

**А. К. Коляда, А. С. Соседко*, М. А. Чивликлий,
А. М. Вайсерман, И. Н. Карабань**

*Государственное учреждение "Институт геронтологии
им. Д. Ф. Чеботарева НАМН Украины", 04114 Киев*

**Институт высоких технологий Киевского национального университета
им. Т. Шевченко, 02033 Киев*

МУТАЦИИ ГЕНОВ *LRRK2*, *GBA* и *SNCA*, АССОЦИИРОВАННЫХ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА У ЖИТЕЛЕЙ УКРАИНЫ

Проведено генотипирование мутаций генов *LRRK2*, *GBA* и *SNCA* 216 пациентов 54–79 лет с болезнью Паркинсона (БП) и 300 неврологически здоровых людей 50–83 лет (контрольная группа), проживающих в разных регионах Украины. У больных БП частота встречаемости генотипа *LRRK2* *g.40734202GA* составляет 1,85 %, *GBA* *c.1226AG* — 2,31 % и *c.483TC* — 1,85 %. В контрольной группе носителей данных генотипов не выявлено. В обеих группах также не выявлено мутаций *c.209G>A* в гене *SNCA*. Полученные результаты показывают, что частота мутаций в генах, ассоциированных с БП у жителей Украины, характерна для стран Евразии.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, ген *LRRK2*, *GBA*, *SNCA*, нейродегенеративные заболевания.

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний в мире. Это возрастзависимое заболевание, которое встречается у 1–2 % людей старше 65 лет, а первые симптомы проявляются иногда до 50 лет. БП по своей природе имеет многофакторную этиологию [19]. Большинство случаев этого заболевания носят идиопатический и спорадический характер [8].

Не вызывает сомнений, что у БП есть четко выраженный генетический компонент, что подтверждается повышенной частотой встречаемости данного заболевания у родственников пациентов. Также не вызывает сомнения, что как на риск развития, так и на степень прояв-

ления клинической симптоматики болезни влияет окружающая среда (в первую очередь — контакт с нейротоксинами).

При БП можно наблюдать процессы ускоренного старения. Так, в норме с возрастом уменьшается число нейронов черной субстанции [23], а также происходят нейрохимические изменения в стриатуме — снижение содержания дофамина и фермента тирозингидроксилазы, уменьшение числа дофаминовых рецепторов [4, 10].

Количество выявляемых генов, которые ассоциируют с БП, постоянно растет. Большинство таких генов идентифицированы путем изучения их функциональной связи с сигнальными каскадами клетки, которые играют важную роль в болезнях с симптомами, подобными проявлениям БП [2]. Исследования рецессивно наследуемых заболеваний (таких, как болезнь Гоше или деменция с тельцами Леви) и комплексных фенотипов (таких, как болезнь Нимана — Пика, детская нейроаксональная дистрофия или нейродеградация с накоплением железа) помогли в поиске новых генов-кандидатов при изучении БП [1].

С момента идентификации первых генов, которые отвечают за склонность к БП, проведено множество исследований, направленных на поиск общих генетических вариаций (аллелей) у пациентов, которые могут быть причиной повышенного риска развития данной патологии [2]. Для поиска генов-кандидатов осуществлено множество полногеномных анализов ассоциаций, а также установлена связь между типами вариаций и формированием болезни [20]. В то же время, остается открытым вопрос об универсальности найденных ассоциаций и распространенности функционально значимых аллелей, повышающих риск развития заболевания. Поэтому особо перспективными видятся сравнительные исследования групп пациентов с БП и здоровых людей, проведенные на малоизученных (в плане генетических исследований) популяциях.

Целью нашего исследования было проведение генотипирования по известным мутациям в генах, ассоциированных с БП, в выборках людей, проживающих на территории Украины.

