

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Милан Б. Лакчевић

ПРОЦЕНА СТРУКТУРНИХ И
ФУНКЦИОНАЛНИХ ПРОМЕНА
НЕРВНОГ СИСТЕМА КОД ПАЦИЈЕНАТА
СА ГОШЕОВОМ БОЛЕШЋУ ТИПА 1

Докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Milan B. Lakočević

ASSESSMENT OF STRUCTURAL AND
FUNCTIONAL CHANGES OF THE
NERVOUS SYSTEM IN PATIENTS WITH
TYPE 1 GAUCHER DISEASE

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019.

Ментор:

Академик Владимир Костић, Универзитет у Београду, Медицински факултет

Коментор:

Проф. др Милан Петаков, Универзитет у Београду, Медицински факултет

Чланови комисије:

1. Проф. др Јасна Зидверц Трајковић, Универзитет у Београду, Медицински факултет
2. Проф. др Мирјана Платиша, Универзитет у Београду, Медицински факултет
3. Проф. др Мирослав Савић, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

Датум одбране докторске дисертације:

Захваљујем се на критичком мишљењу и подршци при изради ове докторске дисертације председнику САНУ Владимиру Костићу, проф. др Мирјани Платиши, научној сарадници др Лепосави Брајковић, научној сарадници др Бојани Белеслин, проф. др Иванки Марковић, проф. др Милану Петакову и доц. др Марку Даковићу.

Посвећено Јованки

ПРОЦЕНА СТРУКТУРНИХ И ФУНКЦИОНАЛНИХ ПРОМЕНА НЕРВНОГ СИСТЕМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ГОШЕОВОМ БОЛЕШЋУ ТИПА 1

РЕЗИМЕ

Циљ ове студије пресека је да се пружи докази о функционалним променама у централном нервном систему оболелих од Гошеове болести типа 1 (ГБ1) без клиничких неуролошких манифестација, и да се утврди да ли постоје и структурне промене.

Методологија: У истраживање је укључено 28 пацијената са ГБ1 и исти број здравих испитаника спарених по полу, годинама живота и доминантној руци. Каталитичка активност β -гликоцереброзидазе у леукоцитима периферне крви утврђена је спектрофлуорометријским методом. Анализа гена *GBA1* изведена је директним секвенцирањем. Процена функционалних промена нервног система обављена је ^{18}F -ФДГ-ПЕТ снимањем по протоколу за статичке студије мозга. Квантитативна обрада појединачних налаза и квантитативна групна анализа обављене су методом статистичког параметарског мапирања функционалних слика. Евалуација промена у функционисању мозга обављена је и применом фМР на скенеру јачине магнетног поља 3 Т коришћењем 32-каналне завојнице за главу. Протокол аквизиције састојао се од брзе градијент ехо аквизиције са препаратацијом магнетизације. Процењивање промена у дебљини моздане коре уз квантификовање запремина појединих формација мозга вршено је коришћењем техника кортикалног мапирања, као и технике морфометрије засноване на поређењу воксела. Снимљени су соматосензорни потенцијали изазвани електричном стимулацијом *n. medianus*-а обе руке. Надражајима трајања 0,2 ms деловало се на фреквенцији од 5 Hz. Полни хормони мерени су радиоимунолошки методом, коришћењем гама сцинтилационог бројача.

Резултати: Код оболелих од ГБ1, детектована је нова мутација c.968A>G у егзону 7 гена *GBA1*. После ^{18}F -ФДГ-ПЕТ снимања, карактеристичан образац регионалног хипометаболизма гликозе у мозгу добијен је групном СПМ анализом за $p < 0,001$ без корекције за вишеструка поређења. Значајно нижа активација мозга током фМР при извођењу моторичког задатка утврђена је у шест кластера.

Сигнификантно мања дебљина кортекса после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$ констатована је у пет кластера у левој хемисфери и једном кластеру у десној хемисфери мозга. Сигнификантно мања запремина утврђена је само у путамену, лево $p < 0,03$ а десно $p < 0,01$. Код здравих мушкараца, значајна је негативна повезаност централног времена спровођења ССЕР (N20-N13) са тестостероном ($r = - 0,571, p = 0,085$), а код оболелих са естрадиолом ($r = - 0,8220, p = 0,007$). Код здравих жена, сигнификантна је позитивна корелација латенце N13 и естрадиола ($r = + 0,783, p = 0,037$), а код оболелих негативна корелација латенце N9 и естрадиола ($r = - 0,789, p = 0,035$).

Закључак: У ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација, функционалне и структурне промене постоје и у ЦНС-у. На нивоу ЦНС-а постоји сексуални диверзитет: полни хормони су на различите начине повезани с овом болешћу код жена и мушкараца.

Кључне речи: Гошеова болест, β -гликоцереброзидаза, ген *GBA1*, ^{18}F -ФДГ-ПЕТ, фМР, ССЕР, тестостерон, естрадиол

Научна област: медицина

Ужа научна област: неурологија

ASSESSMENT OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHANGES OF THE NERVOUS SYSTEM IN PATIENTS WITH TYPE 1 GAUCHER DISEASE

SUMMARY

The aim of this cross-sectional study is to provide evidence of functional changes of the central nervous system in patients with type 1 Gaucher disease (GD1) without clinical neurological manifestations, and to determine if there are structural changes.

Methodology: The catalytic activity of β -glucocerebrosidase in peripheral blood leukocytes was determined using the spectrofluorometric method. Direct sequencing of the *GBA1* gene was also performed. Computerized tomographic recording using the ^{18}F -FDG-PET was performed to assess central nervous system functional changes during rest. Quantitative processing of individual findings and quantitative group analysis were done using statistical parametric mapping of functional images. Evaluation of changes in brain functioning was also carried out using fMRI on a scanner with a magnetic field strength of 3 T employing a 32-channel head coil. The acquisition protocol consisted of a quick gradient echo acquisition with the preparation of magnetization. Assessment of changes in cortical thickness, with the volume quantifications of individual brain formations, was performed using cortical mapping techniques and morphometry based on voxel-based morphometry. Somatosensory evoked potentials (SSEP) were recorded after electrical stimulation of the median nerve in both arms. Stimuli of 0.2 ms duration, at a frequency of 5 Hz, were used. Sex hormones were measured using radioimmunoassay method with gamma scintillation counter.

Results: In patients with GD1, a novel mutation c.968A>G in exon 7 of the *GBA1* gene was detected. After ^{18}F -FDG-PET recording, the characteristic pattern of regional glucose hypometabolism in the brain was obtained by group SPM analysis for $p < 0.001$ without correcting for multiple comparisons. While performing movement exercises, a significantly lower brain activation in the six clusters was observed on fMRI. Following a Monte Carlo Null Z correction, a significantly lower cortex thickness $p < 0.001$ was seen in five clusters in the left hemisphere, and one cluster in the right hemisphere of the brain.

Significantly smaller volume was observed only in both putamens, with values being on the left $p < 0.03$, and on right $p < 0.01$. In healthy men, there was a significant negative correlation observed between the central conduction time of SSEP (N20-N13) with testosterone ($r = - 0.571$, $p = 0.085$). Interestingly, a negative correlation was also observed in male patients with oestradiol ($r = - 0.8220$, $p = 0.007$). In healthy women, there is a positive correlation between N13 latency and oestradiol ($r = + 0.783$, $p = 0.037$), while a negative correlation between N9 latency and oestradiol in diseased women ($r = - 0.789$, $p = 0.035$).

Conclusion: In GD1 patients without clinical neurological manifestations, functional and structural changes exist in the CNS. At the level of the CNS, gender discrepancies are observed; sex hormones appear to function in different ways based on gender in both healthy and diseased groups.

Key words: Gaucher disease, β -glucocerebrosidase, ^{18}F -FDG-PET, fMRI, SSEP, testosterone, oestradiol

Scientific field: Medicine

Specic medical field: Neurology

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Лизосомски систем и болести накупљања у лизосомима	1
1.2. Молекулски основ Гошеове болести	3
1.3. Ген <i>GBA1</i> , псеудоген ψ <i>GBA1</i> : грађа и еволуција	5
1.4. Пост-транслациона обрада лизосомске β -гликоцереброзидазе	7
1.5. Клинички аспект Гошеове болести	10
1.5.1. Тип 1 Гошеове болести	10
1.5.2. Тип 2 Гошеове болести	11
1.5.3. Тип 3 Гошеове болести	12
2. ЦИЉЕВИ	14
3. МЕТОДОЛОГИЈА	15
3.1. Одабир пацијената	15
3.2. Одређивање каталитичке активности β -гликоцереброзидазе	17
3.3. Анализа гена <i>GBA1</i>	19
3.3.1. Изолација ДНК из крви	19
3.3.2. Реакција ланчаног умножавања <i>GBA1</i>	19
3.3.3. Пречишћавање узорака	21
3.3.4. Асиметрична реакција ланчаног умножавања	21
3.3.5. Преципитација узорка	22
3.3.6. Капиларна електрофореза	22
3.4. Позитронска емисиона томографија	23
3.4.1. Принцип ^{18}F -ФДГ-ПЕТ мозга	23
3.4.2. Аквизиција ^{18}F -ФДГ-ПЕТ података	24
3.4.3. Статистичка обрада ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза	25
3.5. Функционална магнетна резонанција, морфометрија, волуметрија	26
3.5.1. Принцип фМР	26
3.5.2. Аквизиција фМР имиџинга	27
3.5.3. Протокол фМР имиџинга	28

3.6. Соматосензорни евоцирани потенцијали: принцип и аквизиција	28
3.7. Радиоимунолошка анализа	30
3.7.1. Принцип РИА	30
3.7.2. Мерење хормонских параметара	31
3.7.3. Статистичка обрада налаза полних хормона	31
4. РЕЗУЛТАТИ	32
4.1. Активност β -гликоцереброзидазе	32
4.2. Дистрибуција промена у секвенци <i>GBA1</i>	32
4.3. Резултати ^{18}F -ФДГ-ПЕТ	34
4.4. Резултати фМР имицинга	42
4.5. Резултати морфометрије и волуметрије	47
4.6. Латенце ССЕРП и полни хормони	54
5. ДИСКУСИЈА	62
6. ЗАКЉУЧЦИ	75
7. ЛИТЕРАТУРА	76

1. Увод

1.1. Лизосомски систем и болести накопљања у лизосомима

Лизосомски систем је главна регулаторна метаболичка мрежа у еукариотским ћелијама. Образују га лизосоми и конститутивни путеви с којима су лизосоми блиско повезани:

- секреторни путеви којима се транспортују новосинтетисани ензими и други протеини до лизосома
- ендосомски путеви који доприносе сигналној трансдукцији
- токови аутофагије којима се испоручује интраћелијски материјал за лизосомску разградњу
- путеви уштеде који олакшавају излазак производа разградње у лизосомима до осталих места у ћелији ради поновног коришћења (рециклирање) (Walkley, 2009).

Упоредо с тим процесима делују и додатни протеолитички механизми, као што је систем убиквитин-протеазом, који има значајну улогу у ефикасном обрту протеина.

У лумену лизосома, претежно хидролитички ензими, оптимално активни при киселом рН, имају капацитет да разграде већину макромолекула, укључујући протеине, угљене хидрате, липиде, РНК и ДНК. После разградње тих супстанци, проистекле аминокиселине, шећери, прости гликолипиди, холестерол и нуклеотиди преносе се кроз мембрану лизосома уз помоћ специфичних транспортних протеина да би били испоручени другим ћелијским органелама ради даље употребе у процесима биосинтезе (Micseny & Walkley, 2012).

Мембрана лизосома садржи високо гликозиловане трансмембранске протеине који формирају специјализовани гликопротеински слој важан за регулацију стабилности и интегритета лизосома. Док трансмембрански сегменти лизосомских мембранских протеина директно учествују у транспорту кроз мембрану, цитосолни делови тих протеина, који су обично кратки, посредују у контакту са цитосолним протеинима и протеинима на другим органелама (Micseny & Walkley, 2012).

Из расположивог протеомског скупа података добијеног анализом протеина лизосомских мембрана, екстраховано је око 300 конститутивних протеина лизосомске мембране. Већина од њих су новоидентификовани и непознате су функције. Тек предстоји да се схвате сложеност, молекулски учесници и детаљи догађаја које регулишу мембрански протеини између цитосолног и лизосомског света. Поремећај баланса у тој интеракцији доводи до болести накупљања у лизосомима (Schwake, 2013; Marques & Saftig, 2019).

Болести накупљања у лизосомима могу се класификовати двојачко:

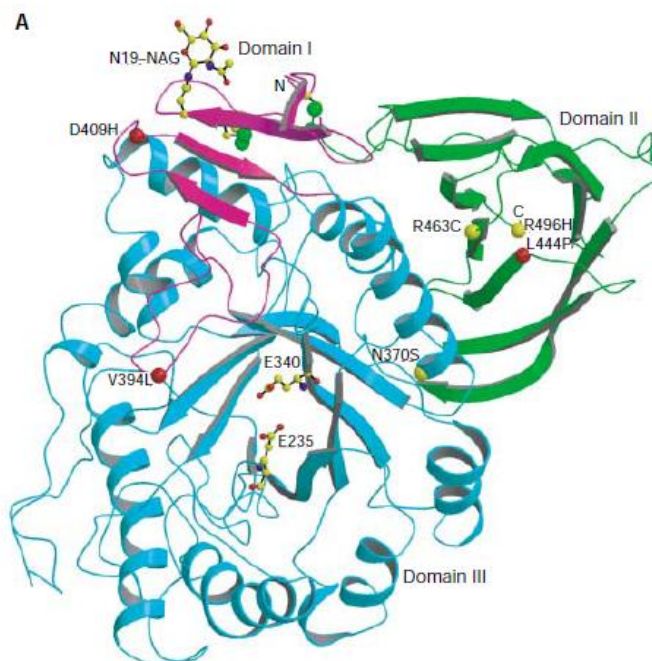
- историјски, на основу биохемијске природе продуката накупљања (нпр. сфинголипидозе, мукополисахаридозе, гликопротеинозе), што је и даље најинформативнија класификација за оне болести које потичу из блока једног ензимског корака на катаболичком путу (Hers, 1963)
- разјашњењем молекулског основа лизосомских поремећаја омогућена је класификација на основу природе молекулског дефицита у лизосомском систему (као што су транспорт молекула кроз мембрану лизосома или унутар ендосомско-лизосомског система, посттранслациона модификација и интраћелијски транспорт лизосомских ензима), таква класификација фокусира пажњу на функцију и патогенетске механизме, као и на развој логичких видова терапије (Micseny & Walkley, 2012)

До данас је познато око 70 болести накупљања у лизосомима (Platt et al., 2018). Може их узроковати не само дефицит функције лизосомских хидролаза, него и других лизосомских и нелизосомских протеина, укључујући ензиме, солубилне неензимске протеине, као и протеине повезане с мембраном, који су од критичке важности за правилно функционисање лизосомског система (Marques & Saftig, 2019).

1.2. Молекулски основ Гошеове болести

Прва описана болест накупљања у лизосомима је ретка аутомно-рецесивна Гошеова болест (ГБ) (*la maladie de Gaucher*). Настаје због смањене активности ензима β -гликоцереброзидазе (β Г), који је у катаболизму гликофинголипида одговоран за хидролизу гликозилцерамида (Brady et al., 1965).

β Г је ензим сачињен од 497 аминокиселина, молекулске је тежине од приближно 60 kD. Кристална структура апоензима β Г разрешена је 2003. године (слика 1). Слободни ензим садржи три удаљена неконинуална домена. Домен I је најмањи, у њега су укључени аминокиселински (АК) остаци 1-27 и 383-414, садржи два дисулфидна моста. Гликозилација АК остатака на положају 19 унутар њега је од есенцијалне важности за развој каталитичке активности. Домен II је најмањи, обухвата АК остатке 30-75 и 431-497. Каталитички домен III је највећи од њих, садржи резидуе 76-381, и 416-430. Каталитичка места су АК остаци на положају E 235 и E 340. Између домена I и III одвија се тесна интеракција (Dvir et al., 2003).



Слика 1. Кристална структура β -гликоцереброзидазе (Dvir et al., 2003).

Најчешћи узрок ГБ су хомозиготне и сложене хетерозиготне мутације у гену *GBA1*, због којих се формира функционално неефикасан мутирани ензим.

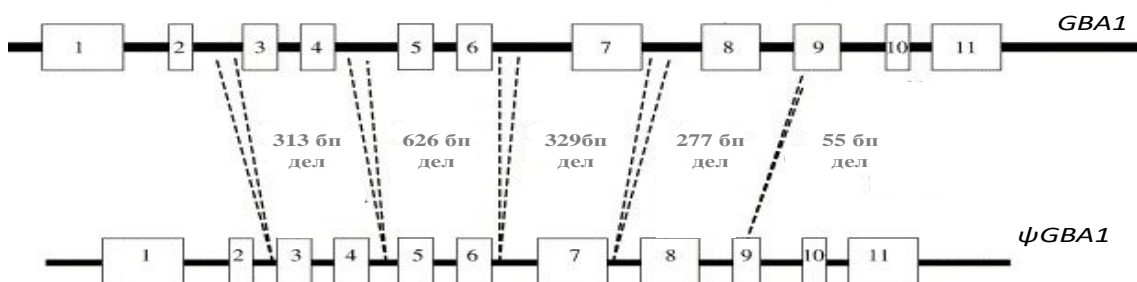
До сада је идентификовано више од 500 мутација које доводе до губитка функције гена *GBA1* (Davidson et al., 2018). Мутације у *GBA1* су највећи познати генетички фактор ризика за развој паркинсонизма, али потребно је истаћи да проспективне клиничке студије показују да се код већине пацијената са ГБ и носилаца мутације у једном од алела тога гена неће развити паркинсонизам (Bultron et al., 2010). Више од 80% су тачкасте мутације (супституција једног нуклеотида) или мале генске алтерације: мутације промењеног смисла (*missense mutations*), мутације без смисла а преурађене терминације (*nonsense mutations*), мутације на месту искрајања егзона (*splice site mutations*), делеције или инсерције једног или више нуклеотида. Релативно су честе рекомбинације са високо хомологим псеудогеном. Рекомбинантни алели могу да проистекну из конверзије гена, фузије или дупликације. Места рекомбинације су варијабилна, у региону од интрона 2 до егзона 11 (нпр. алел *RecNcil*) (Hruska et al., 2008; Maor et al., 2016).

Резидуална активност β Г доводи до непотпуног катаболичког блока са последичном акумулацијом нехидролизованог супстрата гликозилцерамида у свим ћелијама, нарочито у макрофагима. Будући да је гликозилцерамид важан конституент биолошких мембрана и кључни посредник у метаболизму гликофинголипида, његово нагомилавање је окидач каскаде патолошких збивања чији је резултат прогресивна мултисистемска ГБ (Futerman, 2006). Због прекомерног нагомилавања гликозилцерамида и гликозилсфингозина у лизосомима, активирани макрофаги секретују цитокине који су окидачи проинфламаторних и антиинфламаторних одговора у ткивима. Све то доводи до висцералних, хематолошких, скелетних и неуролошких промена у ГБ (Hogowitz et al., 2016).

На основу клиничког испољавања, ГБ се традиционално класификује на три типа: ненеуронопатски тип 1, акутни неуронопатски тип 2 и хронични неуронопатски тип 3. Путативно ненеуронопатски тип 1 је врло хетероген. Широк фенотипски спектар ГБ1 испољава се у распону од виртуелно асимптоматског (типично је да се такви пацијенти дијагностикују случајно) до тешког, по живот опасног фенотипа (Elstein & Zimran, 2013).

1.3. Ген *GBA1*, псевдоген ψ *GBA1*: грађа и еволуција

Ген за лизосомску, мембрански везану β Г (*GBA1*) локализован је на 1. хромосому (1q21) (Horowitz et al., 1989). Састоји се од 11 егзона и 10 интрона, дужине секвенце 7604 базних парова (бп). Високо хомологи псевдоген (ψ *GBA1*) лоциран је 16 кило база (кб) нисходно од гена *GBA1* (Horowitz et al., 1989). Дужина секвенце (ψ *GBA1*) је око 5,5 кб и дели 96 одсто сличности са геном *GBA1* (слика 2). Разлика у величини секвенце између *GBA1* и ψ *GBA1* потиче од инсерције такозваних *Alu* секвенци (кратке репетитивне секвенце ДНК), углавном у интронском региону оба гена (Horowitz et al., 1989). Губитак функционалности у ψ *GBA1* делимично се може објаснити делецијом 5 и 55 бп у 4. и 9. егзону (Horowitz et al., 1989).



Слика 2. Поређење функционалног гена за лизосомску β Г (*GBA1*) и псевдогена (ψ *GBA1*). Оба гена имају 11 егзона (означени су нумерисаним правоугаоницима). Између егзона су интронске секвенце, а границе егзона и интрона између оба гена су идентичне. Величина ψ *GBA1* је мања у односу на *GBA1* за око 1,6 кб због четири велике делеције у интронима 2 (313 бп), 4 (626 бп), 6 (329 бп) и 7 (277 бп) и мање делеције у 9. егзону ψ *GBA1* (55 бп, на слици означено испрекиданим линијама).

Еволуција гена *GBA1* посебно је интересантна за развој ГБ јер се сматра да је дошло до дупликације самог функционалног гена и стварања псеудогена, а затим и до њихове интеракције тј. могуће нехомологе рекомбинације и генске конверзије (Zimran et al., 1990). Рекомбинација између два алела ствара тзв. комплексни алел што чини β Г нефункционалном у више од 20 одсто мутација гена у неким популацијама са ГБ (Beutler et al., 1998).

Истраживања показују да код мајмунā Новог света и код осталих животињских врста постоји само једна копија гена *GBA1*. Пошто су две копије гена *GBA1* идентификоване код мајмунā Старог света и осталих виших примата, с еволутивног аспекта се претпоставља да је дупликација ових гена настала пре око 40 милиона година (Wafaei & Choy, 2005).

Слично као код људи, друга копија гена за β Г код горила и шимпанзи је нефункционална због делеције 55 бп у егзону 9, али се испоставило да је код орангутана непромењена и да је и даље функционална. Тако се сазнало да се делеција егзона 9, која је учинила другу копију гена за β Г нефункционалном, догодила после одвајања орангутана од еволуционе линије развоја човека пре око 13 милиона година, а пре диферентовања горила, 6 милиона година уназад (Miyamoto & Goodman, 1990; Wafaei & Choy, 2005).

Ниједна варијација нуклеотида у гену *GBA1* међу приматима не одговара познатим мутацијама у ГБ код људи (Wafaei & Choy, 2005).

1.4. Пост-транслациона обрада лизосомске β -гликоцереброзидазе

Информациона РНК за *GBA1* човека садржи два функционална почетна (старт) кодона AUG за метионин, који служи као сигнал за почетак синтезе β Г на полирибозомима везаним за ендоплазмични ретикулум (ЕР) (Sorge et al., 1987). Та два физиолошки активна метионина су на растојању од 20 аминокиселина (Pasmanik-Chor et al., 1996). Ако се први метионин по редоследу препозна као стартни, насцентни полипептид имаће на 5' крају нетранслаторну секвенцу од 38 аминокиселина, док ако се препозна други, тај низ биће дуг 18 аминокиселина. За 5' нетранслаторну секвенцу новонасталог полипептида у цитоплазми се везује универзални сигнални рибонуклеопротеински комплекс. У интеракцији са мембраном ЕР, тај комплекс омогућава транслокацију полипептида у лумен ЕР, у ком се 5' нетранслаторна секвенца одстрањује цепањем (хидролизом) (Wild et al., 2002; Halic & Beckmann, 2005).

У ЕР се β Г модификује гликозилацијом на четири од пет постојећих секвенци Asn-x-Ser/Thr (стиче четири бочна олигосахаридна ланца). Гликозилација на првом месту (Asn19) је од суштинске важности за развој каталитичке активности β Г (Berg-Fussman et al, 1993). Надаље, гликозидазе I и II каталитички уклоне са гликана два гликозна остатка, после чега насцентни полипептид бива подвргнут контроли квалитета у ЕР. Ако тај систем препозна да су нормални молекули β Г исправно увијени у нативну тродимензионалну грађу, онда се одстрани и трећа гликозна резидуа под дејством гликозидазе II, као и друга маноза. После такве обраде, β Г се веже за лизосомски интегрални мембрански протеин типа 2 (LIMP-2) (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Zunke et al., 2016).

LIMP-2 је идентификован као селективни и специфични рецептор за β Г, који игра кључну улогу у преносу β Г у лизосоме (Conrad et al., 2017). За њихово рН зависно везивање од главног значаја је хистидин на позицији 171 у молекулу, који такође служи као рН сензор од критичке важности за дисоцијацију тог комплекса рецептор/лиганд у касним ендосомима (Reczek et al., 2007; Blanz et al., 2010). Антероградни транспорт комплекса β Г/LIMP-2 из ЕР у *цис*-Голџи комплекс (ГК) обављају везикуле обложене специфичним цитоплазматским протеинским комплексом (coat protein complex II – COP-II), одговорним за деформисање мембране

ER и формирање везикула (Barlowe et al., 1994). По испоруци садржаја, везикуле се фузионишу са *цис*-ГК (Martinez-Menarguez et al., 1999).

ГК прима протеине чији олигосахариди садрже два ацетилгликозамина и осам манозних остатака. За разлику од већине солубилних протеина који на путу ка лизосомима у *цис* цистернама бивају модификовани манозном фосфорилацијом, за молекуле β Г се не везује маноза-6-фосфат, већ њихови гликани (шећерни остаци) подлежу мултифазној модификацији. Прво се каталитички одстрани три манозна остатка, па дода ацетилгликозамин, потом се одстрани још две манозе а додају два ацетилгликозамина, да би се коначно придодале три галактозе и три остатка сијалинске киселине (Helenius & Aebi, 2001).

Изворни тип (wild type) β Г остаје везан за LIMP-2 све до касног ендосома, у ком пад рН доводи до њихове дисоцијације и ослобађања β Г у унутрашњост лизосома. У лизосому, β Г делује као мембрански везан протеин иако не садржи трансмембранске домене, а LIMP-2 се рециклира у ГК или ER (Reczek et al., 2007).

У ER, прецизно регулисани систем за контролу квалитета спречава излазак протеина неодговарајуће конформације у секреторни пут тако што специфични шаперони у интеракцији са пептидима помажу њихово увијање. Класичан шаперон калнексин препознаје и протеине везане за мембрану и протеине слободне у лумену ER (Hammond et al., 1994; Benyair et al., 2011).

Нормални али погрешно увијени молекули β Г у процесу контроле квалитета бивају задржани и подлежу регликозилацији гликана да би поново ушли у циклус калнексина, што катализује UDP-гликоза:гликопротеин-гликотрансфераза, да би стекли биолошки функционалну конформацију (Sousa et al., 1992; Parodi, 2000). Ако поновљени покушаји увијања буду неуспешни, изврши се ретранслокација таквих молекула кроз мембрану ER у цитоплазму, где подлежу убиквитинацији и деградацији у протеазому (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation – ERAD) (Braakman & Bulleid, 2011; Smith et al., 2011).

