

DOI: 10.1134/S004137711812009X

МАКРОФАГИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КАК МОДЕЛЬ ИЗУЧЕНИЯ ДИСФУНКЦИИ ГЛЮКОЦЕРЕБРОЗИДАЗЫ

© М. А. Николаев,^{1,2,*} А. Э. Копытова,¹ Г. В. Байдакова,³ А. К. Емельянов,^{1,2}
Г. Н. Салогуб,⁴ К. А. Сенкевич,^{1,2} Т. С. Усенко,^{1,2} М. В. Горчакова,²
Ю. П. Ковальчук,² О. А. Беркович,² Е. Ю. Захарова,³ С. Н. Пчелина^{1,2}

¹Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
научно-исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

²Первый С.-Петербургский государственный медицинский
университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022,

³Медико-генетический научный центр, Москва, 115522 и

⁴Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197341;

* электронный адрес: Nikolaev_MA@npri.nrcki.ru

Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) приводят к снижению активности фермента глюкоцереброзидазы (GCase) и развитию болезни Гоше (БГ), относящейся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН). В гомо- и гетерозиготном состоянии мутации в гене *GBA* повышают риск развития болезни Паркинсона (БП) в 7—8 раз. Для скрининга новых препаратов, повышающих ферментативную активность GCase, актуально создание модели *in vitro* на основе первичных клеточных культур от пациентов, несущих мутации в гене *GBA*. В настоящем исследовании сопоставлена эффективность различных способов культивирования макрофагов периферической крови пациентов с БГ и контрольной группы с последующей оценкой ферментативной активности GCase и концентрации лизосфинголипидов методом тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) в сухом пятне клеток. Впервые оценена эффективность восстановления ферментативной активности мутантной GCase на культуре первичных макрофагов пациентов с БГ при воздействии фармакологических шаперонов GCase (изофагомина и амброксола). Полученные результаты позволили предложить удобный вариант скрининга потенциальных лекарственных препаратов, повышающих активность GCase, *in vitro*.

Ключевые слова: болезнь Гоше, макрофаги, глюкоцереброзидаза, лизосфинголипиды

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона, БГ — болезнь Гоше, ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография, МС/МС — тандемная масс-спектрометрия, ЛБН — лизосомные болезни накопления, *GBA* — ген глюкоцереброзидазы, GCase — фермент глюкоцереброзидаза, М-КСФ — колониестимулирующий фактор роста макрофагов, HexSph — гексозилсфингозин.

Дисфункция ферментов лизосом приводит к развитию целого ряда наследственных заболеваний, относящихся к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН). Самой распространенной из ЛБН является болезнь Гоше (БГ) — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное наличием мутаций в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*). Мутации в гене *GBA* приводят к снижению ферментативной активности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GCase), осуществляющего расщепление глюкозилцерамида. Как следствие, во многих тканях организма, включая селезенку, печень, почки, легкие, головной и костный мозг, происходит накопление субстрата, а также его деацетилированной формы — глюкозилсфингозина (GlcSph) (Messner, Cabot, 2010).

В зависимости от проявления и тяжести неврологической симптоматики БГ подразделяется на три типа — нейронопатический (тип I), инфантильная форма (тип II) и подострая нейронопатическая (ювелирная) форма (тип III) (Weiss et al., 2015). В настоящее время для лечения пациентов с БГ используется ферментно-заместительная терапия (Brady, 2006). Это дорогостоящий способ лечения, основанный на пожизненной внутривенной инъекции рекомбинантного фермента пациенту 2 раза в месяц. Более того, эта терапия неэффективна при неврологических формах заболевания из-за неспособности фермента проникать через гематоэнцефалический барьер.

Известно, что гомо- и гетерозиготные носители мутаций в гене *GBA* имеют высокий риск развития распро-

страненного нейродегенеративного заболевания — болезни Паркинсона (БП) (Sidransky et al., 2009). В настоящее время не существует нейропротекторных средств для лечения БП. Обсуждается разработка терапевтических подходов как для лечения нейрональных форм БГ, так и для БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (ГВА-БП), основанных на увеличении ферментативной активности GCase (Rocha et al., 2015). В частности, рассматривается использование небольших фармакологических шаперонов GCase, небольших молекул, связывающихся с ферментом и влияющих на его конформацию, стабилизацию структуры фермента и транслокацию в лизосомы (Aflaki et al., 2016).