Материал и методы. Исследовали образцы крови 216 пациентов 54–79 лет с БП (116 мужчин и 100 женщин) и контрольной группы 300 неврологически здоровых людей (200 мужчин и 100 женщин) в возрасте 50–83 лет, проживающих в разных регионах Украины. ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора "ДНК-Сорб В" (Россия). Генотипирование проводили методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Амплификацию исследуемых локусов проводили с использованием сайт-специфических праймеров на амплификаторе "*PCR Thermal Cycler*" ("*Corbett LifeScience*", Австралия). Рестрикцию полученных ампликонов осуществляли в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя специфических рестриктаз (*Fermentas*, Литва). Результаты амплификации и рестрикции оценивали путем проведения вертикального электрофореза в 3 % агарозном геле.

При статистической обработке результатов исследования фактическую (H_e) и теоретическую (H_o) гетерозиготность популяций вычисляли с

помощью метода Россета — Раймонда, панмиктичность популяции рассчитывали по формуле равновесия Харди — Вайнберга. Для определения разницы между частотами аллелей у пациентов с БП и у здоровых людей использовали критерий χ^2 .

Результаты и их обсуждение. Проведено генотипирование наиболее часто встречаемой мутации гена *LRRK2* — *g.40734202G > A*, которая приводит к замене остатка глицина на остаток серина в позиции 219 кодируемого геном белка. Все участники контрольной группы оказались носителями аллеля *G*, а носителей аллеля *A* обнаружено не было (таблица). Контрольная группа была представлена носителями только одного генотипа — *g.40734202GG*, а генотипов *g.40734202AA* и *g.40734202AG* не обнаружено. Оценка гетерозиготности по методу Россета — Раймонда не дала результатов, так как в контрольной группе не было носителей *AG* генотипа.

Встречаемость генотипов и аллелей генов в исследуемых группах

Ген	Мутация	Генотип	Контроль	БП	χ^2, P ($df = 2$)
<i>LRRK2</i>	<i>g.40734202G > A</i> , чел. (%)	GG	300 (100)	212 (98,15)	25,81 $P = 0,0034$
		AG	0	4 (1,85)	
		AA	0	0	
	Частота аллелей, %	G	100	99,07	
		A	0	0,93	
<i>GBA</i>	<i>c.1226A > G</i> , чел. (%)	AA	300 (100)	211 (97,69)	26,40 $P = 0,008$
		AG	0	5 (2,31)	
		GG	0	0	
	Частота аллелей, %	A	100	98,84	
		G	0	1,16	
<i>GBA</i>	<i>c.483T > C</i> , чел. (%)	TT	300 (100)	212 (98,15)	25,81 $P = 0,0034$
		TC	0	4 (1,85)	
		CC	0	0	
	Частота аллелей, %	T	100	99,07	
		C	0	0,93	

В группе больных присутствовали как гетерозиготы *g.40734202AG* (1,85 %), так и гомозиготы по аллелю *G* (98,15 %). Таким образом, только в группе пациентов с БП обнаружены носители аллеля *A* (0,93 %). Несмотря на то что различия между контрольной и исследуемой группами были незначительными, проверка по критерию χ^2 показала, что они являются достоверными ($df = 2, P < 0,05$). С помощью формулы равновесия Харди — Вайнберга установлено, что группа является панмиктической и может считаться репрезентативной. Носители генотипа *g.40734202AA* не были обнаружены ни в контрольной группе, ни среди больных с БП. Подобные результаты являются характерными и для других популяций, что, по-видимому, связано с низкой частотой данного аллеля или летальностью генотипа *AA* [14]. Данная мутация

является наиболее часто встречающейся мутацией гена *LRRK2*. Ее частота в популяциях Европы составляет до 4,6 % у больных со спорадической формой БП и 11,5 % у больных с семейной формой БП; у евреев ашкенази ее частота в некоторых исследованиях достигает 13,3 % у больных со спорадической формой БП и 29,7 % у больных с семейной формой БП. В России она выявляется у 13 % больных с семейной формой БП и у 0,5 % при спорадической форме заболевания [12], а у арабов Северной Африки — у 40,8 % больных со спорадической формой БП и у 37,0 % больных с семейной формой БП [15, 18]. В то же время, эта мутация крайне редко встречается у монголоидов [23]. Клинические проявления данной мутации достаточно гетерогенны, и по некоторым данным она обладает неполной пенетрантностью [13, 21, 22].

