

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Nikola D. Kresojević

**UČESTALOST I SPECIFIČNOST ISPOLJAVANJA  
PARKINSONOVE BOLESTI KOD HOMOZIGOTNIH I  
HETEROZIGOTNIH NOSILACA MUTACIJE GENA ZA  
GLUKOCEREBROZIDAZU**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Nikola D. Kresojević

**FREQUENCY AND SPECIFICITY OF PARKINSON'S DISEASE  
AMONG HOMOZYGOUS AND HETEROZYGOUS CARRIERS  
OF MUTATIONS IN GLUCOCEREBROSIDASE GENE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

## INFROMACIJE O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE

Mentor:

Akademik prof. dr Vladimir Kostić, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

prof. dr Tatjana Pekmezović, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

1. prof. dr Marina Svetel, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. prof. dr Ivana Novaković, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. prof. dr Marija Žarkov, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

datum odbrane: \_\_\_\_\_

*Naumu*

*Beskrajnu zahvalnost dugujem prof. dr Vladimir Kostiću, na prilici da budem deo tima koga čine vrsni naučnici i neurolozi i iznad svega izvanredni ljudi. Hvala Vam na inspiraciji, razumevanju, podršci, znanju koje ste nesebično delili sa mnom i hvala Vam na strpljenju.*

*Zahvaljujem se prof. dr Tatjani Pekmezović na nesebičnoj stručnoj i tehničkoj pomoći tokom osnovnih i doktorskih studija i prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Prof. Marini Svetel i doc. dr Nataši Dragašević se zahvaljujem zbog prvih uzbudljivih susreta sa neurologijom. Izrada ove doktorske disertacije samo je mali deo naučno-istraživačke avanture koja je započela još u studentskim danima. Hvala Vam što ste mi podrška još od tada, već deset godina.*

*Dr Aleksandri Tomić se zahvaljujem na društvu u zajedničkim istraživačkim interesovanjima koja su započela sa prvim srednjoškolskim danima. Bez nje bi putovanje kroz svet nauke bilo nepotpuno.*

*Ass. dr Igoru Petroviću, dr Milici Ječmenici Lukić i dr Ivi Stanković zahvaljujem na bezrezervnoj stručnoj i prijateljskoj podršci.*

*Zahvaljujem se Valeriji Dobričić, Mileni Janković, prof. dr Ivani Novaković, ass. dr Vladani Marković, ass. dr Tanji Stojković, dr Saši Radovanoviću, dr Milanu Lakočeviću, dr Stojanu Periću, dr Miliji Mijajlović, dr Aleksandri Pavlović, dr Leposavi Brajković, ass. dr Gorani Mandić i prof. dr Elki Stefanovoj na pomoći u sakupljanju, obradi i analizi rezultata ovog istraživanja.*

*Zahvaljujem se ispitanicima koji su pristali da učestvuju u ovoj studiji.*

*Zahvaljujem se mojoj porodici i prijateljima na razumevanju, strpljenju i podršci.*

## Sažetak

Uvod: Nedavno je otkriveno da nosioci mutacija u genu za glukocerebrozidazu (*GBA*), kako u homozigotnom stanju, kod pacijenata koji imaju Goševu bolest (GB), tako i kod heterozigotnih nosilaca ove mutacije, imaju veću šansu da obole od Parkinsonove bolesti (PB). Prema literaturnim podacima, klinička slika Parkinsonove bolesti kod nosilaca mutacije u *GBA* genu, slična je fenotipu sporadične forme.

Ciljevi: Utvrđivanje učestalosti *GBA* mutacija u grupi pacijenata sa PB u Srbiji i karakterizacija genotipa. Određivanje specifičnosti kliničkog ispoljavanja PB kod heterozigotnih i homozigotnih nosilaca *GBA* mutacija i utvrđivanje genotipsko-fenotipske korelacije. Utvrđivanje neuroimidžing karakteristika PB pacijenata sa *GBA* mutacijama, zdravih nosilaca *GBA* mutacija i pacijenata sa GB.

Materijal i metode: Analiza egzona 8-11 *GBA* gena obavljena je kod 644 PB pacijenta i 368 zdravih kontrola. Pored toga, pregledano je 18 pacijenata sa GB i njihovih 14 srodnika prvog stepena koji su obavezni nosioci *GBA* mutacija. Nakon određivanja *GBA* statusa i prisustva PB kod ovih ispitanika, formirane su grupe za dalju analizu. Dizajn po tipu studije preseka korišćen je za računanje odnosa šansi prisustva *GBA* mutacije u ispitivanim grupama, kao i za utvrđivanje osnovnih kliničkih karakteristika PB kod nosilaca *GBA* mutacija. Dizajn po tipu studije slučajeva i kontrola korišćen je za utvrđivanje nemotornih karakteristika kao i imidžing razlika kod PB udružene sa *GBA* mutacijama u poređenju sa sporadičnom PB (bez mutacija u *GBA* genu, sPB). Ekstenzivna testiranja za procenu kognitivnih, bihevioralnih, motornih i nemotornih karakteristika uključile su: Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS), Hoehn i Yahr stadijum PB, Mini Mental State Examination (MMSE), Hamiltonovu skalu depresivnosti, Hamiltonovu skalu anksioznosti, Bekovu skalu za depresiju, skalu apatije, upitnik nemotornih simptoma, Adenbruksovo kognitivno ispitivanje i Bostonski test nominacije. Pregled mozga je obavljen na aparatu za magnetnu rezonanciju (MR) jačine 1,5 T. Na snimcima je određivano ukupno opterećenje hiperintenznim lezijama bele mase, zapremina sive mase mozga pomoću morfometrije zasnovane na vokselu i analiza puteva bele mase metodom difuzionog tenzorskog imidžinga. Transkranijalna sonografija mozga (TKS) korišćena je za analizu struktura srednje linije moždanog stabla. Kod zdravih nosilaca *GBA* mutacije, bez jasnih znakova PB, urađen je DaT-SPECT u cilju utvrđivanja premotorne faze PB.

Rezultati: Mutacije u *GBA* genu značajno češće postoje kod PB pacijenta (6,52%) nego kod kontrola- (1,36%) (OR=5,07; CI=1,99-12,92; p=0,00017). Ukupno je detektovano 17 različitih promena u egzonima 8-11 *GBA* gena, uključujući mutacije u homozigotnom, heterozigotnom ili kombinovanom heterozigotnom stanju. Detektovani su rekombinantni aleli, polimorfizmi i tihe varijante. Tri najučestalije mutacije (N370S, D409H i RecNcil) zajedno su činile skoro ¾ detektovanih mutacija u *GBA* genu (72%). Početak PB bio je u proseku u 53. godini nezavisno od prisustva *GBA* mutacije. Nosioци „teške“ *GBA* mutacija imali su statistički značajno raniji početak PB nego nosioци „lake“ *GBA* mutacije. Grupa PB pacijenata sa *GBA* mutacijom nije se statistički značajno razlikovala od PB grupe bez *GBA* mutacije po polnoj distribuciji, godinama u trenutku pregleda, dužini trajanja PB, pozitivnoj porodičnoj anamnezi za postojanje PB i terapijskom odgovoru na L-dopu. Najčešći inicijalni simptom PB, nezavisno od *GBA* statusa, bio je jedan od kardinalnih simptoma PB. Bol je bio češći inicijalni simptom kod nosilaca *GBA* mutacije. U trenutku pregleda, najveći broj ispitanika imao je asimetričan parkinsonizam sa sličnim motornim fenotipom, nezavisno od *GBA* statusa. Diskinezije i frizing hoda su bili statistički značajno češći kod pacijenata sa *GBA* mutacijom. Ispitivanjem kognitivnih funkcija uočeno je da PB pacijenti sa *GBA* mutacijama češće imaju kognitivni deficit, ali bez statistički značajne razlike u poređenju sa PB pacijentima bez *GBA* mutacija. Trend statističke značajnosti postojao je za subkor za jezik Adenbruksove skale, a značajna razlika pokazana je na Bostonskom testu nominacije, na štetu nosilaca *GBA* mutacija. *GBA* genotip nije uticao na učestalost prisustva halucinacija i apatije. Ispitivanje prisustva depresije i anksioznosti ostaje nekonkluzivno. Profil nemotornih simptoma nije se razlikovao kod PB pacijenata u zavisnosti od *GBA* statusa, sem za preteranu dnevnu pospanost i gubitak interesovanja, koji su bili češći u grupi sa *GBA* mutacijom. Ispitivanje odnosa PB i mutacija u *GBA* genu TKSom, ukazao je da je aSNmax vrednost kod PB pacijenata koji su homozigotni i heterozigotni nosioци mutacije u *GBA* genu skoro identična kao kod kontrolne PB grupe bez *GBA* mutacija. MR ispitivanje ukazuje da kod PB pacijenata nosilaca *GBA* mutacije postoji poremećen obrazac alteracija bele mase, uključujući inerhemisferične i frontalne kortiko-kortikalne konekcije, kao i da ne postoji značajna atrofija sive mase mozga. Kod dva zdrava nosioца mutacije u *GBA* genu dokazana je premotorna faza PB.

Zaključci: Mutacije u *GBA* genu su značajan genetski faktor rizika za PB u populaciji ispitanika iz Srbije. Klinička slika PB udružene sa *GBA* mutacijama je veoma slična sporadičnoj PB i obuhvata asimetričan parkinsonizam sa dobrim terapijskim odgovorom na L-dopu. Diskinezije, frizing hoda i poremećaj nominacije, moguće je da su češći kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama. TKS ukazuje da kod PB udružene sa *GBA* mutacijama postoji tipičan nalaz za PB, nezavisno od *GBA* statusa, dok se MR pregledom detektuju promene u beloj masi.

## KLJUČNE REČI

Parkinsonova boleť (PB), glukocerebrozidaza (GC-aza), Gošeoġa boleť (GB), biheġvioralni poremećaji, kognitivni poremećaj, nemotorni simptomi, magnetna rezonanca (MR), transkranijalna sonografija (TKS), morfometrija zasnovana na vokselu (VBM), difuzioni tenzorski imidŷing (DTI)



## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** It was found recently that homozygous carriers of mutations in the gene encoding for glucocerebrosidase (*GBA*)- Gaucher's disease (GD) patients, and heterozygous carriers of *GBA* mutations, are in greater risk to develop Parkinson's disease (PD). According to literature, clinical presentation of such PD is similar to that in sporadic PD.

**Goals:** To estimate *GBA* mutation frequency among PD patients in Serbia and to determine *GBA* genotype. To determine clinical presentation of PD patients who are heterozygous or homozygous carriers of *GBA* mutations and to determine genotype-phenotype correlation. To determine neuro-imaging characteristics PD patients with *GBA* mutations, GD patients and healthy carriers of *GBA* mutations.

**MATERIAL AND METHODS:** Sequencing of exons 8-11 of *GBA* gene was performed on 644 PD patients and 368 healthy controls. Also, 18 GD patients and 14 of their first degree relatives, who are obligate carriers of *GBA* mutation, were included. After determining *GBA* status and the presence of PD signs, adequate groups were formed for further analysis. Cross-sectional study was used to determine odds ratio for presence of *GBA* mutations among PD patients and their basic clinical characteristics comparing to healthy controls. Case control study design was used for analysis of non-motor characteristics and imaging differences in between PD groups with and without *GBA* mutations. Motor, non-motor, cognitive and behavioral characteristics were assessed using Unified Parkinson Disease Rating Scale, Hoehn and Yahr scale, Mini Mental State Examination, Hamilton depression scale, Hamilton anxiety scale, Beck depression inventory, Apathy scale, Non-motor symptoms questionnaire, Addenbrooks cognitive examination and Boston naming test. MRI analysis was obtained with 1.5 T. Images were used for analysis of the white matter hyperintense lesions load, grey matter volume using voxel-based morphometry (VBM) and assessment of white matter tracts with diffusion tensor imaging (DTI). Transcranial sonography (TCS) was used for analysis of the brainstem midline structures. DaT-SPECT was performed in healthy *GBA* carriers without definite parkinsonism in order to detect premotor phase of PD.

**RESULTS:** *GBA* mutations are more frequent among PD patients (6.52%) than among controls (1.36%) (OR=5.07; CI=1.99-12.92; p=0.00017). Seventeen different changes were detected in exons 8-11 of *GBA* gene in homozygous, heterozygous or compound heterozygous state, including mutations, recombinant alleles, polymorphisms and silent variants. N370S, D409H and RecNcil were the three most frequent and

together represented  $\frac{3}{4}$  of all detected mutations (72%). Mean PD onset was at 53 years, regardless of *GBA* status. Those carrying severe *GBA* mutations had earlier PD onset comparing to carriers of mild *GBA* mutations. Groups of PD patients with and without *GBA* mutations did not differ regarding sex, age at examination, disease duration, family history for PD and L-dopa therapeutic response. First PD symptom was one of cardinal PD symptoms, regardless of the *GBA* status. Pain was more frequent finding as an initial symptom among *GBA* carriers. Most of the patients had asymmetric parkinsonism with similar motor phenotype regardless of the *GBA* status. L-dopa induced dyskinesias and freezing of gait were more frequent among patients with *GBA* mutations. PD patients with *GBA* mutations more frequently have cognitive decline comparing to those PD patients without *GBA* mutations, however, without statistical significance. The *GBA* carriers had a statistical trend for lesser subscore for language of Addenbrooke's cognitive examination and also had a significantly lower score on the Boston naming test. The *GBA* mutations did not have an influence on hallucinations and apathy frequency. Results of depression and anxiety testings remain inconclusive. Profile of non-motor symptoms did not differ among PD patients with and without *GBA* mutations, with an exception for loss of interest and difficulties to stay awake during daily activities that were more frequent among *GBA* carriers. The most important TCS finding was that aSNmax value was almost identical when comparing homozygous carriers with PD, heterozygous carriers with PD and sporadic PD group. MRI examination showed altered pattern in white matter, including interhemispheric and frontal cortico-cortical connections, while gray matter atrophy was not detected.

Conclusions: *GBA* mutations are a genetic risk factor for PD among the Serbian population. Clinical characteristics of *GBA* related PD is very similar to sporadic PD and includes asymmetric parkinsonism with a good response to L-dopa therapy. Dyskinesias, freezing of gait and nomination abnormalities are more frequent among PD patients with *GBA* mutations then those without *GBA* mutations. TCS revealed that *GBA* related PD patients have typical TCS findings while MRI showed white matter abnormalities.

#### KEY WORDS

Parkinson's disease (PD), glucocerebrosidase (GC-ase), Gaucher's disease (GD), behavior, cognitive impairment, non-motor symptoms, magnetic resonance imaging (MRI), voxel-based morphometry (VBM), diffusion tensor imaging (DTI), transcranial sonography (TCS)

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Gošeova bolest.....	3
1.1.1. <i>GBA</i> gen.....	5
1.1.2. Enzim $\beta$ -glukocerebrozidaza .....	5
1.1.3. Patofiziologija Gošeove bolesti .....	6
1.1.4. Klinička slika Gošeove bolesti .....	7
1.1.5. Korelacija genotipa i fenotipa kod Gošeove bolesti .....	9
1.2. Parkinsonova bolest.....	10
1.2.1. Klinička slika Parkinsonove bolesti.....	10
1.2.1.1. Kardinalni znaci Parkinsonove bolesti.....	11
1.2.1.2. Ostale motorne manifestacije Parkinsonove bolesti .....	13
1.2.1.3. L-dopom indukovane motorne komplikacije .....	13
1.2.1.4. Nemotorne manifestacije Parkinsonove bolesti.....	14
1.2.2. Histopatologija Parkinsonove bolesti .....	17
1.2.3. Molekularne osnove Parkinsonove bolesti.....	18
1.2.3.1. Etiopatogeneza Parkinsonove bolesti.....	18
1.2.3.2. $\alpha$ -sinuklein.....	18
1.2.3.3. Čelijski putevi razgradnje proteina .....	19
1.2.3.3.1. Ubikvitin-proteazomski sistem (UPS).....	20
1.2.3.3.2. Autofagno- lizosomalni put (ALP) .....	22
1.2.3.4. Poremećaj autofagije u Parkinsonovoj bolesti .....	25
1.2.3.5. $\alpha$ -sinuklein i putevi autofagije .....	27
1.2.4. Lizosomalna disfunkcija i Parkinsonova bolest .....	28
1.2.5. Mehanizam nastanka Parkinsonove bolesti udružene sa mutacijama u <i>GBA</i> genu .....	29
1.3. Odnos Gošeove i Parkinsonove bolesti.....	31
1.3.1. Bolesti lizosomalnog deponovanja i Parkinsonova bolest .....	31
1.3.2. Rizici za nastanak PB kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca <i>GBA</i> mutacija .....	34
1.3.3. Gošeova bolest i Parkinsonova bolest .....	34
1.3.4. Heterozigotno nosilaštvo <i>GBA</i> mutacije i Parkinsonova bolest.....	36
1.3.5. Neuropatološki nalaz Parkinsonove bolesti udružene sa <i>GBA</i> mutacijama .....	37

1.4. Imidžing studije u Parkinsonovoj bolesti .....	37
1.4.1. Transkranijalna parenhimska sonografija mozga .....	38
1.4.2. Magnetna rezonanca .....	40
1.4.3 DaT-SPECT .....	42
2. CILJEVI .....	44
3. MATERIJAL I METODE .....	45
3.1. Ispitanici .....	45
3.2. Dizajn studije.....	46
3.2.1. Studija preseka.....	46
3.2.1.1. Identifikacija GBA mutacija kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću.....	46
3.2.1.2. Identifikacija znakova parkinsonizma kod GB pacijenata i njihovih srodnika.....	47
3.2.2. Definisanje grupa ispitanika na osnovu <i>GBA</i> genetskog statusa i prisustva znakova Parkinsonove bolesti.....	48
3.2.3. Molekularno-genetska analiza .....	50
3.2.3.1. Izolovanje genomske DNK iz limfocita periferne krvi .....	50
3.2.3.2. Lančana reakcija polimerizacija-PCR .....	51
3.2.3.3. Kapilarna elektroforeza.....	51
3.3. Studija slučajeva i kontola.....	53
3.3.1. Klinička ispitivanja.....	53
3.3.1.1. Testiranje motornih manifestacija Parkinsonove bolesti .....	53
3.3.1.2. Testiranje nemotornih manifestacija Parkinsonove bolesti .....	54
3.3.1.2.1. Neuropsihološko testiranje.....	54
3.3.1.2.2. Psihijatrijsko testiranje.....	55
3.3.2. Imidžing.....	56
3.3.2.1. Transkranijalna sonografija moždanog parenhima .....	56
3.3.2.2. Pregled na magnetnoj rezonanci - morfometrija zasnovana na vokselima i difuzioni tenzorski imidžing .....	57
3.3.2.2.1. Parametri MR pregleda i analiza rezultata .....	57
3.3.2.2.2. Promene u beloј masi .....	58
3.3.2.2.2.1. TBSS (Tract-based spatial statistics) analiza.....	58
3.3.2.2.2.2. Post Hoc analiza vrednosti FA traktova bele mase od interesa.....	59
3.3.2.2.3. Atrofija sive mase: morfometrija zasnovana na vokselima .....	59

3.3.3. Ispitivanje DaT-SPECT metodom.....	60
3.4. Statistička analiza podataka.....	62
4. REZULTATI .....	63
4.1. Genetski skrining.....	63
4.2. Kliničke karakteristike ispitivanih bolesnika .....	67
4.3. Transkranijalna sonografija moždanog parenhima .....	81
4.4. Rezultati pregleda na magnetnoj rezonanci .....	85
4.5. Identifikacija ispitanika u prekliničkoj fazi Parkinsonove bolesti među nosiocima <i>GBA</i> mutacije ..	91
5. DISKUSIJA .....	93
6. ZAKLJUČCI.....	122
7. LITERATURA .....	125

## 1. UVOD

Parkinsonova bolest (PB) je drugo po učestalosti neurodegenerativno oboljenje od koga u svetu boluje oko 6 miliona ljudi<sup>1</sup>. Kod PB javljaju se motorni poremećaji kao što su bradikinezija, tremor, rigidnost i posturalna nestabilnost, a osim njih i niz nemotornih manifestacija kao što su autonomna disfunkcija i kognitivni poremećaj<sup>1</sup>. U osnovi PB je progresivna degeneracija dopaminergičkih neurona ali i drugih monoaminergičkih ćelija moždanog stabla<sup>2</sup>, povećanje mikroglijalne aktivacije i akumulacija proteina u preživelim neuronima u vidu Levijevih tela (LT)<sup>3</sup>. Smatra se da abnormalna obrada proteina u ubikvitin-proteazomskom i lizozomno-autofagnom sistemu, oksidativni stres, mitohondrijalna i lizozomalna disfunkcija mogu uticati na pojavu PB<sup>1</sup>.

Prvi opis Parkinsonove bolesti (PB) potiče od Jamesa Parkinsona u kapitalnom delu „An Essay on the Shaking Palsy“ koji je objavljen 1817. godine<sup>4</sup>, dok su prvi opisi histopatoloških odlika neurodegenerativnih bolesti potekli od nemačkih neuropatologa pre nešto više od jednog veka<sup>5</sup>. Friederich Lewy je 1912. godine opisao karakteristične inkluzije u neuronima pacijenata obolelih od PB koje su kasnije nazvane „Levijeva tela“<sup>6</sup>. Elektronskom mikroskopijom, 1965. godine pokazano je da su LT sastavljena od filamenata<sup>7</sup>. Ipak, nije bilo jasno u kom stepenu i na koji način opisane promene učestvuju u procesu neurodegeneracije<sup>5</sup>. Korak bliže rešenju problema bili smo 1997. godine kada je pokazano da su LT kod PB pacijenata imuno-reaktivna na  $\alpha$ -sinuklein<sup>8</sup> a iste godine je po prvi put identifikovana mutacija u genu za  $\alpha$ -sinuklein kao uzročnik familijarne PB<sup>9</sup> što je potvrdilo ideju o direktnoj vezi ovog proteina i PB. U narednim godinama, sa pojavom modernih tehnologija kao što su sekvenciranje nove generacije (eng. next generation sequencing- NGS) i studije asocijacije u čitavom genomu (eng. genome wide association studies- GWAS), otkriveno je još nekoliko genetskih uzročnika i faktora podložnosti za PB<sup>10</sup>. Genetskim studijama do sada je pokazano da mutacije u 7 različitih gena dovode do pojave L-dopa responsivnog parkinsonizma (Tabela 1).

Slika 1. Levijeva prva ilustracija mikroskopskih promena kod paralysis agitans, kako je ranije nazivana Parkinsonova bolest. Iz Lewandowsky's Handbuch der Neurologie (1912). Prilagođeno prema referenci 6.

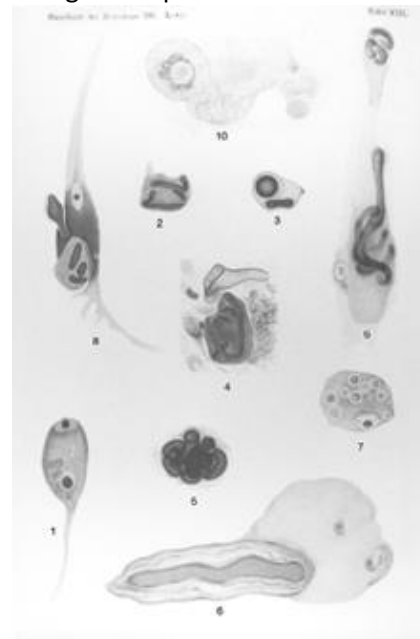


Tabela 1. Geni udruženi sa L-dopa responsivnim parkinsonizmom. Prilagođeno prema referenci 11.

	Patološki agregat	Komentar
<b>Parkinsonizam</b>		
<i>PARKIN</i>	degeneracija substancije nigre ali obično bez LT	Recesivno, rani početak
<i>PINK1</i>	nema podataka	Recesivno, rani početak
<i>DJ-1</i>	nema podataka	Recesivno, rani početak
<i>ATP13A2</i>	nema podataka	Recesivno, rani početak
<b>Parkinsonova bolest</b>		
$\alpha$ -sinuklein	LT	Najčešće tačkaste mutacije i duplikacije
<i>LRRK-2</i>	Obično LT	Dominante mutacije
<i>GBA</i>	LT	Povećan rizik

Legenda: *GBA*- glukocerebrozidaza; *LRRK-2*- leucine rich repeat kinase 2. *PINK1*- PTEN-induced putative kinase 1; LT- Levijeva tela.

Za sada najčešća poznata mutacija koja se može pronaći kod PB pacijenata je zapravo u *GBA* genu koji kodira za  $\beta$ -glukocerebrozidazu (GC-aza), enzim koji je deficijentan u Gošeovoj bolesti (GB). Veza GB i PB bila je na prvi pogled neočekivana jer je dugo vremena izmicala kako sofisticiranim genetskim analizama tako i epidemiološkom zapažanju<sup>12</sup>.

GB je prvi put opisana 1882. godine u doktorskoj tezi Phillipe Charles Ernest Gauchera, po kome je dobila ime pola veka kasnije<sup>13</sup>. Tek 1996. godine publikovan je prvi rad u kome je prikazano šest slučajeva sa tipom I GB, koji su obolevili od brzo progresivnog parkinsonizma ranijeg početka (prosečno u 48,8 godina) sa slabim odgovorom na antiparkinsonu terapiju<sup>14</sup>. Tri godine kasnije je opisan pacijent kod koga je pojava parkinsonizma 12 godina prethodila pojavi prvih simptoma GB, u vidu akutne leukopenije i trombocitopenije<sup>15</sup>. Međutim, sporadični opisi GB pacijenata sa nekim elementima parkinsonizma postojali su u literaturi i mnogo ranije. Verovatno da prvi takvi opisi datiraju iz 1939. godine kada su Van Bogaert i Froehlich opisali GB pacijenta sa rigiditetom na donjim ekstremitetima<sup>16</sup>, a za njima i Davidsonov opis bolesnika sa hipomimijom iz 1942. godine<sup>14</sup>.

Analiza *GBA* gena kod PB pacijenata prvi put je izvršena 2004. godine kada je pokazano da bi mutacije u ovom genu mogle biti faktor rizika za nastanak parkinsonizma<sup>17,18</sup>, a potom je potvrđena povećana incidencija PB među rođacima GB pacijenata, koji su obavezni nosioci *GBA* mutacije, što govori u prilog da čak i u heterozigotnom stanju ove mutacije predstavljaju faktor rizika za nastanak PB<sup>19</sup>. U populaciji Aškenazi Jevreja, čak 27,3% GB pacijenata je imalo rođaka sa PB u poređenju sa 12,3%

kontrola koje su imale rođaka sa PB<sup>19</sup>. Glavna potvrda povezanosti *GBA* i PB proistekla je iz multicentrične studije koja je uključila 5691 PB pacijenata i 4898 kontrola i koja je utvrdila da je odnos šansi (OR-eng. *odds ratio*) 5,43, za bilo koju *GBA* mutaciju kod PB pacijenata u odnosu na kontrole<sup>20</sup>.

Kompleksan odnos mutacija u *GBA* genu i sinukleinopatija ilustrovan je podatkom da je odnos šansi za *GBA* mutacije kod demencije sa Levijevim telima (DLT) još veći nego za PB i iznosi 8,28<sup>21</sup>. Međutim, *GBA* mutacije nisu povezane sa drugom sinukleinopatijom, multiplom sistemskom atrofijom<sup>22</sup>.

## 1.1. Gošeova bolest

Lizozomi sadrže oko 50-60 različitih solubilnih enzima i najmanje sedam membranskih proteina<sup>23</sup>. Mutacije u genima koji kodiraju za ove proteine uzrok su bolesti lizozomalnog deponovanja<sup>23</sup> kojih je do sada opisano više od 40<sup>24</sup>. Sve ove bolesti nastaju zbog deficijencije određenog lizozomalnog proteina, osim u par izuzetnih slučajeva gde postoji deficijencija nelizozomalnih proteina koji učestvuju u biosintezi lizozoma<sup>24</sup>. Zajednička osobina ovih bolesti je deponovanje supstrata unutar lizozoma na osnovu kojih je izvršena njihova klasifikacija<sup>24</sup> (Tabela 2). Većina bolesti lizozomalnog deponovanja se nasleđuje autozomno recesivno, sem Fabrijeve bolesti i mukopolisaharidoze tip II koje se nasleđuju X-vezano<sup>24</sup>.

GB nastaje zbog insuficijentne aktivnosti GC-aze uzrokovane mutacijom u *GBA* genu što dovodi do akumulacije glikozil ceramida, glavnog supstrata GC-aze<sup>25</sup>. GB je najčešća iz grupe bolesti lizozomalnog deponovanja<sup>25</sup>, javlja se panetnički sa učestalošću od 1:40000 do 1:50000 živorođenih, dok se u populaciji Aškenazi Jevreja javlja češće, 1:800 živorođenih<sup>25</sup>. Smatra se da u je u populaciji Aškenazi Jevreja svaka sedamnaesta osoba nosilac mutacije u *GBA* genu<sup>26</sup>.



Tabela 2. Klasifikacija bolesti lizozomalnog deponovanja. Prilagođeno prema referenci 27.

<b>Bolesti lizozomalnog deponovanja</b>		
<b>Mukopolisaharidoze (MPS)</b>		
MPS I	MPS II	MPS IIIA
MPS IIIB	MPS IIIC	MPS IIID
MPS IVA	MPS IVB	MPS VI
MPS VII		
<b>Glikoproteinoze</b>		
Aspartilglukozaminurija	Fukozidoza	$\alpha$ -manozidoza
$\beta$ -manozidoza	Mukolipidoza I (sijalidoza)	Schindler-ova bolest
<b>Sfingolipidoze</b>		
Fabrijeva bolest	Farberova bolest	Gošeova bolest
GM1 gangliozidoza	Tay-Sachs-ova bolest	Sandhoff-ova bolest
Krabbe-ova bolest	Metahromatska leukodistrofija	Niemann Pick-ova bolest tip A i B
<b>Druge lipidoze</b>		
Niemann Pick-ova bolest tip C	Wolman-ova bolest	Neuronalna ceroidna lipofuscinoza
<b>Bolest deponovanja glikogena</b>		
Bolest deponovanja glikogena tip II (Pompeova bolest)		
<b>Multipli enzimski deficiti</b>		
Multipla sulfatazna deficijencija	Galaktosijalidoza	Mukolipidoza II/III
Mukolipidoza IV		
<b>Defekt lizozomalnog transporta</b>		
Cistinoza	Bolest deponovanja sijalične kiseline	
<b>Druge bolesti u vezi sa defektom u lizozomanom proteinima</b>		
Danon-ova bolest	Deficijencija hijaluronidaze	

### 1.1.1. *GBA* gen

Gen koji kodira za glukocerebrozidazu (*GBA*) nalazi se na prvom hromozomu u regionu q21-q31<sup>28</sup>. Ovaj gen se sastoji od 11 egzona i 10 introna i obuhvata sekvencu od 7,6-kb<sup>29</sup>. Pseudogen (*GBAP*) dužine 5,7 kb nalazi se 16 kb nizvodno<sup>29</sup>. *GBA* i *GBAP* se podudaraju u sekvenci 96%. Ipak, neki delovi *GBA* ne postoje u *GBAP*, npr. *GBAP* u egzonu 9 ima deleciju 55 baznih parova<sup>29</sup>. Prisustvo pseudogena na istom lokusu važno je zbog mogućnosti rekombinacije između *GBA* i *GBAP*, što može rezultovati u mutacijama<sup>30</sup>. Identifikacija mutiranog *GBA* alela stoga može biti problematična, a prevazilazi se dizajni-ranjem prajmera koji razlikuju *GBA* i *GBAP*<sup>30</sup>.

U *GBA* genu opisano je preko 250 mutacija. Prema revijskom radu Hruska i saradnika<sup>30</sup> ove mutacije obuhvataju 203 mutacije promenjenog smisla (eng. *missense*) i 18 besmislenih (eng. *nonsense*) mutacija, 36 malih insercija ili delecija koje dovode do promena okvira čitanja (eng. *frameshift* ili *inframe* alteracija), 14 mutacija u mestu za iskrajanje egzona (eng. *splice junction* mutacije) i 13 kompleksnih alela koji imaju dve ili više mutacija *in cis*. Pored ovih, opisuju se i rekombinacije *GBA* i *GBAP* koje rezultiraju iz konverzije, fuzije ili duplikacije gena<sup>30</sup>. Prve dve opisane mutacije u literaturi, L444P<sup>31</sup> i N370S<sup>32</sup> i dalje su najprevalentnije u većini ispitivanih populacija<sup>30</sup>. Osim mutacija, u *GBA* genu opisano je i nekoliko različitih polimorfizama<sup>30</sup>.

### 1.1.2. Enzim $\beta$ -glukocerebrozidaza

Enzim GC-aza je lizosomalna hidrolaza vezana za membranu<sup>33</sup>. To je glikoprotein koji se sastoji od 497 aminokiselina, a nastaje obradom od prekursornog proteina tokom njegovog prolaska kroz membranu endoplazmatičnog retikuluma<sup>33</sup>. Novosintetisani enzim putuje do lizozoma nezavisno od manosa-6-fosfat i oligosaharidnog puta. Poluživot enzima, kada se nađe u lizozomu fibroblasta, je oko 60 sati, a glikolizacija je važna za njegovo preživljavanje<sup>33</sup>. GC-aza razgrađuje brojne glikozil-ceramide. Najvažniji prirodni supstrat je glikosfingolipid, glikozil ceramid, i u manjoj meri, njegov deacilovani analog, glikozil sfingozin. Poremećaj funkcije GC-aze dovodi do akumulacije ovih supstrata u određenim tkivima<sup>33</sup>. Površina membrane je važna za aktivnost enzima jer negativno naelektrisani fosfolipidi mogu da povećaju enzimsku aktivnost. Saposin C, protein od 80 aminokiselina, je prirodni aktivator GC-aze<sup>33</sup>. Deficit saposin C proteina, takođe dovodi do problema u razgradnji glikozil ceramida i pojave fenotipa sličnog GB<sup>34</sup>. Većina mutacija u *GBA* genu dovodi do promena u konformaciji proteina, a neke utiču i na samo aktivno mesto enzima, što u oba slučaja smanjuje katalitičku moć enzima<sup>33</sup>.

### 1.1.3. Patofiziologija Gošeove bolesti

Iako deficijencija enzima postoji u svim ćelijama tela, akumulacija glukocerebrozidaze u lizozomima se događa samo u makrofagima. Takvi makrofagi se nazivaju Gošeove ćelije (slika 2). Deficit funkcije makrofaga ne objašnjava sve karakteristike bolesti<sup>35</sup>.

Akumulacija glukocerebrozidaze može se, međutim, dogoditi u drugim ćelijama van lizozoma što dovodi do poremećaja produkcije drugih kompleksnih glikolipida (npr. glikosfingozina) koji se u velikim količinama može naći u slezini<sup>35</sup>.

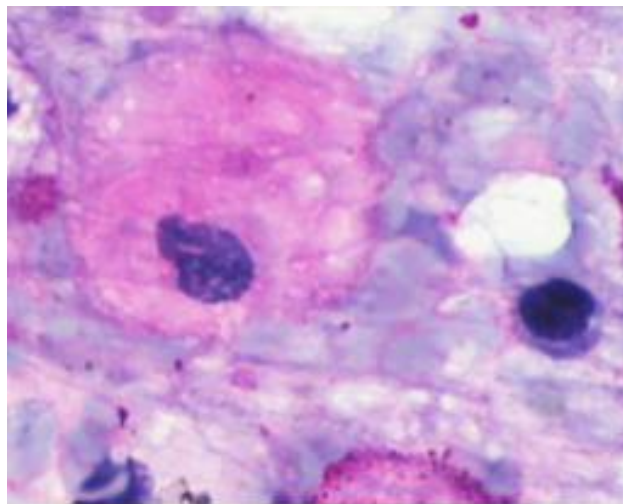
Postoje dve pretpostavke o patofiziološkom mehanizmu aktivacije makrofaga u GB:

1. prva je da je patološki inicijator prekomerna akumulacija glukozilceramida<sup>25</sup>. Sfingolipidi verovatno imaju ulogu u procesu inflamacije i apoptoze, a glikozilceramid deluje kao direktni aktivator makrofagne funkcije ili pojačava njihov efekat, verovatno putem disregulacije selektivnih kalcijumovih kanala<sup>25</sup>.
2. druga pretpostavka se odnosi na zauzimanje abnormalne konformacije mutiranog proteina tj. abnormalanog foldinga mutiranih proteina u endoplazmatičnom retikulumu, što može pokrenuti proces apoptoze ili inflamatorni odgovor u mnogim tkivima<sup>25</sup>.

Patogeneza u CNS-u je drugačija nego u visceralnim organima. U CNS-u dolazi do

smrti neurona, a masivna akumulacija glukozilceramida nije od kritičnog značaja<sup>25</sup>. Toksična reakcija na glikozilsfingozin je jedno objašnjenje, a drugo je uticaj glikozilceramida na abnormalan fluks kalcijuma u endoplazmatični retikulum koji bi mogao da dovede do oštećenja ćelije<sup>25</sup>. Potencijalni mehanizmi za nastanak PB udružene sa *GBA* mutacijama (*GBA-PB*), posebno će biti navedeni u tekstu kasnije.

Slika 2. Razmaz kostne srži sa *Periodic acid schiff* (PAS) pozitivnom Gošeovom ćelijom (x100; prilagođeno prema referenci 351.)



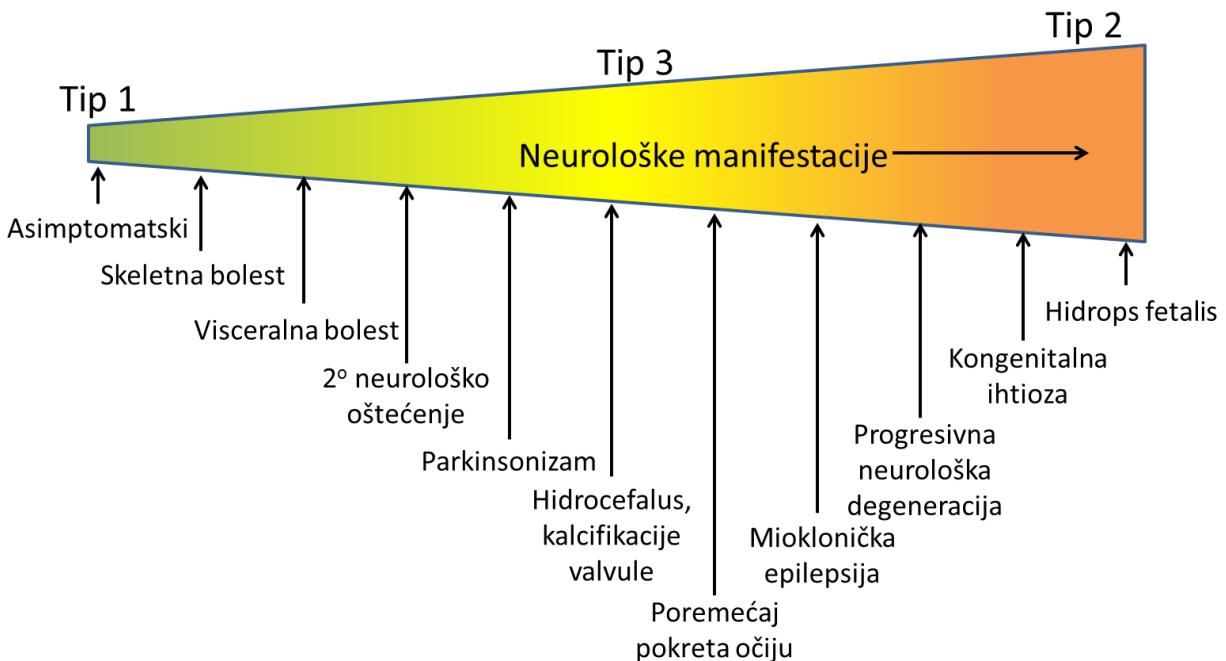
### 1.1.4. Klinička slika Gošeove bolesti

Klinička slika Gošeove bolesti veoma je varijabilna: od smrti in utero do asimptomatske<sup>36</sup>. Klasično, GB se deli na tri tipa u zavisnosti od afekcije i stepena progresije neuroloških simptoma<sup>36</sup>:

- Tip 1 - neneuropatska GB,
- Tip 2 - akutna neuropatska GB,
- Tip 3 - hronična neuropatska GB,

ali se može posmatrati i kao kontinuum fenotipa kao što je prikazano na slici 3.

Slika 3. Kontinuum fenotipa u GB. Prilagođeno prema referenci 36.



Tip 1 GB je najčešći oblik GB: u francuskom registru pacijenti sa GB tip 1 činili su 85%, tip 2 četiri procenta, tip 3 četiri procenta, dok su 6,9% činile perinatalne letalne forme<sup>37</sup>. Kod GB tip 1 postoji velika varijabilnost u kliničkoj prezentaciji i progresiji bolesti. Bolest može početi u bilo kom uzrastu, a ukoliko počne pre pete godine ima teži tok nego kod početka u odrasloj dobi<sup>13</sup>. Najčešći prvi simptomi i znaci su hepato-splenomegalija, anemija, trombocitopenija i bolovi u kostima<sup>13</sup>. Splenomegalija je znak koji najčešće ukazuje na pravu dijagnozu<sup>37</sup>. Kod pacijenata sa normalnom slezinom, trombocitopenija je izraženija nego anemija<sup>13</sup>. Hepatomegalija je skoro uvek prisutna, ali veoma se retko nalaze povišeni enzimi jetre ili neki drugi znaci hroničnog oboljenja jetre<sup>13</sup>. Kod pacijenata koji su splenektomisani može se javiti masivna hepatomegalija, kao i pogoršanje skeletnih manifestacija<sup>13</sup>. Skeletne manifestacije

obuhvataju osteoplastnu i osteoklastnu disfunkciju sa posledičnim problemima u remodelovanju kostiju, pojavu osteopenije, avaskularne nekroze i „koštanih kriza“ (periodi izraženih bolova u kostima)<sup>13</sup>. Deca sa GB tip 1 mogu imati usporen razvoj<sup>13</sup>. Plućne abnormalnosti se opisuju u GB tip 1 iako nisu izražene kao u druga dva tipa bolesti. U studiji Kerema i sardnika, veliki broj GB tip 1 pacijenata je imao subkliničke abnormalnosti na funkcionalnim testovima, a ukupno 68% je imalo neki poremećaj plućne funkcije<sup>38</sup>. Monoklonska gamopatija prisutna je kod oko 12% pacijenata, a često se sreće i poliklonska gama globulinemija<sup>37</sup>. Procenjeno je da je relativni rizik za nastanak multiplog mijeloma kod GB pacijenata 5,9. GB tip 1 pacijenti nisu u povišenom riziku za nastanak drugih malignih bolesti<sup>39</sup>. Očekivani životni vek GB pacijenata tip 1 na rođenju je za 9 godina kraći nego u kontrolnoj zdravoj populaciji i iznosi 68 godina<sup>40</sup>. Mortalitet je veći u grupi pacijenata kojima je izvršena splenektomija<sup>40</sup>. Najčešći uzorci smrti su maligne, kardiovaskularne i cerebrovaskularne bolesti<sup>40</sup>.

Tip 2 GB počinje u prvim mesecima života, a tok bolesti obuhvata rapidnu degeneraciju moždanog stabla<sup>41</sup> sa brзом progresijom neuroloških simptoma, što dovodi do smrtnog ishoda unutar prve dve godine života<sup>36</sup>. Karakteristično se javlja trijada neuroloških simptoma koja obuhvata strabizam, trizmus i retrofleksiju glave, a potom se javljaju epileptični napadi, disfagija, spasticitet i ekstrapiramidni znaci<sup>13</sup>. Kod ove forme opisuje se i laringealni stridor, dismotilitet jednjaka i nestabilna srčana frekvencija<sup>42</sup>. Dominantno visceralno oštećenje je, pored hepato-splenomegalije, anemije i trombocitopenije, hronično ili subakutno oštećenje pluća<sup>41</sup>. Davljenje hranom i apneje su glavni respiratorni problem uzrokovan neurološkom deterioracijom<sup>41</sup>. Pola GB tip 2 pacijenata umire zbog akutnog prestanka rada respiratornog centra ili zbog pneumopatije, bilo da je u vezi sa samom patologijom GB ili posledica masivne aspiracije<sup>41</sup>.

Tip 3 GB obuhvata multiple fenotipove koji mogu uključiti primarno visceralne simptome i neurološke, pre svega usporene horizontalne sakade, a pored toga se opisuje mioklonus, ataksija, epileptički napadi i demencija<sup>36,43</sup>.

Međutim, pored klasična tri fenotipa, postoje i brojni drugi kod kojih se opisuje hidrops fetalis sa kongenitalnom ihtiozom (varijanta tipa 2; perinatalne letalne forme GB), kalcifikacija srčanih valvula (varijanta tipa 3), bubrežni i autoimuni poremećaji, hidrocefalus i kornealna zamućenja, plućna hipertenzija, parkinsonizam itd., a zbog nekih od ovih kliničkih manifestacija opisuje se i intermedijarni tip GB<sup>36</sup>.

U GB tip 1 koja je klasifikovana kao neneuropatski oblik bolesti, pored pojave PB, postoje saopštenja i o postojanju periferne neuropatije, depresije, mioklonusa i drugih simptoma koji bi ukazivali

na afekciju centralnog i perifernog nervnog sistema<sup>44</sup>. Ove činjenice dovode u pitanje ispravnost važeće klasifikacije GB, posebno imajući na umu činjenicu da je u studiji Cherina i saradnika 51% GB tip 1 pacijenata imao patološki neurološki nalaz<sup>44</sup>.

### 1.1.5. Korelacija genotipa i fenotipa kod Gošeove bolesti

Klinički je zapaženo da podgrupa GB pacijenata sa jedinstvenim fenotipom može imati različit genotip<sup>30</sup> kao i da pacijenti sa istim genotipom imaju različite kliničke manifestacije, tok bolesti i odgovor na terapiju<sup>36</sup>, što se odnosi i na braću i sestre sa GB<sup>45</sup>, kao i na blizance sa GB<sup>46</sup>.

Poznate korelacije genotipa i fenotipa su retke i obuhvataju sledeće primere:

- N370S mutacija se nalazi samo u GB tip 1<sup>30</sup>;
- kod GB tip 2 prevalentni su rekombinantni i retki aleli, a homozigotno stanje za rekombinantne alele je u istraživanju Stone i saradnika bilo u vezi sa ranim letalitetom<sup>47</sup>;
- GB tip 3 pacijenti koji su prvo imali visceralne manifestacije, obično su nosili L444P i/ili R463C mutaciju, dok su oni sa miokloničkom epilepsijom obično imali kombinaciju N188S, G377S i V394L sa Null ili rekombinantnim alelom<sup>30,48,49</sup>;
- atipični fenotip koji obuhvata kalcifikaciju ili fibrozu srčanih valvula, kornealna zamućenja, hidrocefalus i dismorfiju, udružen je sa D409H mutacijom. Međutim, čak i homozigoti sa D409H mutacijom ne razvijaju uvek ovaj atipični fenotip<sup>30</sup>.

Većina *GBA* mutacija može se detektovati u različitim tipovima GB i mogućnost za prognostičke predikcije fenotipa na osnovu genotipa su ograničene<sup>30</sup>. Beutler je sa saradnicima predložio klasifikaciju mutacija<sup>50</sup>, raspoređujući ih u tri grupe u zavisnosti od fenotipa u kom se javljaju na (Tabela 3):

- **„Null“ mutacije**, tj. one mutacije kod kojih ne dolazi do sinteze proteina;
- **„Teške“ mutacije** su one kod kojih dolazi do produkcije proteina. Ukoliko dođe do nasleđivanja teške mutacije sa null mutacijom ili drugom teškom mutacijom, najčešće dolazi do pojave neuropatske forme GB (tip 2 ili tip 3).
- **„Lake“ mutacije** su one kod kojih takođe dolazi do produkcije proteina i udružene su samo sa neneuropatskom GB (tip 1).

Tabela 3. Očekivani klinički fenotip Gošeove bolesti na osnovu klasifikacije na Null, teške i lake mutacije. Prilagođeno prema referenci 50.

		Prvi alel		
		Null	Teška	Laka
Drugi alel	Null	inkompatibilno sa životom	Tip 2/3	Tip 1
	Teška	Tip 2/3	Tip 2/3	Tip 1
	Laka	Tip 1	Tip 1	Tip 1

## 1.2. Parkinsonova bolest

PB se javlja kod ljudi svih rasa i vera, nešto češće kod muškaraca nego kod žena<sup>11</sup>. Incidencija PB raste sa uzrastom, od 17,4 na 100000 osoba-godina u uzrastu 50-59 godina do 93,1 na 100000 osoba-godina uzrasta od 70-79 godina; rizik za nastanak PB tokom života je 1,5%<sup>11,51</sup>. Medijana godina početka bolesti je 60 godina, a prosečna dužina trajanja bolesti od dijagnoze do smrtnog ishoda je 15 godina<sup>11</sup>. Mortalitet kod PB je veći nego u opštoj populaciji. Standardizovani odnos mortaliteta iznosi 1,88, a najčešći dokumentovani uzrok smrti kod PB pacijenata je pneumonija<sup>11,52</sup>.

Osim genetskih uzroka i genetskih faktora rizika, prepoznati su i drugi faktori rizika za nastanak PB kao što su starije životno doba, život u seoskom području, bavljenje poljoprivredom, konzumiranje bunarske vode, izloženost pesticidima, dok pušenje duvana izgleda da ima protektivnu ulogu<sup>1,53</sup>.

### 1.2.1. Klinička slika Parkinsonove bolesti

PB najčešće počinje poremećajem dešnjaštva, a ređe lakim povlačenjem noge po podlozi. Umor i ukočenost su česte, ali nespecifične smetnje. Okolina pacijenta, pre nego sam pacijent, može primetiti tužan izraz lica, fleksiju ruke koja ne maše tokom hoda, monoton govor i usporenost. Poremećaj rukopisa može se javiti i nekoliko godina pre dijagnoze PB<sup>11</sup>. Sindrom zamrznutog ramena javlja se kao prvi simptom kod 8% PB pacijenata i može dve godine prethoditi pojavi tipičnih simptoma PB<sup>54</sup>.

Pacijenti se rano u toku bolesti žale na gubitak čula mirisa, a njihovi supružnici na poremećaje u REM fazi spavanja<sup>11</sup>. Osim toga, kod PB se opisuju konstipacija, problem sa žvakanjem i gutanjem, curenje pljuvačke, urgencija mokrenja i urinarna inkontinencija<sup>11</sup>. U daljem toku, sa progresijom bolesti, može se javiti frizing hoda sa motornim blokovima i padovima, izražena usporenost pokreta zbog koje je

pacijentu potrebna pomoć u obavljanju svakodnevnih aktivnosti<sup>11</sup>. Povećan je rizik za nastanak demencije, posebno kod onih pacijenata koji imaju izražen poremećaj govora i hoda, depresiju ili loš odgovor na terapiju L-dopom<sup>11</sup>. Vizuospacijalni poremećaj, poremećaj pažnje i egzekutivne disfunkcije češće su kod PB pacijenata nego kod pacijenata sa demencijom sa Levijevim telima ili pacijenata sa Alchajmerovom demencijom<sup>11</sup>.

### **1.2.1.1. Kardinalni znaci Parkinsonove bolesti**

Kardinalni znaci PB su motorni simptomi i znaci, i obuhvataju: tremor u miru, rigiditet, bradikineziju i posturalnu nestabilnost<sup>55</sup>.

Tremor je frekvencije 4-6 Hz, unilateralan u početku bolesti, javlja se u miru, a tipično nestaje sa pokretom i u spavanju, najizraženiji je u distalnom delu ekstremiteta. Najčešće se javlja na ruci, a može se javiti i na usnama, bradi, vilici, nozi i, za razliku od esencijalnog termora, ne javlja se kao tremor glave ili glasa<sup>55</sup>. Tremor je prisutan na početku bolesti kod 69% pacijenta dok 75% pacijenata ima tremor bilo kada u toku bolesti, a kod 9% se može izgubiti u toku bolesti<sup>55,56</sup>.

Rigiditet je povišen otpor na pasivni pokret koji se ponekad opisuje i kao fenomen zupčastog točka<sup>55</sup>. Rigiditet se javlja i u proksimalnim i u distalnim zglobovima i može se pojačati u zglobu u kom se klinički ispituje voljnim pokretima kontralateralnog ekstremiteta (Fromentov manevar)<sup>55</sup>.

Bradikinezija ili usporenost pokreta je najkarakterističniji znak PB, iako se može videti i kod drugih bolesti kao npr. depresije<sup>55</sup>. Bradikinezija obuhvata problem sa planiranjem, inicijacijom i egzekucijom pokreta, kao i sa izvođenjem motornog zadatka simultano sa drugim zadatkom<sup>55,57</sup>. Prva klinička manifestacija bradikinezije, osim usporenosti pokreta, obuhvata i problem sa izvođenjem finih motornih radnji. Smatra se da su i druge manifestacije PB kao npr. smanjena psihomotorna ekspresija lica, curenje pljuvačke, problem sa gutanjem, monoton i hipofon govor, smanjeno treptanje i redukcija sinkineskih pokreta rukom tokom hoda, takođe manifestacije bradikinezije<sup>55</sup>.

Posturalna nestabilnost je posledica oštećenja posturalnih refleksa i javlja se u kasnijim fazama bolesti. Na posturalnu nestabilnost utiču i drugi fenomeni koji se javljaju u PB kao npr. ortostatska hipotenzija i poremećaji senzornih sistema<sup>55</sup>. Posturalna nestabilnost i frizing hoda uzoroci su padova sa mogućim komplikacijama u vidu fraktura<sup>55</sup>. U kasnijim stadijumima bolesti, poremećaj balansa i padovi se izdvajaju kao dominantan problem na koji se žale pacijenti i osobe koje o njima brinu<sup>58</sup>.

Klinički dijagnostički kriterijumi za PB prema Queen Square Brain Bank prikazani su u Tabeli 4.



Tabela 4. Klinički dijagnostički kriterijumi za Parkinsonovu bolest po Queen Square Brain Bank. Prilagođeno prema referenci 11.

---



---

**KORAK 1: dijagnoza parkinsonog sindroma**

---

Bradikinezija + najmanje jedan od sledećih

- rigiditet
  - tremor u miru frekvencije 4-6 Hz
  - posturalna nestabilnost koja nije uzrokovana primarnom vizuelnom, vestibularnom, cerebelarnom ili propioceptivnom disfunkcijom
- 
- 

**KORAK 2: isključujući kriterijumi za PB**

---

- anamneza o ponavljanim vaskularnim događajima sa stepenastom progresijom parkinsonih simptoma
  - anamneza o ponovljenim povredama glave
  - anamneza o definitivnom encefalitisu
  - okulogirne krize
  - terapija neurolepticima u trenutku pojave simptoma
  - više od jednog obolelog rođaka
  - remisija bolesti koja se održava
  - striktna unilateralna zahvaćenost nakon 3 godine bolesti
  - supranuklearna pareza pogleda
  - cerebelarni znaci
  - rana pojava teške autonomne disfunkcije
  - rana pojava teške demencije sa poremećajem memorije, jezika i praksije
  - Babinski znak
  - prisustvo tumora mozga ili komunikantnog hidrocefalusa na CT pregledu
  - negativan odgovor na velike doze L-dope ako je isključena malapsorpcija
  - izloženost MPTP-u
- 
- 

**Korak 3: podržavajući prospektivni pozitivni kriterijumi za PB**

---

Najmanje tri kriterijuma su potrebna za definitivnu dijagnozu PB

- unilateralan početak bolesti
  - prisustvo tremora u miru
  - progresivan tok
  - perzistiranje asimetrije sa većom zahvaćenošću one strane tela na kojoj je bolest počela
  - odličan odgovor na L-dopu (70-100%)
  - teška, L-dopom indukovana horeja
  - odgovor na L-dopu 5 ili više godina
  - tok bolesti od 10 ili više godina
  - hiposmija
  - vizuelne halucinacije
- 
-

### **1.2.1.2. Ostale motorne manifestacije Parkinsonove bolesti**

Frizing je čest, onesposobljavajući simptom PB koji se karakteriše iznenadnim, kratkotrajnim i prolaznim blokovima pokreta i najčešće utiče na hod, posebno pri iniciranju hoda, okretanju, nailasku na prepreku ili prilikom prolaska kroz uzan prostor<sup>59-61</sup>. Epizode frizinga hoda najčešće traju do 10 sekundi, retko do 30 sekundi, češće se javljaju u OFF stanju i mogu se javiti samo na jednoj nozi<sup>58</sup>. Pacijenti vremenom pronalaze trik kojim prevazilaze epizode frizinga i to mogu biti preskakanje objekta, hodanje u ritmu muzike i slično<sup>55</sup>. Frizing se javlja kod 47% PB pacijenata, češće kod onih koji duže boluju i koji su u težem stadijumu bolesti<sup>61</sup>, kojima je bolest počela problemima sa hodom, dok su PB pacijenti sa tremorom u manjem riziku za nastanak frizinga hoda<sup>59</sup>. Pojava frizinga u toku bolesti povezana je sa nastankom poremećaja govora i sa posturalnom nestabilnošću<sup>59</sup>.

### **1.2.1.3. L-dopom indukovane motorne komplikacije**

Terapija L-dopom zlatni je standard u lečenju PB, ali ona sa sobom nosi rizik od pojave komplikacija u vidu motornih fluktuacija i diskinezija<sup>62</sup>. Kod nekih pacijenata mogu se javiti fluktuacije i nemotornih simptoma, a kod nekih dolazi do pojave spontanih fluktuacija, kako motornih, tako i nemotornih, nezavisno od uzimanja L-dope<sup>63</sup>. Najčešća forma motornih fluktuacija je efekat nestajanja terapije, eng. „wearing off“ fenomen, koji predstavlja pogoršanje parkinsonih simptoma usled skraćenog trajanja povoljnog dejstva nakon uzimanja doze L-dope<sup>62</sup>.

Otprilike u isto vreme kada se jave motorne fluktuacije, pacijenti obično razviju i L-dopom izazvane nevoljne pokrete koji se nazivaju diskinezije<sup>63</sup>. Diskinezije se najčešće javljaju u periodu kada je koncentracija leka u krvi najveća i tada se nazivaju vršne diskinezije (eng. *peak of dose*), a mogu se javiti i tokom celog ON perioda i tada se zovu kvadratne (eng. *square wave*) diskinezije<sup>63</sup>. Strana tela na kojoj su simptomi PB izraženiji je obično strana na kojoj se prvo pojave diskinezije<sup>63</sup>. Horeiformni pokreti raznih delova tela, distonička posturalnost ekstremiteta, karaniocervikalna distonija i horeja su česti u ON periodu, a ukoliko se diskinezije jave u OFF periodu najčešće su distoničkog tipa i zahvataju nogu i stopalo<sup>63</sup>.

Poboljšanje parkinsonih simptoma nakon uzimanja dopaminergičke terapije se označava kao „ON“ period, dok se period vraćanja parkinsonih simptoma nakon isteka dejstva terapije označava kao „OFF“ period<sup>63</sup>. Sa progresijom bolesti i kod hronične upotrebe L-dope, javljaju se periodi naglog prelaska iz ON stanja, kada je pacijent pokretan i sa diskinezijama, u OFF stanje kada je otežano pokretan i to se označava kao ON-OFF fluktuacije<sup>63</sup>. Ova vrsta fluktuacija može biti predvidiva, ali i nepredvidiva i smatra se da je posledica farmakokinetičkih i farmakodinamskih faktora u vezi sa hroničnim uzimanjem L-dope u prisustvu teške nigrostrijatne degeneracije<sup>63</sup>.

U studiji u kojoj je dijagnoza PB bila potvrđena histopatološkim nalazom, prvo su se razvijale diskinezije, a poslednje ON-OFF fluktuacije; 71,4% imalo je neželjene efekte i to 61,9% diskinezije, 35,7% "wearing off" i 16,7% ON-OFF fluktuacije<sup>64</sup>. Drugi podaci iz literature pokazuju da oko 40% pacijenata razvije motorne fluktuacije i isto toliko diskinezije nakon 5 godina terapije L-dopom<sup>65</sup>. Pacijenti koji oboljevaju ranije, pre 40. godine, češće razvijaju motorne fluktuacije i diskinezije nego pacijenti kojima PB počne kasnije<sup>66</sup>. Započinjanje terapije L-dopom u kasnijem stadijumu bolesti brže dovodi do pojave motornih fluktuacija i L-dopom indukovanih diskinezija<sup>67</sup>.

#### **1.2.1.4. Nemotorne manifestacije Parkinsonove bolesti**

Nemotorne manifestacije PB obuhvataju neuropsihijatrijske, autonomne, gastrointestinalne, senzorne poremećaje i poremećaje spavanja. Spisak nemotornih simptoma prikazan je u Tabeli 5. Ovi poremećaji su češći u težim stadijumima bolesti, a javljaju se, prema studiji Shulmana i saradnika, kod 88% pacijenata (59% ima dva ili više, a oko 25% PB pacijenata ima četiri ili više nemotorna poremećaja)<sup>68</sup>. U velikoj italijanskoj multicentričnoj studiji na 1072 PB pacijenta, čak 98,6% imalo je neki nemotorni simptom, a najčešće su to bili umor (kod 58% pacijenata), anksioznost (56%), bolovi u nogama (38%), insomnija (37%), urgencija mikcije i nokturija (35%), curenje pljuvačke i problem sa koncentracijom (31%)<sup>69</sup>.

Dijagnoza depresije u PB komplikuje se činjenicom da se simptomi depresije kao što su psihomotorni poremećaji, poremećaji spavanja, umor, apatija i smanjena facijalna ekspresija, takođe manifestacije PB<sup>70</sup>. Generalno se smatra da je depresija jedan od najčešćih nemotornih simptoma PB, iako je prevalencija depresije u PB u studijama varijabilna, od 4% do 76%, što zavisi od metodologije istraživanja<sup>70</sup>. U analizi 45 studija koje se bave depresijom u PB sa ukupno 1179 pacijenata, Slaughter i kolege<sup>71</sup> su zaključili da je prevalencija depresije 31%; veliku depresivnu epizodu imalo je 24,8%, malu depresivnu epizodu 36,6%, a distimiju 22,5% pacijenata. Značaj depresije je u tome što ima najveći uticaj na kvalitet života PB pacijenata<sup>72</sup>.

Drugi važan afektivni poremećaj u PB je apatija koja može biti simptom depresije, ali se može javiti i nezavisno od depresije<sup>70</sup>. Apatija je skup bihevioralnih, emocionalnih i kognitivnih karakteristika koje obuhvataju smanjenu motivaciju i napor za obavljanje svakodnevnih aktivnosti, smanjenje intelektualnih interesa i inicijative u smislu personalnih i socijalnih pitanja, i indiferentnost ili zaravnjenje afekta<sup>73</sup>. Prevalencija apatije u studijama je varijabilna, iznosi od 17 do 70%, što zavisi od mnogobrojnih faktora, npr. kognitivnog statusa i depresije ispitivanih pacijenata, metodologije ispitivanja, samih ispitivača itd<sup>73</sup>. U istraživanju sprovedenom na 360 PB pacijenata na Neurološkoj klinici KCS, apatija je

postojala uporedo sa depresijom kod 36,9% pacijenata, dok je apatiju bez depresije imalo 23%, a depresiju bez apatije 4,4% pacijenata<sup>73</sup>.

Tabela 5. Nemotorne manifestacije Parkinsonove bolesti. Prilagođeno prema referenci 70.

<b>Neuropsihijatrijski simptomi</b>	Depresija, apatija, anhedonija, anksioznost Demencija Poremećaj kontrole impulsa Halucinacije i iluzije (obično idukovane lekovima)
<b>Poremećaji spavanja</b>	Poremećaji usnivanja i održavanja spavanja <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insomnija</li> <li>• Primarni poremećaji spavanja</li> </ul> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sindrom nemirnih nogu, periodični pokreti nogu</li> <li>2. <i>Sleep</i> apnea (opstruktivna ili centralna)</li> </ol> Parasomnije <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poremećaj ponašanja u REM fazi</li> <li>• Nevoljni pokreti u ne-REM fazi</li> <li>• Živi snovi</li> </ul> Preterana dnevna pospanost
<b>Autonomna disfunkcija</b>	Disfunkcija bešike Ortostatska hipotenzija Hiperhidroza Seksualna disfunkcija
<b>Gastrointestinalni simptomi</b>	Konstipacija Hipersalivacija Disfagija
<b>Senzorni simptomi</b>	Bol Olfaktivna disfunkcija Vizuelni simptomi (diplopije, zamagljen vid)
<b>Drugi simptomi</b>	Zamor Gubitak telesne mase Povećnje telesne mase (može biti indukovano lekovima)

Anksioznost se javlja kod 28-56% PB pacijenata<sup>68,69</sup>, a procenjena životna prevalencija anksioznosti kod PB pacijenata je 49%<sup>74</sup>. Specifične fobije, panični ataci i socijalna fobija su najčešći u spektru anksioznih poremećaja kod PB pacijenata<sup>74</sup>.

Kognitivni poremećaj u PB obuhvata poremećaj pažnje i pamćenja, vizuospacijalnu i egzekutivnu disfunkciju<sup>75</sup>. Demencija je kasna komplikacija PB koja se može javiti udružena sa bihevioralnim i

neuropsihijatrijskim simptomima<sup>76</sup>. Prevalencija demencije u PB je 30-40% u kliničkim ispitivanjima, 16% kod novodijagnostikovanih PB pacijenata, a 10% PB pacijenata godišnje razvije demenciju što je 4-6 puta više nego u opštoj populaciji<sup>75</sup>. Smatra se da je 3-4% demencije u opštoj populaciji uslovljeno demencijom u PB<sup>77</sup>. Faktori rizika za nastanak demencije kod PB su starije životno doba, teži parkinsonizam i rigidna forma bolesti sa posturalnom nestabilnošću i poremećajem hoda, prisustvo halucinacija i blagog kognitivnog poremećaja na prvom pregledu<sup>75</sup>.

Halucinacije se smatraju neželjenim efektom antiparkinsone terapije, ali na njihovu genezu mogu uticati i drugi faktori<sup>78</sup>. U studiji preseka obavljenoj na 180 PB pacijenata u Srbiji, halucinacije je imalo 13%, a od njih 90% su bile vizuelne halucinacije<sup>79</sup>, dok je u studiji Fenelona i saradnika<sup>78</sup> na 216 PB pacijenata 39,8% imalo halucinacije u prethodna tri meseca. Kliničko ispoljavanje halucinacija najčešće obuhvata osećaj prisustva druge osobe, promicanje u periferiji vidnog polja (najčešće oblika životinje), formirane halucinacije, a ređe i auditivne halucinacije<sup>78</sup>. Faktori rizika za nastanak halucinacija obuhvataju teške kognitivne poremećaje, dnevnu pospanost i duže trajanje PB<sup>78</sup>.

Weintraub i saradnici<sup>80</sup> su u studiji preseka na 3090 PB pacijenata zaključili da je prevalencija poremećaja kontrole implusa 13,6%. Kockanje je postojalo kod 5%, kompulzivno seksualno ponašanje kod 3,5%, kompulzivna kupovina kod 5,7%, prejedanje kod 4,3%, a dva ili više poremećaja je imalo 3,9% bolesnika<sup>80</sup>. Poremećaj kontrole impulsa javlja se češće kod pacijenata koji dobijaju terapiju dopaminskim agonistima u poređenju sa onima koji dobijaju L-dopu<sup>80</sup>. Punding je besciljna repetitivna aktivnost koja se javlja sa prevalencijom 1,4-14% i najčešće se ispoljava kod PB pacijenata u vidu sortiranja predmeta, neproaktivnim pisanjem, rasklapanjem i sklapanjem uređaja itd<sup>81</sup>.

Poremećaj spavanja postoji kod 75-98% PB pacijenata, korelira sa težinom bolesti, uzimanjem lekova i depresijom, i snažno utiče na kvalitet života<sup>70</sup>. Fragmentacija sna je najčešći poremećaj koji se javlja tri puta češće nego kod zdravih kontrola, a opisuju se i primarni poremećaji spavanja- sleep apnea i sindrom nemirnih nogu<sup>70,82</sup>. Poremećaj ponašanja u REM spavanju karakteriše se motornom aktivnošću i vokalizacijom u REM fazi spavanja, a javlja se kod 33-60% PB pacijenata, ali i u drugim sinukleino-pacijama i može biti preklinički marker razvoja parkinsonog sindroma<sup>70</sup>.

