на пул экзосом, секретируемых клетками.

В настоящей работе нами показано, что мутации в генах *GBA* и *LRRK2* не влияют на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови при БП. За последние годы проведен ряд исследований, направленных на оценку возможности использования уровня альфа-синуклеина экзосом периферических жидкостей (кровь, СМЖ, слюна) в качестве биомаркера БП. В 2014 году Shi и соавт. показали, что уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови, содержащих поверхностный маркер L1CAM, у пациентов с БП повышен по сравнению с контрольной группой [9]. Экзосомы получали методом иммунопреципитации с использованием антител к поверхностному маркеру экзосом L1CAM (присутствие этого маркера свидетельствует о нейронном происхождении экзосом [29]). Уровень альфа-синуклеина оценивали с помощью метода Luminex. В 2019 году Nan и соавт. определили концентрацию альфа-синуклеина общего пула экзосом плазмы крови и показали, что уровень альфа-синуклеина у пациентов с БП выше, чем в контроле [30]. Экзосомы плазмы крови были получены с помощью последовательного УЦ с последующей очисткой образцов методом ХП. Уровень альфа-синуклеина, как и в нашей работе, оценивали методом ИФА. В 2016 году Stuendl и соавт. показали, что уровень альфа-синуклеина экзосом СМЖ на ранних стадиях БП ниже, чем в контрольной группе [10]. Экзосомы выделяли методом последовательного УЦ, уровень альфа-синуклеина оценивали методом электрохемилюминесценции. В 2019 году Сао и соавт. выявили повышение уровня альфа-синуклеина в экзосомах слюны у пациентов с БП по сравнению с контрольной группой [11]. Экзосомы слюны получены методом ХП, уровень альфа-синуклеина оценен с помощью метода электрохемилюминесценции. В 2018 году Serгу и соавт. обнаружили повышение уровня альфа-синуклеина экзосом плазмы крови у пациентов с БП в сравнении с контрольной группой, а также выявили отрицательную корреляцию уровня альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови с тяжестью БП по шкале Хен-Яра [31]. В каждом исследовании использовали разные ме-

тоды получения фракции внеклеточных везикул, а также детекции альфа-синуклеина.

На данный момент существует несколько методов выделения экзосом, каждый из которых имеет свои плюсы и минусы. Метод последовательного УЦ позволяет получить фракцию, максимально чистую от внесенных в образец дополнительных примесей, но не позволяет полноценно удалить следы белков и прочих молекул внеклеточной среды биологических жидкостей. Этот метод обычно применяют для выделения экзосом в целях их сокультивирования с клеточными культурами. Считается, однако, что метод последовательного УЦ не следует использовать для выделения фракции внеклеточных везикул без дополнительной очистки при последующей оценке белкового состава экзосом [32]. В нашей работе мы использовали коммерческий набор, принцип работы которого основан на методе ХП экзосом из биологических жидкостей, позволяющем удалить из биологического образца большую часть растворимых белков [32]. Использование этого подхода позволило нам минимизировать содержание альфа-синуклеина плазмы крови в исследуемых образцах.

В отличие от данных, полученных ранее, мы не выявили повышения содержания альфа-синуклеина экзосом плазмы крови при различных формах БП по сравнению с контролем. Подобные различия могут объясняться разнообразием существующих сегодня методов выделения и очистки пула экзосом плазмы крови, а также методов детекции альфа-синуклеина. Интересно отметить, что все исследования по оценке белкового состава экзосом плазмы крови методом масс-спектрометрии (МС/МС) не обнаружили в их составе альфа-синуклеина [26, 33].

Таким образом, нами впервые показано, что мутации в гене *GBA* влияют на пул экзосом плазмы крови у пациентов с БП. В то же время не выявлено влияния мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* на уровень альфа-синуклеина экзосом плазмы крови.