Также проведено генотипирование по 2 мутациям *c.1226A > G* и *c.483T > C* в гене *GBA*, который кодирует фермент глюкоцереброзидазу, расщепляющий бета-цереброзид. При дефиците фермента лизосомальные макромолекулы накапливаются в различных клетках организма, особенно в нейронах. Накопление жировых отложений в мозге нарушает кровоснабжение, что снижает активность и функциональность его структур. Мутация *c.483T > C* в 10-м экзоне гена *GBA* в гомозиготном состоянии приводит к болезни Гоше. Также есть многочисленные данные о повышенном риске развития БП, связанном с гетерозиготным носительством мутаций в данном гене [10]. Анализ контрольной группы показал, что все обследуемые имеют *c.483TT* генотип, и, следовательно, частота аллеля Т составляет 100 %. *c.483C* аллеля в контрольной группе обнаружено не было.

В группе пациентов с БП частота встречаемости генотипа *c.483TC* составила $(1,83 \pm 0,0042)$ %, генотипа *c.483TT* — $(98,15 \pm 0,0042)$ %. В данной группе выявлено 4 гетерозиготных носителя мутации *c.483T > C*. Частота встречаемости *c.483T* аллеля для данной группы составила 0,93. Проверка по формуле равновесия Харди — Вайнберга показала случайное распределение генотипов, что подтверждает репрезентативность группы ($df = 2$, $P < 0,05$). Также для данной группы при помощи теста Роскета — Раймонда рассчитаны H_e и H_o . Вышеуказанные показатели составили 0,78 % и 0,77 %, соответственно. Отсутствие разницы между этими показателями было доказано значением дисперсии (0,0005). Обращает на себя внимание тот факт, что нами не были выявлены гомозиготы по *c.483C* аллелю. Это может быть связано с летальностью данного генотипа из-за чрезмерного накопления жировых масс еще до рождения [12].

При исследовании встречаемости мутации *c.1226A > G* (*N370S*) в группе контроля носителей мутации как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии выявлено не было. Эти данные совпадают с результатами аналогичных исследований, проведенных в популяциях других стран [3]. В группе пациентов с БП генотип *c.1226AA* встречался с частотой 97,68 %, а генотип *c.1226AG* — 2,32 %. Частота встречаемости аллеля *c.1226A* составила 98,84 %, а *c.1226G* — 1,16 %. Проверка при помощи теста Роскета — Раймонда на гетерозиготность показала анало-

гичные результаты. Различие контрольной группы и группы пациентов с БП достоверно ($df = 2$, $P < 0,05$) и подтверждается малым значением показателя дивергенции (0,00053 %), а также тем, что распределение обеих исследованных групп, рассчитанное по формуле равновесия Харди — Вайнберга, близко к панмиктическому. Хотя данных по частоте встречаемости различных мутантных вариантов гена у жителей Украины и близлежащих стран пока нет, подобные исследования активно ведутся в других странах. Так, гетерозиготные носители мутаций по гену *GBA* составляют 10,7–31,3 % среди евреев ашкенази с БП и 2,3–9,4 % среди пациентов других этнических групп [7]. Среди семейных случаев БП у жителей США носителями мутаций были 4,1 % по сравнению с 1,1 % в группе здоровых людей [17]. Мутации в гене *GBA* найдены у 14,7 % пациентов с семейной формой БП среди жителей Японии [16].

Проведено также генотипирование по гену *SNCA*. У пациентов с мутациями в этом гене первые признаки БП проявляются уже в возрасте до 50 лет, болезнь протекает очень быстро и часто характеризуется снижением когнитивных функций [19, 20]. Нами была изучена встречаемость мутации с.209G > A (A53T) в гене *SNCA* у пациентов с БП и в контроле. В результате исследования мутантных аллелей данного гена в обеих группах обнаружено не было, что, по-видимому, связано с чрезвычайно низкой частотой встречаемости данной мутации или полным ее отсутствием у жителей данной территории. Подобные результаты получены и на других выборках [6, 11]. Так как точечные мутации в данном гене являются достаточно редкими, но в то же время продукт гена вовлечен непосредственно в патогенез заболевания, перспективным, по-видимому, является поиск мутаций в регуляторных участках гена, которые пока недостаточно изучены [5].