Для изучения эффективности таких препаратов в восстановлении ферментативной активности GCase в клетках человека используются различные функциональные модели. Следует отметить, что использование фибробластов человека для моделирования заболеваний, связанных с дисфункцией GCase, не является достаточно перспективным из-за низкого уровня метаболизма сфинголипидов в клетках этого типа (Borger et al., 2015). Макрофаги периферической крови человека участвуют в утилизации эритроцитов, мембрана которых преимущественно содержит глюкозилцереброзид. С учетом вышесказанного, а также доступности клеток крови выбор в качестве объекта исследования макрофагов периферической крови может обсуждаться в качестве перспективного подхода для изучения молекулярных механизмов дисфункции GCase, а также поиска путей восстановления активности этого фермента.

Целью настоящего исследования явилась оценка возможности использования макрофагов, дифференцированных из моноцитов периферической крови человека, для изучения *in vitro* изменений ферментативной активности GCase и накопления метаболитов (лизосфинголипидов) методом tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) в сухом пятне клеток.

Материал и методика

Получение макрофагов. Периферическую кровь брали у 4 пациентов с БГ (2 женщины, 2 мужчин; средний возраст 60.5 ± 6.7 года) и у 15 доноров контрольной группы (8 женщин и 7 мужчин; средний возраст 57.8 ± 8.8 года). Все индивидуумы контрольной группы проходили осмотр невролога с целью исключения неврологических заболеваний. Исследование одобрено этическим комитетом Первого С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова, все пациенты подписали информированное согласие. Для получения мононуклеарной фракции клеток из свежесобранной цельной крови использовали метод градиентного центрифугирования при 1600 об/мин и 16 °C в растворе фикола плотностью 1.077 (GE Healthcare, Англия). Далее для выбора оптимальной методики дифференцирования макрофагов из описанных ранее (Dekker et al., 2011; Aflaki et al., 2014) мононуклеарные клетки ресуспендировали в двух различных культуральных средах, содержащих либо 10 % сыворотки человека (Sigma, США), либо 10 % фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и М-КСФ (Gibco, США), в конечной концентрации 10 нг/мл для стимуляции роста макрофагов. Дифференцировка моноцитов в макрофаги проходила в

инкубаторе при 37 °C и 5 % CO₂ с ежедневной заменой среды в течение 5 сут.

В качестве фармакологических шаперонов GCase были выбраны изофагомин и амброксол (Sigma, США). Для оценки их влияния на ферментативную активность GCase к клеткам на 4-й день культивирования добавляли изофагомин до конечной концентрации 30 мкМ или амброксол до конечной концентрации 50 мкМ, после чего клетки инкубировали в течение 4 сут в том же инкубаторе. Все эксперименты повторяли трижды.

Фенотипическое созревание макрофагов подтверждали с помощью световой микроскопии и проточной цитометрии с использованием флуоресцентно меченных антител (eBioscience, США), иммуногенных к мембранному белку CD68⁺ и CD45⁺ макрофагов и лейкоцитов соответственно на 5-е сут культивирования (рис. 1, а), сравнивая результаты с контрольными клетками (до дифференцировки после 2 ч культивирования) (рис. 1, б). Окраску внутримембранных белков для проведения проточной цитометрии осуществляли по стандартному протоколу (<https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-staining-intracellular-molecules-using-detergents>). Измерения проводили на проточном цитометре FC500 BeckmanCoulter (США).

Ферментативную активность GCase оценивали в сухих пятнах крови, а также в сухих пятнах лимфоцитов и макрофагов крови на фильтровальной бумаге Whatman 903[®] (Whatman, Германия). Цельную кровь, а также суспензию клеток наносили в объеме, достаточном для равномерного пропитывания обозначенной области на фильтре (25 мкл). Измерения проводили с помощью ВЭЖХ-МС/МС путем измерения концентрации продукта, полученного в результате реакции фермента с субстратом. Предполагалось, что количество полученного продукта прямо пропорционально активности фермента. За основу взят опубликованный протокол (Zhang et al., 2008) с модификациями. Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева. В отличие от протокола, разработанного ранее (Zhang et al., 2008), в нашем исследовании коктейль, содержащий субстрат, внутренний стандарт и буферный раствор для экстракции, добавляли к сухим пятнам биоматериала диаметром 3.2 мм. Инкубационный буфер включал в себя 0.1 М буферный раствор формиата аммония, pH 4.4, 8 мкмоль/л акарбозы и 9.6 г/л таурохолатата натрия. Разделение продуктов реакции, внутренних стандартов и оставшихся в смеси субстратов проводили на системе ВЭЖХ-МС/МС, состоящей из ВЭЖХ Schimadzu LC20 (Schimadzu, Япония) и tandemного масс-спектрометра API 3200 QTrap (ABSciex, США), в режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring — MRM).