Выражаем благодарность Горшкову Андрею Николаевичу (Научно-исследовательский Институт гриппа им. А.А. Смородинцева) за проведение экспериментов с просвечивающей электронной микроскопией.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №18-015-00262А (скрининг мутаций в генах *GBA* и *LRRK2* и оценка концентрации альфа-синуклеина в экзосомах плазмы крови); грант №19-315-90059 Аспиранты (характеристика внеклеточных везикул методом проточной цитометрии, вестерн-блоттинга), Российского научного фонда (№ 19-15-00315 (характеристика везикул методом НТА в группах бессимптомных носителей мутаций *GBA*, пациентов с *GBA*-БП)).

Все процедуры, выполненные в данной работе, соответствуют этическим стандартам институционального комитета по исследовательской этике и хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От всех пациентов получено информированное согласие.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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., Pchelina S.N. (2018) Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiol. Aging*. **71**, 272.
- Пчелина С.Н., Иванова О.Н., Емельянов А.К., Якимовский А.Ф. (2011) Клиническое течение LRRK2-ассоциированной болезни Паркинсона. *Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. **12**(11), 56–62.
- Lesage S., Anheim M., Condroyer C., Pollak P., Durif F, Dupuits C., Viallet F., Lohmann E., Corvol J.C., Honore A., Rivaud S., Vidailhet M., Durr A., Brice A., French Parkinson's Disease Genetics Study Group. (2011) Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **20**(1), 202–210.
- Balestrino R., Schapira A. (2019) Parkinson disease. *Eur. J. Neurol.* **27**, 27–42.
- Bieri G., Gitler A.D., Brahic M. (2018) Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of alpha-synuclein. *Neurobiol. Dis.* **109**, 219–225.
- Danzer K.M., Krebs S.K., Wolff M., Birk G., Hengerer B. (2009) Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J. Neurochem.* **111**(1), 192–203.
- Шварцман А.Л., Сенкевич К.А., Емельянов А.К., Пчелина С.Н. (2019) Прионные свойства альфа-синуклеина. *Молекуляр. биология*. **53**(3), 380–387.
- Greening D., Simpson R. (2018) Understanding extracellular vesicle diversity – current status. *Expert. Rev. Proteomics.* **15**, 887–910.
- Shi M., Liu C., Cook T.J., Bullock K.M., Zhao Y., Ghingina C., Li Y., Aro P., Dator R., He C., Hipp M.J., Zabetian C.P., Peskind C.P., Hu S-C., Quinn S.F., Galasko D.R., Banks W.A., Zhang J. (2014) Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* **128**, 639–650.
- Stuendl A., Kunadt M., Kruse N., Bartels C., Moebius W., Danzer K.M., Mollenhauer B., Schneider A. (2016) Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain.* **139**, 481–494.
- Cao Z., Wu Y., Liu G., Jiang Y., Wang X., Wang Z., Feng T. (2019) α -Synuclein in salivary extracellular vesicles as a potential biomarker of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **696**, 114–120.
- Eitan E., Suire C., Zhang S., Mattson M.P. (2016) Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release. *Ageing Res. Rev.* **32**, 65–74.
- Orenstein S.J., Kuo S.H., Tasset I., Arias E., Koga H., Fernandez-Carasa I., Cortes E., Honig L.S., Dauer W., Consiglio A., Raya A., Sulzer D., Cuervo A.M. (2013) Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* **16**(4), 394–406.
- Fraser K.B., Rawlins A.B., Clark R.G., Alcalay R.N., Standaert D.G., Liu N. (2016) Ser(P)-1292 LRRK2 in urinary exosomes is elevated in idiopathic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **31**(10), 1543–1550.
- Magalhaes J., Gegg M.E., Migdalska-Richards A., Doherty M.K., Whitfield P.D., Schapira A.H. (2016) Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.* **25**, 3432–3445.
- Shtam T., Naryzhny S., Kulabukhova D., Garaeva L., Senkevich K., Landa S., Varfolomeeva E., Salogub G., Verlov N., Kopylov A., Zorina E., Kamyshinsky R., Usenko T., Shwartsman A., Zakharova E., Emelyanov A., Pchelina S. (2020) Altered level of plasma exosomes in patients with Gaucher disease. *Eur. J. Med. Genet.* **63**(11), 104038.
- Postuma R.B., Berg D., Stern M., Poewe W., Olanow C.W., Oertel W., Obeso J., Marek K., Litvan I., Lang A.E., Halliday G., Goetz C.G., Gasser T., Dubois B., Chan P., Bloem B.R., Adler C.H., Deuschl G. (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **30**, 1591–1601.
- Aharon-Peretz J., Rosenbaum H., Gershoni-Baruch R. (2004) Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi jews. *N. Engl. J. Med.* **351**(19), 1972–1977.
- Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C., Fahn S., Ford B., Kuo S-H., Mazzoni P., Pauciuolo M.W., Nichols W.C., Gan-Or Z., Rouleau G.A., Chung W.K., Wolf P., Oliva P., Keutzer J., Marder K., Zhang X. (2015) Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain.* **138**(Pt9), 2648–2658.
- Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K., Ivanova O.N., Schwarzman A.L., Singleton A.B. (2008) Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. **15**(7), 692–696.
- Hashad D.I., Abou-Zeid A.A., Achmawy G.A., Allah H.M., Saad M.A. (2011) G2019S mutation of the leucine-rich repeat kinase 2 gene in a cohort of Egyptian patients with Parkinson's disease. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* **15**(12), 861–866.
- Fedick A., Su J., J alas C., Northrop L., Devkota B., Ekstein J., Treff N.R. (2013) High-throughput carrier screening using TaqMan allelic discrimination. *PLoS One.* **8**(3), e59722.
- Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G., Andoskin P., Senkevich K., Nikolaev M., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Fedotova E., Abramychcheva N., Usenko T., Kulabukhova D., Lavrinova A., Kopytova A., Garaeva L., Nuzhnyi E., Illarioshkin S., Zakharova E. (2017) Oligomeric α -synuclein and glucocerebrosidase activity levels in GBA-associated Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **636**, 70–76.
- Guedes L.C., Chan R.B., Gomes M.A., Conceição V.A., Machado R.B., Soares T., Xu Y., Gaspar P., Carriço J.A.,