Мутиране облике β Г процес контроле квалитета у ER препознаје да су погрешно увијени (нису формиран у потпуно функционалан кватернерни протеин), па бивају подвргнути различитим степенима ERAD-а, на шта утичу два чиниоца: стање увијености мутираног молекула (које је зависно од мутација) и капацитет

система контроле да препозна исправно и погрешно увијене молекуле протеина (Bendikov-Bar & Horowitz, 2012).

Степен функционалности ERAD-а битна је детерминанта тежине ГБ, будући да тај процес одређује колико ће молекула мутираног ензима стићи у лизозоме да обаве хидролизу гликозилцерамида, по стопи која умногоме варира међу протеинским молекулима са различитим мутацијама (различите су резидуалне ензимске активности) (Dinur et al., 1984).

Акумулација неувијених/погрешно увијених молекула β Гу ЕР доводи до стреса, а одговор на стрес је активација три филогенски конзервисана сигнална трансдукциона пута (unfolded protein response – UPR). Мембрана ЕР садржи три независна трансмембранска протеинска сензора стреса (inositol-requiring enzyme 1 – IRE1, double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase – PERK и activating transcription factor 6 – ATF6) који остају у неактивном стању све док је за њих везан луменски протеин BiP (binding immunoglobulin protein). Како се неувијени протеини нагомилавају у ЕР, тако везују BiP који дисосује од IRE1, PERK и ATF6, а то доводи до њихове модификације и сигналне трансдукције. Примарни циљеви UPR-а су да обнови нормалну функцију ћелије заустављањем транслације протеина и да активира сигналне путеве за повећање производње шаперона. Ако се ти циљеви не достигну, UPR усмерава ћелију ка апоптози (Schröder & Kaufman, 2005; Walter & Ron, 2011).

1.5. Клинички аспект Гошеове болести

Процењена глобална преваленца ГБ је од 1 : 50.000 до 1 : 100.000 (Elstein & Zimran, 2013).

1.5.1. Тип 1 Гошеове болести

Тип 1 је најчешћа форма ГБ, дијагностикује се у 90 до 95 одсто случајева. Узраст у ком започне клиничко испољавање болести је варијабилан, код половине броја оболелих се открива пре 10. године живота (Charrow et al., 2000). Пацијенти са благим испољавањем болести могу се дијагностиковати у одраслом животном добу, а неки могу остати асимптоматски током целог живота.

Спленомегалија је главни клинички знак и може бити огромна, да заузима највећи део трбуха и изазива механички проблем са деформацијама, абдоминалном нелагодношћу, или хроничним болом. Међутим, мали је ризик од руптуре слезине после неке трауме. Спленомегалија је одговорна за хиперспленизам који се открива преко тромбоцитопеније и анемије.

Тромбоцитопенија је уобичајена, може да постане тешка и проузрокује хеморагијски синдром. Тромбопатија и низак ниво фактора згрушавања код неких пацијената могу бити основ за тенденцију ка крварењу. Анемија је обично блага, открива се код 30 до 50 одсто пацијената са ГБ1.

Хепатомегалија је ређа него спленомегалија. Обично је мање изражена, а функције јетре су нормалне. Међутим, продужена цитолита може указивати на развој цирозе. Холелитијаза је чешћа код пацијента са ГБ1 него у општој популацији.

Промене на костима манифестују се у виду коштаних криза, остеонекрозе, хроничног бола, остеопеније, остеопорозе, деформитета костију и патолошких фрактура.

Коштане кризе су микроинфаркти који захватају дуге кости (тибија, фемур, са акутним, интензивним, онеспособљавајућим болом. Извештено је да 17 одсто деце доживе коштану кризу пре почетка терапије специфичне за ГБ (Andersson et al., 2008).

Радиолошким прегледом може се утврдити: стањивање кортекса дугих костију, морфолошке промене које карактерише метафизодиафизно увећање дугих костију, врло често деформитет фемура у виду Ерленмајерове боце.

Инфилтрација костију може да изазове фрактуре са тешком консолидацијом и остеосинтезом. А васкуларна некроза главе фемура или хумеруса једно је од најтежих инвалидних стања.

У развојном животном добу, карактеристичан је застој у растењу.

Пацијенти са ГБ1 често пате од хроничног умора.

Паркинсонизам се јавља код 2,2 одсто оболелих од овог примарно висцералног типа болести (Chetrit et al., 2013). Преваленца полинеуропатије код пацијената са типом 1 ГБ повећана је у поређењу са општом популацијом (Biegstraaten et al., 2010).

1.5.2. Тип 2 Гошеове болести

Тип 2 се дијагностикује код око 1 одсто свих пацијената са ГБ. То је типична неуролошка форма одојчади (Mignot et al., 2006). Код деце која су највише погођена, знаци почињу да се испољавају пре деветог месеца живота.

Неуролошки знаци могу да се појаве пре спленомегалије или могу бити откривени у исто време. Први знаци су карактеристична тријада: опистотонус, тешкоће са храњењем и гутањем, и конвергентни страбизам. Могу бити удружени са тризмусом и хипертонијом екстремитета, уз пирамидни и/или екстрапирамидни ригидитет (Mignot et al., 2006, Roshan Lal & Sidransky, 2017).

Апнее, углавном повезане са ларингеалним спазмима, обично се јављају неколико месеци након почетка болести, и како месеци пролазе тако постају све дуже и чешће.

Психомоторни развој може бити успорен. Код неких одојчади може се уочити губитак вештина, али остали настављају да стичу нове вештине упркос прогресији болести.

Спленомегалија увек постоји током болести, у 60 одсто случајева удружена је са тромбоцитопенијом.

Неуспех у напредовању може да буде први знак који привуче пажњу педијатра. Проналази се код 30 одсто пацијената на почетку болести, без асистенције при храњењу прогредира до кахексије.

Захваћеност плућа је углавном повезана са понављаним аспирацијама. Интерстицијални инфилтрати уочени код ГБ2 могу бити знак инфилтрације плућа Гошеовим ћелијама.

Смрт наступа пре краја друге године живота због масовне аспирације или протраховане апнее (Mignot et al., 2006).

1.5.3.Тип 3 Гошеове болести

Тип 3 се дијагностикује код приближно 5 одсто пацијената са ГБ (Charrow et al., 2000). У клиничкој слици комбиновани су висцерални симптоми и знаци какви постоје у типу 1 ове болести са неуролошким знацима, изузимајући неуролошке знаке какви постоје код оболелих од типа 2.

Типом 3 ГБ обухваћени су пацијенти са веома променљивим неуролошким манифестацијама, у распону од благе окуломоторне дисфункције до тешке и брзо напредујуће дегенерације мозга (Roshan Lal & Sidransky, 2017). Почетак болести најчешће је у детињству, при чему се код половине пацијената неуролошки знаци испоље пре узраста од 2 године, према истраживању 131 пацијента у оквиру Међународног регистра за ГБ (Tylki-Szymańska et al., 2010).

Супрануклеарна парализа погледа је најранији и најчешћи неуролошки налаз (код безмало две трећине пацијената). Манифестује се у виду успорених сакадичних очних покрета, предоминантно у хоризонталном правцу (Patterson et al., 1993). Оштећени покрети ока могу бити једини неуролошки знак код неких пацијената током неколико деценија. Међутим, у клиничком току болести обично се јављају додатне неуролошке промене.

Прогресивна церебеларна атаксија и спастичност јављају се код око 20 до 50 одсто болесника са типом 3 ГБ, то рапидно утиче на ходање и стајање које постаје отежано (Davies et al., 2007). Когнитивно оштећење и опадање могу погодити до једне трећине пацијената.

Учесталост епилепсије није прецизно позната. Пријављена је код 16 одсто пацијената у Међународном Гошеовом регистру (Tylki-Szymańska et al., 2010), али може бити да је то потцењено. Извештено је о различитим типовима напада, при чему се посебно издваја подгрупа пацијената који пате од прогресивне миоклоничне епилепсије. Код тих болесника, епилепсија се прогресивно погоршава током времена са разним типовима напада, миоклонусом, когнитивним опадањем и церебеларном дегенерацијом. Неки пацијенти са овим фенотипом не показују клинички значајно висцерално складиштење супстрата ензима, што указује на то да би требало тестирати недостатак β -гликоцереброзидазе код пацијената са прогресивном миоклоничном епилепсијом, чак и када нема спленомегалије (Mignot et al., 2013).

Тип 3 ГБ се даље клинички разврстава на три подтипа:

- 3А (пацијенти са благим системским обољењем и прогресивном енцефалопатијом са миоклоничком епилепсијом)
- 3В (у којем је доминантан неуролошки дефицит супрануклеарна парализа погледа)
- 3С (са благим неуролошким обољењем и са калцификацијама аортног залистка).

Међутим, фенотипски је могућа свака комбинација наведених абнормалности (Goke-Alpan et al., 2003). Једини конзистентно посебан фенотип је подтип 3С, који је увек узрокован хомозиготном тачкастом мутацијом с.1342G>C у егзону 9 гена *GBA1* (назив алела према устаљеној номенклатури D409H, аминокиселинска промена р. Asp448His) (Tylki-Szymańska et al., 2010).

2. ЦИЉЕВИ

Овај рад је предузет с циљем да се код оболелих од ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација:

1. Докажу функционалне промене у ЦНС-у,
2. Утврди да ли у ЦНС-у постоје и структурне промене,
3. Испита повезаност функционалних промена у нервном систему и полних хормона.

3. МЕТОДОЛОГИЈА

3.1. Одабир пацијената

Ово истраживање је обухватило 28 пацијената Клиничког центра Србије, 14 жена и 14 мушкараца (просечне године живота $40,6 \pm 12,8$), са потврђеном дијагнозом ГБ1. Дијагноза је постављена клиничким прегледом, биохемијском анализом активности лизосомске, мембрански везане β Г и анализом гена *GBA1*. У истраживање су укључени само пацијенти који ни после десет година клиничког неуролошког праћења нису показали никакве неуролошке знаке. Међу пацијентима, 25 су десноруки, а од преосталих, два су леворука и један амбидекстер. Контролна група се састојала од истог број здравих субјеката који су са групом пацијената спаривани по полу, годинама живота и доминантној руци.

Од укупног броја пацијената, осморо никада није примало специфичну терапију за ГБ, док је 20 континуирано лечено од 5 до 15 година.

На оралној супстрат-редукционој терапији инхибицијом гликозилцерамид синтазе (Eliglustat) било је четворо пацијената.

Међу 16 пацијената који су били на терапији замене ензима у виду интравенске инфузије, једна пацијенткиња је примала рекомбиновани ДНК аналог хумане β Г добијен технологијом активације гена у хуманој ћелијској линији. (Velaglucerase alfa), осморо је примало рекомбиновани ДНК аналог хумане β Г животињског порекла (Imiglucerase), док је остали седморо пацијената примало рекомбиновани ДНК аналог хумане β Г пореклом од биљних ћелија (Taliglucerase alfa).

Ни један од наведених лекова не пролази баријеру крв-мозак (Elstein & Zimran, 2012).

Подаци за групу пацијената су дати у табели 1.

Табела 1. Сумарни подаци о пацијентима са ГБ1

Пацијенти	Пол	Године живота	Висина cm	Тежина kg	Резидуална активност $\beta\Gamma^1$	Доминантна рука	Терапијски статус
п1	Ж	61	160	83	1.51	Д	нелечена
п2	Ж	58	162	52	1.86	Д	ЕРТж
п3	Ж	54	165	76	1.7	Д	ЕРТж
п4	Ж	50	158	53	2.2	Д	ЕРТж
п5	Ж	42	172	57	0.5	Д	ЕРТб
п6	Ж	40	176	80	1	Д	ЕРТб
п7	Ж	39	170	56	0.7	Д	ЕРТж
п8	Ж	35	166	54	1.2	Д	ЕРТж
п9	Ж	34	170	64	1.05	Д	нелечена
п10	Ж	31	164	55	непозната	Д	ЕРТх
п11	Ж	30	161	53	1.8	Д	ЕРТж
п12	Ж	24	153	51	2.13	Д	нелечена
п13	Ж	20	150	49	3.14	Д	СРТ
п14	Ж	19	173	60	1	Д	ЕРТб
п15	М	61	185	73	1.44	Д	ЕРТб
п16	М	59	170	68	0.9	Д	ЕРТб
п17	М	57	167	78	1	Д	ЕРТб
п18	М	55	187	85	непозната	Д	нелечен
п19	М	54	177	78	1.18	Л	ЕРТб
п20	М	43	180	92	0.92	АД	ЕРТж
п21	М	41	168	52	2.1	Л	нелечен
п22	М	41	167	80	1.43	Д	нелечен
п23	М	40	181	71	1.91	Д	нелечен
п24	М	38	175	76	2.46	Д	нелечен
п25	М	34	183	77	1.59	Д	ЕРТж
п26	М	27	194	81	1.7	Д	СРТ
п27	М	26	187	73	1.9	Д	СРТ
п28	М	25	178	64	2.8	Д	СРТ

¹nmol/mg /h, Д- деснорукоост, Л – леворукоост, АД – амбидекстер, ЕРТх,ж,б – ензимска супституциона терапија хуманог, животињског, биљног порекла, СРТ – супстрат редукциона терапија

3.2. Одређивање каталитичке активности β -гликоцереброзидазе

Одређивање каталитичке активности β Г обављало се из хомогената леукоцита изолованих из периферне венске крви, која је узоркована са хепарин-декстранским раствором као антикоагулансом. Леукоцити добијени лизом еритроцита и центрифуговањем на 10.000 обртаја/min, одмах су процесуирани у аналитички рад или замрзавани на -70°C (Wenger et al., 1991; Blaue et al., 2002).

Даљим поступком ултразвучне сонификације, уз додатак 0,25% раствора Tritona X-100, коришћењем ултразвучног сонификатора (HD 2070, Sonopuls, Bandelin Electronic, Berlin, Germany), спроводило се разбијање мембране како леукоцита, тако и самих лизосома. Добијени леукоцитни хомогенат је након тога центрифугован 5 минута на 10.000 обртаја/min (центрифуга са хлађењем Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH PG. KG, Tuttlingen, Germany), у циљу таложења ћелијских мембрана.

С обзиром на то да се каталитичка активност β Г изражава на концентрацију протеина у леукоцитима, добијени хомогенат се истовремено користи за одређивање протеина и каталитичке активности β Г (Daniels et al., 1980; Daniels et al., 1981; Daniels et al., 1982; Moss, 2002).

Концентрација протеина у хомогенату леукоцита одређивана је спектрофотометријским методом са пирогалолом (спектрофотометар Microlab 300 Vital Scientific, Graz, Austria). Пирогалол црвено у присуству молибденових јона, у киселој средини, са протеинима из хомогената леукоцита гради комплекс, чија је апсорбација директно пропорционална концентрацији протеина.

Оптимална концентрација протеина у хомогенату леукоцита за одређивање ензима је 2–4 g/L. Ако је концентрација протеина била већа од 4,0 g/L, хомогенат се разблаживао са 0,25% раствором Tritona X-100. Цео поступак даље ензимске анализе обављан је одмах и на хладном, због мале стабилности ензима у хомогенату леукоцита.

С обзиром на чињеницу да се у хомогенату леукоцита налазе оба изоензима β Г: лизосомска, мембрански везана β Г и цитоплазматска β Г, а да је узрок ГБ дефицит активности лизосомског изоензима, за раздвајање својих активности било је

неопходно инкорпорисање специфичних активатора и инхибитора у реакциону смесу.

Активатори лизосомске гликоцереброзидазе су жучне соли (натријум таурохолат и натријум тауродеокихолат), кисели фосфолипиди и термостабилни гликопротеин, док јој активност комплетно и иреверзибилно инхибише кондуритол Бе епоксид. За разлику од лизосомског ензима, цитоплазматски ензим инхибишу поменуте жучне соли и фосфолипиди, а не инхибише кондуритол Бе епоксид. Лизосомски ензим је стабилан на рН 4,0, док се цитоплазматски ензим брзо и иреверзибилно инактивише при том истом рН, што је методолошки искоришћено за њихово раздвајање (рН-метар НМ-30G, DKK TOA Corporation, Токуо, Јапан).

За ензимску анализу је коришћен спектрофлуориметријски метод са флуоресцентним супстратом 4-метилумбелиферил- β -D-гликозидом (4-МУФ- β -гликозид). Послен 60 минута инкубације на 37°C, реакција је прекидана додатком алкалног пуфера (глицин/NaOH пуфер, рН 10,4), чиме се производ ензимске реакције, 4-метилумбелиферон (слабе флуоресценције), настао као производ активности β Г на 4-МУФ- β -глукозид превод у 4-метилумбелиферон ањон (интензивне флуоресценције).

Флуоресценција насталог производа мерена је на спектрофлуориметру (SPF-500TMC, SLM Aminco, SLM Instruments, Inc., El Cajon, USA), на $\lambda_{EX}=365$ nm и $\lambda_{EM}=448$ nm. У поступку одређивања каталитичке активности ензима, као стандард је коришћен 4-метилумбелиферон.

Дијагноза ГБ је потврђена ензимском анализом активности β Г у Центру за медицинску биохемију Клиничког центра Србије.

Контролна група за одређивање каталитичке активности β Г састојала се од 70 особа из опште популације (33 жене и 37 мушкараца), узраста од 20 до 68 година, код којих је искључено постојање ГБ.

За активност β Г добијен је интервал контролних вредности на здравој српској популацији (као 2,5 и 97,5 перцентили) од 6,65 до 15,90 nmol/mg /h (Šumarac, 2012).

3.3. Анализа гена *GBA1*

3.3.1. Изолација ДНК из крви

Пацијентима је вађена крв у вакутајнерима (BD Vacutainer, Franklin Lakes NJ, USA) са раствором трисодијум-цитрата погодним за каснију изолацију ДНК. Крв је аликвотирана одмах после примања у лабораторију и чувана на -20°C , све до момента изолације ДНК.

За изолацију ДНК коришћен је један од аликвота крви, а ДНК је изолована по протоколу из кита (PureLin Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, Waltham, USA). Изолација се базира на везивању ДНК узорка за силика мембрану у присуству соли, испирању свих нечистоћа из узорка и растварањем геномске ДНК. Укратко, узимано је 200 μL крви, додавана је протеиназа К, РНaza А као и пуфер за дигестију/везивање ДНК за мембрану. Узорак је инкубиран на 55°C 10 минута, јер дигестиони пуфер на поменутој температуру појачава активност протеиназе К и утиче на деградацију протеина. Такође, додатком РН-аза А отклањана је сва преостала РНК у узорку крви. Затим је у лизат додаван етанол, па је пребациван у колумне са силика мембраном. После центрифуговања и испирања пуфером два пута, додаван је пуфер са ниском концентрацијом соли за растварање ДНК. Након растварања, геномска ДНК је била спремна за ланчану реакцију умножавања.

3.3.2. Реакција ланчаног умножавања гена *GBA1*

По изолацији ДНК, рађена је реакција ланчаног умножавања молекула ДНК за ген *GBA1*. Ген *GBA1* састоји се од 11 егзона (сегмената гена који садрже информацију за синтезу протеина) између којих се налазе некодирајући низови – интрони. За секвенцирање гена је неопходно да сваки синтетисани прајмер или граничник на 5' (директном) и на 3' (реверзном) крају ДНК молекула буде дубоко у интрону и покрије цео егзон.

Реакција ланчаног умножавања (*polymerase chain reaction – PCR*) је метод којим се у *in vitro* условима амплификује унапред дефинисана секвенца молекула

ДНК. Тај метод омогућава стварање великог броја копија коришћењем мале почетне количине ДНК узорка. За *PCR* процес је поред граничника и ДНК молекула који служи као образац за формирање комплементарног ланца, потребан и ензим ДНК полимеразе. Улога ДНК полимеразе је да синтетиче нов ланац на основу матрице. Ензим је изолован из термофилних бактерија (*Thermus aquaticus*) које се налазе у термалним изворима, са температурама воде и до 110 °C. Таква ДНК полимеразе је погодна за *PCR* процес зато што је довољно стабилна при високим температурама. У реакцију ланчаног умножавања, поред ДНК, граничника и ДНК полимеразе, додавани су нуклеотиди (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), основни градивни елементи аплификата и одговарајући пуфер са обавезним садржајем магнезијум-хлорида. Пуфер обезбеђује оптималне услове за активност полимеразе (pH од 8,3 до 9,2), док јони магнезијума граде комплексе са нуклеотидима и формирају супстрат за полимеразу.

PCR за *GBA1* рађен је у неколико понављаних циклуса, а сваки циклус чине три различите температуре које се мењају периодично. Први корак је денатурација, када су водоничне везе у дволанчаном молекулу ДНК раскидане на температури од 95°C. У другом кораку, на температури од 60°C и на раздвојеним ланцима ДНК хибридизовани су прајмери са матрицом (анилинг). Трећи корак је елонгација, тј. екстензија ДНК полимеразом ланца на температури од 72°C. Након последњег циклуса, рађена је финална елонгација ради комплетирања делимично синтетисаних продуката на температури од 72°C током 10 минута. За *PCR* је коришћен апарат за амплификацију (Т3000 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany).

После *PCR*-а, узорци су проверавани на 1% агарозном гелу, заједно са маркером (ДНК фрагменти познатих дужина) и на основу величине потврђивана је тачност амплификованог продукта. Потврђени узорци су даље коришћени за пречишћавање.

3.3.3. Пречишћавање узорака

PCR продукти су пречишћавани по протоколу из кита (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Germany) како би узорци били погодни за читање секвенце одређеног гена. Узорци су наносени на силика мембрану са високо засићеним раствором соли који везује ДНК молекуле, затим су испирани, и на крају су растварани ниско засићеним раствором соли или водом. Пречишћавањем су уклањани прајмери и нуклеотиди, као и све друге нечистоће из узорка. Тако добијен узорак је био спреман за асиметрични PCR.

3.3.4. Асиметрична реакција ланчаног умножавања

За секвенцирање је примењена једна од варијација PCR процеса, асиметрични PCR. Асиметрични PCR је метод којим се амплификује један ланац молекула ДНК и додаје само једна прајмер, директни или реверзни прајмер. Прајмер се додаје у вишку и специфичан је за један ланац ДНК који се амплификује. Због споре (аритметичке) амплификације касније у реакцији када се потроше прајмери, неопходни су додатни циклуси.

Одређивање секвенце нуклеотида у ланцу ДНК одвијало се по Сангеровом методу. У реакциону смесу поред 4 дезоксирибонуклеотид-трифосфата (dATP, dGTP, dCTP и dTTP), додавана су и 4 дидезоксинуклеотида обележена флуоресцентним бојама (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP), као и ДНК полимераза, један прајмер и матрични ланац. Дидезоксинуклеотидима недостаје 3' хидроксилна група тако да када се они уграде у ланац, прекида се синтеза па следећи нуклеотид не може да се веже у растући ланац. Како ДНК полимераза катализује додавање коплементарних база на 3' крају, дидезоксинуклеотиди се такмиче у уградњи са одговарајућим нормалним нуклеотидима. На тај начин су се на матрици производили ДНК фрагменти различитих дужина који су на свом 3' крају имали флуоресцентно обележене дидезоксирибонуклеотиде. После асиметричног PCR, узорци су били спремни за преципитацију и секвенцирање.

3.3.5. Преципитација узорка

За преципитацију узорака коришћени су гликоген, амонијум-ацетат и етилен-диамин-тетра сирћетна киселина (EDTA). По вортексовању, додаван је 90% алкохол, па су узорци остављани преко ноћи на -20°C . Следећег дана узорци су центрифуговани 45 минута на $+4^{\circ}\text{C}$, супернатанти су одливани а талог испиран 70% алкохолом. Потом су узорци поново центрифуговани 15 минута на $+4^{\circ}\text{C}$, па су одливани супернатанти, а талог прво сушен и потом растворен у формаиду. Тако растворени су денатурисани на 95°C 2 минута, хлађени на -20°C и даље коришћени за секвенцирање.

3.3.6. Капиларна електрофореза

Секвенцирање је рађено на четворокапиларном аутоматском секвенатору (Applied Biosystem 3130 Genetic Analyzer, Carlsbad, CA, USA), који анализује четири узорка у исто време применом метода капиларне електрофорезе. Капиларна електрофореза је заснована на принципу традиционалних гел елктофоретских метода, где су стаклени капилари испуњени полимером (POP7, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). Полимер омогућава путовање фрагмената ДНК привучених катодом тј. електродом од платине које се налазе на крају капилара. Један део капилара побуђује ласер, па се детекција емисионе светлости карактеристичне таласне дужине из узорка открива и евидентира преко CCD камере која садржи уређај за пренос сигнала ради даље обраде (charge-coupled device). Сакупљени подаци из узорака су аутоматски софтверски обрађивани као електроферограм сачињен од низа обојених пикова где сваки пик представља позицију једног нуклеотида, и ручно су поређени са секвенцом гена *GBA1*.

Анализа гена *GBA1* рађена је у генетичким лабораторијама Академског медицинског центра у Амстердаму и Клинике за неурологију Клиничког центра Србије.

3.4. Позитронска емисиона томографија

3.4.1. Принцип ^{18}F -ФДГ-ПЕТ мозга

Позитронска емисиона томографија (ПЕТ) је метод нуклеарног имиџинга којим се добијају функционалне слике тродимензионалне расподеле радиофармака у организму. Коришћењем специфичних радиофармака (хемијског једињења обележеног радионуклидом – изотопом), могу се визуализовати различити аспекти мождане функције (проток, метаболизам, неуротрансмитери, транспортери, ензими, транспорт аминокиселина, синтеза протеина итд) до молекулског нивоа на неинвазиван начин *in vivo*.

Радионуклиди који се најчешће користе у ПЕТ су позитронски емитери кратког живота: угљеник ^{11}C ($T_{1/2} = 20,4 \text{ min}$), флуор ^{18}F ($T_{1/2} = 110 \text{ min}$), кисеоник ^{15}O ($T_{1/2} = 2,03 \text{ min}$), азот ^{13}N ($T_{1/2} = 9,97 \text{ min}$).

За мерење метаболизма гликозе у мозгу користи се дезоксигликоза, аналог гликозе обележен позитронским емитером флуором – ^{18}F -флуорозезоксигликоза (^{18}F -ФДГ). Тај радиофармак, у конкуренцији са гликозом везује се за гликозне транспортере који омогућају пролаз кроз баријеру крв-мозак. По доспевању у мождане ћелије, хексокиназа фосфорилише ^{18}F -ФДГ у ^{18}F -флуорозеоцигликозо-6-фосфат, који се даље не метаболише и остаје заробљен у неуронима током неколико сати, што омогућаје да се визуализује његова дистрибуција у мозгу.

Радиоактивним распадом језгра атома радионуклида ^{18}F ослобађају се позитрони који, као веома нестабилне честице, врло брзо реагују са слободним електронима из околне материје. При судару, њихове масе нестају (аниhilација) и стварају се два гама фотона са енергијом од по 511 keV. Гама фотони се разилазе у супротном смеру под углом од 180° . Емитовано гама зрачење детектује се циркуларним системом ПЕТ камере. Компјутерском обрадом просторне дистрибуције ових догађаја добијају се функционалне слике расподеле радиофармака ^{18}F -ФДГ у мозгу, који је индикатор функционалне (синаптичке) регионалне мождане активности.