Autonomna disfunkcija kod PB obuhvata kardiovaskularne, gastrointestinalne, urogenitalne i termoregulatorne poremećaje<sup>70</sup>. Prevalencija autonomne disfunkcije u PB je 14-80%, u zavisnosti od metodologije studije<sup>70</sup>. Postoje dokazi da opstipacija, urinarna i seksualna disfunkcija i smanjen hronotropni odgovor srca tokom vežbanja mogu biti premotorni simptomi PB<sup>83</sup>. Opstipacija, nokturijska i

ortostatska hipotenzija imaju veliki uticaj na kvalitet života<sup>70</sup>. Ortostatska hipotenzija postoji kod 30-58% PB pacijenata i može se javiti, kao i kod multiple sistemske atrofije, rano u toku bolesti<sup>70</sup>. Do 80% PB pacijenata je u nekim studijama prijavljivalo konstipaciju<sup>83</sup>. Seksualna disfunkcija se beleži kod 79% muškaraca i 75% žena<sup>83</sup>.

### 1.2.2. Histopatologija Parkinsonove bolesti

Selektivni gubitak dopaminergičkih neurona (koji sadrže neuromelanin) u pars compacta supstancije nigre, najvažniji je patološki znak PB, a pored toga se gubitak neurona može videti i u locusu ceruleusu, dorzalnim jedrima vagusa, nuclei raphe, nucleus basalis Maynert i nekim kateholamin-ergičkim strukturama moždanog stabla uključujući ventrotegmentalnu areju<sup>11</sup>. Ovaj gubitak neurona udružen je sa tri različite vrste intraneuronalnih inkluzija: Levijevim telima, bledim telima (eng. *the pale bodies*) i Levijevim neuritima<sup>11</sup>. Levijeva tela (LT) se mogu dalje podeliti prema morfologiji na klasičan tip (u moždanom stablu) i kortikalni tip. Klasičan tip je sferične strukture od 8-30  $\mu\text{m}$ , ima hijalino jezgro okruženo perifernim bledo-mrljastim haloom, a ultrastrukturalno je sastavljen od 7–20 nm širokih filamenata od gustog granularnog materijala sa vezikularnim strukturama<sup>11</sup>. Bleda tela, prethodnici Levijevih tela, su velike zaobljene strukture koje zamenjuju neuromelanin<sup>11</sup>. Konstantan procenat nigralnih neurona (3-4%) sadrži LT nezavisno od stadijuma bolesti što bi moglo da znači da se LT neprestano formiraju i nestaju<sup>84</sup>. Kortikalna LT nemaju unutrašnja jedra i halo, i nalaze se u malim i srednjim piramidnim neuronima VI i VII sloja temporalnog, parijetalnog, frontalnog, insularnog, entorinalnog korteksa i u cingulumu<sup>11</sup>. Iako se neokortikalna LT nalaze i kod Alchajmerove bolesti, kod PB ona nisu patološki korelat postojanja demencije<sup>11</sup>. Agregati post-translaciono modifikovanog presinaptičkog proteina  $\alpha$ -sinukleina su glavna komponenta LT i Levijevih neurita<sup>11,85</sup>.

Incidentalni nalaz LT može se naći kod 10% osoba koje nisu imale kliničke znake PB i smatra se da bi to mogla biti preklinička faza PB<sup>11,85,86</sup>. Brakova teorija upravo govori o toku prekliničke prema simptomatskoj PB kroz akumulaciju agregata  $\alpha$ -sinukleina koji se šire aksonskim putevima. Prema ovoj teoriji, proces počinje u Majsnеровom gastričnom autonomnom pleksusu i olfaktornim nervnim završecima, a potom se širi do prednjeg olfaktornog nukleusa i određenih regiona produžene moždine, i zatim u rostralne strukture moždanog stabla kada biva zahvaćena pars compacta supstancije nigre da bi se potom proces proširio ascendentno prema korteksu<sup>87</sup>.

### 1.2.3. Molekularne osnove Parkinsonove bolesti

#### 1.2.3.1. Etiopatogeneza Parkinsonove bolesti

Smatra se da bi karakteristično oštećenje neurona u neurodegenerativnim bolestima moglo biti posledica agregacije proteina, pa se ove bolesti nazivaju i proteinopatijama<sup>88</sup>. PB je jedna u nizu proteinopatija, preciznije sinukleinopatija, bolesti kod kojih centralnu ulogu zauzima  $\alpha$ -sinuklein<sup>5</sup>. U slučaju mutacije u  $\alpha$ -sinukleinu, agregacija proteina se odvija brže nego agregacija normalnog (eng. *wild type*) proteina<sup>88</sup>. Osim toga, moguće je da i poremećaj degradacije proteina u ćeliji može biti u osnovi nastanka neurodegenerativnih bolesti jer je u tom slučaju narušen odnos sinteze i razgradnje proteina<sup>89</sup>.

#### 1.2.3.2. $\alpha$ -sinuklein

Familija proteina sinukleina obuhvata tri člana:  $\alpha$ -sinuklein,  $\beta$ -sinuklein i  $\gamma$ -sinuklein. Oni su kodirani različitim genima, ali su srodni, visoko konzervirani proteini koji se sreću samo kod kičmenjaka<sup>90</sup>. Svi oni su široko rasprostranjeni u strukturama mozga, ali njihova fiziološka funkcija nije u potpunosti shvaćena<sup>5</sup>. Sva tri člana porodice sinukleina su proteini koji sadrže sličan broj aminokiselina, podudaraju se u 55-62% sekvenci i imaju sličnu organizaciju domena<sup>91</sup>. Amino kraj svakog proteina sadrži nepravilne ponovke od 11 aminokiselina koji uvek sadrže konsenzus sekvencu KTEKGV. Ovi ponovci razdvojeni su regionom od 5-8 aminokiselina<sup>5</sup>. Najveća koncentracija  $\alpha$ - i  $\beta$ -sinukleina je u nervnim završecima i to u neposrednoj blizini sinaptičkih vezikula, a manji broj se može naći u ćelijskom telu i dendritima<sup>5,90</sup>. Za razliku od njih,  $\gamma$ -sinuklein se nalazi duž celog neurona<sup>90</sup>. Sinukleini se mogu naći i u drugim tkivima:  $\alpha$ -sinuklein u trombocitima,  $\beta$ -sinuklein u Sertolijevim ćelijama testisa, a  $\gamma$ -sinuklein u epidermisu i metastatskom tkivu karcinoma dojke<sup>90</sup>.

Postoji nekoliko pretpostavki o funkciji sinukleina:  $\alpha$ -sinuklein se vezuje za lipidne membrane, pa se pretpostavlja da bi mogao biti lipid-vezujući protein<sup>92</sup>.  $\alpha$  i  $\beta$ - sinukleini inhibiraju fosfolipazu D2 koja učestvuje u signalom indukovanoj citoskeletnoj regulaciji i endocitozi, pa je moguće da je uloga ovih sinukleina u regulaciji procesa vezikularnog transporta<sup>92,93</sup>. Pomoću kazein kinaze 1 i 2 i nekoliko G-protein-vezanih receptor kinaza,  $\alpha$ -sinuklein može biti fosforilisan, što smanjuje mogućnost njegove interakcije sa fosfolipidima i fosfolipazom D2<sup>94</sup>. Detektovan je i protein sinfilin-1 koji se vezuje za  $\alpha$ -sinuklein, a koji bi mogao imati ulogu „sidra“ vezujući  $\alpha$ -sinuklein za proteine koji učestvuju u transportu vezikula i funkciji citoskeleta<sup>5,95</sup>.

$\alpha$ -sinuklein je posebno važan za neurodegenerativne bolesti, a pažnju naučne javnosti privuklo je otkriće mutacije u genu za  $\alpha$ -sinuklein kod familijarne forme PB<sup>9,90</sup>. U pitanju je supstitucija alanina treoninom na poziciji 53 u proteinu (A53T). Međutim, iako je otkrivena i druga mutacija, takođe u

familijarnoj PB, njihovo prisustvo nije dokazano u drugim ispitivanim grupama PB pacijenata širom sveta, što znači da mutacije u genu za  $\alpha$ -sinuklein nisu uzrok sporadične PB<sup>90</sup>. Kasnije je pokazano da bi polimorfizmi u genu za  $\alpha$ -sinuklein mogli biti geni podložnosti za nastanak PB<sup>96</sup>. Inaktivacijom gena za  $\alpha$ -sinuklein ne dolazi do pojave značajnog neurološkog fenotipa, dakle, gubitak funkcije  $\alpha$ -sinukleina verovatno nema ulogu u nastanku neurodegeneracije. Miš sa nedostatkom  $\alpha$ -sinukleina ima povišene vrednosti dopamina u strijatumu, pa se smatra da je  $\alpha$ -sinuklein negativan regulator neurotransmisije u ovoj strukturi<sup>97</sup>.

Rekombinantni  $\alpha$ -sinuklein u određenim *in vitro* uslovima zauzima oligomernu konformaciju i postepeno se konvertuje u  $\beta$ -nabranu ploču, fibrilanu strukturu koja podseća na LT i neurite koji se nalaze kod PB. Ovaj proces nazvan je agregacija i smatra se da je u osnovi toksičnog dejstva  $\alpha$ -sinukleina<sup>98</sup>. Nije jasno koja od formi  $\alpha$ -sinukleina je toksična: da li samo fibrilarna ili neki od intermedijarnih solubilnih oligomera<sup>98-100</sup>. Dopamin i njegovi metaboliti inhibiraju konverziju protofibrila u fibrile i mogu povećati akumulaciju protofibrila. Ovo bi donekle moglo da objasni selektivnu osetljivost dopaminergičkih neurona na toksičan efekat  $\alpha$ -sinukleina<sup>101</sup>. Dalje, postoje pretpostavke da bi ukupna koncentracija  $\alpha$ -sinukleina mogla da bude u osnovi njegove agregacije, međutim ostaje nejasno kolika je njegova ukupna koncentracija u PB jer su u istraživanjima dobijeni oprečni rezultati<sup>98</sup>.

Mehanizmi transkripcione i post-translacione regulacije  $\alpha$ -sinukleina moguće je da učestvuju u patogenezi PB. Ima podataka da bi povećana koncentracija informacione RNK za  $\alpha$ -sinuklein mogla da bude triger za patogenezu PB<sup>98</sup>.

### **1.2.3.3. Ćelijski putevi razgradnje proteina**

U ćeliji postoji nekoliko proteolitičkih sistema, a dva najvažnija su: ubikvitin-proteazomski sistem (UPS) i autofagno-lizozomalni put (ALP) koji obuhvata makroautofagiju, mikroautofagiju i šaperonima posredovanu autofagiju<sup>102</sup>. Sistemi degradacije proteina su važni zbog obnavljanja ćelije, odstanjivanja štetnih konstituenata i normalnog prometa ćelijskih komponenti. Ovi sistemi učestvuju u razvoju i diferencijaciji, u fenotipskom oblikovanju ćelije, spremajući je da brzo i adekvatno odgovori na promene u okruženju ili na promene u svom unutrašnjem metabolizmu, kako u fiziološkim uslovima, tako i u uslovima stresa<sup>102</sup>. U UPS razgrađuju se predominantno kratkoživeći nuklearni i citosolni proteini dok se kroz ALP degradiraju dugoživeći proteini, ali i veliki supstrati kao što su ćelijske organele, kroz proces makroautofagije<sup>102,103</sup>.

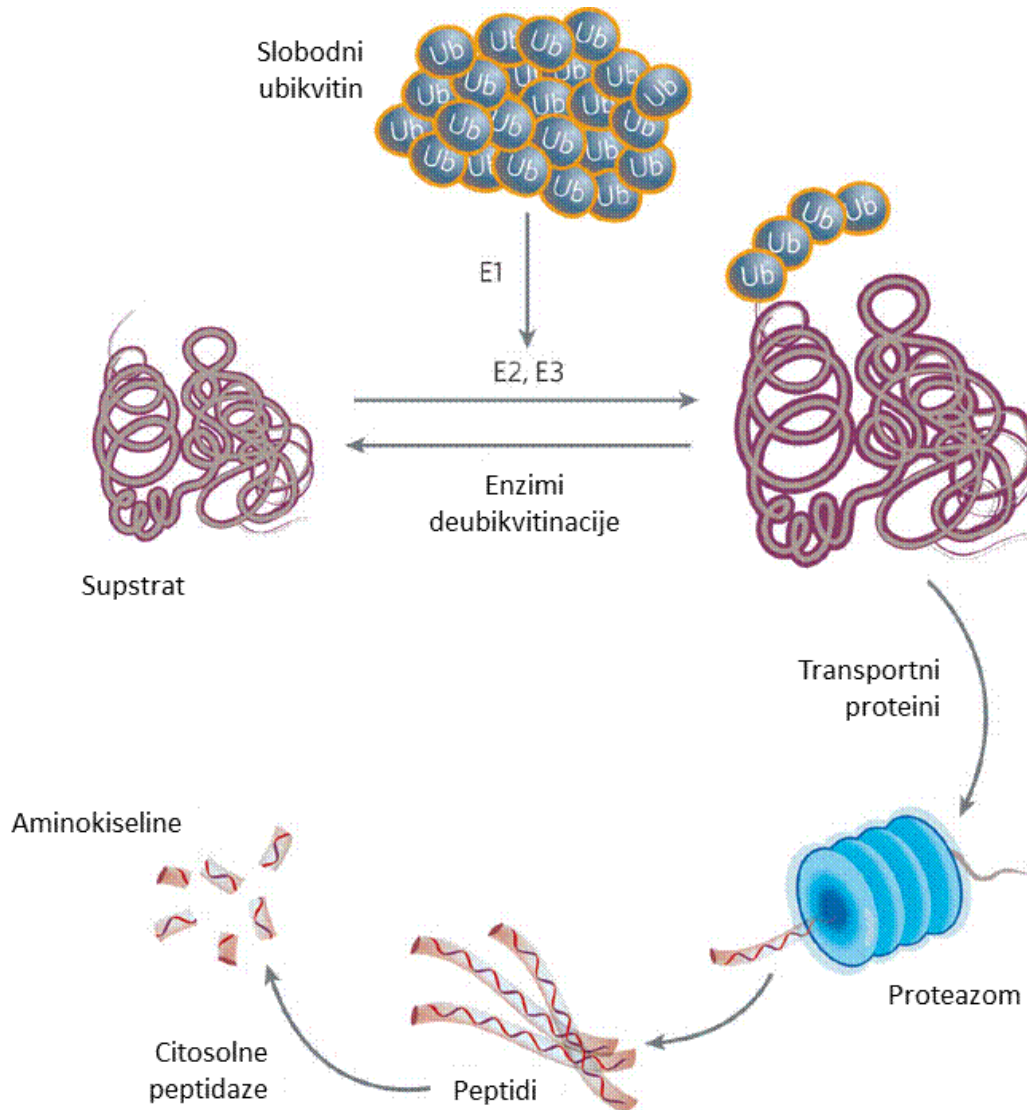


#### 1.2.3.3.1. Ubikvitin-proteazomski sistem (UPS)

UPS je nelizosomalni način razgradnje proteina koji se odvija u dva koraka. Prvo dolazi do kovalentnog vezivanja više molekula ubikvitina za supstrat kada se formira poliubikvitinski niz, a drugi korak je degradacija obeleženog proteina pomoću 26S proteazoma kada se oslobađa vezani ubikvitin koji ćelija ponovo može da koristi<sup>103</sup>. Vezivanje ubikvitina za supstrat odvija se delovanjem tri enzima: E1 (ubikvitin aktivirajući enzim) koji se vezuje za ubikvitin, formirajući tioestrom vezani konjugat uz hidrolizu ATP; E2 (ubikvitin konjugujući enzim) koji prihvata ubikvitin od E1 i formira sličan tioestar sa ubikvitinom; E3 (ubikvitin ligaza) koji prihvata E2 i supstrat i prenosi ubikvitin na supstrat<sup>89</sup>. Supstrat se razgrađuje u proteazomu, multiproteinskom kompleksu oblika „bureta“ u kom dolazi do redukcije proteina do peptida, a koji se dalje u citosolu razgrađuju pomoću peptidaza do aminokiselina<sup>89</sup> (slika 4). I sam molekul ubikvitina često prolazi kroz proces ubikvitinacije, što rezultira u formiranju poliubikvitinskog lanca<sup>89</sup>. Signal koji je potreban da bi proteazom prepoznao supstrat je lanac od četiri ili više ubikvitinskih molekula, vezanih za supstrat preko lizina na poziciji 48<sup>89</sup>. Nejsno je, međutim, na koji način UPS ostvaruje visoku selektivnost u razgradnji tačno određenih proteina, u tačno određenom trenutku ćelijskog ciklusa ili nakon specifičnog ekstraćelijskog stimulusa<sup>103</sup>. Smatra se da je specifičnost UPS određena E3 proteinima, kao i modifikujućim enzimima i pomoćnim proteinima<sup>103</sup>. Supstrat mora biti prepoznat i vezan za specifičnu E3 kao preduslov za ubikvitinaciju<sup>103</sup>. Da bi bio prepoznat, supstrat prolazi posttranslacionu modifikaciju kao što su fosforilacija, oksidacija, asocijacija sa pomoćnim proteinima ili šaperonima<sup>103</sup>.

Postoje dokazi o poremećaju UPS u PB. Pokazano je da postoji poremećaj proteazomske aktivnosti kod sPD<sup>104</sup>. Jedna od E3-ubikvitin ligaza je i parkin protein koji ima autoubikvitinirajuću aktivnost i koji je jednim delom na amino kraju sličan ubikvitinu, dok na karboksi kraju formira *RING-finger* domen<sup>103</sup>. Mutacije u genu koje inaktiviraju aktivnost ove ligaze dovode do pojave autozomno recesivnog juvenilnog parkinsonizma, a posebno je interesantno da se kod ovih pacijenata ne nalaze Levijeva tela<sup>105,106</sup>. Oštećenje funkcije ligaze dovodi do nagomilavanja supstrata koji može imati toksičan efekat na dopaminergičke neurone. Identifikovano je nekoliko supstrata ove ligaze, ali je i dalje nejasno da li je akumulacija nekog od tih proteina u osnovi patogeneze PB<sup>103</sup>. Priča se dalje komplikuje činjenicom da inaktivacijom *PARKIN* gena kod miša ne dolazi do pojave parkinsonog sindroma<sup>103</sup>. Kod mnogih PB pacijenata pokazano je postojanje heterozigotne *PARKIN* mutacije zbog čega se postavlja pitanje da li bi takvo stanje moglo biti faktor podložnosti za nastanak PB pod određenim uslovima, kada se dosegne „prag“ za nastanak PB<sup>107</sup>. Odgovor na ovo pitanje i dalje nije jedinstven obzirom da postoje dokazi pro i contra<sup>107,108</sup>.

Slika 4. Shematski prikaz ubikvitin proteazomskog sistema. Prilagođeno prema referenci 89.



Mutacije u genu za ubikvitin karboksi-terminalnu hidrolazu L1 (UCHL1) identifikovane su, takođe, kod familijarne forme PB<sup>109</sup>. Pretpostavka je da zbog mutacije dolazi do smanjene aktivnosti ovog enzima, a to posledično dovodi do manjka slobodnog ubikvitina potrebnog za degradaciju nekog, za sada neidentifikovanog proteina koji bi nakon nagomilavanja mogao biti toksičan za neurone<sup>103</sup>. Osim hidrolazne, smatra se da UCHL1 ima suprotnu, ligaznu aktivnost, i da obe funkcije enzima imaju ulogu u proteazomskoj proteolizi<sup>110</sup>. Međutim, mutacije u ovom genu utiču i na autofagno-lizozomalni put razgradnje proteina, tačnije šaperonima posredovanu autofagiju<sup>111</sup>, kao što će kasnije biti navedeno.

$\alpha$ -sinuklein u bilo kom obliku, monomernom, oligomernom ili kao filamentozni agregat, vezuje se za S6' 19S subjedinicu proteazoma i na taj način inhibira njegovu aktivnost<sup>103</sup>. Dakle, agregacija  $\alpha$ -sinukleina može dovesti do sekundarnog oštećenja UPS<sup>103</sup>. Iako se u LT, pored  $\alpha$ -sinukleina nalazi i ubikvitin, nije jasno da li poliubikvitinacija  $\alpha$ -sinukleina ima ulogu u njegovoj degradaciji<sup>103</sup>.

#### 1.2.3.3.2. Autofagno- lizosomalni put (ALP)

Lizozomi su jedna od komponenti naizgled nepovezanog sistema organela koji se zove endozomno-lizosomalni sistem. Ovaj sistem obuhvata **rane endosome** koji se nalaze na periferiji ćelije, **kasne endosome** koji se uglavnom nalaze perinuklearno i **lizosome** koji zajedno formiraju lanac putem kojeg se obavlja prenos i razgradnja molekula. Lizozom je okružen membranom, ima nizak pH u unutrašnjosti i sadrži brojne vezikule sa hidroliznim enzimima. Na membrani lizozoma nalaze se proteini od kojih su neki transportni sistemi koji nose partikule između lumena i citosola. Unutar lizozoma dolazi do razgradnje supstrata<sup>27</sup>.

ALP obuhvata tri glavna oblika razgradnje: makroautofagiju, mikroautofagiju i šaperonima posredovanu autofagiju<sup>102</sup>. Kroz sva tri ova načina intracelularne komponente bivaju dopremljene u lizozom i tu bivaju razgrađene hidrolazama do sastavnih delova koje ćelija ponovo može da koristi<sup>102</sup>. Ono što razlikuje ova tri puta autofagije je način na koji konstituenti bivaju dopremljeni unutar lizozoma<sup>102</sup>.

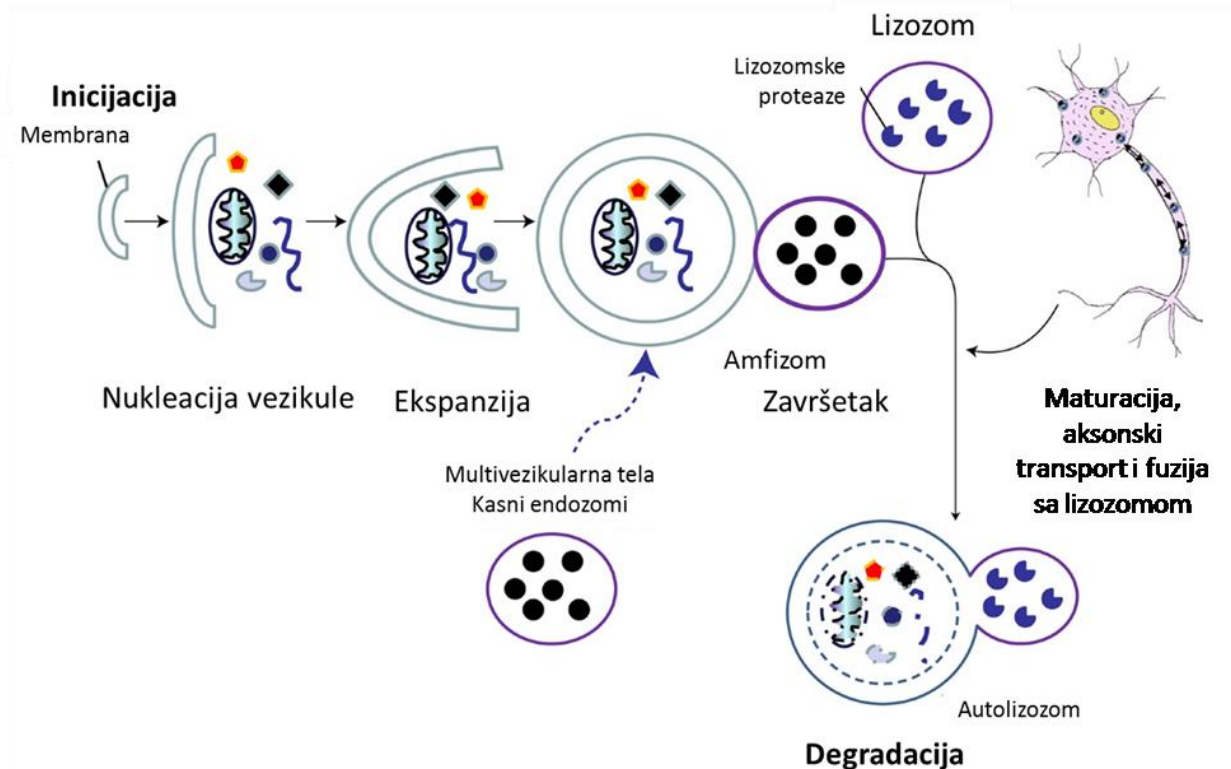
Kod **mikroautofagije** formiraju se invaginacije na nivou lizosomalne membrane koje zahvataju susedni sadržaj (citosol, organele, lipide ili proteine)<sup>102</sup>. Nekada se invaginacije mogu pretvoriti u vezikule koje zajedno sa zahvaćenim sadržajem bivaju razgrađene u lizozomu<sup>102</sup>. Uloga mikroautofagije nedovoljno je poznata a posebno u smislu njene potencijalne uloge u patogenezi neurodegenerativnih bolesti<sup>102</sup>. Ipak, pretpostavlja se da bi mikroautofagija mogla da ima važnu ulogu u degradaciji proteina u uslovima disfunkcije drugih proteolitičkih enzima<sup>102</sup>.

**Makroautofagije** je precizno regulisan ćelijski proces<sup>102</sup>. Ona se neprekidno odvija u ćeliji ali se može značajno pojačati u određenim okolnostima kao što je npr. gladovanje ćelije<sup>102</sup>. Makroautofagija započinje formiranjem fagofore, vezikule sa dvostrukom membranom koja okružuje deo citoplazme sa komponentama koje treba ukloniti<sup>102</sup>. Poreklo ove membrane nije poznato, a do sada postoje pretpostavke da nastaje od endoplazmatičnog retikuluma, Goldžijevog aparata, mitohondrija i plazma membrane<sup>102</sup>. Fagofora sazrevanjem postaje autofagozom koji je takođe okružen dvostrukom membranom<sup>102</sup>. Autofagozom se kreće duž mikrotubula i spaja se sa lizozomom i formira autofagolizozom, strukturu u kojoj se vrši hidroliza sadržaja pomoću enzima lizozoma<sup>102</sup> (slika 5). Proces formiranja autofagozoma

obuhvata nekoliko koraka: inicijaciju, nukleaciju, prepoznavanje „tovara“, ekspanziju i završetak, tj. stvaranje autofagolizozoma<sup>102</sup>.

Autofagozomi mogu da se formiraju u bilo kom delu ćelije nasuprot mikroautofagiji koja obuhvata samo delove ćelije u neposrednoj blizini lizozoma<sup>102</sup>. Ovo je posebno važno za neurone jer se autofagija može obavljati ne samo u perinuklearnom delu ćelije u kom se nalaze lizozomi, već i u udaljenim delovima ćelije, dendritima ili aksonu<sup>112</sup>. U tom smislu važan je aspekt kretanja autofagolizozoma iz udaljenih delova ćelije u perinuklearni region kao i mehanizam celularnog transporta koji podržava ovaj sistem<sup>102</sup>. Pored toga, sistem endozoma je važan za proces makroautofagije jer se vezikularne strukture iz endozomalnog puta i multivezikularna tela spajaju sa autofagozomom i formiraju amfizome koji omogućavaju sazrevanje vezikule i njenu fuziju sa lizozomom<sup>102</sup>. Dakle, poremećaj kasnog endozomalnog sistema kao i poremećaj celularnog transporta mogu oštetiti proces makroautofagije<sup>102</sup>.

Slika 5. Shematska prezentacija makroautofagije. Prilagođeno prema referenci 102.



Glavnu ulogu u regulaciji autofagije zauzima serin/treonin kinaza mTOR (eng. *mammalian target of rapamycin*). U uslovima gladovanja ćelije dolazi do indukcije autofagije kroz inhibiciju mTOR-a. mTOR je centralni regulator ćelijskog rasta koji ima ulogu u balansiranju između autofagije i ćelijskog rasta u

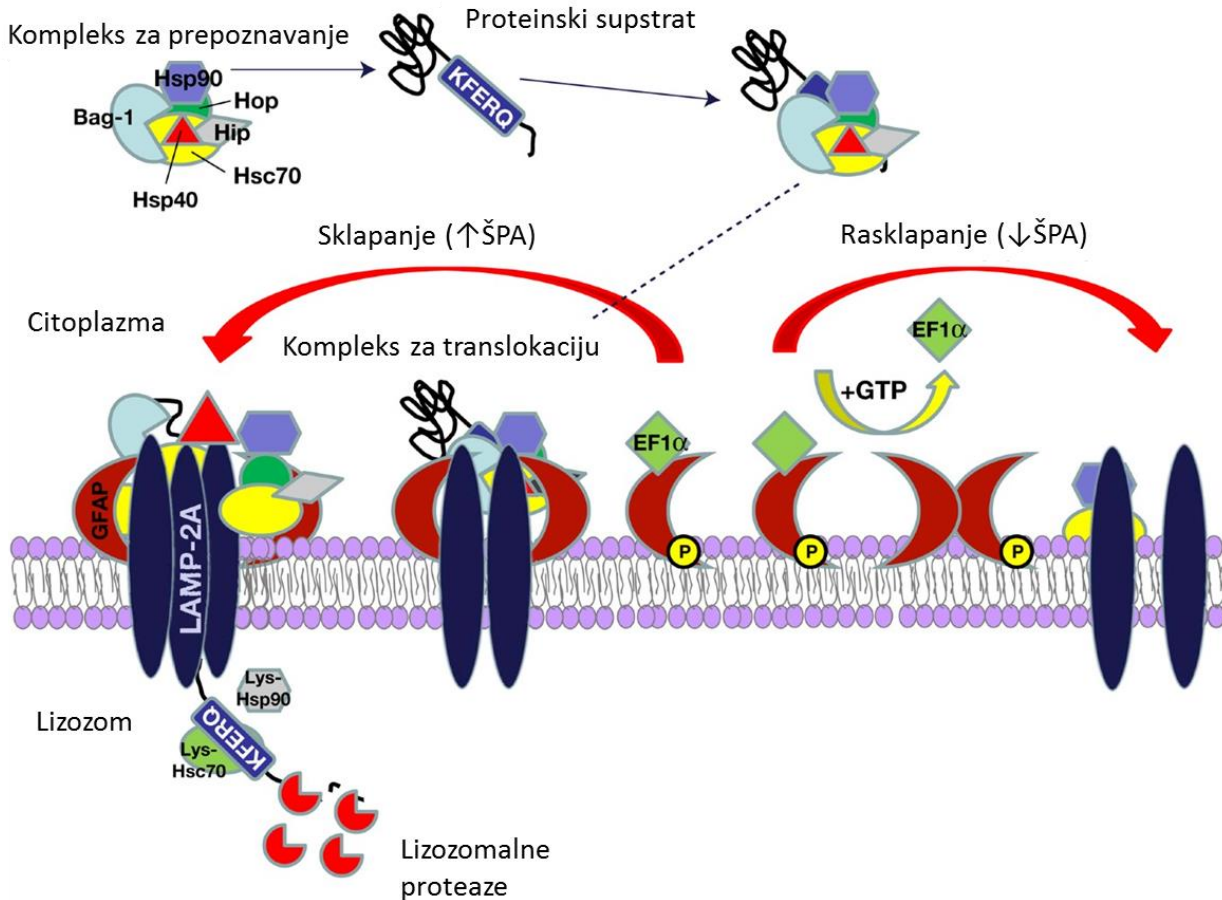
odnosu na nutritivni status ćelije, prisustvo faktora rasta ili stresora, ali treba naglasiti da proces indukcije autofagije može biti i mTOR nezavisan<sup>102,113</sup>. Identifikovano je mnogo gena čiji produkti učestvuju u kontroli sazrevanja autofagnih vezikula i koji se zajedničkim imenom zovu Atg geni (eng. *autophagy-related genes*)<sup>114</sup>. Oštećenje mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, povećana produkcija slobodnih radikala, kao i infektivni agensi, mogu biti trigeri za započinjanje autofagije<sup>114</sup>. Dokazano je da se makroautofagijom mogu selektivno degradirati različiti supstrati, kao npr. oštećene organele ili agregati proteina<sup>102</sup>. U ovom procesu važnu ulogu imaju proteini p62 i HDAC6 koji imaju sposobnost vezivanja poliubikvitinskim nizom obeleženih proteina i mitohondrija koje se potom degradiraju<sup>102</sup>. Protein p62 omogućava direktnu vezu autofagije i UPS što je od velikog značaja u trenucima prevelikog opterećenja UPS, kada obeleženi proteini mogu nastaviti razgradnju u lizozomalnom sistemu<sup>115</sup>.

Značaj autofagije za CNS ilustrovan je u istraživanju u kom je ablacijom Atg 5 ili Atg 7 gena kod miša došlo do pojave neurodegeneracije već u prvim mesecima života<sup>116,117</sup>. Pokazano je da stalno uklanjanje citosolnih proteina kroz bazalni proces autofagije prevenira akumulaciju abnormalnih proteina koji vode u neurodegeneraciju<sup>116</sup>. U neuronima je proces autofagije više zastupljen nego u drugim ćelijama; formiranje autofagozoma, maturacija i digestija su brze i efikasne, što bi moglo da objasni izraženu osetljivost neurona na oštećenje procesa autofagije<sup>102</sup>. Starenje je jedan od faktora koji smanjuje kapacitet proteinske razgradnje putem makroautofagije<sup>102</sup>.

**Šaperonima posredovana autofagija (ŠPA)** je selektivan mehanizam degradacije specifičnih citosolnih proteina u lizozomima; u ovom procesu ne dolazi do formiranja vezikula<sup>102</sup>. U procesu ŠPA, šaperoni i košaperoni prepoznaju citosolne proteine koji imaju specifičnu pentapeptidnu sekvencu KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) ili neku sličnu sekvencu, i potom ih translociraju do lizozomalne membrane gde se vezuju za drugi kompleks i internalizuju u lizozom, gde bivaju razgrađeni<sup>102</sup>. Dakle, supstrat ŠPA se transportuje preko lizozomalne membrane zahvaljujući učešću dva proteinska kompleksa: prvu grupu čine šaperoni i košaperoni i oni predstavljaju *kompleks za prepoznavanje tovara*, a drugu grupu čine lizozomalni proteini koji se nalaze na obe strane lizozomalne membrane i oni čine *kompleks za translokaciju tovara*. Citosolni Hsc70 (eng. *heat shock cognate protein of 70 kDa*) prepoznaje ciljni motiv na supstratu i zajedno sa šaperonima i košaperonima ga dovodi do površine lizozoma gde se vezuje za LAMP-2A. Glavni element lizozomalne membrane je LAMP-2A protein (eng. *lysosome-associated membrane protein type 2A*), integralni transmembranski protein koji može da formira oligomere i na taj način učestvuje u formiranju translokacione pore za prolazak ciljanog proteina. Stabilizacija translokacionog kompleksa ŠPA je modulirana pomoću glijalnog fibrilarnog kiselog proteina, GFAP (eng. *glial*

*fibrillary acidic protein*), i faktora elongacije 1  $\alpha$ -EF1 $\alpha$ . GFAP se vezuje za LAMP-2A i kompleks se stabilizuje. Međutim, formirajući dimer sa fosforilisanom formom (GFAP-P) dovodi do rasklapanja translokacionog kompleksa. EF1 $\alpha$  inhibira proces dimerizacije. EF1 $\alpha$  se uklanja sa lizosomalne membrane u prisustvu GTP, što dovodi do GFAP dimerizacije i rasklapanja translokacionog kompleksa<sup>102</sup> (slika 6).

Slika 6. Osnovne komponente šaperonima posredovane autofagije. Prilagođeno prema referenci 102.



Makroautofagija i ŠPA se preklapaju iako molekularne osnove ove veze nisu poznate<sup>102</sup>. Eksperimentalnom blokadom jednog od ovih puteva aktivira se drugi<sup>102</sup>. Starenje dovodi do smanjenja aktivnosti ŠPA i to zbog smanjenja nivoa LAMP-2A na lizosomalnoj membrani<sup>118</sup>. Malo se zna o ulozi ŠPA u nervnom sistemu, ali je dokazano da ŠPA jeste aktivan način proteolize u neuronima<sup>102</sup>.

#### 1.2.3.4. Poremećaj autofagije u Parkinsonovoj bolesti

Prisustvo ubikvitninskih inkluzija je zajednički imenilac za različite neurodegenerativne bolesti i predstavlja indikator disfunkcije proteolitičkih sistema u ćeliji<sup>102</sup>. Iako se prvo smatralo da je to dokaz

disfunkcije UPS, kasnije je pokazano da i poremećaj autofagije dovodi do istog ishoda<sup>116,117</sup>. Nagomilavanje autofagnih vakuola u neuronima uočava se u raznim neurodegenerativnim bolestima i može označavati indukciju autofagije ili pak nemogućnost da se proces makroautofagije kompletira<sup>102</sup>. Centralna dilema je da li je akumulacija autofagnih vakuola protektivni mehanizam ili put koji vodi u ćelijsku smrt. „Autofagna ćelijska smrt“ je po svojim karakteristikama različita od apoptoze i nekroze<sup>102</sup>.

Prisustvo autofagnih vakuola pokazano je ultrastrukturnom analizom tkiva mozga PB pacijentata<sup>119</sup>. U MPTP mišjem modelu PB takođe postoje autofagne vakuole kao i makroautofagne komponente unutar Levijevih tela<sup>120</sup>. U substanciji nigri PB pacijenata, u poređenju sa tkivom kontrola, nađen je manji broj lizosomalnih markera, kao što su katepsin D i LAMP-1<sup>121</sup>. Zaključak ove studije je da je degenerativni proces u PB u vezi sa proteazomnom i lizosomalnom disfunkcijom, poremećajem odstranjivanja proteina i akumulacijom proteina, što vodi u ćelijsku smrt<sup>121</sup>.

Smatra se da u PB postoji i oštećenje ŠPA u raznim delovima mozga, a ne samo u regionima gde postoji gubitak ćelija što je važno jer postoje dokazi da se  $\alpha$ -sinuklein u neuronima razgrađuje putem ŠPA, kao i makroautofagijom<sup>102,122</sup>. Kod genetski determinisane PB, tj. nosilaca mutacije u UCHL1 genu, postoje dokazi o afekciji UPS. Međutim, pokazano je da mutirana forma UCHL1, za razliku od neizmenjene forme proteina, aberantno reaguje sa LAMP-2A i Hsc70, na taj način inhibira ŠPA, zbog čega na kraju dolazi do povećanja nivoa  $\alpha$ -sinukleina<sup>111</sup>. Dalje, kod autozomno dominantne forme PB uzrokovane mutacijom u *LRRK2* genu, koji kodira protein kinazu (leucine rich repeat serine/threonine protein kinase 2 ili PARK8), smatra se da postoji poremećaj procesa autofagije u delu nakon formiranja autofagozoma<sup>102</sup>.

Mitohondrijalna disfunkcija je takođe povezivana sa patogeneom PB. Eliminacija oštećenih mitohondrija u post-mitotičkom neuronu je važna jer bi njihovo nagomilavanje moglo da dovede do eventualne ćelijske smrti<sup>123</sup>. Proces uklanjanja oštećenih mitohondrija makroautofagijom naziva se mitofagija<sup>102</sup>. Smatra se da je uloga *PARKIN* i *PINK1* proteina vezana za očuvanje integriteta mitohondrija. Mutacije u oba ova gena (*PARKIN* i *PINK1*) su uzročnici autozomno recesivnog parkinsonizma<sup>102,124</sup>. Usledili su dokazi da *PARKIN* selektivno učestvuje u promociji oštećenih mitohondrija autofagnoj degradaciji, a da je *PINK* neophodan za funkciju parkin proteina i deluje na taj način što parkin proteinu signalizira mitohondrijalnu disfunkciju<sup>125,126</sup>. Smatra se dakle, da u osnovi *PARKIN* i *PINK1* autozomno recesivne PB postoji poremećaj mitofagije<sup>102</sup>.

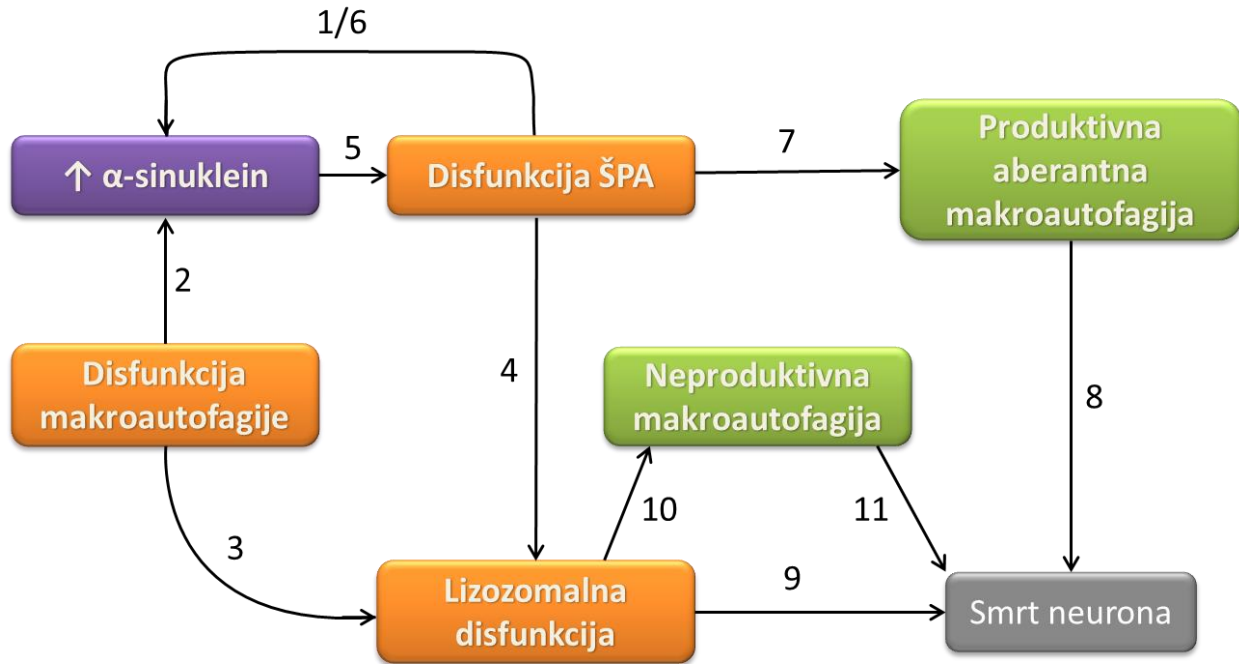
### 1.2.3.5. $\alpha$ -sinuklein i putevi autofagije

U početku se smatralo da je UPS glavni put razgradnje  $\alpha$ -sinukleina, a kasnije je pokazano da se razgradnja prevashodno vrši kroz lizosomalni put i to makroautofagijom i ŠPA<sup>102</sup>. Normalan (eng. *wild type*)  $\alpha$ -sinuklein je supstrat ŠPA u *in vitro* uslovima. Mutirani  $\alpha$ -sinuklein (A53T i A30P), snažno se vezuje za LAMP-2A i ne biva internalizovan u lizozom, i potom degradiran. Na taj način, mutirani  $\alpha$ -sinuklein se ponaša kao blokator preuzimanja u lizosome čime sprečava kako sopstvenu razgradnju, tako i razgradnju drugih supstrata<sup>127</sup>. Monomeri i dimeri  $\alpha$ -sinukleina razgrađuju se ŠPA za razliku od oligomera  $\alpha$ -sinukleina<sup>102,128</sup>. Posttranslacione modifikacije normalnog  $\alpha$ -sinukleina utiču na sposobnost ŠPA da razgrade  $\alpha$ -sinuklein i mogle bi biti u osnovi njegove agregacije i akumulacije u citosolu<sup>128</sup>. Oksidacija i nitracija  $\alpha$ -sinukleina umanjuju njegovu degradaciju kroz ŠPA, dok fosforilacija i dopaminska modifikacija  $\alpha$ -sinukleina kompletno zaustavljaju razgradnju  $\alpha$ -sinukleina<sup>128</sup>. Sve nabrojane modifikacije utiču na razgradnju samo  $\alpha$ -sinukleina, ali ne i na razgradnju drugih proteinskih supstrata, osim dopaminske modifikacije  $\alpha$ -sinukleina koja blokira razgradnju i drugih supstrata u ovom putu razgradnje, što bi moglo da objasni selektivnu degeneraciju dopaminergičkih neurona kod PB<sup>128</sup>. Dakle, postoji mogućnost da i sam  $\alpha$ -sinuklein ima toksičan efekat, jer se meša u put ŠPA kao i na ukrštanje dva glavna puta autofagije<sup>102</sup>. Zbog toga, izgleda da aberantni  $\alpha$ -sinuklein dovodi do povećanja akumulacije autofagozoma kroz lizosomalnu disfunkciju ili kroz specifično ciljanje ŠPA, ali postoje i dokazi da  $\alpha$ -sinuklein inhibira i ranu fazu formiranja autofagozoma<sup>102,129</sup>.

Na slici 7. prikazana je hipotetička shema veze  $\alpha$ -sinukleina i puteva autofagije. U ranoj fazi PB, disfunkcija ŠPA (strelica 1) ili makroautofagije (strelica 2) mogu dovesti do akumulacije  $\alpha$ -sinukleina. Disfunkcija ovih puteva može biti posledica starenja i paralelno dovodi do generalizovane lizosomalne disfunkcije (strelice 3 i 4), jer se lizozomi oslanjaju na ove sisteme kako bi efikasno degradirali intracelularne proteine. Nagomilavanje aberantnog  $\alpha$ -sinukleina tokom vremena može uzrokovati specifično oštećenje ŠPA (strelica 5), što dovodi do daljeg nagomilavanja  $\alpha$ -sinukleina (strelica 6). Disfunkcija ŠPA u ovom stadijumu vodi u aberantnu aktivaciju „produktivne“ makroautofagije (strelica 7), koja može dovesti do degeneracije neurona (strelica 8). Istovremeno progresija generalizovane lizosomalne disfunkcije može voditi u neuronalnu smrt bilo direktno (strelica 9), bilo kroz aberantnu akumulaciju autofagozoma koji se ne mogu razgraditi oštećenim lizozomima (tzv. „neproduktivna makroautofagija“) (strelica 10). Akumulacija nefunkcionalnog autofagozoma može dalje oštetiti neurone tj. smanjiti preživljavanje neurona (strelica 11). Krajni rezultat „produktivne“ i „neproduktivne“ makroautofagije u kasnom stadijumu bolesti vodi u ćelijsku smrt sa akumulacijom autofagozoma u umirućim neuronima<sup>102</sup>.



Slika 7. Patogeni efekat  $\alpha$ -sinukleina u neuronima putem interferencije sa šaperonima posredovanom autofagijom i makroautofagijom. Prilagođeno prema referenci 102.



#### 1.2.4. Lizosomalna disfunkcija i Parkinsonova bolest

Pretpostavlja se da poremećaj funkcije bilo kog od sistema autofagno-lizosomalnog puta, makroautofagije ili ŠPA, ili još uopštenije lizosomalna disfunkcija, mogu biti odgovorni za agregaciju  $\alpha$ -sinukleina i patogenezu PB<sup>130</sup>. U prilog ovoj hipotezi govore i dva genetski uslovljena poremećaja koji dovode do lizosomalne disfunkcije i pojave parkinsonizma. Prvi je mutacija u *ATP13A2* genu koji kodira za lizosomalnu ATP-azu, a koji može dovesti do pojave hereditarnog autozomno-recesivnog parkinsonizma sa demencijom i piramidnim degeneracijom (PARK9- Kufor-Rakeb sindrom)<sup>131</sup>. Opisani su i slučajevi PB ranog početka koji su heterozigotni nosioci mutacije u *ATP13A2* genu<sup>132</sup>. Drugi genetski determinisani uzrok je mutacija u genu koji kodira za lizosomalni enzim glukocerebrozidazu (*GBA* gen) koja je u homozigotnom obliku uzrok GB, a za koju je pokazano da povećava rizik za pojavu PB<sup>20</sup>. Pacijenti sa GB imaju 20 puta veći rizik za nastanak PB<sup>133</sup>. Kasnije je ustanovljeno da su PB pacijenti pet puta češće nosioci mutacije u *GBA* genu u poređenju sa zdravim kontrolama, što je potvrdilo da mutacije u ovom genu predstavljaju faktor rizika za PB<sup>20</sup>.

### 1.2.5. Mehanizam nastanka Parkinsonove bolesti udružene sa mutacijama u *GBA* genu

Kod autozomno recesivnih formi PB smatra se da dolazi do gubitka funkcije proteina dok kod autozomno dominantnih formi PB protein dobija novu ulogu (eng. *gain of function*). Iako se GB nasleđuje autozomno recesivno, *GBA* udruženi parkinsonizam ne prati Mendelski način nasleđivanja, pa su predložene obe teorije: gubitak funkcije i dobijanje nove funkcije proteina<sup>134</sup>.

Većina mutiranih alela dovodi do misfoldinga proteina što podržava teoriju dobijanja nove funkcije proteina kod postojanja *GBA* mutacije<sup>134</sup>. Pojava abnormalne konformacije proteina mogla bi da dovede do povećane agregacije  $\alpha$ -sinukleina ili do lizosomalne disfunkcije preopterećivanjem UPS ili oštećujući proces autofagije<sup>134</sup>. U ćelijskim modelima pokazano je da prekomerna ekspresija mutirane GC-aze značajno povećava akumulaciju  $\alpha$ -sinukleina i to u zavisnosti od doze, dok se kod korišćenja inhibitora GC-aze nivo  $\alpha$ -sinukleina ne povećava<sup>135</sup>. Mutirana GC-aza nalazi se u LT zajedno sa  $\alpha$ -sinukleinom<sup>136</sup>. Kod homozigotnih nosilaca mutacije 90% LT ima pozitivan signal za GC-azu, kod heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije u proseku 75% LT ima pozitivan signal za GC-azu, dok kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije manje od 10% LT ima pozitivan signal za normalnu GC-azu<sup>136</sup>. Ovakav nalaz podržava teoriju da je mehanizam nastanka PB uslovljen dobijanjem nove funkcije mutiranog proteina koji učestvuje u agregaciji  $\alpha$ -sinukleina<sup>136</sup>.

Sa druge strane, kod PB pacijenata opisane su Null *GBA* mutacije, što govori u prilog teorije o gubitku funkcije proteina<sup>134</sup>. Nosioци Null *GBA* mutacija su u većem riziku za nastanak parkinsonizma<sup>137</sup>. U Tabeli 6. prikazane su neke činjenice koje podržavaju svaku od teorija.

*GBA* mutacije mogu uticati i na razgradnju proteina u putu razgradnje udruženom sa endoplazmatičnim retikulumom (ERAD). Naime, folding proteina u endoplazmatičnom retikulumu (ER) se nadzire mehanizmom kontrole kvaliteta ER (ERQC). Proteini koji zadovolje kriterijume kvaliteta odlaze do finalne destinacije kroz sekretazni put, dok se ostali proteini razgrađuju kroz ERAD<sup>138</sup>. Za vreme procesa razgradnje kroz ERAD, šaperoni i udruženi faktori prepoznaju supstrat i potom se vrši njegova retrotranslokacija u citosol gde bivaju razgrađeni u UPS. U slučaju *GBA*-PB, pokazano je da je mutirana GC-aza, pre nego normalan enzim, supstrat za parkin posredovanu ERAD degradaciju, što blokira interakciju sa drugim parkin supstratima, utičući na njihovu razgradnju u UPS<sup>139</sup>.

Nema jasnih podataka o načinu na koji bi *GBA* mutacije uticale na proces mitofagije. Poznato je da se i kod PB i GB javlja defekt u ćelijskoj kontoli kvaliteta i da kod obe bolesti postoji nagomilavanje disfunkcionalnih mitohondrija, što naglašava važnost obrta ovih organela, jer u suprotnom, sa destrukci-

jom mitohondrija dolazi do oštećenja normalne energetske homeostaze, curenja reaktivnih molekula koji sadrže kiseonik (eng. *ROC- reactive oxygen species*) i potencijalne aktivacije apoptoze<sup>140</sup>.

Tabela 6. Argumenti za mehanizam dobijanja nove funkcije vs. gubitak funkcije za Parkinsonovu bolest udruženu sa mutacijama u *GBA* genu. Prilagođeno prema refernci 134.

Dobijanje nove funkcije	Gubitak funkcije
PB se javlja kod <i>GBA</i> heterozigota	Null <i>GBA</i> aleli se opisuju kod PB pacijenata
Većina <i>GBA</i> mutacija su <i>missence</i> što dovodi do misfoldinga proteina	U mišjem modelu GB nalaze se povišeni nivoi $\alpha$ -sinukleina
Mutirana glukocerebrozidaza nalazi se u LT što ukazuje na oligomerizaciju $\alpha$ -sinukleina ili poremećaj njegove degradacije	Lipidni raftovi i ceramidi imaju ulogu u patogenezi PB
Većina pacijenta sa GB ne razvija PB, uprkos niskim vrednostima aktivnosti enzima glukocerebrozidaze	Hemijska inhibicija glukocerebrozidaze kod miša i u ćelijama dovodi do povećanja koncentracije $\alpha$ -sinukleina
Mutirana glukocerebrozidaza se akumulira u endoplazmatskom retikulumu i opterećuje proteazomni i lizosomalni sistem	Glukocerebrozidaza i glikozilsfingozin mogu da se akumuliraju u lizozomu i tako utiču na njegovu funkciju

Jedna od predloženih teorija *GBA* udružene PB, pretpostavlja transćelijsko širenje agregata  $\alpha$ -sinukleina mehanizmom koji je sličan širenju priona. U tom slučaju makrofagi bi mogli da budu nosioci ovih agregata obzirom da su oni najviše oštećeni u GB. Kako heterozigotni nosioci *GBA* mutacije nemaju oštećen makrofagni sistem, smatra se da je potrebno da postoji i „*second hit*“, nova somatska mutacija u makrofagu koji bi inicirao agregaciju  $\alpha$ -sinukleina i njegovo širenje<sup>141</sup>.

Akumulacija supstrata u ćelijskim modelima GB dovodi do saturacije lizosomalnog puta glukocerebrozida, usmeravajući ga na druge ćelijske delove, gde se akumulira, pre svega u lipidne mikrodomene (raftove), a slično se događa i sa drugim sfingolipidima<sup>123</sup>. Lipidni raftovi regulišu sortiranje i prenos proteina i lipida, a poremećaj funkcije lipidnih raftova usled poremećenog sastava lipida, može uticati i na zakrivljenost membrane kao i na procese sortiranja i prenošenja proteina i lipida<sup>123</sup>. Indirektan dokaz za ovo je farmakološki model GB gde je korišćen specifičan inhibitor GC-aze u mišjem i ćelijskom modelu, što je dovelo do povećanog nivoa i agregacije  $\alpha$ -sinukleina<sup>123,142</sup>. Postoji i alternativno objašnjenje: povećanje glukocerebrozida uzrokuje aktivaciju rijanoidnog receptora, što dovodi do povećanja slobodnog intracelularnog kalcijuma, a to na kraju vodi u ćelijsku smrt i parkinsonizam<sup>141,143</sup>. Ostaje nejasno kako bi ova teorija mogla da se primeni na heterozigotne nosioce *GBA* mutacije.

Cela prethodna diskusija bazirala se na pokušaju da se objasni veza PB i nosilaštva homozigotnih ili heterozigotnih mutacija u *GBA* genu. Postavlja se pitanje da li je enzimski sistem GC-aze od značaja u patogenezi sporadične PB? Pokazano je u istraživanju na tkivu mozga PB pacijenata koji nisu nosioci *GBA* mutacije da je nivo enzima glukocerebrozidaze i enzimska aktivnost redukovana u ranom stadijumu PB u regionima mozga sa povišenim nivoom  $\alpha$ -sinukleina, dok je *GBA1* ekspresija informacione RNK neselektivno redukovana u svim delovima mozga PB pacijenata. Selektivan gubitak lizosomalne GC-aze je u direktnoj vezi sa smanjenom ŠPA, povećanim nivoom  $\alpha$ -sinukleina i smanjenjem ceramida. Smatra se da je ovo dokaz da je deficit GC-aze kod sporadične PB u vezi sa abnormalnom akumulacijom  $\alpha$ -sinukleina kroz poremećaj ŠPA i lipidnog metabolizma<sup>144</sup>.

Tema postaje kompleksnija nedavnim dokazom da kod LIMP-2 deficijentnih miševa dolazi do nagomilavanja  $\alpha$ -sinukleina, razvoja neurološkog deficita i prerane smrti. LIMP-2 je receptor za lizosomalni transport GC-aze. Mutacije u genu koji kodira za LIMP uzrokuju sindrom akcionog mioklonusa sa bubrežnom insuficijencijom, kao i progresivnu miokloničku epilepsiju udruženu sa bubrežnom slabošću, ataksijom i nagomilavanjem još uvek neidentifikovane supstance u mozgu, što sve dovodi do prerane smrti. Kod ovih pacijenata ne dolazi do transporta GC-aze u lizosome već je ona lokalizovana u ER. U mozgu LIMP-2 deficijentnih miševa dokazana je značajna redukcija aktivnosti GC-aze, što je dovelo do nagomilavanja lipida, poremećaja autofagije i lizosomalne funkcije, akumulacije  $\alpha$ -sinukleina sa posledičnim neurotoksičnim efektom na dopaminergičke neurone. Heterologa ekspresija LIMP-2 ubrzavala je uklanjanje  $\alpha$ -sinukleina kod preterane ekspresije, verovatno kroz povećanje aktivnosti lizosomalne GC-aze. U mozgu PB pacijenata, nivo LIMP-2 je bio povećan, verovatno da bi kompenzovao deficijenciju GC-aze. Smatra se zato da LIMP-2 zauzima važno mesto u patogenezi i potencijalnoj terapiji PB, jer bi se njegovom ekspresijom moglo uticati na povećanje aktivnosti GC-aze<sup>145</sup>.

### 1.3. Odnos Goševove i Parkinsonove bolesti

#### 1.3.1. Bolesti lizosomalnog deponovanja i Parkinsonova bolest

PB se opisuje, osim kod GB, i kod drugih bolesti lizosomalnog deponovanja (BLD) ali je ova veza manje dokumentovana u literaturi, moguće samo zbog toga što je broj pacijenata sa drugim BLD manji<sup>23</sup>.

Postoji više mogućih razloga za objašnjenje malog broja opserviranih veza između drugih BLD i PB:

- PB pacijenti se obično ne ispituju u smislu dijagnoze BLD;

- neke BLD veoma su retke i ostaju nedijagnostikovane, delom zbog toga što postoji velika varijabilnost u kliničkoj slici i godinama početka bolesti;
- simptomi PB mogu biti samo deo kliničkog spektra BLD kod kojih postoje teška neurološka oštećenja;
- pacijenti sa infantilnim početkom BLD ne dožive starosnu dob u kojoj bi se potencijalno javili simptomi PB, tj. pacijenti sa teškim formama BLD obično imaju akutno oštećenje mozga i umiru unutar prve godine života do kada gubitak dopaminergičkih neurona nije dovoljan da bi se razvila PB.

Zbog svega navedenog, dijagnostikovanje PB kod pacijenata sa BLD je retko i verovatno ograničeno samo na forme bolesti kod odraslih<sup>23</sup>.

Spisak BLD kod kojih su opisani znaci parkinsonizma prikazane su u Tabeli 7., u koju nije uvršćena GB.

Tabela 7. Bolesti lizozomalnog deponovanja kod kojih su opisani znaci parkinsonizma. Prilagođeno prema referenci 23.

Bolest	Oštećen protein	Lizozomalni depozit	PB kod pacijenta ili nosioca mutacije	PB kod rođaka BLD pacijenta	Patologija u SN	$\alpha$ -sinuklein/ LT
GM1 gangliozidoza	$\beta$ -galaktozidaza	GM1	+			
Tay-Sachs-ova bolest	$\beta$ -heksozaminidaza A		+	+	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>
Sandhoff-ova bolest	$\beta$ -heksozaminidaza A i B				<sup>b</sup>	<sup>b</sup>
MPS II	iduronat-2-sulfataza	Deratan sulfat/ heparan sulfat			+	<sup>c</sup> / <sup>-d</sup>
MPS IIIA	heparan N sulfataza	heparan sulfat				<sup>f</sup>
MPS IIIB	N-acetil- $\alpha$ -glukozaminidaza	heparan sulfat			+	<sup>c</sup> / <sup>-d</sup>
MPS IVA	N-acetilgalaktozamin-6-sulfat sulfataza	Keratan sulfat, hondroitin-6-sulfat				
MPS IVB	$\beta$ -galaktozidaza	keratan sulfat				
Niemann Pick tip C	NPC 1 i 2	holesterol i sfingolipidi	+	+	+	+
NCL1	protein palmitoil tioesteraza 1	lipidni tioestri	+			
NCL2	tripeptidil aminopeptidaza 1	subjedinica c mitohondrijalne ATP sintetaze	+			
NCL3	CLN3 protein, lizozomalni transmembranski protein	subjedinica c mitohondrijalne ATP sintetaze	+		+	
NCL4B	nije poznat	subjedinica c mitohondrijalne ATP sintetaze	+			
NCL10	katepsin D	sapozini A i D	+			+
Metahromatska leukodistrofija	arilsulfataza A	sulfatirani glikolipidi				+
$\beta$ -galaktosijalidoza	katepsin A	sialil-oligosaharidi				+
$\alpha$ -manozidoza	$\alpha$ -manozidaza	oligosaharidi koji sadrže manozu				+
$\beta$ -manozidoza	$\beta$ -manozidaza	Man( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc				
Multipla sulfatazna deficijencija	formilglicin generišući enzim	sulfatidi			+	+
Niemann Pick tip B	sfingomijelinaze	SM	+			
Fabrijeva bolest	$\alpha$ -galaktozidaza A	Gb3	+		+	
Sijalidoza	sijalidaza	sialil-oligosaharidi i sialilglikopeptidi				
Bolest deponovanja sijalične kiseline	sijalin	sijalična kiselina				

Legenda: + znači da je u studijama pokazano prisustvo posmatrane odlike, a – da nije pokazano prisustvo posmatrane odlike. Ukoliko je polje prazno to znači da nema dostupnih podataka. a-podaci dobijeni iz eksperimenata na mišjim modelima, b- podaci dobijeni analizom pacijenata, c- fosforilisani  $\alpha$ -sinuklein, d-LT. Za bolesti kod kojih su sva polja prazna postoje drugi dokazi kao npr. agregata ubikvitiniranih proteina, smanjenja enzimске aktivnosti ili USH-L1 nishodne regulacije. NCL- neuroanlna ceroidna lipofusinoza.

### 1.3.2. Rizici za nastanak PB kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacija

Incidencija PB među GB pacijentima je 6-17 puta veća nego u kontrolnim populacijama<sup>146</sup>. Prilagođeni rizik za nastanak PB kod GB pacijenata u toku života je 21,4 puta veći nego u opštoj populaciji<sup>133</sup>. Na individualnom nivou, verovatnoća da će GB tip 1 pacijent razviti PB pre 70. godine je 5-7%, odnosno 9-12% pre 80. godine<sup>146</sup>. Slično je i u studiji Alcalaya i saradnika<sup>147</sup> na populaciji Aškenazi Jevreja gde je procenjen za starost specifičan rizik u 60. i 80. godini 4,7% i 9,1% među GB pacijentima, 1,5% i 7,7% među heterozigotnim nosiocima *GBA* mutacije i 0,7% i 2,1% među onima koji nemaju mutacije u *GBA* genu. Rizik za nastanak PB je veći kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije nego kod ispitanika bez *GBA* mutacije, a statistički značajne razlike nije bilo u poređenju GB grupe sa grupom heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije<sup>147</sup>. Dakle, *GBA* homozigotni i heterozigotni nosioci imaju povećan starosno specifični rizik za nastanak PB u poređenju sa kontrolnom grupom<sup>147</sup>. Smatra se da su nosioci teških *GBA* mutacija u većem riziku za nastanak PB<sup>137</sup>.

Iako se u literaturi uzima da su *GBA* mutacije snažan faktor rizika za nastanak PB, neki autori, međutim, smatraju da se radi o autozomno dominantnom nasleđivanju sa smanjenom penetrantnošću<sup>148</sup>. Anheim i saradnici<sup>148</sup> su procenili da je penetrantnost u dominantnom modelu nasleđivanja 7,6%, 13,7%, 21,4%, i 29,7% u 50., 60., 70. i 80. godini redom.

I pored svih napred nabrojanih rizika, većina GB pacijenata kao i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije nikada ne razvije PB, pa nije zauzet stav u vezi sa genetskim savetovanjem srodnika ovih osoba<sup>134</sup>.

### 1.3.3. Gošeova bolest i Parkinsonova bolest

Iako se prema klasičnoj klasifikaciji GB tip 1 smatra neneuropatskom formom, ranije pomenuta studija Cherin i saradnika<sup>44</sup> pokazala je da od 105 GB pacijenata 49% ima neki neurološki simptom- PB imala su četiri pacijenta (4%), a neki znak parkinsonizma 22 pacijenta (21%). U Danskom registru GB, 27 od 75 pacijenata (36%) imalo je neku neurološku dijagnozu, a jedan pacijent je imao PB<sup>149</sup>.

Prema podacima dobijenim iz Internacionalanog registra pacijenata sa GB, od 4051 pacijenta, 68 je imalo znake PB (GB-PB)<sup>146</sup>, a u Francuskom GB registru PB je imalo 11 od 485 GB pacijenata (2%)<sup>150</sup>. Odnos polova kod GB-PB pacijenata je 1.3:1 (muški:ženski), što je drugačije nego u opštoj populaciji gde je 2:1<sup>146</sup>. Kod 90% pacijenata dijagnoza GB je postavljena pre pojave parkinsonizma iako je poznato i obrnuto, da PB prethodi pojavi kliničkih manifestacija GB<sup>15,146,151</sup>.

PB kod GB pacijenata počinje u ranijem životnom dobu, prosečno u 49. godini prema jednom, tj. 57. godini prema drugom saopštenju, dok je početak sporadične PB prosečno u 60. godini u opštoj populaciji<sup>11,146,150</sup>. U populaciji Aškenazi Jevreja početak PB raniji je kod GB pacijenata (u 54,2 godine) nego kod heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije (65,2 godine)<sup>147</sup>.

Klinička slika PB kod većine GB pacijenata je slična tipičnoj PB i uključuje asimetričan početak bolesti, tremor u miru, rigiditet, bradikineziju, dobar odgovor na L-dopu i hirurške intervencije<sup>146,152</sup>. Praćenjem pacijenata su opservirane očekivane komplikacije PB: wearing off, diskinezije i motorne fluktuacije<sup>152</sup>. Međutim, pored tipičnih, opisuju se i atipične manifestacije PB kod GB pacijenata. Prva saopštenja kažu da je kod GB klinička prezentacija parkinsonizma teška i atipična, progresija bolesti agresivna, a odgovor na terapiju slab<sup>14</sup>. Od atipičnih karakteristika opisuju se rani padovi, demencija i kognitivna disfunkcija koja podseća na demenciju sa Levijevim telima, akcioni tremor i umeren odgovor na L-dopu, a na nivou slučaja se opisuju fenotipovi nalik kortikobazalnoj degeneraciji i težak kognitivni poremećaj sa akinetskim mutizmom i kortikalnom atrofijom<sup>146,150,153,154</sup>. U pregledu literature, Alonso-Canovas i saradnici su pronašli da 19 od 48 GB-PB pacijenata ima kognitivni poremećaj, tri demenciju i poremećaj pogleda u horizontalnoj ravni, a dva mioklonus<sup>153</sup>. Podaci o terapijskom odgovoru na L-dopu nisu konzistentni: novije studije pokazuju da je dobar ili odličan kao i kod idiopatske PB<sup>134</sup>.