- Alcalay R.N., Ferreira J.J., Outeiro T.F., Miltenberger-Miltenyi G. (2017) Serum lipid alterations in GBA-associated Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* **44**, 58–65.
25. Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., Fedotova E., Illarioshkin S., Zakharova E. (2018). Blood liposphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase 1 mutations. *Mov. Disord.* **33**(8), 1325–1330.
26. Miao Y., Li G., Zhang X., Xu H., Abraham S.N. (2015) A TRP channel senses lysosome neutralization by pathogens to trigger their expulsion. *Cell.* **161**(6), 1306–1319.
27. Papadopoulos V.E., Nikolopoulou G., Antoniadou I., Karachaliou A., Arianoglou G., Emmanouilidou E., Sardi S.P., Stefanis L., Vekrellis K. (2018) Modulation of β -glucocerebrosidase increases α -synuclein secretion and exosome release in mouse models of Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* **27**(10), 1696–1710.
28. Aflaki E., Stubblefield B.K., Maniwan E., Lopez G., Moaven N., Goldin E., Marugan J., Patnaik S., Dutra A., Southall N., Zheng W., Tayebi N., Sidransky E. (2016) Macrophage models of Gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs. *Sci. Transl. Med.* **6**, 240–273.
29. Lachenal G., Pernet-Gallay K., Chivet M., Hemming F.G., Belly A., Bodon G., Blot B., Haase G., Goldberg Y., Sadoul R. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**(2), 409–418.
30. Han C., Xiong N., Guo X., Huang J., Ma K., Liu L., Xia Y., Shen Y., Li J., Jiang H., Wang L., Guo S., Xu X., Zhang G., Liu J., Cao X., Zhang Z., Lin Zh., Wang T. (2019) Exosomes from patients with Parkinson's disease are pathological in mice. *J. Mol. Med. (Berl.)* **97**(9), 1329–1344.
31. Cerri S., Ghezzi C., Sampieri M., Avenali M., Dornini G., Zangaglia R., Minafra B., Blandini F. (2018) The exosomal/total α -synuclein ratio in plasma is associated with measures of disease severity in PD patients. *Front. Cell Neurosci.* **12**, 125.
32. de la Torre Gomez C., Goreham R.V., Bech Serra J.J., Nann T., Kussmann M. (2018) "Exosomics" – a review of biophysics, biology and biochemistry of exosomes with a focus on human breast milk. *Front. Genet.* **9**, 92.
33. Tomlinson P.R., Zheng Y., Fischer R., Heidasch R., Gardiner C., Evetts S., Hu M., Wade-Martins R., Turner M.R., Morris J., Talbot K., Kessler B.M., Tofaris G.K. (2015) Identification of distinct circulating exosomes in Parkinson's disease. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **2**(4), 353–361.