3.4.2. Аквиизиција ^{18}F -ФДГ-ПЕТ података

^{18}F -ФДГ-ПЕТ снимање мозга урађено је у Центру за нуклеарну медицину Клиничког центра Србије. Снимању је подвргнуто 16 пацијената са ГБ1 (7 жена, 9 мушкараца, узраста 44 ± 14 година), који ни после више од 10 година неуролошког праћења нису испољили клиничке знаке неуролошких поремећаја. Контролну групу чинило је 50 здравих испитаника (30 жена, 20 мушкараца, узраста 42 ± 12 година) из лабораторијске базе података INLAB Web service Института за молекуларни имицинг и физиологију у Милану.

Свим испитаницима урађено је компјутеризовано томографско снимање методом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ по протоколу за статичку студију мозга. (Varrone et al, 2009). После најмање 4 часа гладовања, пацијенту се провери вредност гликемије (< 9 mmol/L) па се интравенски убризга радиофармак ^{18}F -ФДГ у дози од 121 до 185 MBq (3-5 mCi) у условима мировања у тихој замраченој просторији у лежећем положају са затвореним очима. После 45 до 60 min вршено је петнаестоминутно снимање ПЕТ/КТ хибридним апаратом (позитронска емисиона томографија/мултислајсна компјутеризована томографија (Biograph 64 TruePoint, Siemens) трансаксијалне резолуције од 5,9 mm.

За реконструкцију томографских ^{18}F -ФДГ-ПЕТ сцинтиграма у фронталној, сагиталној и трансверзалној равни примењен је итеративним метод са корекцијом на атенуацију (слабљење) и скетер (ресејање). Обрада ПЕТ снимака коригованих за атенуацију, КТ снимака и фузионих ПЕТ/КТ снимака урађена је интегрисаним мултимодалним имицинг софтвером (Syngo 2008В Siemens Medical Systems). Функционалне слике приказане су у виду 35 трансаксијалних пресека са стандардном скалом боја у односу на максималне стандардизоване вредности преузимања радиофармака (SUV max).

У евалуацији налаза коришћени су фузиони ПЕТ/КТ пресеци дебљине 5 mm, и независни ПЕТ и КТ пресеци у све 3 равни, као и обртни 3 D приказ.

^{18}F -ФДГ-ПЕТ функционалне слике протумачене су појединачно за сваког испитаника квалитативно (визуелна анализа) и квантитативно (voxel based анализа за

цео мозак методом статистичког параметарског мапирања – СПМ), као и групна квантитативна анализа СПМ методологијом (Penny et al, 2006).

Појединачна квалитативна визуелна анализа метаболизма мозга по регионима (кортекс, базалне ганглије, таламуси, мождано стабло, церебелум) обављена је од стране искусног специјалисте нуклеарне медицине и неурологије Клиничког центра Србије у Београду.

Квантитативна обрада појединачних налаза и квантитативна групна анализа обављене су методом статистичког параметарског мапирања (СПМ) функционалних слика у сарадњи са Институтом за молекуларни имиџинг и физиологију у оквиру италијанског Националног истраживачког центра у Милану.

3.4.3. Статистичка обрада ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза

Регионални метаболизам гликозе у мозгу појединачног пацијента анализиран је квантитативним параметарским t-тестом за 2 узорка поређењем вредности метаболизма сваког пацијента са вредностима метаболизма контролне групе здравих испитаника заснованом на вокселима димензија $2 \times 2 \times 2$ mm. Добијене су СПМ t-мапе регионалног хипометаболизма гликозе преклопљене са атласом магнетне резонанције можданих пресека са статистичком значајношћу $p < 0.05$, уз корекцију за вишеструка поређења.

Да би се добио образац измене регионалног метаболизма гликозе пацијената са ГБ1, урађена је квантитативна групна анализа статистичким t-тестом за 1 узорак која је изведена на СПМ t-мапама хипометаболизма појединачних пацијената. Тако је добијена СПМ t-мапа са регионалним хипометаболизмом мозга који је заједнички за све оболеле од ГБ1 са статистичком значајношћу $p < 0.001$ без корекције и $p < 0,05$ са FWE корекцијом за вишеструка поређења (Family Wise Error).

3.5. Функционална магнетна резонанција, морфометрија, волуметрија

3.5.1. Принцип фМР

Функционална магнетна резонанција (фМР) је неуроимицинг метод за регистровање мождане активности. Делује тако што детектује промене у оксигенацији и протоку крви које се јављају као одговор на промењену неуронску активност – када је подручје мозга активније, троши више кисеоника и да би се задовољила повећана потражња, проток крви се повећава у активној области (Howseman & Bowtell, 1999).

Хемоглобин је дијамагнетски када је оксигенисан али парамагнетски када је дезоксигенисан (што значи да у присуству спољашњег магнетног поља добија магнетне особине). Ова разлика у магнетним својствима доводи до малих разлика у МР сигналу крви у зависности од степена оксигенације. Пошто оксигенација крви варира у зависности од нивоа неуронске активности, те разлике се могу користити за детекцију активности мозга. Овај вид магнетне резонанције познат је као BOLD (blood oxygenation level dependent) имицинг (слика која зависи од нивоа оксигенације крви) (Ogawa et al., 1990).

При повећању неуронске активности иницијално се смањи оксигенација крви, а затим следи период у којем се проток крви повећава, не само до нивоа којим се задовољава захтев за кисеоником, већ долази и до прекомерне компензације као одговор на повећану потражњу. То значи да се оксигенација крви заправо повећава након неуралне активације. Проток крви достигне врхунац после приближно 6 s, а затим се враћа на основни ниво (Howseman & Bowtel, 1999). Пошто повећани цереброваскуларни проток повећа снабдевање кисеоником у већој мери него што је потребно да би се задовољиле локалне метаболичке потребе, то доводи до смањења концентрације дезоксихемоглобина у капиларима и венским крвним судовима. Ово је механизам којим BOLD контраст показује локацију функционалне активације у фМР сликама (Ogawa & Sung, 2019).

У стању мировања (resting state) BOLD активација је одраз флукуације сигнала на веома ниским фреквенцијама (испод 0,1 Hz) (Raichle, 2009). Корелациона

анализа стања мировања има велики потенцијал за откривање функционалних стања мозга. Таква анализа може да идентификује неуронске мреже које одређују људске сензорне и менталне карактеристике, као и неуронске мреже које су новомодификоване учењем (пластичност) или поремећене болестима ЦНС-а (Ogawa & Sung, 2019).

3.5.2. Аквиизиција фМР имицинга

Евалуација промена у функционисању мозга обављена је применом технике функционалног магнетно-резонантног снимања (фМР) на уређају за магнетну резонанцију јачине магнетног поља 3 Т (Siemens Skyra scanner, Erlangen, Germany) коришћењем 32-каналне завојнице за главу. Протокол аквиизиције састојао се од брзе градијент ехо аквиизиције са препаратацијом магнетизације (MP RAGE). Параметри MP RAGE секвенце су: време понављања (repetition time – TR) 2300 ms, време еха (echo time – TE) 2,98 ms, време инверзије 900 ms, угао одклона (flip angle – FA) = 90°, величина матрице 256x256, видно поље (field of view – FOV) 256x256, градијент ехо секвенце за мапирање поља (TR = 400 ms, TE = 4,92/7,38 ms, FA = 60°, матрица 64x64, FOV 192x192) и ехо планарне BOLD секвенце (TR = 3200 ms, TE = 30 ms, FA = 60°, матрица 96x96, FOV 192x192). T2 турбо спин ехо секвенца додата је протоколу ради приказа евентуалне патологије мозга.

Процењивање промена у дебљини možдане коре уз квантификовање запремина појединих формација мозга вршена је коришћењем техника кортикалног мапирања (програм Freesurfer), као и технике морфометрије засноване на поређењу воксела (voxel-based morphometry). Као основ за анализу коришћене су T1W слике високе резолуције.

Све наведене технике МР биле су обједињене у јединствен протокол прегледа, што је изискивало само један долазак испитаника у Центар за магнетну резонанцију КЦС.

3.5.3. Протокол фМР имицинга

Парадигма фМР имицинга састојала се од наизменичних блокова мировања и задатка у трајању од по 30 s сваки. У току блока мировања, испитаницима је наложено да држе руке на столу скенера. У току блока са задатком, од испитаника је тражено да понављају у низу покрете опозиције прстију према палцу (по редоследу: палац – индекс, средњи, домали, мали прст) истовремено на обе шаке. Да би се обезбедило исправно извођење, пола сата пре МР скенирања, испитаници су замољени да тај задатак ураде два пута.

3.6. Соматосензорни евоцирани потенцијали: принцип и аквизиција

Соматосензорни евоцирани потенцијали (ССЕП) су неурофизиолошки метод испитивања функционалног интегритета соматосензорног система. То су акциони потенцијали генерисани у периферним деловима сензитивних путева као одговор на физички надражај из спољашње средине. При стимулацији *n. medianus*-а, талас деполаризације преноси се сензитивним влакнима периферног живца преко задњих рогова кичмене мождине, дуж задњег фуникулуса до нуклеуса продужене мождине, одатле лемнискусом медијалисом до вентролатералних и постеролатералних нуклеуса у таламусу, и онда таламо-кортикалном пројекцијом до примарне соматосензитивне коре мозга (Ђурић, 2002).

Пацијенти и здраве контроле испитивани су применом стандардизованог метода ССЕП, надраживањем десног и левог *n. medianus*-а у пределу ручног зглоба. Стимулација је вршена помоћу специјалних површинских електрода које се састоје од катоде и аноде. Катода је постављана директно изнад живца, а анода 3-4 cm дистално од катоде. Интензитет стимулације био је прилагођаван на вредност непосредно изнад прага моторног одговора (2-6 mA), што је као резултат давало слаб мишићни трзај у пределу тенара. Трајање појединачног стимулуса било је 0,2 ms, при фреквенцији стимулације периферног нерва од 5 Hz.

За детекцију одговора коришћене су површинске Ag-AgCl диск електроде пречника 0,7 cm позициониране у пределу ипсилатералне наткључне јаме (Ербова

тачка), на постериорној страни врата у пројекцији трнастог наставка 7. вратног пршљена, као и контралатерално над скалпом у позицији паријеталне тачке С3 односно С4 које репрезентују пројекцију примарног соматосензитивног кортекса леве и десне хемисфере церебрума. Референтна цефаличка електрода је постављана на позицију Fz. Пре позиционирања електрода, кожа је чишћена алкохолом. Електроде су постављане како је по међународном систему 10-20 предвиђено за овај модалитет евоцираних потенцијала.

По конвенцији, електроде са десне стране су обележене парним бројевима, оне са леве непарним, док словне ознаке Fz говоре да је локација електроде у фронталном реду дуж средње линије поглавине. Електрода за уземљење пацијената постављана је на чело, где не смета стандардним електродама. Електроде имају отвор у центру кроз који је наношена контактна паста. Паста омогућује пренос сигнала са коже на електроду путем јонских интеракција насталих између електролитске пасте и површине коже с једне стране, и електролитске пасте и унутрашње површине електроде с друге стране.

Пошто су изазвани потенцијали врло слаби у односу на целокупну електричну активност, неопходно је понављање стимулације периферног живца и усредњавање. Довољно јасан одговор за интерпретацију добијен је низом од 300 понављања. За време таквог поступка, сигнал се повећава сумирањем, сразмерно броју стимулуса. Усредњавањем се редукује основни шум и увећава жељени одговор (Ђурић, 2002).

Електродна импеданца (отпор између коже и електрода) одржавана је константно на вредностима нижим од 5 k Ω . Низ од 300 понављаних одговора био је усредњаван и складиштен на диску рачунара у циљу накнадне процене (off-line) латенце појединачних компоненти одговора. Време анализе износило је 50 ms. Распон филтера је подешен на пропусни опсег < 10 Hz и 2 kHz. Регистрована су најмање два записа у циљу потврђивања поновљивости и олакшавања препознавања појединих компоненти одговора.

Порекло компоненти одговора добијеног надраживањем медијалног живца су: N9 - брахијални плексус, N11 и N13 – дорзалне колумне, нуклеус кунеатус, N20 и P25 – примарни сензорни кортекс (Allison et al., 1991; Ђурић, 2002).

Латенца је временски интервал од стимулације до појаве одговора. Мери се у милисекундима. При анализи добијених одговора, као мерна тачка користи се врх таласа. Латенца представља најзначајнији и најпоузданији параметар у анализи евоцираних потенцијала. Разлике латенци N20-N13 и P25-N13 представљају централна времена спровођења, а P25-N20 време спровођења кроз примарни сензорни кортекс (Allison et al., 1991; (Aminoff et Eisen, 2012).

Анализоване вредности представљају просечну вредност латенци добијених на левом и десном *n. medianus*-у. Снимања ССЕРП обављена су апаратом Medelec Synergy, Viasys Healthcare, UK у неурофизиолошкој лабораторији Клинике за неурологију Клиничког центра Србије.

3.7. Радиоимунолошка анализа

3.7.1. Принцип РИА

Радиоимунолошка анализа (radioimmunoassay – RIA) је метод за одређивање концентрације хормона и ензима коју карактерише висока специфичност грађења комплекса антиген-антитело и висока осетљивост у детекцији зрачења које емитује радонуклид којим је обележен антиген (Berson & Yalow, 1968).

Поступак се изводи у неколико актова. Прво се у кивети за центрифуговање помешају серум и антиген обележен радионуклидом па се добро измеша на вортекс уређају. При томе настаје комплекс антиген-обележено антитело.

У следећем акту, у ту кивету додаје се серум у којем треба да се одреди концентрација хормона па се све инкубира на собној температури приближно сат времена. У току инкубације, због конкуренције, долази до истискивања дела обележеног антигена из комплекса, односно његове замене антигеном из серума испитаника. Број молекула обележеног антигена који ће бити истиснут из комплекса тим је већи што је већа концентрација необележеног антигена у испитиваном серуму.

После инкубације, у кивету се додаје нови серум који садржи антитело на прво антитело (заправо у том случају прво антитело представља антиген за друго антитело), после чега долази до таложења формираног комплекса. Кивета се затим центрифугује, супернатант се одлије, а активност талога се мери помоћу сцинтилационог бројача.

3.7.2. Мерење хормонских параметара

Концентрације хормона у серуму мерене су код 20 пацијената са ГБ1 (10 жена, 10 мушкараца, узраста од 19 до 61 године) и код контролне групе здравих испитаника упарених по полу и годинама живота.

Мерење је вршено у РИА лабораторији Клинике за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма Клиничког центра Србије.

За директно квантитативно одређивање концентрација хормона у серуму коришћени су одговарајући комерцијални комплети за радиоимунолошку анализу:

- естрадиол (ESTR-US-CT, Cisbio Bioassays, Codolet, France)
- тестостерон (TESTO-CT2, Cisbio Bioassays, Codolet, France)

У завршном акту, концентрације хормона измерене су гама сцинтилационим бројачем (CliniGamma 1272, LKB-Wallac, USA).

3.7.3. Статистичка обрада налаза полних хормона

Да ли је нормална дистрибуција података, испитано је тестом Shapiro-Wilk.

За процену разлика између контролне и ГБ1 групе употребљена је двосмерна ANOVA.

Пирсонов (Pearson) коефицијент корелације (r) коришћен је за процену линеарног односа између варијабли.

Подаци су представљени као средња вредност \pm стандардна грешка.

Као статистичка значајност сматрано је $p < 0.05$.

За статистичку анализу коришћен је софтвер SPSS 19 (IBM).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1 Активност β -гликоцереброзидазе

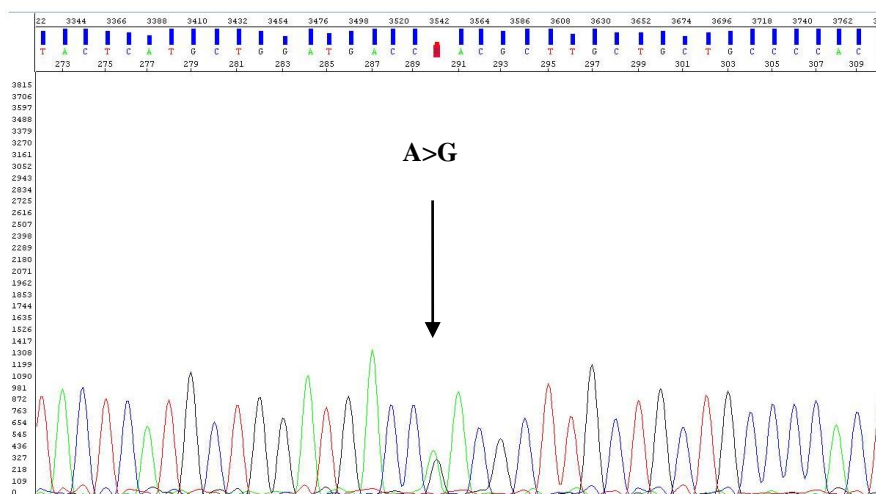
Код испитаника оболелих од ГБ1 измерена резидуална вредност активности β Г кретала се у распону од 0,5 до 3,14 nmol/mg/h (Табела 1).

4.2 Дистрибуција промена у секвенци *GBA1*

У анализованим кодирајућим регионима гена *GBA1* пронађене су следеће промене појединачног нуклеотида: с.256С>G, с.475С>T, с.754Т>A, с.968A>G (слика 3), с.1226A>G, с.1246G>A, с.1342G>C, с.1448Т>C, с.1505G>A. Такође су детектоване две делеције: с.1236_1317del82bp и с.1265_1319del55bp. Поред тога, откривена су и два вишеструко мутирана алела: [с.882Т>G; с.1342 G>C] и [с.1448Т>C; с.1483G>C; с.1497G>C]. Позиције детектованих промена и њихов број наведен је у табели 2.

Укупно је нађено 12 различитих сложених хетерозиготних мутација, при чему су сви пацијенти са ГБ1 на једном алелу имали супституцију с.1226A>G. Пронађена је и једна хомозиготна мутација са променом с.1226A>G на оба алела.

Сви контролни испитаници имали су изворни тип гена *GBA1* (wild type) на оба алела.



Слика 3. Електроферограм приказује промену с.968A>G у егзону 7 гена *GBA1*.

Табела 2. Сложене хетерозиготне и хомозиготне мутације детектоване у кодирајућим регионима гена *GBA1*.

Промена у с.DNK	Алел1		Алел2			N
	Егзон	Аминокис промена	Промена у с.DNK	Егзон	Аминокис промена	
c.256C>G	3	p.Arg86X	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
c.475C>T	5	p.Arg159Trp	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
c.754T>A	6	p.Phe252Cys	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	2
c.968A>G	7	p.Gln323Arg	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
[c.882T>G; c.1342G>C]	7	p.His294Gln;	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
	9	p.Asp448His				
c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	3
c.1236_1317del182bp	9		c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
c.1246G>A	9	p.Gly416Ser	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
c.1265_1319del55bp	9	p.Leu422ProfsX4	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	1
c.1342G>C	9	p.Asp448His	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	6
[c.1448T>C; c.1483G>C; c.1497G>C]	10	p.Leu483Pro	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	4
	10	p.Ala495Pro				
	10	p.Val499=				
c.1448T>C	10	p.Leu483Pro	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	3
c.1505G>A	10	p.Arg502His	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	3

N – број болесника

Болдовано – вишеструко мутирани алел

4.3. Резултати ^{18}F -ФДГ-ПЕТ

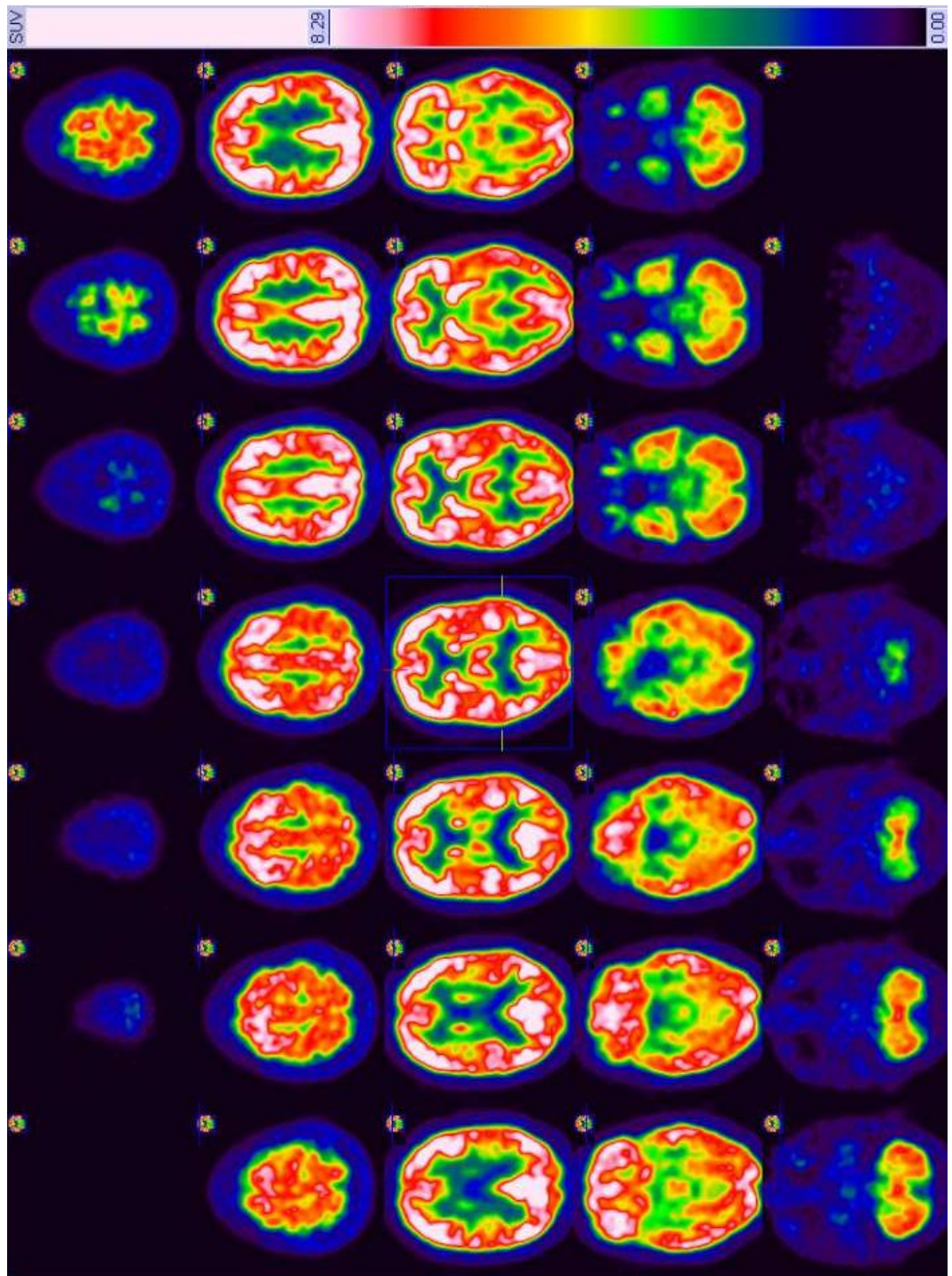
Код свих пацијената са ГБ1, визуелном и квантитативним анализом појединачних налаза регистрован је снижен метаболизам гликозе у регионима коре мозга, базалним ганглијама, можданом стаблу и церебелуму (пример слике 4-6, табела 3).

Групна СПМ анализа ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза показала је да нема утицаја пола на резултате а да године живота могу имати утицаја на хипометаболизам у нивоу мезиотемпоралних региона (мали кластер) (слика 7).

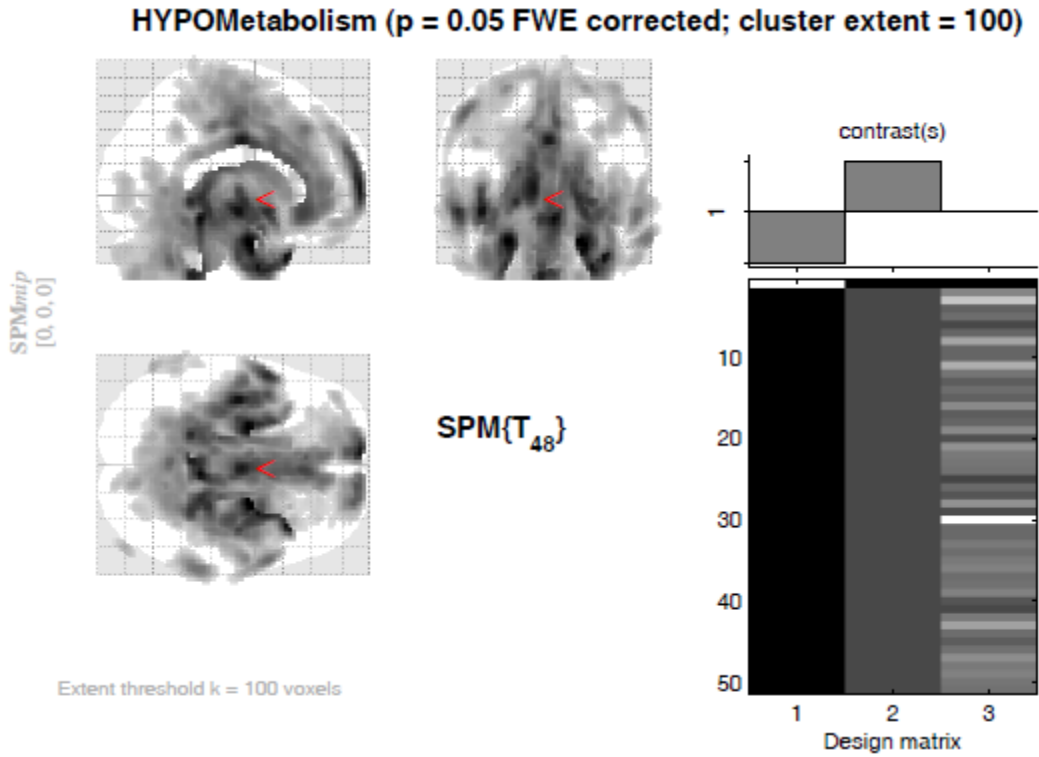
Групном СПМ анализом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза код пацијената са ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација добијен је образац регионалног метаболизма гликозе који карактерише хипометаболизам у:

- кори мозга обострано:
 - фронтално (највише медијално, предњи цингулум, инсуларно)
 - фронтно-паријетално (перичентрално – сензомоторни кортекс)
 - темпорално (мезијално и латерално)
- стријатуму
- таламусу
- можданом стаблу (најизраженије у средњем мозгу)
- церебелуму (изреженији у вермису него у хемисферама)

Карактеристичан образац регионалног хипометаболизма гликозе код ГБ1 добијен је групном СПМ анализом (СПМ t-мапе) за $p < 0,001$ без корекције за вишеструка поређења (слике 8 и 9) и за $p < 0,05$ са FWE корекцијом за вишеструка поређења (Family Wise Error – FWE) (слика 10), (табела 4).



Слика 4. ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаз регионалног метаболизма гликозе код пацијента са ГБ1 (27 год): Зоне сниженог метаболизма гликозе фронтотпаријетално перицентрално, темпорално обострано, у нивоу таламуса, можданог стабла, и церебеларно обострано.