Полученные результаты показывают, что частота мутаций в генах, ассоциированных с БП у жителей Украины, характерна для стран Евразии.

Список использованной литературы

1. Коляда О. К., Вайсерман О. М., Карабань И. М. Генетичні основи хвороби Паркінсона (огляд літератури та власних досліджень) // Журн. НАМН України. — 2013. — 1, № 1. — С. 65–74.
2. Крыжановский Г. Н., Карабань И. Н., Магаева С. В. и др. Болезнь Паркинсона. — М.: Медицина, 2002. — 316 с.
3. Asselta R., Rimoldi V., Siri C. et al. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism // Parkinsonism and Related Disorders. — 2014. — 20. — P. 1215–1220.
4. Berg D. Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease // J. Neural. Transm. — 2006. — 70. — P. 249–254.
5. Brighina L., Frigerio R., Schneider N. K. et al. Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study // Neurology. — 2008. — 70, № 16. — P. 1461–1469.
6. Farrer M., Wavrant-De Vrièze F., Crook R. et al. Low frequency of alpha-synuclein mutations in familial Parkinson's disease // Ibid. — 1998. — 43. — P. 394–397.

7. *Gan-Or Z., Giladi N., Rozovski U.* et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset // *Neurology*. — 2008. — **7**. — P. 2277–2283.
8. *Gasser T.* Genetics of Parkinson's disease // *Curr. Opin. Neurol.* — 2005. — **18**. — P. 363–369.
9. *Gopalai A. A., Lim Sh.-Y., Chua J. Y.* et al. *LRRK2 G2385R* and *R1628P* mutations are associated with an increased risk of parkinson's disease in the malaysian population // *BioMed. Res. Int.* — 2014. — doi: 10:1155/2014/867321.
10. *Hruska K. S., LaMarca M. E., Scott C. R., Sidransky E.* Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene // *Human mutation*. — 2008. — **29**, № 5. — P. 567–583.
11. *Illarioshkin S. N., Ivanova-Smolenskaya I. A., Markova E. D.* et al. Lack of alpha-synuclein gene mutations in families with autosomal dominant Parkinson's disease in Russia // *J. Neurol.* — 2000. — **247**. — P. 968–969.
12. *Illarioshkin S. N., Shadrina M. I., Slominsky P. A.* et al. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia // *Europ. J. Neurol.* — 2007. — **14**. — P. 413–417.
13. *Kay D. M., Kramer P. L., Higgins D. S.* et al. Escaping Parkinson's disease: a neurologically healthy octogenarian with the *LRRK2 G2019S* mutation // *Mov. Disord.* — 2005. — **20**. — P. 1077–1078.
14. *Lesage S., Brice A.* Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors // *Hum. Mol. Genet.* — 2009. — **18**. — P. 48–59.
15. *Lesage S., Durr A., Tazir M.* et al. *LRRK2 G2019S* as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs // *New. Engl. J. Med.* — 2006. — **354**. — P. 422–423.
16. *Mitsui J., Mizuta I., Toyoda A.* et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease // *Arch. Neurol.* — 2009. — **66**. — P. 571–576.
17. *Nichols W. C., Pankratz N., Marek D. K.* et al. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset // *Neurology*. — 2009. — **72**. — P. 310–316.
18. *Ozelius L. J., Senthil G., Suanders-Pullman R.* et al. *LRRK2 G2019S* as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jewish // *New. Engl. J. Med.* — 2006. — **354**. — P. 424–425.
19. *Puschmann A., Ross O. A., Vilarico-Güell C.* et al. A Swedish family with de novo α -synuclein A53T mutation: Evidence for early cortical dysfunction // *Parkinsonism Relat. Disord.* — 2009. — **15**. — P. 627–632.
20. *Satake W., Nakabayashi Y., Mizuta J.* et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease // *Nature Genetics*. — 2009. — **41**, № 12. — P. 1303–1308.
21. *Smith W., Pei Z., Jiang H.* et al. Leucine-rich repeat kinase 2 (*LRRK2*) interacts with parkin, and mutant *LRRK2* induces neuronal degeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2005. — **102**, № 51. — P. 18676–18681.
22. *Tan E. K., Shen H., Tan L. C.* et al. The *G2019S LRRK2* mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients // *Neurosci Lett.* — 2005. — **384**. — P. 327–329.
23. *Tammachote R., Tongkobpetch S., Srichomthong C.* et al. A common and two novel GBA mutations in Thai patients with Gaucher disease // *Hum. Genet.* — 2013. — **58**, № 5. — P. 594–599.