Концентрацию лизосфинголипидов HexSph (смесь глюкозилсфингозина (GlcSph) и галактозилсфингозина (GalSph)) определяли по известному протоколу (Polo et al., 2017) с модификациями, в частности измеряя ее в сухом пятне биоматериала. В качестве внутреннего стандарта использовали лизолактозилсфингозин (LysoLC). Система ВЭЖХ-МС/МС состояла из ВЭЖХ Schimadzu Nexera (Schimadzu, Япония) и масс-спектрометра API-5500 QTrap (ABSciex, США). Разделение метаболитов проводили на колонке Phenomenex Fusion-RP 4 мкм размером 2.1 × 50 мм в линейном режиме градиента.

Статистический анализ проводили, используя программу SPSS, версия 23.0. Сравнение вариационных рядов между двумя группами сравнения проводили с ис-

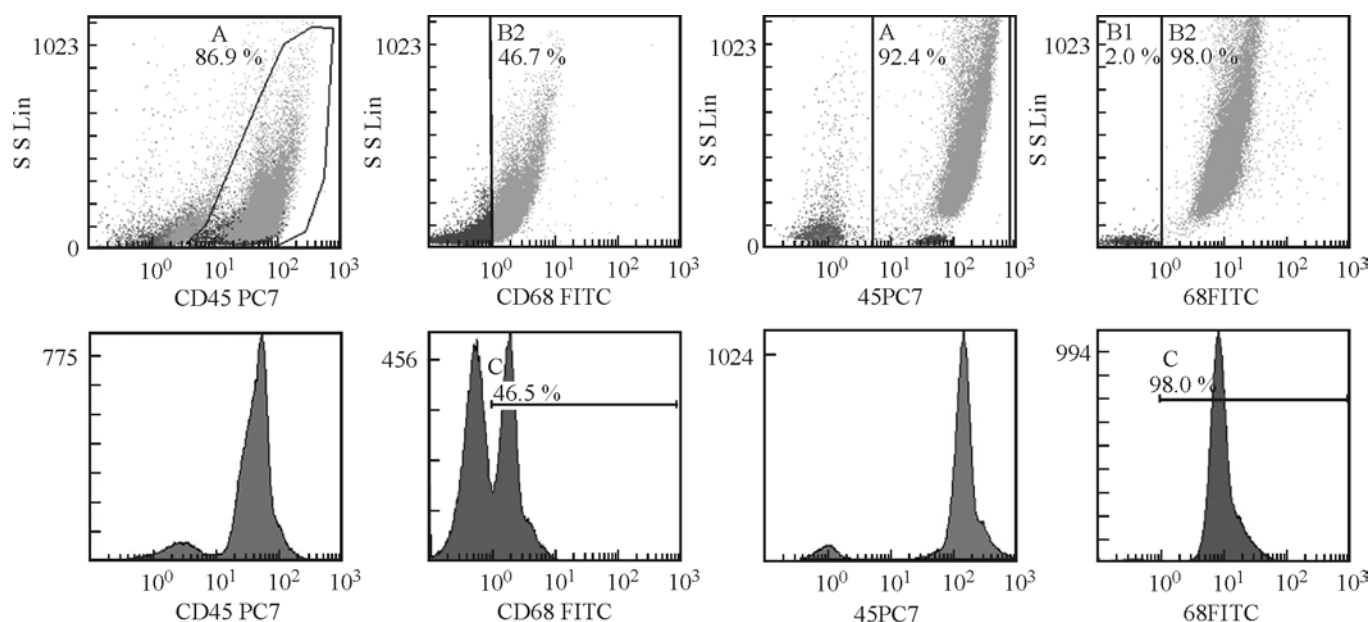


Рис. 1. Гистограммы проточной цитометрии клеток, полученные с использованием флуоресцентномеченных антител к маркерам CD45⁺ и CD68⁺ через 2 ч (а) и 5 сут (б) культивирования.

Слева — содержание лейкоцитов CD45⁺ по отношению ко всем клеткам (%); справа — содержание макрофагов CD68⁺ по отношению к CD45⁺-клеткам (%).

пользованием критерия Манна—Уитни (в случае отсутствия соответствия нормальному распределению). Значения $P < 0.05$ считали статистически значимыми. Данные представлены в виде медианы (минимум—максимум).