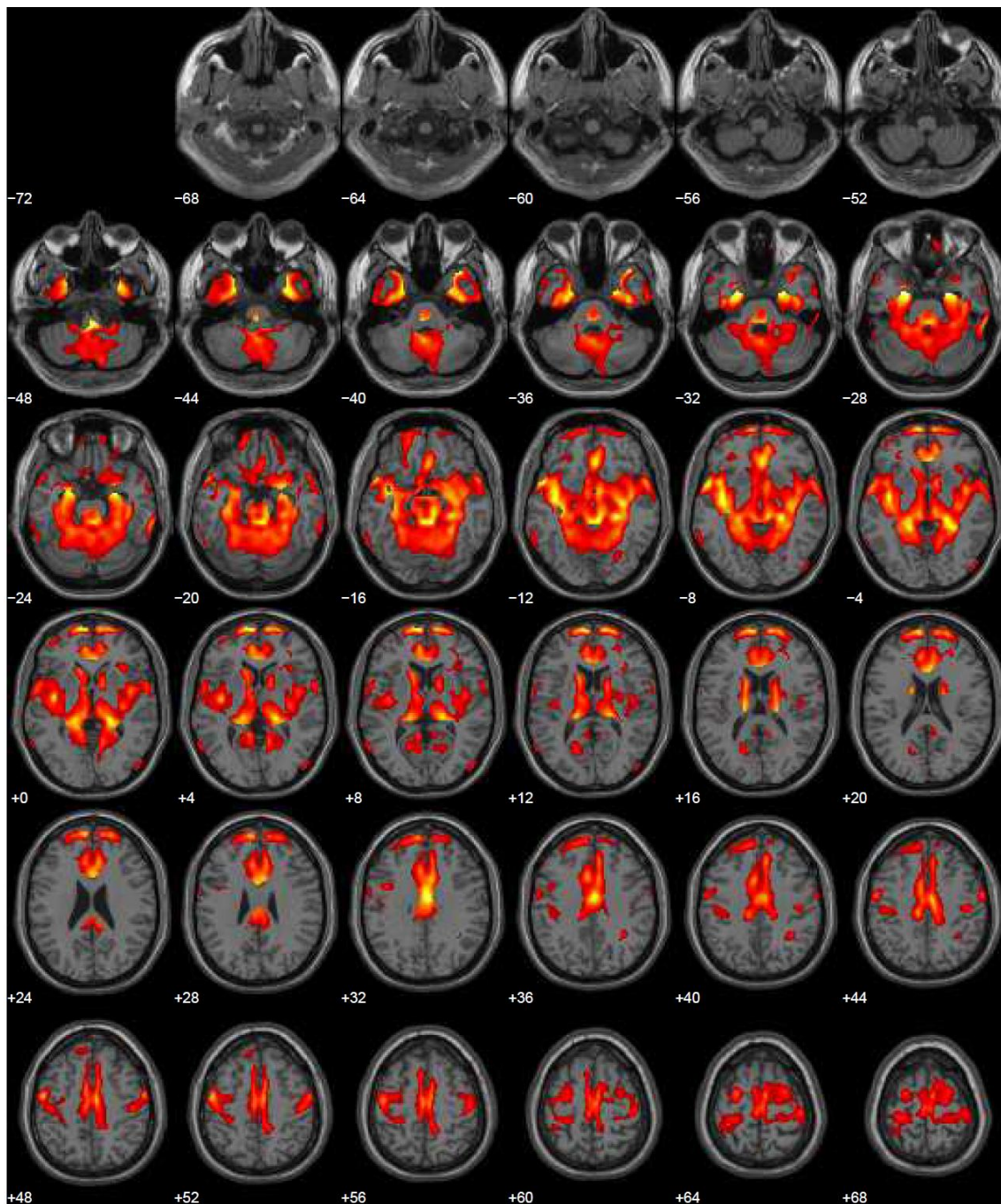


Слика 5. Квантитативна СПМ анализа ^{18}F -ФДГ-ПЕТ појединачног налаза код истог пацијента са ГБ1 (27 год): мапа хипометаболизма у 3 димензије са колор скалом.

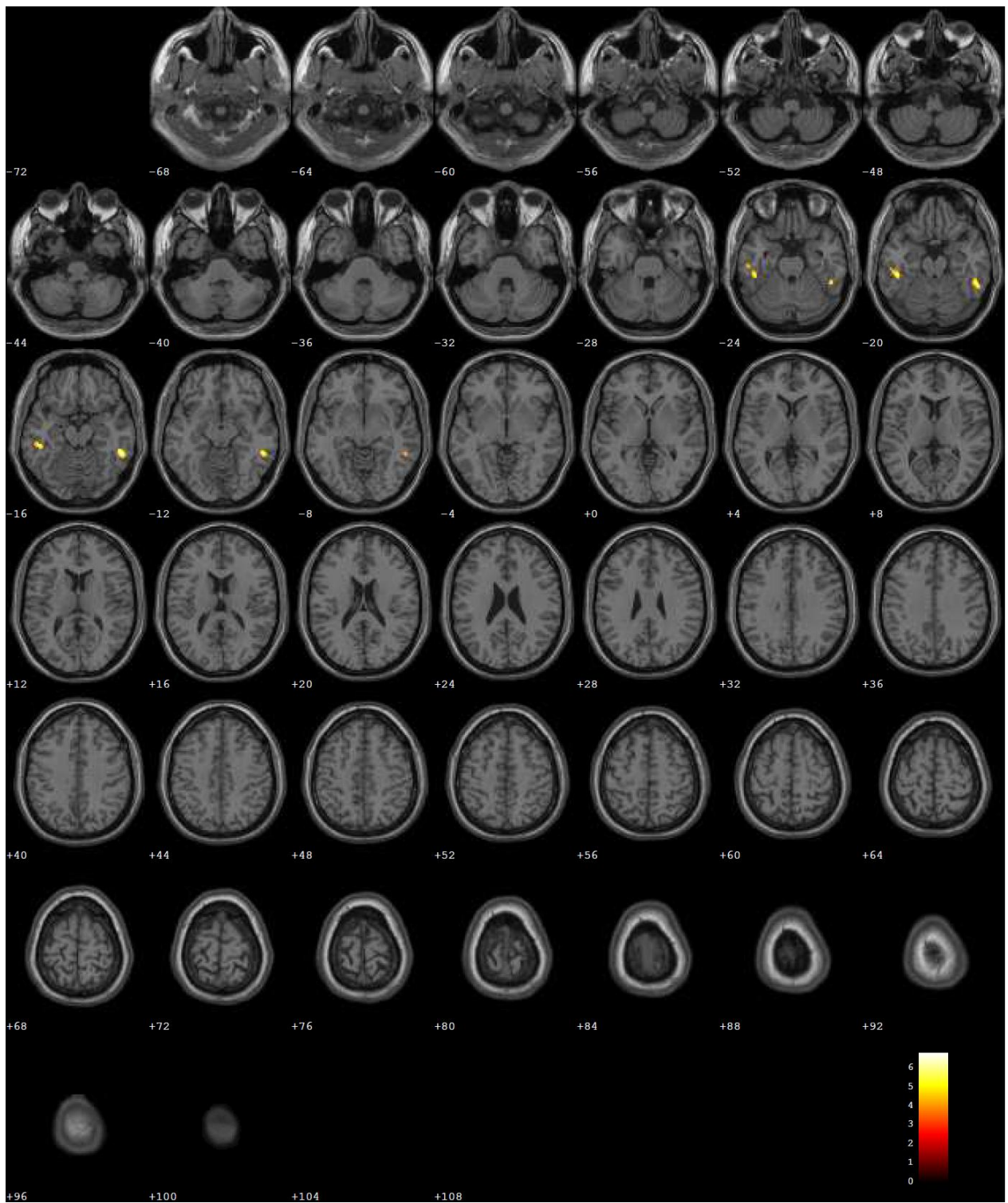
Табела 3. Квантитативна СПМ анализа ^{18}F -ФДГ-ПЕТ појединачног налаза код истог пацијента са ГБ1 (27 год): p вредности по волуменима.

Statistics: p -values adjusted for search volume

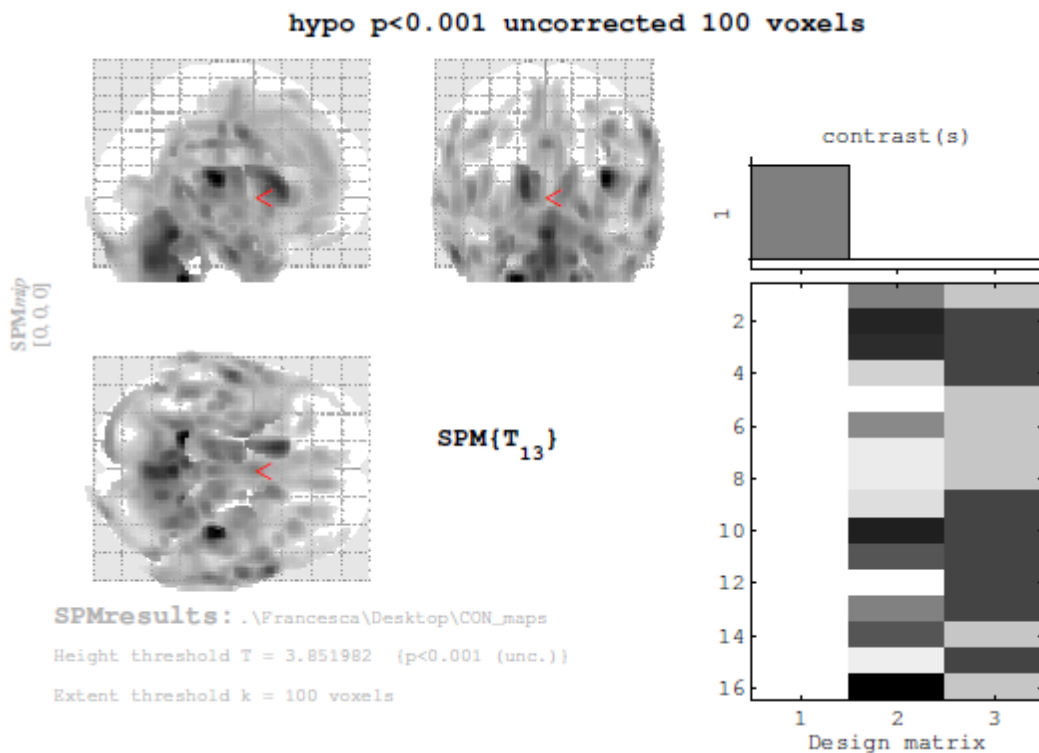
set-level		cluster-level			voxel-level					mm mm mm							
p	c	$p_{\text{corrected}}$	k_E	$p_{\text{uncorrected}}$	$p_{\text{FWE-corr}}$	$p_{\text{FDR-corr}}$	T	(Z_{c})	$p_{\text{uncorrected}}$								
0.000	5	NaN	52321	0.000	0.000	0.000	24.51	Inf	0.000	24	-4	-28					
										0.000	0.000	24.02	Inf	0.000	-22	-4	-28
										0.000	0.000	23.32	Inf	0.000	6	-34	-14
		0.000	291	0.000	0.000	0.000	14.49	Inf	0.000	64	-38	-26					
		0.000	391	0.000	0.000	0.000	9.76	7.21	0.000	-60	-62	8					
		0.000			0.000	0.000	8.97	6.84	0.000	-62	-50	-12					
		0.000			0.000	0.000	8.74	6.73	0.000	-58	-50	-24					
		0.000	113	0.000	0.000	0.000	9.76	7.21	0.000	36	-48	40					
		0.000	176	0.000	0.000	0.000	9.22	6.96	0.000	50	-82	8					
		0.000			0.000	0.000	8.99	6.85	0.000	52	-82	0					



Слика 6. СПМ t-мапа региона са хипометаболизмом гликозе корегистрована са МР атласом аксијалних пресека код истог пацијента са ГБ1 (27 год): Зоне сниженог метаболизма гликозе фронтопаријетално перицентрално, темпорално обострано, у нивоу таламуса, možданог стабла, и церебеларно обострано.



Слика 7. Утицај година живота на резултате код ГБ1 добијен групном СПМ анализом (СПМ t-мапе) $p < 0,001$ без корекције за вишеструка поређења, корегистровани са Т1 МР аксијалним пресецима.

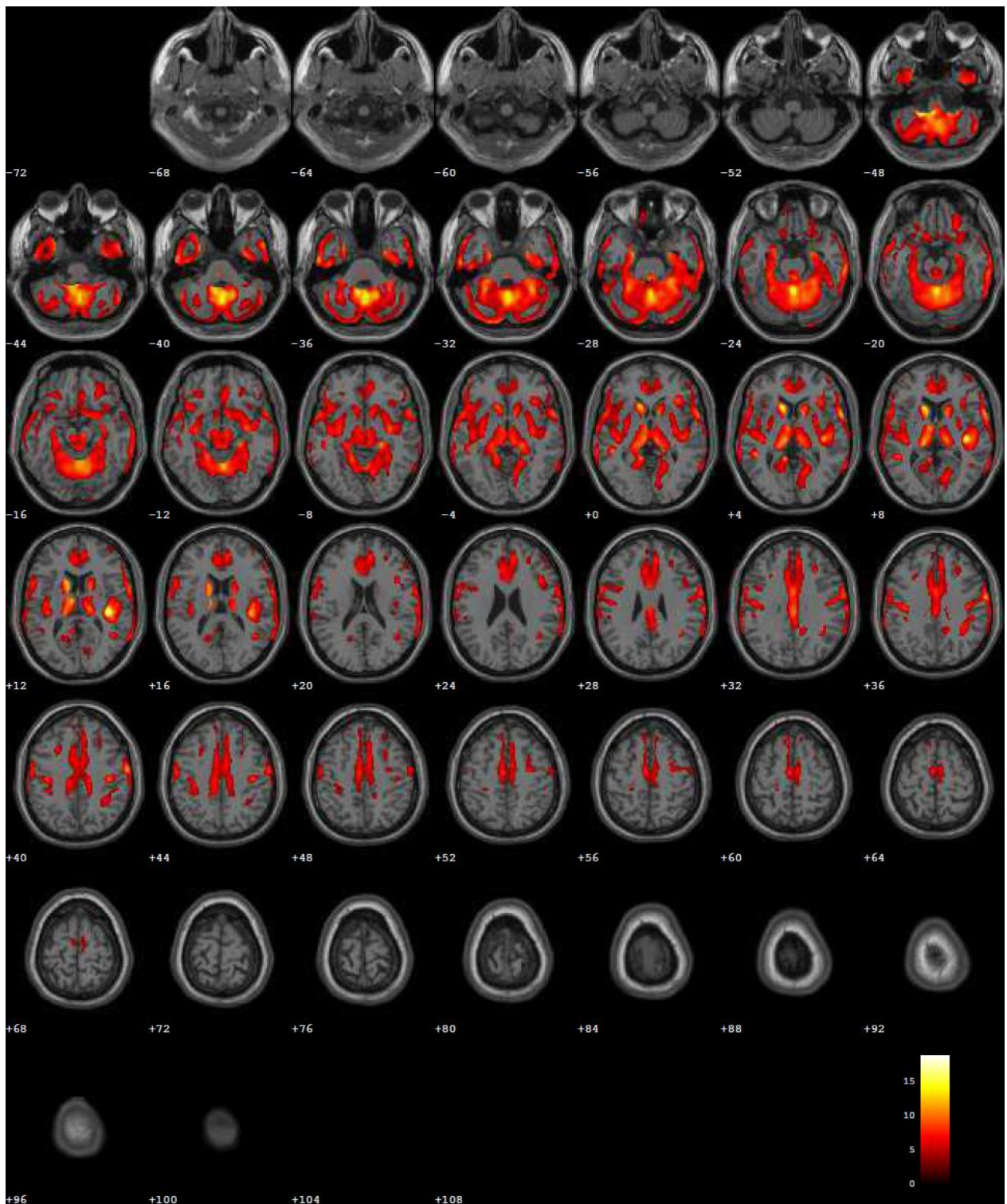


Слика 8. Квантитативна групна СПМ анализа ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза код 16 пацијената са ГБ1: мапа хипометаболизма у 3 димензије са колор скалом.

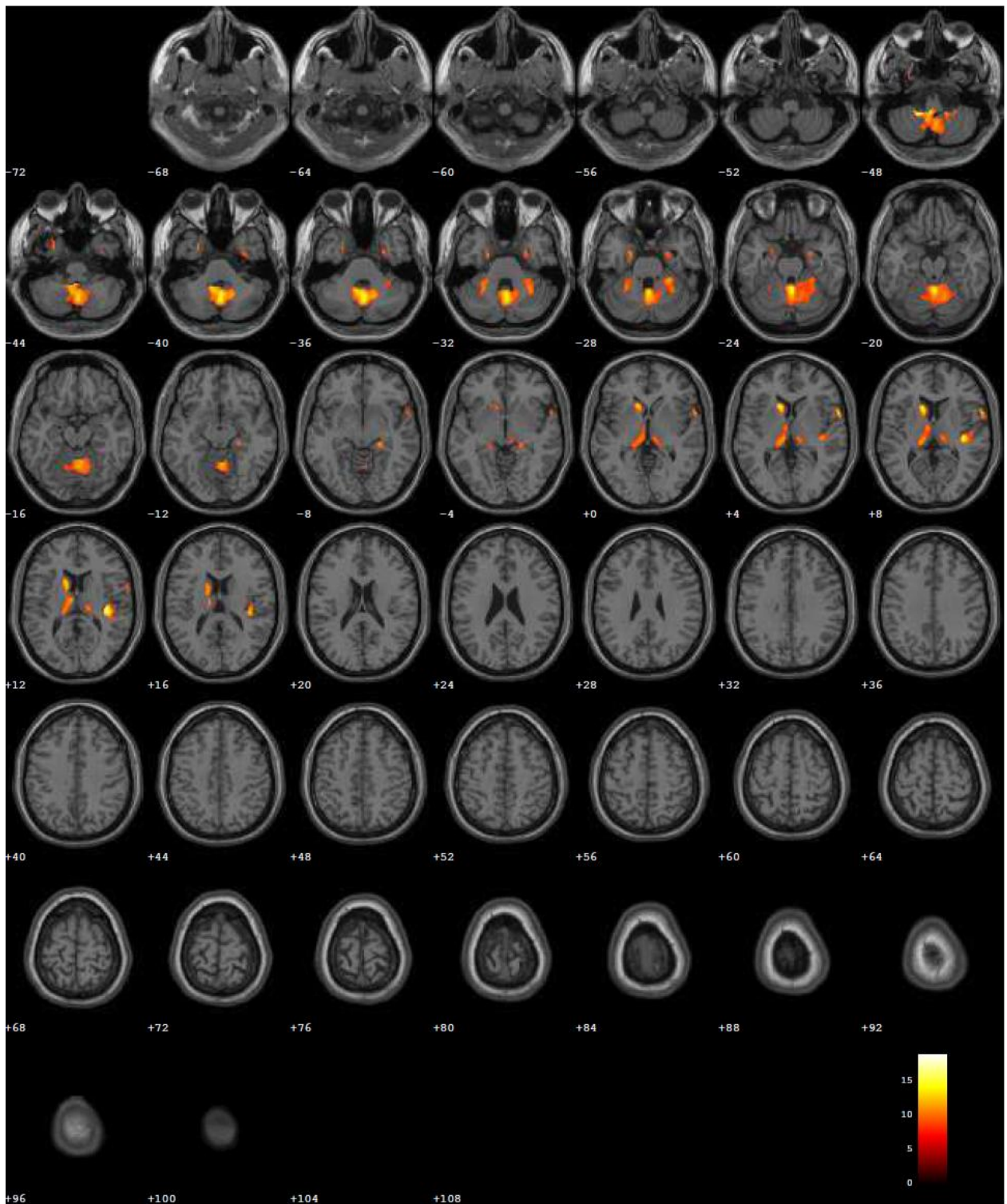
Табела 4. Квантитативна групна СПМ анализа ^{18}F -ФДГ-ПЕТ налаза код 16 пацијената са ГБ1: p вредности по волуменима.

Statistics: p -values adjusted for search volume

set-level		cluster-level			voxel-level					mm mm mm		
p	c	$p_{\text{corrected}}$	k_E	$p_{\text{uncorrected}}$	$p_{\text{FWE-corr}}$	$p_{\text{FDR-corr}}$	T	(Z_*)	$p_{\text{uncorrected}}$			
0.000	5	0.000	46410	0.000	0.000	0.000	18.80	6.50	0.000	-18	-44	-50
					0.000	0.000	18.72	6.49	0.000	38	-22	10
					0.000	0.000	15.98	6.18	0.000	2	-52	-24
		0.004	439	0.000	0.020	0.000	9.27	5.05	0.000	40	-50	28
					0.073	0.000	7.91	4.71	0.000	44	-54	14
					0.096	0.000	7.63	4.63	0.000	36	-46	34
		0.141	168	0.018	0.106	0.000	7.53	4.60	0.000	42	16	22
		0.306	116	0.043	0.294	0.000	6.50	4.26	0.000	-24	16	38
		0.070	216	0.009	0.629	0.000	5.60	3.93	0.000	30	28	34
					0.949	0.001	4.70	3.53	0.000	28	40	22
					0.984	0.002	4.43	3.40	0.000	26	34	48



Слика 9. Карактеристичан образац регионалног хипометаболизма гликозе код ГБ1 добијен групном СПМ анализом (СПМ t-мапе) $p < 0,001$ без корекције за вишеструка поређења, корегистровани са T1 МР аксијалним пресецима.



Слика 10. Карактеристичан образац регионалног хипометаболизма гликозе код ГБ1 добијен групном СПМ анализом (СПМ t-мапе) $p < 0,05$ са FWE корекцијом за вишеструка поређења, корегистровани са T1 МР аксијалним пресецима.

4.4. Резултати фМР имицинга

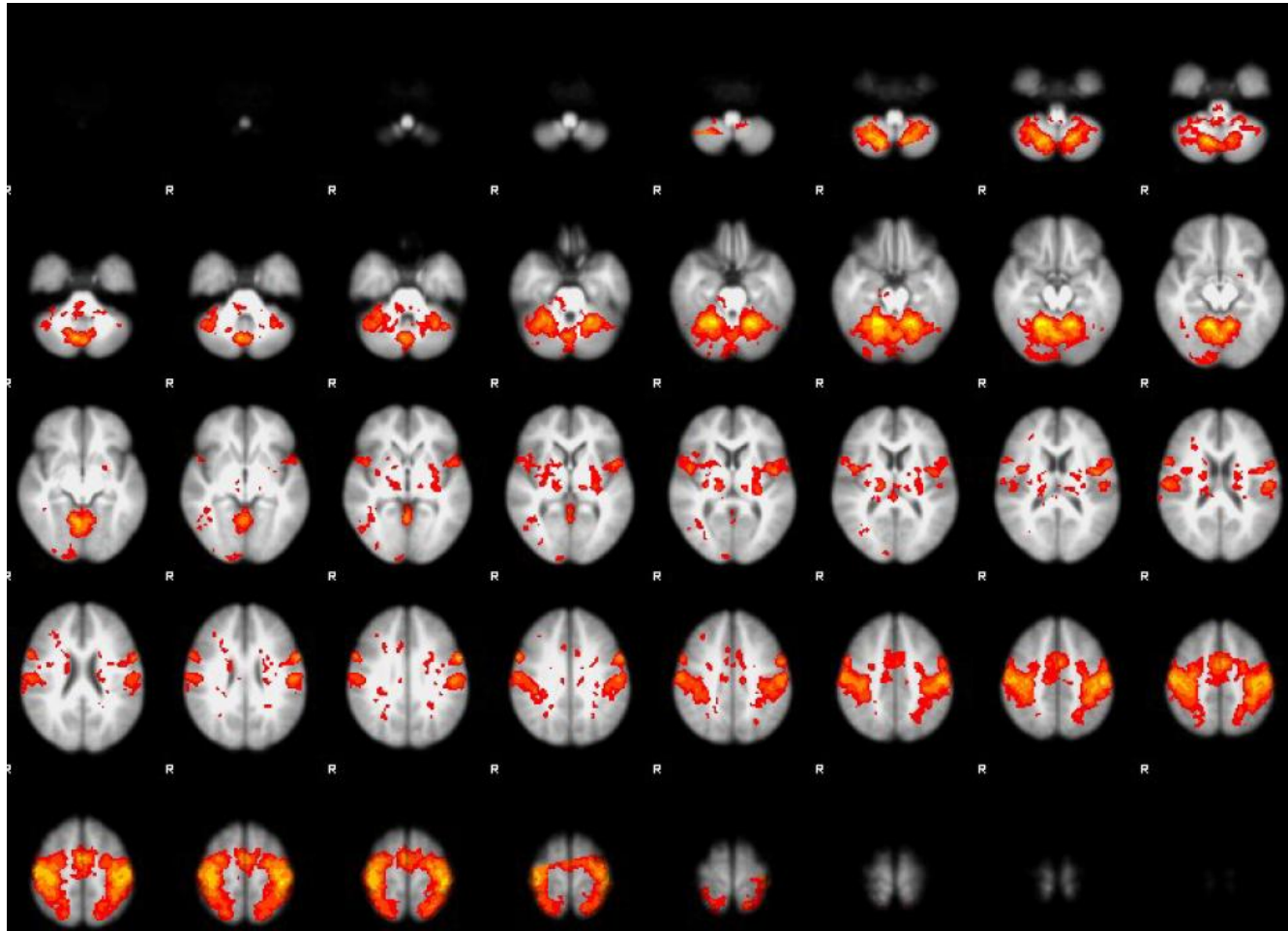
Снимање мозга при извођењу моторног задатка рађено је код 26 пацијената са ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација и код истог броја здравих испитаника мечованих по полу, годинама живота и доминантној руци.

Код здравих испитаника, групном анализом помоћу генералног линеарног модела примењеног на фМР снимке утврђено је да су обострано активирани региони: сензомоторни кортекс, суплементарна моторна ареа, таламус, стријатум и церебелум (слика 11).