Poređenjem GB pacijenata sa i bez parkinsonizma utvrđeno je da oni sa parkinsonizmom imaju blažu formu GB jer imaju manju prevalenciju anemije, trend manje hepatomegalije i trombocitopenije<sup>146</sup>. GB-PB pacijenti bili su stariji u trenutku postavljanja dijagnoze GB, kasnije su dobili terapiju za GB i umirali su kasnije, prosečno u 72. godini, u poređenju sa GB pacijentima bez parkinsonizma, koji su umirali prosečno u 63. godini<sup>146</sup>. Skeletne manifestacije su bile slične u obe grupe GB, nezavisno od prisustva parkinsonizma<sup>146</sup>. Međutim, u studiji Bultrona i saradnika<sup>133</sup> zaključeno je da je fenotip GB teži kod pacijenata sa parkinsonizmom i to zbog većeg skora po Hermanu (indeks opšte težine bolesti i skor koštane zahvaćenosti).

Primena supstitucione enzimske terapije za GB ne prevenira nastanak PB, ne utiče na simptome PB i uprkos njenoj primeni dolazi do progresije parkinsonizma, što je verovatno posledica nemogućnosti enzimske terapije pa prođe krvno-moždanu barijeru<sup>146,150,152</sup>. Miglustat je lek koji se takođe koristi u terapiji GB i prolazi krvno-moždanu barijeru, ali nema jasnih podataka o uticaju ovog leka na simptome parkinsonizma kod GB pacijenata<sup>150,155,156</sup>.



### 1.3.4. Heterozigotno nosilaštvo *GBA* mutacije i Parkinsonova bolest

Generalni je stav da PB kod heterozigotnih nosilaca mutacija u *GBA* genu (*GBA*-PB) počinje ranije nego kod pacijenata bez mutacije<sup>134</sup>. U multicentričnoj studiji koja je analizirala preko 5000 PB pacijenata, uključujući između ostalih Aškenazi Jevreje, prosečna starost na početku PB kod nosilaca *GBA* mutacija je bila 54,9 godina, a kod pacijenata bez mutacije 58,8 godina<sup>20</sup>. U studiji Neumann i saradnika, od 790 PB pacijenata koji nisu pripadali populaciji Aškenazi Jevreja, 33 su bili heterozigotni nosioci mutacija u *GBA* genu sa početkom PB prosečno u 52,7 godina, dok je početak bolesti kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije bio u proseku u 58,7 godina<sup>157</sup>. Međutim, u studiji sprovedenoj u Španiji, godine početka bolesti nisu se statistički značajno razlikovale: početak *GBA*-PB je bio prosečno u 54,2 godine, a u PB grupi bez mutacije u 56,5 godina<sup>158</sup>. Smatra se da nosioci „teških“ *GBA* mutacija imaju raniji početak bolesti od nosilaca „lakih“ mutacija<sup>137</sup>. Podaci o polnoj distribuciji kod *GBA*-PD nisu konkluzivni, jer se dobijaju različiti odnosi u studijama<sup>158</sup>.

Što se tiče motornog aspekta PB, razlika nije pronađena u skorovima na skali *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) i stadijumu PB ocenjenom pomoću skale prema autorima Hoehn i Yahr (H&Y)<sup>158,159</sup>. U nekim studijama je pokazano da *GBA*-PB pacijenti imaju manju incidenciju bradikinezije i tremora u miru<sup>20</sup>. U studiji Setó-Salvia i saradnika, *GBA*-PB pacijenti imali su češće intermedijarnu formu PB (prema klasifikaciji koja obuhvata još i tremor dominantnu formu i formu sa posturalnom nestabilnošću i poremećajem hoda)<sup>158</sup>.

U studiji Seto-Salvia i saradnika, demencija je bila češća kod *GBA*-PB (50%) nego kod PB pacijenata bez mutacija (24%). Zaključeno je da bi prisustvo mutacija u *GBA* genu moglo da utiče na pojavu demencije kod PB pacijenata sa odnosom šansi (OR) 5,8<sup>158</sup>. Slični rezultati su opisani i u studiji Neumann i saradnika koji su pronašli kognitivno oštećenje ili demenciju kod 48%, a halucinacije kod 45%<sup>157</sup>. Kognitivni deficit češći je kod pacijenata koji su nosioci „teške“ *GBA* mutacije u poređenju sa nosiocima „lake“ mutacije<sup>137</sup>. U svetlu razmatranja odnosa demencije i *GBA* mutacija, važno je napomenuti da se *GBA* mutacije dovode u vezu i sa drugim sinukleinopatijama, kao što je demencija sa Levijevim telima (DLT). U velikoj multicentričnoj studiji Nallsa i saradnika analiziran je *GBA* gen kod 721 pacijenta sa DLT i 151 sa PB sa demencijom (PBD), i pokazano je poređenjem sa kontrolama da je odnos šansi za *GBA* mutaciju u DLT 8,28 a za PBD 6,48<sup>21</sup>.

*GBA*-PB pacijenti imaju češće i teže nemotorne simptome bolesti, kako neuropsihijatrijske tako i autonomne<sup>160</sup>. Ovi pacijenti, u poređenju sa sPB imaju veće skorove na skalama za depresiju, apatiju,

anksioznost, poremećaje spavanja, apetita i ishrane, kao i ortostatsku simptomatologiju, urinarnu i seksualnu disfunkciju i poremećaj funkcije creva<sup>160</sup>.

U studijama praćenja pokazano je da GBA-PB pacijenti imaju bržu progresiju bolesti merenu H&Y skalom, kao i bržu progresiju demencije u poređenju sa sPB, a iznenađujući je bio nalaz da je osim mutacija i prisustvo *GBA* polimorfizama (E326K, E388K, T369M i L119L) imalo uticaj na bržu progresiju motornih simptoma PB<sup>161</sup>.

Positivna porodična anamneza je, prema najvećoj multicentričnoj studiji, značajno češća kod GBA-PB pacijenata (24%) u poređenju sa PB pacijentima bez *GBA* mutacije (18%), dok je u studiji sprovedenoj u Španiji čak 50% GBA-PB imalo rođaka prvog stepena sa PB nasuprot 38,9% PB pacijenata bez *GBA* mutacije ali ova razlika nije bila statistički značajna<sup>20,158</sup>. Obrnuto, PB pacijenti sa pozitivnom porodičnom anamnezom za PB, češće su bili nosioci *GBA* mutacije nego sporadični PB pacijenti bez pozitivne porodične anamneze za PB<sup>162</sup>.

Terapijski odgovor GBA-PB na L-dopu je dobar i na njega ne utiče *GBA* status<sup>158</sup>.

### 1.3.5. Neuropatološki nalaz Parkinsonove bolesti udružene sa *GBA* mutacijama

Histopatološkim pregledom mozga GB tip 1 pacijenta uočava se astrogliaza, bez značajnog gubitka neurona koji se viđa kod GB tip 2 i tip 3<sup>163</sup>. Kod *GBA* udruženog parkinsonizma nalaze se  $\alpha$ -sinuklein-imunoreaktivni kortikalni tip LT, „brainstem“ tip LT i Levijevi neuriti<sup>134</sup>. LT se nalaze i atipično, u hipokampalnim regionima CA2-4 kod GB pacijenata sa parkinsonizmom<sup>163</sup>. Distribucija LT je difuznija kod nosilaca *GBA* mutacije i zahvata i kortikalne regione<sup>157,164</sup>. Postoje i suprotni rezultati koji pokazuju da *GBA* status nije značajno povezan sa gustinom kortikalnih LT nakon mečovanja GBA-PB sa sPB po polu, godinama početka bolesti, godinama smrti i prisustvu demencije<sup>165</sup>. GC-aza prisutna je u LT i to prosečno u 75% LT kod pacijenata sa *GBA* mutacijama (homozigoti i heterozigoti) za razliku od 10% LT kod sPB pacijenata koji nemaju mutaciju u *GBA* genu<sup>136</sup>.

## 1.4. Imidžing studije u Parkinsonovoj bolesti

Iako je dijagnoza PB klinička, imidžing studije mogu biti od pomoći i one obuhvataju različite tehnologije koje prikazuju strukturne ili funkcionalne promene u mozgu ovih pacijenata. Dijagnostička, klinička i istraživačka vrednost dobijenih nalaza je varijabilna u zavisnosti od primenjenije tehnologije neurovizualizacije, o čemu slede detaljnija objašnjenja u nastavku teksta koji će se bazirati na tri različite tehnologije: transkranijalnu parenhimsku sonografiju mozga (TKS), nuklearnu magnetnu rezonancu (MR) i DaT-SPECT.

### 1.4.1. Transkranijalna parenhimska sonografija mozga

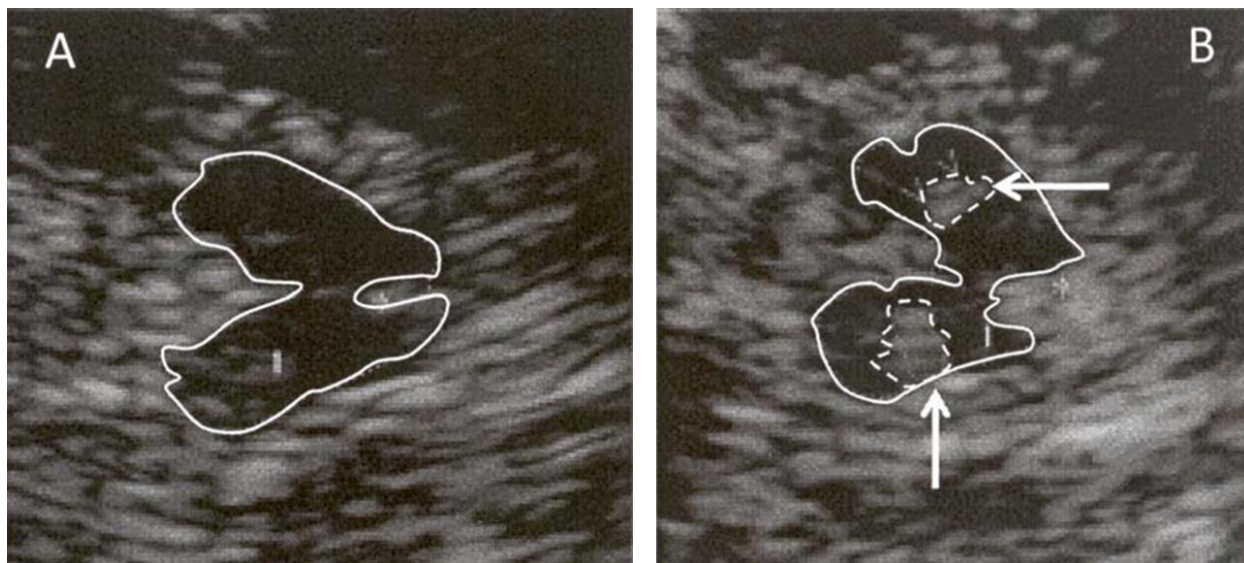
Do kasnih 80.-ih godina prošlog veka smatralo se da vizualizacija intrakranijumskih struktura ultrazvukom (UZ) nije moguća zbog lobanje koja je prepreka na putu UZ talasa<sup>166</sup>. Međutim, ranih 90.-ih godina je pokazano da B-mod transkranijalne sonografije (TKS) omogućava vizualizaciju glavnih parenhimskih struktura i lezija od nivoa ponsa do parijetalnog režnja, kao i merenje ventrikularnog sistema<sup>166</sup>.

Fizički princip vizualizacije kod TKS je refleksija ultrazvučnih talasa sa površina različite akustičke impedance, što se razlikuje od drugih imidžing metoda, pa se zbog toga dobija komplementaran imidžing mozga koji donosi nove informacije<sup>167</sup>. U poređenju sa konvencionalnim imidžing metodama kao što su kompjuterizovana tomografija (CT) i MR mozga, TKS ima prednosti u smislu neinvazivnosti, cene, kratkog trajanja pregleda, mobilnosti aparata, mogućnosti jednostavnog ponavljanja pregleda i male zavisnosti od komplikacije pacijenta. Mane TKS su zavisnost od veštine ispitivača i transparentnosti temporalnog koštanog prozora, pa ovaj pregled nije moguć ili je parcijalno moguć kod 10-20% ispitanika<sup>167</sup>.

Becker i saradnici su 1995. godine prvi opisali karakterističan nalaz TKS pregleda kod PB pacijenata, tj. povećanje ehogenog signala (hiperehogenost) supstancije nigre (SN)<sup>168</sup> (slika 8). Nekoliko studija je pokazalo da se hiperehogenost SN može videti kod 90% PB pacijenata ali i kod 8–14% zdravih osoba uzrasta 16–83 godine<sup>166,169</sup>. Ovakav nalaz kod zdravih osoba nekada se smatra biomarkerom predispozicije za razvoj PB, iako po ovom pitanju nije zauzet jasan stav. U prilog ovoj ideji govori nalaz motorne usporenosti i drugih blagih ekstrapiramidnih simptoma kod ovih ispitanika, kao i češća pojava depresije i hiposmije koje se smatraju premotornim znacima PB, zbog čega TKS može imati ulogu u detekciji premotorne faze PB<sup>166</sup>.

Razlog pojave hiperehogenosti SN pri TKS pregledu nije jasan. Pokazano je u animalnim i postmortem studijama da povišena koncentracija gvožđa u tkivu korelira sa povećanom ehogenošću SN<sup>166,170</sup>. Ipak, povećana koncentracija gvožđa verovatno ne može biti jedino objašnjenje za hiperehogenost SN, posebno ne kod PB pacijenata, već i drugi faktori, kao što su proteini koji vezuju gvožđe<sup>166</sup>. Smatra se da se gvožđe ne vezuje za feritin već za druge proteine tkiva<sup>171</sup>. Postojanje varijacije sekvence gena za ceruloplazmin igra ulogu u regulaciju metabolizma gvožđa<sup>171</sup>. Aktivacija mikroglije, koja sadrži velike količine feritina, izgleda da takođe ima ulogu u nastanku hiperehogenosti SN<sup>172,173</sup>. Povišena vrednost gvožđa u SN kod PB može biti odraz disfunkcije poremećene homeostaze gvožđa u mozgu, moguće kao sekundarni fenomen u kaskadi neuronalne degeneracije<sup>174</sup>.

Slika 8. Prikaz mezencefalona pomoću transkranijalne parenhimske sonografije mozga. Prilagođeno prema referenci 169.



Legenda: Presek mezencefalona (A) kod zdravog ispitanika i (B) kod bolesnika obolelog od Parkinsonove bolesti sa obostranom izraženom hiperehogenošću supstancije nigre (ocrtana površina označena strelicom).

Senzitivnost TKS, dobijena poređenjem nalaza PB pacijenata i zdravih kontrola, je 85,7%, a specifičnost 82,9%, pozitivna prediktivna vrednost 85,7%, a negativna prediktivna vrednost 82,9%, pa se smatra da je TKS važan instrument u smislu dijagnostike PB<sup>175</sup>. Odsustvo hiperehogenosti SN može poslužiti u diferencijalnoj dijagnozi, jer se takav nalaz može naći kod esencijalnog tremora, parkinsonog aspekta depresivnog poremećaja i distonije responsivne na L-dopu<sup>166</sup>. Od posebnog značaja je pomoć TKS u diferencijalnoj dijagnozi PB prema parkinsonizmima. Gaenslen i saradnici su praćenjem pacijenata sa nejasnim kliničkim znacima parkinsonizma pokazali da je TKS nalaz govorio u prilog idiopatske PB sa senzitivnošću 90,7% i specifičnošću 82,4%, pozitivnom prediktivnom vrednošću 92,9% i tačnošću klasifikacije 88,3%<sup>176</sup>.

Površina hiperehogenosti SN veća je na kontralateralnoj strani u odnosu na stranu tela na kojoj su simptomi PB izraženiji<sup>177</sup>. Ova površina se ne menja sa napredovanjem bolesti zbog čega ne predstavlja marker težine PB već marker nigrostijatne vulnerabilnosti, ne odražava stepen nigrostijatne degeneracije, niti klinički stepen progresije PB<sup>172,178</sup>. Oprečni su nalazi u smislu ehogenosti SN kod različitih kliničkih podtipova PB: u nekim studijama nije pronađena razlika, dok je u drugim opisano da je izražena bilateralna ehogenost SN povezana sa akinetskom i mešovitom formom PB pre nego sa tremor-

skom formom PB<sup>169,171</sup>. PB pacijenti sa izraženijim signalom imaju raniji početak bolesti i češće motorne komplikacije, tj. diskinezije, fluktuacije i frizing hoda<sup>171,177</sup>.

Sledeći važan nalaz pregledom moždanog parenhima TKS je smanjena ehogenost raphe jedara moždanog stabla kod 40-60% PB pacijenata koja je u nekim studijama povezana sa urgencijom mikcije<sup>166</sup> i sa depresijom kod PB<sup>171</sup>. Osim kod PB, smanjena ehogenost raphe jedara se opisuje i kod 50-70% pacijenata sa unipolarnom depresijom<sup>166</sup> i kod 6-9% zdravih ispitanika<sup>179</sup>.

#### 1.4.2. Magnetna rezonanca

Dijagnostički značaj pregleda PB pacijenata konvencionalnom magnetnom rezonancom (MR) je nejasan jer ova tehnika nije dovoljno senzitivna da prikaže anatomske i funkcionalne promene, posebno u ranom stadijumu bolesti<sup>180</sup>. Normalan nalaz MR pregleda postoji čak i kod pacijenata koji dugo godina boluju od idiopatske PB<sup>180</sup>. Standardni MR pregled koristi se u cilju diferencijalne dijagnoze PB i atipičnih parkinsonizama, kao i da bi se isključili sekundarni uzroci parkinsonizma, pre svega vaskularni<sup>180</sup>. Sa druge strane, nekonvencionalne MR tehnike kao npr. MR spektroskopija, difuzioni tenzorski imidžing, funkcionalna MR itd., omogućavaju detekciju strukturnih, funkcionalnih i metaboličkih promena koje ne samo da su važne u smislu diferencijalne dijagnoze, već su značajne i u smislu rane dijagnoze, ishoda i terapijskog monitoringa PB<sup>180</sup>. U daljem tekstu detaljnije će biti opisane dve nekonvencionalne MR metode, difuzioni tenzorski imidžing (DTI) i morfometrija zasnovana na vokselima.

DTI MR pregled zasniva se na nasumičnim translatorim pokretima molekula koji se dešavaju sekundarno, zbog termalne energije, a na njih utiču i mnogobrojni mikrostrukturni faktori uključujući organele, neurofibrile i membrane. Difuzija može biti relativno direkcionalna (anizotropna) ili se može dešavati u svim pravcima (izotropna). Stepem i pravac difuzije se koriste da bi se dobila kontrastna slika, a tenzor se može izračunati u cilju procene difuzivnosti u trodimenzionalnom prostoru. Iz tenzora se dalje izračunava srednje pomeranje molekula (MD- srednja difuzivnost, eng. *mean diffusivity*) i stepen do koje je difuzija direkcionalna, tj. frakcionalna anizotropija (FA). Dodatni skalari, kao što je aksijalna i radijalna difuzivnost, koriste se u proceni magnitude difuzije paralelne i upravne na osovinu difuzije. Orijentacija vlakana se procenjuje na osnovu orijentacije najduže osovine tenzora. Orijentacija vlakana u susednim pikselima rekonstruiše se da bi se dobila slika puteva bele mase (BM) u procesu koji se zove traktografija, što i čini osnovu analize puteva BM mozga pomoću ove metode<sup>181</sup>.

Putem DTI metode dobija se podatak o mikrostrukturnim promenama u beloj masi (BM). Kod PB pacijenata je moguće detektovati regionalne i specifične promene u mikroskopskom integritetu BM i

bazalnih ganglija<sup>180</sup>. Na ovaj način se mogu ispitati promene u povezanosti određenih struktura mozga<sup>180</sup>. SN je jedna od najčešće ispitivanih struktura DTI metodom<sup>181</sup>; redukcija FA u SN nije pronađena u svim studijama, ali su rezultati metaanalize pokazali da ona postoji<sup>181,182</sup>. Upravo koristeći ovu MR tehniku pokazano je da se promene kod PB pacijenta mogu naći i u frontalnim regionima i to bez gubitka volumena tih struktura, što je uzeto kao dokaz da se neurodegenerativni proces može detektovati i šire od struktura bazalnih ganglija<sup>183</sup>. Gattellaro i saradnici ispitivali su pomoću DTI 10 PB pacijenata bez kognitivnog poremećaja i 10 mečovanih zdravih kontrola i pokazali su postojanje široko rasprostranjenih mikrostrukturnih promena u frontalnim i parijetalnim delovima BM čak i u ranim stadijumima PB<sup>184</sup>. Agosta i saradnici su ispitivali 89 PB pacijenata u različitim stadijumima PB i uporedili njihove DTI nalaze međusobno i sa 42 zdrave kontrole<sup>185</sup>. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da se oštećenja BM povećavaju sa težinom PB; oštećenja BM nalaze se u moždanom stablu, talamokortikalnim putevima, olfaktornim traktovima, kao i velikim interhemisferičnim, limbičkim i ekstramotornim asocijativnim putevima. Najizraženija razlika u smislu oštećenja BM dobijena je poređenjem umerenih formi PB (H&Y 3) i blažih formi PB (H&Y 2/2,5). Abnormalnosti BM nađene izvan nigrostrijatnog sistema se akumuliraju sa progresijom PB. Oštećenja BM su u korelaciji sa stepenom globalnog kognitivnog deficita<sup>185,186</sup>. Poremećaji u BM koji se detektuju DTI tehnikom, verovatno doprinose nastanku težih motornih i nemotornih poremećaja kod PB pacijenata u kasnijim stadijumima bolesti<sup>185</sup>. DTI bi, prema rezultatima meta analize, mogao biti koristan biomarker, pre svega od značaja u diferencijalnoj dijagnozi parkinsonizama<sup>182</sup>.

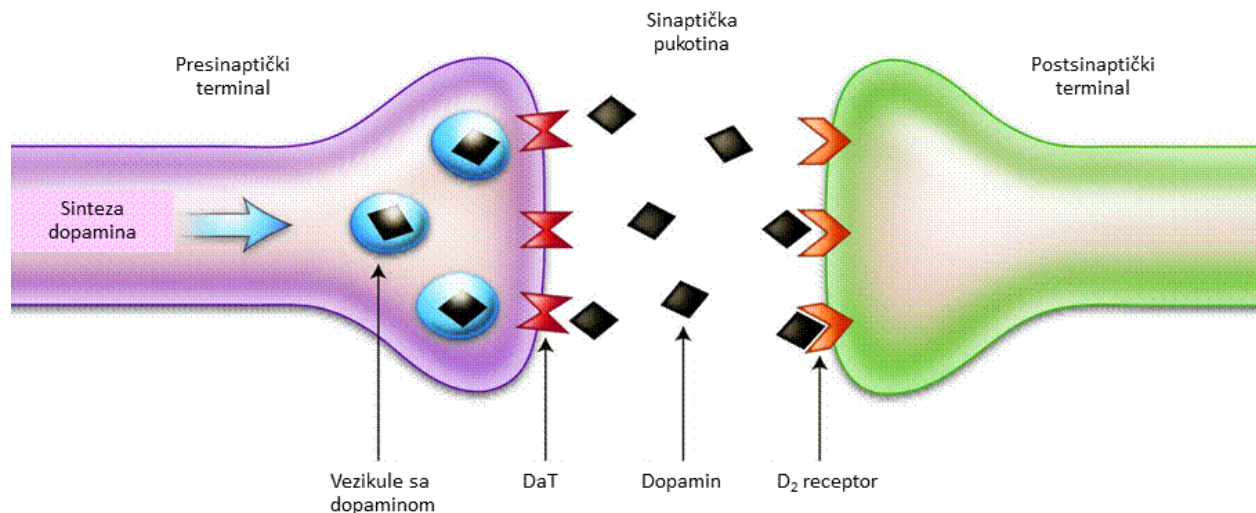
Morfometrija zasnovana na vokselima (eng. *voxel-based morphometry*; VBM) je automatizovana analiza komparacije volumena regiona mozga na *T1-weighted* MR snimcima među dve grupe ispitanika. Ova tehnologija je nepristrasna i ne zahteva *a priori* pretpostavke o strukturama koje treba analizirati, već analizira ceo snimak mozga<sup>187</sup>. Da bi se obavila statistička analiza niza snimaka dobijenih od različitih ispitanika, ove slike prolaze seriju koraka pripreme za analizu koji uključuju: prostornu normalizaciju kojom se podaci svih individua prevode u isti stereotaksični prostor; potom se, na osnovu mapa verovatnoće distribucije tkiva i na osnovu intenziteta unutar slike, vrši segmentacija sive i bele mase, belu masu i likvor. Poslednji korak je „glačanje” (eng. *smoothing*) slika da bi se dobila što normalnija distribucija podataka i da bi se smanjila varijabilnost među ispitanicima<sup>187</sup>. Statističkim testovima vrši se poređenje grupa za svaki voksel slike i utvrđuje značajnost razlike<sup>187</sup>. Problem interpretacije oprečnih nalaza u VBM studijama kod PB postoji zbog statističke obrade podataka, pre svega jer je potrebno izvršiti korekciju za multipla poređenja<sup>187</sup>. Veliki broj studija koristio je VBM u cilju ispitivanja sive mase kod PB pacijenata i pokazao da, u poređenju sa kontrolama, kod PB pacijenata postoje veoma male

promene u sivoj masi dok su, naprotiv, neke druge studije našle promene u sivoj masi u raznim delovima mozga, uključujući delove frontalnog, parijetalnog i temporalnog režnja, kao i subkortiklane sive mase<sup>187</sup>. VBM tehnologija korišćena je kao osnov za pokušaj identifikacije strukturnog korelata za specifične simptome i znake PB, pa je tako ispitivanjem PB pacijenata sa unilateralnim tremorom pokazano povećanje koncentracije sive mase u nucleus ventralis intermedius (VIM) talamusa, kontralateralno u odnosu na stranu zahvaćenu tremorom<sup>188</sup> dok su pedunkulo-pontino jedro<sup>189</sup>, lingvalni girus okcipitalnog lobusa i gornji parijetalni lobus<sup>190</sup> u vezi sa halucinacijama kod PB pacijanata. Izražena atrofija sive mase nađena je kod PB pacijenata sa demencijom, a manje izražena kod PB pacijenata sa blagim kognitivnim poremećajem (BKP)<sup>191</sup>. Atofija frontalnog i parijetalnog režnja se nalazi kod PB pacijenata sa frizingom hoda<sup>192</sup>.

### 1.4.3 DaT-SPECT

Dopamin se skladišti u vezikulama presinaptičkog dopaminergičkog neurona odakle se oslobađa u sinaptičku pukotinu i stupa u interakciju sa receptorima na postsinaptičkoj membrani neurona strijatuma (slika 9).

Slika 9. Shematska ilustracija dopaminergičkog puta u strijatumu. Prilagođeno prema referenci 193.

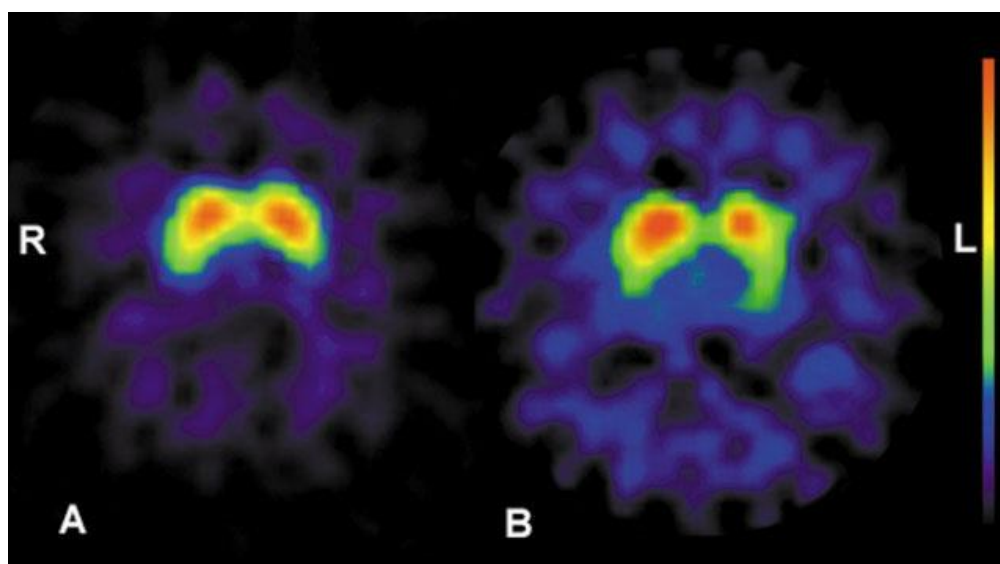


Ekstracelularni dopamin se aktivno vraća u presinaptički neuron pomoću dopaminskog transportera (DaT) koji se nalazi na površini ćelije. Procesom nigrostrijatne degeneracije dolazi i do smanjenja i nishodne regulacije DaT-a, što je zapravo u osnovi koncepta DaT-SPECT-a. Naime, selektivnim obeležavanjem DaT-a radiofarmakom, može se pratiti *in vivo* smanjenje funkcije dopaminergičkih neurona<sup>193</sup>. To je jedna od metoda funkcionalnog imidžinga koja omogućava diferenciranje PB od nekih parkinsonizama i

bolesti koje se prezentuju tremorom; njima se identifikuje poremećaj funkcije presinaptičkog kraja nigrostrijatnog neurona<sup>194,195</sup>.

Obzirom da se najveća količina dopaminergičke transmisije odvija u strijatumu, upravo tu je i maksimum preuzimanja DaT radio-obeleživača, dok je aktivnost u ostalom delu mozga minimalna. Normalan nalaz prikazuje strijatum u obliku simetričnog znaka zapete (slika 10.) dok je asimetrija ili promena oblika abnormalan nalaz, pod uslovom da je pacijent bio nepomičan tokom dijagnostike<sup>193</sup>.

Slika 10. Nalaz DaT-SPECT-a kod zdravog ispitanika (A) i ispitanika sa hemiparkinsonizmom (B). Prilagođeno prema referenci 194.



DaT-SPECT je 100% specifična metoda za razlikovanje osoba sa ranom fazom PB od zdravih osoba, ali je senzitivnost varijabilna i kreće se od 8 do 100% u studijama<sup>196</sup>. Bilateralno oštećenje bazalnih ganglija može se detektovati i kod hemiparkinsonizma, a patološki nalaz se može naći i kod osoba sa faktorima rizika za razvoj PB, kao što su poremećaj spavanja u REM fazi i hiposmija, pa se smatra da DaT-SPECT može koristiti u detekciji premotorne faze PB<sup>197-199</sup>.

Opisani su slučajevi sa kliničkom dijagnozom PB i normalnim DaT-SPECT nalazom i oni se u literaturi nazivaju “scans without evidence of dopaminergic deficit” (SWEDD). Praćenjem ovih pacijenata pokazano je da ne dolazi do progresije nalaza, da pacijenti ne reaguju na terapiju L-dopom i da DaT-SPECT nalaz ostaje normalan, pa se smatra da je u ovakvim slučajevima moguće da inicijalna dijagnoza PB zapravo nije bila tačna<sup>193</sup>.



## 2. CILJEVI

1. Utvrđivanje učestalosti *GBA* mutacija u grupi pacijenata sa PB;
2. karakterizacija genotipa *GBA* mutacije;
3. karakterizacija specifičnosti kliničkog ispoljavanja PB kod heterozigotnih i homozigotnih nosilaca mutacije u *GBA* genu i utvrđivanje genotipsko-fenotipske korelacije;
4. utvrđivanje neuroimidžing karakteristika (TKS, MR, DaT-SPECT) PB pacijenata sa *GBA* mutacijama, zdravih nosilaca *GBA* mutacija i pacijenata sa GB; i
5. otkrivanje potencijalnih prekliničkih markera PB kod zdravih heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Ispitanici

U studiji su učestvovali ispitanici raspoređeni u sledeće grupe:

1. pacijenti koji boluju od Parkinsonove bolesti i koji su pregledani ambulantno ili koji su bili hospitalizovani na Odeljenju za neurodegenerativne bolesti Klinike za Neurologiju Kliničkog centra Srbije (KCS) u periodu od januara 2011. godine do juna 2014. godine;

2. pacijenti koji boluju od Gošeove bolesti, a leče se na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS i Klinici za hematologiju KCS;

3. roditelji i braća/sestre pacijenata koji boluju od Gošeove bolesti, a koji su obavezni heterozigotni ili homozigotni nosioci *GBA* mutacije; i

4. zdrave kontrole.

Svim potencijalnim ispitanicima studije objašnjeno je koji su ciljevi studije i predložen im je protokol ispitivanja, a potom ponuđeno učešće u studiji. Svi ispitanici uključeni u studiju potpisali su informisani pristanak. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Studija je sprovedena u sledećim institucijama:

1. Klinika za neurologiju Kliničkog centra Srbije (KCS);
2. Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma KCS;
3. Klinika za hematologiju KCS;
4. Centar za nuklearnu medicinu KCS;
5. Centar za radiologiju i magnetnu rezonancu KCS;
6. Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Scientific Institute and University Hospital San Raffaele, Milano, Italija.

Celokupna baterija testova i ispitivanja predviđena za svaku od ispitivanih grupa sprovedena je na Klinici za neurologiju u periodu od januara 2011. godine do juna 2014. godine, osim MR pregleda koji je obavljen u Centru za radiologiju i magnetnu rezonancu KCS i DaT-SPECT pregleda koji je obavljen u

Centru za neuklearnu medicinu KCS. Analiza MR snimaka izvršena je u University Hospital San Raffaele, Milano, Italija.

## 3.2. Dizajn studije

Celokupno istraživanje obuhvatalo je dve faze koje se metodološki razlikuju. Prvi deo je bila studija preseka sa ciljem utvrđivanja genetskog statusa u *GBA* genu kod PB pacijenata, procene učestalosti *GBA* mutacija u ispitivanoj PB populaciji i utvrđivanja osnovnih kliničkih razlika PB pacijenata u zavisnosti od statusa u *GBA* genu. Osim toga, obavljen je pregled GB pacijenata i njihovih prvih srodnika, koji su obavezni heterozigotni nosioci *GBA* mutacije, u cilju utvrđivanja prisustva znakova parkinsonizma. Nakon identifikacije nosilaca *GBA* mutacija i prisustva PB, u cilju utvrđivanja detaljnih kliničkih i imidžing karakteristika, korišćen je dizajn studije slučajeva i kontrola.

### 3.2.1. Studija preseka

#### 3.2.1.1. Identifikacija *GBA* mutacija kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću

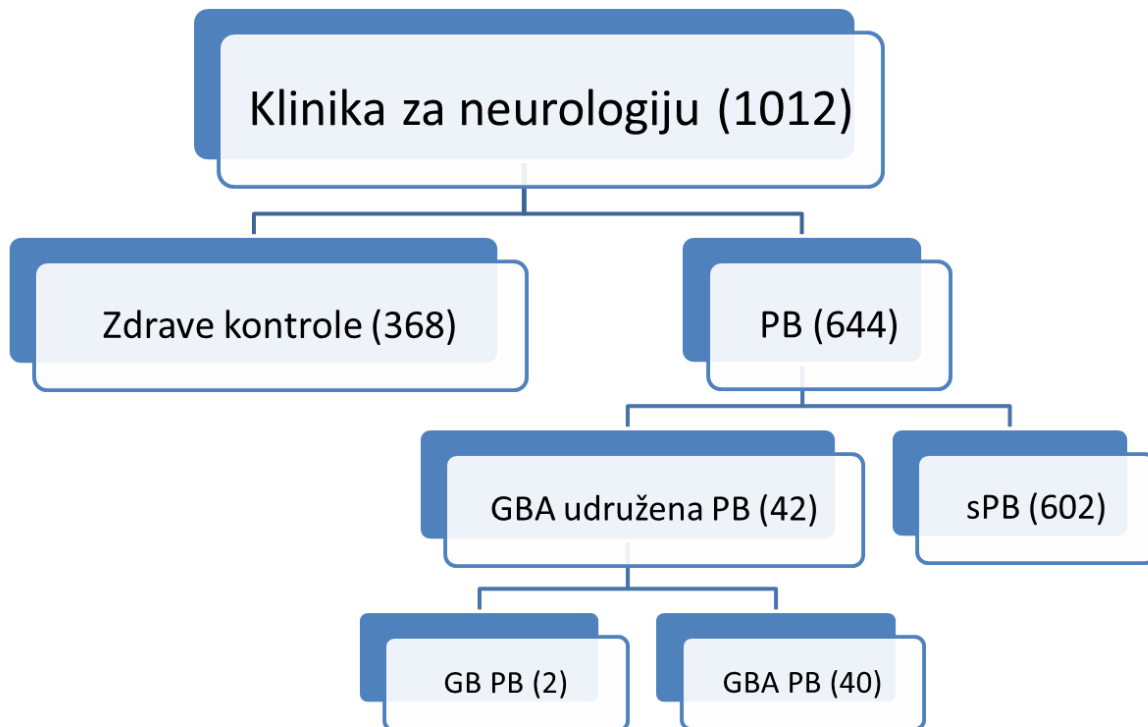
Regrutovanje PB pacijenata vršeno je u periodu od januara 2011. godine do juna 2014. godine na Odeljenju za neurodegenerativne bolesti na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije kako među hospitalizovanim pacijentima, tako i među ambulantnim pacijentima, u okviru redovnih kontrolnih pregleda. Svi PB pacijenti uključeni u studiju zadovoljavali su kliničke kriterijume za dijagnozu PB na osnovu UK Brain Bank kriterijuma<sup>11,200</sup> (Tabela 4) uz napomenu da pozitivna porodična anamneza nije bila korišćena kao isključujući kriterijum.

Svatom pacijentu je ponuđeno da učestvuje u skriningu za mutaciju u *GBA* genu koji je, nakon uzorkovanja krvi radi genetskih analiza, uključivao i prikupljanje osnovnih demografsko-kliničkih podataka: godine starosti u trenutku pregleda, godine početka PB, dominantni prvi simptomi PB (ukočenost/rigiditet, usporenost/hipokinezija i bradikinezija, tremor, bol, problemi sa pisanjem, problemi sa hodom), podaci o porodičnoj anamnezi za postojanje PB, prisustvo/odsustvo određenih karakteristika PB u trenutku pregleda (simetričan/asimetričan parkinsonizam, diskinezije, distonija, frizing hoda, demencija, vizuelne halucinacije, posturalna nestabilnost), antiparkinsonoj terapiji i terapijskom odgovoru na L-dopu (odličan/umeren/bez efekta), te podatak o etničkoj pripadnosti. Dnevna doza antiparkinsonske terapije izražena je kao doza ekvivalentna količini L-Dope preračunata prema prethodno preporučenim faktorima konverzije<sup>201</sup>. Pored toga, pacijenti su u ovom delu studije testirani sledećim skalama: UPDRS i H&Y u ON fazi, Hamiltonova skala depresivnosti (HAMD), Hamiltonova skala anksioznosti (HAMA) i Mini mental test (MMSE).

Kontrolna grupa obuhvatala je etnički mešovane kontrole. Ovi ispitanici su pregledani od strane neurologa i kod svih je potvrđeno odsustvo kliničkih znakova neurološkog deficita, uključujući PB. Kontrolnu grupu ispitanika činili su zaposleni na Klinici za neurologiju, studenti Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i supružnici ili pratnja PB pacijenata ukoliko nisu u krvnom srodstvu.

Nakon određivanja genetskog statusa u *GBA* genu svi PB pacijenti su raspoređeni u dve grupe: PB pacijente nosioce *GBA* mutacije i PB pacijente bez mutacije u *GBA* genu, tj. sporadična PB (sPB). Nosioci mutacije su dalje podeljeni na heterozigotne (*GBA*-PB) i homozigotne nosioce koji su ujedno imali i Goševu bolest (*GB*-PB). Nakon razvrstavanja pacijenata upoređeni su prikupljeni demografski i klinički podaci ove dve grupe (slika 11.).

Slika 11. Proces regrutacije pacijenata sa Parkinsonovom bolešću na Klinici za neurologiju.



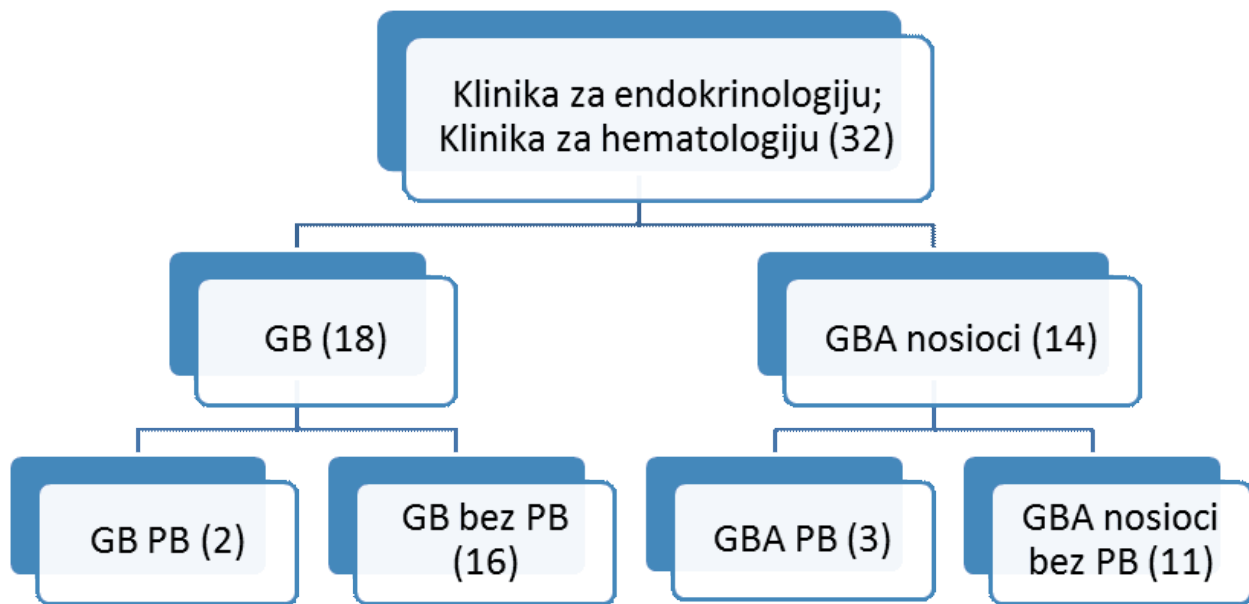
Legenda: u zagradi je prikazan ukupan broj ispitanika po svakoj prikazanoj kategoriji. PB- Parkinsonova bolest; sPB- Parkinsonova bolest bez mutacije u *GBA* genu; GB PB- pacijenti sa Goševom i Parkinsonovom bolešću; GBA PB- PB pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu.

### 3.2.1.2. Identifikacija znakova parkinsonizma kod GB pacijenata i njihovih srodnika

Drugi deo studije preseka odnosio se na pregled pacijenata sa Goševom bolešću (GB) kao i njihovih prvih srodnika (roditelji, deca, braća/sestre) koji su obavezni nosioci mutacija u *GBA* genu, a sa

ciljem utvrđivanja prisustva kliničkih ili imidžing (TKS, DaT-SPECT) znakova parkinsonizma. Identifikacija pacijenata sa GB je vršena uz pomoć lekara Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Klinike za hematologiju KCS iz dostupne medicinske dokumentacije. Svako od ispitanika koji je prihvatio učešće u studiji bio je neurološki pregledan u cilju identifikacije znakova parkinsonizma. Kod pregledanih osoba, osim znakova parkinsonizma, nisu uočeni drugi neurološki simptomi i znaci. Ukupno je pregledano 18 pacijenata koji su od ranije imali postavljenu dijagnozu GB na osnovu biohemijske ili genetske analize i 14 srodnika ovih pacijenata koji su obavezni nosioci mutacije u *GBA* genu. Na slici 12. prikazan je proces identifikacije ispitanika na Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Klinici za hematologiju KCS.

Slika 12. Proces regrutacije pacijenata Gošeovom bolešću i njihovih srodnika prvog stepena.



Legenda: u zagradi je prikazan ukupan broj ispitanika po svakoj prikazanoj kategoriji. GB- pacijenti sa Gošeovom bolešću; GB PB- pacijenti sa Gošeovom i Parkinsonovom bolešću; GBA zdravi nosioci- heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu bez znakova PB; GBA PB- PB pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu.

### 3.2.2. Definisane grupe ispitanika na osnovu *GBA* genetskog statusa i prisustva znakova Parkinsonove bolesti

Kombinovanjem grupa pacijenata regrutovanih na Klinici za neurologiju, Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i Klinici za hematologiju KCS, svi ispitanici su na osnovu

genetskog statusa u *GBA* genu i na osnovu prisustva znakova PB razvrstani u jednu od 6 grupa koje su tako definisane bile osnov za sprovođenje kasnijih delova studije. Ispitanici su razvrstani u sledeće grupe (prikazan je istraživački protokol za svaku od grupa):

1. heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu koji boluju od PB. Protokol za ispitivanje ove grupe obuhvatio je sledeće:
  - a. prikupljanje osnovnih demografskih i kliničkih podataka;
  - b. kliničko ispitivanje i testiranje koje uključuje primenu skala za procenu kliničkih specifičnosti bolesti - Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS), stadijum PB po Hoehn and Yahr, Mini Mental State Examination (MMSE), Hamiltonova skala depresivnosti (HAMD), Hamiltonova skala anksioznosti (HAMA), Bekova skala za depresiju, Skala apatije, ispitivanje nemotornih simptoma PB (Non-motor symptoms questionnaire<sup>202</sup>), Adenbruksovo kognitivno ispitivanje (ACE) i Bostonski test nominacije.
  - c. neuroimidžing ispitivanje koje je obuhvatalo:
    - i. transkranijalnu parenhimsku ehosonografiju i
    - ii. MR endokranijuma- morfometriju zasnovanu na vokselima i DTI;
2. homozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu - pacijenti koji imaju Gošeovu bolest i Parkinsonovu bolest. Protokol za ispitivanje ove grupe obuhvatio je isti protokol kao za grupu pod rednim brojem 1, osim MR pregleda endokranijuma.
3. zdravi heterozigotni nosioci *GBA* mutacije - bez znakova PB. Protokol za ispitivanje ove grupe obuhvatio je:
  - a. prikupljanje osnovnih demografskih i kliničkih podataka;
  - b. neuroimidžing ispitivanje koje je obuhvatalo:
    - i. transkranijalnu parenhimsku ehosonografiju;
    - ii. DaT-SPECT (ukoliko je moguće);
4. homozigotni nosioci *GBA* mutacije - pacijenti sa Gošeovom bolešću bez znakova PB. Protokol za ispitivanje ove grupe obuhvatio je isti protokol kao za grupu pod rednim brojem 3.
5. PB pacijenti bez mutacije u *GBA* genu. Pacijenti ove grupe služili su kao PB kontrole za različite delove istraživanja. Protokol ispitivanja uključenih u dalju analizu je obuhvatao testiranja kao za grupu pod rednim brojem 1.

6. grupa zdravih kontrola bez mutacije u *GBA* genu. Ispitanici ove grupe su prolazili isti protokol kao i grupa pod rednim brojem 3.

### **3.2.3. Molekularno-genetska analiza**

Za detekciju mutacija korišćena je metoda sekvenciranja egzona 8, 9, 10 i 11 *GBA* gena jer se u njima, prema literaturnim podacima, najčešće detektuju mutacije. Uzorci krvi korišćeni su kao biološki materijal za genetske analize, a dobijeni su od svih ispitivanih PB pacijenata i zdravih kontrola tokom ambulantnih pregleda ili hospitalizacije na Klinici za neurologiju. Uzimano je po 5 ml krvi. Kao antikoagulans je korišćen natrijum-citrat u koncentraciji 0,38 % (w/v). Uzorci su do finalne analize čuvani na -20°C.

#### **3.2.3.1. Izolovanje genomske DNK iz limfocita periferne krvi**

Genomska DNK je izolovana po uputstvu proizvođača upotrebom QIAamp DNA mini kita (QIAGEN, Nemačka), koji je namenjen za brzu izolaciju ukupne DNK (genomska, viralna, mitohondrijalna) iz različitih bioloških uzoraka.

Proces izolacije DNK iz pune krvi podrazumeva prvo liziranje limfocita periferne krvi puferom za lizu u prisustvu proteinaze K. Lizat se zatim centrifugiranjem propušta kroz Mini spin kolonice pri čemu se DNK vezuje za silikonsku membranu kolonice, a ostale komponente ćelija prolaze kroz nju. Potom se odgovarajućim puferima vrši dodatno ispiranje DNK od proteina i drugih agenasa koji bi potencijalno mogli da inhibiraju PCR reakciju. Prečišćena DNK se na kraju eluira sa membrane u odgovarajućem puferu ili redestilovanoj vodi.

Kvalitet i količina izolovane DNK su određivani spektrofotometrijski, metodom koja služi za kvantitativno određivanje malih količina rastvorenih supstanci zasnovanoj na merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Količina apsorbovane svetlosti odgovara koncentraciji ispitivane supstance. Nukleinske kiseline apsorbuju na 260 nm, a koncentracija DNK je izračunata prema odgovarajućoj formuli koja sadrži apsorbancu izmerenu na ovoj talasnoj dužini. U našem istraživanju merenja su vršena na spektrofotometru *BioPhotometer Plus* (*Eppendorf*, Nemačka) u plastičnim kivetama *Uvette* (*Eppendorf*, Nemačka). Čistoća uzorka DNK na spektrofotometru je određena pomoću apsorbance izmerene na talasnim dužinama od 230, 280 i 340 nm. Na 230 nm apsorbuju fenolati anjon, tiocijanat i peptidi, na 280 nm apsorbuju fenol i proteini, dok apsorbancija na 330 nm i više ukazuje na prisustvo čestica u rastvoru koje rasejavaju svetlost u vidljivom spektru (npr. soli).

### 3.2.3.2. Lančana reakcija polimerizacija-PCR

PCR reakcija (reakcija lančane polimerizacije; eng. *Polymerase Chain Reaction*)<sup>203,204</sup> je *in vitro* selektivna amplifikacija određenog segmenta DNK molekula. Sinteza DNK je katalizovana termo-stabilnom DNK polimerazom (Taq polimeraza). Prajmeri, oligonukleotidne sekvence dužine 14-40 nukleotida obezbeđuju specifičnost PCR reakcije. Prajmeri hibridizuju sa komplementarnim sekvencama na DNK molekulu ograničavajući segment DNK koji se amplifikuje. Dužina amplifikovanog fragmenta je određena rastojanjem sekvenci koje prepoznaju prajmeri. PCR reakcija se odvija u 25-40 ponovljenih ciklusa sinteze DNK molekula i na taj način se dobija  $10^6$  do  $10^9$  kopija željenog fragmenta. Svaki ciklus se sastoji iz tri koraka: termalna denaturacija, hibridizacija prajmera i ekstenzija-sinteza DNK. Nakon poslednjeg ciklusa sledi finalna elongacija da bi se kompletirala sinteza parcijalno sintetisanih produkata.

U našem istraživanju dizajnirani su prajmeri za egzone 8, 9, 10 i 11 GBA gena. Za egzone 8 i 9 dizajnirani su prajmeri koji su specifični za *GBA* gen a ne za *GBA* pseudogen (*GBAP*). Egzoni 10 i 11 su amplifikovani korišćenjem „nested“ PCR reakcije sa delimično nekomplementarnim prajmerima u cilju izbegavanja koamplifikacije *GBAP* gena. PCR reakcije su izvođene u GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (AppliedBiosystems, USA) PCR aparatu u 0,2 ml tankozidnim (eng. *thin wall*) mikrotubama u volumenu od 15  $\mu$ l, prema standardizovanom protokolu.

Provera uspešnosti i kvaliteta PCR reakcije vršena je elektroforezom na 2% agaroznom gelu standardnom metodom. Vizuelizacija PCR produkata se vršila dodavanjem etidijum-bromida (EtBr) u gel. EtBr fluorescira kada se DNK molekul izloži UV svetlu talasne dužine  $\lambda=254$  nm. U polju jednosmerne struje fragmenti DNK u agaroznom gelu putuju u funkciji svoje dužine, pa će kraći fragmenti putovati brže kroz gel i na gelu će se videti kao niža traka u odnosu na onu koju daju duži fragmenti DNK. Veličina PCR produkta se procenjuje poređenjem sa markerom koji sadrži fragmente poznatih dužina. Kvalitet PCR-a se ocenjuje kao dobar kada se na gelu uočava očekivani broj traka koje su jasne i imaju očekivanu dužinu.

### 3.2.3.3. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza je automatizovani proces koji se izvodi na automatskom DNK sekvenatoru i podrazumeva elektroforetsko razdvajanje DNK fragmenata kroz vrlo tanke kapilare ispunjene polimerom. Ovom metodom mogu da se razdvoje fragmenti između kojih postoji razlika u dužini od samo 1bp. Kapilarna elektroforeza se primenjuje u DNK sekvenciranju i fragmentnoj analizi. DNK sekvenciranjem se određuje tačan nukleotidni sastav neke sekvence pomoću nekoliko metoda i tehnologija koje se koriste u cilju utvrđivanja redosleda nukleotidnih baza (adenin, guanin, citozin i



timin) u molekulu DNK. Najšire primenjivani metod je Dye-terminator sekvenciranje koji se zasniva na Sangerovoj metodi sekvenciranja.

Sekvenciranje po Sangeru podrazumeva izvođenje četiri nezavisne PCR reakcije, sve četiri sadrže DNK matricu, prajmer, DNK polimerazu i smešu deoksiribonukleotid trifosfata- dNTP (dATP, dGTP, dCTP i dTTP), ali i po jedan od dideoksiribonukleotid trifosfata (ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP). PCR uzorci su pre sekvenciranja prečišćeni od ostataka neugrađenih prajmera i nukleotida, koji bi mogli uticati na reakciju sekvenciranja. Prečišćavanje je vršeno enzimima Exonuclease I (Exo I) (Fermentas, Nemačka) i Shrimp alkaline phosphatase (SAP) (Fermentas, Nemačka). Exo I razgrađuje neugrađene prajmere, dok SAP uklanja fosfatne grupe sa dNTP-ova ostavljajući ih u vidu nukleozida. Reakcija je pripremana sa 5 µl PCR produkta u koji se dodaje 10 U Exo I i 2 U SAP enzima. Smeša se zatim inkubira 15 min na 37°C, pa se zatim 15 minuta na 80°C vrši inaktivacija enzima.

Reakcija sekvenciranja pripremana je upotrebom BigDye Terminator Ready Reaction kita (Applied Biosystems, USA). Kao matrica za ovu reakciju dodaje se prečišćeni PCR produkt čiju sekvencu treba odrediti, kao i samo jedan od para prajmera koji je korišćen u PCR reakciji. PCR reakcije se izvode u GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (AppliedBiosystems, USA) PCR aparatu po programu koji se sastoji od inicijalne denaturacije 1 min na 96°C i 25 ciklusa amplifikacije. Svaki ciklus amplifikacije sastoji se od denaturacije 10s na 96°C, hibridizacije 5s na 50°C i elongacije 4 min na 60°C. Nakon završetka amplifikacije uzorci se čuvaju na 4°C.

Pre analize produkata reakcije sekvenciranja na automatskom sekvencatoru oni su prečišćeni od ostataka fluorescentno obeleženih ddNTP-ova etanol/Na-acetatnom precipitacijom. Ovim je sprečeno interferiranje fluorescentnog signala sa neugrađenih ddNTP-ova sa onim koji potiče sa sekvence analiziranog DNK fragmenta.

Elektroforeza prečišćenih produkata reakcije sekvenciranja vršena je na aparatu ABI 3500 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Elektroforeza je vršena na 15kV i 60°C. Za elektroforezu je korišćen polimer POP7 (AppliedBiosystems, USA) i kapilara od 50 cm.

Prikupljanje „sirovih“ podataka (eng. *raw data*) sekvenci kao i kontrola celog procesa automatskog sekvenciranja vršena je pomoću 310 Data Collection softvera (AppliedBiosystems, USA). Dobijene sekvence su poređene sa normalnim (eng. *wild type*) sekvencama koje su preuzete iz Ensembl baze podataka (<http://www.ensembl.org/index.html>). Poređenje je vršeno pomoću Sequencher 4.10.1 Demo softvera (Gene Codes Corporation, USA). Za sve detektovane promene u sekvenci provereno je da li su

opisane u dbSNP v139 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) i HGMD (eng. *The Human Gene Mutation Database*, <http://www.hgmd.org>) bazama podataka, kao i da li postoji opisan njihov eventualni patološki značaj. Osim ovih, korišćene su i baze podataka specifične za određene gene (<http://www.dmd.nl>; <http://umd.be>; <http://www.biopku.org>).

Potencijalni patološki značaj detektovanih promena predviđan je i *in silico*, korišćenjem MutationTaster softvera (<http://www.mutationtaster.org>). Ovim programom se vrši predviđanje da li je uočena promena sekvence mutacija koja dovodi do oboljevanja ili je u pitanju benigni polimorfizam.

Kod subjekata kod kojih je identifikovana D409H mutacija, vršeno je sekvenciranje za H255Q zbog velike frekvencije alela sa duplom mutacijom [D409H; H255Q] kod GB pacijenata na Balkanu<sup>205</sup>.

### 3.3. Studija slučajeva i kontola

Dizajn tipa studije slučajeva i kontrola korišćen je radi utvrđivanja određenih kliničkih karakteristika, pre svega nemotornih karakteristika PB udružene sa *GBA* mutacijama, kao i u imidžing studijama, što je detaljnije objašnjeno kasnije u tekstu.

#### 3.3.1. Klinička ispitivanja

Radi utvrđivanja kliničkih karakteristika PB udružene sa *GBA* mutacijama, svaki pacijent koji je heterozigotni nosilac *GBA* mutacije je mečovan sa jednim PB pacijentom koji nije nosilac mutacije u *GBA* genu. Mečovanje je vršeno po polu, starosti, dužini trajanja bolesti, H&Y stadijumu bolesti i godinama edukacije. U ovom delu studije je učestvovalo 62 PB pacijenta i to 31 GBA-PB i 31 sPB pacijent.

##### 3.3.1.1. Testiranje motornih manifestacija Parkinsonove bolesti

Stadijum PB ocenjen je pomoću skale prema autorima Hoenhovej i Yahru<sup>206</sup> (H&Y) gde postoji pet stepeni gradacije i to:

- I- unilaterana zahvaćenost,
- II- blaga bilateralna zahvaćenost bez posturalne nestabilnosti,
- III- blaga do umerena bilateralna bolest uz postojanje posturalne nestabilnosti, pri čemu je pacijent fizički nezavistan,
- IV- potpuno izraženi simptomi bolesti, pacijent je još uvek sposoban da stoji i hoda bez pomoći, ali postoji izražena onesposobljenost,
- V- teška onesposobljenosti- pacijent je vezan za invalidska kolica ili krevet.

Za procenu raznih aspekata PB korišćena je UPDRS skala koja je od svog nastanka 1980. godine, najčešće korišćena klinička skala za PB. U ovom istraživanju upotrebljena je revizija iz 2007. godine- MDS-UPDRS (Movement disorder society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale)<sup>207</sup>. Skala se sastoji od 4 dela:

- I- nemotorna iskustva dnevnog života;
- II- motorna iskustva dnevnog života;
- III- motorni pregled; i
- IV- motorne komplikacije.

Za svako pitanje ponuđeno je pet odgovora: 0 = normalno, 1 = malo, 2 = blago, 3 = umereno i 4 = teško. Za svaki deo skale zasebno se računa skor, kao i na kraju i ukupni UPDRS skor. Skor na UPDRS se kreće od 0 do 108, pri čemu viši skorovi ukazuju na težu kliničku sliku. Za potrebe ispitivanja motornih manifestacija PB korišćeni su delovi III i IV UPDRS skale.

Na osnovu originalnog upitnika (Prilog 1), prikupljeni su podaci o postojanju i tipu motornih komplikacija kao što su frizing hoda, motorne fluktuacije i diskinezije. Na osnovu utiska ispitivača, motorni fenotip u trenutku pregleda pacijenta klasifikovan je kao jedan od sledećih: tremorska forma PB, akinetsko-rigidna forma PB, forma PB sa dominantnim oštećenjem hoda i posturalnosti, ili kao neklasifikovana forma.

Vrsta i količina antiparkinsone terapije je zabeležena u trenutku pregleda pacijenta, a potom je preračunata u ekvivalentnu količinu L-dope, prema prethodno preporučenim faktorima konverzije<sup>201</sup>.

### **3.3.1.2. Testiranje nemotornih manifestacija Parkinsonove bolesti**

Opšta procena nemotornih manifestacija PB vršena je pomoću: 1- intervju koristeći originalni upitnik (Prilog 1), gde su dobijeni podaci o postojanju autonomnih poremećaja, poremećaja spavanja i poremećaja kontole impulsa; 2- I i II dela UPDRS skale; 3- Non-motor symptoms questionnaire<sup>202</sup>, upitnik koji kroz 30 pitanja ispituje prisustvo nemotornih simptoma u sledećim domenima: gastrointestinalni trakt, urinarni trakt, seksualna funkcija, kardiovaskularni sistem, apatija-pažnja-pamćenje, halucinacije-iluzije, depresija-anksioznost-anhedonija, spavanje-zamor, bol, ostalo (npr. pojava diplopija, gubitak telesne mase).

#### **3.3.1.2.1. Neuropsihološko testiranje**

Za neuropsihološku procenu korišćeni su sledeći testovi:

1. za kognitivni skrining - Mini Mental State Examination<sup>208</sup> (MMSE) test. Skor manji od 25 poena (od ukupno 30 poena), ukazvao je na prisustvo kognitivnog deficita.
2. Skrining test za postojanje demencije - revidirana verzija testa Addenbrooke's Cognitive Examination<sup>209</sup> (ACE-R). ACE-R je validan skrining test za procenu demencije, senzitan i za procenu rane kognitivne disfunkcije. Ovim testom ispituju se sledeći domeni: pažnja, pamćenje, fluentnost, jezik i vizuospacijalne sposobnosti. Vrednost ukupnog skora manja od 88 poena (od ukupno 100 poena), ukazivala je na demenciju sa senzitivnošću od 94% i specifičnošću od 89%<sup>209</sup>. Za gore navedene subskorove po domenima, korišćene su norme zavisne od starosti<sup>209</sup>.
3. Bostonski test imenovanja (BNT)<sup>210</sup> je korišćen za ispitivanje jezičkih funkcija, tj. za detekciju anomalije. BNT zavisi od očuvanosti vizuelne percepcije. Za patološku vrednost na BNT smatran je skor manji za dve standardne devijacije u odnosu na normu za starost prema Pavloviću<sup>211</sup>.
4. Radi ispitivanja frontalne disfunkcije, korišćen je Frontal assessment battery<sup>212</sup> (FAB) i to u delu studije koji je uključivao pregled na MR.

#### 3.3.1.2.2. Psihijatrijsko testiranje

Prisustvo depresivnosti ispitivano je pomoću Hamiltonove skale za procenu depresije<sup>213</sup> sa 21 pitanjem (HAMD) i Bekove skale za depresiju<sup>214</sup> (Revised Beck Depression Inventory- BDI-II). HAMD testiranje, u vidu strukturisanog intervjua, sprovedeno je od strane obučenog lekara. Skor na HAMD skali veći od 17 smatran je pokazateljem postojanja depresivnosti. BDI-II je psihometrijski test koji takođe ispituje postojanje depresivnosti, ali ne zahteva intervjuisanje, već ispitanik sam bira jedan od ponuđenih odgovora za svako od 21 pitanja. Skor na BDI-II veći od 13 smatran je pokazateljem depresivnosti.

Anksioznost je ispitivana od strane obučenog lekara, strukturisanim intervjuom koristeći Hamiltonovu skalu za procenu anksioznosti<sup>215</sup> (HAMA). Skor na HAMA skali veći od 18 smatran je značajnim pokazateljem anksioznosti.

Apatija je ispitivana pomoću Skale Apatije<sup>216</sup> (AS) koja se sastoji od 14 pitanja a koja se preporučuje kao oruđe za skrining za prisustvo apatije (za skor veći od 13), kao i za procenu težine apatije<sup>217</sup>.

### 3.3.2. Imidžing

#### 3.3.2.1. Transkranijalna sonografija moždanog parenhima

U ovom delu studije ukupno je pregledan 131 ispitanik od kojih je 118 ispitanika (90,1%) imalo transparentan koštani prozor makar sa jedne strane. U GBA+/PB+ grupi, 18 od 22 pacijenta (81,8%) imalo je transparentan koštani prozor.

TKS je obavljena na ispitanicima sa poznatim genetskim statusom u *GBA* genu koji su bili pregledani od strane neurologa u cilju utvrđivanja postojanja znakova PB. Upravo na osnovu prisustva dijagnoze PB i genetskog statusa u *GBA* genu, ispitanici su bili svrstani u jednu od sledećih grupa:

1. GB+/PB+ ispitanici sa GB sa PB;
2. GB+/PB- ispitanici sa GB bez PB;
3. GBA+/PB+ PB pacijenti heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu;
4. GBA+/PB- zdravi heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu, bez znakova PB;
5. sPB- sporadična PB, bez detektovane mutacije u *GBA* genu; i
6. zdrave kontrole.

Za svakog ispitanika, pored TKS pregleda, prikupljeni su osnovni demografski podaci i podaci o trajanju bolesti. Stadijum PB je skorovan prema Hoehnovoj i Yahru, težina prema UPDRS III, globalna kognitivna funkcija ocenjena je Mini Mental skalom (MMSE), depresija Hamiltonovom skalom depresije (HAMD), a anksioznost Hamiltonovom skalom anksioznosti (HAMA).

Transkranijalna sonografija parenhima mozga izvedena je korišćenjem kolor-kodiranog faznog ultrazvučnog sistema, transkranijalnom ultrazvučnom sondom od 2,5 MHz (ProSound Alpha 10, Aloca, Japan). Pregled je obavljen kroz levi i desni periaurikularni akustički koštani prozor skenirajući u aksijalnoj ravni supra i infratentorijalne regione mozga pomeranjem sonde; dubina insoniranja bila je 14-16 cm, a dinamički opseg 45-50 dB. Svetlina, kontrast i vremensko pojačanje su podešeni radi dobijanja najboljeg kvaliteta slike. Specifične normativne vrednosti dobijene su pregledom 148 zdravih ispitanika (78 muškaraca i 70 žena; prosečna starost  $55,2 \pm 9,8$  godina, raspon 17-89 godina) a prema metodama diskutovanim u referenci 166.

Merenje površine ehogenosti SN vršeno je na aksijalnim presecima odmah nakon manuelnog ocrtavanja spoljašnje ivice ehogene površine SN. Ehogena površina SN  $<0,19 \text{ cm}^2$  klasifikovana je kao normalna, površina  $\geq 0,25 \text{ cm}^2$  kao izrazito hiperehogena, a vrednosti  $0,19-0,25 \text{ cm}^2$  kao umereno hiperehogene. Klasifikacija ispitanika u odnosu na ehogenost SN vršena je prema većoj od dve vrednosti

SN (desne i leve). Pored toga, sprovedeno je poređenje maksimalnih vrednosti hiperehogene površine SN (aSN<sub>max</sub>) dobijenih merenjem veće SN (aSN) svakog ispitanika ili ipsilateralne površine SN (aSN) ukoliko je postojao insuficijentan koštani prozor.

Posmatrane TKS-om, crvena jedra i raphe jedra su normalno hiperehogene strukture mezencefalona. Ehogenost raphe jedara je smatrano abnormalnim ukoliko je signal iz ove strukture prekinut ili je nedostajao pri skeniranju obe strane, a uprkos hiperehogenosti crvenog jedra. Širina treće komore merena je na nivou diencefalona, u aksijalnoj ravni i određena je minimalnim transverzalnim dijametrom na aksijalnim TKS skenovima. Dijametar treće komore normalno iznosi do 10 mm. Sve TKS preglede obavio je ispitivač koji nije imao uvid u kliničke i genetske podatke ispitanika.