Результаты

Для оценки возможности использования макрофагов для анализа ферментативной активности GCase, а также концентрации лизосфинголипидов методом ВЭЖХ-МС/МС на фильтровальную бумагу наносили пятна цельной крови или культивируемые клетки крови в различной концентрации. В случае культуральных макрофагов оценка ферментативной активности GCase в су-

хих пятнах существенно зависела от концентрации клеток, нанесенных на фильтры. При концентрации макрофагов выше $2.52 \cdot 10^6$ кл./мл наблюдали отсутствие линейной зависимости активности GCase от концентрации клеток (см. таблицу). В дальнейшем для оценки ферментативной активности GCase, а также накопления лизосфинголипидов в сухом пятне на фильтровальную бумагу наносили макрофаги в концентрации $2 \cdot 10^6$ кл./мл.

В ходе работы сопоставляли эффективность дифференцировки моноцитов крови в макрофаги в среде в присутствии сыворотки человека и в среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку и фактор роста макрофагов М-КСФ, поскольку в бычьей сыворотке он отсутствует. В обоих случаях на 5-е сут культивирования наблюдали дифференцирование моноцитов в макрофаги.

Активность GCase в сухих пятнах клеток периферической крови индивидуума контрольной группы, нанесенных на фильтровальную бумагу в различных концентрациях

Клетки	Концентрация клеток, млн/мл	Активность GCase в сухих пятнах, мкмоль/л/ч ^а
Лимфоциты периферической крови	4.9	0.060 ± 0.003
	3.6	0.040 ± 0.002
МФ, культивирование в присутствии сыворотки человека	3.0	41.51 ± 10.07
	2.5	24.38 ± 9.22
	2.0	6.03 ± 2.71
	0.8	3.55 ± 0.38
	0.6	2.52 ± 0.43
	0.4	0.73 ± 0.13
МФ, культивирование в присутствии бычьей сыворотки и М-КСФ	3.0	27.50 ± 7.14
	2.0	6.92 ± 2.05
	1.9	5.9 ± 0.3

Примечание. ^а Даны средние значения и их ошибки.