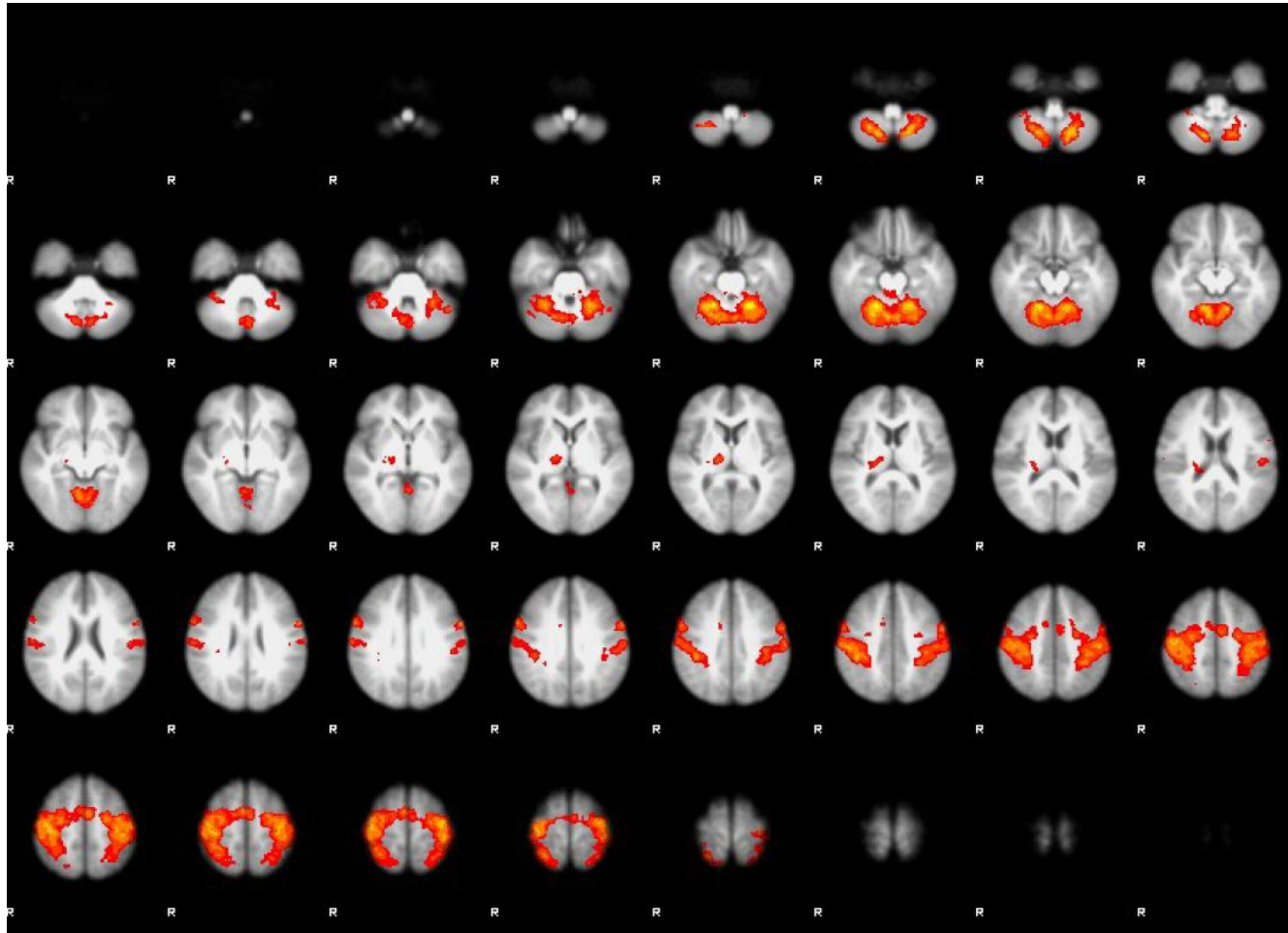
Код пацијената са ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација, групном анализом помоћу генералног линеарног модела примењеног на фМР снимке утврђено је да су активирани региони: сензомоторни кортекс и суплементарна моторна ареа обострано, таламус само десно, церебелум, док стријатум није активиран (слика 12).

Разлика усредњених налаза фМР мозга контролне групе здравих испитаника и пацијената са типом 1 ГБ приказана је на слици 13. Статистички значајно нижа активација код оболелих од ГБ1 у односу на здраве испитанике ($p < 0,05$) утврђена је у шест региона (кластера) (табела 5):

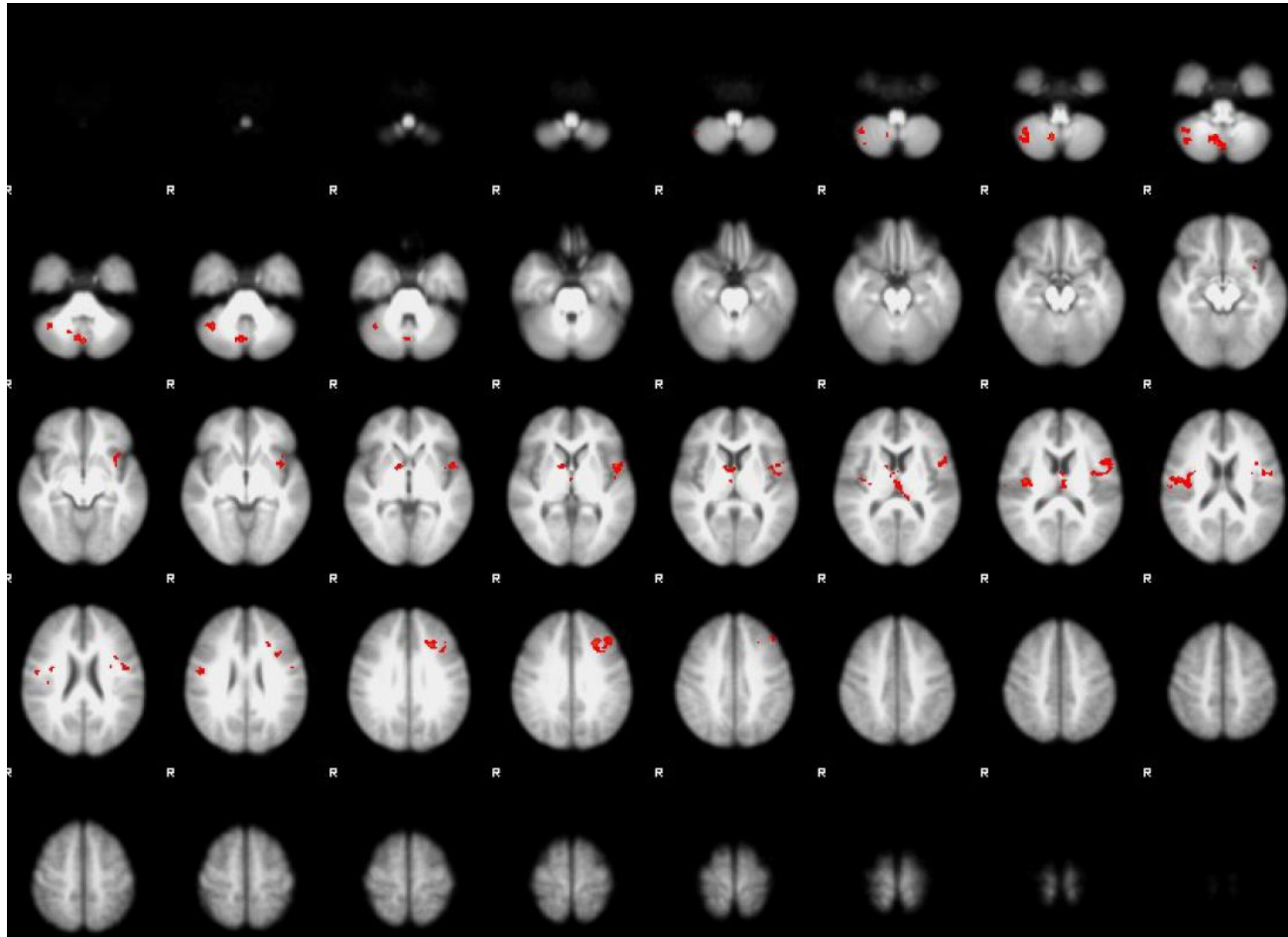
- кластер 1: десни палидум
- кластер 2: 66% секундарног соматосензорног кортекса
- кластер 3: десна хемисфера церебелума
- кластер 4: десни део вермиса
- кластер 5: 20% средње фронталне вијуге
10% горње фронталне вијуге
- кластер 6: 40% Брокиног поља 44
38% оперкуларног кортекса
10% прецентралне вијуге.



Слика 11. Резултати групне анализе помоћу генералног линеарног модела примењеног на фМР снимке здравих субјеката.



Слика 12. Резултати групне анализе помоћу генералног линеарног модела примењеног на фМР снимке пацијената са ГБ1.



Слика 13. Мапа статистички значајних разлика између здравих субјеката и пацијената са ГБ1.

Табела 5. Сумарни резултати фМР анализе разлика између здравих субјеката и пацијената са ГБ1.

Кластер	N	p	$-\log_{10}(p)$	Z-MAX	Z-MAX X	Z-MAX Y	Z-MAX Z	Z-COG X	Z-COG Y	Z-COG Z	COPE-MAX	COPE-MAX X	COPE-MAX Y	COPE-MAX Z	COPE MEAN
1	179	0,0484	1,32	3,5	14	4	0	3,41	-5,97	9,37	142	4	2	8	66,8
2	227	0,0129	1,89	4,23	48	-10	20	44	-10,2	19,9	53	40	-14	18	32,8
3	228	0,0125	1,9	4,13	42	-64	-46	40,1	-57,1	-43,8	60,7	38	-54	-36	43
4	231	0,0126	1,94	4,28	0	-70	-42	6,8	-66,3	-41,6	98	0	-72	-44	58,6
5	246	0,0078	2,11	4,41	-24	24	34	-31,8	23,2	33,7	47,6	-42	32	40	27,1
6	400	0,0002	3,72	4,5	-48	6	4	-46,3	5,63	8,2	75,6	-56	10	4	38,6

N – број воксела у кластеру

MAX – вредност максималног интензитета активације унутар кластера

MAX X/Y/Z – позиција воксела максималног интензитета активације дата по стандардним просторним координатама у mm (Z-MAX када је улазни податак Z скор)

COG X/Y/Z – положај центра гравитације кластера (Centre of Gravity) (то је пондерисани просек координата по интензитетима унутар кластера, еквивалентан је концепту центра гравитације за објект са дистрибуираном масом где интензитет замењује масу) у овом случају дат је по стандардним просторним координатама у mm (Z-COG када је улазни податак Z скор)

COPE – мапа активације за дату парадигму: максимална COPE вредност, локација ове максималне вредности, средња COPE вредност преко кластера дефинисаних из улазног Z скор

4.5. Резултати морфометрије и волуметрије

Морфометрија кортекса и одређивање волумена субкортикалних сивих маса ЦНС-а обављено је код 28 пацијената са типом 1 ГБ и код 28 здравих испитаника упарених по полу, годинама живота и доминантној руци.

Статистички значајно смањење дебљине коре мозга код пацијената са ГБ1 приказано је на сликама 14 и 15, а кластери статистички значајних разлика без корекције и са корекцијама Monte Carlo Null Z и FDR наведени у табелама 6, 7, 8, 9 и 10.

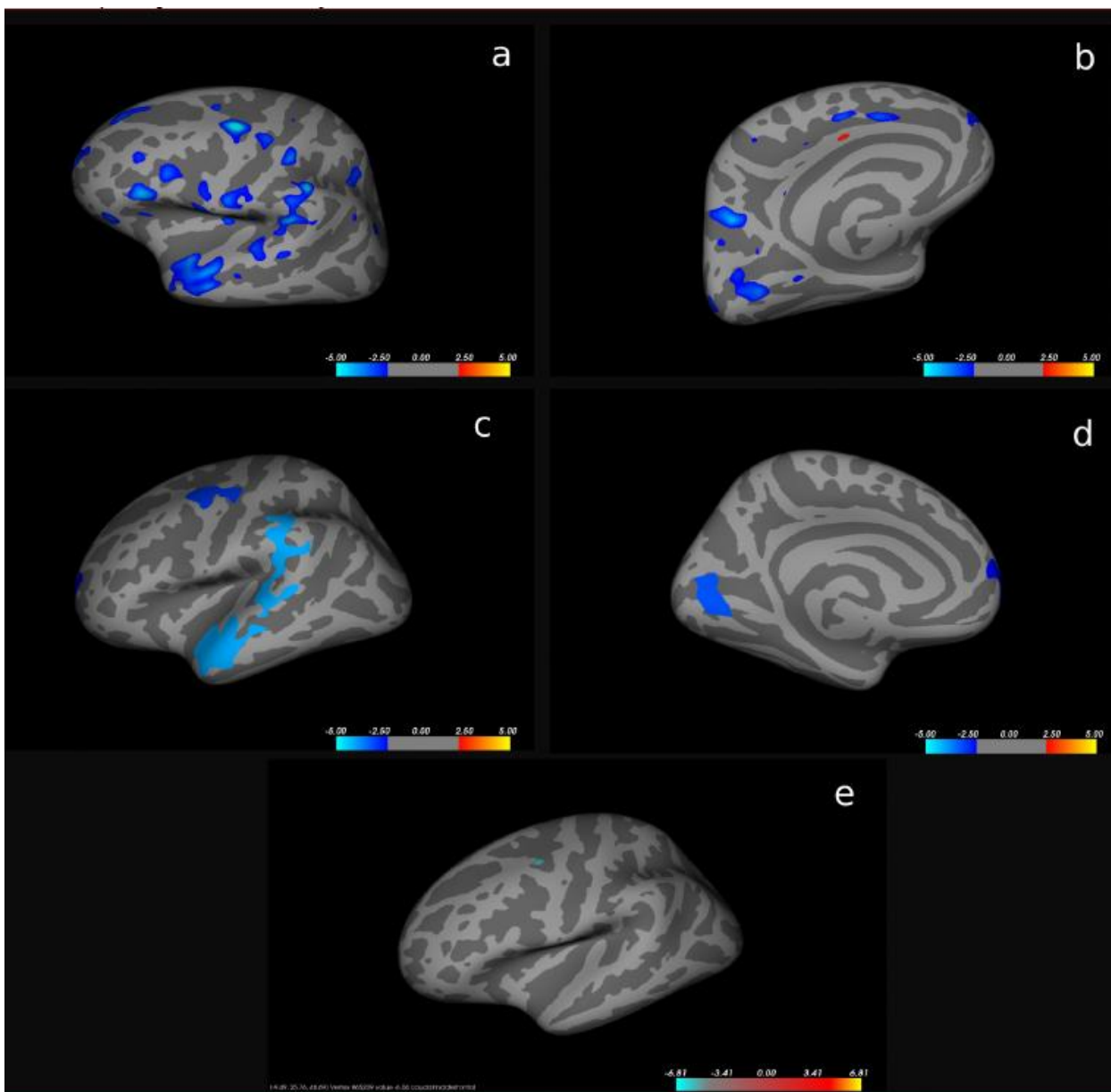
На левој хемисфери мозга, сигнификантно мања дебљина кортекса код оболелих од ГБ1 у односу на здраве испитанике после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$ утврђена је у пет кластера:

- кластер 1: горња слепоочна вијуга
- кластер 2: супрамаргинална вијуга
- кластер 3: перикалкарини кортекс
- кластер 4: прецентрална вијуга
- кластер 5: рострални крај средње фронталне вијуге.

На десној хемисфери мозга, статистички значајно мања дебљина кортекса код оболелих од ГБ1 у односу на здраве испитанике после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$ утврђена је у једном кластеру:

- кластер 1: латерални окципитални кортекс.

Сигнификантна мања запремина субкортикалних сивих маса код пацијената са ГБ1 у односу на здраву контролну групу утврђена је само у путамену, лево $p < 0,03$ а десно $p < 0,01$ (слика 16).



Слика 14. Резултати морфометријске вертекс-анализе леве хемисфере мозга урађене помоћу софверског пакета Freesurfer. Мапе статистички значајних разлика између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката. Статистички значајно смањење дебљине кортекса, узимајући у обзир године живота и пол, приказано је на колор скали плаво-светло плаво, док је повећање приказано на скали црвено-жуто. Колор скала представља логаритамску вредност p . Сlike а и б приказују некориговане разлике на мултипла поређења, док сlike с и д приказују разлике добијене после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$. Слика е приказује резултате после корекције FDR (false discovery rate) са значајношћу $p < 0,05$.

Табела 6. Кластери статистички значајних разлика у дебљини кортекса леве хемисфере између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката без корекције.

Кластер	Мах	VtxМах	Површина*	TalX	TalY	TalZ	Анатомски регион
1	-6,043	65209	329,28	-34,3	-2,2	44,2	g. frontalis medius (p. caudalis)
2	-4,7005	123281	709,79	-51,2	-37,6	41,8	g. supramarginalis
3	-4,2418	12597	382,6	-51,8	28,9	7,3	g. frontalis inferior (p. triangularis)
4	-4,1384	130391	307,52	-8,9	-66,9	30,7	precuneus
5	-3,855	161035	1211,43	-51,6	-7	-14,3	g. temporalis superior
6	-3,5522	80827	170,87	-49,1	-24,9	52,9	g. postcentralis
7	-3,4668	53715	165,41	-55	2,3	4,3	g. precentralis
8	-3,4357	11791	394,64	-16,2	61,6	1,7	g. frontalis superior
9	-3,3349	66895	254,63	-55,4	-7,1	17,8	g. postcentralis
10	-3,3178	56042	554,98	-6,8	-76,2	-1,2	g. lingualis
11	-3,1396	13751	145,49	-37,3	20,2	21,6	g. frontalis medius (p. rostralis)
12	-3,1361	134110	74,27	-12,1	15	33,6	c. cingularis anterior (p. caudalis)
13	-3,1075	83623	61,48	-11	2,8	43,4	g. frontalis superior
14	-3,0347	110140	132,16	-41,1	34,9	-13,2	g. frontalis inferior (p. orbitalis)
15	-2,9968	100832	79,37	-34,3	-19,6	13,3	insula
16	-2,9885	102478	195,7	-17,3	48	34,5	g. frontalis superior
17	-2,9822	112546	133,45	-8,6	-101,3	3,3	c. occipitalis lateralis
18	-2,9654	7221	150,63	-34,8	-15,1	49,9	g. precentralis
19	-2,9518	112046	164,2	-30,4	-56,8	36,9	l. parietalis superior
20	-2,9211	24070	199,68	-57,2	-25,2	2,3	g. temporalis superior

Мах = максимални логаритам p вредности у кластеру, VtxМах = број вертекса у максимуму, TalX, TalY, TalZ – Талерове (Talairach) координате за осовине x , y и z , c – cortex (кора мозга), g – gyrus (вијуга), l – lobulus (режњић), p – pars (део), * mm^2

Табела 7. Кластери статистички значајних разлика у дебљини кортекса леве хемисфере између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$.

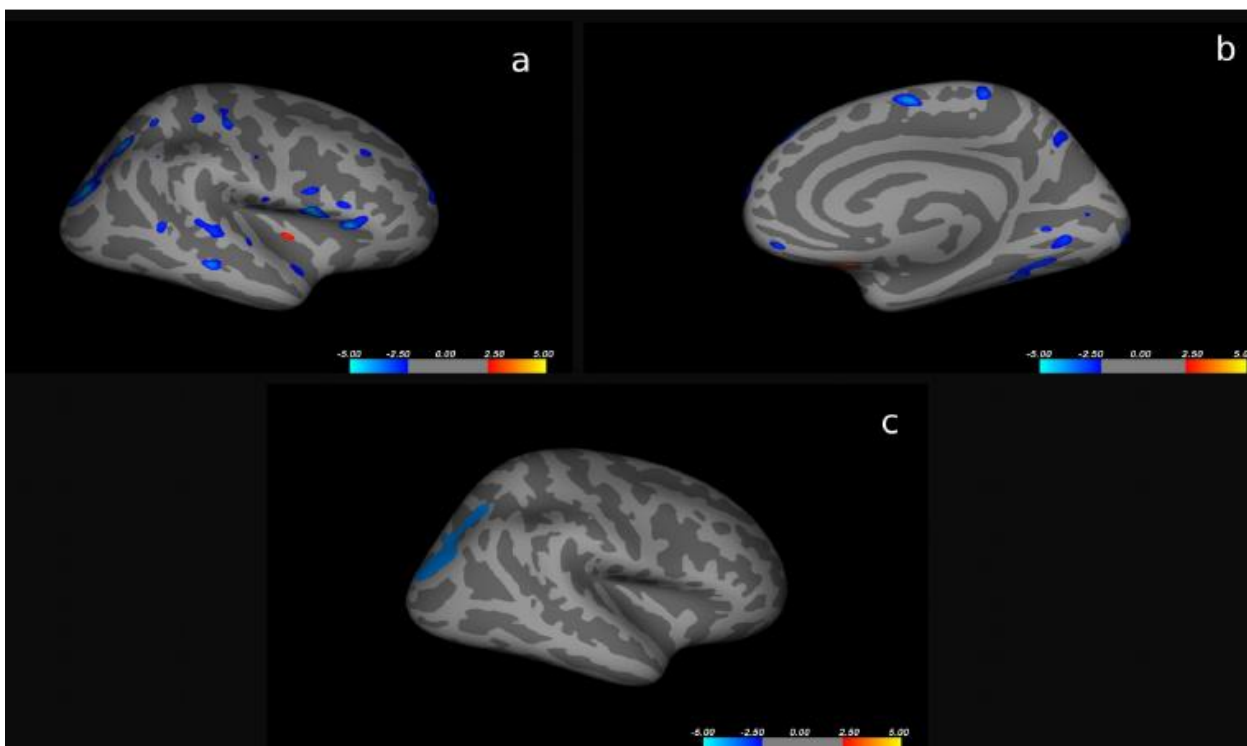
Кластер	Мах	VtxМах	Површина*	TalX	TalY	TalZ	Анат. регион
1	-4	28	1643,16	-48	-11,6	-9,6	g. temporalis superior
2	-4	98	1500,77	-57	-34,2	40,4	g. supramarginalis
3	-3	138	742,1	-15,1	-78,4	10,8	c. pericalcarinus
4	-2,7447	42	42	-40,8	-11,8	48,1	g. precentralis
5	-2,0706	176	176	-23,4	53,7	11,1	g. frontalis medius (p. rostralis)

Мах = максимални логаритам p вредности у кластеру, VtxМах = број вертекса у максимуму, TalX, TalY, TalZ – Талерове (Talairach) координате за осовине x, y и z, c – cortex (кора мозга), g – gyrus (вијуга), p – pars (део), * mm^2

Табела 8. Кластери статистички значајних разлика у дебљини кортекса леве хемисфере између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката после корекције FDR са значајношћу $p < 0,05$.

Кластер	Мах	VtxМах	Површина*	TalX	TalY	TalZ	Анат. регион
1	-6,043	65209	46,52	-34,3	-2,2	44,2	g. frontalis medius (p. caudalis)
2	-4,7005	123281	5,15	-51,2	-37,6	41,8	g. supramarginalis

Мах = максимални логаритам p вредности у кластеру, VtxМах = број вертекса у максимуму, TalX, TalY, TalZ – Талерове (Talairach) координате за осовине x, y и z, g – gyrus (вијуга), p – pars (део), * mm^2



Слика 15. Резултати морфометријске вертекс-анализе десне хемисфере мозга урађене помоћу софверског пакета Freesurfer. Мапе статистички значајних разлика између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката. Статистички значајно смањење дебљине кортекса, узимајући у обзир године живота и пол, приказано је на колор скали плаво-светло плаво, док је повећање приказано на скали црвено-жуто. Колор скала представља логаритамску вредност p . Сlike а и б приказују некориговане разлике на вишеструка поређења, док слика с приказује разлике добијене после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$.

Табела 9. Кластери статистички значајних разлика у дебљини кортекса десне хемисфере између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката без корекције.

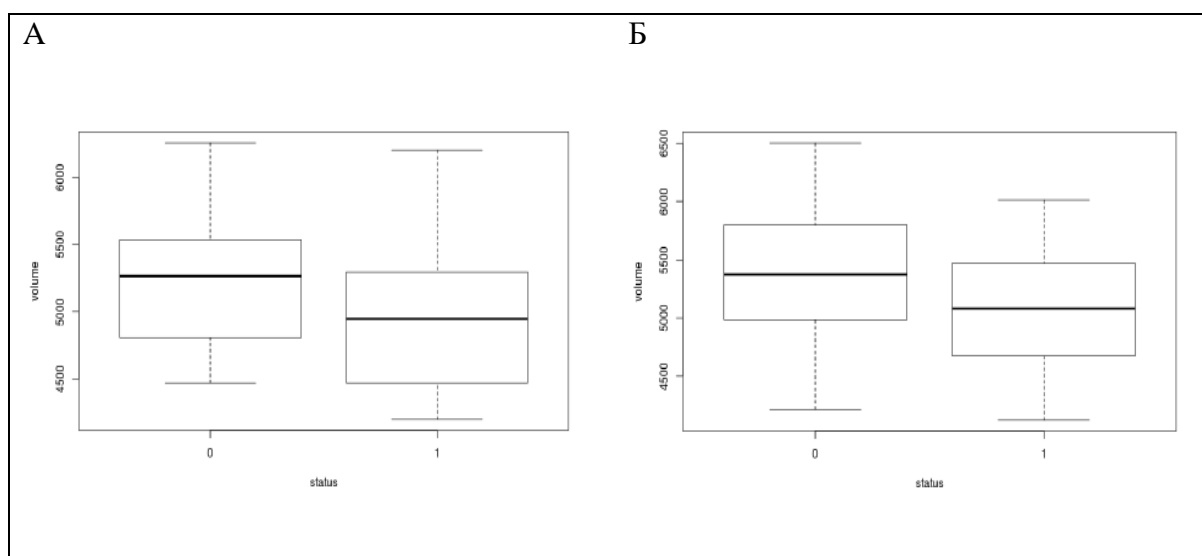
Кластер	Мах	VtxМах	Површина*	TalX	TalY	TalZ	Анат. регион
1	-4,7572	149661	239,1	11,2	39,4	47,8	g. frontalis superior
2	-4,4573	38955	716,96	31	-76,8	15,4	l. parietalis inferior
3	-4,4506	83371	286,15	51,6	10,1	1,8	g. frontalis inferior (p. opercularis)
4	-4,3585	64274	175,76	41	26,3	6,8	g. frontalis inferior (p. triangularis)
5	-3,961	30412	117,59	7,7	-5,5	58	g. frontalis superior
6	3,7403	2601	132,71	14,2	18,6	-13,3	c. orbitofrontalis (p. lateralis)
7	-3,5689	149221	95,28	60,3	-29,2	-11,1	g. temporalis medius
8	-3,3977	146133	415,78	18,2	59,1	13,2	g. frontalis medius (p. rostralis)
9	-3,3182	31950	203,43	30,7	-55,7	-15,5	g. fusiformis
10	-3,1572	129301	63,44	5,9	-38,4	58,8	l. paracentralis
11	-3,0293	151814	165,11	43	-23,1	53	g. postcentralis
12	-2,7817	117712	53,2	30,8	-52,5	55,1	l. parietalis superior
13	-2,7592	51289	37,13	6	50,2	-19,1	c. orbitofrontalis (p. medialis)
14	-2,7559	64190	53,31	45,2	4,8	19,2	g. frontalis inferior (p. opercularis)
15	-2,7529	137088	156,05	8,9	-70,6	-1,4	g. lingualis
16	-2,6938	52690	167,53	65,2	-27,1	1,4	g. temporalis superior
17	-2,6931	7120	61,93	55,4	-52,7	7,9	l. parietalis inferior
18	-2,6286	72675	65,83	34,5	-35,4	54,2	g. postcentralis
19	-2,5698	45148	39,5	16,4	-62,4	1,6	g. lingualis
20	2,5695	63700	39,99	37	-9,8	-0,6	insula
21	-2,5051	145656	58,64	53,3	22,7	18,4	g. frontalis inferior (p. opercularis)
22	-2,5023	137019	101,46	17,2	-97,2	-6,5	c. occipitalis lateralis

Мах = максимални логаритам p вредности у кластеру, VtxМах = број вертекса у максимуму, TalX, TalY, TalZ – Талерове (Talairach) координате за осовине x , y и z , c – cortex (кора мозга), g – gyrus (вијуга), l – lobulus (режњић), p – pars (део), * mm^2

Табела 10. Кластери статистички значајних разлика у дебљини кортекса десне хемисфере између пацијената са ГБ1 и контролних субјеката после корекције Monte Carlo Null Z са значајношћу $p < 0,001$.