### **3.3.2.2. Pregled na magnetnoj rezonanci - morfometrija zasnovana na vokselima i difuzioni tenzorski imidžing**

Cilj ovog dela našeg istraživanja bio je utvrđivanje obrasca atrofije mozga i mikrostrukturnih promena u beloj masi kod GBA+PB+ pacijenata u poređenju sa sPB i zdravim kontrolama da bi se *in vivo* utvrdio strukturni korelat *GBA* mutacije kod PB. Korišćena je tehnologija morfometrije zasnovane na vokselima (VBM) i difuzioni tenzorski (DT) imidžing.

U ovom delu studije ukupno je učestvovalo 46 ispitanika od kojih su: 15 bili PB pacijenti sa heterozigotnom mutacijom u *GBA* genu (GBA+PB+) i koji su mečovani po polu i starosti sa 14 PB pacijenata bez mutacije u *GBA* genu (sPB) i 16 zdravih kontrola bez mutacije u *GBA* genu. Osim MR pregleda, ispitanici su bili testirani Mini Mental skalom (MMSE), Addenbrookeovim testom (ACE-R), baterijom za procenu frontalnih funkcija (*Frontal Assessment Battery, FAB*) i Hamiltonovom skalom za procenu depresivnosti (HAMD) i anksioznosti (HAMA). Dijagnoza PB-demencije (PB-D) i PB - blagog kognitivnog poremećaja (PB-BKP) su postavljene prema Movement Disorder Society Task Force kriterijumima<sup>218,219</sup>. Dva pacijenta nisu bili u mogućnosti da urade ACE-R, a jedan pacijent nije bio u mogućnosti da uradi FAB, HAMD i HAMA zbog demencije. ACE-R i FAB skorovi su bili dostupni za 9 PB pacijenata bez *GBA* mutacije (sPB).

#### 3.3.2.2.1. Parametri MR pregleda i analiza rezultata

MR pregled mozga obavljen je na MR aparatu Avanto system (Siemens, Enlargen, Germany) jačine magnetnog polja od 1,5-Tesla. Protokol je obuhvatio primenu sledećih sekvenci:

1. Dual-echo turbo (DE) spin-echo sa sledećim parametrima: vreme repeticije (TR) 2650 ms, vreme eha (TE) 28/113 ms, dužina eho voza 5, broj aksijalnih preseka 50, debljina 2,5 mm, bez međuprostora, veličina matrice 256×256, polje snimanja (FOV) 250×250 mm<sup>2</sup>.

2. Trodimenzionalni T1-*weighted* magnetizacijom-pripremljen echo gradijent brze akvizicije TFE (transient field echo): pravac frekvencije, inferiorno–superiorni; TR=2000 ms; TE=4,72 ms; *flip angle*, 12°; veličina matrice, 256×224×208 [inferiorno–superiorno, anteriorno–posteriorno, levo–desno], FOV, 236×236×236 mm<sup>3</sup>.

3. Pulsed gradient SE single-shot echo-planar (TR=8100 ms; TE=95 ms; *flip angle*, 90°; veličina matrice, 128×128; FOV, 240×240 mm<sup>2</sup>; 50 aksijalnih preseka; debljina 2,5 mm, bez međuprostora), sa difuziono kodiranim gradijentima preimenjenim u 12 nekolinearnih pravaca, koji je izabran kao podrazumevan u skeneru (b factor, 1000 s/mm<sup>2</sup>; "*unweighted*" [b<sub>0</sub>] slika i 8 prosečnih). Maksimalna amplituda difuzionog gradijenta je bila 33 mT/m, a za prijem signala je korišćen kalem za glavu sa multiplim kanalima.

MR analizu obavio je iskusni istraživač koji nije imao podatke o tome da li ispitanik pripada kontrolnoj ili eksperimentalnoj grupi niti kakve su njegove kliničke i kognitivne karakteristike. Ovaj deo analize obavljen je u Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology, Division of Neuroscience, Scientific Institute and University Hospital San Raffaele, Milano, Italija. Hiperintenziteti u beloj masi (WMH), ukoliko su postojali, bili su identifikovani na DE skenovima. Opterećenje hiperintenzitetima bele mase (WMH) mereno je korišćenjem softvera: Version 5,0, Xinapse Systems, Northants, UK; <http://www.xinapse.com>.

### 3.3.2.2.2. Promene u beloj masi

#### 3.3.2.2.2.1. TBSS (*Tract-based spatial statistics*) analiza

DT MR analiza je sprovedena koristeći FSLv4.1 (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/>), a dobijeni DT MR snimci su korigovani zbog distorzija indukovanih vrtložnim strujama<sup>220</sup> i registrovani su na nedifuzionoj zapremini (b=0) sa 6 stepeni slobodne transformacije radi korekcije zbog pokreta glave. Difuzioni tenzor (DT) je procenjivan voksel po voksel uz pomoć *DTI fit toolbox*, koji je deo *FMRIB Diffusion Toolbox*, u sklopu FSL i izračunate su srednja difuzivnost (MD- *mean diffusivity*) i mape frakcione anizotropije (FA)<sup>221</sup>. TBSS verzija 1,2 (<http://www.fmrib.ox.ac.uk/fsl/tbss/index.html>) korišćena je za analizu više ispitanika<sup>222</sup>. FA zapremine su podešene prema standardizovanom prostoru na sledeći način: standardizovana slika prostora FMRIB58 FA je izabrana za ciljnu FA sliku, i nelinearna transfor-

macija koja mapira FA svakog ispitanika na ciljnu sliku pomoću *FMRIB's Non-linear Image Registration Tool*. Usrednjena slika FA je kreirana poravnanjem slika svih subjekata čime je formiran skelet FA koji reprezentuje puteve BM zajedničke za sve ispitanike<sup>222</sup>. Prag FA skeleta postavljen je na 0,2 da bi se isključili vokseli sa malom FA za koje se smatra da verovatno sadrže sivu masu ili cerebrospinalnu tečnost. Individualni MD i FA podaci su projektovani na ovaj zajednički skelet.

#### 3.3.2.2.2. Post Hoc analiza vrednosti FA traktova bele mase od interesa

Putevi bele mase (BM) su definisani na osnovu rezultata TBSS analize. Za identifikaciju puteva BM korišćena su dva atlasa iz softvera FSL (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/data/atlas-descriptions.html>): the Johns Hopkins University WM tractography i ICBM-DTI WM labels atlas), i definisani su putevi BM od interesa: telo, koleno i splenijum korpusa kalozuma; olfaktorni trakt; prednji krak kapsule interne; anteriorni, superiorni i posteriorni deo korone radiate; cingulum; capsula externa; posteriorna talamička radijacija; fasciculus longitudinalis superior. Putevi BM od interesa su postavljeni preko srednje slike FA i maskirani skeletom BM. Srednje vrednosti FA su dobijene za svaki trakt BM obostrano.

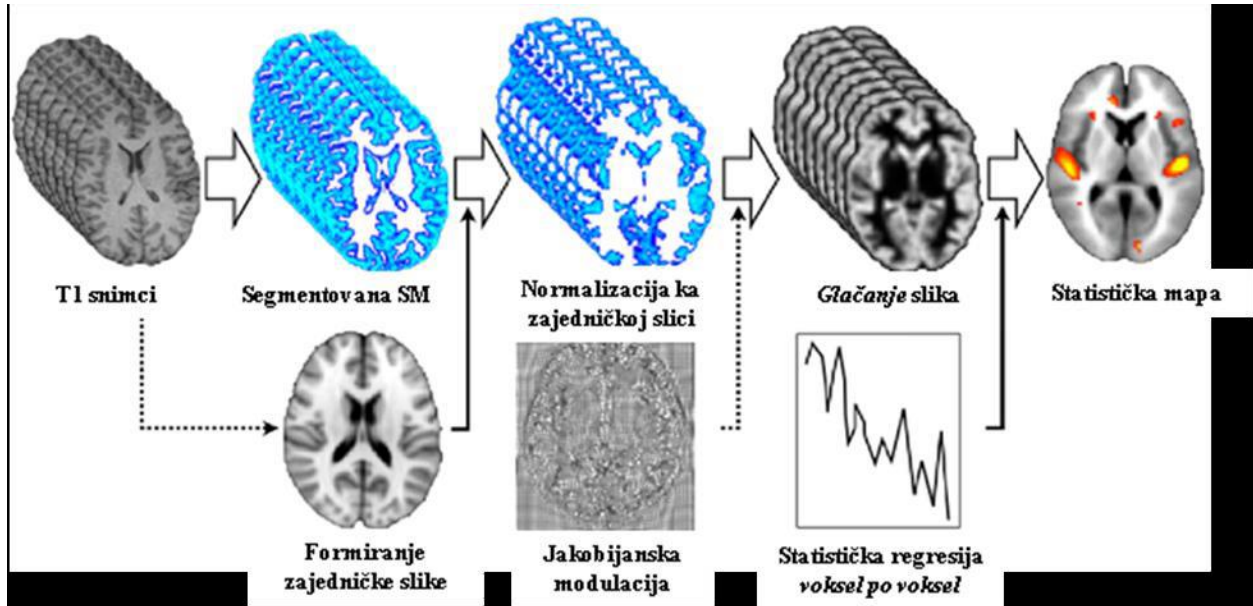
#### 3.3.2.2.3. Atrofija sive mase: morfometrija zasnovana na vokselima

Morfometrija zasnovana na vokselu (VBM) je obavljena pomoću SPM8 (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, Velika Britanija) i difeomorfne anatomske registracije korišćenjem Liejeve eksponencijalne algebre (*Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra*, DARTEL)<sup>223</sup>. Kao osnovni izvor informacija za ovu metodu korišćeni su snimci dobijeni na T1 sekvenci. Ovaj postupak je kompleksan i obuhvatao je nekoliko faza (slika 13.): (1) T1-weighted slike su segmentirane pomoću VBM5.1<sup>224</sup> da bi se dobile mape verovatnoće tkiva u *Montreal Neurological Institute (MNI)* prostoru i to za sivu masu (SM), belu masu (BM) i cerebrospinalnu tečnost (CST), uz odvajanje tkiva skalpa, lobanje i duralnih venskih sinusa; (2) slike su importovane u DARTEL, poravnate i potom segmentovane na SM, BM i CST (pomoću parametara iz prethodnog koraka) i prilagođene izotropnom vokselu veličine 1,5 mm; (3) Segmenti SM su simultano koregistrovani pomoću DARTEL-a<sup>223</sup>; (4) na striktno poravnate segmente primenjena su polja protoka kako bi se uklopili u zajednički DARTEL prostor i potom su modulirane korišćenjem Jakobijanskih determinanti; (5) modulirane slike iz DARTEL-a su normalizovane u MNI obrazac pomoću affine transformacije procenjene iz DARTEL SM obrasca i *a priori* mape verovatnoće SM bez prilagođavanja izotropnom vokselu (<http://brainmap.wisc.edu/normalizeDARTELtoMontrealNeurologicalInstitute>)<sup>225</sup>. Na kraju su slike obrađene pomoću 8-mm *Full-Width Half-Maximum Gaussian* filtera ("glačanje slike"). Svaki voksel



na ovoj slici reprezentuje lokalnu „koncentraciju“ tkiva (vrednosti se kreću od 0 do 1). Ovaj postupak se koristi da bi se osigurala definitivna klasifikacija voksela u odgovarajući region mozga (SM, BM i CST).

Slika 13. Postupci pri morfometriji zasnovanoj na vokselu (VBM).



Legenda: SM – siva masa

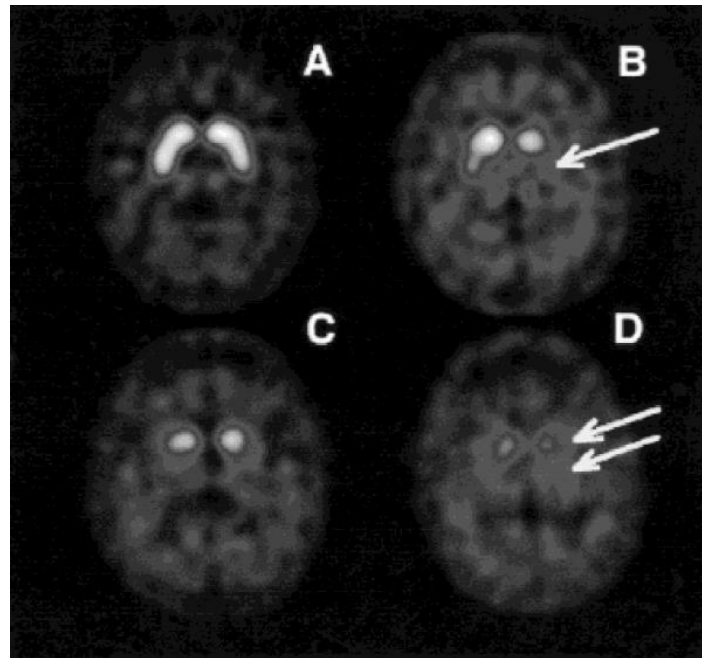
### 3.3.3. Ispitivanje DaT-SPECT metodom

Cilj ovog dela studije bio je da se utvrdi da li postoji smanjena akumulacija radiofarmaka kod zdravih nosilaca *GBA* mutacije tj. utvrđivanje premotorne faze PB.

Ispitanici koji su učestvovali u ovom delu studije snimljeni su DaT-SCAN-om u Centru za nuklearnu medicinu Kliničkog Centra Srbije. Kao radiofarmak korišćen je I123-ioflupane FP-CIT (DaT-SCAN, General Elecrtic Amersham), koji je aplikovan sporo intavenski u dozi od 111-185 MBq (3-5mCi). Kao premedikaciju svaki ispitanik je dobio 10 kapi Lugolovog rastvora per os, a nakon snimanja 2x10 kapi Lugolovog rastvora per os tokom tri dana.

SPECT akvizicija je vršena 3-6 sati nakon aplikacije radiofarmaka, dvoglavom gama kamerom (Mediso Nuclear Spirit), sa LEHR kolimatorom (niske energije i visoke rezolucije). Akvizicija podataka vršena je u matrici 128x128, sa rotacijom od 360 stepeni, radijus rotacije 13,4-16 cm, i sa vremenom akvizicije po jednoj projekciji 35-40 s. Slike su rekonstruisane korišćenjem "Filtered back projection" metode sa Butterworth filterom (cut off 0,5, order 7). Generisani su transverzalni, sagitalni i koronarni slajsovi. Korekcija na atenuaciju vršena je Chang-ovom metodom (faktor 0,12). Kvalitalivna analiza snimaka vršena je od strane istog specijaliste nuklearne medicine za sve ispitanike (slika 14).

Slika 14: Vizuelna analiza DaT-SPECT-a. Prilagođeno prema referenci 226.



Legenda: (A) Uredno nakupljanje radiofarmaka bilateralno u putamenu i nc. caudatus-u. (B) DAT stadijum I: asimetrično nakupljanje radiofarmaka, sa približno urednim nakupljanjem u putamenu jedne hemisfere i smanjenim nakupljanjem u putamenu suprotne hemisfere. (C) DAT stadijum II: značajna bilateralna redukcija nakupljanja radiofarmaka u putamenu, dok je očuvana aktivnost u nc caudatus-u. (D) DAT stadijum III: bilateralno smanjeno nakupljanje radiofarmaka i u putamenu i u nc caudatus-u.

### 3.4. Statistička analiza podataka

Od parametara deskriptivne statistike korišćeni su proporcija, srednja vrednost i standardna devijacija (SD).

Sve ispitivane varijable su prvo analizirane pomoću Kolmogorov-Smirnov testa da bi se utvrdilo da li se distribuišu po normalnoj raspodeli. Za poređenje nominalnih i ordinalnih varijabli između dve grupe ispitanika korišćen je  $\chi^2$  test ili Fisherov test tačne verovatnoće, u zavisnosti od dimenzija tablice kontingencije i broja očekivanih slučajeva u tablici. Značajnost razlike kontinuiranih neparametarskih varijabli između dve grupe ispitanika je ispitivana pomoću Mann-Whitneyevog U testa. Značajnost razlike kontinuiranih parametarskih varijabli između dve grupe ispitanika testirana je pomoću Studentovog t testa. Za poređenje više grupa ispitanika korišćena je parametarska ANOVA sa post hoc analizom (Bonferronijeva korekcija) ili neparametarska ANOVA (Kruskal-Wallis), u zavisnosti od tipa raspodele podataka.

Statistička obrada podataka je vršena u programu SPSS verzija 16,0 (SPSS Inc. Čikago, Illinois, SAD).

U analizi MR nalaza koji se odnose na DT deo studije, korišćen je softver za interferenciju zasnovanu na permutaciji koji služi za neparametrijsku pragovnu statističku analizu (deo deo je FMRIB softverske biblioteke-FSL<sup>227</sup>). Broj permutacija bio je podešen na 5000<sup>227</sup>. Vrednosti srednje difuzivnosti (MD) i frakcione anizotropije (FA) su poređene između dve grupe na skeletu bele mase, pomoću t-testa nakon korekcije prema starosnoj dobi ispitanika. Prag rezultujućih statističkih mapa podešen je za  $p < 0,05$ , korigovan za multiple komparacije (family-wise error, FWE) na nivou klastera koristeći opciju slobodno-pragovnog klaster pojačanja<sup>228</sup>. Vrednosti FA iz traktova bele mase od interesa, poređene su pomoću modela analize kovarijanse, korigovane za starosnu dob ispitanika. Korelacija između varijabli kognitivnog testiranja (MMSE, ACE skor i subskorovi, FAB) i vrednosti FA i opterećenjem hiperintenzitetima bele mase (WMH), procenjena je pomoću Spearmanovog koeficijenta, korigovano za starosnu dob ispitanika. Analiza kovarijanse je upotrebljena radi utvrđivanja razlike sive mase između ispitivanih grupa, korigovane za starosnu dob ispitanika i ukupnu intrakranijalnu zapreminu, korigovanu pomoću FWE.

Nivo značajnosti za sve statističke analize bio je 0,05 za statistički značajnu razliku i 0,01 za visoko statistički značajnu razliku.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Genetski skrining

U genetskoj analizi učestvovalo je ukupno 644 PB pacijenata (401 muškarac i 243 žene) i 368 zdravih kontrola (115 muškaraca i 253 žene). PB pacijenti su u trenutku pregleda imali u proseku  $60,7 \pm 10,4$  godina, raspon 19-83 godine. Zdrave kontrole su u proseku imale  $21,2 \pm 6,9$  godina, raspon 19-77 godina. Demografski podaci učesnika prikazani su u Tabeli 8.

Tabela 8. Demografski podaci učesnika studije.

	PB pacijenti	Kontrole
<b>Pol (M:Ž)</b>	401:243	115:253
<b>Godine u trenutku pregleda</b>	$60,7 \pm 10,4$ ; (19-83)	$21,2 \pm 6,9$ ; (19-77)

Legenda: godine u trenutku pregleda su prikazane kao prosečna vrednost  $\pm$  standardna devijacija i potom kao raspon.

Etnička pripadnost je bila zabeležena na osnovu iskaza ispitanika. Dva pacijenta iz PB grupe su se izjasnili da pripadaju Jevrejskoj etničkoj grupi, a jedan od njih je heterozigotni nosilac N370S mutacije u *GBA* genu; 3 pacijenta su se izjasnili kao pripadnici Albanske etničke grupe, za 9 pacijenata (1,4%) nedostajali su podaci o etničkoj pripadnosti i najveći broj, 630 PB (97,8%) pacijenata je pripadao Srpskoj etničkoj grupi. Svi ispitanici iz kontrolne grupe izjasnili su se kao pripadnici Srpske etničke grupe.

Genetskom analizom egzona 8-11 *GBA* gena kod svih ispitanika ukupno je detektovano 96 promena koje obuhvataju mutacije, polimorfizme, tihe varijante i promene nepoznatog značaja (Tabela 9).

Jedan pacijent je bio homozigot za N370S mutaciju, a jedan je bio kombinovani heterozigot sa genotipom N370S/D409H. Homozigotne i kombinovane heterozigotne promene nisu detektovane u kontrolnoj grupi. Pacijent koji je homozigotni nosilac N370S mutacije, pregledan je u 58. godini života, a njegova PB je počela u 54. godini, nije imao kliničke znake GB niti mu je dijagnoza GB bila postavljena. Kod pacijenta sa genotipom N370S/D409H simptomi PB su se javili u 39. godini, a pregledan je u 41. godini kada je imao kliničke znake GB (trombocitopeniju, leukopeniju i splenomegaliju); kod ovog ispitanika je dijagnoza GB bila postavljena ranije i dobijao je enzimsku supstytucionu terapiju.

U heterozigotnom stanju detektovane su sledeće mutacije: N370S kod 13/644 PB pacijenta (2,02%) i 0 kontrola; E388K kod 1/644 PB pacijenta (0,16%) i 1/368 kontrola (0,27%)- bez statistički značajne razlike u frekvenciji javljanja ove mutacije (OR=0,57; CI=0,04-9,15;  $p>0,05$ ); D409H kod 12/644 PB pacijenta (1,86%) i 2/368 kontrola (0,54%) što je na trendu statističke značajnosti (OR=3,47; CI=0,77-15,61;  $p=0,0837$ ); L444P kod 2/644 PB pacijenta (0,31%) i 1/368 kontrola (0,27%)- bez statističke značajnosti (OR=1,14; CI=0,10-12,65;  $p>0,05$ ); *RecNcil* (L444P+A456P +V460V) kod 4/644 PB pacijenta (0,62%) i 0 kontrola; R463C, R463H i N392S kod 2/644 PB pacijenta (0,31%) i 0 kontrola; D380V i P391L kod 1/644 PB pacijenta (0,16%) i 0 kontrola; A456P nije detektovana kod PB pacijenata već samo kod jedne zdrave kontrole (0,27%).

Polimorfizam T369M u heterozigotnom stanju pronađen je kod 28/644 PB pacijenta (4,35%) i 12/368 kontrola (3,26%). Učestalost javljanja ovog polimorfizma nije se statistički značajno razlikovala među grupama (OR=1,35; CI=0,68-2,69;  $p>0,05$ ). Kod jednog PB pacijenta (0,16%) detektovana je promena T369M u homozigotnom stanju.

Tihe varijante mutacija, koje ne dovode do promene aminokiseline u proteinu, detektovane su kod ukupno 8 ispitanika i to u heterozigotnom stanju: V460V kod 4 PB pacijenta (0,62%); T369T, V398V i V459V svaka kod 1 kontrole (0,27%).

Rezultati genetskih analiza za sve ispitanike kod kojih je ustanovljeno postojanje bilo koje promene u *GBA* genu prikazani su u Tabeli 9.

Najčešća mutacija kod PB pacijenata je N370S koja je pronađena kod ukupno 15 pacijenata (2,33%) i to kod 13 pacijenata u heterozigotnom stanju, kod jednog pacijenta u homozigotnom stanju i kod jednog pacijenta koji je kombinovani heterozigotni nosilac mutacija. Druga mutacija po učestalosti je D409H koja je u heterozigotnom stanju postojala kod 12 PB pacijenata (1,86%), kod 2 kontrole (0,54%) i jednog kombinovanog heterozigota. Treća po učestalosti je *RecNcil* koja je detektovana kod 4 PB pacijenta (0,62%).

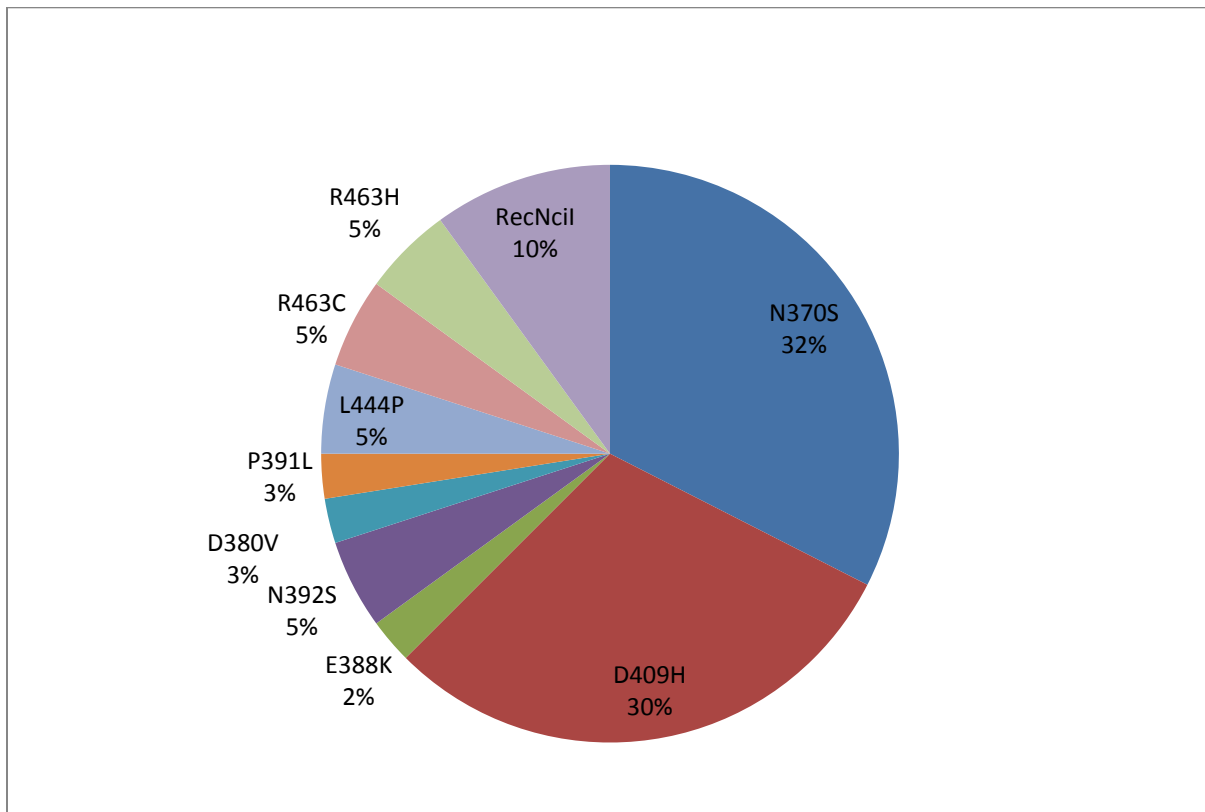
Tabela 9. Promene detektovane sekvenciranjem *GBA* gena kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i zdravih kontrola.

<b>GBA mutacija (protein)</b>	<b>DNK promena</b>	<b>Egzon</b>	<b>PB pacijenti (N=644) Broj / frekvencija nosilaštva (%)</b>	<b>Kontrole (N=368) Broj / frekvencija nosilaštva (%)</b>	<b>Šanse odnosa (OR)</b>	<b>Interval poverenja (95% CI)</b>	<b>p</b>
<b>Heterozigoti</b>							
N370S/wt	c.1226A>G	9	13/2,02	0/0			
*D380V/wt	c.1256A>T	9	1/0,16	0/0			
E388K/wt	c.1279G>A	9	1/0,16	1/0,27	0,57	0,04-9,15	0,68820
*N392S/wt	c.1292A>G	9	2/0,31	0/0			
D409H/wt <sup>#</sup>	c.1342G>C	9	12/1,86	2/0,54	3,47	0,77-15,61	0,08376
P391L/wt	c.1289C>T	9	1/0,16	0/0			
L444P/wt	c.1448T>C	10	2/0,31	1/0,27	1,14	0,10-12,65	0,91298
A456P/wt	c.1497G>C	10	0/0	1/0,27			
R463C/wt	c.1504C>T	10	2/0,31	0/0			
R463H/wt	c.1505G>A	10	2/0,31	0/0			
<b>Kompleksni ili rekombinantni aleli</b>							
RecNciI (L444P + A456P + V460V)	c.1448T>C c.1483G>C c.1497G>C	10	4/0,62	0/0			
<b>Homozigoti ili kombinovani heterozigoti</b>							
N370S/N370S	c.1226A>G	9	1/0,16	0/0			
N370S/D409H <sup>#</sup>	c.1226A>G c.1342G>C	9	1/0,16	0/0			
<b>Ukupno</b>			<b>42/6,52</b>	<b>5/1,36</b>	<b>5,07</b>	<b>1,99-12,92</b>	<b>0,00017</b>
<b>Polimorfizmi</b>							
T369M/wt	c.1223C>T	8	28/4,35	12/3,26	1,35	0,68-2,69	0,39327
T369M/T369M	c.1223C>T	8	1/0,16	0/0			
<b>Promene nepoznatog značaja</b>							
R329H/wt	c.1103G>A	8	1/0,16	0/0			
<b>Tihe varijante</b>							
*T369T/wt	c.1224G>A	8	0/0	1/0,27			
*V398V/wt	c.1311C>T	9	0/0	1/0,27			
*V459V/wt	c.1494C>T	10	0/0	1/0,27			
V460V/wt	c.1497G>C	10	4/0,62	0/0			

<sup>#</sup>svi nosioci D409H mutacije bili su nosioci duplo mutiranog alela genotipa D409H/H225Q; \* promene koje su prvi put opisane u literaturi

Ukoliko posmatramo samo mutacije koje su pronađene kod PB pacijenta u heterozigotnom stanju (Slika 15.), možemo videti da tri najučestalije mutacije (N370S, D409H i *RecNcil*) zajedno čine skoro  $\frac{3}{4}$  mutacija (72%). U grupi heterozigotnih nosilaca mutacije, 13 pacijenata imali su "laku" mutaciju i to svi N370S, 20 pacijenata je imalo "tešku" mutaciju (D409H, R463C, L444P, *RecNcil*), dok kod 7 preostalih nije bilo moguće klasifikovati mutacije po ovom sistemu.

Slika 15. Mutacije u *GBA* genu pronađene u heterozigotnom stanju kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću. Na slici nije prikazana promena nepoznatog značaja R329H.



Kod jednog pacijenta detektovana je heterozigotna promena G u A na poziciji 104 u egzonu 8, tj. R329H (Arg368His). Ova promena je ranije opisana u radu Kalinderija i saradnika<sup>229</sup>, ali njena patogenost nije utvrđena. Korišćenjem softverske predikcije patogenosti mutacije dobija se verovatnoća od 51% da je mutacija patogena zbog čega je u ovom istraživanju mutacija R329H klasifikovana kao promena nepoznatog značaja.

Kod 42 od 644 PB pacijenta (6,52%) i 5 od 368 kontrola (1,36%) pokazano je postojanje mutacije u *GBA* genu. Ne računajući R329H promenu, frekvencija *GBA* mutacija bila je statistički značajno češća

(OR=5,07; CI=1,99-12,92; p=0,00017) kod PB pacijenata nego kod zdravih kontrola. Ukoliko se R329H promena uključi u analizu dobija se sličan rezultat: OR= 5,19; CI= 2,03-13,23; p=0,00013.

## 4.2. Kliničke karakteristike ispitivanih bolesnika

Analiza osnovnih demografskih i kliničkih podataka izvršena je nakon podele svih PB pacijenata na dve grupe u zavisnosti od prisustva mutacija u *GBA* genu i to na: PB pacijente sa mutacijom (*GBA*-PB - 43 pacijenta) i PB pacijente bez *GBA* mutacije (*sPB*- 601 pacijent), a potom su te dve grupe poređene. Pacijent sa heterozigotnom promenom nepoznatog značaja (R329H) uvršćen u dalju analizu u tekstu u PB grupu sa mutacijom i tako je i prikazano u predstojećim tabelama. Ukoliko se pacijent sa R329H isključi iz analize ne dolazi do suštinske promene rezultata.

Grupe se nisu statistički značajno razlikovale po polnoj distribuciji, godinama na početku PB, godinama u trenutku pregleda, dužini trajanja PB i pozitivnoj porodičnoj anamnezi za postojanje PB (Tabela 10). Prosečne godine početka PB kod nosilaca *GBA* mutacije su 53,1±9,5 godina (najraniji početak u 34., a najkasniji u 66. godini), dok je u grupi bez *GBA* mutacije 53,3±11,0 godina (najraniji u 10. a najkasniji u 79. godini). Dužina trajanja bolesti je u grupi sa *GBA* mutacijom prosečno 7,88±5,99 godina (od 3 meseca do 23 godine), a u grupi bez *GBA* mutacije 7,49±7,45 godina (od 3 meseca do 45 godina).

Tabela 10. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa Parkinsonovom bolešću, sa i bez *GBA* mutacije.

	<b>GBA-PB</b>	<b>n<sub>a</sub></b>	<b>sPB</b>	<b>n<sub>a</sub></b>	<b>p</b>
<b>Pol (M:Ž)</b>	25:18	43	376:225	601	0,563 <sup>a</sup>
<b>Pozitivna porodična anamneza</b>	9 (23,1%)	39	96 (17,6%)	543	0,397 <sup>a</sup>
<b>Godine početka bolesti*</b>	53,1±9,5 (34-66)	39	53,3±11,0 (10-79)	571	0,909 <sup>b</sup>
<b>Godine u trenutku pregleda*</b>	61,0±9,0 (41-83)	39	60,7±10,5 (19-82)	574	0,850 <sup>b</sup>
<b>Trajanje bolesti (godine)*</b>	7,9±6,0 (0,25-23)	39	7,5±7,4 (0,25-45)	571	0,748 <sup>b</sup>

Legenda: n<sub>a</sub> – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. \*Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija i potom kao raspon. a-  $\chi^2$ ; b- t-test

Podaci o porodičnoj anamnezi bili su dostupni za 582 pacijenta; kod 23,1% *GBA*-PB pacijenata i 17,6% *sPB* pacijenata porodična anamneza bila je pozitivna za postojanje PB kod srodnika, a ova razlika nije pokazala statističku značajnost.

Od devet *GBA*-PB pacijenata sa pozitivnom porodičnom anamnezom, kod šest (66,7%) je jedan od roditelja imao PB, jedan *GBA*-PB pacijent je imao rođaka drugog stepena sa PB, a pored njih su u ovu



grupu uključeni i dvojica braće koji nisu imali druge srodnike sa PB. U grupi sPB najčešće je od PB oboleo jedan od roditelja i to kod 42 sPB pacijenta (43,7%), 16 (16,7%) je imalo brata ili sestru obolele od PB, troje sPB pacijenata imalo je dete sa PB, jedan sPB pacijent imao je roditelja i brata/sestru obolelog od PB, jedan PB pacijent imao je brata/sestru i dete sa PB, četiri sPB pacijenta imalo je babu/dedu sa PB, a 20 pacijenata imalo je srodnika drugog stepena sa PB (pod srodnikom drugog stepena podrazumevaju se: tetka, stric, ujak i njihova deca), dok je za devet sPB pacijenta postojao podatak o pozitivnoj porodičnoj anamezi, ali nije bio dostupan precizniji podatak o srodstvu sPB pacijenta i rođaka sa PB.

Kod najvećeg broja PB pacijenata bez obzira na *GBA* status, prvi simptom PB se javljao na ruci i to kod 68,4% *GBA*-PD pacijenata i 75,6% kod sPB, dok su se kod ostalih pacijenata simptomi prvo javljali na nozi ili na ruci i nozi istovremeno. Dominantna prva smetnja bila je u obe grupe tremor, potom usporenost, ukočenost i otežan hod. Problem sa pisanjem je registrovan samo u sPB grupi. Za sve nabrojane prve simptome nije postojala statistički značajna razlika kada se uporede *GBA*-PB i sPB grupa sem za bol kao prvi dominantan simptom koji je postojao kod 10,5% PB pacijenata nosilaca mutacije i kod 3% PB pacijenata bez mutacije u *GBA* genu (Tabela 11). Kod sva četiri *GBA*-PB pacijenta i kod 14 od ukupno 16 sPB pacijenata sa bolom kao inicijalnim simptomom PB, bol je bio lokalizovan u ruci, tj. u ramenom regionu, ipsilateralno sa stranom na kojoj je počela PB. Dva pacijenta iz sPB grupe imala su bol lokalizovan u nozi. U *GBA*-PB grupi, tri pacijenta sa bolom u ramenu su heterozigotni nosioci D409H mutacije, a jedan R463H mutacije.

Tabela 11. Dominantan znak na početku Parkinsonove bolesti.

Dominantan znak na početku bolesti	<i>GBA</i> -PB	$n_a$	sPB	$n_a$	p
rigidnost	6 (15,8%)	38	73 (13,5%)	539	0,697 <sup>a</sup>
bradikineza	9 (23,7%)	38	149 (27,6%)	539	0,597 <sup>a</sup>
tremor	17 (44,7%)	38	272 (50,5%)	539	0,495 <sup>a</sup>
<b>bol</b>	4 (10,5%)	38	16 (3,0%)	539	<b>0,036<sup>b</sup></b>
problem u pisanju	0	38	7 (1,3%)	539	1 <sup>b</sup>
otežan hod	2 (5,3%)	38	22 (4,1%)	539	0,667 <sup>b</sup>
<b>zahvaćenost ruke/noge/ruke i noge</b>	26/5/7	38	404/59/71	534	0,585 <sup>a</sup>

Legenda:  $n_a$  – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. a-  $\chi^2$ ; b- Fisherov test.

U trenutku pregleda najveći broj pacijenata obe grupe imao je asimetričan parkinsonizam. Distonija (blefarospazam ili tortikolis) postojala je kod 1,8% sPB pacijenta, posturalna nestabilnost kod

28,2% GBA-PB i 27,0% sPB pacijenata, halucinacije kod 15,4% GBA-PB i 8,1% sPB pacijenata; kod svih prethodno nabrojanih znakova bolesti nije registrovana statistički značajna razlika među grupama. Diskinezije su statistički značajno češće postojale u GBA-PB grupi (38,5%) u poređenju sa sPB grupom (23,6%), a razlika je postojala i u pojavi frizinga hoda: 36,8% u GBA-PB grupi i 19,6% u sPB grupi ( $p < 0,05$ ) (Tabela 12).

Tabela 12. Znaci Parkinsonove bolesti u trenutku pregleda.

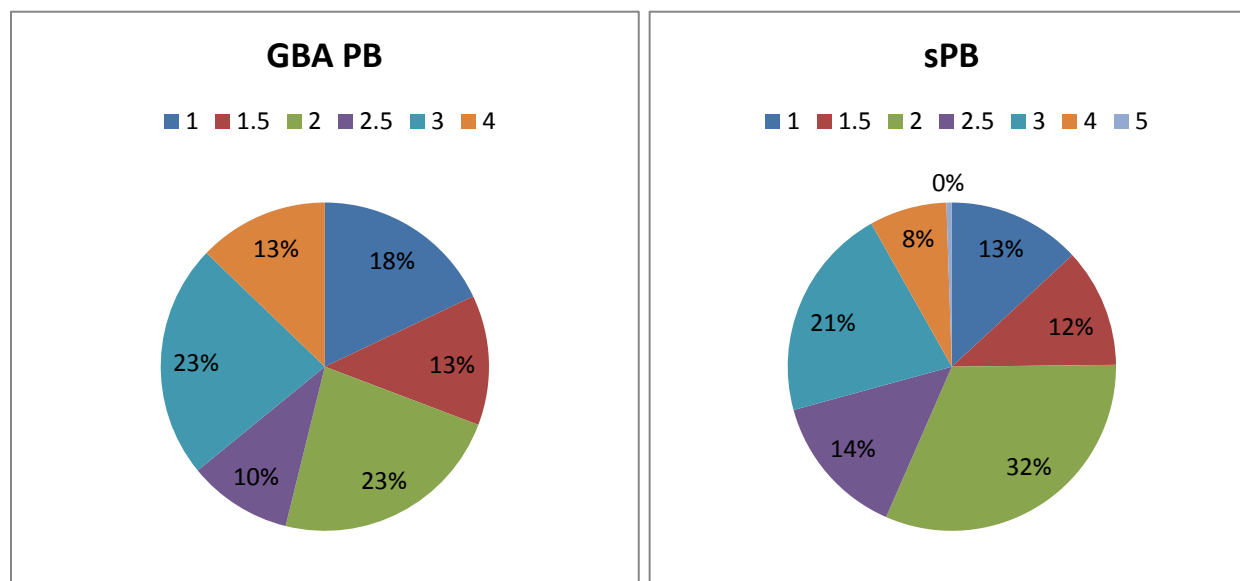
Znaci na pregledu	GBA-PB	$n_a$	sPB	$n_a$	p
asimetričan parkinsonizam	37 (92,5%)	40	542 (94,4%)	574	0,612 <sup>a</sup>
diskinezije	15 (38,5%)	39	128 (23,6%)	542	<b>0,038<sup>a</sup></b>
distonija	0	39	10 (1,8%)	542	1 <sup>b</sup>
frizing hoda	14 (36,8%)	38	106 (19,6%)	542	<b>0,011<sup>a</sup></b>
posturalna nestabilnost	11 (28,2%)	39	148 (27,0%)	548	0,871 <sup>a</sup>
halucinacije	6 (15,4%)	39	44 (8,1%)	542	0,118 <sup>a</sup>
UPDRS ukupni u ON stanju*	58,61±34,16 (7-159)	36	54,79±27,52 (3-152)	373	0,438 <sup>c</sup>
H&Y stadijum u ON stanju*	2,29±0,96 (1-4)	39	2,26±0,83 (1-5)	564	0,811 <sup>c</sup>

Legenda:  $n_a$  – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. \*Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija i potom kao raspon. a-  $\chi^2$ ; b- Fišerov test, c- t-test.

Ukupni UPDRS skor za GBA-PB grupu iznosio je između 7 i 159, prosečno 58,61±34,16, a H&Y od 1-4 stadijuma, prosečno 2,29±0,96. Za sPB grupu UPDRS je bio od 3 do 152, prosečna vrednost 54,79±27,52, a H&Y od 1-5 stadijuma, prosečno 2,26±0,83. Grupe se nisu statistički značajno razlikovale po skorovima za ukupni UPDRS i H&Y stadijum ( $p > 0,05$ ). Slika 16. prikazuje strukturu ispitivanih pacijenata po H&Y stadijumu bolesti.

Grupe pacijenata nisu se statistički značajno razlikovale kada se porede srednje vrednosti skorova na MMSE i HAMD, dok je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) postojala u HAMA skorovima koji su u grupi GBA-PB pacijenta iznosili od 0 do 29, prosečno 9,16±5,97 u poređenju sa sPB gde je HAMA skor bio 0-31, prosečna vrednost 6,75±5,82.

Slika 16. Struktura ispitivanih pacijenata prema H&amp;Y stadijumu Parkinsonove bolesti.



Pacijenti u svakoj grupi potom su razvrstani u dve podgrupe na osnovu vrednosti skora postignutog na svakom od sledećih testova, a u odnosu na preporučenu graničnu vrednost prema literaturi, i to na sledeći način: za MMSE se smatralo da kognitivni poremećaj postoji kod pacijenata sa skorom koji je  $\leq 24$ ; za HAMD se smatralo da je pacijent depresivan ukoliko je skor  $\geq 17$ ; za HAMA se smatralo da je pacijent anksiozan ako je skor  $\geq 18$ . Upoređivanjem GBA-PB i sPB grupa pacijenata nakon kategorijalne raspodele kod ova tri testa nije detektovana statistički značajna razlika.

Tabela 13. Skorovi na Mini Mental skali (MMSE) i Hamiltonovoj skali depresivnosti (HAMD) i anksioznosti (HAMA).

Znaci na pregledu	GBA-PB	$n_a$	sPB	$n_a$	p
MMSE*	27,44±2,73 (20-30)	36	27,72±3,50 (2-30)	425	0,656 <sup>c</sup>
MMSE≤24	6 (16,7%)	36	44 (10,4%)	425	0,242 <sup>a</sup>
HAMD*	9,42±6,00 (0-28)	33	8,88±7,96 (0-46)	379	0,703 <sup>c</sup>
HAMD≥17	3 (9,1%)	33	63 (16,6%)	379	0,258 <sup>a</sup>
HAMA*	9,16±5,97 (0-29)	32	6,75±5,82 (0-31)	304	<b>0,027<sup>c</sup></b>
HAMA≥18	1 (3,1%)	32	19 (6,25%)	304	0,706 <sup>b</sup>

Legenda:  $n_a$  – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. \*Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija i potom kao raspon. a-  $\chi^2$ ; b- Fišerov test, c- t-test.

U slučaju HAMA, obzirom da nakon kategorijalne raspodele pacijenata nije pokazana statistički značajna razlika među grupama, a da ona postoji pri poređenju prosečne vrednosti za HAMA skor koji, međutim ne prevazilazi graničnu vrednost ni u jednoj grupi, smatramo da ovaj nalaz nema klinički značaj (Tabela 13).

Terapijski odgovor na L-dopu nije se statistički značajno razlikovao među grupama. Terapiju nije dobijalo ukupno 39 PB pacijenata jer su prvi put pregledani u ranom stadijumu bolesti nakon čega im je terapija uvedena. U GBA-PB grupi 10% pacijenata nije dobijalo terapiju, dok je u grupi sPB taj procenat bio nešto manji (6,49%). Najveći broj pacijenata, nezavisno od statusa u *GBA* genu, je imao odličan terapijski odgovor na L-dopu i to u grupi GBA-PB 82,1% i u grupi sPB 90,17%. Među grupama nije registrovana statistički značajna razlika u pogledu terapijskog odgovora ( $p > 0,05$ ) (Tabela 14).

Tabela 14. Odgovor na terapiju L-dopom.

Odgovor na terapiju L-dopom	GBA-PB	n <sub>a</sub>	sPB	n <sub>a</sub>	p
odličan	32 (82,1%)	39	486 (90,17%)	539	0,108 <sup>a</sup>
umeren	2 (5,13%)	39	15 (2,78%)	539	0,320 <sup>b</sup>
loš	1 (2,56%)	39	13 (2,41%)	539	1 <sup>b</sup>
ne uzima terapiju	4 (10,3%)	39	35 (6,49%)	539	0,323 <sup>b</sup>

Legenda: n<sub>a</sub> – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. a-  $\chi^2$ ; b- Fišerov test

PB pacijenti koji su heterozigotni nosici *GBA* mutacije su dalje podeljeni u dve grupe na osnovu „težine“ mutacije: nosioce „lake“ *GBA* mutacije i nosioce „teške“ *GBA* mutacije, a potom su klinički i demografski podaci ove dve grupe upoređeni. Ove dve grupe nisu se razlikovale po polnoj distribuciji, postojanju pozitivne porodične anamneze za PB, dužinu trajanja bolesti (Tabela 15.), dominantnom znaku na početku bolesti (Tabela 16), i odgovoru na terapiju L-dopom (Tabela 18). Razlika među ovim grupama nije postojala u smislu prisustva navedenih znakova u trenutku pregleda (Tabela 17), uz napomenu da je razlika bila na nivou trenda za prisustvo frizinga koji je bio češći kod nosilaca „lake“ *GBA* mutacije (58,3%) nego kod nosilaca „teških“ *GBA* mutacija (26,3%). Početak PB kod nosilaca „teških“ *GBA* mutacija je bio prosečno u 47,9±8,3 (34-61) godina, što je statistički značajno ranije ( $p < 0,05$ ) u poređenju sa godinama početka PB kod nosilaca „lake“ *GBA* mutacije, prosečno u 60,0±6,8 (43-66). Statistički značajna razlika postojala je i pri poređenju godina u trenutku pregleda - pacijenti sa „lakim“ *GBA* mutacijama bili su stariji u trenutku pregleda (68,7±5,8) u poređenju sa grupom sa „teškim“ *GBA* mutacijama (56,6±7,6) (Tabela 15).

Tabela 15. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata sa Parkinsonovom bolešću koji su heterozigotni nosioci „lakih“ i „teških“ *GBA* mutacija.

	<i>GBA</i> „lake“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>GBA</i> „teške“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>p</i>
<b>Pol (M:Ž)</b>	7:6	13	11:9	20	0,948 <sup>a</sup>
<b>pozitivna porodična anamneza</b>	4 (33,3%)	12	4 (20,0%)	20	0,432 <sup>b</sup>
<b>godine početka bolesti*</b>	60,0±6,8 (43-66)	12	47,9±8,3 (34-61)	20	0,000038 <sup>c</sup>
<b>godine u trenutku pregleda*</b>	68,7±5,8 (59-83)	12	56,6±7,6 (41-72)	20	0,000028 <sup>c</sup>
<b>trajanje bolesti (godine)*</b>	8,7±6,7 (0,25-21)	12	8,7±5,8 (2-23)	20	0,306 <sup>d</sup>

Legenda: *n<sub>a</sub>* – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. \*Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija i potom kao raspon. a-  $\chi^2$ ; b- Fišerov test; c-t-test, d-Mann-Whitney U test.

Tabela 16. Dominantan znak na početku Parkinsonove bolesti kod pacijenata koji su heterozigotni nosioci „lakih“ i „teških“ *GBA* mutacija.

Dominantan znak na početku bolesti	<i>GBA</i> „lake“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>GBA</i> „teške“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>p</i>
<b>rigidnost</b>	1 (8,3%)	12	4 (21,5%)	19	0,623 <sup>a</sup>
<b>bradikineza</b>	3 (25,0%)	12	5 (26,3%)	19	1 <sup>a</sup>
<b>tremor</b>	7 (58,3%)	12	7 (36,8%)	19	0,242 <sup>b</sup>
<b>bol</b>	0	12	3 (15,8)	19	0,264 <sup>a</sup>
<b>problem u pisanju</b>	0	12	0	19	-
<b>otežan hod</b>	1 (8,3%)	12	0	19	0,387 <sup>a</sup>
<b>zahvaćenost ruke/noge/ruke i noge</b>	7/2/3	12	15/2/2	19	0,447 <sup>b</sup>

Legenda: *n<sub>a</sub>* – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. a-Fisher; b-  $\chi^2$ .

Tabela 17. Znaci Parkinsonove bolesti u trenutku pregleda kod pacijenata koji su heterozigotni nosioci „lakih“ i „teških“ *GBA* mutacija.

Znaci na pregledu	<i>GBA</i> „lake“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>GBA</i> „teške“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>p</i>
asimetričan parkinsonizam	12 (100%)	12	18 (94,7%)	19	1 <sup>a</sup>
diskinezije	7 (58,3%)	12	6 (31,6%)	19	0,141 <sup>b</sup>
distonija	0	12	0	19	-
frizing hoda	7 (58,3%)	12	5 (26,3%)	19	0,075 <sup>b</sup>
posturalna nestabilnost	4 (33,3%)	12	7 (36,8%)	19	1 <sup>a</sup>
halucinacije	3 (25,0%)	12	3 (15,8%)	19	0,640 <sup>a</sup>
UPDRS ukupni u ON stanju*	52,92±26,12 (9-95)	12	67,88±43,17 (7-159)	17	0,148 <sup>d</sup>
H&Y stadijum u ON stanju*	2,12±1,00 (1-4)	12	2,52±0,98 (1-4)	20	0,148 <sup>c</sup>

Legenda: *n<sub>a</sub>* – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. a-Fišerov test; b- $\chi^2$ ; c- t-test, d-Mann-Whitney U test. \*Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija i potom kao raspon.

Tabela 18. Odgovor na terapiju L-dopom kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću koji su heterozigotni nosioci „lakih“ i „teških“ *GBA* mutacija.

Odgovor na terapiju L-dopom	<i>GBA</i> „lake“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>GBA</i> „teške“ mutacije	<i>n<sub>a</sub></i>	<i>p</i>
odličan	10 (83,3%)	12	17 (85,0%)	20	1 <sup>a</sup>
umeren	0	12	1 (5%)	20	1 <sup>a</sup>
loš	0	12	0	20	-
ne uzima terapiju	2 (16,7%)	12	2 (10%)	20	0,619 <sup>a</sup>

Legenda: *n<sub>a</sub>* – broj ispitanika za koje je podatak bio dostupan. a-Fišerov test.

U cilju daljeg ispitivanja motornih komplikacija i nemotornih manifestacija PB udružene sa *GBA* mutacijama, sprovedena je i studija slučajeva i kontrola gde je upoređen 31 PB pacijent heterozigotni nosilac *GBA* mutacije sa 31 PB pacijentom bez mutacije u *GBA* genu (sPB). Mečovanje je vršeno na osnovu pola, godina početka PB, dužine trajanja bolesti, H&Y stadijuma PB i godina obrazovanja (Tabela 19). Ove dve grupe nisu se razlikovale u smislu antiparkinsonske terapije, predstavljene kao L-Dopa ekvivalent (LDE), u ukupnom UPDRS skor i subskorovima UPDRS-a, osim za I deo UPDRS-a gde je postojala statistički značajna razlika (Tabela 19). Dve grupe nisu se statistički razlikovale u smislu prisustva PB u porodičnoj anamnezi, lokalizaciji početnih simptoma PB, kao i PB fenotipa u trenutku pregleda (Tabela 20).

Tabela 19. Studija slučajeveva i kontrola: mečovanje.

		GBA-PB	sPB	p
<b>pol</b>	muški	15 (48,4%)	15 (48,4%)	1,000
	ženski	16 (51,6%)	16 (51,6%)	
<b>starost</b>	godine	63,9±6,8	64,3±6,2	0,808
<b>obrazovanje</b>	godine	12,2±3,7	11,7±3,6	0,603
<b>početak PB</b>	godine	56,0±7,8	55,9±7,9	0,948
<b>trajanje PB</b>	godine	7,9±6,1	8,5±6,3	0,799
<b>H&amp;Y</b>	stadijum	2,26±0,99	2,26±0,89	1,000
<b>UPDRS I</b>		9,84±7,80	5,00±3,61	<b>0,005</b>
<b>UPDRS II</b>		13,45±10,30	13,45±7,81	0,446
<b>UPDRS III</b>		33,64±18,55	30,81±15,04	0,799
<b>UPDRS IV</b>		3,64±4,46	2,68±3,05	1,000
<b>UPDRS total</b>		60,58±35,52	51,93±24,90	1,000
<b>LDE</b>		760,79±431,11	699,66±456,98	0,611

Rezultati su prikazani kao prosečna vrednost ± standardna devijacija. LDE- L-Dopa ekvivalent.

Tabela 20. Porodična anamneza, lokalizacija inicijalno simptoma i fenotip Parkinsonove bolesti.

		GBA-PB	sPB	p
Porodična anamneza za PB	pozitivna	7 (22,6%)	5 (16,1%)	0,520
	negativna	24 (77,4%)	26 (83,9%)	
Lokalizacija inicijalnog simptoma	na ruci	22 (75,9%)	17 (60,7%)	0,444
	na nozi	2 (6,9%)	4 (14,3%)	
	na ruci i nozi	5 (17,2%)	7 (25,0%)	
PB fenotip	tremorski	8 (25,8%)	9 (29,0%)	0,787
	akinetsko rigidni	21 (67,7%)	21 (67,7%)	
	posturalna nestabilnost sa poremećajem hoda	1 (3,2%)	0	
	neodređen	1 (3,2%)	1 (3,2%)	

Nije bilo statistički značajne razlike među grupama u postojanu motornih komplikacija PB osim trenda koji je primećen za vršne diskinezije koje su postojale u GBA-PB grupi kod 45,8% i kod 20,7% u sPB grupi ( $p=0,051$ ). Takođe nije bilo statistički značajne razlike u postojanju frizinga hoda, prisustva halucinacija ili poremećaja kontrole impulsa (Tabela 21).

Tabela 21. Prisustvo motornih komplikacija, frizinga hoda, halucinacija i poremećaja kontrole impulsa.

		GBA-PB	sPB	p
<b>Diskinezije</b>	nema	11 (45,8%)	18 (60,0%)	0,300
	ima	13 (54,2%)	12 (40,0%)	
<b>Horea</b>	nema	14 (58,3%)	18 (60,0%)	0,901
	ima	10 (41,7%)	12 (40,0%)	
<b>Distonija</b>	nema	19 (79,2%)	26 (89,7%)	0,288
	ima	5 (20,8%)	3 (10,3%)	
<b>Balizam</b>	nema	23 (95,8%)	30 (100%)	0,259
	ima	1 (4,2%)	0	
<b>Vršne diskinezije*</b>	nema	13 (54,2%)	23 (79,3%)	<b>0,051</b>
	ima	11 (45,8%)	6 (20,7%)	
<b>Diskinezije na kraju doze</b>	nema	21 (87,5%)	24 (82,8%)	0,631
	ima	3 (12,5%)	5 (17,2%)	
<b>Bifazične diskinezije</b>	nema	24 (100%)	27 (96,4%)	0,350
	ima	0	1 (3,6%)	
<b>Motorne fluktuacije</b>	nema	11 (45,8%)	16 (55,2%)	0,498
	ima	13 (54,2%)	13 (44,8%)	
<b>„wearing off“</b>	nema	17 (70,8%)	17 (58,6%)	0,356
	ima	7 (29,2%)	12 (41,4%)	
<b>ON/OFF</b>	nema	16 (66,7%)	25 (86,2%)	0,091
	ima	8 (33,3%)	4 (13,8%)	
<b>no ON</b>	nema	23 (95,8%)	28 (96,6%)	0,891
	ima	1 (4,2%)	1 (3,4%)	
<b>Halucinacije</b>	nema	16 (66,7%)	21 (70,0%)	0,793
	ima	8 (33,3%)	9 (30,0%)	
<b>Frizing</b>	nema	12 (50,0%)	15 (50,0%)	1,000
	ima	12 (50,0%)	15 (50,0%)	
<b>Poremećaj kontrole impulsa</b>	nema	21 (95,5%)	30 (100%)	0,238
	ima	1 (4,5%)	0	

\* OR=3,25 (CI 0,97-10,87).

Ispitivanje nemotornih karakteristika pomoću Non-motor symptoms questionnaire<sup>202</sup> pokazalo je da u poređenju sa sPB, kod GBA-PB pacijenata postoji statistički značajno češće gubitak interesovanja



( $p=0,022$ ) i dnevna pospanost ( $p=0,036$ ) dok su na nivou trenda bili osećanje tuge ( $p=0,079$ ), kao i manja učestalost živih snova ( $p=0,051$ ) i problema sa gutanjem ( $p=0,076$ ) kod GBA-PB pacijenata. Nije bilo statistički značajne razlike prilikom poređenja ostalih stavki upitnika, kao ni prilikom poređenja ukupnog skora (Tabela 22).

Tabela 22. Upitnik o nemotornim simptomima.

		GBA-PB	sPB	p
<b>curenje pljuvačke</b>	nema	23 (82,1%)	20 (71,4%)	0,342
	ima	5 (17,9%)	8 (28,6%)	
<b>hiposmija</b>	nema	17 (63,0%)	18 (64,3%)	0,919
	ima	10 (37,0%)	10 (35,7%)	
<b>problem sa gutanjem<sup>#</sup></b>	nema	23 (82,1%)	17 (60,7%)	0,076
	ima	5 (17,9%)	11 (39,3%)	
<b>mučnina i povraćanje</b>	nema	26 (96,3%)	24 (85,7%)	0,172
	ima	1 (3,7%)	4 (14,3%)	
<b>konstipacija</b>	nema	18 (64,3%)	12 (42,9%)	0,108
	ima	10 (35,7%)	16 (57,1%)	
<b>inkontinencija stolice</b>	nema	23 (82,1%)	26 (92,9%)	0,225
	ima	5 (17,9%)	2 (7,1%)	
<b>nekompletno pražnjenje creva</b>	nema	19 (70,4%)	22 (78,6%)	0,485
	ima	8 (29,6%)	6 (21,4%)	
<b>urgencija mokrenja</b>	nema	16 (59,3%)	15 (53,6%)	0,671
	ima	11 (40,7%)	13 (46,4%)	
<b>nokturija</b>	nema	11 (40,7%)	14 (50,0%)	0,491
	ima	16 (59,3%)	14 (50,0%)	
<b>neobjašnjivi bolovi</b>	nema	21 (77,8%)	22(78,6%)	0,943
	ima	6 (22,2%)	6 (21,4%)	
<b>gubitak telesne mase</b>	nema	24 (85,7%)	20 (71,4%)	0,193
	ima	4 (14,3%)	8 (28,6%)	
<b>problem sa pamćenjem</b>	nema	16 (57,1%)	21 (75,0%)	0,158
	ima	12 (42,9%)	7 (25,0%)	
<b>gubitak interesovanja<sup>&amp;</sup></b>	nema	15 (53,6%)	23 (82,1%)	<b>0,022</b>
	ima	13 (46,4%)	5 (17,9%)	
<b>halucinacije</b>	nema	20 (71,4%)	24 (85,7%)	0,193
	ima	8 (28,6%)	4 (14,3%)	
<b>problem sa koncentracijom</b>	nema	13 (46,4%)	19 (67,9%)	0,105
	ima	15 (53,6%)	9 (32,1%)	
<b>osećanje tuge<sup>“</sup></b>	nema	10 (37%)	17 (60,7%)	0,079
	ima	17 (63%)	11 (39,3%)	

<b>anksioznost</b>	nema	13 (48,1%)	12 (42,9%)	0,694
	ima	14 (51,9%)	16 (57,1%)	
<b>veća ili manja zainteresovanost za seks</b>	nema	13 (52,0%)	18 (66,7%)	0,282
	ima	12 (48,0%)	9 (33,3%)	
<b>problem u seksualnom odnosu</b>	nema	13 (52,0%)	18 (66,7%)	0,282
	ima	12 (48,0%)	9 (33,3%)	
<b>mrkosvestica</b>	nema	13 (48,1%)	19 (67,9%)	0,139
	ima	14 (51,9%)	9 (32,1%)	
<b>padovi</b>	nema	20 (71,4%)	22 (78,6%)	0,537
	ima	8 (28,6%)	6 (21,4%)	
<b>dnevna pospanost<sup>o</sup></b>	nema	20 (71,4%)	26 (92,9%)	<b>0,036</b>
	ima	8 (28,6%)	2 (7,1%)	
<b>insomnija</b>	nema	20 (74,1%)	21 (75,0%)	0,937
	ima	7 (25,9%)	7 (25,0%)	
<b>živi snovi<sup>l</sup></b>	nema	22 (81,5%)	16 (57,1%)	<b>0,051</b>
	ima	5 (18,5%)	12 (42,9%)	
<b>poremećaj spavanja u REM fazi</b>	nema	17 (63,0%)	15 (53,6%)	0,480
	ima	10 (37,0%)	13 (46,4%)	
<b>sindrom nemirnih nogu</b>	nema	18 (66,7%)	16 (57,1%)	0,467
	ima	9 (33,3%)	12 (42,9%)	
<b>oticanje nogu</b>	nema	22 (81,5%)	22 (78,6%)	0,787
	ima	5 (18,5%)	6 (21,4%)	
<b>preterano znojenje</b>	nema	21 (77,8%)	19 (67,9%)	0,409
	ima	6 (22,2%)	9 (32,1%)	
<b>duple slike</b>	nema	26 (96,3%)	25 (89,3%)	0,317
	ima	1 (3,7%)	3 (10,7%)	
<b>sumanutosti</b>	nema	25 (89,3%)	25 (89,3%)	1,000
	ima	3 (10,7%)	3 (10,7%)	
<b>NMS prosečna vrednost pozitivnih odgovora</b>		<b>9,286±4,913</b>	<b>8,929±5,361</b>	<b>0,421</b>

<sup>#</sup> OR=2,98 (CI 0,87-10,17); <sup>&</sup> OR=3,98 (CI 1,18-13,51); <sup>“</sup> OR=2,62 (CI 0,88-7,81); <sup>o</sup> OR=5,21 (CI 0,99-27,03);

<sup>l</sup> OR=0,30 (CI 0,09-1,03).

Testiranje kognitivnih funkcija nije pokazalo postojanje statistički značajne razlike u MMSE skoru, kao i ukupnom skoru i subskorovima Adenbruksovog testa, osim za subskor koji se odnosi na jezik gde je postojao trend statističke značajnosti ( $p=0,056$ ). Ovaj nalaz ukazuje na češći poremećaj kod GBA-PB pacijenata ukoliko se koriste prema starosti prilagođene granične vrednosti testa, iako se srednja vrednost kod ove dve grupe nije razlikovala. GBA-PB grupa imala je statistički značajno lošija postignuća na Bostonskom testu imenovanja (Tabela 23).

Ispitivanje postojanja anksioznosti, depresije i apatije nije pokazalo postojanje statistički značajne razlike među grupama, osim na Bekovoj skali za depresiju nakon što se pacijenti podele u grupe sa i bez depresije sa granicom od 13 poena ( $p=0,008$ ) koja ukazuje da je depresija bila češća u GBA PB grupi. I u ovom slučaju nije postojala razlika u srednjim vrednostima na Bekovoj skali za depresiju (Tabela 24).

Tabela 23. Rezultati kognitivnog testiranja- Adenbruks, MMSE, Bostonski test nominacije.

kategorija	srednja vrednost±standardna devijacija		p	granična vrednost	ispad	GBA-PB	sPB	p
	GBA-PB	sPB						
<b>Adenbruks pažnja</b>	17,19±1,36	16,06±3,79	0,131	zavisi od uzrasta	nema ima	20 (69,0%) 9 (31,0%)	24 (77,4%) 7 (22,6%)	0,459
<b>Adenbruks pamćenje</b>	21,19±4,52	21,26±5,84	0,962	zavisi od uzrasta	nema ima	21 (72,4%) 8 (27,6%)	26 (83,9%) 5 (16,1%)	0,282
<b>Adenbruks fluentnost</b>	8,88±3,17	8,97±3,23	0,922	zavisi od uzrasta	nema ima	16 (55,2%) 13 (44,8%)	21 (67,7%) 10 (32,3%)	0,317
<b>Adenbruks jezik*</b>	23,73±2,86	22,84±6,10	0,473	zavisi od uzrasta	nema ima	18 (62,1%) 11 (37,9%)	26 (83,9%) 5 (16,1%)	<b>0,056</b>
<b>Adenbruks vizuospac.</b>	15,00±1,96	14,10±3,65	0,240	zavisi od uzrasta	nema ima	24 (82,8%) 5 (17,2%)	25 (80,6%) 6 (19,4%)	0,833
<b>Adenbruks ukupno</b>	86,00±12,12	83,23±21,17	0,539	88	nema ima	14 (48,3%) 15 (51,7%)	19 (61,3%) 12 (38,7%)	0,311
<b>MMSE</b>	27,62±2,50	27,23±4,84	0,691	24	nema ima	25 (83,3%) 5 (16,7%)	27 (87,1%) 4 (12,9%)	0,679
<b>Bostonski test nominacije<sup>1</sup></b>	52,30±7,52	55,83±4,35	0,037	zavisi od uzrasta	nema ima	16 (64,0%) 9 (36,0%)	29 (96,7%) 1 (3,3%)	<b>0,003</b>

\* OR=3,17 (CI 0,94-10,75); <sup>1</sup> OR=16,39 (CI 1,89-142,86).

Tabela 24. Psihijatrijska ispitivanja- Hamiltonova skala depresije i anksioznosti, Bekova skala za depresiju i skala apatije.

kategorija	srednja vrednost±standardna devijacija		p	granična vrednost	ispad	GBA-PB	sPB	p
	GBA-PB	sPB						
<b>Hamilton depresija (HAMD)</b>	9,07±6,33	6,03±4,79	0,313	17	nema ima	26 (89,7%) 3 (10,3%)	31 (100,0%) 0	0,107
<b>Bekova skala za depresiju (BDI)<sup>§</sup></b>	11,50±9,34	9,08±6,66	0,973	13	nema ima	18 (75,0%) 6 (25,0%)	26 (100%) 0	<b>0,008</b>
<b>Hamilton anksioznost (HAMA)</b>	8,64±6,43	6,97±5,26	0,377	18	nema ima	27 (96,4%) 1 (3,6%)	30 (96,8%) 1 (3,2%)	1,000
<b>Apatija</b>	15,15±9,47	13,19±7,88	0,959	13	nema ima	12 (46,2%) 14 (53,8%)	14 (45,2%) 17 (54,8%)	0,940

<sup>§</sup> OR= 1,33 (CI 1,06-1,68).

### 4.3. Transkranijalna sonografija moždanog parenhima

U ovom delu studije TKS-om je ukupno pregledano 118 ispitanika i to:

- četiri ispitanika u GB+/PB+ grupi od kojih su tri bila kombinovani heterozigotni nosioci N370S/D409H mutacija a jedan homozigot sa N370S/N370S genotipom,
- 12 ispitanika u GB+/PB- grupi sa sledećim genotipom: tri kombinovana heterozigota sa N370S/D409H mutacijama, tri sa N370S/R463H mutacijama, dva sa N370S/RecNcil, dva N370S/c.1265\_1319del, jedan sa N370S/R120W mutacijama i jedan homozigot N370S/N370S,
- 18 u GBA+/PB+ grupi gde je mutacija D409H nađena u heterozigotnom stanju kod osam ispitanika, N370S kod sedam, dok je svaka od mutacija L444P, D380V i E388K pronađena kod jednog ispitanika,
- devet u GBA+/PB- grupi od kojih je šest ispitanika bilo asimptomatski heterozigoni nosilac N370S mutacije, dva ispitanika su imala R409H mutaciju a jedan L444P mutaciju,
- 32 ispitanika u sPB grupi,
- 43 zdrave kontrole.