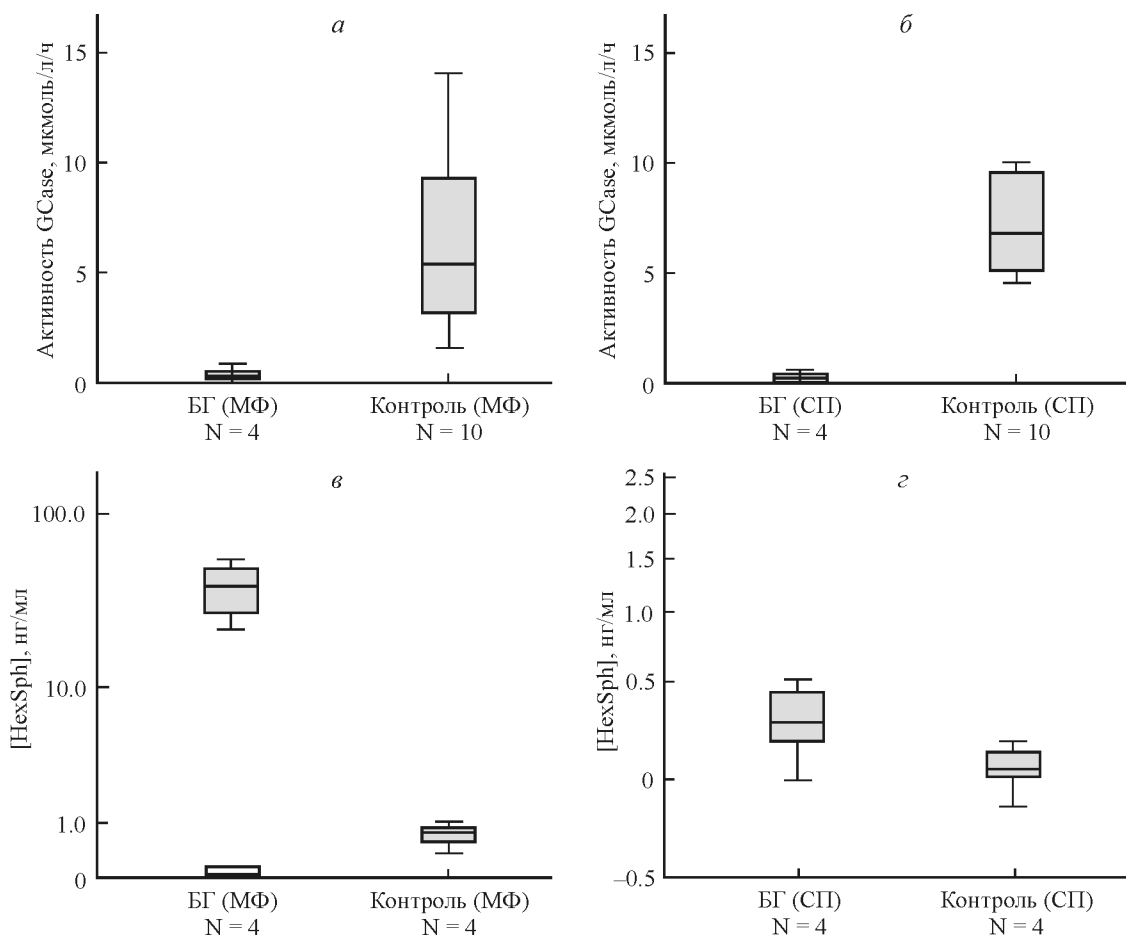


Рис. 2. Активность GCase в макрофагах (а) и сухом пятне крови (б), а также концентрация лизосфинголипидов (HexSph) в макрофагах (в) и сухом пятне крови (г) у пациентов с БГ и здоровых доноров (контроль).

МФ — макрофаги, СП — сухое пятно. Здесь и на рис. 3: данные представлены в виде медианы, вертикальные отрезки минимальные и максимальные значения.

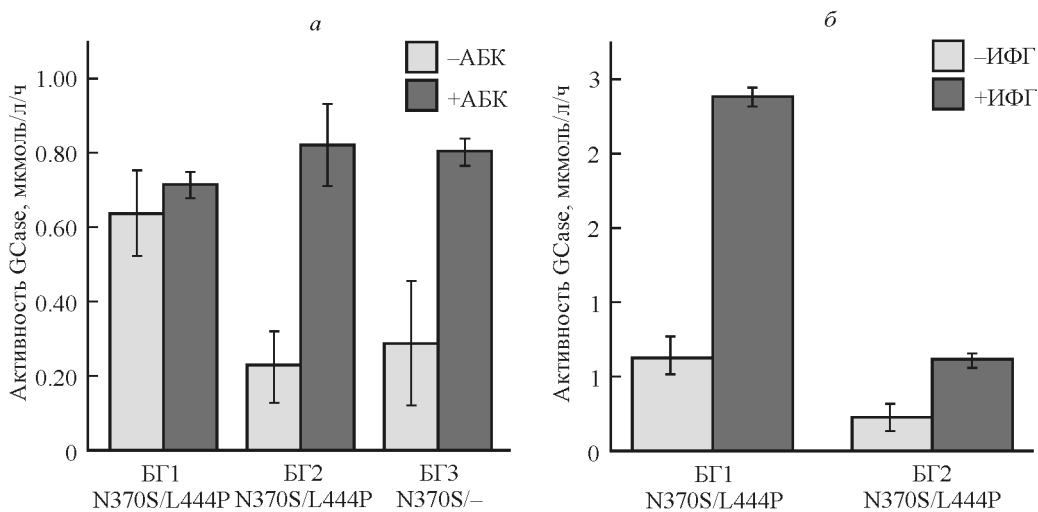


Рис. 3. Активность GCase макрофагов в культуре пациентов с БГ в отсутствие (светлые столбцы) и в присутствии (черные столбцы) амброксала (АБК, а) и изофагомина (ИФГ, б).

По горизонтали внизу — генотип пациента с БГ.

Эффективность дифференцировки достигала 98 % (процентное соотношение клеток макрофагов к моноцитам на 5-е сут культивирования). В дальнейшей работе макрофаги культивировали в присутствии М-КСФ ввиду отсутствия различий эффективности между двумя способами культивирования, а также относительной дешевизны данного способа.

Нами проведено сопоставление активности GCase в сухих пятнах крови и макрофагов, культивируемых в присутствии М-КСФ, между пациентами с БГ ($n = 4$) и контрольной группой ($n = 10$). Снижение активности GCase у пациентов с БГ по сравнению с контролем продемонстрировано как в сухих пятнах крови ($P < 0.001$), так и в культивируемых макрофагах ($P < 0.001$) (рис. 2, а, б). Также было показано статистически значимое повышение концентрации HexSph как в сухом пятне крови пациентов с БГ, так и в сухом пятне культивируемых макрофагов по сравнению с контрольной группой ($P < 0.001$ в обоих случаях) (рис. 2, в, з).