PLASMA EXOSOMES IN INHERITED FORMS OF PARKINSON'S DISEASE

D. G. Kulabukhova^{1,2}, L. A. Garaeva^{1,3}, A. K. Emelyanov^{1,2}, K. A. Senkevich^{1,2}, E. V. Gracheva⁴,
I. V. Milukhina^{1,2,4}, E. Y. Varfolomeeva^{1,3}, A. A. Timofeeva², A. L. Shwartsman¹,
T. A. Shtam^{1,3}, and S. N. Pchelina^{1,2,3,4,*}

¹Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, 188300 Russia

²First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Petersburg, 197022 Russia

³National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, 123182 Russia

⁴Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, 197376 Russia

*e-mail: sotchelina@hotmail.com

Parkinson's disease (PD) is the second most frequent neurodegenerative disorder. Alpha-synuclein misfolding and aggregation resulting in neurotoxicity is a hallmark of PD. The prion properties of alpha-synuclein are discussed. Exosomes (extracellular vesicles 40–100 nm in size) can play a key role in the transport of pathogenic forms of alpha-synuclein. The most frequent inherited forms of the disease are PD, associated with mutation in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2-PD) and glucocerebrosidase (GBA-PD) genes. The aim of our work is to evaluate concentration and size of exosomes derived from blood plasma of patients with GBA-PD, asymptomatic *GBA* mutation carriers and an effect of *GBA* and *LRRK2* mutations on alpha-synuclein level in exosomes derived from peripheral blood plasma. Plasma extracellular vesicles were isolated via chemical precipitation and sequential ultracentrifugation and characterized by transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis (NTA) and flow cytometry. Total alpha-synuclein level in plasma exosomes was estimated by enzyme-linked immunosorbent assay. Patients with sporadic PD, PD with dementia, patients with inherited PD (GBA-PD, LRRK2-PD) as well as asymptomatic *GBA* mutation carriers were included into the study. The concentration on plasma exosomes was higher in GBA-PD patients compared to sporadic PD, asymptomatic carriers of mutations on *GBA* gene and control ($p = 0.004$, 0.019 and 0.0001 respectively). The size of plasma exosomes was higher in GBA-PD patients compared to asymptomatic carriers of *GBA* mutations and control ($p = 0.009$ and 0.0001 , respectively). No significant difference was found for exosomal alpha-synuclein levels in the studied groups. Our results allowed us to suggest that a decrease in GBA activity may affect the pool of plasma exosomes and mutations in the *LRRK2* and *GBA* gene do not influence on plasma exosomal alpha-synuclein level.

Keywords: Parkinson's disease, alpha-synuclein, exosomes, *LRRK2*, *GBA*