Кластер	Мах	VtxМах	Површина*	TalX	TalY	TalZ	Анатомски регион
1	-3,699	136	956,47	27,5	-83,9	14	c. occipitalis lateralis

Мах = максимални логаритам p вредности у кластеру, VtxМах = број вертекса у максимуму, TalX, TalY, TalZ – Талерове (Talairach) координате за осовине x, y и z, c – cortex (кора мозга), * mm^2



Слика 16. Резултати одређивања запремине помоћу софтвера FSL-First за субкортикалне сиве масе после корекције на вишеструка поређења, А – леви путамен $p < 0,03$, Б – десни путамен $p < 0,01$

4.6. Латенце ССЕР и полни хормони

Соматосензорни потенцијали изазвани на *n. medianus*-у обострано и концентрације полних хормона естрадиола и тестостерона испитивани су код 20 пацијената са ГБ1 и исто толико здравих субјеката упарених по полу и годинама живота.

По годинама живота нема разлике ни у једној групи. По висини, значајне су разлике у свакој групи: жене су ниже од мушкараца у обе групе, жене са ГБ1 су ниже у односу на контролне здраве жене (табела 11).

У обе групе статистички је сигнификантна разлика у концентрацијама естрадиола и тестостерона између жена у репродуктивном периоду и мушкараца, што је и очекивано (табела 11).

Нема разлике латенци пикова између оболелог од ГБ1 и здравих испитаника по свим параметрима (N9, N11, N13, N20, P25, N20-N13, P25-N13, P25-N20), али у контролној групи здравих постоји значајна разлика по полу од N9 до P25, док се код пацијената са ГБ1 та разлика по полу завршава на N13, губи се на N20 и P25. Нема разлике у просечним вредностима латенци N20-N13, P25-N13, P25-N20 ни између група нити по половима (слика 17).

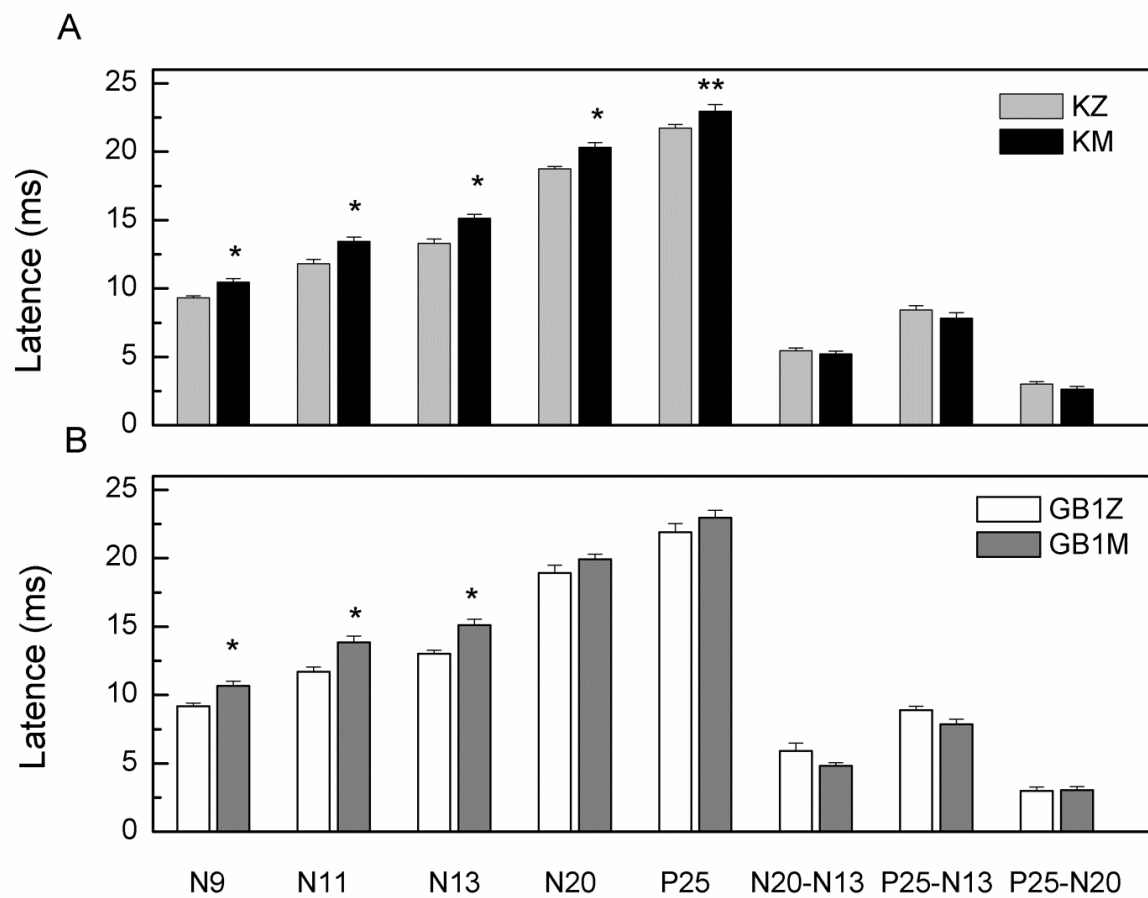
У групи здравих, једино је статистички сигнификантна повезаност централног времена спровођења (N20-N13) и концентрације тестостерона код мушкараца (слика 18). Код оболелих од ГБ1, значајна негативна корелација латенци и концентрација тестостерона постоји само код пацијенткиња и то на периферији (N11, N13) (слике 19 и 20). Када се жене и мушкарци посматрају заједно, статистички је значајна повезаност свих латенци на периферији (N9, N11, N13) и концентрација тестостерона и код групе здравих испитаника и код пацијената са ГБ1: N9 ($r = 0.57$ vs. $r = 0.58$, $p < 0.01$), N11 ($r = 0.60$ vs. $r = 0.62$, $p < 0.01$) и N13 ($r = 0.65$ vs. $r = 0.67$, $p < 0.01$). Само код оболелих мушкараца сигнификантна је негативна корелација централног времена спровођења (N20-N13) и концентрације естрадиола (слика 21). У контролној групи здравих жена значајна је позитивна повезаност латенце N13 и концентрације естрадиола (слика 22А), док је код жена оболелих од ГБ1 значајна негативна повезаност латенце N9 и концентрације естрадиола (слика 22Б).

Табела 11. Антропометријски и лабораторијски подаци здравих испитаника и пацијената са ГБ1.

	Здрава контрола			Гошева болест типа 1			<i>p</i> (♀К/ГБ1)	<i>p</i> (♂К/ГБ1)
	♀ (N=10)	♂ (N=10)	<i>p</i>	♀ (N=10)	♂ (N=10)	<i>p</i>		
Узраст (године)	39,2 ± 5,1	44,4 ± 3,9	0,42	38,2 ± 4,1	43,8 ± 4,2	0,35	0,88	0,92
Висина (cm)	171,0 ± 1,4	180,2 ± 1,8	0,01	164,3 ± 2,7	180,0 ± 2,6	0,01	0,04	0,95
Тестостерон (nmol/L)	1,07 ± 0,12	21 ± 2	0,01	0,89 ± 0,17	19,4 ± 1,3	0,01	0,33	0,49
Естрадиол ¹ (pmol/L)	341 ± 56	129 ± 10	0,01	376 ± 82	115 ± 13	0,01	0,73	0,40

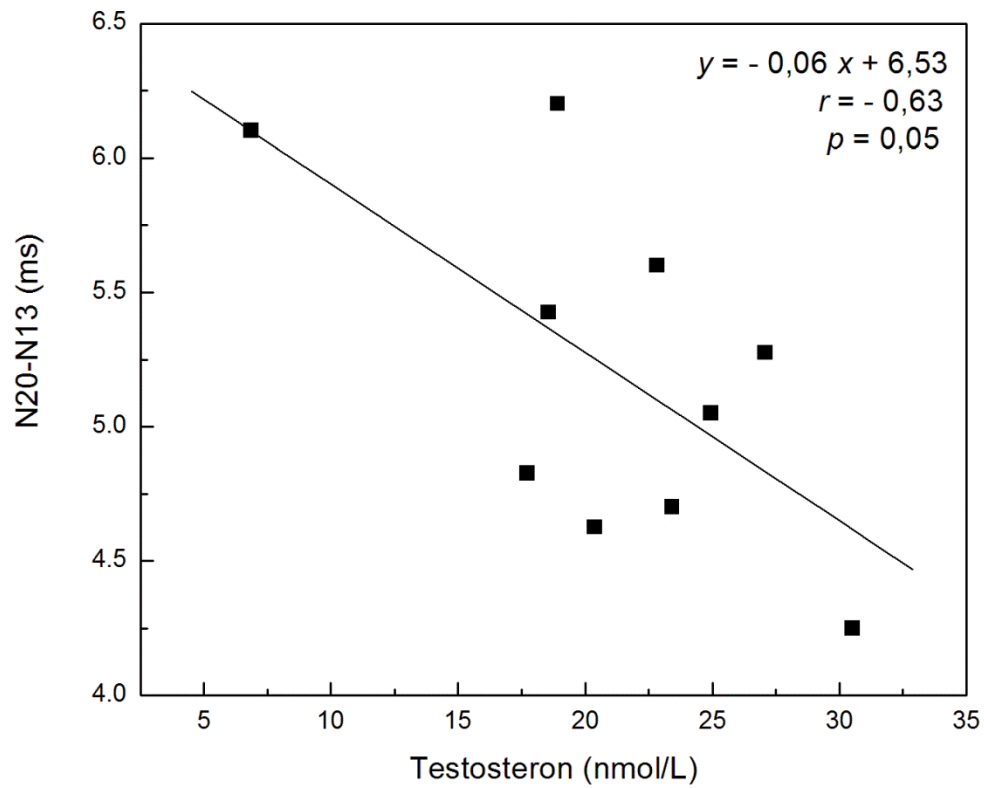
* Анализоване су вредности естрадиола само за 7 жена у репродуктивном периоду

¹ Узете су вредности само седам жена у репродуктивном периоду

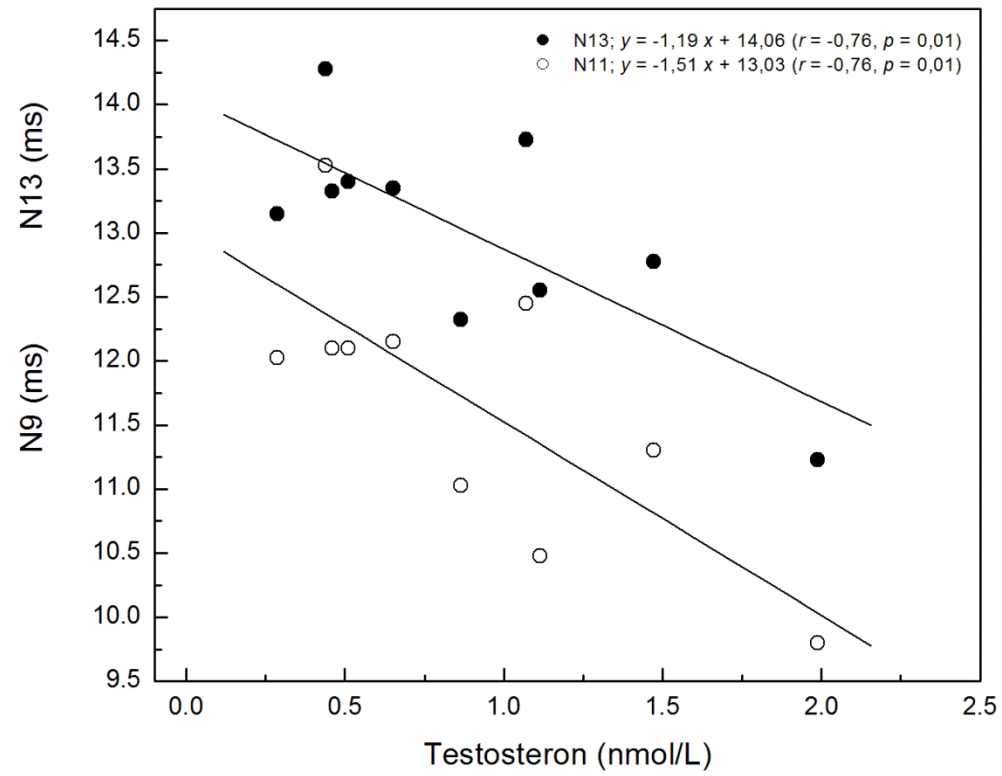


Слика 17. Латенце плус стандардне грешке код контролне групе здравих (К) и пацијената са ГБ1.

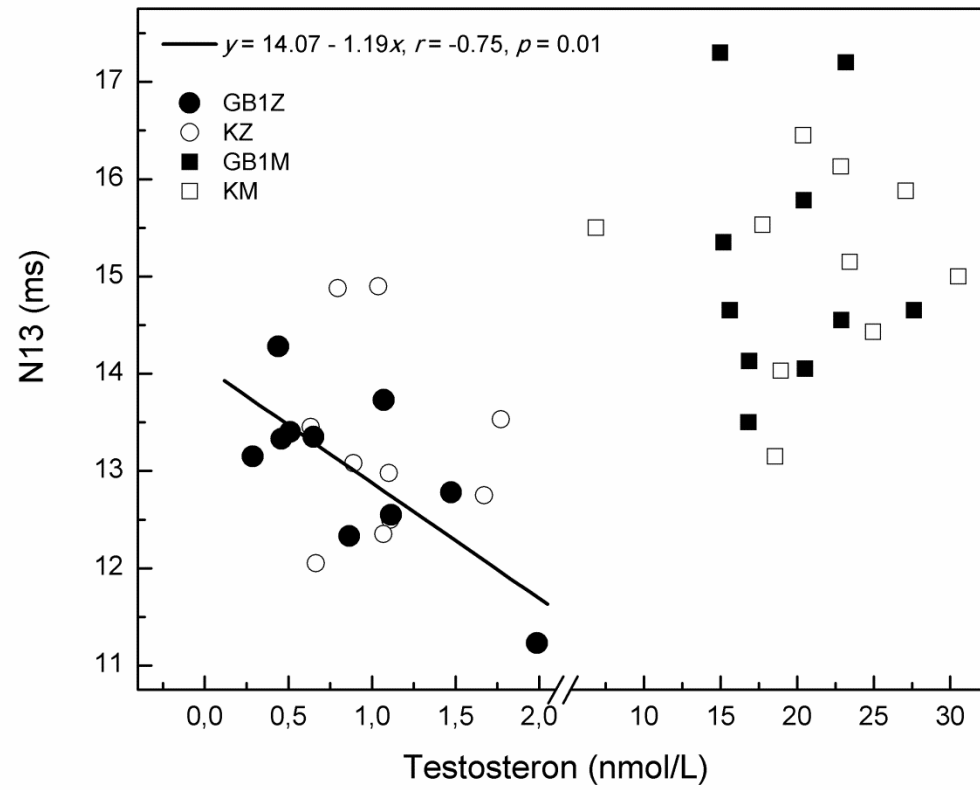
* $p < 0,01$ ** $p < 0,05$



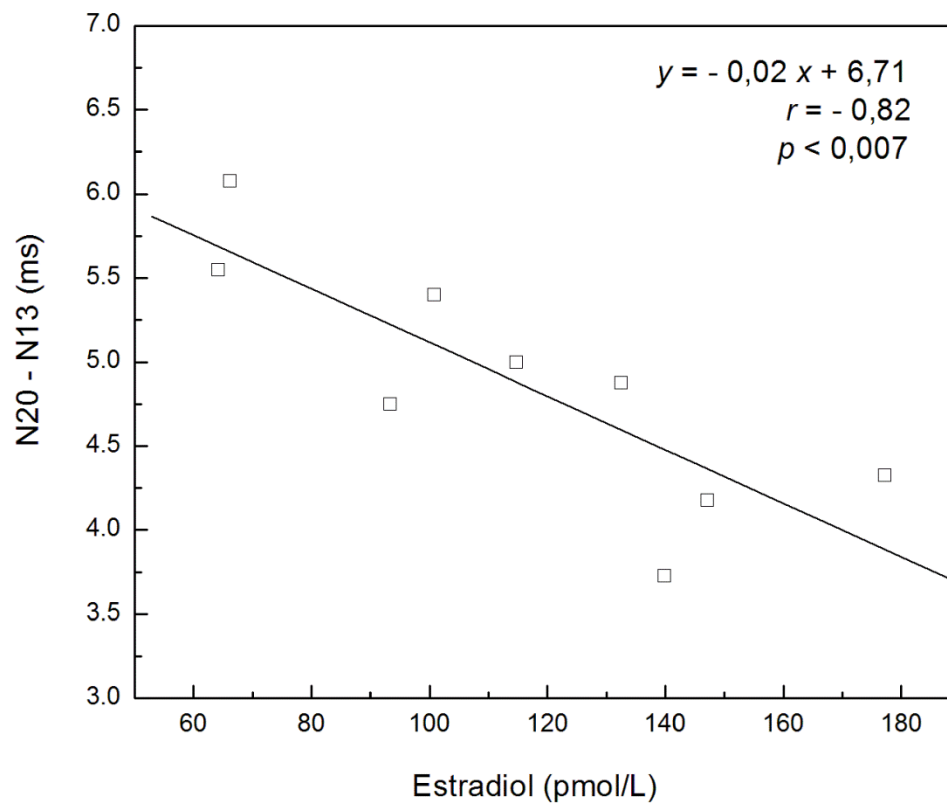
Слика 18. Корелација између централног времена спровођења у мозгу и концентрације тестостерона у плазми код контролне групе здравих мушкараца.



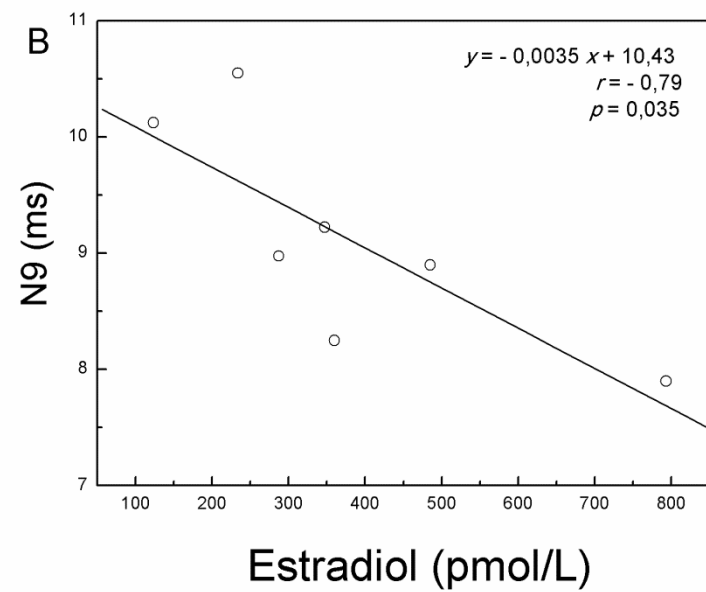
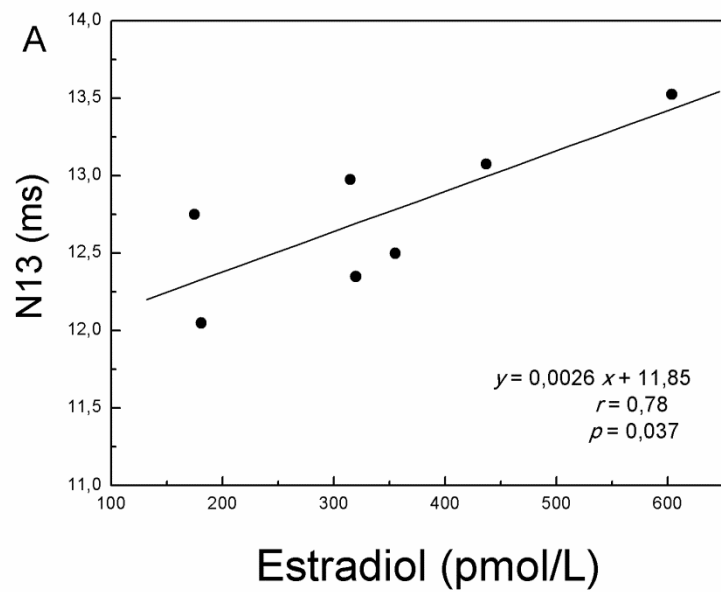
Слика 19. Корелација између латенци (N9 и N13) и концентрације тестостерона у плазми код жена оболелих од ГБ1.



Слика 20. Корелација између латенце N13 и концентрације тестостерона у плазми код жена оболелих од ГБ1.



Слика 21. Корелација између централног времена спровођења у мозгу и концентрације естрадиола у плазми код мушкараца са ГБ1.



Слика 22. Позитивна корелација између латенце N13 и концентрације естрадиола у плазми код здравих жена (A) и негативна корелација између латенце N9 и концентрације естрадиола у плазми код жена оболелих од ГБ1 (Б).

5. ДИСКУСИЈА

Важећа општеприхваћена подела ГБ успостављена је 1972. године. Експерти Националних института за здравље САД, Фредриксон и Слоун су, после увида у све расположиве оригиналне радове о клиничкој слици ГБ, класификовали ГБ на три типа: тип 1 (хронични ненеуронопатски), тип 2 (акутни неуронопатски) и тип 3 (субакутни неуронопатски). Изричито су навели да је обавезан критеријум за постављање дијагнозе ГБ1 да нема знакова захваћености централног нервног система (ЦНС) („Freedom from signs of cerebral involvement is the *sine qua non* for classification of Type 1 Gaucher's disease“) (Fredrickson & Sloan, 1972) (и при том употребили крњи, апокопни латински израз изоставивши главни део – *conditio*, услов). Прокоментарисали су да у ствари нема типичног примера ГБ1. С истинским научним схватањима, нису поставили никаква крута ограничења, већ су антиципирани да ће једног дана постати видљиво неколико форми хроничне ненеуронопатске ГБ (значи ГБ1), укључујући неке асимптоматске, са хистолошким доказом захваћености нервног система („Perhaps someday there will emerge several forms of chronic non neuronopathic Gaucher's disease, including some with symptomless, histologic evidence of neuronal involvement“) (Fredrickson & Sloan, 1972). Међутим, постављени критеријум је временом претворен у догму.

После деценија генотипско-фенотипских студија о ГБ испоставило се да нема никаквих значајних корелација (Kolodny, 2013). Постало је јасно да се чак исти генотипови налазе код пацијената са различитим клиничким типовима или презентацијама ГБ. Уочено је да браћа и сестре са истим генотипом могу имати различите клиничке манифестације, компликације, као и одговоре на терапију. Описани су чак и монозиготни близанци са различитим типом или степеном тежине болести (Lachmann et al., 2004). И обратно, клинички слични пацијенти могу имати много различитих генотипова (Sidransky, 2004). Водећи светски признати ауторитет данашњице за ГБ с неуролошког аспекта, педијатар Елен Сидрански из Националног института за истраживање људског генома, у оквиру Националних института за здравље САД, после вишедеценијске евалуације пацијената са ГБ, дошла је до закључака: (1) да је ГБ исправније окарактерисати као континуум фенотипова, од којих неки пркосе класификацији у класична три типа, и (2) да је можда, најрелевантнија разлика у томе што је код неких

пацијената са ГБ захваћен нервни систем а код других није (*sic!*) (Sidransky, 2004). Поводом потоњег, увидом у радове о ГБ доступне преко PubMed-а, види се да се ради само о епигонима с истим резоновањем.

Још од последње деценије XX века било је запажено да се код неких пацијената са ГБ1 јавља паркинсонизам раног почетка од 4. до 6. деценије живота и агресивног клиничког тока, али се молекулски патофизиолошки механизам тога још увек не разуме (Neudorfer et al., 1996; Sidransky & Lopez, 2012; Horowitz et al., 2016). У проспективној студији у којој је кохорта од 444 пацијента са ГБ1 консекутивно процењивана неуролошки током 12 година, паркинсонизам се развио код 11 пацијената. Тако се сазнало да пацијенти са ГБ1 имају скоро 20 пута већи ризик за развој паркинсонизма у поређењу са општом популацијом (Vultron et al., 2010). Тих 2,48% пацијената са паркинсонизмом представља специфичан субфенотип ГБ1.

С обзиром на таква сазнања, за ову студију пресека управо су били одабрани пацијенти са ГБ1 који ни после више од 10 година неуролошке контроле нису испољили било какве клинички препознатљиве промене од стране ЦНС-а. (Код петоро њих пре овога истраживања била је урађена и једнофотонска емисиона компјутеризована томографија – SPECT мозга). Будући да све еукариотске ћелије, укључујући и неуроне, садрже лизосоме у којима се одвија катаболизам сфинголипида (Goo et al., 2017), извели смо хипотезу да због дефицијентне активности β Г последичне промене настају и у ЦНС-у пацијената са типом 1 ГБ без паркинсонизма (скоро 98% оболелих од ГБ1), упркос непостојања клиничких неуролошких манифестација. Осмишљено је да упориште за пружање доказа буде у функционалној неуровизуализацији методом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ. Додатно је аргументовано методом фМР. До сада оваквих истраживања није било.

Гликоза је главни метаболички супстрат мозга, њена оксидација производи количину енергије која је неопходна за адекватну моздану активност. Проучавање метаболизма гликозе *in vivo* омогућава ^{18}F -ФДГ-ПЕТ од увођења метода 1976. године (Sokoloff et al., 1977). Локална потрошња гликозе, а тиме и церебралног преузимања ^{18}F -ФДГ, јако позитивно корелише са локалном неуронском активношћу, пропорционално се повећава са интензитетом или фреквенцијом стимулуса (Sokoloff et al., 1981) а смањује у условима сензорне депривације (Kennedy et al., 1976). Такве метаболичке варијације одвијају се на нивоу синаптичких веза (Sokoloff, 1999). Неуротрансмисија и трансдукција

сигнала су процеси са највишим енергетским захтевима. Процењено је да енергетска потреба неуротрансмисије и сродних догађаја премашује 80% укупне енергетске потрошње мозга (Shulman et al., 2004). Код здравих особа, у условима мировања брзина метаболичке потрошње гликозе је око 15 $\mu\text{mol}/\text{min}$ у 100 g беле масе, и 40-60 $\mu\text{mol}/\text{min}$ у 100 g сиве. Преузимање ^{18}F -ФДГ је обично веће у фронталном, паријеталном и окципиталном кортексу него у темпоралном, док базалне ганглије имају нешто већу активност него кортекс (Ivančević et al., 2000; Berti et al., 2014).