С целью оценки возможности использования предложенного подхода для скрининга препаратов, повышающих активность GCase, мы культивировали в присутствии фармакологических шаперонов GCase изофагомина (30 мкМ) и амброксола (50 мкМ) макрофаги пациентов с БГ (БГ1—БГ3) с наиболее частыми мутациями в гене *GBA* (L444P и N370S) с генотипом: N370S/L444P (БГ1, мужчина 57 лет; БГ3, мужчина 63 года), N370S/– (БГ2, женщина 53 года). Продemonстрировано увеличение активности GCase в макрофагах периферической крови пациентов с БГ в присутствии обоих шаперонов (рис. 3). Ранее изофагомин и амброксол в аналогичных концентрациях были использованы при оценке их влияния на активность GCase в фибробластах от больных БГ (Khanna et al., 2010; Sun et al., 2012; McNeill et al., 2014).

Обсуждение

В настоящей работе с использованием различных методов культивирования макрофагов из периферической крови человека показано, что при выбранных условиях культивирования (получение макрофагов из моноцитов с использованием фактора М-КСФ) макрофаги пациентов с БГ отражают изменение ферментативной активности GCase и накопление лизосфинголипидов при их оценке в сухом пятне, наносимых на фильтровальную бумагу в количестве $2 \cdot 10^6$ кл./мл.

Выбор в качестве объекта исследования макрофагов периферической крови является одним из наиболее перспективных подходов для изучения молекулярных механизмов дисфункции GCase (Aflaki et al., 2014). Это обусловлено тем, что именно макрофаги осуществляют иллюминацию из кровяного русла эритроцитов, мембраны которых богаты глюкоцереброзидом, что обуславливает высокий уровень ферментативной активности GCase в данных клетках. Культивированные макрофаги периферической крови человека уже успешно использовали для исследования молекулярных особенностей патогенеза БГ. Так, ингибирование активности GCase при культивировании макрофагов с использованием селективного ингибитора кондуриitol-B-эпоксида приводило к накоплению лизосфинголипидов (Dekker et al., 2011). Кроме того, культивирование макрофагов пациентов с БГ использовали в поиске фармакологических шаперонов GCase для терапии этого заболевания (Aflaki et al., 2014, 2016; Rodri-

quez-Lavado, 2014). В этих работах (Aflaki et al., 2014, 2016), так же как и в настоящей, использовали М-КСФ для получения макрофагов из моноцитов человека.

Мы подтвердили, что оценка активности GCase в культивируемых макрофагах отражает изменение активности GCase в крови пациентов с БГ, что и предполагает адекватность использования данного подхода для изучения молекулярных механизмов GBA-БП и скрининга потенциальных активаторов GCase, которые могут быть использованы для лечения как нейрональных форм БГ, так и БП. В настоящее время для оценки эффективности фармакологических шаперонов GCase также используют макрофаги и дофаминергические нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) (Panicker et al., 2014). Однако следует отметить, что этот подход является дорогостоящим и времязатратным, и такие исследования остаются единичными.

В настоящей работе мы впервые показали, что оценка активности GCase методом ВЭЖХ-МС/МС при культивировании макрофагов из моноцитов периферической крови с использованием М-КСФ отражает снижение ферментативной активности GCase, наблюдаемое в сухих пятнах крови у пациентов с БГ. Метод ВЭЖХ-МС/МС является сегодня наиболее чувствительным для оценки активности ферментов и концентрации метаболитов и в данный момент активно внедряется в клиническую практику для диагностики БГ (Polo et al., 2017). Обсуждается преимущество использования данного метода для оценки ферментативной активности GCase с использованием флуоресцентномеченных субстратов (Yadav et al., 2015; Wolf et al., 2017). В частности, используя оценку активности GCase и уровня субстратов в сухом пятне крови методом ВЭЖХ-МС/МС, мы ранее показали, что пациенты с БП, имеющие мутацию в гене *GBA* в гетерозиготном состоянии, также демонстрируют снижение ферментативной активности GCase и увеличение концентрации HexSph (Pchelina et al., 2017, 2018).

Использование фармакологических шаперонов GCase в настоящее время рассматривается в качестве перспективных подходов к терапии при лечении пациентов с БГ (Schapira et al., 2013). В настоящем исследовании впервые проведено сокультивирование макрофагов с ранее описанными фармакологическими шаперонами GCase изофагомином и амброксолом. Ранее эффективность шаперонов GCase показана в отношении восстановления активности мутантных форм GCase на фибробластах пациентов с БГ и БП, а также на мышечных моделях этих заболеваний (Lieberman et al., 2007; Sun et al., 2012). Необходимо отметить, что в нашем исследовании ферментативная активность GCase макрофагов периферической крови пациентов с БГ в присутствии амброксола увеличилась в 1.2—1.9 раза, что составило 11.6 ± 2.3 % от ферментативной активности GCase в контрольной группе. В то же время при обработке макрофагов двух пациентов с БГ изофагомином наблюдали увеличение ферментативной активности GCase в 2 и 3.6 раза, что составляло 11.6 и 44 % соответственно от среднего уровня ферментативной активности GCase в контрольной группе.