Svi ispitanici su bili srpske nacionalne pripadnosti. U Tabeli 25. prikazani su karakteristike ispitanika koji su učestvovali u delu studije sa TKS.

Statistički značajna razlika za godine u trenutku pregleda je postojala među grupama: GB+PB- ( $p=0,36$ ), GBA+PB+ ( $p=0,018$ ) i sPB ( $p=0,032$ ) koje su se razlikovale od kontrola; GB+PB- se razlikovala od GBA+PB+ ( $p=0,000$ ), GBA+PB- ( $p=0,039$ ) i sPB ( $p=0,000$ ) grupe.

U grupi pacijenata koji su imali i GB i PB regrutovana su samo 4 pacijenta, svi muškog pola. Prvi znaci PB kod ovih pacijenta javili su se gotovo osam godina ranije nego u druge dve PB grupe (GBA+/PB+ i sPB), ali ova razlika nije bila statistički značajna ( $p = 0,311$ ).

Statistički značajna razlika nije postojala među tri grupe sa PB, kada se porede po dužini trajanja PB, H&Y stadijumu, UPDRS III skor i MMSE skor. Pacijenti grupe GB+PB+ imali su statistički značajno veći prosečan skor na skali HAMA ( $20,7\pm 4,6$ ) u poređenju sa GBA+PB+ ( $10,7\pm 7,1$ ) i sPB grupama ( $9,1\pm 7,1$ ) ( $p = 0,025$ ). Sličan trend je postojao i kod depresije, ali nije dosegao statističku značajnost ( $p = 0,117$ ).

U Tabeli 26 i na Slici 17. prikazani su rezultati ispitivanja TKS.

Tabela 25. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika.

	GB+PB+	GB+PB-	GBA+PB+	GBA+PB-	sPB	Kontrole	p
<b>Broj pacijenata</b>	4	12	18	9	32	43	-
<b>Pol (m:ž)</b>	0:4	1:5	1:1,6	2:1	1:2,6	1:2,9	0,085 <sup>a</sup>
<b>Godine starosti<sup>d</sup></b>	49,0±12,1	44,7±19,0	62,6±8,6	56,7±11,7	61,5±9,3	54,9±14,9	0,014 <sup>b,*</sup>
<b>Godine početka PB<sup>d</sup></b>	45,6±9,5	-	53,0±8,2	-	53,3±10,0	-	0,311 <sup>c</sup>
<b>Godine trajanja PB<sup>d</sup></b>	3,6±3,7	-	9,6±6,7	-	8,2±5,8	-	0,201 <sup>b</sup>
<b>H&amp;Y stadijum<sup>d</sup></b>	2,5±1,2	-	2,7±1,1	-	2,4±0,8	-	0,648 <sup>b</sup>
<b>UPDRS III<sup>d</sup></b>	47,2±27,7	-	38,6±21,4	-	35,9±15,5	-	0,433 <sup>b</sup>
<b>MMSE<sup>d</sup></b>	28,5±1,3	-	27,9±2,6	-	28,5±2,4	-	0,838 <sup>c</sup>
<b>HAMD<sup>d</sup></b>	19,2±6,3	-	9,4±5,7	-	11,2±9,0	-	0,117 <sup>b</sup>
<b>HAMA<sup>d</sup></b>	20,7±4,6	-	10,7±7,1	-	9,1±7,1	-	0,025 <sup>b,†</sup>

Legenda: GB+PB+: pacijenti sa GB tip 1 i parkinsonizmom; GB+PB-: pacijenti sa GB tip 1 bez parkinsonizma; GBA+PB+: PB pacijenti heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu; GBA+PB-: asimptomatski heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu; sPD: sporadična PB (isključeno postojanje mutacija u *GBA* genu). H&Y- Hoehn i Yahr skala; UPDRS: Unified Parkinson's Disease Rating Scale; MMSE: Mini Mental State Examination; HAMD: Hamilton Depression Rating Scale; HAMA: Hamilton Anxiety Rating Scale. \*: GD+PD- (p=0,36), GBA+PD+ (p=0,018) i sPD (p=0,32) grupe razlikuju se od grupe Kontrole, i GD+PD- grupa razlikuje se od GBA+PD+ (p= 0,000), GBA+PD- (p=0,039) i sPB (p= 0,000) grupa;†: GD+PD+ grupa razlikuje se od sPB i GBA+PD+ grupa. a- $\chi^2$ . b-Kruskal Wallis Test. c-One way ANOVA. d- vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija.

Tabela 26. Nalaz transkranijalne sonografije kod ispitanika.

	<b>GB+PB+</b>	<b>GB+PB-</b>	<b>GBA+PB+</b>	<b>GBA+PB-</b>	<b>sPB</b>	<b>Kontrole</b>	<b>p</b>
<b>aSNmax (cm<sup>2</sup>)<sup>d</sup></b>	0,28±0,15	0,18±0,06	0,27±0,06	0,16±0,03	0,28±0,10	0,12±0,08	0,001 <sup>a,*</sup>
<b>Hiperehogenost SN<sup>e</sup></b>	3/4 (75%)	4/12 (33%)	15/18 (83%)	2/9 (22%)	28/32 (87,5%)	5/43 (11,6%)	<0,001 <sup>b,†</sup>
<b>Abnormalna ehogenost raphe<sup>e</sup></b>	2/4 (50%)	2/12 (17%)	10/18 (55,6%)	2/9 (22%)	9/32 (29%)	8/43 (19%)	0,046 <sup>b,#</sup>
<b>Širina treće komore (mm)<sup>d</sup></b>	6,2±1,7	6,2±1,8	7,4±2,6	5,6±0,9	7,1±2,3	8,0±1,7	0,516 <sup>c</sup>

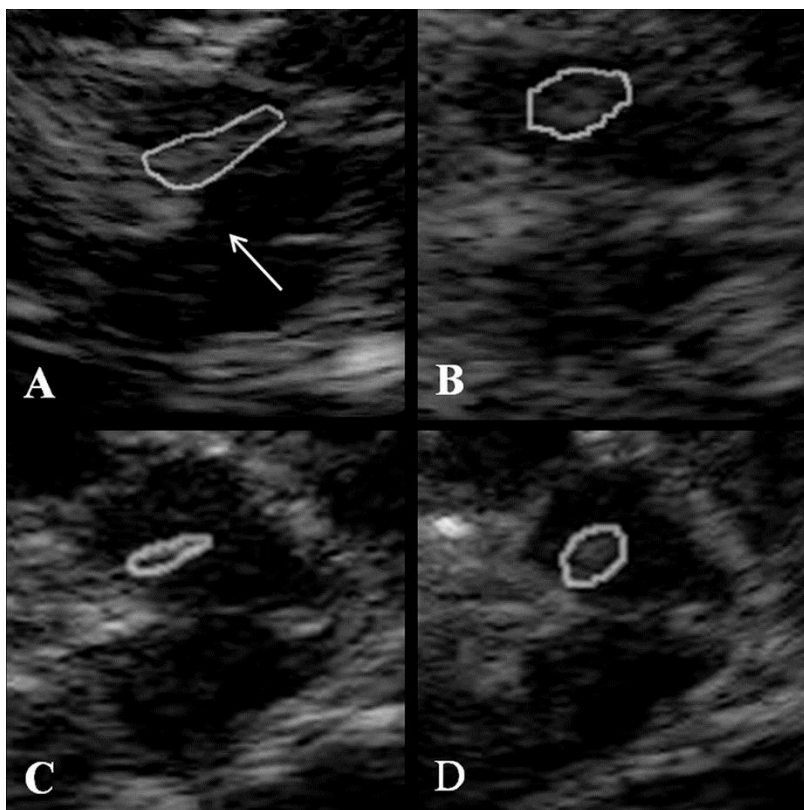
Legenda: GB+PB+: pacijenti sa GB tip 1 i parkinsonizmom; GB+PB-: pacijenti sa GB tip 1 bez parkinsonizma; GBA+PB+: PB pacijenti heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu; GBA+PB-: asimptomatski heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu; sPB: sporadična PB (bez mutacije u *GBA* genu). \*: GB+PB+grupa razlikuje se od GBA+PD- grupe (p=0,022) i grupe Kontrole (p=0,001), GB+PB- grupa razlikuje se od sPB grupe (p=0,001) i grupe Kontrole (p=0,041), GBA+PB+ grupa razlikuje se od GB+PD- (p=0,005) i GBA+PB-grupe (p=0,001) i grupe Kontrola (p=0,000). GBA+PB- grupa razlikuje se od sPB grupe (p=0,000); sPB grupa razlikuje se od grupe Kontrole (p=0,000). †: detalji prevalencije hiperehogenosti SN (prisustvo bar unilateralne značajne ili umerene hiperehogenosti) i razlike između grupa prikazane su u rezultatima. #: GBA+PB+ grupa razlikuje se od GB+PB- grupe (p=0,033) i grupe Kontrole (p=0,004). a: Kruskal Wallis Test. b:  $\chi^2$ . c: One way ANOVA vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Sve vrednosti su prikazane kao broj ispitanika sa specifičnom karakteristikom/ ukupan broj ispitanika, u zagradi su predstavljeni u procentima.



U svim ispitivanim grupama osim GBA+PB-, aSNmax je bio veći nego kod kontrolne grupe. GB+PB+ grupa razlikuje se od GBA+PD- grupe ( $p=0,022$ ) i grupe Kontrole ( $p=0,001$ ), GB+PB- grupa razlikuje se od sPB grupe ( $p=0,001$ ) i grupe Kontrole ( $p=0,041$ ), GBA+PB+ grupa razlikuje se od GB+PD- ( $p=0,005$ ) i GBA+PB-grupe ( $p=0,001$ ) i grupe Kontrola ( $p=0,000$ ). GBA+PB- grupa razlikuje se od sPB grupe ( $p=0,000$ ); sPB grupa razlikuje se od grupe Kontrole ( $p=0,000$ ). U svim PB grupama, nezavisno od statusa u *GBA* genu (GB+PB+, GBA+PB+ i sPB), aSNmax vrednosti bile su slične. Nije pokazano postojanje razlike aSNmax među ispitanicima koji nose mutaciju u *GBA* genu, a koji nemaju PB (grupe GB+PB- i GBA+PB-).

Kada se primeni kriterijum za klasifikaciju hiperehogenosti SN na normalan, umeren i izražen, u grupi GB+PB+, povećana hiperehogenost je uočena kod tri pacijenta od kojih su dva imala obostrano izraženu hiperehogenost, a jedan unilateralnu umerenu hiperehogenost. Patološka hiperehogenost SN postojala je kod 87,5% pacijenata sPB grupe (sedam pacijenata je imalo bilateralnu izraženu, tri pacijenta bilateralnu umerenu, tri pacijenta sa umerenom/izraženom, osam pacijenata sa unilateralnom izraženom i tri pacijenta sa unilateralnom umerenom i sedam pacijenata sa unilateralnom umerenom hiperehogenošću SN) i 83% pacijenata GBA+PB+ grupe (jedan pacijent sa bilateralnom izraženom, jedan sa bilateralnom umerenom, tri sa umerenom/izraženom, sedam sa unilateralnom izraženom i tri pacijenta sa unilateralnom umerenom hiperehogenošću SN). Patološku hiperehogenost SN imalo je i 22,2% ispitanika iz GBA+PB- grupe (jedan pacijent sa bilateralnom umerenom i jedan sa unilateralnom umerenom hiperehogenošću SN) i kod 33,3% GB+PB- grupe (jedan pacijent sa bilateralnom umerenom, jedan sa unilateralnom izraženom, i dva pacijenta sa unilateralnom umerenom hiperehogenošću SN), ( $p<0,001$ ). Samo 11,6% kontrola je imalo hiperehogenost SN (dva ispitanika sa unilateralnom izraženom i tri sa unilateralnom umerenom hiperehogenošću SN). Prevalencija hiperehogene SN je bila statistički značano viša u GBA+PB+ grupi u poređenju sa zdravim kontrolama ( $p<0,001$ ), GB+PB- ( $p=0,05$ ) i GBA+PB- grupom ( $p=0,002$ ). U tri grupe bez znakova parkinsonizma, hiperehogenosti SN je registrovana kod 11,6% zdravih kontrola, 22,2% asimptomatskih heterozigotnih nosilaca mutacije u *GBA* genu i 33,3% kod GB pacijenata tip 1 koji nemaju znake parkinsonizma. Iako se uočava porast učestalosti hiperehogenosti SN, među ovim grupama nije pokazano postojanje statistički značajne razlike (GB+PD- vs. GBA+PB- :  $p=0,577$ ; GBA+PB- vs. grupa zdravih kontrola:  $p=0,397$ ), dok je razlika između GB+PB- i zdravih kontrola bila na nivou trenda značajnosti ( $p=0,072$ ).

Slika 17. Primer nalaza transkranijalne parenhimske sonografije kod ispitivanih pacijenata.



Legenda: A. unilateralna hiperehogenost SN i prekinuto raphe kod pacijenta sa GB tip 1 i PB; B. hiperehogenost SN kod PB pacijenta koji je heterozigotni nosilac *GBA* mutacije; C. normalna ehogenost SN kod GB pacijenta bez PB; D. normalna ehogenost SN kod heterozigotnog nosioca *GBA* mutacije bez PB.

Učestalost prekinute ehogenosti ili nedostajućeg signala iz raphe jedara razlikovala se među ispitivanim grupama ( $p=0,046$ ): *GBA+PB+* grupa se statistički značajno razlikovala od *GB+PB-* grupe ( $p=0,033$ ) i grupe zdravih kontrola ( $p=0,004$ ).

Nije bilo statistički značajne razlike među grupama u dijametri treće komore.

#### 4.4. Rezultati pregleda na magnetnoj rezonanci

U delu ispitivanja strukturnih promena mozga MR metodologijom učestvovalo je ukupno 45 ispitanika i to 15 PB pacijenata koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu (*GBA+PB+*) koji su mešovani sa 14 PB pacijenata bez mutacija u *GBA* genu i 16 zdravih kontrola. Pacijenti i kontrole se nisu razlikovali po godinama, polu, godinama obrazovanja i opterećenjem WMH (hiperintenzitetima bele

mase) (Tabela 27). Grupe PB pacijenata se nisu razlikovale po godinama početka bolesti, dužini trajanja bolesti, Hoehn i Yahr stadijumu PB, strani na kojoj je PB počela i UPDRS III skor.

Četiri od 15 PB pacijenata iz grupe GBA+PB+ imali su početak bolesti pre 50. godine. Jedan pacijent je imao, a ostalih 14 nisu imali pozitivnu porodičnu anamnezu za PB. Jedan pacijent imao je izraženu autonomnu disfunkciju.

Tabela 27. Demografske i kliničke karakteristike ispitanika.

	Zdrave kontrole	GBA+PB+	sPB	p
<b>Broj ispitanika</b>	16	15	14	-
<b>Pol (ž:m)</b>	7:9	6:9	6:8	1,0
<b>Godine starosti</b>	64±8 (53-81)	64±8 (49-83)	64±7 (52-79)	0,99
<b>Godine obrazovanja</b>	14±3 (8-18)	12±4 (4-17)	12±4 (3-16)	0,69
<b>Godine početka PB</b>	-	54±7 (39-65)	53±8 (36-64)	0,88
<b>Godine trajanja PB</b>	-	10±6 (2-21)	11±6 (2-20)	0,59
<b>Hoehn i Yahr stadijum<sup>d</sup></b>	-	2,8±1,0 (1-5)	2,7±0,8 (2-4)	0,78
<b>Prva zahvaćena strana (leva/desna/simetrično)</b>	-	8/6/1	6/8/0	0,58
<b>UPDRS III</b>	-	40±18 (5-79)	32±9 (17-47)	0,22
<b>WMH opterećenje (ml)</b>	0,5±1,2 (0-4,9)	1,8±4,5 (0-15,9)	1,2±1,9 (0-5,0)	0,54

Legenda: vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (raspon) ili broj pacijenata. P vrednost odnosi se na Fišerov test, Mann–Whitney U test ili Kruskal–Wallis test. GBA+PB+ - PB pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu. sPB- PB pacijenti koji nisu nosioci mutacije u *GBA* genu. UPDRS- Unified Parkinson's Disease Rating Scale; WMH- hiperintenziteti bele mase.

U Tabeli 28. prikazani su rezultati dobijeni testiranjem neuropsiholoških/bihejvioralnih aspekata PB pacijenata sa i bez heterozigotnih mutacija u *GBA* genu. U GBA+PB+ grupi, kognitivni deficit je postojao kod devet ispitanika (60%): tri pacijenata su dijagnostikovani kao PB-demencija, dva pacijenta su imala blagi kognitivni deficit u multiplim domenima, a tri pacijenta su imala nisko postignuće na jednom od sprovedenih kognitivnih testiranja (dva u domenu memorije i jedan egzekutivnu disfunkciju). Nijedan sPB pacijent nije imao demenciju, a među onima kod kojih je bilo dostupno neuropsihološko testiranje, dva pacijenta su imali BKP (kod jednog pacijenta u multiplim domenima, a kod drugog u

jednom domenu), pet pacijenata je imao loše postignuće na jednom od kognitivnih testova (kod tri pacijenta poremećaj pažnje, a kod dva na testovima koji ispituju jezik). Jedan PB pacijent sa *GBA* mutacijom i četiri PB pacijenta bez mutacije su imali abnormalne skorove na HAMA skali. HAMD skorovi su bili abnormalni kod tri PB pacijenta iz sPB grupe. Poređenjem srednjih vrednosti dostupnih kognitivnih testiranja nije pokazano postojanje razlike za ove dve grupe PB pacijenata.

Nije bilo razlike u srednjoj difuzivnosti (MD- mean diffusivity) kada se uporede ispitanici *GBA+PB+* grupe i zdrave kontrole. Abnormalnosti BM nisu pronađene kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije kada se uporede sa zdravim kontrolama. Nije bilo razlike u DT MR nalazu kada se uporede PB pacijenti sa i bez *GBA* mutacije.

TBSS analiza pokazala je da *GBA+PB+* ispitanici u poređenju sa zdravim kontrolama imaju smanjenu FA u olfaktornom traktu, kolenu i telu corpus calosuma i prednjem kraku capsulae internae obostrano ( $P < 0,05$  FWE; Slika 18.). PB pacijenti nosioci *GBA* mutacije su takođe pokazali smanjenu FA u desnom prednjem delu capsulae externae, levom cingulumu, levom parahipokampalnom traktu, levom parijetalnom delu fascikulusa longitudinalisa superiora i u levoj okcipitalnoj beloju masi ( $P < 0,05$  FWE; Slika 18.).

U Tabeli 29. prikazane su srednje vrednosti FA za traktove BM od interesa kod zdravih kontrola i ispitivanih grupa PB pacijenata. Poređenjem *GBA+PB+* ispitanika sa druge dve ispitivane grupe (sPB i zdrave kontrole), pokazano je smanjenje FA u telu i kolenu corpus callosuma, olfaktornom traktu, prednjem kraku capsulae internae i cingulumu obostrano. Kada se uporede PB pacijenti sa *GBA* mutacijom sa grupom PB pacijenta bez *GBA* mutacije, smanjena FA je nađena još u kapsuli externi obostrano i u levom fascikulusu longitudinalis superior. Alteracije FA nisu pronađene kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije u poređenju sa zdravim kontrolama.

Pacijenti i kontrolna grupa nisu se razlikovali po volumenu sive mase ( $P < 0,05$  FWE).

Kod PB pacijenata skor za fluentnost na ACE-R je korelirao sa vrednostima FA tela ( $r=0,49$ ,  $P=0,02$ ) i kolena ( $r=0,44$ ,  $P=0,04$ ) corpus callosuma, capsulae externae obostrano (levo:  $r=0,50$ ,  $P=0,02$ ; desno:  $r=0,56$ ,  $P=0,01$ ), i olfaktornim traktom bilateralno (levo:  $r=0,47$ ,  $P=0,03$ ; desno:  $r=0,58$ ,  $P=0,01$ ). Korelacija nije pronađena između skorova za MMSE i ukupnog ACE-R skora i FAB sa FA vrednostima traktova BM. Opterećenje hiperintenzitetima BM (WHM load) nije bilo u korelaciji sa kognitivnim varijablama i DT MR metrikom.

Tabela 28. Rezultati neuropsiholoških ispitivanja kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću, sa i bez mutacije u *GBA* genu koji su učestvovali u MR studiji.

Test	granična vrednost	GBA+PB+		sPB	
		srednja vrednost± SD (raspon) <sup>a</sup>	Abnormalan skor, n (%)	srednja vrednost± SD (raspon) <sup>a</sup>	Abnormalan skor, n (%)
<b>MMSE</b>	24	28±3 (22–30)	3/15 (20%)	27±2 (25–30)	0/14 (0%)
<b>ACE-R</b>					
• ukupno	73,4	84,8±12,9 (63–98)	3/13 (23%)	85,4±9,0 (68–97)	1/9 (11%)
• pamćenje	18,2	20,5±5,0 (12–26)	5/13 (38%)	22,1±4,5 (11–26)	1/9 (11%)
• orijentacija i pažnja	16,6	17,4±1,2 (14–18)	2/13 (15%)	16,6±1,2 (15–18)	5/9 (56%)
• verbalna fluentnost	7,5	8,4±3,2 (2–12)	3/13 (23%)	9,8±2,5 (7–14)	2/9 (22%)
• jezik	19,8	23,7±3,0 (18–26)	1/13 (8%)	23,1±2,0 (20–26)	0/9 (0%)
• vizuospacijalni domen	11,5	14,8±2,3 (9–16)	2/13 (15%)	13,9±2,0 (9–15)	1/9 (11%)
<b>FAB</b>	13,9	13,1±4,6 (6–18)	6/14 (43%)	14,4±2,5 (10–18)	2/9 (22%)
<b>HAMA</b>	17	10,7±7,0 (0–29)	1/14 (7%)	9,8±6,9 (0–20)	4/14 (29%)
<b>HAMD</b>	19	9,4±5,7 (0–19)	0/14 (0%)	14,8±9,5 (1–37)	3/14 (21%)

Legenda: a- dva pacijenta iz GBA+PB+ grupe nisu bili u stanju da urade ACE-R test, jedan nije bio u stanju da uradi FAB, HAMA i HAMD zbog teške demencije. ACE-R i FAB skorovi su bili dostupni za devet sPB pacijenata. ACE-R, *Addenbrooke's Cognitive Examination Revised*; FAB, *Frontal Assessment Battery*; HAMA, *Hamilton Anxiety Rating Scale*; HAMD, *Hamilton Depression Rating Scale*; MMSE, *Mini-Mental State Examination*; SD, standardna devijacija. Abnormalan skor- broj pacijenata koji su imali vrednost testiranja preko granične vrednosti ispitivanog testa, u pravcu patološkog nalaza.

Slika 18. Rezultati prostorne statistike zasnovane na traktovima kod PB pacijenata koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu u poređenju sa zdravim kontrolama. Razlike frakcione anizotropije (FA) su prikazane crvenom bojom. Rezultati su preklapljeni na aksijalnu sekciju FA atlasa prema radiološkoj konvenciji (desno je levo) i prikazani su za  $P < 0,05$ , sa korekcijom za multiple komparacije (family-wise error, FWE).

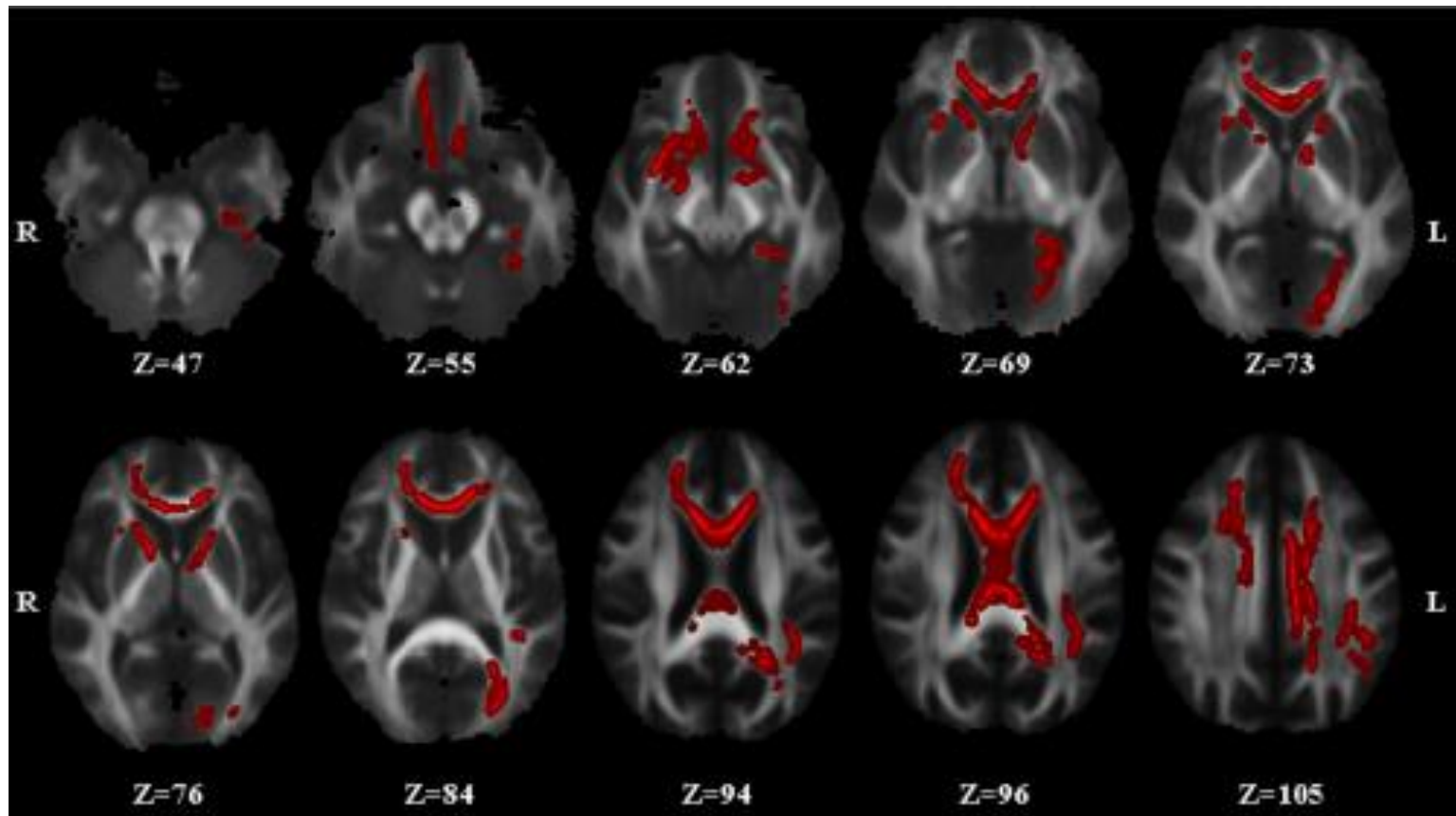


Tabela 29. Vrednosti frakcione anizotropije traktova bele mase kod zdravih kontrola i pacijenata sa Parkinsonovom bolesću, sa i bez heterozigotne mutacije u *GBA* genu.

Trakt BM	Strana tela	Kontrole	sPB	GBA+PB+	sPB vs Kontrole <sup>a</sup>	GBA+PB+ vs Kontrole <sup>a</sup>	GBA+PB+ vs sPB
Telo corpus calosuma	-	0,69±0,02	0,69±0,04	0,65±0,04	0,85	<b>0,004</b>	<b>0,01</b>
Koleno corpus calosuma	-	0,74±0,03	0,73±0,04	0,70±0,03	0,38	<b>0,001</b>	<b>0,01</b>
Splenijum corpus calosuma	-	0,78±0,02	0,78±0,03	0,77±0,03	0,95	0,61	0,58
Tractus olfactorius	L	0,30±0,02	0,30±0,02	0,28±0,03	0,99	<b>0,01</b>	<b>0,01</b>
	D	0,30±0,03	0,31±0,03	0,27±0,03	0,52	<b>0,03</b>	<b>0,006</b>
Prednji krak capsulae internaе	L	0,62±0,02	0,62±0,02	0,60±0,02	0,77	<b>0,03</b>	<b>0,02</b>
	D	0,62±0,03	0,62±0,03	0,60±0,02	0,87	0,09	0,13
Corona radiata pars anterior	L	0,49±0,02	0,49±0,03	0,47±0,04	0,91	0,15	0,19
	D	0,49±0,03	0,49±0,04	0,47±0,03	0,91	0,10	0,13
Corona radiata pars superior	L	0,49±0,27	0,50±0,02	0,49±0,02	0,31	0,76	0,46
	D	0,49±0,02	0,50±0,02	0,48±0,02	0,26	0,43	0,06
Corona radiata pars posterior	L	0,48±0,02	0,48±0,04	0,47±0,02	0,48	0,66	0,25
	D	0,49±0,03	0,50±0,04	0,48±0,02	0,29	0,57	0,10
Cingulum	L	0,53±0,03	0,54±0,05	0,50±0,04	0,85	<b>0,02</b>	<b>0,01</b>
	D	0,54±0,03	0,55±0,04	0,51±0,05	0,64	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>
Capsula externa	L	0,46±0,03	0,46±0,03	0,44±0,02	0,65	0,09	<b>0,04</b>
	D	0,45±0,02	0,46±0,03	0,44±0,02	0,18	0,11	<b>0,005</b>
Posteriorna talamička radijacija	L	0,58±0,03	0,58±0,04	0,57±0,05	0,98	0,68	0,71
	D	0,58±0,03	0,58±0,05	0,57±0,04	0,94	0,62	0,68
Fasciculus longitudinalis superior	L	0,50±0,02	0,51±0,03	0,48±0,02	0,19	0,26	<b>0,02</b>
	D	0,49±0,02	0,50±0,03	0,49±0,03	0,28	0,76	0,16

Legenda: vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ± standardna devijacija. a- p vrednosti se odnose na analizu kovarijanse, prilagođena za godine ispitanika. BM- bela masa. L- levo. D- desno.

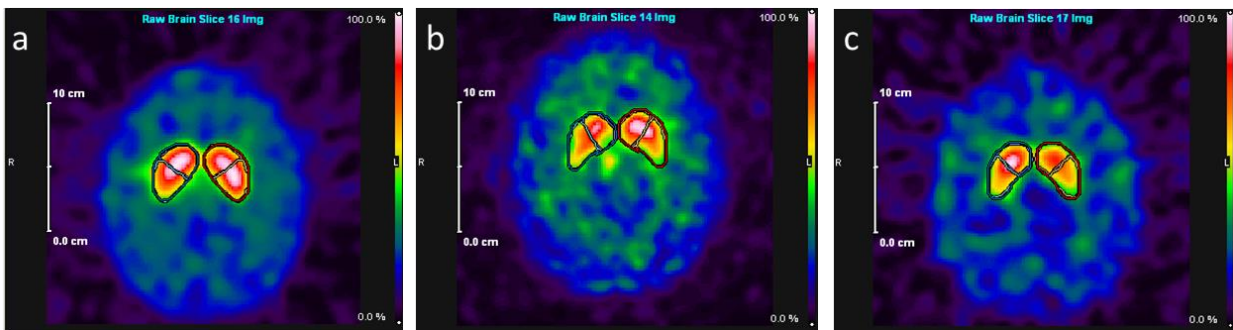
#### 4.5. Identifikacija ispitanika u prekliničkoj fazi Parkinsonove bolesti među nosiocima *GBA* mutacije

Ukupno je pregledano 14 prvih srodnika GB pacijenata koji su obavezni heterozigotni nosioci *GBA* mutacija. Kod tri ispitanika je kliničkim pregledom ustanovljeno postojanje motornih abnormalnosti koje bi mogle biti korelat parkinsonizma. Jedan pacijent pristao je samo na klinički pregled, ali nije pristao na ostala isptivanja.

Druga dva pacijenta su roditelji sestara koje imaju GB. Iako nisu primetili nikakav zdravstveni problem, neurološkim pregledom ustanovljeno je da majka, stara 51 godinu u trenutku pregleda, imala diskretnu bradikineziju desne ruke, ali bez značajnog dekrementa amplitude pokreta; anamnestički je dobijen podatak da nema problem sa čulom mirisa u smislu hiposmije, negirala je opstipaciju, poremećaj raspoloženja i kliničke korelate poremećaja spavanja u REM fazi. Otac ove ispitanice imao je PB, a brat ima dijagnozu primarno progresivne multiple skleroze. Otac GB pacijentkinja, star 55 godina u trenutku pregleda, imao je blagu hipomimiju i pozitivan „step“ test na levoj nozi; on je, međutim naveo da slabije oseća i raspoznaje mirise, ali i da ima alergijski rinitis, povremeno ima noćne more, govori u snu (što bi mogla biti manifestacija poremećaja spavanja u REM fazi) i negirao je postojanje opstipacije i poremećaja raspoloženja. Majka ovog ispitanika ima PB. Dostupni podaci o pojavi PB u ovoj familiji prikazani su u porodičnom stablu na Slici 20.

TKS kod majke je pokazala postojanje hiperehogenosti leve SN ( $0,23 \text{ cm}^2$ ) dok je kod oca postojala hiperehogenost desne SN ( $0,24 \text{ cm}^2$ ). U cilju potvrđivanja prekliničke faze PB urađen je DaT-SPECT, koji je kod oba ispitanika ukazao na redukovano vezivanje DAT radiofarmaka u strijatumu što ukazuje na depleciju dopamina (slika 19). Zanimljivo, tokom perioda praćenja od tri godine, ovi ispitanici imali su nepromenjen neurološki nalaz i nisu zadovoljili klinički kriterijum za dijagnozu PB.

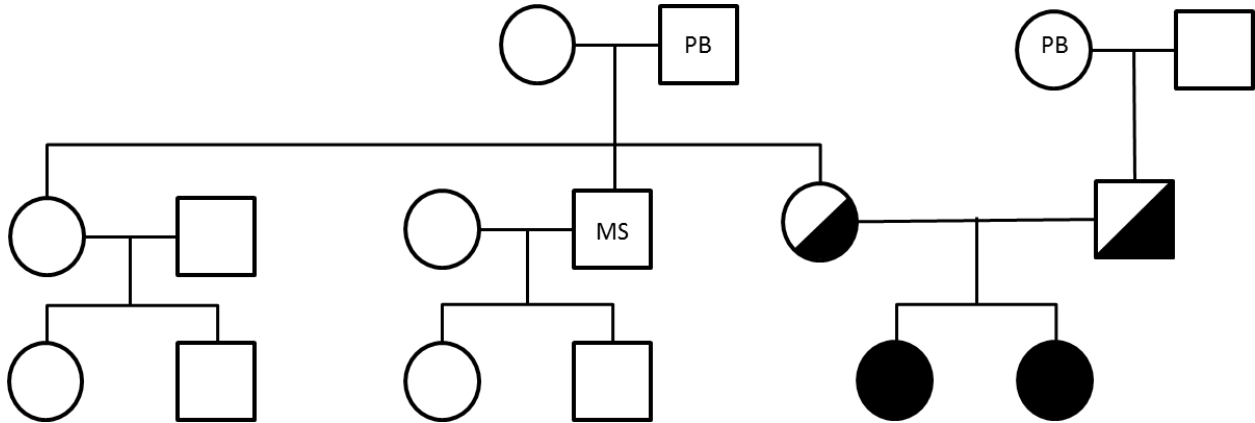
Slika 19. DaT-SPECT nalaz kod tri ispitanika.





Legenda: a- normalan nalaz DaT-SPECT-a kod osobe bez znakova parkinsonizma i bez *GBA* mutacije. b- nalaz DaT-SPECT-a kod oca sestara sa GB pokazuje smanjeno nakupljanje radiofarmaka obostrano, izraženije desno. c- nalaz DaT-SPECT-a kod majke sestara sa GB pokazuje smanjeno nakupljanje radiofarmaka obostrano, izraženije levo.

Slika 20. Porodično stablo koje prikazuje familiju u kojoj se u tri generacije javljaju Parkinsonova ili Goševa bolest.



Legenda: PB- Parkinsonova bolest; MS- multipla skleroza

- - zdrava osoba ženskog pola, nepoznat *GBA* status
- - zdrava osoba muškog pola, nepoznat *GBA* status
- ◐ - osoba ženskog pola, heterozigorni nosilac *GBA* mutacije
- ◑ - osoba muškog pola, heterozigorni nosilac *GBA* mutacije
- - osoba ženskog pola sa GB

## 5. DISKUSIJA

Analizom egzona 8-11 *GBA* gena ustanovljeno je postojanje mutacija kod 6,52% pacijenata sa PB, što je statistički značajno češće nego kod zdravih kontrola gde je *GBA* mutacija pronađena kod 1,36% ispitanika. Izračunat je odnos šansi  $OR=5,07$  (95% CI 1,99-12,92), što znači da se mutacije u *GBA* genu mogu naći pet puta češće kod PB pacijenata nego kod zdravih kontrola.

Naši rezultati su slični rezultatima najveće multicentrične studije koja je obuhvatila 5691 PB pacijenta i 4898 zdravih kontrola, gde je izračunat odnos šansi 5,43<sup>20</sup>. Ovaj, nešto veći odnos šansi verovatno je posledica uključivanja 780 PB pacijenata i 387 zdravih kontrola koji su Aškenazi Jevreji, a kod kojih se *GBA* mutacije javljaju sa većom učestalošću (15% PB pacijenata i 3% kontrola) u poređenju sa ostalim ispitanicima koji su bili drugih etničkih pripadnosti (3% PB pacijenata i manje od 1% kontrola). U ovoj studiji, međutim, nije bilo dostupno sekvenciranje svih egzona *GBA* gena u svakom od centara. U velikoj studiji na evropskoj populaciji ispitanika, dominantno iz Francuske, vršeno je sekvenciranje svih egzona *GBA* gena<sup>162</sup>. U ovom slučaju odnos šansi bio je još veći ( $OR=6,98$ ), a učestalost mutacija kod PB pacijenata je bila je slična kao u našoj studiji, 6,7% (76 od 1130 PD pacijenata) dok je kod zdravih kontrola učestalost mutacija bila 1,0% (4 od 391 ispitanika).

Kao što je ranije napomenuto, veća učestalost *GBA* mutacije kod PB pacijenata, čak do 31%, sreće se kod Aškenazi Jevreja<sup>18</sup>. Ovo nije neobičan nalaz obzirom da je svaka 17. osoba ove etničke grupe nosilac *GBA* mutacije<sup>26</sup>. Nasuprot tome, u populaciji severnoafričkih Berbera<sup>230</sup>, kao i u populaciji centralne Norveške<sup>231</sup>, nije pokazana razlika u učestalosti javljanja *GBA* mutacija kod PB pacijenata i kontrola. Obe studije donele su zaključak nakon analize ograničenog broja mutacija.

Učestalost *GBA* mutacija veća je od svih drugih poznatih monogenih uzročnika PB, sa izuzetkom određenih populacionih grupa, geografskih područja ili podgrupa PB kao npr. PB sa početkom pre 40. godine. Od dominantno naslednih uzroka PB, *LRRK2* mutacije su najčešće i mogu se naći kod 0,6-1,6% PB pacijenata, tj. kod 2-13% PB pacijenata sa hereditarnom PB<sup>232-234</sup>. Izuzetak su grupe Aškenazi Jevreja i severnoafričkih Berbera gde *LRRK2* p.G2019S mutacija postoji kod 22-41% sporadičnih i 30-41% hereditarnih slučajeva PB<sup>230,234</sup>. Smatra se da je visoka učestalost u ovim populacijama posledica efekta osnivača („founder“ haplotipa) i da je *G2019S* mutacija u drugim populacijama retka<sup>235</sup>, uključujući PB populaciju iz Srbije gde je frekvencija *LRRK2* mutacija 1,23%<sup>236</sup>. Mutacije u *VSP35* genu, koje takođe dovode do autozomno dominantnog nasleđa PB, su retke, postoje kod 0,08-0,14% PB pacijenata<sup>235,237</sup>. Mutacije u *SNCA* genu su veoma retke<sup>235</sup>. Recesivni geni se mogu naći sa većom učestalošću u grupi PB

sa ranim početkom: *PARKIN* kod 1,4-20% sporadičnih slučajeva PB i oko 50% familijarnih PB sa ranim početkom, *PINK1* kod 1-4% i *DJ1* kod manje od 1% pacijenata sa početkom PB pre 40. godine<sup>235,238</sup>.

Spisak dostupnih rezultata iz centara koji su učestvovali u velikoj multicentričnoj studiji<sup>20</sup> prikazani su u Tabeli 30. Druge studije slučajeva i kontrola koje su se bavile učestalošću *GBA* mutacija kod PB pacijenata u drugim populacijama, prilazane su u Tabeli 31.

Tabela 30. Rezultati ispitivanja učestalosti *GBA* mutacija kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću u različitim centrima velike multicentrične studije. Prilagođeno prema referenci 20.

Centar		Broj pacijenata (broj Aškenazi Jevreja)	Pol (M:Ž (nepoznato))	Godine ispitanika	Broj (%) ispitanika sa mutacijama	Testirane mutacije
<b>Brazil</b>	Pacijenti	65 (0)	42:23	54,1	4 (6%)	N370S, L444P, G377S
	Kontrole	264 (0)	169:95	54,4	0	
<b>New York</b>	Pacijenti	275 (117)	171:104	65,6	34 (12%)	Sekvenciranje celog gena
	Kontrole	140 (65)	73:67	62,8	3 (2%)	
<b>Francuska</b>	Pacijenti	297 (0)	185:112	57,8	12 (4)	N370S, L444P, D409H
	Kontrole	251 (0)	142:109	57,8	1 (<1)	
<b>Haifa, Israel</b>	Pacijenti	162 (162)	94:65 (3)	68,5	40 (25)	N370S, L444P, c.84dupG, V394L, IVS2+1G→A, R496H
	Kontrole	-	-	-	-	
<b>Italija</b>	Pacijenti	395 (0)	244:151	66,5	11 (3)	L444P, N370S
	Kontrole	483 (0)	180:303	56,9	1 (<1)	
<b>Norveška</b>	Pacijenti	311 (0)	186:123 (2)	-	7 (2)	L444P, N370S
	Kontrole	473 (0)	267:206	64,1	8 (2)	
<b>National Human Genome Research Institute</b>	Pacijenti	539 (0)	275:166 (98)	73,5	29 (5)	Sekvenciranje celog gena
	Kontrole	209 (1)	100:109	67,6	6 (3)	
<b>Portugal</b>	Pacijenti	231 (0)	110:121	65,3	15 (6)	Sekvenciranje celog gena
	Kontrole	482 (0)	-	65,5	6 (1)	
<b>Rostock, Nemačka</b>	Pacijenti	298 (0)	190:108	64,3	18 (6)	Sekvenciranje celog gena
	Kontrole	212 (0)	105:107	74,5	5 (2)	
<b>Singapur</b>	Pacijenti	329 (0)	170:158 (1)	70,3	8 (2)	L444P, N370S
	Kontrole	201 (0)	99:102	64,2	0	
<b>Tajvan</b>	Pacijenti	559 (0)	304:255	69,1	22 (4)	N370S, L444P, RecNcil, R120W + sekvenciranje celog
	Kontrole	377 (0)	198:179	60,5	4 (1)	

						gena za 183 pacijenta i 88 kontrola
<b>Tel Aviv, Izrael</b>	Pacijenti	420 (419)	262:158	68,0	81 (19)	c.84dupG, IVS2+1G→A, N370S, V394L, D409H, L444P, R496H, RecTL
	Kontrole	321 (321)	159:162	65,3	13 (4)	
<b>Japan</b>	Pacijenti	534 (0)	282:252	65,3	50 (9)	Sekvenciranje celog gena
	Kontrole	546 (0)	294:252	44,8	2 (<1)	
<b>Tübingen, Nemačka</b>	Pacijenti	377 (0)	222:155	64,8	12 (3)	L444P, N370S
	Kontrole	325 (0)	192:132 (1)	58,3	0	
<b>Toronto, Kanada</b>	Pacijenti	88 (2)	51:37	55,0	5 (6)	N370S, K178T, L444P, c.84dupG, R329C, IVS2+1G→A, RecNci1
	Kontrole	96 (0)	27:69	69,6	1 (1)	
<b>Seattle, SAD</b>	Pacijenti	811 (20)	607:204	66,9	24 (3)	N370S, L444P, RecNci1, L444R
	Kontrole	518 (0)	193:324 (1)	65,2	2 (<1)	

Tabela 31. Učestalost *GBA* mutacija kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i kod kontrolne grupe u različitim populacijama.

	populacija	Testirane mutacije	Broj učesnika		Učestalost nosilaca (%)		p	Najčešće varijante
			PB	Kontrole	PB	Kontrole		
Lwin et al 2004 <sup>17</sup>	Razne	svi egzoni	57	44	21,0%	0,0%	..	N370S
Aharon-Peretz et al 2004 <sup>18</sup>	Aškenazi	N370S, L444P, c.84dupG, IVS2+A>G, V394L, R496H	99	1543	31,3%	6,2%	<0,0001	N370S
Clark et al 2005 <sup>239</sup>	Aškenazi	N370S	160	92	10,7%	4,3%	0,20	N370S
Sato et al 2005 <sup>240</sup>	Kavkaska- kanadsko poreklo	N370S, L444P, IVS2+A>G, K198T, R329C, c.84dupG, RecNci1	88	122	5,7%	0,8%	0,48	RecNci1
Toft et al 2006 <sup>231</sup>	Norveška	N370S, L444P	311	474	2,3%	1,7%	0,58	N370S

Eblan et al 2006 <sup>241</sup>	Razne (bez Jevreja)	svi egzoni	33	31	12,0%	3,2%	..	RecNci1, L444P
Tan et al 2007 <sup>242</sup>	Kina	L444P, N370S	331	347	2,4%	0,0%	0,06	L444P
Ziegler et al 2007 <sup>243</sup>	Kina	svi egzoni	92	92	4,3%	1,1%	..	L444P
Wu et al 2007 <sup>244</sup>	Tajvan	L444P, RecNci1, R120W	518	339	3,1%	1,2%	0,07	L444P, RecNci1
Clark et al 2007 <sup>159</sup>	Razne (64% Jevreja)	svi egzoni	278 (178)	179 (85)	13,7%	4,5%	..	N370S, c.84dupG
De Marco et al 2008 <sup>245</sup>	Italija	N370S, L444P	395	483	2,8%	0,2%	0,0018	L444P
Spitz et al 2008 <sup>246</sup>	Brazil	N370S, L444P, G377S	65	267	3,0%	0,0%	0,037	L444P
Mata et al 2008 <sup>247</sup>	Razne	N370S, L444P	721	554	2,9%	0,4%	0,001	N370S, L444P
Gan-Or et al 2008 <sup>248</sup>	Aškenazi	N370S, R496H, L444P, c.84dupG, IVS2+1, V394L, D409H, RecTL	420	333	17,9%	4,2%	<0,0001	N370S
Kalineri et al 2009 <sup>229</sup>	Grčka	svi egzoni	172	132	4,7%	0,8%	0,048	H255Q, L444P
Nichols et al 2009 <sup>249</sup>	Razne (<10% Jevreji)	N370S, T369M, L444P, IVS6, IVS10, E326K, K303K, R262H, RecNci1	1325	359	12,6%	5,3%	..	E326K, T369M, N370S, L444P
Neumann et al 2009 <sup>157</sup>	Britanija	svi egzoni	790	257	4,2%	1,2%	0,01	L444P, N370S
Socal et al 2009 <sup>250</sup>	Brazil (različito etničko poreklo)	L444P, N370S, IVS2+1, 84GG	62	..	3,5%	..	..	..
Mitsui et al 2009 <sup>251</sup>	Japan	svi egzoni	534	544	9,4%	<0,1%	<0,0001	R120W, RecNci1
Bras et al 2010 <sup>252</sup>	Portugal	svi egzoni	230	430	6,1%	0,7%	..	N370S, N396T
Saunders-Pullman et al 2010 <sup>151</sup>	Aškenazi	N370S, L444P, 84GG, IVS2+1G>A, V394L, del55bp, D409H, R496H	250	..	12,8%	..	..	N370S

Mao et al 2010 <sup>253</sup>	Kina	L444P	616	411	3,2%	0,2%	0,001	..
Sun et al 2010 <sup>254</sup>	Kina	L444P, F213I, R353W, N370S	402	413	2,7%	0,0%	0,0007	L444P
Hu et al 2010 <sup>255</sup>	Kina	N370S	328	300	1,8%	0,7%	0,29	..
Lesage et al 2011 <sup>256</sup>	Severna Afrika (Alžir, Maroko, Tunis, Libija)	svi egzoni	194	177	4,6%	0,5%	0,01	N370S, L444P, RecNci1
Nishioka et al 2011 <sup>230</sup>	Afrički Berberi	K26R, K186R, N370S	395	372	4,3%	5,1%	>0,05	K26R
Moraitou et al 2011 <sup>257</sup>	Grčka	N370S, L444P, D409H, H255Q, R120W, Y108C, IVS10-1G>A, IVS6-2A>G	205	206	10,2%	3,4%	0,006	N370S
Noreau et al 2011 <sup>258</sup>	Kanada- francusko poreklo	svi egzoni	212	189	3,8%	0,5%	0,10	L444P, p.L236F, p.S378L, p.W417G
Lesage et al 2011 <sup>162</sup>	Razne evropske	svi egzoni	1130	391	6,7%	1,0%	<0,0001	N370S
Huang et al 2011 <sup>259</sup>	Kina	svi egzoni	967	780	3,7%	0,3%	0,0001	L444P
Setó-Salvia et al 2012 <sup>158</sup>	Španija	svi egzoni	225	186	9,8%	0,5%	0,016	N370S, L444P
Emelyanov et al 2012 <sup>260</sup>	Rusija	N370S, L444P	330	240	2,7%	0,4%	0,038	N370S
de Carvalho Guimarães et al 2012 <sup>261</sup>	Brazil	N370S, L444P	237	186	3,4%	0,0%	..	..
Choi et al 2012 <sup>262</sup>	Koreja	svi egzoni	277	291	3,2%	0,0%	0,01	N188S, P201H, R257Q, S271G, L444P
Wang et al 2012 <sup>263</sup>	Kina	L444P, N370S, R120W	208	298	3,4%	0,3%	0,007	L444P

Zhang et al 2012 <sup>264</sup>	Kina	L444P, N370S, R120W	195	443	3,1%	0,0%	0,001	L444P
Winder-Rhodes et al 2013 <sup>161</sup>	Britanija	svi egzoni	259	..	3,5%	..	..	N370S, L444P
González-Del Rincón et al 2013 <sup>265</sup>	Meksički Mestizo	N370S, L444P	128	252	5,5%	0,0%	..	L444P
Yu et al 2014 <sup>266</sup>	Kina	svi egzoni	184	130	8,7%	1,54%	0,0072	L444P
Li et al 2014 <sup>267</sup>	Japan (familijarni PB)	svi egzoni	147	100	18,8%	1%	<0,0001	L444P
Pulkes et al 2014 <sup>268</sup>	Tajland	svi egzoni	480	395	5,0%	0,5%	<0,001	..
Asselta et al <sup>269</sup>	Italija	GBA egzoni 9-10	2350	1114	4,5%	0,63%	$2,2 \times 10^{-11}$	N370S
Malec-Litwinowicz et al 2014 <sup>270</sup>	Poljska	GBA egzoni 8-9	138	..	3,6%	..	..	N370S
Grimes et al 2015 <sup>271</sup>	Kanada	svi egzoni	225	110	4,4%	0,91%	0,088	N370S, L444P
Gan-Or et al 2015 <sup>272</sup>	Aškenazi Jevreji	N370S, R496H, 84GG, IVS2+1, V394L, D409H, L444P, RecTL	1000	3805	19,2%	6,4%	<0,0001	N370S



Frekvencija i distribucija *GBA* mutacija je varijabilna u različitim populacijama<sup>20</sup>. U grupi naših PB ispitanika, skoro ¼ heterozigotnih nosilaca mutacija imalo je genotip N370S, D409H ili *RecNcil*. Najčešće detektovana mutacija u našem uzorku je N370S i nalazi se u skoro 30% mutiranih alela (13/44) i nije pronađena u kontrolnoj grupi. Ova mutacija je veoma česta kod Aškenazi Jevreja gde se sreće u čak 70% mutiranih alela<sup>20</sup>; u evropskim populacijama nalazi se u 46% a u Portugaliji u 36% mutiranih alela<sup>162,252</sup>. U evropskoj multicentričnoj studiji N370S mutacije bila je šest puta češća kod PB pacijenata nego kod kontrola<sup>162</sup>. Interesantno je da je u azijskim populacijama N370S retka mutacija, kako kod PB pacijenata, tako i kod kontrola<sup>243,244,251,255</sup>.

N370S smatra se „lakom“ mutacijom<sup>50</sup>. Pretpostavlja se da kada se N370S mutacija nađe na jednom alelu kod GB pacijenta, tada ima „protektivnu“ ulogu u smislu nastanka neuropatske forme GB, bez obzira koja se mutacija nalazi na drugom alelu (Tabela 3). Ona se sreće kod većine GB pacijenata koji su kombinovani heterozigotni nosioci mutacija i koji su razvili PB<sup>133,273–275</sup>, što govori u prilog njene važnosti u smislu patogeneze PB kod GB. U slučaju heterozigotnih nosilaca mutacija u *GBA* genu, oni koji su imali bilo koju drugu mutaciju osim N370S, bili su u većem riziku za nastanak PB<sup>276</sup> ili posmatrano šire, nosioci „teških“ *GBA* mutacija imaju veći rizik za nastanak PB i raniji početak bolesti u poređenju sa nosiocima „lakih“ *GBA* mutacija, dok homozigoti i kombinovani heterozigoti imaju najraniji početak PB<sup>248</sup>. Ovo bi moglo da znači da u smislu nastanka PB, ista mutacija može imati različitu ulogu kod GB pacijenata i heterozigotnih nosilaca<sup>273</sup>.

Naši rezultati pokazuju da je druga mutacija po učestalosti D409H koja je u heterozigotnom stanju postojala kod 12 PB pacijenata (1,86%), dve kontrole (0,54%) i jednog kombinovanog heterozigota. D409H klasifikuje se kao „teška“<sup>50</sup>, nalazi se i u pseudogenu i sreće se u tipu 1 i tipu 3 GB<sup>277</sup>. Homozigoti sa ovom mutacijom imaju specifičan fenotip GB, sa srčanom fibrozom ili kalcifikacijama, hidrocefalusom, kornealnim zamućenjima i oftalmoplegijom<sup>25,277</sup>. Važan nalaz je da su svi naši PB pacijenti nosioci D409H mutacije imali duplo mutiran alel genotipa D409H/H255Q. Homozigotni nosioci ovog duplo mutiranog alela imaju težu kliničku sliku GB i to je čest nalaz među GB pacijentima sa Balkana i iz jadranskog dela Italije<sup>205</sup>.

Mutacija L444P je, prema rezultatima multicentrične studije, panetnička i najčešća u svim ispitivanim PB populacijama osim kod Aškenazi Jevreja<sup>20</sup>. Ova mutacija se klasifikuje kao „teška“<sup>50</sup>, može se naći kao tačkasta mutacija ili kao deo kompleksnog alela (npr. *RecNcil*) i udružena je sa neuropatskim fenotipom GB<sup>278</sup>. *RecNcil* je kompleksna mutacija (L444P + A456P + V460V) koja obuhvata sekvencu porekla pseudogena i takođe se klasifikuje kao „teška“<sup>50,279</sup>. Odnos šansi da se mutacija L444P nađe kod

PB pacijenta u odnosu na kontrole, veća je nego za N370S mutaciju<sup>20</sup>. Takođe, L444P mutacija se češće nego N370S nalazi kod GB pacijenata čiji su roditelji imali PB, što bi moglo da znači da L444P mutacija nosi veći rizik za nastanak PB nego neke druge mutacije<sup>280</sup>. U našoj ispitivanoj grupi, nije bilo razlike u frekvenciji L444P kao tačkaste mutacija kod PB pacijenta (dva PB pacijenta, 0,31%) i zdravih kontrola (jedna kontrola, 0,27%). L444P kao deo *RecNcil* je detektovan kod 4 PB pacijenta (0,62%), a nije ga bilo kod kontrola. Ukupno uzevši *RecNcil* tj. L444P su u našoj ispitivanoj grupi treća po učestalosti mutacija *GBA* gena među PB pacijentima.

Svaka od mutacija R463C, R463H i N392S je u heterozigotnom stanju pronađena kod 2 PB pacijenta (0,31%) i nije ih bilo u kontrolnoj grupi. R463C klasifikuje se kao „teška”<sup>50</sup> mutacija, mada zbunjuje podatak da kada se nasledi u homozigotnom stanju dovodi do GB tip 1, dok nasleđivanje u kombinaciji sa „null” alelom rezultuje u tip 1 ili tip 3 GB<sup>30</sup>. U nekim studijama ova mutacija je bila ređa kod Aškenazi Jevreja sa GB nego u drugim populacijama i druga je po učestalosti kod GB tip 3, mada su ovi podaci nekonzistentni<sup>36,49,281</sup>. R463H klasifikovana je kao „null” mutacija i opisana je i uz tip 2 GB<sup>50,282</sup>. N392S je *missens* mutacija (c.1292A>G) koja ranije nije opisana u literaturi. Mutacija na istoj poziciji, N392I, ranije je opisana i klasifikovana kao „teška” i opisuje se uz tip 2 GB<sup>47,50,282</sup>.

E388K (c.1279G>A) je nesinonimna promena nejasne patogenosti i pronađena je u heterozigotnom stanju kod jednog pacijenta (0,16%) i kod jednog zdravog ispitanika (0,27%). Ne postoje podaci u literaturi o „težini” ove mutacije, dok je druga mutacija na istom mestu (1279G>T) klasifikovana kao „null” mutacija. Razlika u učestalosti javljanja E388K kod PB pacijenata i kontrola u našem istraživanju, nije bila statistički značajna, što je u skladu sa rezultatima Asselta i saradnika<sup>269</sup>. Obzirom da postojanje E388K promene nije nikada jasno povezano sa nastankom GB, neki autori je smatraju polimorfizmom<sup>269</sup>. Međutim, iako se polimorfizmi u *GBA* genu ne smatraju faktorom rizika za nastanak PB, pokazano je da PB pacijenti koji su heterozigotni nosioci ove promene imaju bržu progresiju motornih simptoma u poređenju sa PB pacijentima koji ne nose promene u *GBA* genu<sup>161</sup>.

P391L je mutacija neutvrđene „težine”<sup>50</sup> koja je u našem ispitivanom uzorku pronađena kod jednog PB pacijenta (0,16%) i nije detektovana u kontrolnoj grupi.

D380V je *missens* promena (c.1256A>T) koja ranije nije prijavljena u literaturi. Nekoliko supstitucija na ovoj poziciji (D380N, D380H, D380Y i D380A) povezano je sa nastankom GB<sup>47,205,283,284</sup>. U našem uzorku je detektovana kod jednog PB pacijenta (0,16%) i nije je bilo kod ispitivanih zdravih kontrola.

A456P je mutacija pronađena kod jedne zdrave kontrole (0,27%) i nije nađena kod PB pacijenata. Ova promena može se naći kao deo ranije opisane *RecNcil* mutacije.

T369M je promena nepoznate „težine“<sup>49,50</sup> i najčešće se u literaturi opisuje kao benigni polimorfizam<sup>159</sup> jer nije jasno povezana sa nastankom GB, niti PB<sup>20,285</sup>. Međutim, literaturni podaci su kontroverzni jer se T369M opisuje kod GB pacijenata koji su kombinovani heterozigoti<sup>49</sup>; PB pacijenti nosioci ove promene imaju raniji početak bolesti u poređenju sa onima koji nemaju promene u *GBA* genu<sup>249</sup>. T369M je u našem istraživanju detektovan kod 28 PB pacijenata (4,35%) i kod 12 zdravih kontrola (3,26%), što nije statistički značajna razlika u učestalosti. U nekim serijama T369M se opisuje kod čak 8% PB pacijenata i može se statistički dovesti u vezu sa postojanjem PB<sup>162,270</sup>. Kod jednog pacijenta T369M postojala je u homozigotnom stanju.

Patogenost R329H promene nije poznata i smatra se da verovatno nije patogena<sup>229</sup>. Softverskom predikcijom dobija se verovatnoća od 51% da je ova promena patogena. U našem uzorku promena R329H pronađena je kod jednog pacijenta sa PB (0,16%) i nije je bilo kod kontrola.

Detektovane su sledeće tihe varijante (sinonimne varijante) koje ne dovode do poremećaja sekvence proteina: T369T, V398V, V459V i V460V u heterozigotnom stanju, od kojih prve tri heterozigotne promene ranije nisu bile opisane u literaturi.

Početak PB bio je u proseku u 53. godini u obe ispitivane grupe, što znači da u našem ispitivanom uzorku prisustvo *GBA* mutacije nije uticalo na vreme početka bolesti. Slično je pokazano i u još nekim istraživanjima od kojih je jedno sprovedeno u Španiji, gde je početak u *GBA*-PB bio prosečno u 54,2 godine, a u sPB grupi u 56,5 godina, takođe bez statističke značajnosti<sup>158,161</sup>. Međutim, u literaturi postoji podatak da prisustvo *GBA* mutacije može modifikovati godine početka PB<sup>159</sup>. Nosioci *GBA* mutacija imaju raniji početak PB u poređenju sa PB pacijentima bez mutacije i to, u nekim studijama, čak šest godina ranije<sup>18,159,249,251,259,262</sup>. Ovaj stav potvrđen je rezultatima meta analize<sup>286</sup>. Nichols i saradnici<sup>249</sup> pokazali su da ukoliko podele PB pacijente na one sa ranim i kasnim početkom bolesti (granica je 50 godina), udruženost *GBA* mutacija i ranijeg početka PB postojala je samo u drugoj grupi sa početkom posle 50. godine. Potpuno suprotan zaključak doneli su Clark i saradnici<sup>159</sup> koji su pokazali da *GBA*-PB pacijenti sa ranim početkom bolesti, imaju za dve godine raniji početak PB u odnosu na sPB, što nije pokazano za PB grupu sa kasnim početkom. Nekoizistentnost ovih nalaza moguće da je posledica ispitivanja različitih etničkih grupa, pristrasnosti u prikupljanju uzoraka za analizu i specifičnog profila pacijenata koji gravitiraju tercijarnoj instituciji kakva je Klinika za neurologiju.

„Težina“ GBA mutacije uticala je, u našem ispitivanom uzorku, na godine početka bolesti. Nosioци „teških“ GBA mutacija imali su prosečno oko 48 godina na početku PB dok su nosioци „lake“ GBA mutacije imali početak bolesti u oko 60 godina, što je statistički značajno kasnije. Ovaj nalaz je konzistentan sa literaturnim podacima. Prema Gan-Or i saradnicima<sup>137</sup>, početak PB kod nosilaca „lake“ GBA mutacije bio je prosečno u 49,8 godina, a kod nosilaca „teških“ GBA mutacija u 62,6 godina, što je slično našem nalazu, a pokazano je i u drugim studijama<sup>133,248,257,272,287</sup>. Dužina trajanja bolesti nije se razlikovala u grupi nosilaca „teških“ i „lakih“ GBA mutacija, ali je postojala razlika u godinama u trenutku pregleda, gde je pokazano da je grupa sa „teškim“ GBA mutacijama značajno mlađa (Tabela 15).

Raniji početak PB vezuje se i za druge monogenske forme PB. Najraniji početak, pre 40. godine života, karakteristika je resektivno naslednih formi PB koji su u vezi sa mutacijama u genima: *PARKIN*, *DJ-1*, *PINK1*, *ATP13A2*<sup>11</sup>. U slučaju autozomno-dominantno nasledne PB udružene sa mutacijama u *LRKK2* genu, početak PB je prosečno u 58. godini života<sup>232</sup>.

GBA-PB i sPB grupa nisu se statistički značajno razlikovale po godinama u trenutku pregleda, dužini trajanja bolesti, kao ni po polnoj distribuciji (Tabela 10). Literaturni podaci o polnoj distribuciji kod heterozigotnih nosilaca GBA mutacije sa PB ne omogućavaju zaključke, jer se dobijaju različiti odnosi u studijama. Lesage i saradnici nisu našli razliku u polnoj distribuciji pacijenata zavisno od GBA statusa<sup>162</sup>. U studiji Setó-Salvia i saradnika postojala je predominacija ženskog (72,7%), a u istraživanju Neumann i saradnika muškog pola (83,8%) među GBA-PB pacijentima<sup>157,158</sup>. U našem uzorku GB i PB imala su četiri pacijenta, svi muškog pola. Moguće je, međutim, da je u slučaju GB pacijenata koji dobiju PB, odnos polova drugačiji nego kod sporadične PB. Naime, u internacionalnom registru GB odnos polova je bio 1,3:1 (muški:ženski) kod PB pacijenata, dok se generalno uzima da je kod sPB odnos 2:1<sup>146</sup>.

Porodična anamneza za PB bila je pozitivna kod 23,1% pacijenata GBA-PB grupe i 17,6% sPB grupe, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Pulkes i saradnici došli su do sličnog zaključka: nosioци GBA mutacije imali su češće pozitivnu porodičnu anamnezu za PB (24% pacijenata) u odnosu na pacijente bez GBA mutacije (9%), opet bez statističke značajnosti koja nije pokazana ni u studiji sprovedenoj u Španiji, gde je čak 50% GBA-PB osoba imalo rođaka prvog stepena sa PB nasuprot 38,9% PB pacijenata bez GBA mutacije<sup>158,268</sup>. Sidranski i saradnici su u najvećoj multicentričnoj studiji dobili procenete slične našim rezultatima: 18% pacijenata bez GBA mutacije i 24% pacijenata sa GBA mutacijom imalo je rođaka prvog ili drugog stepena sa PB, međutim, u ovom slučaju postojala je statistički značajna razlika<sup>20</sup>. Rezultat jedine meta analize podržava nalaz češćeg postojanja pozitivne porodične anamneze za PB kod PB pacijenta nosilaca GBA mutacije<sup>286</sup>. Takođe, PB pacijenti sa pozitivnom porodičnom

anamnezom za PB češće su nosioci *GBA* mutacije nego oni sa negativnom porodičnom anamnezom<sup>162</sup>. Kod familijarnih formi PB, opisana je veća učestalost i drugih gena koji uzrokuju PB, što je delom diskutovano ranije u tekstu.

Najčešći inicijalni simptom PB, nezavisno od *GBA* statusa, bio je jedan od kardinalnih simptoma PB. Tremor je bio inicijalni simptom kod 44,7% i 50,5%, bradikinezija kod 23,7% i 27,6%, a rigiditet kod 15,8% i 13,5% u *GBA*-PB i sPB grupi redom; statistička analiza nije pokazala razliku (Tabela 11). Težina *GBA* mutacije nije uticala na inicijalnu prezentaciju PB (Tabela 16). Podaci u literaturi nisu konzistentni po pitanju inicijalne prezentacije PB kod nosilaca *GBA* mutacija. Gan-Or i saradnici uočili su u grupi nosilaca *GBA* mutacija tendenciju veće učestalosti slabosti i manje učestalosti rigiditeta na početku PB<sup>248</sup>. Clark i saradnici prijavili su tremor kao češći, dok je Aharon-Peretz sa saradnicima našao da je tremor značajno ređi inicijalni simptom u grupi nosilaca *GBA* mutacija u odnosu na sPB<sup>159,288</sup>. U našoj grupi ispitanika nije pokazano da nosioci *GBA* mutacije češće imaju bradikineziju na početku bolesti u poređenju sa PB pacijentima bez *GBA* mutacije<sup>162,289</sup>. Prema rezultatima meta analize, PB pacijenti sa *GBA* mutacijom u poređenju sa onima bez *GBA* mutacije, imali su češće bradikineziju kao inicijalni simptom PB, dok razlika u frekvenciji tremora kao inicijalnog simptoma PB nije pokazana<sup>286</sup>.