Региони мозга захваћени патолошким процесима су дисфункционални, синаптичка активност је смањена, смањен је метаболизам гликозе па је смањено и накупљање ^{18}F -ФДГ. Мерењем регионалног метаболизма гликозе (као индикатора очуваности регионалне мождане активности) могу се детектовати поремећаји мождане функције и код испитаника који немају јасне структурне ни клиничке неуролошке манифестације болести. Стога је ово испитивање методом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ спроведено код групе пацијената са типом 1 ГБ без клиничких неуролошких промена.

Резултати нашег истраживања потврђују постављену хипотезу. Чак је изненађујућа дискрепанца између непостојања јасних клиничких показатеља мождане дисфункције и широких зона хипометаболизма на ^{18}F -ФДГ-ПЕТ-у код пацијената са ГБ1 без неуролошких знакова, и то већ у стању мировања (resting state), будући да у мозгу здравих људи постоји пропорционални однос између можданих функција и метаболизма гликозе. Поставља се питање зашто нема клиничких неуролошких испољавања?

За дисфункцију је потребно да се достигне критички праг оштећења. С обзиром на то да је доказано да, осим у развојном добу, пластичност постоји и у адултном ЦНС-у (Merzenic et al., 1983), онда захваљујући реорганизацији синапса и мозак пацијената са ГБ1 се адаптира на хипометаболичке услове тако да нема клиничких неуролошких манифестација. Али, дискретни испади највероватније постоје у виду финих дисфункција. То захтева врло суптина тестирања која би указала на дискретне функционалне показатеље, дискретне сурогат маркере неуролошке дисфункције у ЦНС-у пацијената са ГБ1 без неуролошких знакова. На то се до сада није мислило иако се ГБ клинички и базично проучава више од 100 година.

Намеће се ново питање: Зашто се при истим комбинацијама сложених хетерозиготних мутација у *GBA1* поставља дијагноза различитих типова ГБ, тип 1, без клинички манифестних неуролошких знакова, и тип 3, код ког се неуролошки знаци клинички јасно показују? Чиме би онда могао да се објасни каузалитет фенотипских разлика? Шта је разлог што је код ГБ3 капацитет неуропластицитета исцрпљен а код ГБ1 није?

ГБ је својствен широк спектар фенотипских карактеристика међу особама са истим мутацијама у гену *GBA1*, па чак када се ради и о монозиготним близанцима (Lachmann et al., 2004). Ова варијабилност у презентацији моногених поремећаја може се објаснити мноштвом фактора као што су генетски чиниоци, животна средина и епигенетски статус, који су специфични за сваког пацијента понаособ (Sidransky, 2004).

Варијанте појединачних нуклеотида и чести полиморфизми могу утицати на испољавање знакова болести, а тиме и на одговарајући фенотип. Те генетске варијанте које модификују болест су у фокусу истраживања од када је први пут уведен тај концепт (Haldane, 1941). Често се користе за разумевање неочекиваних фенотипова као и за идентификовање нових терапијских циљева. Генерално узевши, гени модификатори могу да промене клиничке фенотипове преко четири основна механизма: променама у пенетранцији, експресивности, доминантности, и/или плеотропији (Nadeau, 2001).

Највише проучавани и високо релевантни модификатори ГБ су *PSAP* (ген за активаторски сапозин С) и *SCARB2* (ген који кодира транспортни протеин LIMP-2).

Смањена активност сапозина С нарушава интеракцију са β Г, ометајући функцију β Г и узрокујући ГБ. Тачно међусобно деловање тих протеина није у потпуности разјашњено (Tamargo et al., 2012). Међу пацијентима са *PSAP* мутацијама, једни су са клиничком сликом типа 1 ГБ, док други показују неуролошке знаке карактеристичне за ГБ типа 3 (Tamargo et al., 2012).

Модификаторску улогу *SCARB2* потврдила је молекуларна анализа урађена код близанаца оболелих од ГБ са истим генотипом. Показало се да брат са благом клиничком сликом ГБ1 има изворни тип *SCARB2*, док је код другог брата са миоклоничком епилепсијом откривена сложена хетерозиготна мутација у *SCARB2*, која је допринела настанку фенотипа ГБ3 (Velayati et al., 2011).

Остали гени који могу да модификују фенотип ГБ јесу гени који се налазе у близина гена *GBA1*. Целокупни регион 1q21, у којем је лоциран *GBA1*, богат је генима: садржи седам гена и два псеудогена врло блиско груписана (Winfield et al., 1997).

Ген *MTX1* (метаксин 1) налази се само 430 нуклеотида нисходно од псеудогена ψ *GBA1* и кодира протеин од 317 аминокиселина, који је вероватно део препропротеинског импорт-комплекса у спољашњој мембрани митохондрија (Armstrong et al., 1997). Ген *MTX1* такође има псеудоген лоциран 670 нуклеотида нисходно на 3' нетранслаторном крају (enhancer одсечак) функционалног гена *GBA1* (Long et al., 1996). Enhancer (појачавач) је сегмент ДНК који појачава транскрипцију гена. Присуство суседних граничних гена и њихових псеудогена повећава шансе за неједнако хромосомско спаривање и рекомбинацију између сваког гена и његовог псеудогена. Стога, рекомбинација између гена *MTX1* и његовог псеудогена има потенцијал да прекине 3' нетранслаторни крај гена *GBA1* (који је у промоторском региону псеудогена ψ *MTX1*) (Winfield et al., 1997; Tayebi et al., 2003). Такви рекомбинантни догађаји могу да модификују експресију *GBA1* и допринесу фенотипској хетерогености ГБ (Tayebi et al., 2000, Tayebi et al., 2003). Као последица тога, прекиди појачавача узроковани овим потенцијалним прелазима између гена и псеудогена могу утицати како на регулацију експресије гена, тако и на епигенетско деловање. Регион који обухвата 3' нетранслаторни крај гена *GBA1* са интроном 3 псеудогена ψ *MTX1* високо је конзервисан и садржи три могућа места везивања транскрипционог фактора. Потенцијална активност 3' нетранслаторног краја гена *GBA1*/псеудогена ψ *MTX1* може бити поремећена било којом рекомбинацијом између гена *MTX1* и псеудогена ψ *MTX1*, што доводи до промена у експресији *GBA1* (Blech-Hermoni et al., 2010). Надаље, и сама промена у *MTX1* може имати фенотипске последице. Код неких пацијената са ГБ идентификована је мутација с.606C>A у гену *MTX1*. Најчешће се проналази да је удружена са с.1226A>G. Показано је да та мутација у *MTX1* може да допринесе настанку блаже фенотипске варијанте ГБ код пацијената са с.1226A>G (LaMarca et al., 2004). Затим, утврђено је да се мутација с.184T>A у гену *MTX1* чешће проналази код оболелих од Паркинсонове болести који су хетерозиготни носиоци мутације у гену *GBA1* него код пацијената код којих нема таквог носилаштва. Указано је на то да је хомозиготни *MTX1* генотип с.184A/A удружен са ранијим клиничким испољавањем моторичких знакова (Gan-Or et al., 2011). Неопходне су

додатне функционалне и клиничке студије да би се детерминисала улога *MTX1* и других суседних гена у модификовању ГБ, пошто већина гена у тој области није до краја проучена.

Тек недавно је показано да псеудоген ψ *GBA1* може да експримира конкурентну ендегену РНК, и да тако индиректно повећава експресију *GBA1* преко микроРНК, јер микроРНК могу да вежу и инхибишу транслацију *GBA1* (Straniero et al., 2017).

Познато је да, осим лизосомске β Г, и други ензими разграђују гликозилцерамиде, што их чини биолошким кандидатима за модификацију ГБ. Ген *GBA2* кодира микросомску β Г, ензим локализован на ЕР, за који се првобитно мислило да му је главни супстрат за хидролизу β -гликозид жучних киселина. Међутим, у експерименту на анималном моделу се открило да искључење гена *GBA2* доводи до накупљања гликозилцерамида а без промене метаболизма липида и жучних киселина. Тако се сазнало да је гликозилцерамид главни супстрат и за лизосомску и за микросомску β Г (Yildiz et al., 2006). Потом је утврђено да се експресија *GBA2* повећа када је дефицијентна β Г пореклом од *GBA1* (Aureli et al., 2012; Burke et al., 2013). Ови резултати су поново испитивани у наредном истраживању на анималном моделу које је показало да се код мишева са истовремено искљученим генима *GBA1* и *GBA2* накупило више гликозилцерамида него када су ти гени искључивани појединачно. Међутим, појединачне и мулти-маркер генетичке анализе су показале да *GBA2* нема утицаја на тежину болести (Yildiz et al., 2013). Тај рад је довео до хипотезе да *GBA2* доприноси патологији ГБ прерадом гликозилсфингозина и гликозилцерамида у сфингозин, једињење које има потенцијал да буде токсично. Тестирање те хипотезе дало је конфликтне резултате, због чега и даље није јасна улога *GBA2* у патофизиологији ГБ (Mistry et al., 2014; Schonauer et al., 2017).

И Е3 убиквитин лигаза ИТСН може да делује модификаторски. Типично је да погрешно увијене β Г елиминише систем контроле квалитета у ЕР па бивају подвргнути ERAD-у у протеазому, али томе не подлежу све варијанте мутиране β Г. Изнети су јаки докази да систем контроле квалитета у ЕР не препознаје β Г са мањим грешкама у увијању, тако да оне ипак стижу у лизосоме, што повећава тежину болести. Тиме се степен ретенције и протеазомске деградације квалификовао за један од фактора који одређују тежину ГБ (Ron & Horowitz, 2005). Битна улога Е3 убиквитин лигазе ИТСН је у томе што ступа у интеракцију

са мутираним варијантама $\beta\Gamma$ и изазива њихову полубиквитинацију и протеазомску деградацију. Пошто количина деградације $\beta\Gamma$ може бити маркер тежине болести, Е3 убиквитин лигазе могле би да се даље истражују као модификатори ГБ (Maog et al., 2013).

Истраживана је и могућа модификаторска улога продукта гена *TNF* који кодира фактор некрозе тумора α ($TNF-\alpha$). Описано је да су концентрације $TNF-\alpha$ више код пацијената са ГБ3 и ГБ2 у поређењу са оболелима од ГБ1 и са здравом контролом (Michelakakis et al., 1996). Испитиван је полиморфизам у гену *TNF* код пацијената са ГБ. Указано је на то да је хомозиготно стање за уобичајени полиморфизам rs1800629 у региону промотора повезано са повишеном експресијом *TNF*, повећаном производњом $TNF-\alpha$ и типом 1 ГБ (Altarescu et al., 2005). Те студије указују да $TNF-\alpha$ може посредовати у фенотипском испољавању ГБ, утицати на укупну тежину болести, посебно у односу на инфламацију и потенцијално неуропатологију.

Испитивања су показала да транскрипциони фактор ЕВ, продукт гена *TFEB*, може бити важан за правилну функцију $\beta\Gamma$. Студије промотора откриле су да многи гени који кодирају лизосомске протеине деле палиндромску (реверзно комплементарну) секвенцу. Те секвенце су означене као „координисани елементи лизосомске експресије и регулације“ (coordinated lysosomal expression and regulation – CLEAR elements). Транскрипциони фактор ЕВ се веже за ове секвенце и окида експресију лизосомских гена, што доводи до повећаног броја лизосома и појачаних активности лизосомских хидролаза (Sardiello et al., 2009). Активирани транскрипциони фактор ЕВ побољшава активност мутиране лизосомске $\beta\Gamma$ тако што подстиче увијања и пренос, делом и преко повећане експресије *LIMP2* (Song et al., 2013). Испитиван је транскрипциони фактор ЕВ у неуронима добијеним од индукованих матичних ћелија узетих од пацијената са ГБ. Утврђено је да ћелије пореклом од пацијената са типовима 2 и 3 ГБ имају смањен број лизосома, накупљање аутофагозома и снижен ниво транскрипционог фактора ЕВ у поређењу са ћелијама пореклом од пацијената са ГБ1 и контролне групе. Додавањем рекомбинантне $\beta\Gamma$ ћелијама обновљен је број лизосома, а тај ефект је био појачан када је транскрипциони фактор ЕВ био прекомерно експримиран (Awad et al., 2015). Показало се да фармаколошки шаперон амброксол повећава експресију транскрипционог фактора ЕВ као и неколико лизосомских гена укључујући *GBA1* (McNeill et al., 2014; Narita et al., 2016).

С генетичког аспекта је важно што је у овом дисертационом истраживању откривена нова, незабележена мутација с.968А>G у 7. егзону гена *GBA1*. Куриозитет је и то што један од испитиваних пацијента има вишеструко мутирани алел [с.882Т>G; с.1342G>С], уобичајени назив [D409Н;H255Q], запажен у источном делу Средоземља, за који је анализом хаплогрупа, користећи полиморфизам пет микросателита у близини *GBA1*, утврђено да води порекло са Балкана (Santamaria et al., 2008).

До сада је спроведено само једно мултимодално неурофизиолошко испитивање (укључујући ССЕР) код одраслих особа са типом 1 ГБ (Perretti et al., 2005). У тој студији учествовало је осам женских и четири мушка одрасла пацијента у узрасту од 17 до 48 година. Транскранијалном магнетном стимулацијом моторног кортекса, код пет од девет испитаних пацијената утврђен је повишен праг дражи, а код два од њих било је продужено и централно време спровођења (N20-N13). ССЕР су приређени код 12 одраслих болесника. Само код двоје је забележено продужено централно време спровођења. У свим случајевима прочитани су нормални електрични одговори са периферије (N9, N11, N13). И то је све од досадашњих неурофизиолошких испитивања ГБ1. Ми смо потврдили такве налазе, али смо отишли и даље. Открили смо да постоје полне разлике – краће латенце и код здравих и код оболелих жена у односу на мушкарце, које до сада уопште нису биле примећене. Затим, у контролној групи здравих уочена је значајна разлика латенци по полу од N9 до P25, док се код оболелих од ГБ1 та разлика губи на N20 и P25. Дакле, на нивоу ЦНС-а полни диверзитет постоји и у патофизиолошком механизму ГБ1. Ради разумевања тог механизма код типа 1 ГБ у истраживање смо увели испитивање полних хормона, што такође до сада није рађено, а утврђено је следеће:

1. Код жена је сигнификантна корелација латенци и концентрација полних хормона само на периферији (Lakošević et al., 2019).

Код здравих жена значајна је једино позитивна корелација са естрадиолом. И код оболелих жена је значајна, али негативна, а негативна је и са тестостероном, што је новина у односу на здраве (Lakošević et al., 2019).

Кључна велика проспективна опсервациона кохортна студија, у којој су промењени строго дефинисане критеријуми, пружила је доказе за полинеуропатију као део природног тока ГБ1 (6). Од 103 болесника у узрасту од

18 до 75 година, 13,6% није било специфично лечено, а 86,4% је добијало супституциону ензимску терапију. Међу њима је на почетку клиничке студије 10,7% већ имало дијагностиковану сензомоторну аксоналну полинеуропатију коришћењем стандардизоване електрофизиолошке процене (Biegstraaten et al., 2010). Током двогодишњег праћења било је откривено шест нових случајева полинеуропатије (2,9 на 100 особа годишње). Иста дијагностичка процедура је коришћена за 25 здравих испитаника. Пошто је процењена преваленца полинеуропатије у општој популацији између 0,09% и 1,3%, а инциденца између 0,0046 и 0,015 на 100 особа годишње, закључено је да су преваленца и инциденца полинеуропатије код пацијената са ГБ1 веће него за општу популацију. То је био разлог што су у ово истраживање укључени само пацијенти без периферних неуролошких манифестација.

Неуроактивни стероиди обухватају стероиде које производи нервни систем и хормоне који потичу из гонада и надбубрежних жлезда. Периферни нервни систем (ПНС) не само да синтетише и метаболише неуроактивне стероиде, већ периферни живци исто тако експримирају рецепторе за неуроактивне стероиде и стога су мета за њихову активност (Melcangi et al., 2005; Melcangi et al., 2011). Стероиди који делују у нервном систему остварују своје ефекте преко класичних интрацелуларних андрогених, прогестеронских, естрогенских, гликокортикоидних и минералокортикоидних рецептора, као и преко неklasичних стероидних рецептора које експримирају различите ћелијске компоненте ПНС-а (De Bellis et al., 2001; Giatti et al., 2015). Стога, регулисањем физиологије ПНС-а преко различитих сигналних путева, неуроактивни стероиди, укључујући тестостерон, могу да утичу на различите функције периферних живаца, међу којима су посебно проучаване пролиферација и мијелинације Шванових ћелија (Melcangi et al., 2005; Giatti et al., 2015).

Упадљив полни диморфизам прираста беле масе у адолесцентском мозгу је већ уочен, али није објашњен (De Bellis et al., 2001; Lenroot et al., 2007). Да би се проценила улога андрогеног рецептора у посредовању ефекта тестостерона на пораст беле масе, испитивано је 204 мушких и 204 женских адолесцената (Perrin et al., 2008). Генотипизован је функционални полиморфизам у гену за андрогени протеински рецептор (AR) (број CAG тринуклеотидних поновака у егзону 1), заједно са мерењем концентрације тестостерона у плазми, компјутеризованом анализом слика магнетне резонанције и прорачуном односа преноса

магнетизације (magnetization transfer ratio – MTR) за белу масу у мозгу као индиректног индекса мијелинације. Показало се да генетска варијација у гену *AR* ублажава ефекат тестостерона на волумен беле масе током адолесценције мушкараца. Наиме, прираст количине беле масе повезан с тестостероном био је већи код адолесцената мушког пола са мањим бројем *CAG* триплета у егзону 1 него што је то био код оних вршњака истог пола код којих је број понављања био већи. Резултати МТР-а указали су на то да је пораст у волумену повезан са узрастом, али то се није могло објаснити повећањем мијелинације. Претпостављено је да тестостерон пре утиче на пречник аксона, него на дебљину мијелинске овојнице. Директна последица повећаног пречника аксона под утицајем тестостерона је смањење броја влакана по јединици запремине, што се манифестује као нижи индекс мијелинације и ниже вредности МТР (Perrin et al., 2008). Исто тако, ово друго може објаснити податке о периферном нервном одговору добијене у нашем истраживању. Унутар опсега концентрације укупног тестостерона (мушкарци и жене), позитивна корелација између нивоа тестостерона у плазми и свих пик латенци код свих учесника у свакој групи је веома значајна. Пошто је број нервних влакана кључни фактор који одређује ефикасност трансмисије периферних нерава (Gu, 2001), мањи број мијелинизованих влакана у *n. medianus*-у услед великог калибра изазваног тестостероном код мушкараца може бити разлог за дуже латенце (Lakošević et al., 2019).

Када су жене анализоване *per se*, користећи нижи опсег вредности тестостерона код жена (до 1.9 nmol/L), само се код жена са ГБ типа 1 показала статистички значајна негативна корелација нивоа тестостерона у плазми са латенцама од N9 до N13. Ова асоцијација указује да само уобичајени налаз ССЕП-а није довољан да би се извели закључци о несметаном морфолошком и функционалном интегритету нерва на периферији код жена са ГБ1 (Lakošević et al., 2019). Треба разјаснити зашто мале промене у концентрацијама тестостерона код жена са типом 1 ГБ утичу на трајање пропагације импулса. Експериментални модели су указали на то да патолошки процеси утичу на концентрацију неуроактивних стероида у периферним живцима на полно различит начин (Caruso et al., 2008; Pesaresi et al., 2010).

2. Код мушкараца, значајна је само повезаност централног времена спровођења ССЕР и концентрација полних хормона.

Важан налаз је да код здравих мушкараца постоји негативна корелација са концентрацијом тестостерона, док је код оболелих мушкараца корелација негативна, али са другим полним хормоном – естрадиолом.

Хормони су битне компоненте регулаторних механизма хомеостазе. Хормони које луче различите ендокрине жлезде допиру до ЦНС-а где утичу на адаптирање синаптичког функционисања и доприносе пластичности мозга сходно промењеним потребама (Azcoitia et al., 2018). Један од хормона који регулише пластичност мозга је и естрадиол. Синтетише се ароматизацијом андрогена какав је тестостерон, под каталитичким дејством ензима ароматазе. Од пионирског рада Нафтолина почетком 70-их година ХХ века сазнало се за активност ароматазе у мозгу, и тако открило да је и мозак извор естрадиола (Naftolin et al., 1971a; Naftolin et al., 1971b; Naftolin et al., 1972). У мозгу мајмуна и људи ароматаза је локализована *in vivo* коришћењем метода ПЕТ (Takahashi et al., 2006; Biegan et al., 2010).

Под физиолошким условима, ароматазу синтетишу бројни неурони, и ароматаза је укључена у регулацију синаптичке пластичности (Beyer et al., 1994; Jakab et al., 1994; Нојо et al., 2004; Yague et al., 2006, 2008). Активност ароматазе детектована је у пресинаптичким терминалима (Naftolin et al., 1996; Peterson et al., 2005). Будући да су и естрогенски рецептори локализовани у региону синапси, естрадиол ослобођен од стране пресинаптичких терминала може брзо да делује као неуромодулатор (Balthazart & Ball, 2006; Saldanha et al., 2011; Remage-Healey et al., 2011). Нова истраживања указују на сексуални диверзитет у деловању ароматазе и естрадиола неуронског порекла на развој синапси и пластичности мозга (Azcoitia et al., 2018).

У патолошким условима, попут повреде мозга, ароматазу синтетишу астроцити, што се тумачи као ендогени неуропротективни механизам јер је естрадиол произведен у реактивним астроцитима такође повезан са функционисањем и пластичношћу оштећених неуронских кола (Azcoitia et al., 2001; Wynne & Saldanha, 2004; Saldanha et al., 2005; Zhang et al., 2014). Код људи, исте промене исходишта ароматазе откривене су у мозгу болесника са Алцхајмеровом болешћу (Ishunina et al., 2005; Ishunina et al., 2007). Потребне су даље студије да би се идентификовали механизми који регулишу ослобађање

естрадиола неуралног порекла ради регулисања реорганизације синапси и функционисања мозга при адаптацији неуронских кола на физиолошке и патофизиолошке услове (Azcoitia et al., 2018).

У овом дисертационом раду идентификован је обрт сигнификантне негативне повезаности централног времена спровођења ССЕРП и полног хормона, од тестостерона код здравих мушкараца до естрадиола код мушкараца оболелих од ГБ1. То је важно зато што једино патохистолошко истраживање мозга 14 пацијената који су боловали од ГБ (од којих троје са ГБ1 без паркинсонизма и четворо са ГБ3), код свих открило промене у слојевима 3 и 5 неокортекса, слоју 4b кортекса калкаринуса и областима 2-4 Амоновог рога. Али, код ГБ3 утврђена промена је губитак неурона, а код ГБ1 само астроглиоза (Wong et al, 2004). С обзиром на то да су у патолошким стањима управо астроцити извор естрадиола који утиче на реорганизацију синапси (Azcoitia et al., 2001; Wynne & Saldanha, 2004; Saldanha et al., 2005; Zhang et al., 2014; Azcoitia et al., 2018; Brocca & Garcia-Segura, 2019), то би онда био кључни механизам пластичности ЦНС-а код мушкараца оболелих од ГБ1 довољног капацитета да се не развију клиничке неуролошке манифестације.

Фундаментални принцип на ком се заснива неуробиолошки концепт пластичности мозга јесте пластичност синапси – константно уклањање и поновно успостављање функционалних контаката мембрана ексцитабилних ћелија (Gulyaeva, 2017). Идентификован је велики број механизма на којима се заснива феномен синаптичке пластичности. Према временској скали деловања тих механизма, синаптичка пластичност може се поделити на три широке категорије: краткотрајну, дуготрајну и хомеостатску. Хомеостатска пластичност омогућује неуронским колима да непрестано одржавају одговарајуће нивое ексцитабилности и конективитета упркос промена унутрашње средине до којих може да доведе и измењени метаболизам (Turrigiano et al., 1998; Turrigiano, 2017). Резултати изнети у овом истраживању сугеришу да је та категорија пластичности успостављена у ГБ1.

Мултиформни механизми пластичности не само да се појављују у различитим класама синапси широм мозга него могу да настају и у једној истој синапси (Nelson & Turrigiano, 2008). Последње две деценије проширена су знања о синаптичким и неуралним доменима, све је више доказа који указују на астроците као потенцијалне интеграторе и модулаторе неуронске активности и

пластичности у простору и времену. Дендритска крошња једног неурона покривена је десетинама различитих астроцита, па синапсе тога неурона не преносе сигнале само другим неуронима, већ су у вишеструкој интеракцији са астроцитима, и, *vice versa*, један астроцит може да ступа у интеракцију са синапсама многих неурона (Halassa & Haydon, 2010). Тако астроцити могу да премосте и утичу на неуронска кола која нису међусобно директно повезана, да учествују у формирању комплексних неуронских мрежа, детектују неуронску активност из различитих неуронских кола, просторно и временски оркестрирају разнолике механизме пластичности (De Pittà et al., 2016). Наше истраживање указује на такву улогу астроцита у ГБ1.

Овом дисертацијом нападнута је важећа догма. Примењен је холистички приступ и изнете су идеје које нису препознате у преовлађујућим научним токовима. Пружени су докази о променама у ЦНС-у који представљају потпуно нова сазнања о ГБ1.

6. ЗАКЉУЧЦИ

У ГБ1 без клиничких неуролошких манифестација:

1. Методом ^{18}F -ФДГ-ПЕТ доказано је да је током мировања значајно измењен регионални метаболизам гликозе у ЦНС-у, и добијен је за овај тип болести карактеристичан образац регионалног хипометаболизма. Хипометаболизам гликозе указује на снижену функционалну (синаптичку) регионалну мождану активност.
2. Методом фМР показано је да је при изођењу моторичког задатка значајно нижа активација у 66% секундарног соматосензорног кортекса, 20% средње фронталне вијуге, 10% горње фронталне вијуге, 40% Брокиног поља 44, 38% оперкуларног кортекса, 10% прецентралне вијуге, десном палидуму, десној хемисфери церебелума и десном делу вермиса.
3. Морфометријом је у левој хемисфери утврђена значајно мања дебљина кортекса супрамаргиналне вијуге, горње слепоочне вијуге, ростралног дела средње фронталне вијуге, прецентралне вијуге, перикалкариног кортекса, а у десној хемисфери, латералног окципиталног кортекса.
4. Волуметријом је констатовано да је значајно мања само запремина путаменā.
5. На нивоу ЦНС-а постоји сексуални диверзитет: полни хормони су на различити начин повезани с овом болешћу код жена и мушкараца.
6. Откривена је нова мутација у гену *GBA1*.

7. ЛІТЕРАТУРА

Allison T, McCarthy G, Wood C, Jones S. Potentials evoked in human and monkey cerebral cortex by stimulation of the median nerve. A review of scalp and intracranial recordings. *Brain* 1991;114 (Pt 6):2465-503.

Altarescu G, Zimran A, Michelakakis H, Elstein D. TNF- α levels and TNF- α gene polymorphism in type I Gaucher disease. *Cytokine* 2005; 31(2): 149–52.

Aminoff M, Eisen A. Somatosensory evoked potentials. In: Aminoff M (Ed). *Aminoff's Electrodiagnosis in Clinical Neurology*. Saunders Elsevier Inc, New York 2012., pp. 513-36.

Armstrong L, Komiya T, Bergman B, Mihara K, Bornstein P. Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J Biol Chem* 1997; 272 (810): 6510-8.