Таким образом, нами показано более выраженное влияние изофагомина, чем амброксола, на увеличение активности GCase макрофагов периферической крови пациентов с БГ. Ранее в различных исследованиях на фибробластах пациентов с БГ при использовании изофагомина показано увеличение активности GCase в 1.4—3.5 раза, что составляло до 60 % от уровня активности GCase в

контрольной группе (Khanna et al., 2010; Sun et al., 2012). Также на фибробластах пациентов с БГ и GBA-БП было показано увеличение активности GCase при использовании амброксола (McNeill et al., 2014).

Таким образом, сделанная нами оценка влияния изофагомина и амброксола на активность GCase в макрофагах периферической крови согласуется с результатами аналогичных исследований, выполненных на фибробластах пациентов с БГ. Это подтверждает мнение о том, что данные фармакологические шапероны GCase могут быть использованы для терапии заболеваний, ассоциированных с дисфункцией GCase (Schapira et al., 2013).

Исходя из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что культивирование макрофагов периферической крови пациентов с дисфункцией GCase с последующей оценкой активности GCase и субстратов методом ВЭЖХ-МС/МС может существенно упростить задачу скрининга новых соединений для лечения как нейрональных форм БГ, так и GBA-БП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 17-75-20159).

Список литературы

- Aflaki E., Borger D., Moaven N., Stubblefield B., Rogers S., Patnaik S., Schoenen F., Westbroek W., Zheng W., Sullivan P., Fujiwara H., Sidhu R., Khaliq Z., Lopez G., Goldstein D., Ory D., Marugan J., Sidransky E. 2016. A new glucocerebrosidase chaperone reduces synuclein and glycolipid levels in ipsc-derived dopaminergic neurons from patients with gaucher disease and parkinsonism. *J. Neurosci.* 36 : 7441—7452.
- Aflaki E., Stubblefield B., Maniawang E., Lopez G., Moaven N., Goldin E., Marugan J., Patnaik S., Dutra A., Southall N., Zheng W., Tayebi N., Sidransky E. 2014. Macrophage models of gaucher disease for evaluating disease pathogenesis and candidate drugs. *Sci. Translat. Med.* 6 : 240ra73. Doi: 10.1126/scitranslmed.3008659.
- Borger D. K., Aflaki E., Sidransky E. 2015. Applications of iPSC-derived models of Gaucher disease. *Ann. Translat. Med.* 3 : 295.
- Brady R. 2006. Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Ann. Rev. Med.* 57 : 283—296.
- Dekker N., van Dussen L., Hollak C., Overkleeft H., Scheij S., Ghauharali K., van Breemen M., Ferraz M., Groener J., Maas M., Wijburg F., Speijer D., Tylki-Szymanska A., Mistry P., Boot R., Aerts J. 2011. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood.* 118 : e118—e127.
- Khanna R., Benjamin E., Pellegrino L., Schilling A., Rigat B., Soska R., Nafar H., Ranes B., Feng J., Lun Y., Powe A., Palling D., Wustman B., Schiffmann R., Mahuran D., Lockhart D., Valenzano K. 2010. The pharmacological chaperone isofagomine increases the activity of the Gaucher disease L444P mutant form of β -glucosidase. *FEBS J.* 277 : 1618—1638.
- Lieberman R., Wustman B., Huertas P., Powe A., Pine C., Khanna R., Schlossmacher M., Ringe D., Petsko G. 2007. Structure of acid beta-glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease. *Nat. Chem. Biol.* 3 : 101—107.
- McNeill A., Magalhaes J., Shen C., Chau K., Hughes D., Mehta A., Foltynie T., Cooper J., Abramov A., Gegg M., Schapira A. 2014. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain.* 137 : 1481—1495.
- Messner M. C., Cabot M. C. 2010. Glucosylceramide in humans. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688 : 156—164.
- Panicker L., Miller D., Awad O., Bose V., Lun Y., Park T., Zambidis E., Sgambato J., Feldman R. 2014. Gaucher iPSC-derived macrophages produce elevated levels of inflammatory mediators and serve as a new platform for therapeutic development. *Stem Cells.* 32 : 2338—2349.
- 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 lysosphingolipids accumulation in patients with Parkinson's disease with GBA mutations. *Movement Disorders.* 33 : 1316—1321.
- Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G., Andoskin P., Senkevich K., Nikolaev M., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Fedotova E., Abramycheva N., Usenko T., Kulabukhova D., Lavri nova 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.
- Polo G., Burlina A., Kolamunnage T., Zampieri M., Dionisi-Vici C., Strisciuglio P., Zaninotto M., Plebani M., Burlina A. 2017. Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 : 404—414.
- Rocha E., Smith G., Park E., Cao H., Brown E., Hayes M., Beagan J., McLean J., Izen S., Perez-Torres E., Hallett P., Isacson O. 2015. Glucocerebrosidase gene therapy prevents α -synucleinopathy of midbrain dopamine neurons. *Neurobiol. Dis.* 82 : 495—503.
- Rodriguez-Lavado J., de la Mata M., Jiménez-Blanco J., García-Moreno M., Benito J., Díaz-Quintana A., Sánchez-Alcázar J., Higaki K., Nanba E., Ohno K., Suzuki Y., Ortiz Mellet C., García Fernández J. 2014. Targeted delivery of pharmacological chaperones for Gaucher disease to macrophages by a mannosylated cyclodextrin carrier. *Org. Biomol. Chem.* 12 : 2289—2301.
- Schapira A., Gegg M. 2013. Glucocerebrosidase in the pathogenesis and treatment of Parkinson disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 110 : 3214—3215.
- Sidransky E., Nalls M., Aasly J., Aharon-Peretz J. et al. 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New Engl. J. Med.* 361 : 1651—1661.
- Sun Y., Liou B., Xu Y., Quinn B., Zhang W., Hamler R., Setchell K., Grabowski G. 2012. Ex vivo and in vivo effects of isofagomine on acid β -glucosidase variants and substrate levels in Gaucher disease. *J. Biol. Chem.* 287 : 4275—4287.
- Weiss K., Gonzalez A., Lopez G., Pedoeim L., Groden C., Sidransky E. 2015. The clinical management of type 2 Gaucher disease. *Mol. Gen. Metab.* 114 : 110—122.
- Wolf P., Alcalay R., Liong C., Cullen E., Pauciulo M., Nichols W., Gan-Or Z., Chung W., Faulkner T., Bents C., Pomponio R., Ma X., Kate Zhang X., Keutzer J., Oliva P. 2017. Tandem mass spectrometry assay of β -glucocerebrosidase activity in dried blood spots eliminates false positives detected in fluorescence assay. *Mol. Gen. Metab.* 123 : 135—139.
- Yadav A., Shen D., Shan X., He X., Kermod A., Vocadlo D. 2015. Fluorescence-quenched substrates for live cell imaging of human glucocerebrosidase activity. *J. Amyk. Chem. Soc.* 137 : 1181—1189.
- Zhang X., Elbin C., Chuang W., Cooper S., Marashio C., Bearegard C., Keutzer J. 2008. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.* 54 : 1725—1728.