Nekoliko studija bavilo se inicijalnim simptomima kod monogenetskih formi PB. U velikoj multicentričnoj studiji koja je ispitivala kliničke karakteristike PB udružene *LRRK2* mutacijama, pokazano je da je najčešći inicijalni simptom, nezavisno od *LRRK2* statusa bio tremor, a zatim, sa manjom učestalošću bradikinezija i rigor<sup>232</sup>, što je slično našem nalazu. PB pacijenti iz severne Afrike koji su nosioci G2019S mutacije *LRRK2* gena, nisu se razlikovali od sPB po četiri ispitivana inicijalna simptoma (tremor, bradikinezija, mikrografija i distonija)<sup>290</sup>. Ukočenost i poremećaj balansa kao inicijalni simptom češće su imali nosioci G2019S *LRRK2* mutacije nego nosioci *GBA* mutacije i sPB pacijenti<sup>289</sup>. Pacijenti sa A53T *SNCA* mutacijom imali su značajno veću frekvenciju bradikinezije i rigiditeta, a manju frekvenciju tremora u poređenju sa PB pacijentima bez *SNCA* mutacije<sup>291</sup>. Prema našem saznanju, početni simptomi PB kod drugih monogenetskih formi PB nisu sistematski izučavani i retki podaci svode se na opise pojedinačnih slučajeva.

Bol, pre svega u ramenu, bio je jedini inicijalni simptom PB u našem uzorku koji je statistički značajno češće prisutan ( $p < 0,05$ ) kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijom (10,5%) nego kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije (3,0%). Slična prevalencija bola, kao prezentujućeg simptoma PB kod nosilaca *GBA* mutacije (9,86%), je utvrđena u prethodim studijama, međutim, nije pokazana statistički značajna razlika u poređenju sa frekvencijom bola kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije (6,07%)<sup>248</sup>. Neobjašnjivi bol je u

drugoј studiji bio češće prisutan kod GBA-PB pacijenata (58%) nego kod PB pacijenata bez *GBA* mutacije (10%).

Bol je jedan od najčešćih pre-motornih simptoma PB i Winkler i saradnici su uključili bol, pored nekoliko drugih nemotornih simptoma, u skor koji služi za identifikaciju individua koja su u riziku da razviju motorne simptome PB kasnije u životu<sup>292</sup>. „Zamrznuto rame“ (eng. *frozen shoulder*) se definiše kao bolni sindrom sa restrikcijom pokreta u zglobu ramena koji se javlja u odsustvu abnormalnosti tog zgloba. To je jedan od najčešćih muskuloskeletnih problema kod PB i može biti inicijalni simptom PB<sup>54</sup>. Bol u ramenu je 21 put češći kod PB pacijenata nego kod kontrolne grupe koja nema PB<sup>293</sup>.

Nekoliko različitih gena ima moguću ulogu u pojavi bola kod PB. Do sada su opisane promene u *SCN9A*, *FAAH* i *COMT* genima<sup>294,295</sup>, a naši rezultati sugerišu da bi se ovoj grupi gena mogao pridružiti i *GBA* kao faktor rizika za nastanak bola kod PB pacijenata. Posebno je interesantan nalaz da su tri od četiri PB pacijenta nosioca *GBA* mutacija koji su imali bol kao inicijalni simptom, bili heterozigotni nosioci D409H mutacije, a jedan je bio nosilac R463H mutacije. Obe ove mutacije su klasifikovane kao „teške“ *GBA* mutacije<sup>50</sup>, što bi moglo dovesti do pojave različitog fenotipa u odnosu na nosioce „lakih“ mutacija.

Kod jednog od pacijenata, koji je homozigotni nosilac N370S mutacije, PB počela je u 54. godini, a četiri godine kasnije, kada je ispitivan u okviru ove studije, nije imao kliničke znake GB niti mu je dijagnoza GB bila prethodno postavljena. Od ranije je poznato da znaci PB mogu prethoditi pojavi kliničkih manifestacija GB, čak i 12 godina<sup>15,151,154</sup>. Najčešće, u 90% slučajeva, dijagnoza GB je postavljena pre pojave parkinsonizma<sup>146</sup>.

Smatra se da je fenotip parkinsonizma veoma sličan kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije<sup>134</sup>. Kliničke karakteristike PB kod nosilaca *GBA* mutacija, tipične su za PB i obuhvataju asimetričan parkinsonizam ranog početka sa dobrim odgovorom na terapiju L-dopom<sup>240</sup>.

U trenutku postavljanja dijagnoze, PB udružena sa *GBA* mutacijama se ne može razlikovati od idiopatske PB<sup>161</sup>. U prethodnim ispitivanjima *GBA* udruženog parkinsonizma, rezultati koji se odnose na motorni aspekt su nekonzistentni. Prema nekim autorima ne postoji razlika kardinalnih simptoma PB, UPDRS III skora, H&Y stadijuma i posturalne nestabilnosti kada se uporede GBA-PD i sPB<sup>159,162,249,250,253,268</sup>. Nasuprot, prema drugim autorima, kod nosilaca *GBA* mutacija postoji manje pacijenata sa asimetričnim početkom bolesti, bradikinezijom i tremorom u miru, rigiditetom i/ili više sa posturalnom nestabilnošću<sup>20,296,297</sup>.

U našem ispitivanom uzorku najveći broj ispitanika imao je asimetričan parkinsonizam. Ukupni UPDRS skor za GBA-PB grupu iznosio  $58,61 \pm 34,16$ , a H&Y stadijum prosečno  $2,29 \pm 0,96$ . Za sPB grupu UPDRS je bio prosečno  $54,79 \pm 27,52$ , a H&Y  $2,26 \pm 0,83$ ; grupe se nisu statistički značajno razlikovale po skorovima za ukupni UPDRS i H&Y stadijum ( $p > 0,05$ ). Rezultati meta analize koji se odnose na težinu motornih simptoma merenu pomoću skala H&Y i UPDRS-III nisu ukazali na postojanje razlike među PB pacijentima u odnosu na status u *GBA* genu<sup>286</sup>. Posturalna nestabilnost bila je prisutna kod nešto više od četvrtine ispitanika u obe ispitivane grupe, dakle nezavisno od *GBA* statusa. Iako neke studije stepen motornog deficita nisu merile skalama, klinički je pokazano da ne postoji razlika motornih karakteristika kod PB pacijenata u zavisnosti od *GBA* genotipa, u trenutku pregleda: Aharon-Peretz i saradnici nisu detektovali razliku u frekvenciji bradikinezije, tremora, rigora, niti posturalne nestabilnosti među grupama<sup>288</sup>. Kraoua i saradnici ispitivali su GB pacijente sa PB i zaključili da se klinička slika tog parkinsonizma ne razlikuje od idiopatske PB po pitanju asimetričnog početka bolesti, akinezije, rigiditeta i tremora u miru<sup>150</sup>.

Rezultati studije preseka ukazuju da su diskinezije bile statistički značajno češće kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijom (38,5%) u poređenju sa sPB grupom (23,6%). Ovakav nalaz u skladu je sa literaturnim podacima. Naime, Lesage i saradnici došli su od istog zaključka: L-dopom indukovane diskinezije češće su kod nosilaca *GBA* mutacija nego kod sPB pacijenata i to nezavisno od pola, doze L-dope, dužine trajanja bolesti i trajanja terapije<sup>162</sup>. Clark i saradnici pokazali su isti odnos po pitanju frekvencije diskinezija, ali napominju da su u njihovom ispitivanom uzorku PB pacijenti sa *GBA* mutacijama uzimali statistički značajno veće doze L-dope, u poređenju sa PB grupom bez *GBA* mutacije<sup>159</sup>. Rezultati istraživanja Aharon-Peretza i saradnika ukazuju da prisustvo i težina diskinezija nije u vezi sa *GBA* genotipom<sup>288</sup>. Meta analiza takođe ukazuje da diskinezije kod GBA-PB pacijenata nisu češće<sup>286</sup>. L-dopom izazvane diskinezije opisuju se i kod GB pacijenata sa PB<sup>154</sup>; Kraoua i saradnici<sup>150</sup> registrovali su postojanje diskinezija kod 5 od 10 pacijenata sa GB i PB. Naša analiza ukazuje na češću pojavu diskinezija kod nosilaca „lakih“ *GBA* mutacija (58,3%) u odnosu na nosioce „teških“ *GBA* mutacija (31,6%) ali statička značajnost nije utvrđena.

Analiza rezultata studije slučajeva i kontrola nije pokazala postojanje statistički značajne razlike među PB grupama koja se odnosi na motorne komplikacije i to u smislu prisustva nevoljnih pokreta (horea, distonija, balizam), vremenske distribucije diskinezija (vršne, bifazične ili diskinezije na kraju doze), kao i motornih fluktuacija („wearing off“, no ON, ON/OFF). Trend statističke značajnosti primećen je za vršne diskinezije koje su postojale u GBA-PB grupi kod 45,8% pacijenata i u sPB grupi kod 20,7%

pacijenata ( $p=0,051$ ;  $OR=3,25$ ;  $CI 0,97-10,87$ ). Prema dobijenim rezultatima, odnos šansi je 3,25 puta veći da PB pacijent ima vršne diskinezije ukoliko je nosilac *GBA* mutacije.

Genetski faktori za koje se smatra da povećavaju rizik za nastanak motornih fluktuacija i L-dopom indukovanih diskinezija su opisane u literaturi i odnose se, između ostalog, na polimorfizme u genima za dopaminske receptore i dopaminski transporter<sup>298</sup>. Međutim, postoje saopštenja da neke monogenetske forme PB takođe mogu imati veću učestalost diskinezija, što je pokazano na primeru G2019S mutacije *LRRK2* gena<sup>290</sup>. Iako razlika u učestalosti diskinezija kod nosilaca *LRRK2* mutacija nije pokazana u drugim studijama, vreme do nastanka diskinezija bilo je duže kod nosilaca ove mutacije nego kod sPB pacijenata<sup>232</sup>.

Frizing hoda bio je, prema rezultatima studije preseka, značajno češći ( $p<0,05$ ) u GBA-PB grupi (36,8%) nego u sPB grupi (19,6%). Ova razlika nije postojala u studiji preseka. Nosioci „lake“ *GBA* mutacije (58,3%) su duplo češće imali frizing hoda nego nosioci „teške“ mutacije (26,3%), ali bez statističke značajnosti. Frizing se javljao sa sličnom učestalošću kod PB pacijenta sa Tajlanda, nezavisno od *GBA* statusa<sup>268</sup>. Osim ove studije, nema drugih literaturnih podataka o učestalosti frizinga kod *GBA* udružene PB. Frizing hoda opisan je i kod GB pacijenta sa PB<sup>151,153</sup>.

Nemotorni simptomi kod genetskih formi PB nisu ispitivani na velikom broju pacijenata i smatra se da se javljaju sa sličnom frekvencijom, ako ne i ređe u poređenju sa idiopatskom PB<sup>299</sup>. Međutim, u slučaju PB udružene sa *GBA* mutacijama pokazano je da su nemotorne karakteristike kod ovih pacijenata češće i izraženije nego kod onih PB pacijenata bez *GBA* mutacije<sup>160,297,300</sup>. Ovome u prilog govori i naš rezultat da GBA-PB pacijenti imaju značajno veći skor na UPDRS I skali (nemotorna iskustva dnevnog života) u poredjenju sa sPB, iako su pacijenti u ove dve grupe mečovani po starosti, dužini trajanja bolesti i H&Y stadijumu bolesti. Vrednost ostalih UPDRS subskorova kao i ukupni UPDRS skor sličan je u ove dve grupe (Tabela 19).

Prema upitniku o nemotornim simptomima koji je korišćen u studiji slučajeva i kontrola, u GBA-PB grupi veći broj pacijenata (42,9%) se izjasnio da ima problem sa pamćenjem, u poređenju sa sPB grupom (25,0%), ali statistički značajna razlika nije pokazana (Tabela 22). Slično, u istraživanju Alcalay i saradnika, GBA-PB pacijenti češće su se žalili na kognitivni poremećaj nego sPB pacijenti, ali je u ovom istraživanju razlika bila statistički značajna<sup>301</sup>.

Rezultati studije preseka u kojoj je za procenu kognitivnog statusa korišćen MMSE test, nisu pokazali postojanje statistički značajne razlike poređenjem srednjih skorova testa u GBA-PB i sPB grupi.



Iako je skor manji od 25 na MMSE testu, koji ukazuje na postojanje kognitivnog deficita, imalo više pacijenata GBA-PB grupe (16,7%) u poređenju sa sPB grupom (10,4%), statistička razlika nije postojala (Tabela 13). Rezultati studije sličajeva i kontrola, takođe nisu ukazali na postojanje statistički značajne razlike u MMSE skoru, kao i ukupnom skoru i subskorovima Adenbruksovog testa, osim subskora za jezik gde je postojao trend statističke značajnosti ( $p=0,056$ ). Ukoliko se primene prema starosti prilagođene granične vrednosti testa, dobija se nalaz koji ukazuje na češći poremećaj kod GBA-PB pacijenata iako se srednja vrednost među ispitivanim grupama nije razlikovala ( $OR=3,175$ ,  $CI 0,942-10,753$ ). GBA-PB grupa imala je statistički značajno lošija postignuća na Bostonskom testu imenovanja: u GBA-PB grupi 36% imalo je vrednost ispod granice predviđene za starosnu dob, dok je u sPB grupi ovakav nalaz imalo samo 3,3% ( $p=0,003$ ;  $OR=16,39$ ,  $CI 1,891-142,857$ ) (Tabela 23).

Različiti kognitivni domeni češće su oštećeni kod PB pacijenta sa *GBA* mutacijom nego kod onih bez *GBA* mutacije<sup>302,303</sup>. U studiji Alcalay i saradnika, pokazano je da PB pacijenti sa *GBA* mutacijama imaju lošija postignuća na MMSE testu, u vizuospacijalnom domenu i memoriji, a najveća razlika pokazana je za neverbalnu memoriju<sup>302</sup>. Zokaei i saradnici pronašli su da GBA-PB pacijenti imaju poremećaj kratkotrajne vizuelne memorije<sup>303</sup>. Mata i saradnici su u ispitivanje uključili kako PB pacijente nosioce *GBA* mutacija, tako i nosioce polimorfizma E326K. Pokazano je da nosioci *GBA* mutacija i polimorfizma imaju drugačiji kognitivni profil u poređenju sa PB pacijentima bez promena u *GBA* genu i to u smislu postojanja poremećaja radne memorije i egzekutivnih funkcija, kao i vizuospacijalnog domena<sup>304</sup>.

Od ranije su poznati genetski faktori rizika (*MAPT*, *SNCA*, *COMT*, *APOE*) za koje se smatra da bi mogli biti u osnovi heterogenosti kognitivnog statusa kod PB<sup>305-308</sup>. *GBA* mutacije su, takođe, nezavisni faktor rizika za kognitivni poremećaj kod PB pacijenata<sup>158,270,302</sup>. Meta analiza ukazuje na povećanu učestalost demencije kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama<sup>286</sup>. Ovi pacijenti u poređenju sa sPB imaju pet puta veći rizik za razvoj demencije i bržu progresiju kognitivnog deficita<sup>158,161,309,310</sup>. Winder-Rhodes i saradnici procenili su da je srednje vreme do razvoja demencije 46,0 meseci za PB pacijente sa *GBA* mutacijama, 96 meseci za PB pacijente sa *GBA* polimorfizmima, dok je manje od polovine sPB pacijenata imalo demenciju tokom perioda praćenja od 82 meseca<sup>161</sup>. Ipak, iako su različita merenja globalne kognicije pokazala veću prevalencu i bržu progresiju deficita kod nosilaca *GBA* mutacija, ona nisu specifična, niti senzitivna u razlikovanju PB pacijenata sa i bez *GBA* mutacija, pa se smatra da je potrebno nastaviti istraživanja u cilju detekcije specifičnog profila kognitivnog oštećenja, tj. određenih kognitivnih domena kod *GBA* udružene PB<sup>311</sup>.

U velikoj multicentričnoj studiji dokazano je da su *GBA* mutacije faktor rizika za demenciju sa Levijevim telima, kao i za Parkinsonovu bolest sa demencijom<sup>21</sup>. U kontinuitetu sa tim bio bi i nalaz da PB pacijenti koji su nosioci *GBA* mutacije imaju ekstenzivniju kortikalnu patologiju Levijevih tela, što bi teorijski moglo biti u osnovi pojave kognitivnog deficita<sup>302</sup>. Međutim, ova hipoteza zahteva dalju potvrdu, jer je poznato da kognitivni deficit ne razvijaju svi GBA-PB pacijenti, u nekim saopštenjima čak i posle 21 godine trajanja PB<sup>302,304</sup>.

Iako je u našem istraživanju pokazano da je učestalost kognitivnog poremećaja veća u grupi PB pacijenata sa *GBA* mutacijama, statistički značajna razlika nije dostignuta u većini poređenja, moguće zbog malog broja pacijenta koji su nosioci mutacije ili zbog odabira pacijenata za mečovanje u studiji slučajeva i kontrola.

Kognitivni deficit ispitivan je i kod drugih monogenetskih formi PB. Velika multicentrična studija je pokazala da PB pacijenti koji su nosioci *LRRK2* mutacije ređe imaju skor na MMSE testu koji je indikativan za postojanje kognitivnog deficita ( $MMSE \leq 24$ ) u poređenju sa sPB pacijentima. Takođe, manji je broj PB pacijenata sa *LRRK2* mutacijama koji je razvio kognitivni deficit u prve dve godine nakon početka motornih simptoma PB<sup>232</sup>. Demencija je retka kod PB udružene sa *PARKIN* mutacijama<sup>299,312</sup>. Demencija kod PB pacijenata sa *SNCA* mutacijama mogla bi biti karakteristika po kojoj se razlikuje od sPB, ali to do sada nije potvrđeno. Podatak iz literature je da samo četvrtina ovih pacijenata ima demenciju posle 17 godina bolesti, što je moguće posledica postojanja benignih duplikacija u *SNCA* genu<sup>299</sup>.

Halucinacije su, u našem istraživanju, bile češće u GBA-PB grupi (15,4%) nego u sPB grupi (8,1%), ali statistička značajnost nije postojala (Tabela 12). Ovaj rezultat u skladu je sa nalazom Aharon-Peretza i saradnika gde su halucinacije postojale kod 19,4% kod GBA-PB i 14,3% sPB pacijenata, kao i u drugim studijama sa manjim ispitivanim uzorkom<sup>245,288</sup>. Nasuprot, Li i saradnici pronašli su značano veću učestalost halucinacija, iluzija i drugih psihotičnih korelata u GBA-PB grupi<sup>267</sup>. Učestalost halucinacija kod GBA-PB pacijenata je varijabilna u studijama i kreće se do 34,7%, čak i 45%<sup>157,251</sup>. „Težina“ *GBA* mutacije nije uticala na frekvenciju pojave halucinacija (Tabela 17), što u do sada dostupnoj literaturi nije razmatrano. U studiji slučajeva i kontrola halucinacije su registrovane kod sličnog broja pacijenata: oko 30%, nezavisno od prisustva *GBA* mutacije (Tabela 21). Razlika u učestalosti javljanja halucinacija i sumanutosti nije pokazana ni rezultatima upitnika o nemotornim simptomima (Tabela 22). Halucinacije koje nisu u vezi sa terapijom mogu se javiti kod skoro 50% PB pacijenata sa *GBA* mutacijama<sup>157</sup>. U studiji Neumanna i saradnika, minimalni interval do nastanka halucinacija je bio 42 meseca, a prosečni 125

meseci nakon početka motornih simptoma PB<sup>157</sup>. Difuzna neokortikalna Levijeva tela češće se nalaze kod GBA-PB pacijenata nego kod sPB<sup>157</sup>. Nastanak vizuelnih halucinacija, iluzija i psihoze moglo bi se dovesti u vezu sa širenjem Levijevih tela u temporalne regione i/ili bi se mogle shvatiti kao deo kliničke slike u spektru patologije Levijevih tela, jer su *GBA* mutacije, kao što je napomenuto, faktor rizika za demenciju sa Levijevim telima<sup>21,136,151,157,251</sup>. Halucinacije se opisuju i kod drugih monogenetskih formi PB, ali ni za jednu nema jasnih podataka o frekvenciji javljanja. Prema nekim saopštenjima halucinacije su češće kod *LRRK2* nosilaca mutacija sa PB nego kod sPB<sup>313-315</sup>, dok je psihoza retka kod PB sa *PARKIN* mutacijama<sup>299</sup>.

Oprečni su literaturni podaci koji se odnose i na druge psihijatrijske poremećaje. Depresija, apatija, indiferentnost i anksioznost, prema nekim autorima, imaju veću prevalenciju kod GBA-PB pacijenata<sup>160,297,300</sup>. Nasuprot, prema drugima, nije pokazana veća učestalost korelata depresije i anksioznosti<sup>248,270,302,309,316</sup>.

U ispitivanju depresivne simptomatologije kod PB udružene *GBA*, u literaturi je najčešće korišćena Bekova skala za depresiju. Srednji skor na ovoj skali u našem istraživanju bio je nešto veći u GBA-PB nego u sPB grupi, ali bez statistički značajne razlike (Tabela 24). Slične srednje vrednosti skora na Bekovoj skali kod GBA-PB pacijenata prijavljene su u još dve studije, od kojih je u jednoj ovaj skor bio statistički značajno veći nego u sPB grupi, dok u drugoj razlika nije postojala<sup>160,302</sup>. Nakon podele naših pacijenata prema graničnoj vrednosti Bekove skale, ispostavlja se da je 25% GBA-PB pacijenta i 0 sPB pacijenata imalo skor veći od 13 poena, što ukazuje na češće prisustvo depresivne simptomatologije kod GBA-PB pacijenata, i što je u skladu sa zaključkom studije Brockmana i saradnika<sup>160</sup>. U drugoj, prospektivnoj studiji istog autora, sa periodom praćenja PB pacijenata od tri godine, pokazano je da su vrednosti skora Bekove skale slične u grupama PB pacijenata bez obzira na *GBA* status<sup>309</sup>. Naš rezultat povećane učestalosti depresije prema BDI skali, treba interpretirati sa oprezom obzirom da srednje vrednosti testa ne ukazuju na postojanje razlike među grupama, da nije vršena korekcija rezultata za multipla poređenja, kao i da postoji mogućnost selekcionarne pristrasnosti pri kreiranju kontrolne sPB grupe, a postavlja se i pitanje validnosti rezultata u odnosu na primenu različitih graničnih vrednosti testa. Rezultati naše studije preseka (Tabela 13) ne ukazuju na razliku srednjih vrednosti skorova HAMD. Slične srednje vrednosti HAMD skora dobijene su i u drugom delu studije (studija slučajeva i kontrola, Tabela 24), ponovo bez statističke razlike. Podelom pacijenata u grupe, na osnovu granične vrednosti za HAMD (skor  $\geq 17$ ), nije statistički pokazano da *GBA* genotip utiče na HAMD skor, što je saglasno sa rezultatima studije sprovedene u Poljskoj gde je korišćena ista skala<sup>270</sup>. Prisustvo osećanja tuge u Upitniku o nemotornim simptomima, prijavilo je 63% pacijenta GBA-PB grupe i 39,3% sPB grupe, a

razlika je bila na trendu značajnosti ( $p=0,079$ ). Wang i saradnici su, koristeći drugu skalu za depresiju, ustanovili da u poređenju sa sPB pacijentima, GBA-PB pacijenti imaju veći srednji skor, kao i da veći broj pacijenta ima skor viši od graničnog, ali statistička značajnost nije postojala<sup>297</sup>. McNaill i saradnici u diskusiji svog istraživanja navode da je depresija teža kod GBA-PB pacijenata, iako ovaj zaključak nisu izveli na osnovu testiranja skalom za depresiju već upotrebom skale za nemotorne simptome i za kvalitet života<sup>300</sup>. GBA status ne utiče na povećanu učestalost depresije kao inicijalnog simptoma PB<sup>248</sup>. Kasten i saradnici ispitivali su depresiju kod drugih monogenetskih formi PB (*SNCA*, *PARKIN*, *PINK1*, *LRRK2*) i zdravih nosilaca ovih mutacija. Zaključeno je da se depresija javlja sa sličnom učestalošću kod zdravih nosilaca mutacija i zdravih kontrola, a češće kod PB pacijenata, što bi značilo da je učestalost depresije u vezi sa prisustvom bolesti, a ne u vezi sa genetskim statusom<sup>317</sup>. Ima i saopštenja da je depresija kod *LRRK2* udružene PB češća nego kod sPB<sup>315</sup>.

Gubitak interesovanja na upitniku o nemotornim simptomima, prijavilo je značajno više PB pacijenata sa GBA mutacijom (Tabela 22), a to bi mogao biti simptom depresije i/ili apatije. Srednje vrednosti na skali apatije, kao i broj pacijenata sa skorom većim od granične vrednosti, bio je sličan među PB grupama, nezavisno od GBA statusa (Tabela 24). U literaturi postoje samo dve studije prema kojima je apatija češća kod PB pacijenata koji su nosioci GBA mutacije<sup>160,300</sup>. Međutim, treba imati na umu da su zaključci o učestalosti apatije u ovim studijama doneti na osnovu opštih psihijatrijskih upitnika, a ne testova namenjenim za testiranje apatije, pa se dovodi u pitanje validnost dobijenih rezultata.

GBA-PB pacijenti imali su veći prosečni skor na skali anksioznosti (HAMA) od sPB pacijenata, međutim, oba prosečna skora bila su daleko manja od granične vrednosti testa indikativne za postojanje anksioznosti (Tabela 13 i 24). Osim toga, nije se razlikovao broj pacijenata sa vrednošću skora iznad ove granice, pa prethodno utvrđenu statističku razliku smatramo klinički irelevantnom (Tabela 13). Razlika u HAMA skoru nije uočena ni u studiji slučajeva i kontrola (Tabela 24). Sličan broj pacijenata je prijavio prisustvo anksioznosti u upitniku o nemotornim simptomima (Tabela 22), nasuprot nalazu McNeilla i saradnika gde je anksioznost ispitivana ovim upitnikom postojala češće u GBA-PB grupi<sup>300</sup>. Upotrebom drugih skala dobijeni su oprečni rezultati: prema jednoj studiji anksioznost je bila češća kod GBA-PB, dok je prema drugoj bila podjednako zastupljena kao kod sPB<sup>160,297</sup>. Kasten i saradnici nisu pronašli razliku u prisustvu anksioznosti poredeći monogenetske forme PB (*SNCA*, *PARKIN*, *PINK1*, *LRRK2*) sa sPB, međutim, socijalna fobija i agorafobija bile su češće kod monogenetskih formi PB nego kod sPB i najčešće kod PB pacijenata sa *PINK1* mutacijama<sup>317</sup>.

Ostale nemotorne manifestacije ispitivane su upotrebom Upitnika o nemotornim simptomima (NMS) (Tabela 22) u studiji slučajeva i kontrola. GBA-PB pacijenti prosečno su prijavili postojanje 9,3 od 30 nemotornih simptoma sa liste, dok su sPB pacijenti prijavili 8,9, statistički nije bilo razlike, nasuprot rezultatu studije McNeila gde je više nemotornih simptoma po PB pacijentu bilo u GBA-PB grupi, što je značajno uticalo na smanjenje kvaliteta života ovih pacijenata<sup>300</sup>. NMS upitnik ispituje prisustvo nemotornih simptoma u nekoliko domena od kojih su tri: apatija-pažnja-pamćenje, halucinacije-iluzije, depresija-anksioznost-anhedonija, već prethodno diskutovani. Pitanjima koja se odnose na nemotorne simptome od strane gastrointestinalnog trakta (curenje pljuvačke, problem sa gutanjem, mučnina i povraćanje, konstipacija, inkontinencija stolice i nekompletno pražnjenje creva) nije pokazano postojanja razlike u frekvenciji ovih simptoma kod PB pacijenata vezano za *GBA* status. Na trendu statističke značajnosti ( $p=0,076$ ) bio je problem sa gutanjem koji su češće prijavili pacijenti sPB grupe. Ovaj nalaz treba interpretirati sa oprezom obzirom da nije izvršena korekcija za multipla poređenja. Češće i teže probleme sa apetitom, poremećajem ishrane i konstipacijom kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama prijavljeni su u ranijim istraživanjima<sup>160,297</sup>.

U našem istraživanju, simptomi poremećaja urinarnog trakta (urgencija mokrenja, nokturija) podjednako su bili prisutni kod PB pacijenata nezavisno od *GBA* genotipa, što je u skladu sa rezultatima studije Wanga i saradnika<sup>297</sup>, a nasuprot nalazu Brockmana i saradnika koji su, na osnovu pitanja iz upitnika za procenu MSA, našli teži poremećaj funkcije bešike i urinarnu inkontinenciju kod nosilaca *GBA* mutacija<sup>160</sup>. Seksualna disfunkcija bila je prisutna kod sličnog broja ispitanika, nezavisno od prisustva *GBA* mutacije. Češće prisustvo seksualne disfunkcije kod GBA-PB pacijenata opisano je ranije u literaturi<sup>160,297</sup>.

Pitanja o poremećaju spavanja u upitniku o nemotornim simptomima (pitanja 22-25), obuhvataju ispitivanje postojanja prekomerne dnevne pospanosti, insomnije, živih snova i pomeranja u snu koji su korelat poremećaja spavanja u REM fazi. Poremećaj spavanja je, prema nekim studijama, češći kod GBA-PB nego kod sPB pacijenata<sup>160</sup>. Rezultati našeg istraživanja ukazuju na značajno češće postojanje preterane dnevne pospanosti kod GBA-PB pacijenata u poređenju sa sPB. Prekomerna dnevna pospanost opisana je kod GB-PB pacijenata<sup>154</sup>, kao i DLB pacijenata sa *GBA* mutacijama<sup>21</sup>, ali se nijedna studija nije bavila ispitivanjem učestalosti ovog poremećaja kod PB udružene sa *GBA* mutacijama. Postojanje živih snova bilo je na samom pragu statističke značajnosti, ali je frekvencija bila manja kod GBA-PB pacijenata. Učestalost insomnije i pomeranja u snu nije se razlikovalo među ispitivanim grupama. Napred opisane statističke značajnosti nisu korigovane zbog multiplih poređenja,

pa se navedeni rezultati moraju interpretirati sa oprezom. Poremećaj spavanja u REM fazi (RBD) je povezan sa *GBA* mutacijama: pacijenti sa idiopatskim RBD češće su nosioci *GBA* mutacija, a *GBA*-PB pacijenti češće imaju RBD<sup>300,318</sup>. Međutim, u drugoj studiji, *GB* pacijenti i zdravi nosioci *GBA* mutacija, nisu imali češće RBD u poređenju sa kontrolnom grupom bez *GBA* mutacija<sup>319</sup>. U prospektivnoj studiji dvogodišnjeg praćenja *GB* pacijenata i zdravih nosilaca *GBA* mutacija pokazano je da je RBD jedan od kliničkih markera prodromalne faze PB koji progredira<sup>320</sup>. *GBA* mutacije ne utiču na benefit od spavanja<sup>267</sup>. I kod drugih monogenetskih formi PB ispitivani su poremećaji spavanja pomoću upitnika o nemotornim simptomima: pacijenti sa *LRRK2* G2019S mutacijom ređe su prijavljivali postojanje govora i pomeranja u snu, u poređenju sa sPB pacijentima<sup>321</sup>. Healy i saradnici nisu pronašli razliku u frekvenciji poremećaja spavanja poređenjem sPB pacijenata i nosilaca *LRRK2* Gly2019Ser mutacije sa PB<sup>232</sup>.

Hiposmija je na osnovu jednog pitanja upitnika o nemotornim simptomima, bila prisutna kod sličnog broja PB pacijenata, nezavisno od prisustva *GBA* mutacija. Ovaj nalaz treba interpretirati pažljivo obzirom da nije vršeno objektivno ispitivanje čula mirisa, već je podatak o hiposmiji davao sam ispitanik. Ipak, u dve studije, olfaktorna disfunkcija je skorovana objektivno, upotrebom testa mirisnih štapića, i na ovaj način nije utvrđeno postojanje razlike među PB pacijentima sa i bez *GBA* mutacija<sup>160,300</sup>. Wang i saradnici takođe nisu pronašli razliku u učestalosti olfaktivne disfunkcije poređenjem PB pacijenata bez mutacija i onih koji su nosioci *GBA* i *LRRK2* mutacija<sup>297</sup>. Poremećaj mirisne funkcije je karakterističan za PB, ali je, prema nekim istraživanjima, manje izražen kod određenih genetskih formi PB, konkretno kod PB pacijenata sa *SNCA* i *LRRK2* mutacijama<sup>232,274,313,322</sup>. Važnost hiposmije je u tome što se javlja kao najčešći izolovani prodromalni marker PB kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije i to pre razvoja kognitivnog deficita ili motornih abnormalnosti<sup>319</sup>.

Neobjašnjivi bol prijavio je sličan broj PB pacijenata, nezavisno od *GBA* statusa, nasuprot studiji McNeilla i saradnika gde je bol bio značajno češći kod *GBA*-PB pacijenata<sup>300</sup>. Iako prisustvo bolova nije sistematski ispitivano kod *GBA*-PB, Wang i kolege su našli da se skor za telesni bol u upitniku za ispitivanje kvaliteta života SF-36, ne razlikuje među grupama PB pacijenata bez mutacija i PB pacijenata sa *GBA* i *LRRK2* mutacijama<sup>297</sup>.

Mrkosvestica i padovi jednako su bili zastupljeni u obe PB grupe, nezavisno od prisustva *GBA* mutacija. Padovi sa gubitkom svesti su bili češći u *GBA*-PB grupi u studiji McNeilla i prema našim saznanjima nisu ispitivani u drugim studijama<sup>300</sup>. Razlika među ispitivanim PB grupama nije postojala ni u učestalosti ostalih ispitivanih nemotornih simptoma: gubitak telesne mase, oticanje nogu, sindrom

nemirnih nogu, pojavi duplih slika i prekomernom znojenju što je u skladu sa rezultatima McNeilla i saradnika koji su koristili isti upitnik za ispitivanje nemotornih simptoma<sup>300</sup>.

Samo jedna studija se bavila ispitivanjem nemotornih karakteristika GB pacijenata i zdravih heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije koji nemaju PB i tu nije identifikovano povećanje autonomnih poremećaja i RBD u poređenju sa kontrolama koje nemaju *GBA* mutacije<sup>319</sup>. Međutim, hiposmija, kognitivni poremećaj i parkinsoni motorni poremećaj češće su postojali kod GB pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, pa se smatra da bi oni mogli biti rani znaci neurodegeneracije. Hiposmija je, prema mišljenju autora, najsenzitivniji, ali ne i specifičan marker za identifikaciju zdravih nosilaca *GBA* mutacija i GB pacijenata koji su u riziku za nastanak PB<sup>319</sup>.

Terapijski odgovor na L-dopu nije se razlikovao u ispitivanim grupama. Najveći broj PB pacijenata, nezavisno od *GBA* statusa i „težine“ mutacije, prijavio je odličan terapijski odgovor na L-Dopu (Tabela 14 i 18). Slični su i podaci iz literature. Naime, osim nekoliko saopštenja o slabijem odgovoru a L-Dopu, većina studija prijavljuje odličan simptomatski efekat L-dope i dopaminskih agonista kod PB udružene sa *GBA* mutacijama<sup>18,158,240,268,296</sup>. Stimulacija dubokih moždanih jedara je vršena i kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije sa PB i u obe grupe je imala dobar ishod. Ipak, napominje se da su ovi pacijenti zahtevali izvođenje operacije ranije u toku bolesti i imali su bržu progresiju kognitivnog deficita i aksijalnih poremećaja nakon operacije<sup>323-326</sup>. Enzimaska zamenska terapija koja se primenjuje u lečenju GB, ne prevenira nastanak i progresiju PB, ne utiče na simptome PB, što se interpretira nemogućnošću ove terapije da prođe krvno-moždanu barijeru<sup>146,150,152</sup>. Za lek miglustat, koji se takođe koristi u terapiji GB i prolazi hematoencefalnu barijeru, ne postoje jasni dokazi da utiče na simptome PB kod GB pacijenata<sup>150,155,156</sup>.

Ograničenja u ovom delu studije odnose se zaključke (npr. učestalost bola kao inicijalnog simptoma PB) koji su doneti na osnovu analize relativno male grupe pacijenata koji su nosioci *GBA* mutacije, iako je primarna grupa PB pacijenata koji su testirani na prisustvo mutacije u *GBA* genu velika. Obzirom da su analizirani samo egzoni 8-11, moguće je da je prava učestalost *GBA* mutacija kod PB pacijenata podcenjena. Deo podataka je dobijen anamnezom pacijenata, pa nije moguće isključiti pristrasnost sećanja. Prethodno je u tekstu napomenuto da neki rezultati, kod kojih je dobijena statistička značajnost, nisu korigovani zbog multiplih poređenja, pa je moguće da su posledica slučajnosti. Takođe, napomenuto je da su nalazi gde postoji statistički značajna razlika pri poređenju srednjih vrednosti testa koje su niže od „cut off“ skora (kod HAMA) i gde nakon kategorijalne raspodele

pacijenata prema graničnoj vrednosti testa nije pokazano postojanje statistički značajne razlike u učestalosti poremećaja, interpretirani kao klinički irelevantni.

Hiperehogenost SN se smatra markerom PB i može se videti kod 90% PB pacijenata i kod 8–14% zdravih ispitanika<sup>166,169</sup>. Najznačajniji rezultat dobijen u našem TKS istraživanju odnosa PB i mutacija u *GBA* genu je da je aSNmax vrednost kod PB pacijenata koji su homozigotni i heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu (GB+PB+ i GBA+PB+ grupe) skoro identična kao kod sPB pacijenata, grupe koja nema mutaciju u *GBA* genu. Vrednosti aSNmax bile su statistički značajno veće kod heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije koji imaju PB (GBA+PB+) u poređenju sa onima koji nemaju PB (GBA+PB-) i u poređenju sa zdravim kontrolama. Prevalencija izražene ili umerene hiperehogenosti SN je bila slična među svim ispitivanim grupama sa PB bez obzira na mutacije u *GBA* genu (GB+PB+: 75%, GBA+PB+: 83%, i sPB: 87,5%), ali statistički značajno veća u poređenju sa grupama bez PB, takođe bez obzira na *GBA* status (GB+PB-, GBA+PB- i grupa zdravih kontrola). Razlika u prevalenciji izražene ili umerene hiperehogenosti SN je bila nivou trenda kada se uporede grupa pacijenata sa GB bez PB (GB+PB-) i zdrave kontrole ( $p < 0,1$ ).

Nekoliko drugih studija bavilo se istom problematikom. Saunders-Pullman sa saradnicima sprovela je TKS ispitivanje na tri PB pacijenta od kojih je jedan bio homozigotni nosilac N370S mutacije, a dva su bila kombinovani heterozigotni nosioci mutacija N370S i R496H i uporedila nalaz sa sPB i zdravim kontrolama<sup>151</sup>. Pokazano je da je hiperehogenost SN kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama ( $0,28 \text{ cm}^2$ ) bila slična kao kod sPB ispitanika ( $0,31 \text{ cm}^2$ ) ( $p=0,52$ ), ali statistički značajno veća u poređenju sa zdravim kontrolama ( $0,14 \text{ cm}^2$ ) ( $p=0,005$ ), što je u skladu sa našim rezultatima. Vrednosti aSNmax dobijene u ovoj studiji veoma su bliske vrednostima dobijenim u našem ispitivanju. Dalje, uočeno je da kod dva od tri ispitivana pacijenta ne postoji asimetrija hiperehogenosti SN, a ovakav ehosonografski nalaz opisuje se kod demencije sa Levijevim telima<sup>327</sup>. Naime, Walter i saradnici pokazali su da je izražena bilateralna hiperehogenost SN bila prisutna kod 80% DLT pacijenata i samo 30% PB pacijenata sa demencijom i PB bez demencije<sup>327</sup>. Značaj ovakvog nalaza postaje kompleksiji imajući u vidu da se kod GBA-PB pacijenata češće nalazi difuzna neokortikalna LT patologija u poređenju sa mečovanim sPB pacijentima<sup>157</sup>. U našem istraživanju, na većem broju pacijenata, pokazan je sličan stepen asimetričnog nalaza kod PB pacijenata sa i bez *GBA* mutacije. Brockmann i saradnici ispitivali su TKS kod 20 PB pacijenta koji su heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu (N370S i L444P) i 20 sPB pacijenata i pronašli sličan stepen hiperehogenosti SN<sup>160</sup>. Barret i saradnici ispitivali su PB pacijente sa *GBA* i *LRRK2* mutacijama u različitim odnosima (23 *GBA* heterozigota i četiri homozigota, 25 *LRRK2* heterozigota i dva homozigota i četiri *GBA-LRRK2*



nosioća kao i 32 sPB) i zaključili da je TKS nalaz kod PB pacijenata nosilaca mutacije abnormalan, ali da se ne razlikuje od sPB<sup>328</sup>. Hiperehogenost SN ne razlikuje se značajno kod heterozigotnih nosilaca „teške“ GBA mutacije kada se uporede sa nosiocima „lake“ mutacije.

Böttcher i saradnici ispitivali su TKS-om 20 GB pacijenata od kojih je četiri imalo PB, i 32 zdrave kontrole<sup>273</sup>. Ovde je pokazano da je hiperehogenost SN česta kod GB pacijenata bez obzira da li su razvili PB ili ne. Drugim rečima, hiperehogenost SN je češća kod GB pacijenata nego kod kontrola ali se ne razlikuje kod GB pacijenata sa i bez PB. Smatramo da su rezultati našeg istraživanja u skladu sa ovim nalazom jer je utvrđeno poređenjem pacijenata sa GB bez PB (GB+PB-) i zdravih kontrola da postoji razlika u prevalenciji izražene ili umerene hiperehogenosti SN na nivou trenda ( $p < 0,1$ ). Ostali rezultati studije Böttcher i saradnika ukazuju da hiperehogenost SN nije zavisila od „težine“ GBA mutacije, ali je bila u korelaciji sa godinama starosti pacijenta u trenutku uvođenja enzimske terapije za GB<sup>273</sup>. Nađeno je, naime, da je hiperehogenost SN bila manja kod GB pacijenata koji su ranije započeli enzimsku terapiju. Ovaj nalaz je diskutovan sa oprezom obzirom na mali broj učesnika studije, kao i na činjenicu da enzimska terapija ne prolazi krvno moždanu barijeru, ali je pretpostavljeno da ostvaruje sistemski efekat utičući na metabolizam gvožđa za koji se smatra da bi delom mogao biti u osnovi opservirane hiperehogenosti SN. Zaključeno je da se kombinacijom kliničkih, genetskih i TKS nalaza može poboljšati procena rizika za nastanak PB kod GB pacijenata.

Posmatranjem sistema raphe TKS-om pretpostavljeno je da bi smanjena ehogenost ovih struktura kod PB pacijenata mogla biti u vezi sa promenama u serotonergičkom sistemu, a koji bi mogao imati ulogu u nastanku depresije i urinarne inkontinencije<sup>179</sup>. U istraživanju Brokmana i saradnika pokazano je da je raphe sistem prekinut kod 61% PB pacijenata sa GBA mutacijama i kod 21% sPB pacijenata, a poređenjem ovih rezultata pokazano je postojanje statistički značajne razlike ( $p=0,006$ )<sup>160</sup>. Pretpostavljeno je da bi ovakav nalaz povećane učestalosti prekinutog signala iz raphe sistema mogao biti u vezi sa većom prevalencijom i težinom neuropsihijatrijskih i autonomnih poremećaja, što je u skladu sa prethodno objavljenim podacima. U našem ispitivanju je, takođe, utvrđena povećana prevalencija abnormalnog TKS signala iz raphe jedara kod onih PB pacijenata koji su heterozigotni nosioci mutacije u GBA genu (55,6%) u poređenju sa onima koji nemaju mutaciju u GBA genu (28,6%), međutim, ova razlika nije dosegla statističku značajnost, ali je bila u nivou trenda ( $p=0,0055$ ), verovatno zbog male grupe ispitanika uključenih u ovaj deo studije.

Hiperehogenost SN opisuje se i kod drugih autozomno-recesivnih i dominantnih genetskih formi PB, po obrascu sličnom onom koji se vidi kod sPB. Schweitzer i saradnici ispitivali su ukupno 14 PB

pacijenata sa različitim monogenetskim mutacijama (jedan pacijent sa mutacijom u  $\alpha$ -sinukleinu, dva sa *PARKIN* mutacijom, dva homozigota i jedan heterozigot za mutaciju *PINK1*, jedan pacijent sa *DJ-1* i sedam sa *LRRK2* mutacijom) i došli su do zaključka da se kod svih ovih pacijenata može ustanoviti veća hiperehogenost SN u poređenju sa zdravim kontrolama, ali manja u poređenju sa sPB<sup>329</sup>. Hagenah i saradnici ispitivali su PB pacijente i kontrole koji su nosioci dve, jedne ili nijedne mutacije u *PARKIN* genu<sup>330</sup>. U ovoj studiji je pokazano da je hiperehogenost SN slična kada se uporede pacijenti sa *PARKIN* udruženom PB i sPB pacijenti. Takođe je primećeno da je veća prosečna vrednost SN bila udružena sa većim brojem mutacija. Walter sa saradnicima takođe je ispitivao nosioce *PARKIN* mutacija i pokazao da je hiperehogenost SN prisutna kod svih onih ispitanika koji su imali PB, bez obzira na mutaciju i broj mutiranih alela<sup>331</sup>. Hiperehogenost SN je postojala i kod svih asimptomatskih nosilaca *PARKIN* mutacije koji su imali abnormalan nalaz na PET-u, ali i kod dva ispitanika sa urednim PET nalazom, što bi značilo da bi ovakav TKS nalaz mogao biti marker prekliničkog parkinsonizma<sup>331</sup>. Sledeće ispitivanje Hagenah i saradnika obuhvatilo je homozigotne i heterozigotne nosioce *PINK1* mutacije. Pokazano je da je TKS nalaz kod PB pacijenata nosilaca *PINK1* mutacije sličan nalazu kod drugih monogenetskih formi PB (*PARKIN* i *LRRK2*) i da se razlikovao od kontrolne grupe zdravih ispitanika<sup>332</sup>. Što se tiče *LRRK2* udružene PB, Berg i saradnici našli su umerenu hiperehogenost SN (0,19-0,24 cm<sup>2</sup>) bar na jednoj strani kod svih sem jednog od ispitivanih *LRRK2* PB pacijenata, a interesantno, nijedan ispitanik nije imao izraženu hiperehogenost SN koja se uobičajeno vidi kod 73-79% PB pacijenata<sup>333</sup>. Hedrich i saradnici opisuju hiperehogenost SN kod *LRRK2* PB pacijenta, ali i kod zdravog nosioca, ponovo ističući ulogu ovakvog TKS nalaza kod nosilaca u smislu detekcije subkliničkog parkinsonizma<sup>333</sup>. Bruggemann i saradnici ispitivali su TKS-om nosioce *LRRK2* G2019S mutacije od kojih je 34 imalo PB, 24 su bili asimptomatski nosioci mutacije i ove nalaze su uporedili sa TKS nalazom sPB pacijenata i zdravih kontrola<sup>334</sup>. Pokazano je da sve ispitivane grupe imaju veću hiperehogenost SN u poređenju sa zdravim kontrolama, da pacijenti sa *LRRK2* udruženom PB imaju veću hiperehogenost SN u poređenju sa asimptomatskim nosiocima mutacije, ali da se ne razlikuju od nalaza kod sPB.

Glavno ograničenje ovog dela naše studije odnosi se na broj pacijenata, a prednost je to što su genetski i klinički dobro definisani. Takođe, iako ispitivač koji je sprovodio TKS pregled nije bio upoznat sa kliničkim i genetskim podacima, tokom pregleda mogao je da opservira znake parkinsonizma kod ispitanika što bi potencijalno moglo da dovede do pristrasnosti. Napokon, kontrolna grupa je statistički značajno mlađa od GBA+PB+ i sPB grupe. Ipak, smatramo da su dobijeni rezultati adekvatni iz razloga što je pokazano da je prevalencija hiperehogenosti SN stabilna u različitim starosnim grupama zdravih kontrola<sup>335,336</sup>. Ehogeni znak se ne menja tokom vremena u populaciji zdravih odraslih od 59-79

godina<sup>337</sup>; kod PB pacijenta površina hiperehogenosti SN se ne menja vremenom i na nju ne utiče težina bolesti<sup>178</sup>. Mahlknecht i saradnici naglašavaju koncept da je povećana ehogenost SN vremenski nezavisan preklinički faktor rizika za PB<sup>337</sup>. PET studije su, ispitujući manji broj PB pacijenata koji su heterozigotni i kombinovani heterozigotni nosioci mutacija u *GBA* genu, pokazale da oni imaju presinaptički gubitak dopaminergičkih ćelija, nasuprot nezahvaćenim ili čak pojačanim postsinaptičkim delovima, što sve ukazuje na patofiziološku sličnost sa sPB<sup>325</sup>. U skladu sa tim su rezultati našeg ispitivanja TKS-om koji ukazuju da je nalaz kod PB udružene sa mutacijama u *GBA* genu značajno različit od nalaza kod zdravih kontrola, ali sličan onome kod sPB.

MR deo istraživanja je iskorišćen da se *in vivo* mapira obrazac atrofije sive mase mozga, kao i mikrostrukturne abnormalnosti mozga kod PB pacijenata nosilaca heterozigotne mutacije u *GBA* genu. Rezultati našeg istraživanja ukazuju da kod GBA+PB+ pacijenata postoji izmena signala bele mase, uključujući interhemisferične i frontalne kortiko-kortikalne veze, kao što su talamofrontalni traktovi koji prolaze kroz prednji krak capsule interne, cingulum i fasciculus longitudinalis superior. Ovi ispitanici, takođe, imaju abnormalnosti BM u levom parahipokampalnom traktu i u parijetalnom i okcipitalnom lobusu. *Post hoc* analiza traktova od interesa pokazala je da GBA+PB+ pacijenti u poređenju sa PB pacijentima bez *GBA* mutacije imaju smanjenu FA u corpus callosumu, olfaktornom traktu, prednjem kraku capsule internae, cingulumu, capsuli externi obostrano i levom fascikulusu longitudinalisu superior. Morfometrijom zasnovanom na vokselima nije pokazana značajna atrofija sive mase mozga kod GBA+PB+ ispitanika.

Promene BM nisu detektovane u grupi PB ispitanika bez *GBA* mutacije. Prethodne studije, koje su koristile metode analize celog mozga kod idiopatske PB dale su nekonzistentne rezultate<sup>183,185,186,338,339</sup>. Naime, rezultati nekih istraživanja pokazali su postojanje abnormalnog obrazca u interhemisferičnim, kortikospinalnim i kortiko-kortikalnim traktovima BM kod PB pacijenata koji nisu dementni i nalaze se u ranom ili srednjem stadijumu bolesti<sup>183,338,339</sup>, drugi su pokazali alteracije u BM samo kod ispitanika u kasnim stadijumima PB<sup>185</sup> ili kod PB pacijenata sa kognitivnim poremećajem<sup>186</sup>. Nekonzistentni nalazi u ovim studijama, moguće je da su posledica malog uzorka ispitanika, kao i njihova klinička heterogenost, a osim toga i različita metodologija korišćena za dobijanje (1,5-T vs. „high-field“ skeniranje; mali vs. veliki broj smerova gradijenta<sup>338</sup>) i merenje difuzije (TBSS vs. statističko parametarsko mapiranje). Mali broj pacijenata sa idiopatskom PB koji su uključeni u našu studiju su razlog što se rezultati studije ne mogu generalizovati. Ipak, ovi rezultati ukazuju da je količina alteracija

BM, ukoliko postoje kod ovih pacijenata, manja nego kod PB pacijenata heterozigotnih nosilaca mutacije u *GBA* genu koji su mečovani po demografskim i kliničkim karakteristikama.

U grupi GBA+PB+ pacijenata koji su učestvovali u ovom delu studije, 60% ispitanika je imalo demenciju ili kognitivni poremećaj, što je više nego što se sreće kod pacijenata sa idiopatskom PB<sup>77</sup>. Nažalost, dva pacijenta iz grupe GBA+PB+ su imali tešku demenciju i nisu bili u stanju da kompletiraju neuropsihološko testiranje, a kognitivno testiranje bilo je dostupno samo za devet PB pacijenata bez *GBA* mutacije. Iz tog razloga, iako nijedan od PB pacijenata iz grupe bez *GBA* mutacije nije imao dijagnozu demencije, srednje vrednosti kognitivnih skorova poređenjem ove dve PB grupe se nisu razlikovale. Zbog ovoga nije bilo moguće doneti specifičan zaključak o uticaju abnormalnosti BM na kognitivni status kod ispitanika GBA+PB+ grupe. Ipak, uočeno je da su vrednosti FA u telu i kolenu corpus callosuma, capsuli eksterni i olfaktornim traktovima bili u korelaciji sa verbalnom fluentnošću koja je pokazatelj egzekutivne funkcije. Abnormalnosti BM bi mogle biti važan patološki supstrat u nastanku kognitivnih i bihejvioralnih manifestacija PB<sup>185,186,338,340,341</sup>. Kod pacijenata sa idiopatskom PB, koji su u ranom stadijumu bolesti i bez kognitivnog deficita, suptilne alteracije BM, pronađene strukturnim i DT MR pregledom, su bile povezane sa egzekutivnim deficitom<sup>338,340</sup> i depresijom<sup>341</sup>. U studiji koja je uključila veliki broj pacijenata sa idiopatskom PB u različitim stadijumima bolesti, pronađeno je da su alteracije BM opsežnije što je PB teža i bile su udružene sa većim stepenom kognitivnog deficita<sup>185</sup>. Kod PB pacijenata sa blagim kognitivnim poremećajem (BKP), zahvaćenost corpus callosuma i glavnih kortiko-kortikalnih traktova je bilo u korelaciji sa MMSE skorovima<sup>186</sup>. Naši rezultati ispitivanja GBA+PB+ pacijenata pokazuju alteracije u BM, ali su potrebna dalja istraživanja na većem broju ispitanika da bi se razjasnilo da li su ove abnormalnosti BM, koje dovode do kortiko-kortikalne diskonekcije, jedan od supstrata povećane učestalosti kognitivnog deficita kod ovih pacijenata.

Do sada nema sličnih publikacija koje ispituju abnormalnosti bele i sive mase kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama. Na osnovu rezultata našeg istraživanja može se spekulirati da su promene BM kod ovih pacijenata posledica primarne patologije BM i/ili aksonske degeneracije udružene sa teškim oštećenjem kortikalnih neurona<sup>136,157</sup>. Patološke studije su pokazale postojanje ubikvitin-pozitivnih i  $\alpha$ -sinuklein-pozitivnih inkluzija koje se nalaze u aksonima pacijenata sa LT patologijom<sup>342</sup>. Takođe, postoje dokazi da u kortikalnim neuronima ovih pacijenata dolazi do akumulacije supstanci koje se transportuju duž aksona<sup>343</sup>, što može značiti da poremećaj aksonalnog transporta može biti u vezi sa PB. Napominjemo da MD abnormalnosti nisu pronađene kod GBA+PB+ pacijenata. Povećanje ekstracelularnog prostora, usled gubitka aksona i neurona, podstiče difuziju vode i dovodi do povećanja MD<sup>221</sup>. Stepent FA

zavisi od gustine membrane<sup>221</sup>. Intracelularne abnormalnosti u preživelim aksonima i formacija „novih“ barijera usled nastanka ćelijskog debris, inflamatornih infiltrata i glioze koje izotropično vrše restrikciju pokreta molekula vode, mogu takođe rezultovati u redukciji FA<sup>221</sup>. Zbog svega navedenog moglo bi se pretpostaviti da je uzrok ovog neslaganja između MD i FA promena prisustvo reaktivne glioze koja bi dovela do „pseudonormalizacije“ MD. Ipak, definisanje tačnog uzroka promena u MD i FA je teško bez patološke potvrde. Ne može se, takođe, isključiti da bi mali uzorak pacijenata, kao i tehničke karakteristike (tj. broj akvizicija  $b$  vrednosti<sup>338</sup>), mogao uticati na rezultate našeg istraživanja. Dalje, cerebrovaskularna patologija može uticati na uočene abnormalnosti BM<sup>344</sup>. U našem istraživanju, jedan pacijent GBA+PB+ grupe je imao malu količinu vaskularnih promena, ali kada se ovaj pacijent isključi iz analize, rezultati se ne menjaju. Težina hiperintenziteta BM nije bila u korelaciji sa DT MR metrikom niti sa kognitivnim varijablama. Sa druge strane, morfometrija zasnovana na vokselima pokazala je da GBA+PB+ pacijenti u poređenju sa kontrolama, ne pokazuju atrofiju sive mase. Iako se kod ovakvog nalaza ne može isključiti uloga sekundarne degeneracije kao uzroka uočenih promena u BM, naši rezultati govore u prilog većeg oštećenja bele nego sive mase kod GBA+PB+ pacijenata. Ranije studije koje su kao metodu ispitivanja koristile morfometriju zasnovanu na vokselima i pokazale regionalnu atrofiju sive mase kod pacijenata sa idiopatskom PB, nisu koristile korigovane nivoe statističke značajnosti<sup>187,345</sup>, dok one studije koje su koristile korekciju za kontrolu multiplih komparacija (family-wise error, FWE) nisu pokazale atrofiju sive mase<sup>185,346</sup>. Međutim, zapremina sive mase merena morfometrijom zasnovanom na vokselima je produkt debljine korteksa mozga, dok se razlike u volumenu sive mase dobijaju samo na osnovu kortikalne površine, a ne njene debljine<sup>347</sup>. Pokazano je da se metodom merenja kortikalne debljine može detektovati više strukturnih promena kod PB pacijenata nego metodom morfometrije zasnovane na vokselima<sup>346</sup>. Zbog toga bi bilo potrebno sprovesti studiju sa merenjem kortikalne debljine kod PB pacijenata sa heterozigotnim mutacijama u *GBA* genu u cilju *in vivo* prikazivanja distribucije difuzne kortikalne LT patologije, kao i da bi se utvrdio odnos promena u sivoj i belojoj masi kod ovih pacijenata.

Identifikacija specifičnih premotornih kliničkih i dijagnostičkih markera ima značajne implikacije, pre svega u omogućavanju primene potencijalnih eksperimentalnih terapijskih strategija u cilju neuroprotekcije kod veoma rane PB, tj. pre nego što nigralna i ekstranigralna neurodegeneracija dosegnu nivo kada intervencije ne bi imale kliničkog smisla<sup>348</sup>. Olfaktivna disfunkcija, poremećaj spavanja u REM fazi, postganglijska srčana simpatetička denervacija, poremećaj gastrointestinalnog motiliteta i neki nemotorni simptomi se mogu javiti pre motorne faze PB<sup>349</sup>. DaT-SPECT je senzitivniji metod za detekciju smanjenja strijarnog dopaminskog transportera u ranoj fazi PB i u stanju je da detektuje dopaminergički

deficit u premotornoj fazi oboljenja<sup>350</sup>. Transkranijalna parenhimska ehosonografija, takođe, ima ulogu u otkrivanju pacijenata u ovom stadijumu, što je pokazano i kod nekih monogenetskih formi PB, kao npr. kod nosilaca *PARKIN* mutacije<sup>331</sup>.

U dvogodišnjem periodu posmatranja zdravih nosilaca *GBA* mutacija pokazano je postojanje hiposmije kao najsenzitivnijeg prodromalnog markera. Osim toga, kognitivni poremećaj javljao se kao rani znak, a opisano je i postojanje RBD i depresije, kao i povećanje skora na UPDRS skali, što uzevši zajedno može ukazivati na kliničke prodrome PB<sup>320</sup>. Neki ispitanici sa *GBA* mutacijama (homozigotni i heterozigotni) mogu imati parkinsonske znake koji su nedovoljni za postavljanje kliničke dijagnoze PB i ovakav nalaz je bio nepromenjen u periodu praćenja od dve godine<sup>319,320</sup>. Mi smo takođe identifikovali dva ispitanika koji su heterozigotni nosioci *GBA* mutacija, kojima je neurološkim pregledom ustanovljen minimalan motorni parkinsoni deficit, koji nije progresivan u periodu praćenja od tri godine i koji je nedovoljan za postavljanje kliničke dijagnoze PB. Obzirom da su ova dva ispitanika imali pozitivne nalaze na transkranijalnoj parenhimskoj ehosonografiji i DaT-SPECT-u, smatramo da se oni nalaze u premotornoj fazi PB.

Iako su *GBA* mutacije značajan faktor rizika za nastanak PB, većina nosilaca ovih mutacija neće dobiti PB<sup>303</sup>. Ipak, smatramo da bi osobe koje imaju bližeg srodnika sa GB ili sa PB, posebno u slučaju postojanja napred navedenih kliničkih manifestacija koje se dovode u vezu sa premotornom fazom PB, bile ciljna grupa za predstojeća istraživanja i primenu potencijalne neuroprotektivne terapije. Otvara se i pitanje etičkih normi ovakve problematike, kao i pitanje potrebe za genetskim savetovanjem i potencijalnim intervencijama kod asimptomatskih osoba.

## 6. ZAKLJUČCI

### 1. O učestalosti *GBA* mutacije kod PB pacijenata

- 1.1. Genetskom analizom egzona 8-11 *GBA* gena kod svih ispitanika iz Srbije (PB pacijenata i kontrola), indentifikovane su promene koje obuhvataju mutacije, polimorfizme, tihe varijante i promene nepozatog značaja. Mutacije kod PB pacijenata detektovane su u homozigotnom i heterozigotnom stanju.
- 1.2. Mutacije u egzonima 8-11 utvrđene su kod 6,52% PB pacijenata i 1,36% ispitanika kontrolne grupe. Frekvencija *GBA* mutacija bila je statistički značajno češća kod PB pacijenata nego kod zdravih kontrola (OR=5,07; CI=1,99-12,92; p=0,00017).
- 1.3. Mutacije u *GBA* genu predstavljaju faktor rizika za nastanak PB u ispitivanoj populaciji iz Srbije.

### 2. O *GBA* genotipu u ispitivanom uzorku

- 2.1. Najčešće detektovana mutacija u našem uzorku je N370S i nalazi se u skoro 30% mutiranih alela (13/44). N370S mutacija nije pronađena u kontrolnoj grupi.
- 2.2. Skoro ¾ heterozigotnih nosilaca mutacija u PB grupi imalo je genotip N370S, D409H ili RecNcil.
- 2.3. Svi PB pacijenti nosioci D409H mutacije imali su duplo mutiran alel genotipa D409H/H255Q.
- 2.4. Po prvi put su detektovane dve nesinonimne varijante (D380V, N392S) kod pacijenata. Osim ovih detektovane su po prvi put i tri sinonimne promene (T369T, V398V, V459V).

### 3. O specifičnosti kliničkog ispoljavanja PB kod heterozigotnih i homozigotnih nosilaca mutacije u *GBA* genu i genotipsko-fenotipska korelacija

- 3.1. Prisustvo *GBA* mutacije nije uticalo na godine početka PB i polnu distribuciju obolelih. Nosioci „teških“ mutacija imali su raniji početak PB u odnosu na nosioce „lakih“ mutacija.
- 3.2. Pozitivna porodična anamneza za PB je postojala kod sličnog broja PB pacijenata, nezavisno od *GBA* statusa.

- 3.3. Najčešći inicijalni simptom PB kod nosilaca *GBA* mutacije je jedan od kardinalnih znakova bolesti: tremor, bradikinezija ili rigiditet. Učestalost inicijalnih znakova bolesti javlja se sa sličnom učestalošću kod nosilaca *GBA* mutacija kao i kod PB pacijenata bez *GBA* mutacija. Bol se retko javlja kao inicijalni simptom PB, ali statistički značajno češće kod nosilaca *GBA* mutacija i tada je najčešće lokalizovan u ramenu.
- 3.4. Kod homozigotnih nosilaca mutacija, PB se može javiti pre nastanka simptoma Gošeeve bolesti.
- 3.5. U trenutku pregleda, najveći broj pacijenata imao je asimetričan parkinsonizam nezavisno od *GBA* statusa. Prisustvo mutacije u *GBA* genu nije uticalo na stepen motornog deficita, meren UPDRS i H&Y skalom.
- 3.6. Diskinezije su značajno češće prisutne kod PB pacijenata koji su nosioci *GBA* mutacija. Rezultati studije preseka ukazuju na češće prisustvo frizinga hoda kod PB pacijenata sa *GBA* mutacijama. Ovaj nalaz nije potvrđen u studiji slučajeva i kontrola i zahteva dalje ispitivanje.
- 3.7. Ispitivanjem kognitivnih funkcija uočeno je da PB pacijenti sa *GBA* mutacijama češće imaju kognitivni deficit, ali bez statistički značajne razlike u poređenju sa PB pacijentima bez *GBA* mutacija. Trend statističke značajnosti postojao je za subskor za jezik Adenbruksove skale, a značajna razlika pokazana je na Bostonskom testu nominacije, na štetu nosilaca *GBA* mutacija.
- 3.8. *GBA* genotip nije uticao na učestalost prisustva halucinacija i apatije. Ispitivanje prisustva depresije i anksioznosti ostaje nekonkluzivno obzirom da su korišćenjem različitih skala dobijeni oprečni rezultati. Skorovi na ispitivanim skalama su bili veći u grupi nosilaca *GBA* mutacija, međutim, ovi skorovi su ispod graničnih vrednosti koje ukazuju na postojanje ispitivanog psihijatrijskog poremećaja, pa se navedeni nalazi moraju interpretirati sa oprezom.
- 3.9. PB pacijenti nosioci *GBA* mutacija nisu se razlikovali po profilu ispitivanih nemotornih simptoma od PB pacijenata bez *GBA* mutacija, sem za preteranu dnevnu pospanost i gubitak interesovanja koji su bila češći u grupi sa *GBA* mutacijom.
- 3.10. Najveći broj ispitivanih PB pacijenata imao je odličan odgovor na terapiju L-dopom, nezavisno od prisustva i „težine“ *GBA* mutacije.



#### **4. O karakteristikama nalaza neuroimidžing ispitivanja (TKS, MR, DaT-SPECT) pacijenata i zdravih nosilaca mutacija u *GBA* genu**

- 4.1. aSNmax vrednost na TKS ispitivanju PB pacijenata koji su homozigotni i heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu slična je onoj u PB grupi bez mutacije. Prevalencija prekinutog rafe jedra značajno se razlikovala u ispitivanim grupama, dok razlika nije postojala u dijametru treće komore.
- 4.2. TCS nalaz kod PB udružene sa *GBA* mutacijama konzistentan je sa TCS nalazom kod sPB.
- 4.3. MR ispitivanje ukazuje da PB pacijenti koji su nosioci mutacija u *GBA* genu imaju poremećen obrazac interhemisferičnih, kortiko-kortikalnih i parahipokampalnih traktova bele mase. Ispitivanje sive mase nije ukazalo na postojanje razlike kada se uporede PB pacijenti i kontrole.

#### **5. O detekciji prekliničke PB kod zdravih heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacije**

- 5.1. U perspektivi potencijalnog budućeg postojanja neuroprotektivne terapije u prekliničkoj ili ranoj fazi PB, mišljenja smo da su GB pacijenti i njihovi srodnici kandidati za klinički i imidžing (TKS i DaT-SPECT) skrining u cilju utvrđivanja prekliničke faze PB, obzirom na poznate rizike za PB kod homozigotnih i heterozigotnih nosilaca *GBA* mutacija.