Aureli M, Bassi R, Loberto N, Regis S, Prinetti A, Chigorno V, Aerts JM, Boot R, Filocamo M, Sonnino S. Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts. *J Inherit Metab Dis* 2012;35(6):1081-91.

Azcoitia I, Arevalo M, Garcia-Segura L. Neural-derived estradiol regulates brain plasticity. *J Chem Neuroanat* 2018;89:53-59.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura L. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol* 2001;47(4): 318–29.

Balthazart J, Ball G. Is brain estradiol a hormone or a neurotransmitter? *Trends Neurosci* 2006;29(5): 241–9.

Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 1994;77(6):895-907.

Bendikov-Bar I, Horowitz M. Gaucher disease paradigm: from ERAD to comorbidity. *Hum Mutat* 2012;33(10):1398-407.

Benyair R, Ron E, Lederkremer G. Protein quality control, retention, and degradation at the endoplasmic reticulum. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;292:197-280.

Berg-Fussman A, Grace M, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem* 1993;268(20):14861-6.

Berson S, Yalow R. General principles of radioimmunoassay. *Clin Chim Acta* 1968;22(1):51-69.

Berti V, Mosconi L, Pupi A. Brain: normal variations and benign findings in fluorodeoxyglucose-PET/computed tomography imaging. *PET Clin* 2014;9(2):129-40.

Beyer C, Green S, Barker P, Huskisson N, Hutchison J. Aromatase-immunoreactivity is localised specifically in neurones in the developing mouse hypothalamus and cortex. *Brain Res* 1994; 638(1-2): 203–10.

Biegón A, Kim S, Alexoff D, Jayne M, Carter P, Hubbard B, King P, Logan J, Muench L, Pareto D, Schlyer D, Shea C, Telang F, Wang G, Xu Y, Fowler J. Unique distribution of aromatase in the human brain: in vivo studies with PET and [N-methyl-11C]vorozole. *Synapse* 2010;64(11):801-7.

Biegstraaten M, Mengel E, Maródi L, Petakov M, Niederau C, Giraldo P, Hughes D, Mrsic M, Mehta A, Hollak C, van Schaik I. Peripheral neuropathy in adult type 1 Gaucher disease: a 2-year prospective observational study. *Brain* 2010;133(10):2909-19.

Blanz J, Groth J, Zachos C, Wehling C, Saftig P, Schwake M. Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase. *Hum Mol Genet* 2010;19(4):563-72.

Blau N, Duran M, Blaskovics M, Gibson K (Eds). *Physician' guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Heidelberg, Germany: Springer 2002.

Blech-Hermoni Y, Ziegler S, Hruska K, Stubblefield B, Lamarca M, Portnoy M; NISC Comparative Sequencing Program, Green E, Sidransky E. In silico and functional studies of the regulation of the glucocerebrosidase gene. *Mol Genet Metab* 2010;99(3):275-82.

Braakman I, Bulleid N. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 2011;80:71-99.

Brocca M, Garcia-Segura L. Non-reproductive functions of aromatase in the central nervous system under physiological and pathological conditions. *Cell Mol Neurobiol* 2019;39(4):473-81.

Bultron G, Kacena K, Pearson D, Boxer M, Yang R, Sathe S, Pastores G, Mistry P. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis* 2010;33(2):167-73.

Burke D, Rahim A, Waddington S, Karlsson S, Enquist I, Bhatia K, Mehta A, Vellodi A, Heales S. Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes. *J Inherit Metab Dis* 2013;36(5):869-72.

Charrow J, Andersson H, Kaplan P, Kolodny E, Pastores G, Rosenbloom B, Scott C, Wappner R, Weinreb N, Zimran A. The Gaucher registry: demographics and disease characteristics of 1698 patients with Gaucher disease. *Arch Intern Med* 2000;160(18):2835-43.

Chetrit E, Alcalay R, Steiner-Birmanns B, Altarescu G, Phillips M, Elstein D, Zimran A. Phenotype in patients with Gaucher disease and Parkinson disease. *Blood Cells Mol Dis* 2013;50(3):218-21.

Conrad K, Cheng T, Ysselstein D, Heybrock S, Hoth L, Chrnyk B, Am Ende C, Krainc D, Schwake M, Saftig P, Liu S, Qiu X, Ehlers M. Lysosomal integral membrane protein-2 as a phospholipid receptor revealed by biophysical and cellular studies. *Nat Commun* 2017;8(1):1908.

Daniels L, Glew R, Diven W, Lee R, Radin N. An improved fluorometric leukocyte β -glucosidase assay for Gaucher disease. *Clin Chim Acta* 1981; 115(3): 369-75.

Davidson B, Hassan S, Garcia E, Tayebi N, Sidransky E. Exploring genetic modifiers of Gaucher disease: The next horizon. *Hum Mutat* 2018;39(12):1739-51.

Davies E, Erikson A, Collin-Histed T, Mengel E, Tyłki-Szymańska A, Vellodi A. Outcome of type III Gaucher disease on enzyme replacement therapy: review of 55 cases. *J Inher Metab Dis* 2007;30(6):935-42.

De Bellis M, Keshavan M, Beers S, Hall J, Frustaci K, Masalehdan A, Noll J, Boring A. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb Cortex* 2001;11(6):552-7.

De Pittà M, Brunel N, Volterra A. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience* 2016; 323:43-61.

Dinur T, Grabowski G, Desnick R, Gatt S. Synthesis of a fluorescent derivative of glucosyl ceramide for the sensitive determination of glucocerebrosidase activity. *Anal Biochem* 1984;136(1):223-34.

Dvir H, Harel M, McCarthy A, Toker L, Silman I, Futerman A, Sussman J. X-ray structure of human acid-beta-glucosidase, the defective enzyme in Gaucher disease. *EMBO Rep* 2003;4(7):704-9.

Đurić S. Somatosenzorni evocirani potencijali. In: Đurić S. *Klinička neurofiziologija*. Prosveta, Niš 2002, pp. 119-29.

Elstein D, Zimran A. Gaucher disease. In: Mehta A, Winchester B (Eds). *Lysosomal storage disorders*. Wiley-Blackwell, Oxford 2012, pp.49-57.

Gan-Or Z, Bar-Shira A, Gurevich T, Giladi N, Orr-Urtreger, A. Homozygosity for the MTX1 c.184T>A (p.S63T) alteration modifies the age of onset in GBA-associated Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2011;12(4):325–32.

Giatti S, Romano S, Pesaresi M, Cermenati G, Mitro N, Caruso D, Tetel M, Garcia-Segura L, Melcangi R. Neuroactive steroids and the peripheral nervous system: An update. *Steroids* 2015;103:23-30.

Goo M, Sancho L, Slepak N, Boassa D, Deerinck T, Ellisman M, Bloodgood B, Patrick G. Activity-dependent trafficking of lysosomes in dendrites and dendritic spines. *J Cell Biol* 2017;216(8):2499-513.

Gulyaeva N. Molecular Mechanisms of Neuroplasticity: An Expanding Universe. *Biochemistry (Mosc)* 2017;82(3):237-42.

Halassa M, Haydon P. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 2010;72:335-55.

Haldane J. The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. *J Genet* 1941;41(2-3): 149–57.

Halic M, Beckmann R. The signal recognition particle and its interactions during protein targeting. *Curr Opin Struct Biol* 2005;15(1):116-25.

Hammond C, Braakman I, Helenius A. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(3):913-7.

Helenius A, Aebi M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001;291(5512):2364-9.

Hers H. Alpha glucosidase deficiency in generalised glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem J* 1963; 86:11-6.

Hojo Y, Hattori T, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii H, Mukai H, Morrison J, Janssen W, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. Adult male hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101 (3): 865–70.

Horowitz M, Elstein D, Zimran A, Goker-Alpan O. New directions in Gaucher disease. *Hum Mutat* 2016;37(11):1121-36.

Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: Structure and evolution. *Genomics* 1989;4(1):87–96.

Howseman A, Bowtell R. Functional magnetic resonance imaging: imaging techniques and contrast mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354(1387):1179-94.

INLAB Web service - <http://inlab.ibfm.cnr.it/inlab/SPM.php>

Ishunina T, Fischer D, Swaab D. Estrogen receptor alpha and its splice variants in the hippocampus in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2007;28(11):1670-81.

Ishunina T, van Beurden D, van der Meulen G, Unmehopa U, Hol E, Huitinga I, Swaab D. Diminished aromatase immunoreactivity in the hypothalamus, but not in the basal forebrain nuclei in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005;26(2):173-94

Ivančević V, Alavi A, Souder E, Mozley P, Gur R, Bénard F, Munz D. Regional cerebral glucose metabolism in healthy volunteers determined by fluorodeoxyglucose positron emission tomography: appearance and variance in the transaxial, coronal, and sagittal planes. *Clin Nucl Med* 2000;25(8):596-602.

Jakab R, Harada N, Naftolin F. Aromatase-(estrogen synthetase) immunoreactive neurons in the rat septal area. A light and electron microscopic study. *Brain Res* 1994; 664(1-2):85-93.

Kennedy C, Des Rosiers M, Sakurada O, Shinohara M, Reivich M, Jehle J, Sokoloff L. Metabolic mapping of the primary visual system of the monkey by means of the autoradiographic [¹⁴C]deoxyglucose technique. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73(11):4230-4.

Kolodny E. Gaucher disease: The neurological examination. In: Grabowsky G (Ed). *Gaucher disease: Basic & clinical perspectives*. Future Medicine Ltd, London 2013. pp.51-61.

Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985;54:631-64.

Lachmann R, Grant I, Halsall D, Cox T. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher disease. *QJM* 2004; 97(4) 199–204.

Lakočević M, Platiša M, Šumarac Z, Suvajdžić D, Mačukanović L, Petakov M. Peripheral neural response and sex hormones in type 1 Gaucher disease. *J Med Biochem* 2019;38:1-5. DOI: 10.2478/jomb-2019-0020

LaMarca M, Goldstein M, Tayebi N, Arcos-Burgos M, Martin B, Sidransky E. A novel alteration in metaxin 1, F202L, is associated with N370S in Gaucher disease. *J Hum Genet* 2004;49(4): 220-2.

Lenroot R, Gogtay N, Greenstein D, Wells E, Wallace G, Clasen L, Blumenthal J, Lerch J, Zijdenbos A, Evans A, Thompson P, Giedd J. Sexual dimorphism of brain developmental trajectories during childhood and adolescence. *Neuroimage* 2007;36(4):1065-73.

Logothetis N, Wandell B. Interpreting the BOLD signal. *Annu Rev Physiol* 2004;66:735-69.

Long G, Winfield S, Adolph K, Ginns E, Bornstein P. Structure and organization of the human metaxin gene (MTX) and pseudogene. *Genomics* 1996;33(2):177-84.

Maor G, Filocamo M, Horowitz M. ITCH regulates degradation of mutant glucocerebrosidase: implications to Gaucher disease. *Hum Mol Genet* 2013;22(7):1316-27.

Marques A, Saftig P. Lysosomal storage disorders - challenges, concepts and avenues for therapy: beyond rare diseases. *J Cell Sci* 2019;132(2). pii: jcs221739. doi: 10.1242/jcs.221739

Martínez-Menárguez J, Geuze H, Slot J, Klumperman J. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 1999;98(1):81-90.

McNeill A, Magalhaes J, Shen C, Chau K, Hughes D, Mehta A, Foltynie T, Cooper J, Abramov A, Gegg M, Schapira A. Ambroxol improves lysosomal biochemistry in glucocerebrosidase mutation-linked Parkinson disease cells. *Brain* 2014;137(Pt 5):1481-95.

Melcangi R, Cavarretta I, Ballabio M, Leonelli E, Schenone A, Azcoitia I, Miguel Garcia-Segura L, Magnaghi V. Peripheral nerves: a target for the action of neuroactive steroids. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;48(2):328-38.

Melcangi R, Garcia-Segura L, Mensah-Nyagan A. Neuroactive steroids: state of the art and new perspectives. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(5):777-97.

Melcangi R, Giatti S, Pesaresi M, Calabrese D, Mitro N, Caruso D, Garcia-Segura L. Role of neuroactive steroids in the peripheral nervous system. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:104.

Merzenich M, Kaas J, Wall J, Sur M, Nelson R, Felleman D. Progression of change following median nerve section in the cortical representation of the hand in areas 3b and 1 in adult owl and squirrel monkeys. *Neuroscience* 1983;10(3): 639-65.

Michelakakis H, Spanou C, Kondyli A, Dimitriou E, Van Weely S, Hollak C, Van Oers M, Aerts J. Plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in Gaucher disease. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1317(3):219-22.

Micseny M, Walkley S. The lysosomal system: Physiology and pathology. In: Mehta A, Winchester B (Eds). *Lysosomal storage disorders*. Wiley-Blackwell, Oxford 2012, pp. 3-12.

Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur T.; French Type 2 Gaucher Disease Study Group. Type 2 Gaucher disease: 15 new cases and review of the literature. *Brain Dev* 2006;28(1):39-48.

Mignot C, Gelot A, Billette de Villemeur T. Gaucher disease. In: *Handbook of clinical neurology*. Elsevier, 2013, pp. 1709-15.

Mistry P, Liu J, Sun L, Chuang W, Yuen T, Yang R, Lu P, Zhang K, Li J, Keutzer J, Stachnik A, Mennone A, Boyer J, Jain D, Brady R, New M, Zaidi M. Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(13):4934-9.

Miyamoto M, Goodman M. DNA systematics and evolution of primates. *Annu Rev Ecol Syst* 1990;21:197-220.

Moss D. β -D-Glucosidases in tissue. In: Bergmeyer H (Ed). *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press, Cambridge 2012, pp. 217-26.

Nadeau J. Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2001;2(3):165-74.

Naftolin F, Horvath T, Jakab R, Leranath C, Harada N, Balthazart J. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunohistochemical study on quali rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology* 1996;63(2):149-55.

Naftolin F, Ryan K, Petro Z. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab* 1971a;33(2):368-70.

Naftolin F, Ryan K, Petro Z. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human fetuses. *J Endocrinol* 1971b;51(4):795-96.

Naftolin F, Ryan K, Petro Z. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology* 1972;90(1):295-8.

Narita A, Shirai K, Itamura S, Matsuda A, Ishihara A, Matsushita K, Fukuda C, Kubota N, Takayama R, Shigematsu H, Hayashi A, Kumada T, Yuge K, Watanabe Y, Kosugi S, Nishida H, Kimura Y, Endo Y, Higaki K, Nanba E, Nishimura Y, Tamasaki A, Togawa M, Saito Y, Maegaki Y, Ohno K, Suzuki Y. Ambroxol chaperone therapy for neuronopathic Gaucher disease: A pilot study. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3(3):200-15.

Nelson S, Turrigiano G. Strength through diversity. *Neuron* 2008;60(3):477-82.

Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E, Reches A, Bembi B, Zimran A. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 1996;89(9):691-4.

Ogawa S, Sung Y. Selected Topics Relating to Functional MRI Study of the Brain. *Keio J Med* 2019. doi: 10.2302/kjm.2018-0011-OA.

Parodi A. Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 2000;69:69-93.

Pasmanik-Chor M, Elroy-Stein O, Aerts H, Agmon V, Gatt S, Horowitz M. Overexpression of human glucocerebrosidase containing different-sized leaders. *Biochem J* 1996;317 (Pt 1):81-8.

Patterson M, Horowitz M, Abel R, Currie J, Yu K, Kaneski C, Higgins J, O'Neill R, Fedio P, Pikus A. Isolated horizontal supranuclear gaze palsy as a marker of severe systemic involvement in Gaucher's disease. *Neurology* 1993;43(10):1993-7.

Penny W, Friston K, Ashburner J, Kiebel S, Nichols T (Eds). *Statistical parametric mapping: The analysis of functional brain images*. Academic Press, Cambridge 2006.

Perretti A, Parenti G, Balbi P, Titomanlio L, Marcantonio L, Iapoce M, Frascogna A, Generoso A, Santoro L. Study of multimodal evoked potentials in patients with type 1 Gaucher's disease. *J Child Neurol* 2005; 20(2):124-8.

Peterson R, Yarram L, Schlinger B, Saldanha C. Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proc Biol Sci* 2005;272(1576):2089-96.

Platt F, d'Azzo A, Davidson B, Neufeld E, Tiffit C. Lysosomal storage diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4(1):27. doi: 10.1038/s41572-018-0025-4.

Raichle M. A paradigm shift in functional brain imaging. *J Neurosci* 2009;29(41):12729-34.

Reczek D, Schwake M, Schröder J, Hughes H, Blanz J, Jin X, Brondyk W, Van Patten S, Edmunds T, Saftig P. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell* 2007;131(4):770-83.

Remage-Healey L, Saldanha C, Schlinger B. Estradiol synthesis and action at the synapse: evidence for synaptocrine signaling. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011;2:28.

Roshan Lal T, Sidransky E. The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease. *Diseases* 2017;5(1). pii: E10. doi: 10.3390/diseases5010010.

Saldanha C, Remage-Healey L, Schlinger B. Synaptocrine signaling: steroid synthesis and action at the synapse. *Endocr Rev* 2011;32(4):532-49.

Saldanha C, Rohmann K, Coomaringam L, Wynne R. Estrogen provision by reactive glia decreases apoptosis in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neurobiol* 2005;64(2):192-201.

Santamaria R, Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Dominissini S, Grossi S, Sánchez-Ollé G, Chabás A, Pittis M, Filocamo M, Vilageliu L, Grinberg D. Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat* 2008;29(6):E58-67.

Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina D, Valenza M, Gennarino V, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk R, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* 2009;325(5939):473-7.

Schonauer S, Körschen HG, Penno A, Rennhack A, Breiden B, Sandhoff K, Gutbrod K, Dörmann P, Raju DN, Haberkant P, Gerl MJ, Brügger B, Zigdon H, Vardi A, Futerman AH, Thiele C, Wachten D. Identification of a feedback loop involving β -glucosidase 2 and its product sphingosine sheds light on the molecular mechanisms in Gaucher disease. *J Biol Chem*. 2017;292(15):6177-6189.

Schröder M, Kaufman R. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005;569(1-2):29-63.

Schwake M, Schröder B, Saftig P. Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic* 2013;14(7):739-48.

Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F. Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci*. 2004; 27(8):489-95.

Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol* 2012;11(11):986-98.

Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder. *Mol Genet Metab* 2004;83(1-2):6-15.

Smith M, Ploegh H, Weissman J. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* 2011;334(6059):1086-90.

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M. The [14C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 1977;28(5):897-916.

Sokoloff L. Energetics of functional activation in neural tissues. *Neurochem Res* 1999;24(2):321-9.

Sokoloff L. Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981;1(1):7-36.

Song W, Wang F, Savini M, Ake A, Di Ronza A, Sardiello M, Segatori L. TFEB regulates lysosomal proteostasis. *Hum Mol Genet* 2013;22(10):1994-2009.

Sorge J, West C, Kuhl W, Treger L, Beutler E. The human glucocerebrosidase gene has two functional ATG initiator codons. *Am J Hum Genet* 1987;41(6):1016-24.

Sousa M, Ferrero-Garcia M, Parodi A. Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* 1992;31(1):97-105.

Straniero L, Rimoldi V, Samarani M, Goldwurm S, Di Fonzo A, Krüger R, Deleidi M, Aureli M, Soldà G, Duga S, Asselta R. The *GBAP1* pseudogene acts as a ceRNA for the glucocerebrosidase gene *GBA* by sponging miR-22-3p. *Sci Rep* 2017;7(1):12702. doi: 10.1038/s41598-017-12973-5

Šumarac Z. Primena biomarkera u dijagnostikovanju i praćenju terapijskog odgovora kod Goševove bolesti. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Beograd 2012. pp.77-85.

Takahashi K, Bergström M, Frändberg P, Vesström E, Watanabe Y, Långström B. Imaging of aromatase distribution in rat and rhesus monkey brains with [¹¹C]vorozole. *Nucl Med Biol* 2006;33(5):599-605.

Tamargo R, Velayati A, Goldin E, Sidransky E. The role of saposin C in Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2012;106(3):257-63.

Tayebi N, Park J, Madike V, Sidransky E. Gene rearrangement on 1q21 introducing a duplication of the glucocerebrosidase pseudogene and a metaxin fusion gene. *Hum Genet* 2000;107(4): 400-3.

Tayebi N, Stubblefield B, Park J, Orvisky E, Walker J, Lamarca M, Sidransky E. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: Implications for complexity in Gaucher disease. *Am J Hum Genet* 2003;72(3):519-34.

Turrigiano G, Leslie K, Desai N, Rutherford L, Nelson S. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* 1998;391(6670):892-6.

Turrigiano G. The dialectic of Hebb and homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2017;372(1715). pii: 20160258

Tylki-Szymańska A, Vellodi A, El-Beshlawy A, Cole JA, Kolodny E. Neuronopathic Gaucher disease: demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. *J Inherit Metab Dis* 2010;33(4):339-46.

Varrone A, Asenbaum S, van der Borght T, Booij J, Nobili F, Någren K, Darcourt J, Kapucu O, Tatsch K, Bartenstein P, van Laere K; European Association of Nuclear Medicine Neuroimaging Committee. EANM procedure guidelines for PET brain imaging using [¹⁸F]FDG, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009;36(12):2103-10.

Velayati A, De Paolo J, Gupta N, Choi J, Moaven N, Westbroek W, Goker-Alpan O, Goldin E, Stubblefield BK, Kolodny E, Tayebi N, Sidransky E. A mutation in SCARB2 is a modifier in Gaucher disease. *Hum Mutat* 2011;32(11):1232-8.

Walkley S. Pathogenic cascades in lysosomal disease – Why so complex? *J Inherit Metab Dis* 2009; 32(2):181-9.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011;334(6059):1081-6.

Wenger D, Williams C. Screening for lysosomal disorders. In: Hommes F (Ed). *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. Wiley-Liss, New York 1991, pp. 587-617.

Wild K, Weichenrieder O, Strub K, Sinning I, Cusack S. Towards the structure of the mammalian signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*. 2002;12(1):72-81.

Winchester B. Classification of lysosomal storage diseases. In: Mehta A, Winchester B (Eds). *Lysosomal storage disorders*. Wiley-Blackwell, Oxford 2012, pp. 37-46.

Winfield S, Tayebi N, Martin B, Ginns E, Sidransky E. Identification of three additional genes contiguous to the glucocerebrosidase locus on chromosome 1q21: Implications for Gaucher disease. *Genome Res* 1997;7(10):1020-6.

Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg G, Wakefield L, Morrison A, Lwin A, Colegial C, Allman J, Schiffmann R. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2004;82(3):192-207.

Wynne R, Saldanha C. Glial aromatization decreases neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*): influence on apoptosis. *J Neuroendocrinol* 2004;16(8):676-83.

Yague J, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, De Felipe J, Garcia-Segura L, Azcoitia I. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience* 2006;138(2):389-401.

Yildiz Y, Hoffmann P, Vom Dahl S, Breiden B, Sandhoff R, Niederau C, Horwitz M, Karlsson S, Filocamo M, Elstein D, Beck M, Sandhoff K, Mengel E, Gonzalez M, Nöthen M, Sidransky E. Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:151.

Yildiz Y, Matern H, Thompson B, Allegood J, Warren R, Ramirez D, Hammer R, Hamra F, Matern S, Russell D. Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility. *J Clin Invest* 2006;116(11):2985-94.

Zhang Q, Wang R, Tang H, Dong Y, Chan A, Sareddy G, Vadlamudi R, Brann D. Brain-derived estrogen exerts anti-inflammatory and neuroprotective actions in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol* 2014;389(1-2):84-91.

Zunke F, Andresen L, Wessler S, Groth J, Arnold P, Rothaug M, Mazzulli J, Krainc D, Blanz J, Saftig P, Schwake M. Characterization of the complex formed by β -glucocerebrosidase and the lysosomal integral membrane protein type-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113(14):3791-6.

СПИСАК СКРАЋЕНИЦА

β Г – β -гликоцереброзидаза

ГБ1 – Гошева болест типа 1

ЕР – ендоплазмички ретикулум

ГК – Голџи комплекс

ПЕТ – позитронска емисиона томографија

СПМ – статистичко параметарско мапирање

ССЕП – соматосензорни евоцирани потенцијали

^{18}F -ФДГ – ^{18}F -флуорозезоксигликоза

фМР – функционална магнетна резонанција

ЦНС – централни нервни систем

ATF6 – activating transcription factor 6

BiP – binding immunoglobulin protein

BOLD – blood oxygenation level dependent (imaging)

CLEAR – coordinated lysosomal expression and regulation (elements)

COP-II – coat protein complex II

ERAD – endoplasmic-reticulum-associated protein degradation

IRE1 – inositol-requiring enzyme 1

LIMP-2 – лизозомски интегрални мембрански протеин типа 2

MTR – magnetization transfer ratio

PERK – double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase

PCR – polymerase chain reaction

RIA – radioimmunoassay

SPECT – single photon computed tomography

UPR – unfolded protein response

БИОГРАФИЈА

Милан Лакочевић дипломирао је на Медицинском факултету у Београду са средњом оценом осам и по, магистрирао из области молекуларне неурогенетике, волонтерски специјализовао неурологију. У току основних студија освојио је награду „Академик Беровић“ за клиничко-експериментални рад из интерне медицине, био члан Савета Медицинског факултета, био организатор конгреса истраживачких радова студената медицине. У току последипломских студија је са резултатима оригиналних научних истраживања учествовао на светским и европским конгресима неурологије, биолошке психијатрије и ендокринологије, превео Оксфордски уџбеник психијатрије и један је од преводаца Харисоновог уџбеника интерне медицине. На Клиници за ендокринологију, дијабетес и болести метаболизма ради на дијагностици и терапији Гошеове болести. Усавршавао се код професора Зимрана на Клиници за Гошеову болест Клиничког центра Shaare Zedek (Капија правде) у Јерусалиму. Редован је учесник међународних научних скупова у свету о болестима накупљања у лизосомима, Гошеовој болести и Фабријевој болести.

Изјава о ауторству

Потписани Милан Б. Лакчевић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ПРОЦЕНА СТРУКТУРНИХ И ФУНКЦИОНАЛНИХ ПРОМЕНА НЕРВНОГ СИСТЕМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ГОШЕОВОМ БОЛЕШЋУ ТИПА 1

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати исправно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2019.

Милан Б. Лакчевић

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Милан Б. Лакочевић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада:

**ПРОЦЕНА СТРУКТУРНИХ И ФУНКЦИОНАЛНИХ ПРОМЕНА НЕРВНОГ
СИСТЕМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ГОШЕОВОМ БОЛЕШЋУ ТИПА 1**

Ментор: Академик Владимир Костић

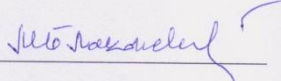
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме и датум одбране рада.

Ови подаци могу се објавити на мрежним станицама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2019.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ПРОЦЕНА СТРУКТУРНИХ И ФУНКЦИОНАЛНИХ ПРОМЕНА НЕРВНОГ СИСТЕМА КОД ПАЦИЈЕНАТА СА ГОШЕОВОМ БОЛЕШЋУ ТИПА 1

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију дату на чување у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2019.