MACROPHAGES FROM PERIPHERAL HUMAN BLOOD AS A MODEL
FOR STUDYING GLUCOCEREBROSIDASE DYSFUNCTION

M. A. Nikolaev,^{1,2} * A. E. Kopytova,¹ G. V. Baydakova,³ A. K. Emelyanov,^{1,2} G. N. Salogub,⁴
K. A. Senkevich,^{1,2} T. S. Usenko,^{1,2} M. V. Gorchakova,² Yu. P. Kovalchuk,² O. A. Berkovich,²
E. Yu. Zakharova,³ S. N. Pchelina^{1,2}

¹ B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute»,
Gatchina, Leningrad Region, 188300,

² I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022,

³ Medical-Genetics Scientific Center, Moscow, 115522, and

⁴ Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg, 197341;

* e-mail: Nikolaev_MA@pnpi.nrcki.ru

Mutations of the *GBA* gene cause Gaucher disease (GD), a lysosomal storage disease (LSD), connected with decreased activity of the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase). Both, homozygous and heterozygous states of *GBA* mutations implicate an increased risk of Parkinson's disease (PD). Cell-based model *in vitro* from patients with mutations in the *GBA* gene is crucial for the new approaches of GD and PD treatment by increasing the GCase enzymatic activity, in particular, using pharmacological chaperones. The current study is based on the use of homogeneous populations of primary human macrophages for investigation of GCase disfunctions. The efficiency of different methods for macrophages culturing was compared with subsequent evaluation of GCase enzymatic activity and lysosphingolipids concentration in the dry spots of macrophages by means of LC-MS/MS. The efficiency of pharmacological chaperones isofagomine and ambroxol in restoring GCase enzymatic activity in the macrophages from GD patients was tested. The following research allowed to propose an approach *in vitro* to screening the potential drugs increases the activity of GCase.

Key words: Parkinson's disease, macrophages, glucocerebrosidase, lysosphingolipids