#### **6. Opšti zaključak**

- 6.1. Imajući u vidu sve napred iznete činjenice koje ukazuju na postojanje kliničke sličnosti *GBA*-PB i sPB, smatramo da je PB koja je u vezi sa mutacijama u *GBA* genu odličan model za patofiziološka istraživanja u oblasti Parkinsonove bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(R1):R48-59.
2. Braak H, Rüb U, Gai WP, Del Tredici K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J. Neural Transm.* 2003; 110(5):517-36.
3. Forno L. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; 55(3):259-72
4. Parkinson J. An essay on the shaking palsy. Sherwood, Neely, and Jones, 1817.
5. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(7):492-501.
6. Holdorff, B. Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci.* 2002; 11(1):19-28.
7. Duffy P, Tennyson V. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1965; 24:398-414.
8. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997; 388(6645):839-40.
9. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A wet al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997; 276(5321):2045-7.
10. Kumar KR, Lohmann K, Klein C. Genetics of Parkinson disease and other movement disorders. *Curr Opin Neurol.* 2012; 25(4):466-74.
11. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease. *Lancet.* 2009; 373(9680):2055-66.
12. Rogaeva E, Hardy J. Gaucher and Parkinson diseases: unexpectedly related. *Neurology.* 2008; 70(24):2272-3
13. Elstein D, Abrahamov A, Hadas-Halpern I, Zimran A. Gaucher's disease. *Lancet.* 2001; 358(9278):324-7.
14. Neudorfer O, Giladi N, Elstein D, Abrahamov A, Turezkite T, Aghai E et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type 1 Gaucher disease. *QJM.* 1996; 89(9):691-4.
15. Machaczka M, Rucinska M, Skotnicki AB, Jurczak W. Parkinson's syndrome preceding clinical manifestation of Gaucher's disease. *Am J Hematol.* 1999; 61(3):216-7.
16. Guimarães J, Amaral O, Sá Miranda MC. Adult-onset neuronopathic form of Gaucher's disease: a case report. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003; 9(5):261-4.
17. Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab.* 2004; 81(1):70-3.
18. Aharon-Peretz J, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 2004; 351(19):1972-7.
19. Halperin A, Elstein D, Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36(3):426-8.
20. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2009; 361(17):1651-61.

21. Nalls MA, Duran R, Lopez G, Kurzawa-Akanbi M, McKeith IG, Chinnery PF et al. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol.* 2013; 70(6):727-35.
22. Segarane B, Li A, Paudel R, Scholz S, Neumann J, Lees A et al. Glucocerebrosidase mutations in 108 neuropathologically confirmed cases of multiple system atrophy. *Neurology.* 2009; 72(13):1185-6.
23. Shachar T, Lo Bianco C, Recchia A, Wiessner C, Raas-Rothschild A, Futerman AH. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov Disord.* 2011; 26(9):1593-604.
24. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999; 281(3):249-54.
25. Grabowski, G. A. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 2008; 372(9645):1263-71.
26. Horowitz M, Pasmanik-Chor M, Borochowitz Z, Falik-Zaccai T, Heldmann K, Carmi R et al. Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Hum Mutat.* 1998;12(4):240-4.
27. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 2005; 128(4):413-31.
28. Barneveld RA, Keijzer W, Tegelaers FP, Ginns EI, Geurts van Kessel A, Brady RO et al. Assignment of the gene coding for human beta-glucocerebrosidase to the region q21-q31 of chromosome 1 using monoclonal antibodies. *Hum Genet.* 1983; 64(3):227-31.
29. Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, Reiner O, Gelbart T, Beutler E et al. The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics.* 1989; 4(1):87-96.
30. Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 2008; 29(5):567-83.
31. Tsuji S, Choudary PV, Martin BM, Stubblefield BK, Mayor JA, Barranger JA et al. A mutation in the human glucocerebrosidase gene in neuronopathic Gaucher's disease. *N Engl J Med.* 1987; 316(10):570-5.
32. Tsuji S, Martin BM, Barranger JA, Stubblefield BK, LaMarca ME, Ginns EI. Genetic heterogeneity in type 1 Gaucher disease: multiple genotypes in Ashkenazic and non-Ashkenazic individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(7):2349-52.
33. Liou B, Kazimierczuk A, Zhang M, Scott CR, Hegde RS, Grabowski GA. Analyses of variant acid beta-glucosidases: effects of Gaucher disease mutations. *J Biol Chem* 2006; 281(7):4242-53.
34. Pàmols T, Pineda M, Girós ML, Ferrer I, Cusi V, Chabás A. Neuronopathic juvenile glucosylceramidosis due to sap-C deficiency: clinical course, neuropathology and brain lipid composition in this Gaucher disease variant. *Acta Neuropathol.* 1999; 97(1):91-7.
35. Guggenbuhl P, Grosbois B, Chalès G. Gaucher disease. *Joint Bone Spine.* 2008;75(2):116-24.
36. Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a 'simple' disorder. *Mol Genet Metab.* 2004; 83(1-2):6-15.
37. Stirnemann J, Vigan M, Hamroun D, Heraoui D, Rossi-Semerano L, Berger MG et al. The French Gaucher's disease registry: clinical characteristics, complications and treatment of 562 patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2012; 7:77.

38. Kerem E, Elstein D, Abrahamov A, Bar Ziv Y, Hadas-Halpern I, Melzer E. Pulmonary function abnormalities in type I Gaucher disease. *Eur Respir J*. 1996; 9(2):340-5.
39. Rosenbloom BE, Weinreb NJ, Zimran A, Kacena KA, Charrow J, Ward E. Gaucher disease and cancer incidence : a study from the Gaucher Registry. *Blood*. 2005; 105(12):4569-72.
40. Weinreb NJ, Deegan P, Kacena KA, Mistry P, Pastores GM, Velentgas P et al. Life expectancy in Gaucher disease type 1. *Am J Hematol*. 2008;83(12):896-900.
41. Mignot C, Doummar D, Maire I, De Villemeur TB; 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.
42. Gupta N, Oppenheim IM, Kauvar EF, Tayebi N, Sidransky E. Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood Cells. Mol Dis*. 2011; 46(1):75-84.
43. Schiffmann R, Fitzgibbon EJ, Harris C, DeVile C, Davies EH, Abel L et al. Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Ann Neurol*. 2008; 64(5):514-22.
44. Chérin P, Rose C, de Roux-Serratrice C, Tardy D, Dobbelaere D, Grosbois B et al. The neurological manifestations of Gaucher disease type 1: the French Observatoire on Gaucher disease (FROG). *J Inherit Meta Dis*. 2010; 33(4):331-8.
45. Amato D, Stachiw T, Clarke JT, Rivard GE. Gaucher disease: variability in phenotype among siblings. *J Inherit Metab Dis*. 2004; 27(5):659-69.
46. Lachmann RH1, Grant IR, Halsall D, Cox TM. Twin pairs showing discordance of phenotype in adult Gaucher's disease. *QJM*. 2004; 97(4):199-204.
47. Stone DL, Tayebi N, Orvisky E, Stubblefield B, Madike V, Sidransky E. Glucocerebrosidase gene mutations in patients with type 2 Gaucher disease. *Hum Mutat*. 2000; 15(2):181-8.
48. Kowarz L, Goker-Alpan O, Banerjee-Basu S, LaMarca ME, Kinlaw L, Schiffmann R et al. Gaucher mutation N188S is associated with myoclonic epilepsy. *Hum Mutat*. 2005; 26(3):271-3.
49. Koprivica V, Stone DL, Park JK, Callahan M, Frisch A, Cohen IJ et al. Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease. *Am J Hum Genet*. 2000; 66(6):1777-86.
50. Beutler E, Gelbart T, Scott CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 35:355-64.
51. de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meché FG et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: The Rotterdam Study. *Neurology*. 1995; 45(12):2143-6.
52. Katzenschlager R, Head J, Schrag A, Ben-Shlomo Y, Evans A, Lees AJ et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*. 2008; 71(7):474-80.
53. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res*. 2001;86(2):122-7.
54. Riley D, Lang AE, Blair RD, Birnbaum A, Reid B. Frozen shoulder and other shoulder disturbances in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1989; 52(1):63-6.
55. Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(4):368-76.
56. Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ. A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 1993 ;50(2):140-8

57. Berardelli A, Rothwell JC, Thompson PD, Hallett M. Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. *Brain*. 2001; 124(Pt 11):2131-46.
58. Bloem BR, Hausdorff JM, Visser JE, Giladi N. Falls and freezing of gait in Parkinson's disease: a review of two interconnected, episodic phenomena. *Mov Disord*. 2004;19(8):871-84.
59. Giladi N, McDermott MP, Fahn S, Przedborski S, Jankovic J, Stern M et al. Freezing of gait in PD: Prospective assessment in the DATATOP cohort. *Neurology*. 2001; 56(12):1712-21.
60. Giladi N, McMahon D, Przedborski S, Flaster E, Guillory S, Kostic V et al. Motor blocks in Parkinson's disease. *Neurology*. 1992; 42(2):333-9.
61. Macht M, Kausner Y, Möller JC, Stiasny-Kolster K, Eggert KM, Krüger HP et al. Predictors of freezing in Parkinson's disease: a survey of 6,620 patients. *Mov Disord*. 2007; 22(7):953-6.
62. Jankovic J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov Disord*. 2005; 20 Suppl 11:S11-6.
63. Fox SH, Lang AE. Levodopa-related motor complications- phenomenology. *Mov Disord*. 2008; 23 Suppl 3:S509-14.
64. Rajput AH, Fenton ME, Birdi S, Macaulay R, George D, Rozdilsky B et al. Clinical-pathological study of levodopa complications. *Mov Disord*. 2002; 17(2):289-96.
65. Ahlskog JE, Muenter MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord*. 2001; 16(3):448-58.
66. Kostic V, Przedborski S, Flaster E, Sternic N. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. *Neurology*. 1991; 41(2 ( Pt 1)):202-5.
67. Kostić VS, Marinković J, Svetel M, Stefanova E, Przedborski S. The effect of stage of Parkinson's disease at the onset of levodopa therapy on development of motor complications. *Eur J Neurol*. 2002; 9(1):9-14.
68. Shulman LM, Taback RL, Bean J, Weiner WJ. Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2001; 16(3):507-10.
69. Barone P, Antonini A, Colosimo C, Marconi R, Morgante L, Avarello TP et al. The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009; 24(11):1641-9
70. Simuni T, Sethi K. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2008; 64 Suppl 2:S65-80.
71. Slaughter JR, Slaughter KA, Nichols D, Holmes SE, Martens MP. Prevalence, clinical manifestations, etiology and treatment of depression in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2001; 13(2):187-96
72. Global Parkinson's Disease Survey Steering Committee. Factors impacting on quality of life in Parkinson's disease: results from an international survey. *Mov Disord*. 2002; 17(1):60-7.
73. Ziropadja L, Stefanova E, Petrovic M, Stojkovic T, Kostic VS. Apathy and depression in Parkinson's disease: the Belgrade PD study report. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18(4):339-42.
74. Pontone GM, Williams JR, Anderson KE, Chase G, Goldstein SA, Grill S et al. Prevalence of anxiety disorders and anxiety subtypes in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2009; 24(9):1333-8.

75. Goetz CG, Emre M, Dubois B. Parkinson's disease dementia: definitions, guidelines, and research perspectives in diagnosis. *Ann Neurol.* 2008; 64 Suppl 2:S81-92.
76. Barton B, Grabli D, Bernard B, Czernecki V, Goldman JG, Stebbins G et al. Clinical validation of Movement Disorder Society-recommended diagnostic criteria for Parkinson's disease with dementia. *Mov Disord.* 2012; 27(2):248-53.
77. Aarsland D, Zaccai J, Brayne C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005; 20(10):1255-63.
78. Fénelon G, Mahieux F, Huon R, Ziégler M. Hallucinations in Parkinson's disease: prevalence, phenomenology and risk factors. *Brain.* 2000; 123 (Pt 4):733-45.
79. Svetel M, Smiljković T, Pekmezović T, Kostić V. Hallucinations in Parkinson's disease: cross-sectional study. *Acta Neurol Belg.* 2012; 112(1):33-7.
80. Weintraub D, Koester J, Potenza MN, Siderowf AD, Stacy M, Voon V et al. Impulse control disorders in Parkinson disease: a cross-sectional study of 3090 patients. *Arch Neurol.* 2010; 67(5):589-95.
81. Miyasaki JM, Al Hassan K, Lang AE, Voon V. Punding prevalence in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007; 22(8):1179-81.
82. Tandberg E, Larsen JP, Karlsen KA. Community-Based Study of Sleep Disorders in Patients With Parkinson's Disease. *Mov Disord.* 1998; 13(6):895-9.
83. Palma J, Kaufmann H. Autonomic disorders predicting Parkinson disease. *Park Relat Disord.* 2014;20 Suppl 1:S94-8.
84. Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C. A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death. *Neurobiol Aging.* 2010; 31(1):99-103.
85. Del Tredici K, Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012; 27(5):597-607.
86. DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA et al. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008; 65(8):1074-80.
87. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Nurobiol Aging.* 2003; 24(2):197-211.
88. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science.* 2002; 296(5575):1991-5.
89. Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* 2006; 443(7113):780-6.
90. Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res.* 1999; 58(1):120-9.
91. Lavedan C. The Synuclein Family. *Genome Res.* 1998; 8:871-880.
92. Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem.* 1998; 273:9443-9449.
93. Jenco JM, Rawlinsong A, Daniels B, Morris AJ. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase. *Biochemistry* 1998; 37:4901-4909.
94. Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL. Synucleins are a novel class of substrates for G

- protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem.* 2000; 275 (34):26515–22.
95. Engelender S, Kaminsky Z, Guo X, Sharp AH, Amaravi RK, Kleiderlein JJ et al. Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet.* 1999; 22(1):110-4.
  96. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R et al. Collaborative Analysis of  $\alpha$ -Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease. *JAMA.* 2006; 296(6):661-70.
  97. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron.* 2000; 25(1):239-52.
  98. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of  $\alpha$ -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2011; 10(11):1015-25.
  99. Trojanowski JQ, Lee VM. Aggregation of neurofilament and  $\alpha$ -synuclein proteins in Lewy Bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia. *Arch Neurol.* 1998; 55(2):151-2.
  100. Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(2):571-6..
  101. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 2001; 294(5545):1346-9.
  102. Xilouri M, Stefanis L. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert Rev Mol Med.* 2011; 13:e8.
  103. Ciechanover, A. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology.* 2006; 66 (2 Suppl 1):S7-19.
  104. McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2003; 179(1):38-46.
  105. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 1998; 392(6676):605-8.
  106. Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology.* 1998; 51(3):890-2.
  107. Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007; 6(7):652-62.
  108. Valente EM, Ferraris A. Heterozygous mutations in genes causing parkinsonism: monogenic disorders go complex. *Lancet Neurol.* 2007; 6(7):576-8.
  109. Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 1998; 395(6701):451-2.
  110. Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect  $\alpha$ -synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell.* 2002; 111(2):209-18.

111. Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2008; 283(35):23731-8.
112. Hollenbeck PJ. Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol.* 1993; 121(2):305-15.
113. Jung CH1, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 2010; 584(7):1287-95.
114. He C, Klionsky D. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009; 43:67-93.
115. Bjørkøy G, Lamark T, Johansen T. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy.* 2006; 2(2):138-9.
116. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 2006; 441(7095):885-9.
117. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006; 441(7095):880-4.
118. Cuervo AM, Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem.* 2000; 275(40):31505-13.
119. Zhu J, Guo F, Shelburne J, Watkins S, Chu C. Localization of phosphorylated ERK/MAP kinases to mitochondria and autophagosomes in Lewy body diseases. *Brain Pathol.* 2003; 13(4):473-81.
120. Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, Perier C, Recasens A, Boya P et al. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2010; 30(37):12535-44.
121. Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, Olanow CW, Kordower JH. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol Dis.* 2009; 35(3):385-98.
122. Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem.* 2008; 283(35):23542-56.
123. Westbroek W, Gustafson AM, Sidransky E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Trends Mol Med.* 2011; 17(9):485-93.
124. Gasser T. Molecular pathogenesis of Parkinson disease: insights from genetic studies. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11:e22.
125. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 2008; 183(5):795-803.
126. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010; 8(1):e1000298.
127. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science.* 2004; 305(5688):1292-5.
128. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Kaushik S, Massey AC, Mazzulli J, Mosharov EV et al. Dopamine-modified  $\alpha$ -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J Clin Invest.* 2008; 118(2):777-88.
129. Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA et al.  $\alpha$ -



- Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol.* 2010; 190(6):1023-37..
130. Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, Stefanis L. Alpha-synuclein degradation by autophagic pathways: a potential key to Parkinson's disease pathogenesis. *Autophagy.* 2008; 4(7):917-9.
  131. Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet.* 2006; 38(10):1184-91.
  132. Di Fonzo A, Chien HF, Social M, Giraudo S, Tassorelli C, Iliceto G et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68(19):1557-62.
  133. Bultron G, Kacena K, Pearson D, Boxer M, Yang R, Sathe S et al. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33(2):167-73.
  134. Sidransky E, Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012; 11(11):986-98.
  135. Cullen V, Sardi SP, Ng J, Xu YH, Sun Y, Tomlinson JJ et al. Acid  $\beta$ -glucosidase mutants linked to Gaucher disease, Parkinson disease, and Lewy body dementia alter  $\alpha$ -synuclein processing. *Ann Neurol.* 2011; 69(6):940-53.
  136. Goker-Alpan O, Stubblefield BK, Giasson BI, Sidransky E. Glucocerebrosidase is present in  $\alpha$ -synuclein inclusions in Lewy body disorders. *Acta Neuropathol.* 2010; 120(5):641-9.
  137. Gan-Or Z, Giladi N, Orr-Urtreger A. Differential phenotype in Parkinson's disease patients with severe versus mild GBA mutations. *Brain.* 2009; 132(Pt 10):e125.
  138. Vembar S, Brodsky J. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9(12):944-57.
  139. Ron I, Rapaport D, Horowitz M. Interaction between parkin and mutant glucocerebrosidase variants: a possible link between Parkinson disease and Gaucher disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19:3771-81.
  140. Osellame LD, Duchen MR. Defective quality control mechanisms and accumulation of damaged mitochondria link Gaucher and Parkinson diseases. *Autophagy.* 2013; 9(10):1633-5.
  141. Goldin E. Gaucher disease and parkinsonism, a molecular link theory. *Mol Genet Metab.* 2010; 101(4):307-10.
  142. Manning-Boğ AB, Schüle B, Langston JW. Alpha-synuclein-glucocerebrosidase interactions in pharmacological Gaucher models: a biological link between Gaucher disease and parkinsonism. *Neurotoxicology.* 2009; 30(6):1127-32.
  143. Pelled D, Trajkovic-Bodennec S, Lloyd-Evans E, Sidransky E, Schiffmann R, Futerman AH. Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiol Dis.* 2005; 18(1):83-8.
  144. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased  $\alpha$ -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain.* 2014; 137(Pt 3):834-48.
  145. Rothaug M, Zunke F, Mazzulli JR, Schweizer M, Altmepfen H, Lüllmann-Rauch R et al. LIMP-2 expression is critical for beta-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(43):15573-8.

146. Rosenbloom B, Balwani M, Bronstein JM, Kolodny E, Sathe S, Gwosdow AR et al. The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: data from the ICGG Gaucher Registry. *Blood Cells Mol Dis.* 2011; 46(1):95-102.
147. Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, Sakanaka K, Levy O, Waters C et al. Comparison of Parkinson Risk in Ashkenazi Jewish Patients With Gaucher Disease and GBA Heterozygotes. *JAMA Neurol.* 2014; 71(6):752-7.
148. Anheim M, Elbaz A, Lesage S, Durr A, Condroyer C, Viallet F et al. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology.* 2012; 78(6):417-20.
149. Biegstraaten M, van Schaik IN, Aerts JM, Hollak CE. 'Non-neuronopathic' Gaucher disease reconsidered. Prevalence of neurological manifestations in a Dutch cohort of type I Gaucher disease patients and a systematic review of the literature. *J Inher Metab Dis.* 2008; 31(3):337-49.
150. Kraoua I, Stirnemann J, Ribeiro MJ, Rouaud T, Verin M, Annic A et al. Parkinsonism in Gaucher's disease type 1: ten new cases and a review of the literature. *Mov Disord.* 2009; 24(10):1524-30.
151. Saunders-Pullman R, Hagenah J, Dhawan V, Stanley K, Pastores G, Sathe S et al. Gaucher Disease Ascertained through a Parkinson's Center: Imaging and Clinical Characterization. *Mov Disord.* 2010; 25(10):1364-72.
152. Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M et al. Gaucher's disease with Parkinson's disease: Clinical and pathological aspects. *Neurology.* 2003; 61(1):99-101.
153. Alonso-Canovas A, Katschnig P, Tucci A, Carecchio M, Wood NW, Edwards M et al. Atypical parkinsonism with apraxia and supranuclear gaze abnormalities in type 1 Gaucher disease. Expanding the spectrum: case report and literature review. *Mov Disord.* 2010; 25(10):1506-9.
154. Machaczka M, Arce MP, Rucinska M, Yoshitake T, Kehr J, Jurczak W et al. A twelve-year follow-up study on a case of early-onset parkinsonism preceding clinical manifestation of Gaucher disease. *JIMD Rep.* 2012; 3:53-7.
155. Goker-Alpan O, Sidransky E. Treating patients with Gaucher disease and parkinsonism: misrepresentation in a title. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008; 14(1):81-2; author reply 83.
156. Hughes DA, Ginsberg L, Baker R, Goodwin S, Milligan A, Richfield L et al. Effective treatment of an elderly patient with Gaucher's disease and Parkinsonism: a case report of 24 months' oral substrate reduction therapy with miglustat. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007; 13(6):365-8.
157. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132(Pt 7):1783-94.
158. Setó-Salvia N, Pagonabarraga J, Houlden H, Pascual-Sedano B, Dols-Icardo O, Tucci A et al. Glucocerebrosidase Mutations Confer a Greater Risk of Dementia during Parkinson's Disease Course. *Mov Disord.* 2012; 27(3):393-9.
159. Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology.* 2007; 69(12):1270-7.
160. Brockmann K, Srulijes K, Hauser AK, Schulte C, Csoti I, Gasser T et al. GBA-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology.* 2011; 77(3):276-80.
161. Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, Mason SL, Williams-Gray CH, Foltynie T et al.

- Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain*. 2013; 136(Pt 2):392-9.
162. Lesage S, Anheim M, Condroyer C, Pollak P, Durif F, Dupuits C et al. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*. 2011; 20(1):202-10.
  163. Wong K, Sidransky E, Verma A, Mixon T, Sandberg GD, Wakefield LK et al. Neuropathology provides clues to the pathophysiology of Gaucher disease. *Mol Genet Metab* 2004; 82(3):192-207.
  164. Nishioka K, Ross OA, Vilariño-Güell C, Cobb SA, Kachergus JM, Mann DM et al. Glucocerebrosidase mutations in diffuse Lewy body disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011; 17(1):55-7.
  165. Parkkinen L, Neumann J, O'Sullivan SS, Holton JL, Revesz T, Hardy J et al. Glucocerebrosidase mutations do not cause increased Lewy body pathology in Parkinson's disease. *Mol Genet Metab*. 2011 ; 103(4):410-2.
  166. Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol* 2008; 7(11):1044-55.
  167. Walter U, Behnke S, Eyding J, Niehaus L, Postert T, Seidel G et al. Transcranial brain parenchyma sonography in movement disorders: state of the art. *Ultrasound Med Biol*. 2007; 33(1):15-25.
  168. Becker G, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K. Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology*. 1995; 45(1):182-4.
  169. Mijajlović M, Petrović I, Stojković T, Svetel M, Stefanova E, Kostić VS. Transcranial parenchymal sonography in the diagnosis of Parkinson's disease. *Vojnosanit Pregl*. 2008; 65(8):601-5.
  170. Berg D, Roggendorf W, Schröder U, Klein R, Tatschner T, Benz P et al. Echogenicity of the substantia nigra: association with increased iron content and marker for susceptibility to nigrostriatal injury. *Arch Neurol*. 2002; 59(6):999-1005.
  171. Walter U, Dressler D, Wolters A, Wittstock M, Benecke R. Transcranial brain sonography findings in clinical subgroups of idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2007; 22(1):48-54.
  172. Lobsien E, Schreiner S, Plotkin M, Kupsch A, Schreiber SJ, Doepp F. No correlation of substantia nigra echogenicity and nigrostriatal degradation in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(3):450-3.
  173. Berg D, Godau J, Riederer P, Gerlach M, Arzberger T. Microglia activation is related to substantia nigra echogenicity. *J Neural Transm*. 2010; 117(11):1287-92..
  174. Sian-Hülsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2011; 118(6):939-57.
  175. Prestel J, Schweitzer KJ, Hofer A, Gasser T, Berg D. Predictive value of transcranial sonography in the diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006; 21(10):1763-5.
  176. Gaenslen A, Unmuth B, Godau J, Liepelt I, Di Santo A, Schweitzer KJ et al. The specificity and sensitivity of transcranial ultrasound in the differential diagnosis of Parkinson's disease: a prospective blinded study. *Lancet Neurol*. 2008; 7(5):417-24.
  177. Berg D, Siefker C, Becker G. Echogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease and its relation to clinical findings. *J Neurol*. 2001; 248(8):684-9.

178. Berg D, Merz B, Reiners K, Naumann M, Becker G. Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2005; 20(3):383-5.
179. Walter U, Skoloudik D, Berg D. Transcranial sonography findings related to non-motor features of Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2010; 289(1-2):123-7.
180. Baglieri A, Marino MA, Morabito R, Di Lorenzo G, Bramanti P, Marino S. Differences between conventional and non-conventional MRI techniques in Parkinson's disease. *Funct Neurol* 2013; 28(2):73-82.
181. Hess CW, Ofori E, Akbar U, Okun MS, Vaillancourt DE. The evolving role of diffusion magnetic resonance imaging in movement disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2013; 13(11):400.
182. Cochrane CJ, Ebmeier KP. Diffusion tensor imaging in parkinsonian syndromes: a systematic review and meta-analysis. *Neurology.* 2013; 80(9):857-64.
183. Karagulle Kendi AT, Lehericy S, Luciana M, Ugurbil K, Tuite P. Altered diffusion in the frontal lobe in Parkinson disease. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008; 29(3):501-5.
184. Gattellaro G, Minati L, Grisoli M, Mariani C, Carella F, Osio M et al. White matter involvement in idiopathic Parkinson disease: a diffusion tensor imaging study. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2009; 30(6):1222-6.
185. Agosta F, Canu E, Stojković T, Pievani M, Tomić A, Sarro L et al. The topography of brain damage at different stages of Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp.* 2013; 34(11):2798-807.
186. Hattori T, Orimo S, Aoki S, Ito K, Abe O, Amano A et al. Cognitive status correlates with white matter alteration in Parkinson's disease. *Hum Brain Mapp.* 2012; 33(3):727-39.
187. Whitwell JL, Josephs KA. Voxel-based morphometry and its application to movement disorders. *Parkinsonism Relat Disord.* 2007;13 Suppl 3:S406-16.
188. Kassubek J, Juengling FD, Hellwig B, Spreer J, Lücking CH. Thalamic gray matter changes in unilateral Parkinsonian resting tremor: a voxel-based morphometric analysis of 3-dimensional magnetic resonance imaging. *Neurosci Lett.* 2002; 323(1):29-32.
189. Janzen J, van 't Ent D, Lemstra AW, Berendse HW, Barkhof F, Foncke EM. The pedunculopontine nucleus is related to visual hallucinations in Parkinson's disease: preliminary results of a voxel-based morphometry study. *J Neurol.* 2012; 259(1):147-54.
190. Ramírez-Ruiz B, Martí MJ, Tolosa E, Giménez M, Bargalló N, Valldeoriola F et al. Cerebral atrophy in Parkinson's disease patients with visual hallucinations. *Eur J Neurol.* 2007; 14(7):750-6.
191. Melzer TR, Watts R, MacAskill MR, Pitcher TL, Livingston L, Keenan RJ et al. Grey matter atrophy in cognitively impaired Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012; 83(2):188-94.
192. Kostic VS, Agosta F, Pievani M, Stefanova E, Jecmenica-Lukic M, Scarale A et al. Pattern of brain tissue loss associated with freezing of gait in Parkinson disease. *Neurology.* 2012; 78(6):409-16.
193. Booth TC, Nathan M, Waldman AD, Quigley AM, Schapira AH, Buscombe J et al. The role of functional dopamine-transporter SPECT imaging in parkinsonian syndromes, part 1. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015; 36(2):229-35.
194. Poewe W, Scherfler C. Role of dopamine transporter imaging in investigation of parkinsonian syndromes in routine clinical practice. *Mov Disord.* 2003; 18 Suppl 7:S16-21.
195. Scherfler C, Schwarz J, Antonini A, Grosset D, Valldeoriola F, Marek K et al. Role of DAT-SPECT in the Diagnostic Work Up of Parkinsonism. *Mov Disord.* 2007; 22(9):1229-38.

196. Vlaar AM, van Kroonenburgh MJ, Kessels AG, Weber WE. Meta-analysis of the literature on diagnostic accuracy of SPECT in parkinsonian syndromes. *BMC Neurol.* 2007; 7:27.
197. Marek KL, Seibyl JP, Zoghbi SS, Zea-Ponce Y, Baldwin RM, Fussell B et al. [123 I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. *Neurology.* 1996; 46(1):231-7.
198. Stiasny-Kolster K, Doerr Y, Möller JC, Höffken H, Behr TM, Oertel WH et al. Combination of 'idiopathic' REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. *Brain.* 2005; 128(Pt 1):126-37.
199. Sommer U, Hummel T, Cormann K, Mueller A, Frasnelli J, Kropp J et al. Detection of presymptomatic Parkinson's disease: combining smell tests, transcranial sonography, and SPECT. *Mov Disord.* 2004; 19(10):1196-202.
200. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees A J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *JNeurol Neurosurg Psychiatry.* 1992; 55(3):181-4.
201. Tomlinson CL, Stowe R, Patel S, Rick C, Gray R, Clarke CE et al. Systematic review of levodopa dose equivalency reporting in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010; 25(15):2649-53.
202. Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P et al. International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: The NMSQuest study. *Mov Disord.* 2006; 21(7):916-2.
203. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987; 155:335-50.
204. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239(4839):487-91.
205. Santamaria R, Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Dominissini S, Grossi S et al. Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat.* 2008; 29(6):E58-67.
206. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology.* 1967; 17:427-427.
207. Goetz CG, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stebbins GT et al. (MDS-UPDRS): Process, format, and clinimetric testing plan Movement disorder society-sponsored revision of the unified Parkinson's disease rating scale. *Mov Disord.* 2007; 22(1):41-7.
208. Folstein M, Folstein S, McHugh P. 'Mini-Mental State' A practical state method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975; 12(3):189-98.
209. Mioshi E, Dawson K, Mitchell J, Arnold R, Hodges JR. The Addenbrooke's Cognitive Examination revised (ACE-R): A brief cognitive test battery for dementia screening. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006 Nov;21(11):1078-85.
210. Kaplan E, Goodglass H, Weintraub S. Boston Naming Test. 1983; Lea & Febiger.
211. Pavlović D. Dijagnostički testovi u neuropsihologiji. 2003; Grafos.
212. Dubois B, Slachevsky A, Litvan I, Pillon B. The FAB: a Frontal Assessment Battery at bedside. *Neurology.* 2000; 55(11):1621-6.

213. Hamilton M. A Rating Scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1960; 23:56–63.
214. Kühner C, Bürger C, Keller F, Hautzinger M. Reliabilität und validität des revidierten Beck-Depressionsinventars (BDI-II). *Befunde aus deutschsprachigen stichproben. Nervenarzt.* 2007; 78: 651–656.
215. Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating. *Br J Med Psychol* 1959; 32:50–5.
216. Starkstein SE, Mayberg HS, Preziosi TJ, Andrezejewski P, Leiguarda R, Robinson RG et al. Reliability, validity, and clinical correlates of apathy in Parkinson's disease. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1992; 4(2):134-9.
217. Leentjens AF, Dujardin K, Marsh L, Martinez-Martin P, Richard IH, Starkstein SE et al. Apathy and Anhedonia rating scales in Parkinson's disease: Critique and recommendations. *Mov Disord.* 2008; 23(14):2004-14.
218. Emre M1, Aarsland D, Brown R, Burn DJ, Duyckaerts C, Mizuno Y et al. Clinical diagnostic criteria for dementia associated with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2007; 22(12):1689-707;.
219. Litvan I, Goldman JG, Tröster AI, Schmand BA, Weintraub D, Petersen RC et al. Diagnostic criteria for mild cognitive impairment in Parkinson's disease: Movement Disorder Society Task Force guidelines. *Mov Disord.* 2012; 27(3):349-56.
220. Studholme C, Hill DL, Hawkes DJ. Automated three-dimensional registration of magnetic resonance and positron emission tomography brain images by multiresolution optimization of voxel similarity measures. *Med Phys.* 1997; 24(1):25-35.
221. Pierpaoli C, Chiro D, Basser J, Trace D. Diffusion Tensor MR Imaging of the Human Brain. *Radiology.* 1996; 201:637–648.
222. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage.* 2006; 31(4):1487-505.
223. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage.* 2007; 38: 95–113.
224. Ashburner J, Friston KJ. Unified segmentation. 2005; 26(3):839-51.
225. McLaren DG, Kosmatka KJ, Kastman EK, Bendlin BB, Johnson SC. Rhesus macaque brain morphometry: a methodological comparison of voxel-wise approaches. *Methods.* 2010; 50(3):157-65.
226. Benamer TS, Patterson J, Grosset DG, Booij J, de Bruin K, van Royen E et al. Accurate differentiation of parkinsonism and essential tremor using visual assessment of [123I]-FP-CIT SPECT imaging: the [123I]-FP-CIT study group. *Mov Disord.* 2000; 15(3):503-10.
227. Nichols TE, Holmes AP. Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: a primer with examples. *Hum Brain Mapp.* 2002; 15(1):1-25.
228. Smith SM, Nichols TE. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference. *Neuroimage.* 2009; 44:83–98.
229. Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Paisan-Ruiz C, Katsarou Z, Hardy J, Fidani L et al. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett.* 2009; 452(2):87-9.
230. Nishioka K, Vilariño-Güell C, Cobb SA, Kachergus JM, Ross OA, Wider C et al. Glucocerebrosidase mutations are not a common risk factor for Parkinson disease in North Africa. *Neurosci Lett.*

- 2010; 477(2):57-60.
231. Toft M, Pielsticker L, Ross OA, Aasly JO, Farrer MJ. Glucocerebrosidase gene mutations and Parkinson disease in the Norwegian. *Neurology*. 2006; 66(3):415-7.
  232. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*. 2008; 7(7):583-90.
  233. Berg D, Schweitzer KJ, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2005; 128(Pt 12):3000-11.
  234. Gao L1, Gómez-Garre P, Díaz-Corrales FJ, Carrillo F, Carballo M, Palomino A et al. Prevalence and clinical features of LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2009; 16(8):957-60.
  235. Puschmann A. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: Clinical phenotypes and frequencies of known mutations. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013; 19(4):407-15.
  236. Janković MZ, Kresojević ND, Dobričić VS, Marković VV, Petrović IN, Novaković IV et al. Identification of novel variants in LRRK2 gene in patients with Parkinson's disease in Serbian population. *J Neurol Sci*. 2015;353(1-2):59-62.
  237. Blanckenberg J, Ntsapi C, Carr JA, Bardien S. EIF4G1 R1205H and VPS35 D620N mutations are rare in Parkinson's disease from South Africa. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(2):445.e1-3.
  238. Lesage S, Brice A. Role of mendelian genes in 'sporadic' Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18 Suppl 1:S66-70.
  239. Clark LN, Nicolai A, Afridi S, Harris J, Mejia-Santana H, Strug L et al. Pilot association study of the beta-glucocerebrosidase N370S allele and Parkinson's disease in subjects of Jewish ethnicity. *Mov Disord*. 2005; 20(1):100-3.
  240. Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y et al. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2005; 20(3):367-70.
  241. Eblan MJ, Scholz S, Stubblefield B, Gutti U, Goker-Alpan O, Hruska KS et al. Glucocerebrosidase mutations are not found in association with LRRK2 G2019S in subjects with parkinsonism. *Neurosci Lett*. 2006;404(1-2):163-5.
  242. Tan EK, Tong J, Fook-Chong S, Yih Y, Wong MC, Pavanni R et al. Glucocerebrosidase Mutations and Risk of Parkinson Disease in Chinese Patients. *Arch Neurol*. 2007; 64(7):1056-8.
  243. Ziegler SG, Eblan MJ, Gutti U, Hruska KS, Stubblefield BK, Goker-Alpan O et al. Glucocerebrosidase Mutations in Chinese Subjects from Taiwan with Sporadic Parkinson Disease. *Mol Genet Metab*. 2007; 91(2):195-200.
  244. Wu YR, Chen CM, Chao CY, Ro LS, Lyu RK, Chang KH et al. Glucocerebrosidase gene mutation is a risk factor for early onset of Parkinson disease among Taiwanese. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(9):977-9.
  245. De Marco EV, Annesi G, Tarantino P, Rocca FE, Provenzano G, Civitelli D V et al. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in southern Italy. *Mov Disord*. 2008;23(3):460-3.
  246. Spitz M, Rozenberg R, Pereira Lda V, Reis Barbosa E. Association between Parkinson's disease and glucocerebrosidase mutations in Brazil. *Parkinsonism Relat Disord*. 2008;14(1):58-62.

247. Mata IF, Samii A, Schneer SH, Roberts JW, Griffith A, Leis BC et al. Glucocerebrosidase Gene Mutations: A Risk Factor for Lewy Body Disorders. *Arch Neurol.* 2008; 65(3):379-82.
248. Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, Shifrin C, Rosner S, Gurevich T et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology.* 2008; 70(24):2277-83.
249. Nichols WC, Pankratz N, Marek DK, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Halter CA et al. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology.* 2009; 72(4):310-6..
250. Socal MP, Bock H, Michelin-Tirelli K, Hilbig A, Saraiva-Pereira ML, Rieder CR et al. Parkinson's disease and the heterozygous state for glucocerebrosidase mutations among Brazilians. *Parkinsonism Relat Disord.* 2009 Jan;15(1):76-8.
251. Mitsui J, Mizuta I, Toyoda A, Ashida R, Takahashi Y, Goto J et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2009; 66(5):571-6.
252. Bras J, Paisan-Ruiz C, Guerreiro R, Ribeiro MH, Morgadinho A, Januario C et al. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in parkinson disease patients from Portugal. *Neurobio Aging.* 2009; 30(9):1515-7.
253. Mao XY, Burgunder JM, Zhang ZJ, An XK, Zhang JH, Yang Y et al. Association between GBA L444P mutation and sporadic Parkinson's disease from Mainland China. *Neurosci Lett.* 2010; 469(2):256-9.
254. Sun QY, Guo JF, Wang L, Yu RH, Zuo X, Yao LY et al. Glucocerebrosidase gene L444P mutation is a risk factor for Parkinson's disease in Chinese population. *Mov Disord.* 2010; 25(8):1005-11.
255. Hu FY, Xi J, Guo J, Yu LH, Liu L, He XH et al. Association of the glucocerebrosidase N370S allele with Parkinson's disease in two separate Chinese Han populations of mainland China. *Eur J Neurol.* 2010; 17(12):1476-8.
256. Lesage S, Condroyer C, Hecham N, Anheim M, Belarbi S, Lohman E et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene confer a risk for parkinson disease in north Africa. *Neurology.* 2011 Jan 18;76(3):301-3.
257. Moraitou M, Hadjigeorgiou G, Monopolis I, Dardiotis E, Bozi M, Vassilatis D et al.  $\beta$ -Glucocerebrosidase gene mutations in two cohorts of Greek patients with sporadic Parkinson's disease. *Mol Genet Metab.* 2011 Sep-Oct;104(1-2):149-52.
258. Noreau A, Rivière JB, Diab S, Dion PA, Panisset M, Soland V et al. Glucocerebrosidase mutations in a French-canadian Parkinson's disease cohort. *Can J Neurol Sci.* 2011; 38(5):772-3.
259. Huang CL, Wu-Chou YH, Lai SC, Chang HC, Yeh TH, Weng YH et al. Contribution of glucocerebrosidase mutation in a large cohort of sporadic Parkinson's disease in Taiwan. *Eur J Neurol.* 2011 Oct;18(10):1227-32.
260. Emelyanov A, Boukina T, Yakimovskii A, Usenko T, Drosdova A, Zakharchuk A et al. Glucocerebrosidase Gene Mutations Are Associated with Parkinson's Disease in Russia. *Mov Disord.* 2012; 27(1):158-9.
261. Guimarães Bde C, Pereira AC, Rodrigues Fda C, dos Santos AV, Campos M Jr, dos Santos JM et al. Glucocerebrosidase N370S and L444P mutations as risk factors for Parkinson's disease in Brazilian patients. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012; 18(5):688-9.
262. Choi JM, Kim WC, Lyoo CH, Kang SY, Lee PH, Baik JS et al. Association of mutations in the



- glucocerebrosidase gene with Parkinson disease in a Korean population. *Neurosci Lett*. 2012; 514(1):12-5.
263. Wang Y, Liu L, Xiong J, Zhang X, Chen Z, Yu L et al. Glucocerebrosidase L444P mutation confers genetic risk for Parkinson's disease in central China. *Behav Brain Funct*. 2012; 8:57.
264. Zhang X, Bao QQ, Zhuang XS, Gan SR, Zhao D, Liu Y et al. Association of common variants in the glucocerebrosidase gene with high susceptibility to Parkinson's disease among chinese. *Chin. J. Physiol*. 2012; 55(6):398-404.
265. González-Del Rincón Mde L, Monroy Jaramillo N, Suárez Martínez AI, Yescas Gómez P, Boll Woehrlen MC, López López M et al. The L444P GBA mutation is associated with early-onset Parkinson's disease in Mexican Mestizos. *Clin Genet*. 2013; 84(4):386-7.
266. Yu Z, Wang T, Xu J, Wang W, Wang G, Chen C et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are responsible for Chinese patients with Parkinson's disease. *J Hum Genet*. 2015; 60(2):85-90.
267. Li Y, Sekine T, Funayama M, Li L, Yoshino H, Nishioka K et al. Clinicogenetic study of GBA mutations in patients with familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(4):935.e3-8.
268. Pulkes T, Choubtum L, Chitphuk S, Thakkinstian A, Pongpakdee S, Kulkantrakorn K et al. Glucocerebrosidase mutations in Thai patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20(9):986-91.
269. Asselta R, Rimoldi V, Siri C, Cilia R, Guella I, Tesesi S et al. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20(11):1215-20.
270. Malec-Litwinowicz M, Rudzińska M, Szubiga M, Michalski M, Tomaszewski T, Szczudlik A et al. Cognitive impairment in carriers of glucocerebrosidase gene mutation in Parkinson disease patients. *Neurol Neurochir Pol*. 2014; 48(4):258-61.
271. Han F, Grimes DA, Li F, Wang T, Yu Z, Song N et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are common in patients with Parkinson's disease from Eastern Canada. *Int J Neurosci* 2016; 126(5):415-21.
272. Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A et al. Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology*. 2015; 84(9):880-7.
273. Böttcher T, Rolfs A, Meyer B, Grossmann A, Berg D, Kropp P et al. Clinical, genetic, and brain sonographic features related to Parkinson's disease in Gaucher disease. *J Neurol*. 2013; 260(10):2523-31.
274. Goker-Alpan O, Lopez G, Vithayathil J, Davis J, Hallett M, Sidransky E . The spectrum of parkinsonian manifestations associated with glucocerebrosidase mutations. *Arch Neurol*. 2008; 65(10):1353-7.
275. Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab*. 2003; 79(2):104-9.
276. Barrett MJ, Giraldo P, Capablo JL, Alfonso P, Irun P, Garcia-Rodriguez B et al. Greater risk of parkinsonism associated with non-N370S GBA1 mutations. *J Inherit Metab Dis*. 2013; 36(3):575-80.
277. Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D et al. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab*. 2001; 73(4):313-21.

278. Abdel Razeq AA, Abd El-Gaber N, Abdalla A, Fathy A, Azab A, Rahman AA. Apparent diffusion coefficient value of the brain in patients with Gaucher's disease type II and type III. *Neuroradiology*. 2009; 51(11):773-9.
279. Park JK, Orvisky E, Tayebi N, Kaneski C, Lamarca ME, Stubblefield BK et al. Myoclonic epilepsy in Gaucher disease: genotype-phenotype insights from a rare patient subgroup. *Pediatr Res*. 2003; 53(3):387-95.
280. Becker JG, Pastores GM, Di Rocco A, Ferraris M, Graber JJ, Sathe S. Parkinson's disease in patients and obligate carriers of Gaucher disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013; 19(1):129-31.
281. Mistry PK, Cappellini MD, Lukina E, Ozsan H, Mach Pascual S, Rosenbaum H et al. A reappraisal of Gaucher disease-diagnosis and disease management algorithms. *Am J Hematol*. 2011 Jan; 86(1):110-5.
282. Giraldo P, Alfonso P, Irún P, Gort L, Chabás A, Vilageliu L et al. Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula. *Orphanet J Rare Dis*. 2012; 7:17.
283. Alfonso P, Aznarez S, Giralto M, Pocovi M, Giraldo P et al. Mutation analysis and genotype/phenotype relationships of Gaucher disease patients in Spain. *J Hum Genet*. 2007; 52(5):391-6.
284. Pomponio RJ, Cabrera-Salazar MA, Echeverri OY, Miller G, Barrera LA. Gaucher disease in Colombia: Mutation identification and comparison to other hispanic populations. *Mol Genet Metab*. 2005; 86(4):466-72.
285. Pouloupoulos M, Levy OA, Alcalay RN. The neuropathology of genetic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(7):831-42.
286. Zhang Y, Sun QY, Zhao YW, Shu L, Guo JF, Xu Q et al. Effect of GBA Mutations on Phenotype of Parkinson's Disease : A Study on Chinese Population and a Meta-Analysis. *Park Dis*. 2015; 2015:916971.
287. Scholz SW, Jeon BS. GBA mutations and Parkinson disease When genotype meets phenotype. *Neurology*. 2015 Mar 3;84(9):866-7.
288. Aharon-Peretz J, Badarny S, Rosenbaum H, Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson disease: phenotype-genotype correlation. *Neurology*. 2005; 65(9):1460-1.
289. Gan-Or Z, Bar-Shira A, Mirelman A, Gurevich T, Kedmi M, Giladi N et al. LRRK2 and GBA mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease. *Neurogenetics*. 2010; 11(1):121-5.
290. Lesage S, Belarbi S, Troiano A, Condroyer C, Hecham N, Pollak P et al. Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? *Neurology*. 2008; 71(19):1550-2.
291. Papapetropoulos S, Paschalis C, Athanassiadou A, Papadimitriou A, Ellul J, Polymeropoulos MH et al. Clinical phenotype in patients with alpha-synuclein Parkinson's disease living in Greece in comparison with patients with sporadic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70(5):662-5.
292. Winkler J, Ehret R, Büttner T, Dillmann U, Fogel W, Sabolek M et al. Parkinson's disease risk score: moving to a premotor diagnosis. *J Neurol*. 2011; 258(Suppl 2):S311-5
293. Madden M, Hall D. Shoulder pain in Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord*. 2010;

- 25(8):1105-6.
294. Greenbaum L, Tegeder I, Barhum Y, Melamed E, Roditi Y, Djaldetti R. Contribution of genetic variants to pain susceptibility in Parkinson disease. *Eur J Pain*. 2012; 16(9):1243-50.
  295. Li W, Chen Y, Yin B, Zhang L. Pain in Parkinson's disease associated with COMT gene polymorphisms. *Behav Neurol*. 2014;2014:304203.
  296. Kumar KR, Ramirez A, Göbel A, Kresojević N, Svetel M, Lohmann K et al. Glucocerebrosidase mutations in a Serbian Parkinson's disease population. *Eur J Neurol*. 2013; 20(2):402-5.
  297. Wang C, Cai Y, Gu Z, Ma J, Zheng Z, Tang BS et al. Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common leucine-rich repeat kinase 2 and glucocerebrosidase genetic variants in Chinese individuals. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(3):725.e1-6.
  298. Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, Gasser T, Kupsch A, Roots I et al. L-Dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology*. 2003; 60(11):1750-5.
  299. Kasten M, Kertelge L, Brüggemann N, van der Vegt J, Schmidt A, Tadic V et al. Nonmotor Symptoms in Genetic Parkinson Disease. *Arch Neurol*. 2010; 67(6):670-6.
  300. McNeill A, Duran R, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83(8):853-4.
  301. Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, Rakitin B, Rosado L, Ross B et al. Self-report of cognitive impairment and Mini-Mental State Exam performance in PRKN, LRRK2, and GBA carriers with early onset Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol*. 2010; 32(7):775-9.
  302. Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang M-, Rosado L, Orbe Reilly M et al. Cognitive performance of GBA mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology*. 2012; 78(18):1434-40.
  303. Zokaie N, McNeill A, Proukakis C, Beavan M, Jarman P, Korlipara P et al. Visual short-term memory deficits associated with GBA mutation and Parkinson's disease. *Brain*. 2014; 137(Pt 8):2303-11.
  304. Mata IF, Leverenz JB, Weintraub D, Trojanowski JQ, Chen-Plotkin A, Van Deerlin VM et al. GBA variants are associated with a distinct pattern of cognitive deficits in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2016; 31(1):95-102.
  305. Williams-Gray CH, Hampshire A, Barker RA, Owen AM. Attentional control in Parkinson's disease is dependent on COMT val 158 met genotype. *Brain*. 2008; 131(Pt 2):397-408.
  306. Foltynie T, Goldberg TE, Lewis SG, Blackwell AD, Kolachana BS, Weinberger DR et al. Planning ability in Parkinson's disease is influenced by the COMT val158met polymorphism. *Mov Disord*. 2004; 19(8):885-91.
  307. Goris A, Williams-Gray CH, Clark GR, Foltynie T, Lewis SJ, Brown J et al. Tau and alpha-synuclein in susceptibility to, and dementia in, Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2007; 62(2):145-53.
  308. Mata IF, Leverenz JB, Weintraub D, Trojanowski JQ, Hurtig HI, Van Deerlin VM et al. APOE, MAPT, SNCA, and Cognitive Performance in Parkinson Disease. *JAMA Neurol*. 2014; 71(11):1405-12.
  309. Brockmann K, Srulijes K, Pflederer S, Hauser AK, Schulte C, Maetzler W, et al. GBA -associated Parkinson's disease: reduced survival and more rapid progression in a prospective longitudinal study. *Mov Disord*. 2015; 30(3):407-11.

310. Oeda T, Umemura A, Mori Y, Tomita S, Kohsaka M, Park K et al. Impact of glucocerebrosidase mutations on motor and nonmotor complications in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2015; 36(12):3306-13.
311. Pal, G., Robertson, E., O'Keefe, J. & Hall, D. The Neuropsychiatric and Motor Profile of GBA - Associated Parkinson's Disease: A Review. *Mov Disord Clin Pract*. 2015; 3(1):4-8.
312. Berardelli A, Wenning GK, Antonini A, Berg D, Bloem BR, Bonifati V et al. EFNS/MDS-ES/ENS [corrected] recommendations for the diagnosis of Parkinson's disease. *Eur J Neurol*. 2013; 20(1):16-34.
313. Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL et al. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain*. 2005; 128(Pt 12):2786-96.
314. Tomiyama H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S et al. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* 2006; 21(8):1102-8.
315. Belarbi S, Hecham N, Lesage S, Kediha MI, Smail N, Benhassine T et al. LRRK2 G2019S mutation in Parkinson's disease: A neuropsychological and neuropsychiatric study in a large Algerian cohort. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010; 16(10):676-9.
316. Kresojević N, Mijajlović M, Perić S, Pavlović A, Svetel M, Janković M et al. Transcranial sonography in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase mutations. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013; 19(4):431-5.
317. Kasten M, Kertelge L, Tadic V, Brüggemann N, Schmidt A, van der Vegt J et al. Depression and quality of life in monogenic compared to idiopathic, early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2012; 27(6):754-9.
318. Gan-Or Z, Mirelman A, Postuma RB, Arnulf I, Bar-Shira A, Dauvilliers Y et al. GBA mutations are associated with Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder. *Ann Clin Transl Neurol* 2015; 2(9):941-5.
319. McNeill A, Duran R, Proukakis C, Bras J, Hughes D, Mehta A et al. Hyposmia and cognitive impairment in Gaucher disease patients and carriers. *Mov Disord*. 2012; 27(4):526-32.
320. Beavan M, McNeill A, Proukakis C, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH et al. Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurol*. 2015; 72(2):201-8.
321. Alcalay RN, Mirelman A, Saunders-Pullman R, Tang MX, Mejia Santana H, Raymond D et al. Parkinson disease phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord*. 2013; 28(14):1966-71.
322. Bostantjopoulou S, Katsarou Z, Papadimitriou A, Veletza V, Hatzigeorgiou G, Lees A et al. Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation. *Mov Disord*. 2001; 16(6):1007-13.
323. Weiss D, Brockmann K, Srulijes K, Meisner C, Klotz R, Reinbold S et al. Long-term follow-up of subthalamic nucleus stimulation in glucocerebrosidase-associated Parkinson's disease. *J Neurol*. 2012; 259(9):1970-2.
324. Chetrit EB, Alcalay RN, Steiner-Birmanns B, Altarescu G, Phillips M, Elstein D et al. Phenotype in patients with Gaucher disease and Parkinson disease. *Blood Cells Mol Dis*. 2013; 50(3):218-21.

325. Kono S, Ouchi Y, Terada T, Ida H, Suzuki M, Miyajima H et al. Functional brain imaging in glucocerebrosidase mutation carriers with and without parkinsonism. *Mov Disord.* 2010; 25(12):1823-9.
326. Angeli A, Mencacci NE, Duran R, Aviles-Olmos I, Kefalopoulou Z, Candelario J et al. Genotype and phenotype in Parkinson's disease: Lessons in heterogeneity from deep brain stimulation. *Mov Disord.* 2013; 28(10):1370-5.
327. Walter U, Dressler D, Wolters A, Wittstock M, Greim B, Benecke R et al. Sonographic discrimination of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia. *J Neurol.* 2006; 253(4):448-54.
328. Barrett MJ, Hagenah J, Dhawan V, Peng S, Stanley K, Raymond D et al. Transcranial sonography and functional imaging in glucocerebrosidase mutation Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2013; 19(2):186-91.
329. Schweitzer KJ, Brüssel T, Leitner P, Krüger R, Bauer P, Woitalla D et al. Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2007; 254(5):613-6.
330. Hagenah JM, König IR, Becker B, Hilker R, Kasten M, Hedrich K et al. Substantia nigra hyperechogenicity correlates with clinical status and number of Parkin mutated alleles. *J Neurol.* 2007; 254(10):1407-13.
331. Walter U, Klein C, Hilker R, Benecke R, Pramstaller PP, Dressler D et al. Brain parenchyma sonography detects preclinical parkinsonism. *Mov Disord.* 2004; 19(12):1445-9.
332. Hagenah JM, Becker B, Brüggemann N, Djarmati A, Lohmann K, Sprenger A et al. Transcranial sonography findings in a large family with homozygous and heterozygous PINK1 mutations. *J. Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008; 79(9):1071-4.
333. Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E, et al. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006; 21(9):1506-10.
334. Brüggemann N, Hagenah J, Stanley K, Klein C, Wang C, Raymond D et al. Substantia nigra hyperechogenicity with LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord.* 2011; 26(5):885-8.
335. Berg D, Becker G, Zeiler B, Tucha O, Hofmann E, Preier M et al. Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound. *Neurology.* 1999; 53(5):1026-31.
336. Go CL, Frenzel A, Rosales RL, Lee LV, Benecke R, Dressler D et al. Assessment of substantia nigra echogenicity in German and Filipino populations using a portable ultrasound system. *J Ultrasound Med.* 2012; 31(2):191-6.
337. Mahlknecht P, Stockner H, Nocker M, Kiechl S, Willeit J, Scherfler C et al. A follow-up study of substantia nigra echogenicity in healthy adults. *Mov Disord.* 2012; 27(9):1196-7.
338. Rae CL, Correia MM, Altena E, Hughes LE, Barker RA, Rowe JB. White matter pathology in Parkinson's disease: the effect of imaging protocol differences and relevance to executive function. *Neuroimage.* 2012; 62(3):1675-84.
339. Zhan W, Kang GA, Glass GA, Zhang Y, Shirley C, Millin R et al. Regional alterations of brain microstructure in Parkinson's disease using diffusion tensor imaging. *Mov Disord.* 2012; 27(1):90-7.
340. Matsui H, Nishinaka K, Oda M, Niikawa H, Komatsu K, Kubori T et al. Wisconsin Card Sorting Test in Parkinson's disease: diffusion tensor imaging. *Acta Neurol Scand.* 2007; 116(2):108-12.
341. Kostić VS, Agosta F, Petrović I, Galantucci S, Spica V, Jecmenica-Lukic M et al. Regional patterns of

- brain tissue loss associated with depression in Parkinson disease. *Neurology*. 2010; 75(10):857-63.
342. Braak H, Sandmann-Keil D, Gai W, Braak E. Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by  $\alpha$ -synuclein immunocytochemistry. *Neurosci Lett*. 1999; 265(1):67-9.
343. Katsuse O, Iseki E, Marui W, Kosaka K. Developmental stages of cortical Lewy bodies and their relation to axonal transport blockage in brains of patients with dementia with Lewy bodies. *J. Neurol Sci*. 2003; 211(1-2):29-35.
344. Bohnen NI, Albin RL. White matter lesions in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2011; 7(4):229-36.
345. Song SK, Lee JE, Park HJ, Sohn YH, Lee JD, Lee PH. The pattern of cortical atrophy in patients with Parkinson's disease according to cognitive status. *Mov Disord*. 2011; 26(2):289-96.
346. Pereira JB, Ibarretxe-Bilbao N, Marti MJ, Compta Y, Junqué C, Bargallo N et al. Assessment of cortical degeneration in patients with Parkinson's disease by voxel-based morphometry, cortical folding, and cortical thickness. *Hum Brain Mapp*. 2012; 33(11):2521-34.
347. Im K, Lee JM, Seo SW, Hyung Kim S, Kim SI, Na DL. Sulcal morphology changes and their relationship with cortical thickness and gyral white matter volume in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neuroimage*. 2008; 43(1):103-13.
348. Stern MB. Transcranial ultrasound in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2008; 7(5):376-8.
349. Siderowf A, Stern MB. Preclinical diagnosis of Parkinson's disease: Are we there yet? *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2006; 6(4):295-301.
350. Booij J, Knol RJ. SPECT imaging of the dopaminergic system in (premotor) Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007; 13 Suppl 3:S425-8.
351. Mohindroo S. Type-3 Gaucher disease with bilateral necrosis of the neck of femur: a case report. *Cases J*. 2009; 2:9380.

## SPISAK SKRAĆENICA

μm- mikrometar

ACE- Adenbruksovo kognitivno ispitivanje

ALP- autofagno-lizosomalni put

AS- skala apatije

aSN-max- maksimalna vrednost hiperehogene površine SN

ATP-adenozin-3-fosfat

BDI- Beck Depression Inventory

BKP- blagi kognitivni poremećaj

BLD- bolest lizosomalnog deponovanja

BM- bela masa

BNT- Bostonski test imenovanja

bp- bazni par

C- Celzijus

CNS- centralni nervni sistem

CST- cerebrospinalna tečnost

CT- kompjuterizovana tomografija

DARTEL- eng. Diffeomorphic Anatomical Registration using Exponentiated Lie algebra

DaT- dopaminski transporter

dB- decibel

DLT- demencija sa levijevim telima

DNK- deoksiribonukleinska kiselina

DT- difuzioni tenzor

DTI- difuzioni tenzorski imidžing

ERAD- razgradnja udružena sa endoplazmatičnim retikulumom

ERQC- kontrola kvaliteta endoplazmatičkog retikuluma

FA- frakciona anizotropija

FAB- Frontal assessment battery

GB- Gošeova bolest

GB+/PB- ispitanici sa GB bez PB

GB+/PB+ ispitanici sa GB sa PB

GBA- gen koji kodira za  $\beta$ -glukocerebrozidazu

GBA+/PB- zdravi heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu, bez znakova PB

GBA+/PB+ PB pacijenti heterozigotni nosioci mutacije u *GBA* genu

GBAP- GBA pseudogen

GBA-PB- Parkinsonova bolest udružena sa mutacijom u *GBA* genu

GB-PB- Pacijenti sa Gošeovom i Parkinsonovom bolešću

GC-aza-  $\beta$ -glukocerebrozidaza

GWAS- studije vezanosti čitavog genoma (eng. genome wide association studies)

H&Y- Hoehn i Yahr stadijum parkinsonove bolesti

HAMA- Hamiltonova skala anksionznosti

HAMD- Hamiltonova skala depresivnosti

Hz- Herc

KCS- Klinički centar Srbije

LAMP-2A protein- eng. lysosome-associated membrane protein type 2A

L-dopa- levodopa

LIMP-2- eng. lysosomal integral membrane protein type 2

LRRK2- eng. leucine rich repeat serine/threonine protein kinase 2

LT- Levijeva tela

MD- srednja difuzivnost (eng. mean diffusivity)

MDS- Movement disorder society

MHz- megaherc

ml- mililitar

MMSE- Mini mental test

MNI- eng. Montreal Neurological Institute

MPS- mukopolisaharidoza



MPTP- 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

MR- magnetna rezonanca

mTOR- eng. mammalian target of rapamycin

nm- nanometar

NPC- Niemann Pick tip C

PB- BKP- PB sa blagim kognitivnim poremećajem

PB- D- PB sa demencijom

PB- Parkinsonova bolest

PCR- reakcija lančane polimerizacije (eng. Polymerase Chain Reaction)

PNS- periferni nervni sistem

REM- Rapid eye movement (faza sna sa brzim pokretima očiju)

RNK- ribonukleinska kiselina

ROC- eng. reactive oxygen species

ROI- Region od interesa

SN- supstancija nigra

ŠPA- šaperonima posredovana autofagija

sPB- sporadična Parkinsonova bolest, koja nije u vezi sa mutacijama

SPECT - eng. Single Photon Emission Computed Tomography

SWEDD- eng. scans without evidence of dopaminergic deficit

TBSS- eng. tract based spatial statistics

TKS- transkranijalna sonografija

UCHL1- ubikvitin karboksi- terminalna hidrolaza L1

UPDRS- ujedinjena skala za procenu parkinsonove bolesti

UPS- ubikvitin-proteazomni sistem

UV- ultraljubičasto

UZ- ultrazvuk

VBM- morfometrija zasnovana na vokselima

VIM- nucleus ventralis intermedius

**Prilozi**

Prilog 1. Originalni upitnik za prikupljanje osnovnih demografskih i kliničkih podataka pacijenata sa PB

**Demografski podaci**

Ime i prezime_____	Datum testiranja _____
Adresa_____	Datum rođenja_____
Telefon_____	Levoruk/desnoruk
Pol:    M        Ž	Godine obrazovanja_____

**Faktori rizika**

Pušenje	NE	DA	kutija/godina_____
Život u seoskom okruženju	NE	DA	godina_____
Izloženost herbicidima/pesticidima	NE	DA	
Korišćenje bunarske vode	NE	DA	

**Lična i porodična anamneza**

Lična anamneza_____		
Porodična istorija za PB DA    NE		
Srodnik prvog stepena	Roditelj (otac,majka)	Godine početka_____
	Brat ili sestra	Godine početka_____
Srodnik drugog stepena _____		Godine početka_____

**Početak bolesti**

Starost na početku bolesti_____	Trajanje bolesti_____
Asimetričan početak    DA    NE	Strana na kojoj je počela PB    D    L
Prvi simptomi:	1. Na ruci    2. Na nozi    3. Na ruci i nozi
Inicijalni simptomi i znaci	1. Tremor    2. Sporost
	3. Ukočenost    4. Odsustvo sinkinetskih pokreta
	5. Bol    6. Izmenjen rukopis
	7. Otežan hod    8. _____

**Terapija**

Th započeta nakon prvih simptoma (meseci)	_____	Trajanje terapije (meseci)	_____
Inicijalni odgovor na levodopu	1. Odličan	2. Dobar/umeren	3. Slab/nikakav
Aktuelna Th (i doze)	_____		
_____			
Aktuelni odgovor na levodopu	1. Odličan	2. Dobar/umeren	3. Slab/nikakav
Aktuelni odgovor na terapiju (%)	_____		
Nakon koliko vremena je prestao Th odgovor (u mesecima)	_____		
Total LDE (trenutno)	_____		

**Aktuelna simptomatologija**

<b>Motorni fenotip</b>			
	Tremor-dominantni		
	Akinetsko-rigidni		
	Posturalna nestabilnost sa poremećajim hoda		
	Neodređen		
<b>Autonomni poremećaji</b>			
GIT	1. Opstipacija	2. Gastrične smetnje	3. _____
Urinary	1. Učestalo mokrenje	2. Nokturija	3. Urgencija 4. Inkontinencija
Impotencija	NE DA	druga erektilna difunkcija _____	
KVS	NE	ortostatska hipotenzija drugo	
Znojenje	NE DA	(preterano znojenje)	
<b>Problemi sa spavanjem</b>			
Noćni	1. Inicijalna insomnija	2. Poremećaj sna tokom noći	
	3. Terminalna insomnija	4. Košmarni snovi	
	5. RBD		
Dnevni	0. nema	1. prekomerna dnevna pospanost	2. ataci spavanja
Sleep benefit	NE DA		

**Komplikacije****Motorne komplikacije**

Diskinezije NE DA

Vrsta: Horea Distonija Balizam Mioklonus Drugo

Tip: Peak-of-dose End-of-dose (i jutarnja distonija) Bifazične Square

Latenca (u mesecima): od prvih simptoma \_\_\_\_\_; od započinjanja terapije \_\_\_\_\_

Onesposobljenost Nema Blaga Umerena Teška

Fluktuacije

Tip Wearing-off On-off odložen ON No on

Latenca (u mesecima): od prvih simptoma \_\_\_\_\_; od započinjanja terapije \_\_\_\_\_

**Psijijatrijske komplikacije**

Halucinacije NE Aktuelo Ranije

Pri kom leku \_\_\_\_\_

Latenca (u mesecima): od prvih simptoma \_\_\_\_\_; od započinjanja terapije \_\_\_\_\_

Sumanutosti \_\_\_\_\_

**Druge komplikacije**

Bol 0-nema 1-usled drugih stanja 2-centralni bol

Bol opisno \_\_\_\_\_

Distonija pre početka Th 1-stopalo 2-ruka 3-blefaro 4-tortikolis

5-hemidistonija 6-drugo \_\_\_\_\_

Freezing NE DA

Off freezing On freezing

Latenca (u mesecima): od prvih simptoma \_\_\_\_\_; od započinjanja terapije \_\_\_\_\_

Padovi vezani za frizing NE DA

Padovi (nevezani za freezing) NE DA

Komentar

---



---

## Prilog 2. HOEHN i YAHR stadijum

- 0 - nema znakova bolesti
- 1 - unilaterana zahvaćenost
- 2 - blaga bilateralna zahvaćenost bez posturalne nestabilnosti
- 3 - blaga do umerena bilateralna bolest uz postojanje posturalne nestabilnosti, pri čemu je pacijent fizički nezavisan
- 4 - potpuno izraženi simptomi bolesti, pacijent je još uvek sposoban da stoji i hoda bez pomoći, ali postoji izražena onesposobljenost
- 5 - teška onesposobljenosti- pacijent je vezan za invalidska kolica ili krevet.