Поступила 13.12.2014

МУТАЦІЇ ГЕНІВ *LRRK2*, *GBA* і *SNCA*, АСОЦІЙОВАНИХ ІЗ ХВОРОБОЮ ПАРКІНСОНА У МЕШКАНЦІВ УКРАЇНИ

О. К. Коляда, А. С. Соседко*, М. А. Чивликлий,
О. М. Вайсерман, І. М. Карабань

Державна установа "Інститут геронтології
ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", 04114 Київ
*Інститут високих технологій Київського національного
університету ім. Т. Шевченка, 02033 Київ

Проведено генотипування мутацій генів *LRRK2*, *GBA* і *SNCA* 216 пацієнтів 54–79 років із хворобою Паркінсона (БП) і 300 неврологічно здорових людей 50–83 років (контрольна група), які проживають у різних регіонах України. У хворих БП частота зустрічальності генотипу *LRRK2 g.40734202GA* становить 1,85 %, *GBA c.1226AG* — 2,31 % і *c.483TC* — 1,85 %. У контрольній групі носіїв даних генотипів не виявлено. В обох групах також не виявлено мутацій *c.209G > A* в гені *SNCA*. Отримані результати показують, що частота мутацій в генах, асоційованих з БП у мешканців України, характерна для країн Євразії.

MUTATIONS OF *LRRK2*, *GBA* and *SNCA* GENES, ASSOCIATED WITH PARKINSON'S DISEASE IN CITIZENS OF UKRAINE

A. K. Koliada, A. S. Sosedko*, M. A. Chivlikly,
A. M. Vaiserman, I. N. Karaban

State Institution "D. F. Chebotarev Institute of Gerontology
NAMS Ukraine", 04114 Kyiv
*Institute of High Technologies of Kyiv National Taras
Shevchenko University, 02033 Kyiv

Genotyping for *LRRK2*, *GBA* and *SNCA* genes in 216 patients aged 54–79 with Parkinson's disease (PD) and 300 neurologically healthy subjects aged 50–83 (control group), living in various parts of Ukraine, revealed the occurrence of *LRRK2 g.40734202GA*, *GBA c.1226AG* and *c.483TC* genes to be in 1.85 %, 2.31 % and 1.85 % of PD patients. No such genes were identified in subjects of control group. No *c.209G > A* mutations in *SNCA* gene were identified in both groups. The data obtained showed the occurrence of mutation in the genes associated with PD in citizens of Ukraine to be peculiar for countries of Eurasia.

Сведения об авторах

ГУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарева НАМН України"

Лабораторія епігенетики

А. М. Вайсерман — зав. лаб., д.м.н.

А. К. Коляда — м.н.с. (alex.genetic@gmail.com)

Отдел клинической физиологии и патологии экстрапирамидных болезней нервной системы

И. Н. Карабань — зав. отделом, д.м.н., профессор

М. А. Чивликлий — врач

Інститут високих технологій Київського національного університету ім. Т. Шевченка

А. С. Соседко — студентка 5 курсу