## Prilog 3. MDS-UPDRS

<b>Deo I: Nemotorni aspekti svakodnevnog života</b>	
<b>1.1. Kognitivni problemi</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez kognitivnih problema.
<b>1</b>	Slabo: Problemi sa pamćenjem prema mišljenju pacijenta ili negovatelja ne utiču na pacijentove svakodnevne aktivnosti ili društveni život.
<b>2</b>	Blago: Klinički jasni kognitivni deficit, koji minimalno utiče na pacijentove svakodnevne aktivnosti ili društveni život.
<b>3</b>	Umereno: Kognitivni deficit utiče na pacijentove svakodnevne aktivnosti i društveni život, ali ga ne onemogućava da u njima učestvuje.
<b>4</b>	Izraženo: Kognitivni deficit koji onemogućava pacijenta da učestvuje u svakodnevnim aktivnostima ili društvenom životu.
<b>1.2. Halucinacije i psihoza</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez halucinacija i psihoze.
<b>1</b>	Slabo: Iluzije ili neformirane halucinacije, pacijent ih prepoznaje, očuvan uvid.
<b>2</b>	Blago: Formirane halucinacije, nezavisne od stimulusa sredine. Bez gubitka uvida.
<b>3</b>	Umereno: Formirane halucinacije sa gubitkom uvida.
<b>4</b>	Izraženo: Postojanje deluzija ili paranoje.
<b>1.3. Depresivno raspoloženje</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez depresivnog raspoloženja.
<b>1</b>	Slabo: Epizode depresivnog raspoloženja koje ne traju duže od jednog dana i ne utiču na svakodnevne aktivnosti i socijalne interakcije.
<b>2</b>	Blago: Depresivno raspoloženje koje traje danima ali ne utiče na svakodnevne aktivnosti i socijalne interakcije.
<b>3</b>	Umereno: Depresivno raspoloženje koje utiče ali ne poništava sposobnost pacijenta za sprovođenje normalnih aktivnosti i socijalnih interakcija.
<b>4</b>	Izraženo: Depresivno raspoloženje koje poništava sposobnost pacijenta za sprovođenje normalnih aktivnosti i socijalnih interakcija.
<b>1.4. Anksioznost</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez anksioznosti.

1	Slabo: Anksioznost koja ne traje duže od jednog dana i ne utiče na svakodnevne aktivnosti i socijane interakcije.
2	Blago: Anksioznost koja traje duže od jednog dana ali ne utiče na svakodnevne aktivnosti i socijane interakcije.
3	Umereno: Anksioznost koja utiče ali ne poništava sposobnost pacijenta za sprovođenje normalnih aktivnosti i socijalnih interakcija.
4	Izraženo: Anksioznost koja poništava sposobnost pacijenta za sprovođenje normalnih aktivnosti i socijalnih interakcija.
<b>1.5. Apatija</b>	
0	Normalno: Bez apatije.
1	Slabo: Apatija procenjena od strane pacijenta i/ili negovatelja, koja ne utiče na svakodnevne aktivnosti i društveni život.
2	Blago: Apatija utiče na pojedine aktivnosti i socijalne interakcije.
3	Umereno: Apatija utiče na većinu aktivnosti i društveni život.
4	Izraženo: Pasivnost i povlačenje, potpuni gubitak inicijative.
<b>1.6. Dopamin disregulacioni sindrom</b>	
0	Normalno: Nije prisutan.
1	Slabo: Postoji ali obično ne uzrokuje problem pacijentu ili negovatelju.
2	Blago: Postoji i uzrokuje neke probleme u ličnom i porodičnom životu pacijenta.
3	Umereno: Postoji i uzrokuje mnoge probleme u ličnom i porodičnom životu pacijenta.
4	Izraženo: Problem koji isključuje pacijenta iz normalnih aktivnosti ili socijalnih interakcija ili u održavanju prethodnih standarda ličnog i porodičnog života.
<b>1.7. Problem sa spavanjem</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Problem koji obično ne remeti celonoćno spavanje.
2	Blago: Problem koji u izvesnoj meri remeti celonoćno spavanje.
3	Umereno: Problem koji remeti celonoćno spavanje ali pacijent prespava više od pola noći.
4	Izraženo: Pacijent koji ne spava veći deo noći.
<b>1.8. Dnevna pospanost</b>	
0	Normalno: Ne postoji.
1	Slabo: Postoji ali mogu da se suzdržim i ostanem budan.
2	Blago: Ponekad zaspim kada sam sam i odmaram, npr. kada čitam ili gledam TV.
3	Umereno: Ponekad zaspim kada ne bi trebalo, npr. dok jedem ili dok pričam sa drugim ljudima.
4	Izraženo: Često zaspim kada ne bi trebalo, npr. dok jedem ili dok pričam sa drugim ljudima.
<b>1.9. Bol i druge senzacije</b>	
0	Normalno: Bez neprijatnih senzacija.
1	Slabo: Imam ove senzacije ali mogu bez problema da budem aktivan u društvu.
2	Blago: Ove senzacije uzrokuju izvesne probleme pri aktivnostima ili kada sam u društvu.
3	Umereno: Ove senzacije uzrokuju mnogo problema ali me ne sprečavaju u obavljanju aktivnosti ili kada sam u društvu.
4	Izraženo: Ove senzacije me sprečavaju u obavljanju aktivnosti ili da budem u društvu.
<b>1.10. Problem sa mikcijom</b>	
0	Normalno: Bez problema sa kontrolom mokrenja.
1	Slabo: Učestalo ili urgentno mokrenje ali bez uticaja na dnevne aktivnosti.
2	Blago: Izvesni problemi u dnevnim aktivnostima ali bez urinarnih akcidenata.
3	Umereno: Mnogi problemi u dnevnim aktivnostima, uključujući urinarne akcidente.

4	Izraženo: Bez kontrole mikcije, potrebno nošenje pelena ili katetera.
<b>1.11. Konstipacija</b>	
0	Normalno: Ne postoji
1	Slabo: Postoji i potreban je dodatni napor da ispraznim creva ali bez uticaja na dnevne aktivnosti.
2	Blago: Postoji i uzrokuje određenu neprijatnost ili problem u aktivnostima.
3	Umereno: Postoji i uzrokuje mnogo problema ali me ne sprečava u aktivnostima.
4	Izraženo: Potrebna mi je fizička pomoć druge osobe radi pražnjenja creva.
<b>1.12. Mrkosvestica pri stajanju</b>	
0	Normalno: Bez ošamućenosti i zamagljenosti.
1	Slabo: Ošamućenost i zamagljenost se dešavaju ali mi ne uzrokuju problem u aktivnostima.
2	Blago: Zbog ošamućenosti i zamagljenosti moram da se pridržim za nešto ali ne moram da sednem ili legnem.
3	Umereno: Zbog ošamućenosti i zamagljenosti moram da sednem ili legnem kako se ne bih onesvestio ili pao.
4	Izraženo: Zbog ošamućenosti i zamagljenosti padam ili se onesvestim.
<b>1.13. Zamor</b>	
0	Normalno: Bez zamora.
1	Slabo: Zamoram se ali me to ne sprečava u aktivnostima i druženju.
2	Blago: Zamor mi uzrokuje neke probleme u aktivnostima i druženju.
3	Umereno: Zamor mi uzrokuje mnoge probleme u aktivnostima i druženju ali me ni u čemu ne sprečava.
4	Izraženo: Zamor me sprečava u obavljanju aktivnosti i u druženju.
<b>Deo II: Motorni aspekti svakodnevnog života</b>	
<b>2.1. Govor</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Moj govor je mek, sliven ili neujednačen ali bez potrebe da drugima ponavljam šta sam rekao.
2	Blago: Ponekad, ali ne svakodnevno, me pitaju da ponovim šta sam rekao.
3	Umereno: Moj govor nije dovoljno jasan zbog čega me drugi svakodnevno pitaju da ponovim šta sam rekao iako je govor većim delom razumljiv.
4	Izraženo: Veći deo mog govora nije razumljiv.
<b>2.2. Curenje pljuvačke</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Imam previše pljuvačke koja ne curi.
2	Blago: Pljuvačka curi dok spavam ali ne i preko dana.
3	Umereno: Povremeno curenje pljuvačke u budnosti koje obično ne zahteva upotrebu maramice.
4	Izraženo: Izraženo curenje pljuvačke zbog čega regularno koristim maramicu da bih zaštitio odeću.
<b>2.3. Žvakanje i gutanje</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Svestan sam usporenog žvakanja ili povećanog napora pri gutanju ali se ne zagrcnem niti je potreban poseban način pripreme hrane.
2	Blago: Moram da prelomim tablete ili da na poseban način pripremim hranu zbog problema sa žvakanjem ili gutanjem, ali se u proteklih nedelju dana nisam zagrcnuo.
3	Umereno: Tokom prošle nedelje sam se zagrcnuo bar jedan put.
4	Izraženo: Zbog problema sa žvakanjem i gutanjem potrebna mi je sonda za ishranu.
<b>2.4. Ishrana</b>	
0	Normalno: Bez problema.

1	Slabo: Sporije jedem ali mi ne treba pomoć i ne prosipam hranu prilikom jela.
2	Blago: Sporije jedem i povremeno prosipam hranu. Povremeno mi treba pomoć pri radnjama kao što je sečenje mesa.
3	Umereno: Treba mi pomoć za puno radnji oko hranjenja, ali nešto mogu da uradim i sam.
4	Izraženo: Treba mi pomoć za sve ili skoro sve radnje oko hranjenja.
<b>2.5. Oblačenje</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Usporen sam ali mi nije potrebna pomoć.
2	Blago: Usporen sam i potrebna mi je pomoć oko nekoliko stvari (npr. dugme, narukvica).
3	Umereno: Potrebna mi je pomoć oko mnogo stvari.
4	Izraženo: Potrebna mi je pomoć oko većine stvari.
<b>2.6. Higijena</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Usporen sam ali mi nije potrebna pomoć.
2	Blago: Potrebna mi je tuđa pomoć oko nekih higijenskih zadataka.
3	Umereno: Potrebna mi je pomoć oko mnogo higijenskih zadataka.
4	Izraženo: Potrebna mi je pomoć oko većine higijenskih zadataka.
<b>2.7. Rukopis</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Moje pisanje je sporo, nespretno i nejednako ali su sve reči čiste.
2	Blago: Neke reči su nejasne i teške za čitanje.
3	Umereno: Mnoge reči su nejasne i teške za čitanje.
4	Izraženo: Većina ili sve reči nisu čitljive.
<b>2.8. Hobiji i druge aktivnosti</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Spor sam ali se lako bavim ovim aktivnostima.
2	Blago: Imam nekih problema oko ovih aktivnosti.
3	Umereno: Imam velike probleme oko ovih aktivnosti ali se većinom bavim.
4	Izraženo: Nisam u mogućnosti da se bavim većinom ovih aktivnosti.
<b>2.9. Okretanje u krevetu</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Imam problema ali mi nije potrebna pomoć.
2	Blago: Imam mnogo problema i povremeno mi je potrebna tuđa pomoć.
3	Umereno: Obično mi je potrebna tuđa pomoć.
4	Izraženo: Ne mogu da se okrenem bez tuđe pomoći.
<b>2.10. Tremor</b>	
0	Normalno: Nemam podrhtavanje niti tremor.
1	Slabo: Podrhtavanje ili tremor se javljaju ali ne prave problem sa bilo kojom aktivnošću.
2	Blago: Podrhtavanje ili tremor uzrokuju problem pri nekim aktivnostima.
3	Umereno: Podrhtavanje ili tremor uzrokuju problem pri mnogim dnevnim aktivnostima.
4	Izraženo: Podrhtavanje ili tremor uzrokuju problem pri većini ili svim aktivnostima.
<b>2.11. Ustajanje iz kreveta, automobila ili niske stolice</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Spor sam i nespretno, ali obično ustajem iz prvog pokušaja.
2	Blago: Potrebno mi je više pokušaja ili povremena pomoć da bih ustao.
3	Umereno: Ponekad mi je potreba pomoć ali uglavnom mogu da ustanem samostalno.



4	Izraženo: Potrebna mi je pomoć često ili uvek.
<b>2.11. Hod i ravnoteža</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Malo sam sporiji ili vučem nogu. Nikada ne koristim pomoć pri hodu.
2	Blago: Povremeno koristim pomoć pri hodu ali mi nije potrebna pomoć druge osobe.
3	Umereno: Obično koristim pomoć (štap, hodalicu) za bezbedan hod bez padova. Ipak, pomoć druge osobe mi obično nije potrebna.
4	Izraženo: Obično mi potrebna pomoć druge osobe za bezbedan hod bez padova.
<b>2.12. Frizing</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Imam krakotrajni frizing ali bez problema nastavima da hodam. Nije mi potrebna pomoć pri hodu zbog frizinga.
2	Blago: Imam frizing i povremeno problem da nastavim da hodam ali mi nije potrebna pomoć pri hodu zbog frizinga.
3	Umereno: Zbog frizinga imam problem da nastavim sa hodom i povremeno koristim pomoć pri hodu.
4	Izraženo: Zbog čestog ili stalno prisutnog frizinga potrebna mi je pomoć pri hodu.
<b>Deo III: Motorni pregled</b>	
<b>3.1. Govor</b>	
0	Normalno: Bez problema
1	Slabo: Gubitak ekspresije, dikcije ili snage glasa ali se sve reči lako rezumeju.
2	Blago: Gubitak ekspresije, dikcije ili snage glasa sa nekoliko nejasnih reči ali se rečenice i dalje lako prate.
3	Umereno: Govor je teško razumljiv do neke mere ali ne u potpunosti, rečenice su slabo razumljive.
4	Izraženo: Većinom nerazumljiv govor.
<b>3.2. Facijalna ekspresija</b>	
0	Normalno: Normalna facijalna ekspresija.
1	Slabo: Minimalno maskoliko lice koje se manifestuje samo smanjenom frekvencijom treptanja.
2	Blago: Pored smanjenog treptanja, maskoliko lice se primećuje i u donjem delu lica, manji su pokreti oko usta ali usne nisu rastavljene.
3	Umereno: Maskoliko lice sa rastavljenim usnama neko vreme dok su usta u miru.
4	Izraženo: Maskoliko lice sa rastavljenim usnama veći deo vremena dok su usta u miru.
<b>3.2. Rigiditet (vrata; desne ruke; leve ruke; desne noge; leve noge)</b>	
0	Normalno: Bez rigiditeta.
1	Slabo: Rigiditet se detektuje samo uz manevar aktivacije.
2	Blago: Rigiditet se detektuje bez manevara aktivacije ali se lako postiže pun obim pokreta.
3	Umereno: Rigiditet se detektuje bez manevara aktivacije; pun obim pokreta se postiže sa naporom.
4	Izraženo: Rigiditet se detektuje bez manevara aktivacije; pun obim pokreta se ne postiže.
<b>3.3. „Finger tapping” (desna ruka; leva ruka)</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Bilo šta od sledećeg: a) regularan ritam je prekinut sa jednom ili dve pauze ili hezitacije pokreta; b) slabo usporavanje; c) smanjenje amplitude oko 10. pokreta.
2	Blago: Bilo šta od sledećeg: a) 3-5 prekida tokom tapinga; b) blago usporavanje; c) smanjenje amplitude na pola sekvence od 10 pokreta.
3	Umereno: Bilo šta od sledećeg: a) više od 5 pauza tokom tapinga ili bar jedna duža pauza (frizing) u pokretu; b) umereno usporavanje; c) smanjenje amplitude od prvog pokreta.
4	Izraženo: Ne izvodi ili jedva izvodi zadatak zbog usporenja, prekida ili smanjenja amplitude.

<b>3.5. Pokreti šaka (desna ruka; leva ruka)</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema.
<b>1</b>	Slabo: Bilo šta od sledećeg: a) regularan ritam je prekinut sa jednom ili dve pauze ili hezitacije pokreta; b) slabo usporavanje; c) smanjenje amplitude pred kraj zadatka.
<b>2</b>	Blago: Bilo šta od sledećeg: a) 3-5 prekida tokom pokreta; b) blago usporavanje; c) smanjenje amplitude na pola zadatka.
<b>3</b>	Umereno: Bilo šta od sledećeg: a) više od 5 pauza tokom pokreta ili bar jedna duža pauza (frizing) u pokretu; b) umereno usporavanje; c) smanjenje amplitude od prvog pokreta.
<b>4</b>	Izraženo: Ne izvodi ili jedva izvodi zadatak zbog usporenja, prekida ili smanjenja amplitude.
<b>3.6. Pokreti supinacije-pronacije šaka (desna ruka; leva ruka)</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema.
<b>1</b>	Slabo: Bilo šta od sledećeg: a) regularan ritam je prekinut sa jednom ili dve pauze ili hezitacije pokreta; b) slabo usporavanje; c) smanjenje amplitude pred kraj sekvence.
<b>2</b>	Blago: Bilo šta od sledećeg: a) 3-5 prekida tokom pokreta; b) blago usporavanje; c) smanjenje amplitude na pola sekvence.
<b>3</b>	Umereno: Bilo šta od sledećeg: a) više od 5 pauza tokom pokreta ili bar jedna duža pauza (frizing) u pokretu; b) umereno usporavanje; c) smanjenje amplitude nakon prvog pokreta supinacija-pronacija.
<b>4</b>	Izraženo: Ne izvodi ili jedva izvodi zadatak zbog usporenja, prekida ili smanjenja amplitude.
<b>3.7. "Toe tapping" (desna noga; leva noga)</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema.
<b>1</b>	Slabo: Bilo šta od sledećeg: a) regularan ritam je prekinut sa jednom ili dve pauze ili hezitacije pokreta; b) slabo usporavanje; c) smanjenje amplitude oko 10. pokreta.
<b>2</b>	Blago: Bilo šta od sledećeg: a) 3-5 prekida tokom tapinga; b) blago usporavanje; c) smanjenje amplitude na pola zadatka.
<b>3</b>	Umereno: Bilo šta od sledećeg: a) više od 5 pauza tokom tapinga ili bar jedna duža pauza (frizing) u pokretu; b) umereno usporavanje; c) smanjenje amplitude od prvog pokreta.
<b>4</b>	Izraženo: Ne izvodi ili jedva izvodi zadatak zbog usporenja, prekida ili smanjenja amplitude.
<b>3.8. Spretnost noge (desna noga; leva noga)</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema.
<b>1</b>	Slabo: Bilo šta od sledećeg: a) regularan ritam je prekinut sa jednom ili dve pauze ili hezitacije pokreta; b) slabo usporavanje; c) smanjenje amplitude pred kraj zadatka.
<b>2</b>	Blago: Bilo šta od sledećeg: a) 3-5 prekida tokom pokreta; b) blago usporavanje; c) smanjenje amplitude na pola zadatka.
<b>3</b>	Umereno: Bilo šta od sledećeg: a) više od 5 pauza tokom pokreta ili bar jedna duža pauza (frizing) u pokretu; b) umereno usporavanje; c) smanjenje amplitude od prvog pokreta.
<b>4</b>	Izraženo: Ne izvodi ili jedva izvodi zadatak zbog usporenja, prekida ili smanjenja amplitude.
<b>3.9. Ustajanje iz stolice</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema. Ustaje brzo, bez oklevanja.
<b>1</b>	Slabo: Ustaje sporije ili nakon više od jednog pokušaja; ili mora da se nagne napred da bi ustao. Ne oslanja se na rukohvate.
<b>2</b>	Blago: Odguruje se o rukohvate, bez poteškoća.
<b>3</b>	Umereno: Mora da se odgurne, tendencija pada unazad; ili pravi više od jednog pokušaja oslanjajući se na rukohvate, ali ustaje bez pomoći.
<b>4</b>	Izraženo: Ne može da ustane bez pomoći.
<b>3.10. Hod</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez problema.

1	Slabo: Hoda nezavisno uz minimalan poremećaj hoda.
2	Blago: Hoda nezavisno sa značajnim poremećajem hoda.
3	Umereno: Zahteva pomoć pomagala pri hodu (štap, hodalica) ali ne i pomoć druge osobe.
4	Izraženo: Ne može da hoda ili hoda samo uz pomoć druge osobe.
<b>3.11. Frizing hoda</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Frizing se javlja pri započinjanu hoda, prilikom okretanja ili pri prolasku kroz vrata sa pojedinačnim zastojem pri svakom od ovih događaja, ali potom nastavlja da hoda bez frizinga.
2	Blago: Frizing se javlja pri započinjanu hoda, prilikom okretanja ili pri prolasku kroz vrata sa više zastoja pri svakom od ovih događaja, ali potom nastavlja da hoda bez frizinga.
3	Umereno: Frizing se javlja jednom tokom hoda.
4	Izraženo: Frizing se javlja više puta tokom hoda.
<b>3.12. Posturalna stabilnost</b>	
0	Normalno: Bez problema. Oporavak nakon jednog ili dva koraka.
1	Slabo: 3-5 koraka ali se oporavi bez pomoći.
2	Blago: više od 5 koraka ali se oporavi bez pomoći.
3	Umereno: Bezbedno stoji, ali postoji odsustvo posturalnog odgovora; pao bi ukoliko ga ispitivač ne pridrži.
4	Izraženo: Veoma nestabilan, sa tendencijom spontanog gubitka balansa ili pri nežnom povlačenju za ramena.
<b>3.13. Držanje</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Nije potpuno ispravljeno, ali može biti normalno kod starije osobe.
2	Blago: Definitivna fleksija, skolioza ili naginjanje na stranu, ali pacijent može da koriguje držanje do normale.
3	Umereno: Povijeno držanje, skolioza ili naginjanje na jednu stranu koje ne može voljno biti korigovano.
4	Izraženo: Fleksija, skolioza ili naginjanje sa ekstremno abnormalnim držanjem.
<b>3.14. Globalna spontanost pokreta (bradikinezija tela)</b>	
0	Normalno: Bez problema.
1	Slabo: Slaba globalna usporenost i osiromašenje spontanih pokreta.
2	Blago: Blaga globalna usporenost i osiromašenje spontanih pokreta.
3	Umereno: Umerena globalna usporenost i osiromašenje spontanih pokreta.
4	Izraženo: Izražena globalna usporenost i osiromašenje spontanih pokreta.
<b>3.15. Posturalni tremor ruku (desna ruka; leva ruka)</b>	
0	Normalno: Bez tremora.
1	Slabo: Tremor je prisutan ali je manje amplitude od 1 cm.
2	Blago: Tremor amplitude 1-3 cm.
3	Umereno: Tremor amplitude 3-10 cm.
4	Izraženo: Tremor amplitude veće od 10 cm.
<b>3.16. Kinetički tremor ruku (desna ruka; leva ruka)</b>	
0	Normalno: Bez tremora.
1	Slabo: Tremor je prisutan ali je manje amplitude od 1 cm.
2	Blago: Tremor amplitude 1-3 cm.
3	Umereno: Tremor amplitude 3-10 cm.
4	Izraženo: Tremor amplitude veće od 10 cm.

<b>3.17. Tremor u miru (vilica<sup>#</sup>, desna ruka; leva ruka; desna noga, leva noga)</b>	
0	Normalno: Bez tremora.
1	Slabo: Tremor je prisutan ali je manje amplitude od 1 cm.
2	Blago: Tremor amplitude 1-3 cm ( <sup>#</sup> 1-2 cm).
3	Umereno: Tremor amplitude 3-10 cm ( <sup>#</sup> 2-3 cm).
4	Izraženo: Tremor amplitude veće od 10 cm ( <sup>#</sup> >3 cm).
<b>3.18. Konstantnost tremora u miru</b>	
0	Normalno: Bez tremora.
1	Slabo: Tremor je prisutan <25% vremena trajanja pregleda.
2	Blago: Tremor je prisutan 26-50% vremena trajanja pregleda.
3	Umereno: Tremor je prisutan 51-75% vremena trajanja pregleda.
4	Izraženo: Tremor je prisutan >75% vremena trajanja pregleda.
<b>IV deo: Motorne komplikacije</b>	
<b>4.1. Vreme trajanja diskinezija</b>	
0	Normalno: Bez diskinezija.
1	Slabo: ≤25% vremena budnog dela dana.
2	Blago: 26-50% vremena budnog dela dana.
3	Umereno: 51-75% vremena budnog dela dana.
4	Izraženo: >75% vremena budnog dela dana.
<b>4.2. Funkcionalni uticaj diskinezija</b>	
0	Normalno: Bez diskinezija ili bez uticaja na aktivnosti ili socijalne interakcije.
1	Slabo: Diskinezije utiču na nekoliko aktivnosti, ali pacijent obično može da ih obavlja i da ima socijalne interakcije za vreme trajanja diskinezija.
2	Blago: Diskinezije utiču na mnoge aktivnosti, ali pacijent obično može da ih obavlja i da ima socijalne interakcije za vreme trajanja diskinezija.
3	Umereno: Diskinezije utiču na aktivnosti do te mere da pacijent obično ne može da sprovede neke od njih ili obično ne može da učestvuje u socijalnim aktivnostima za vreme trajanja diskinezija.
4	Izraženo: Diskinezije utiču na aktivnosti do te mere da pacijent ne može da izvede većinu ili da učestvuje u većini socijalnih aktivnosti za vreme trajanja diskinezija.
<b>4.3. Vreme trajanja OFF stanja</b>	
0	Normalno: Bez OFF perioda.
1	Slabo: ≤25% vremena budnog dela dana.
2	Blago: 26-50% vremena budnog dela dana.
3	Umereno: 51-75% vremena budnog dela dana.
4	Izraženo: >75% vremena budnog dela dana.
<b>4.4. Funkcionalni uticaj luktucija</b>	
0	Normalno: Bez fluktuacija ili bez njihovog uticaja na aktivnosti ili socijalne interakcije.
1	Slabo: Fluktuacije utiču na nekoliko aktivnosti, ali pacijent u OFFu obično može da ih obavlja i da ima socijalne interakcije kao i u ONu.
2	Blago: Fluktuacije utiču na mnoge aktivnosti, ali pacijent u OFFu obično može da ih obavlja i da ima socijalne interakcije kao i u ONu.
3	Umereno: Fluktuacije utiču na aktivnosti do te mere da pacijent u OFFu obično ne može da sprovede neke od njih ili obično ne može da učestvuje u socijalnim aktivnostima kao u ONu.
4	Izraženo: Fluktuacije utiču na aktivnosti do te mere da pacijent u OFFu ne može da izvede većinu ili da učestvuje u većini socijalnih aktivnosti kao u ONu.
<b>4.5. Kompleksnost motornih fluktuacija</b>	

<b>0</b>	Normalno: Bez fluktuacija.
<b>1</b>	Slabo: OFF periodi su predvidivi uvek ili veći deo vremena (>75%).
<b>2</b>	Blago: OFF periodi su predvidivi veći deo vremena (51-75%).
<b>3</b>	Umereno: OFF periodi su predvidivi deo vremena (26-50%).
<b>4</b>	Izraženo: OFF epizode su retko predvidive ( $\leq 25\%$ ) .
<b>4.6. Bolna OFF distonija</b>	
<b>0</b>	Normalno: Bez distonije ili bez OFF perioda.
<b>1</b>	Slabo: $\leq 25\%$ vremena OFFa.
<b>2</b>	Blago: 26-50% vremena OFFa.
<b>3</b>	Umereno: 51-75% vremena OFFa.
<b>4</b>	Izraženo: >75% vremena OFFa.

**Prilog 5. HAMILTONOVA SKALA ZA PROCENU DEPRESIVNOSTI- uputstvo za popunjavanje**

1. **DEPRIMIRANOST**- tuga, beznađe, bespomoćnost, bezvrednost
  - 0= Nema znakova
  - 1= Ova osećanja navodi samo pri ispitivanju
  - 2= Spontano iskazuje ova osećanja
  - 3= Osećanje ispoljava bez reči- izrazom lica, stavom tela, glasom, težnjom za plakanjem
  - 4= Verbalnom i neverbalnom komunikacijom pacijent navodi gotovo isključivo ova osećanja
2. **OSEĆANJE KRIVICE**- samooptuživanje, ideje krivice i/ili kazne, sumanutost krivice, optužujući i potkazujući glasovi (halucinacije)
  - 0= nema
  - 1= Samooptuživanje, misli da razočarava ljude
  - 2= Misli o krivici, razmišlja o greškama i gresima iz prošlosti
  - 3= Veruje da je bolest kazna, deluzija krivice
  - 4= Čuje optužujuće ili preteće glasove i/ili doživljava zastrašujuće vizuelne halucinacije
3. **SUICID**- doživljaj bezvrednosti života, suicidalne ideje ili pokušaji
  - 0= Nema ideja o samopovređivanju
  - 1= Oseća da život nije vredan življenja
  - 2= Želi da je mrtav ili misli o svojoj smrti izazvanoj vlastitom rukom
  - 3= Česte su suicidalne misli i postupci
  - 4= Pokušaj samoubistva (svaki ozbiljan pokušaj oceniti sa 4)
4. **RANA INSOMNIJA**- teškoće usnivanja
  - 0= Uspavljivanje bez teškoća
  - 1= Žali se da ponekad ne može da zaspri duže od pola sata
  - 2= Iz noći u noć ima problema pri uspavljivanju
5. **INSOMNIJA TOKOM NOĆI**- isprpljujuće spavanje, poremećen san, buđenje tokom noći
  - 0= Nema teškoća
  - 1= Žali se na nemir i smetnje tokom noći
  - 2= Budi se tokom noći (svako ustajanje oceniti sa 2, izuzev usled fizioloških potreba)
6. **KASNA INSOMNIJA**- rano buđenje
  - 0= Nema teškoća
  - 1= Budi se rano ujutru, ali nastavlja da spava
  - 2= Ako ustane ne može ponovo da zaspri
7. **RAD I AKTIVNOST**- osećanje nesposobnosti, zamora ili slabosti. Gubitak interesovanja.
  - 0= Bez teškoća
  - 1= Misli i osećanje nesposobnosti, umora ili malaksalosti odnose se na aktivnost, rad ili hobi
  - 2= Gubitak interesovanja za aktivnosti, hobi ili rad, bilo da o tome pacijent saopštaav ili da se to manifestuje nedoumicom, neodlučnošću ili oklevanjem (smatra da treba sebe da natera da radi ili da se bavi drugim aktivnostima)

3= Vreme stvarno utrošeno za aktivnosti je skraćeno ili je produktivnost smanjena; u bolnici sa 3 oceniti vreme kraće od tri sata dnevno posvećeno aktivnosti (radu ili hobiju), osim u lakšim poslovima

4= Nesposobnost da obavlja aktivnosti zbog sadašnje bolesti; u bolnici sa 4 oceniti neangažovanje u aktivnostima, osim u lakšim poslovima na odeljenju ili ako ni njih ne obavlja bez tuđe pomoći.

8. **RETARDACIJA**- usporenost mišljenja i govora, poremećaj koncentracije, snižena motorna aktivnost

0= Normalno govori i razmišlja

1= Blaga usporenost misli i govora

2= Očigledna usporenost pri razgovoru

3= Razgovor otežan

4= Potpni stupor

9. **AGITACIJA**- „zanima“ se rukama, krši ruke, lomi nokte

0= Nema teškoća

1= Vrpoljenje tokom razgovora

2= „Igra“ se sa kosom, rukama...

3= Ne može mirno da sedi, šeta po prostoriji

4= Krši ruke, grize nokte, čupka kosu, gricka usne

10. **PSIHIČKA ANKSIOZNOST**- napetost, iritabilnost, zabrinutost. Uplašeno iščekivanje i strahovi

0= Nema teškoća

1= Subjektivno- apetost i razdražljivost

2= Zabrinutost zbog beznačajnih stvari

3= Zastrašenost izražena u govoru ili vidljiva na licu

4= Ispoljava strahove (bez pitanja)

11. **SOMATSKA ANKSIOZNOST**- fiziološki korelati kao: gastrointestinalni, kardiovaskularno, respiratorni, urinarni, znojenje

0= Ne žali se

1= Blaga

2= Umereno

3= Teška

4= Onesposobljavajuća

12. **SOMATSKI GASTROINTESTINALNI SIMPTOMI**- gubitak apetita

0= Ne žali se

1= Gubitak apetita, mada jede bez podsticanja; oseća težinu u stomaku

2= Teško jede bez podsticanja; traži laksanse ili su mu potrebni laksansi ili lekovi za druge

13. **OPŠTI SOMATSKI SIMPTOMI**- osećaj težine, bolovi, gubitak energije, laka zamorljivost

0= Nema simptoma

1= Osećaj težine u udovima, leđima ili glavi; bolovi u leđima, glavobolja, bolovi u mišićima; gubitak energije i zamaranje

2= Svaki jasno izražen simptom oceniti sa 2

14. **GENITALNI SIMPTOMI**- gubitak libida, poremećaji menstrualnog ciklusa

0= Ne žali se

1= Blagi

2= Teški

15. **HIPOHONDRIJA**- preokupacija zdravljem, zahtevi za pomoć, hipohondrične sumanutosti

0= Ne žali se

1= Pažljivo prati svoje telesno stanje; zaokupljen je fizičkim pojavama

2= Preokupiranost zdravljem

3= Često se žali na smetnje, traži pomoć...

4= Hipohondrične samoobmane

16. **GUBITAK TELESNE MASE** (per anamnesis)

0= Nema gubitka telesne mase

1= Verovatan gubitak telesne mase zbog sadašnje bolesti

2= Neosporan gubitak telesne mase (prema izjavi pacijenta)

17. **SPOSOBNOST UVIĐANJA**- prihvata da je depresivan i bolestan, poriče da je depresivan

0= Svestan da je depresivan i bolestan

1= Prihvata da je bolestan, ali uzroke pripisuje premoru, hrani, klimi, virusima, potrebi za odmorom itd.

2= Poriče da je bolestan

18. **DNEVNA VARIJACIJA RASPOLOŽENJA**- simptomi najizraženiji ujutru i uveče

0= nema

1= Neke indikacije o dnevnim varijacijama

2= Jasno lošije ujutru, uveče ili popodne nego u neko drugo doba dana

19. **DEPERSONALIZACIJA I DEREALIZACIJA**- osećanje nestvarnosti, nihilističke ideje

0= Nema

1= nejasno osećanje sopstvene promene

2= Jasno i stalno osećanje nestvarnosti

20. **PARANOIDNOST**- sumnjičavost, ideje odnosa, sumanutost proganjanja

0= Nema

1= samosvesnost; nedostatak poverenja u druge, neodređene ideje uticaja, tendencija za optuživanjem drugih ljudi da mu smeju, radnje protiv njega u običnim sitnicama, itd. Reaguje na razumevanje

2= Paranoidni stav, ideje odnosa i/ili proganjanja, neodržene i nesistematizovane sumanutosti ili misli da mu drugi žele zlo

3= Aktivne i afektivno ispunjene paranoidne sumanutosti, donekle sistematizovano sumanuto raspoloženje. Ubeđen da mu drugi žele zlo.

4= Floridan; aktivno elaboriran, paranoidno sumanut sistem, intenzivno sumanuto raspoloženje, halucinacije.

21. **OPSESIVNO KOMPULZIVNI SIMPTOMI**

0= Nema

1= Nesigurni ili retki, nema značajne anksioznosti

2= Jasno prisutni i izražavaju anksioznost



**Prilog 6. Bekova skala za depresiju- BDI-II****Uputstvo:**

Upitnik se sastoji od 21 grupe izjava. Molimo vas, pročitajte pažljivo svaku grupu izjava i odaberite **jednu izjavu** iz svake grupe koja najbolje opisuje kako ste se osećali tokom **prethodne dve nedelje, uključujući i danas**. Zaokružite broj pored izjave koju ste odabrali. Ukoliko vam se čini da više izjava iz grupe podjednako odgovara vašem stanju, zaokružite najveći broj za tu grupu. Odaberite samo po jednu izjavu iz svake grupe, uključujući i stavke 16 (Izmene sna) ili 18 (Izmene apetita).

**1 Tuga**

- 0 Nisam tužan/na.
- 1 Tužan/na sam veći deo vremena.
- 2 Tužan/na sam sve vreme.
- 3 Toliko sam tužan/na ili nesrećan/na da ne mogu to da podnesem.

**2 Pesimizam**

- 0 Verujem u svoju budućnost.
- 1 Manje verujem u svoju budućnost nego ranije.
- 2 Ne očekujem da će se stvari odvijati povoljno po mene.
- 3 Moja budućnost je beznadežna i biće samo još gora.

**3 Raniji neuspesi**

- 0 Ne osećam se neuspešno.
- 1 Doživeo/la sam više neuspeha nego što je trebalo.
- 2 Kad pogledam unazad, vidim mnogo neuspeha.
- 3 Potpuno sam neuspešna osoba.

**4 Gubitak zadovoljstva**

- 0 Stvari u kojima uživam pružaju mi jednako zadovoljstva kao i ranije.
- 1 Ne uživam u stvarima kao nekad.
- 2 Osećam veoma malo zadovoljstva zbog stvari u kojima sam nekada uživao/la.
- 3 Ne osećam nikakvo zadovoljstvo zbog stvari u kojima sam nekada uživao/la.

**5 Osećaj krivice**

- 0 Ne osećam neku posebnu krivicu.
- 1 Osećam krivicu zbog mnogih stvari koje sam uradio/la ili je trebalo da uradim.
- 2 Osećam krivicu veći deo vremena.
- 3 Osećam krivicu sve vreme.

**6 Osećaj kazne**

- 0 Ne osećam se kažnjeno.
- 1 Osećam da ću možda biti kažnjen/a.
- 2 Očekujem da ću biti kažnjen/a.
- 3 Osećam da sam kažnjen/a.

**7 Nedostatak samodopadanja**

- 0 Prema sebi osećam isto što i uvek.
- 1 Izgubio/la sam poverenje u sebe.
- 2 Razočaran/a sam sobom.
- 3 Ne volim sebe

**8 Samokritičnost**

- 0 Ne kritikujem ili krivim sebe više nego obično.
- 1 Kritikujem sebe više nego ranije.
- 2 Prebacujem sebi sve svoje greške.
- 3 Krivim sebe za sve loše što se dogodi.

### **9 Suicidalne misli ili želje**

- 0 Ne razmišljam o samoubistvu.
- 1 Razmišljam o samoubistvu, ali ne bih to učinio/la.
- 2 Želim da se ubijem.
- 3 Ubio/la bih se da imam priliku.

### **10 Plačljivost**

- 0 Ne plačem više nego ranije.
- 1 Plačem više nego ranije.
- 2 Plačem zbog svake sitnice.
- 3 Plače mi se, a ne mogu.

### **11 Uznemirenost**

- 0 Ne osećam veći nemir ili napetost nego obično.
- 1 Osećam veći nemir ili napetost nego obično.
- 2 Osećam toliki nemir ili uznemirenost da mi je teško da budem na jednom mestu.
- 3 Osećam toliki nemir ili uznemirenost da moram stalno da se krećem ili nešto da radim.

### **12 Gubitak interesovanja**

- 0 Nisam izgubio/la interesovanje za ljude ili aktivnosti.
- 1 Ljudi ili stvari zanimaju me manje nego ranije.
- 2 Izgubio/la sam većinu interesovanja za ljude ili stvari.
- 3 Ne interesuje me gotovo ništa.

### **13 Neodlučnost**

- 0 Donosim odluke jednako lako kao i uvek.
- 1 Teže donosim odluke nego ranije.
- 2 Znatno teže donosim odluke nego ranije.
- 3 Teško donosim bilo kakvu odluku.

### **14 Bezvrednost**

- 0 Ne osećam se bezvredno.
- 1 Ne osećam se vrednim/om i korisnim/om kao ranije.
- 2 Osećam da manje vredim od drugih ljudi.
- 3 Osećam se potpuno bezvredno.

### **15 Gubitak energije**

- 0 Imam istu količinu energije kao i uvek.
- 1 Imam manje energije nego ranije.
- 2 Nemam dovoljno energije da mnogo toga uradim.
- 3 Nemam energije ni za šta

### **16 Izmene sna**

- 0 Nemam nikakvih izmena sna.
- 1a Spavam malo više nego obično.
- 1b Spavam malo manje nego obično.
- 2a Spavam mnogo više nego obično.
- 2b Spavam mnogo manje nego obično.
- 3a Spavam veći deo dana.
- 3b Budim se 1-2 sata ranije i ne mogu ponovo da zaspim.

### **17 Razdražljivost**

- 0 Nisam razdražljiviji/a nego obično.
- 1 Razdražljiviji/a sam nego obično.
- 2 Mnogo sam više razdražljiv/a nego obično.
- 3 Razdražljiv/a sam sve vreme.

**18 Izmene apetita**

- 0 Nemam izmena u apetitu.
- 1a Apetit mi je nešto manji nego obično.
- 1b Apetit mi je nešto veći nego obično.
- 2a Apetit mi je mnogo manji nego ranije.
- 2b Apetit mi je mnogo veći nego obično.
- 3a Uopšte nemam apetita.
- 3b Žudim za hranom sve vreme.

**19 Teškoće koncentracije**

- 0 Koncentrišem se isto kao i uvek.
- 1 Ne koncentrišem se dobro kao obično.
- 2 Teško mi je da se duže koncentrišem na bilo šta
- 3 Ne mogu da se koncentrišem ni na šta.

**20 Zamor ili premor**

- 0 Nisam umoran/na niti zamoren/a više nego obično.
- 1 Lakše se umaram ili zamaram nego obično.
- 2 Previše sam umoran/na ili zamoren/a za mnoge stvari koje sam inače radio/la.
- 3 Previše sam umoran/na ili zamoren/a za većinu stvari koje sam inače radio/la.

**21 Gubitak seksualnog interesovanja**

- 0 Nisam primetio/la promenu seksualnog interesovanja u skorije vreme.
- 1 Seks me interesuje manje nego ranije.
- 2 Seks me mnogo manje interesuje sada.
- 3 Potpuno sam izgubio/la interesovanje za seks.

**Prilog 7. Hamiltonova skala anksioznosti**

0 – ne postoji; 1 – slabo (retko); 2 – povremeno (umereno); 3 – često (izraženo);

4 – stalno (onesopsobljavajuće)

<b>1. Anksioznost</b>					
Briga, brižnost, anticipacija (predviđanje) najlošije mogućnosti, strah, razdražljivost	0	1	2	3	4
<b>2. Napetost</b>					
Osećaj napetosti, umora, trzaji prilikom neočekivanog zvuka, plačljivost, ustreptalost, uznemirenost, nemogućnost opuštanja i relaksacije	0	1	2	3	4
<b>3. Strah od:</b>					
Mraka, nepoznatih ljudi, napuštanja, životinja, saobraćaja, gužve	0	1	2	3	4
<b>4. Nesanica</b>					
Poteškoće u zaspivanju, anak zadovoljstva u aktivnostima koje su ranije pricinjavale zadovoljstisprekidan san, osećaj umora nakon spavanja, noćne more, košmari	0	1	2	3	4
<b>5. Intelektualne teškoće</b>					
Otežana koncentracija, problem, i sa upamćivanjem	0	1	2	3	4
<b>6. Depresivno raspoloženje</b>					
Gubitak interesovanja, izostanak zadovoljstva u aktivnostima koje su ranije pricinjavale zadovoljstvo (npr. hobi), depresivno raspoloženje, dnevne varijacije raspoloženja	0	1	2	3	4
<b>7. Somatski (mišićni) simptomi</b>					
Bolovi, trzajevi, ukočenost, grčevi, škr gutanje zubima, zastajkivanje u govoru, osećaj povećanog tonusa (ukočenosti u mišićima	0	1	2	3	4
<b>8. Somatski (senzorni) simptomi</b>					
Zujanje u ušima, zamucenje vida, naleti osećaja toplote i hladnoće, malaksalost, osećaj bockanja i trnjenja.	0	1	2	3	4
<b>9. KV simptomi</b>					
Osećaj lupanja i treperenja srca, bol u grudima, pulsacije krvnih sudova, nesvestica, izostanak srčanih otkucaja	0	1	2	3	4
<b>10. Respiratorni simptomi</b>					
Osećaj pritiska i teskobe u grudima, gušenje, nedostatak vazduha, česti uzdasi, nepravilnog disanja.	0	1	2	3	4

**11. GIT simptomi**

Teškoće gutanja, bol u stomaku, osećaj nadutosti u stomaku, mučnina, povraćanje, gubitak težine, opstipacija. 0 1 2 3 4

**12. Genitourinarni simptomi**

Učestalo mokrenje, urgencija (neodložno) mokrenje, izostanak menstruacije, seksualna neosetljivost, prerana ejakulacija, gubitak seksualne želje, impotencija 0 1 2 3 4

**13. Neurovegetativni simptomi**

Suvoća usta, bledilo, znojenje, vrtoglavica, glavobolja, osećaj podizanja kose 0 1 2 3 4

**14. Ponašanje tokom intervjua**

Vrpoljenje, nemir, „ne drži ga mesto“, tremuloznost ruku, naborano čelo, česti uzdasi, ubrzano disanje, bledilo, često gutanje i sl. 0 1 2 3 4

## Prilog 8. Skala apatije

Pitanje	Odgovor			
Da li ste zainteresovani za učenje novih stvari?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li ste zainteresovani za bilo šta?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li ste zabinuti zbog svoje bolesti?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li ulažete puno napora u obavljanju poslova?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li stalno tražite nešto što bi ste radili?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li imate planove i ciljeve za budućnost?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li ste motivisani?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li imate energije za svakodnevne aktivnosti?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li neko mora svakog dana da vam kaže šta da radite?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li ste ravnodušni prema stvarima?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li vas mnoge stvari ne dotiču?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li vam je potreban podsticaj da bi ste nešto započeli?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li se osećate ni srećno ni tužno, već negde između?	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma
Da li smatrate da ste apatični	Nimalo	Pomalo	Donekle	Veoma

Prilog 9. Upitnik o nemotornim simptomima PB (Non-motor symptoms questionnaire<sup>202</sup>)

1. Curenje pljuvačke tokom dana	DA	NE
2. Gubitak ili smanjenje osećaja ukusa ili mirisa	DA	NE
3. Teškoće sa gutanjem hrane ili pića ili problemi sa gušenjem	DA	NE
4. Povraćanje ili mučnina	DA	NE
5. Zatvor (manje od 3 stolice nedeljno) ili neophodnost naprezanja da biste mogli da imate stolicu	DA	NE
6. Nemogućnost zadržavanja stolice	DA	NE
7. Osećaj da je pražnjenje creva bilo nepotpuno kad izadjete iz toaleta	DA	NE
8. Urgencija mokrenja zbog koje morate da žurite u toalet	DA	NE
9. Redovno noćno ustajanje da biste mokrili	DA	NE
10. Neobjašnjeni bolovi (ne zbog poznatih stanja kao što je artritis)	DA	NE
11. Neobjašnjene promene telesne mase (nevezane za način ishrane)	DA	NE
12. Problem sa prisećanjem događaja koji su se nedavno odigrali ili zaboravljanje da uradite stvari	DA	NE
13. Gubitak interesovanja za dešavanja oko vas ili za obavljanje poslova	DA	NE
14. Vidite ili čujete nešto za šta znate da ne postoji	DA	NE
15. Teškoće sa koncentrisanjem i održavanjem pažnje	DA	NE
16. Osećanje tuge i neraspoloženja	DA	NE
17. Osećanje napetosti, straha ili panike	DA	NE
18. Osećanje da ste više ili manje zainteresovani za seks nego ranije	DA	NE
19. Teško Vam je da imate seksualni odnos kad pokušate	DA	NE
20. Osećaj nesvestice, vrtoglavice ili slabosti pri ustajanju iz sedećeg ili stojećeg položaja.	DA	NE
21. Padovi	DA	NE
22. Teškoće da ostanete budni tokom aktivnosti kao što su rad, vožnja ili jelo	DA	NE
23. Teškoća da zaspate uveče ili budjenje u toku noći	DA	NE
24. Intenzivni, živi snovi ili zastrašujući snovi	DA	NE
25. Govor ili pokretanje u snu kao da izvodite san	DA	NE
26. Neprijatan osećaj u nogama za vreme odmora i osećaj da morate da se krećete	DA	NE
27. Oticanje nogu	DA	NE
28. Prekomerno znojenje	DA	NE
29. Duple slike	DA	NE
30. Verujete da se oko vas dešavaju stvari za koje drugi kažu da nisu tačne	DA	NE

## Prilog 10. Addenbrooke-ovo kognitivno testiranje (Addenbrooke's Cognitive Examination (ACE))

**ORIJENTACIJA I PAŽNJA****VREMENSKA ORIJENTACIJA**

\*Skor (0-5)\_\_\_\_\_

1. Recite mi današnji datum ili koji je dan u mesecu !	
2. Kažite mi koja je godina !	
3. Recite mi koji je mesec !	
4. Recite mi koji je danas dan (u nedelji)	
5. Recite mi koliko je sati !	

**PROSTORNA ORIJENTACIJA**

\*Skor (0-5)\_\_\_\_\_

1. Recite mi naziv ove ustanove.	
2. Recite mi na kom se spratu sada nalazimo.	
3. Recite mi u kom se gradu nalazimo.	
4 Recite mi kako se zove naša republika	
5. Recite mi kako se zove naša država.	

**REGISTRACIJA**

\*Skor (0-3)\_\_\_\_\_

"Sada ću vam reći tri reči, a zatim ih vi ponovite za mnom". Nakon što pacijent ponovi sve tri reči, recite: „ Kasnije ću od vas tražiti da ih ponovite, zato se potrudite da ih zapamtite". (bodujte samo prvi pokušaj, ali ukoliko je to neophodno ponovite ih tri puta) ...zapišite broj ponavljanja \_\_\_\_\_

lopta	
zastava	
drvo	

**PAŽNJA I KONCENTRACIJA**

\*Skor (0-5)\_\_\_\_\_

„Oduzimajte od 100-7, tako redom nastavite da oduzimate po 7 sve dok vam ne kažem da stanete!“

(93, 86, 79, 72, 65).

„ Kako glasi reč VRATA kada bi se čitala unazad“ (bodovati bolje urađen zadatak)



**PAMĆENJE***PAMĆENJE – Prisećanje**\*Skor (0-3)\_\_\_\_\_*

'Koje tri reči sam malo pre rekla da ponovite i da ih zapamtite?'

*PAMĆENJE – Anterogradna memorija**Skor (0-7)\_\_\_\_\_*

„Sada ću Vam reći jedno ime, prezime i adresu. Molim Vas da ih ponovite za mnom. Ponoviću ih 3 puta, tako da imate vremena da naučite! Zapamtite jer ću Vas posle pitati ove podatke!“

Bodujte samo treći pokušaj.

	1 <sup>o</sup> pokušaj	2 <sup>o</sup> pokušaj	3 <sup>o</sup> pokušaj
<i>Marko Petrović</i>	.....	.....	.....
<i>Kneginje Ljubice 14</i>	.....	.....	.....
<i>Zrenjanin</i>	.....	.....	.....
<i>Srbija</i>	.....	.....	.....

*PAMĆENJE – Retrogradna memorija**Skor (0-4)\_\_\_\_\_*

1. Kako se zove naš sadašnji predsednik države	
2. Kako se zvao bivši predsednik države	
3. Kako se zove poglavar Srpske Pravoslavne Crkve	
4. Kako se zove sadašnji predsednik Rusije?	

**FLUENTNOST***FONEMSKA FLUENTNOST**Skor (0-7)\_\_\_\_\_*

„Nabrajjajte mi što više reči koje počinju na slovo „S“, ali ne uključujući imena ljudi, gradova i sl.“ Skoruje se broj reči u minutu.

				>17	7
				14-17	6
				11-13	5
				8-10	4
				6-7	3
				4-5	2
				2-3	1
				<2	0

**KATEGORIJALNA FLUENTNOST**

Skor (0-7) \_\_\_\_\_

„Nabrajjajte mi što više životinja koje Vam padnu na pamet, domaće, divlje...“

				>21	7
				17-21	6
				14-16	5
				11-13	4
				9-10	3
				7-8	2
				5-6	1
				<5	0

**JEZIK****PRAĆENJE VERBALNIH INSTRUKCIJA**

\*Skor (0-1) \_\_\_\_\_

"Molim vas pročitajte ovu rečenicu i uradite to što piše!"

# Zatvorite oči

**TROSTRUKI NALOG**

\*Skor (0-3) \_\_\_\_\_

„Uzmite ovaj papir desnom rukom, savijte ga na pola i bacite ga na pod.“

**PISANJE**

\*Skor (0-1) \_\_\_\_\_

„Smislite sami bilo koju rečenicu i napišite je.“

**PONAVLJANJE**

Molim Vas ponovljajte za mnom

„Krokodil, ekscentričnost, neinteligentan, statističar“

Skor (0-2) \_\_\_\_\_

[SKOR 2-ako sve izgovori tačno; 1 za 3 reči; 0 za 2 reči ili manje]

„Pre i posle svega“

Skor (0-1) \_\_\_\_\_

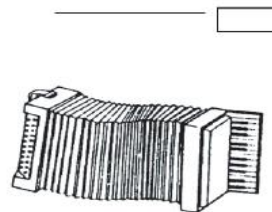
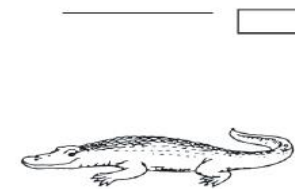
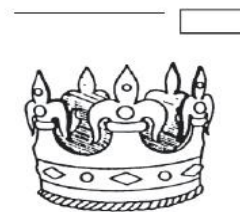
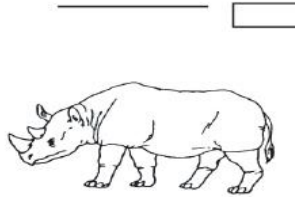
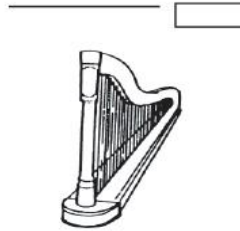
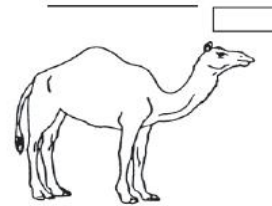
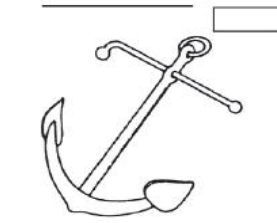
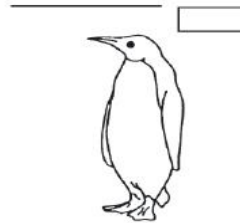
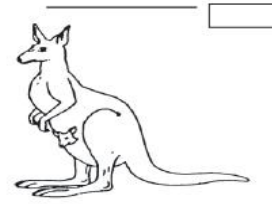
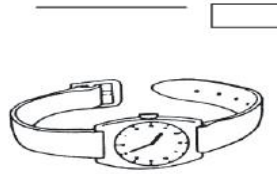
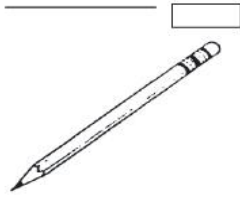
„Nema ali i niti ako“

\*Skor (0-1) \_\_\_\_\_

IMENOVANJE

\*MMSE Skor- olovka, sat (0-2)\_\_\_

ACE Skor (0-12)\_\_\_



RAZUMEVANJE

Skor (0-1)\_\_\_

Koristeći gore nacrtane figure, pitajte pacijenta:

Koja od ovih figura Vas asocira na monarhiju?

Koja od ovih figura se odnosi na torbare?

Koja od ovih figura ima veze sa Antarktikom?

Koja od ovih figura ima veze sa moreplovstvom?

ČITANJE

Skor (0-1) \_\_\_\_\_

**seljak**

**biljka**

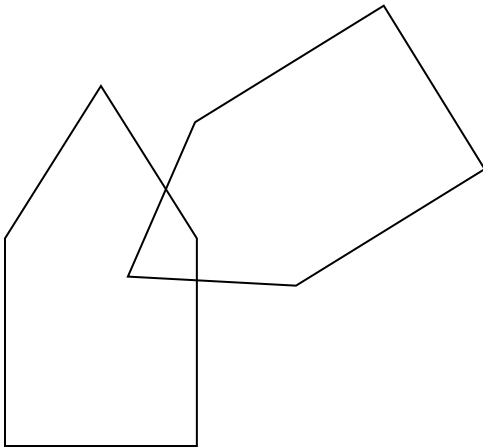
**otvoren**

**mašina**

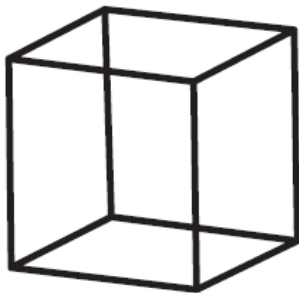
**vatra**

**VIZUOSPACIJALNE SPOSOBNOSTI**

Zamolite pacijenta da nacрта istu figuru pored:



\*Skor (0-1) \_\_\_\_\_



Skor (0-1) \_\_\_\_\_

Skor (0-5) \_\_\_\_\_

**TEST CRTANJA SATA**

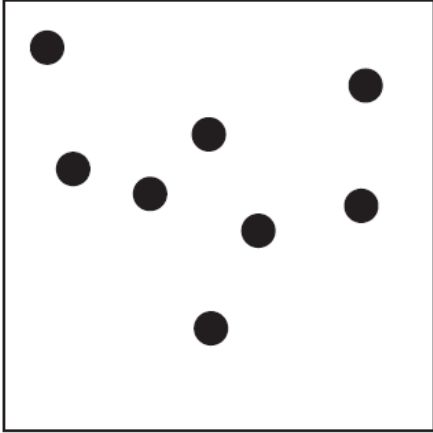
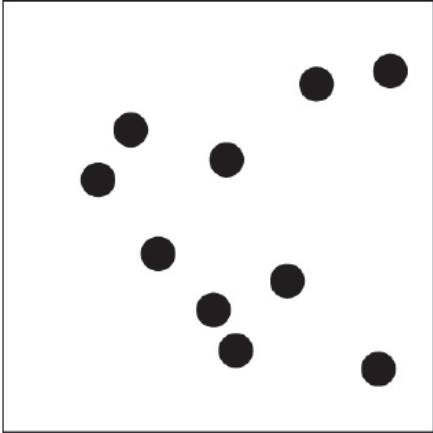
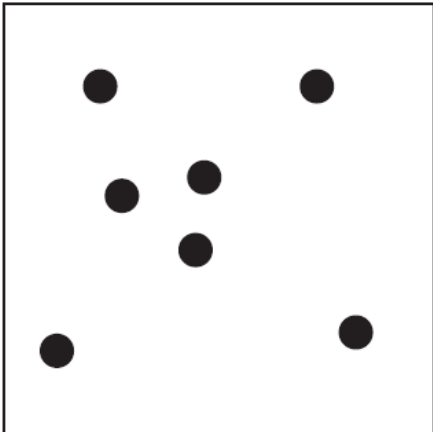
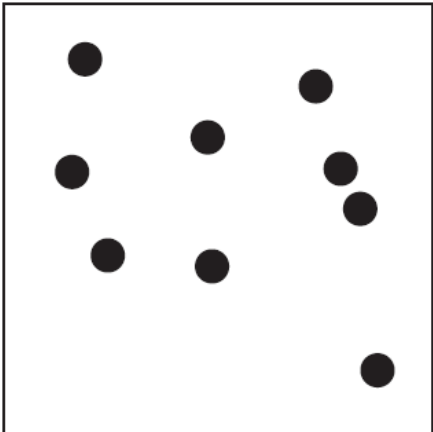
„Nacrtajte sat sa brojevima i kazaljke koje pokazuju da je 5 h i 10 min“.

(bodovanje: krug = 1, brojevi = 2, kazaljke = 2 u koliko je tačno)

PERCEPCIJA

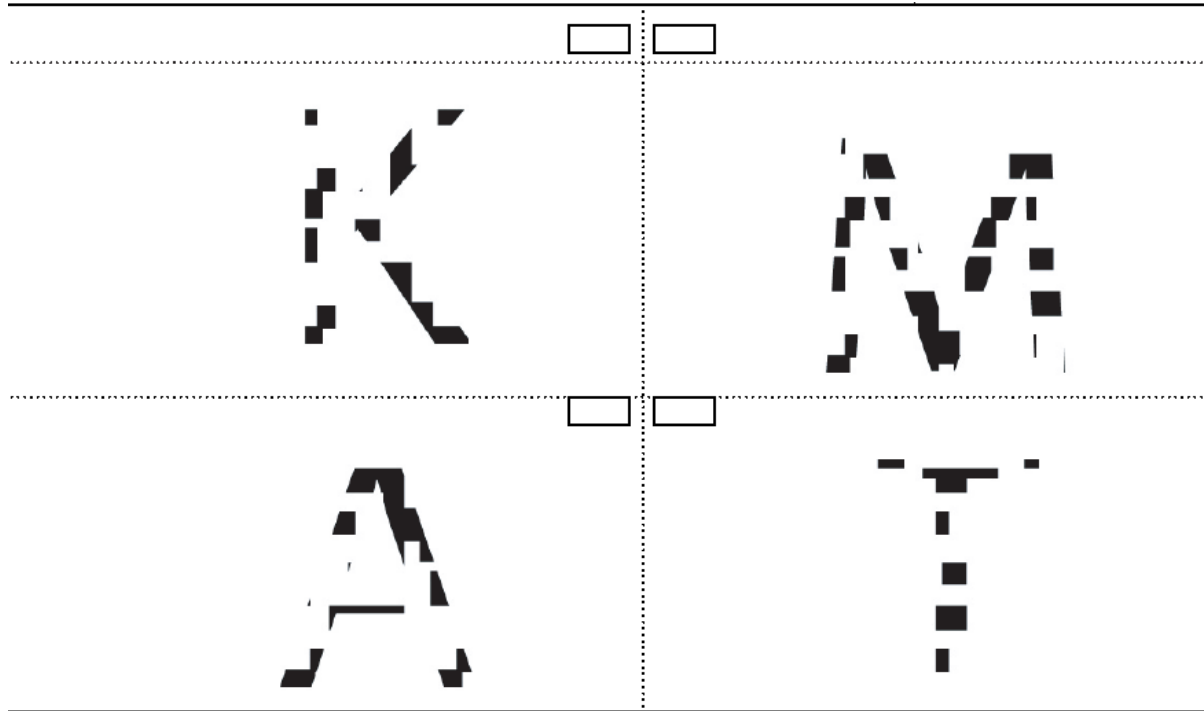
Skor (0-4) \_\_\_\_\_

„Izbrojte mi koliko ima tačkica na ovim slikama, ali bez pokazivanja na njih“

<input type="text"/>	<input type="text"/>
	
<input type="text"/>	<input type="text"/>
	

„Recite mi koja su ovo slova!“

Skor (0-4) \_\_\_\_\_



PRISEĆANJE

Skor (0-7) \_\_\_\_\_

„ Da li se sećate onog imena i prezimena i adrese koju sam Vam pre nekoliko minuta rekla?“

Marko Petrović .....

Kneginje Ljubice 14 .....

Zrenjanin .....

Srbija .....

REKOGNICIJA

Skor (0-7) \_\_\_\_\_

Ovaj test se radi ukoliko pacijent se ne seti jednog ili više podataka iz prethodnog zadatka. Ukoliko je sve pogodio, preskočite ovo pitanje i dajte 5 bodova.

Miloš Petrović	Marko Petrović	Petar Marković	prisećanje	
Kneginje Zorke	Carice Milice	Kneginje Ljubice	prisećanje	
41	14	16	prisećanje	
Zaječar	Zrenjanin	Beograd	prisećanje	
Srbija	Crna Gora	Vojvodina	prisećanje	

Skorovi	
Pažnja/orijentacija/18	
Pamćenje/26	
Fluentnost/14	
Jezik/26	
Vizuospacijalne sposobnosti/16	
Ukupan skor ACE/100	
*MMSE/30	

## Prilog 11. A frontal assessment battery at bedside- FAB

## 1. Sličnosti (konceptualizacija)

“Po čemu su slični, odnosno šta je zajedničko za...?”

Pomorandžu i bananu (Ako pacijent totalno pogreši I kaže: “nema nikakve sličnosti” ili delimično pogrešno odgovori: “slični su po tome što imaju koru,” podstaknite pacijenta tako što ćete reći: “i pomorandža i banana su...”; ali skorujte 0 za ovo pitanje; nemojte pomagati pacijentu za sledeća dva podpitanja

Sto i stolica

Lala, ruža I narcis

Bodovanje (samo odgovori koji podrazumevaju kategorisanje nabrojanih reči se smatraju korektnim [voće, nameštaj, cveće]

Broj korektnih odgovora: 3 2 1 0

## 2. Fonemska fluentnost (mentalna fleksibilnost)

“Pokušajte da mi nabrojite što više reči koje počinju slovom ‘S,’ bilo koje reči ali izuzimajući vlastite imenice, odnosno imena ljudi, gradova I sl.” Ako pacijent u prvih pet sekundi ne kaže ni jednu reč, podstaknite ga: “ npr. stolica.” Ako pacijent opet ne kaže ni jednu reč u narednih 10 sekundi, ponovite: “bilo koja reč koja počinje na slovo ‘S’ “. Vreme je ograničeno na 60 sekundi.

Bodovanje ( ne boduju se ponovljene reči, varijacije istih reči tipa lim, limar I sl., kao I gore pomenute vlastite imenice)

Više od 9 reči: 3 boda; od 6 do 9 reči: 2 boda; od 3 do 5 reči: 1 bod; manje od 3 reči: 0 bodova.

## 3. Motorne serije (programiranje)

“Pogledajte pažljivo u mene I obratite pažnju na ono što ću sada da uradim.”

Ispitivač, koji sedi naspram pacijenta, tri puta uzastopno levom rukom treba da ponovi Luria seriju “pesnica–ivica–dlan.”

“Sada, sa vašom desnom rukom uradite istu ovu seriju pokreta, prvo ćemo zajedno, a potom vi sami.”

Ispitivač ponavlja Lurija seriju tri puta sa pacijentom, a potom mu kaže: “Sada, uradite isto ovo sami, bez moje pomoći.”

Bodovanje

Ako pacijent korektno uradi svih 6 serija uzastopno: 3 boda

Ako pacijent korektno uradi najmanje 3 serije uzastopno, ali u delu testa kada to radi samostalno: 2 boda

Ako pacijent ne može da uradi ni jednu seriju samostalno, ali sva tri puta kada radi paralelno sa ispitivačem izvede korektno: 1 bod



Pacijent ne može da izvede korektno tri uzastopne serije, čak i kada radi paralelno sa ispitivačem: 0 bodova

#### 4. Konfliktne instrukcije (senzitivnost na smetnju)

“Kada ja tapšem jednom, Vi tapšite 2 puta”

Da bi bili sigurni da je pacijent razumeo šta se traži od njega da uradi, dozvoljeno je tri puta ponoviti ovu seriju: 1-1-1.

“A kada, ja tapšem dva puta, Vi treba jednom.”

Da bi bili sigurni da je pacijent razumeo šta se traži od njega da uradi, dozvoljeno je tri puta ponoviti ovu seriju: 2-2-2.

Potom ispitivač treba da izvede sledeću seriju:

1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.

#### Bodovanje

Bez greške: 3 boda; jedna ili dve greške: 2 boda; više od dve greške: 1 bod; ako pacijent tapše isto kao i ispitivač najmanje 4 puta uzastopno: 0 bodova.

#### 5. Go–No Go (kontrola inhibicije)

“Kada ja tapšem jednom i Vi tapšite isto jednom.”

Da bi bili sigurni da je pacijent razumeo šta se traži od njega da uradi, dozvoljeno je tri puta ponoviti ovu seriju: 1-1-1.

“Kada ja tapšem 2 puta, Vi nemojte tapšati”

Da bi bili sigurni da je pacijent razumeo šta se traži od njega da uradi, dozvoljeno je tri puta ponoviti ovu seriju: 2-2-2. Potom ispitivač treba da izvede sledeću seriju: 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.

#### Bodovanje

Bez greške: 3 boda; jedna ili dve greške: 2 boda; više od dve greške: 1 bod; ako pacijent tapše isto kao i ispitivač najmanje 4 puta uzastopno: 0 bodova.

#### 6. Prihvatanje ponašanja (sredinska autonomija)

“Nemojte sada dodirivati moje ruke.”

Ispitivač sedi naspram pacijenta; potom namešta šake pacijenta sa dlanovima okrenutim na gore na njegova kolena. Potom, ispitivač ne treba ništa da govori, niti da gleda u pacijenta, prinosi svoje ruke blizu ruku pacijenta i dodiruje dlanove na obe ruke, da bi video da li će pacijent spontano da zgrabi njegove ruke. Ukoliko ga pacijent uzme za ruku, ispitivač treba da ponovo kaže “Molim Vas, nemojte sada dodirivati moje ruke.”

#### Bodovanje

Pacijent nije uhvatio šake ispitivača: 3 boda; pacijent okleva i pita ispitivača šta treba da uradi: 2 boda; pacijent hvata ispitivača za šake bez oklevanja: 1 bod; pacijent hvata ispitivača za šake posle ponovljene instrukcije da to ne radi: 0 bodova.

## BIOGRAFIJA

Dr Nikola Kresojević je rođen 14.11.1981. godine u Valjevu, gde je završio osnovnu školu i Valjevsku gimnaziju. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2000/2001. godine, a završio 2008. godine sa prosečnom ocenom 8.51. Doktorske studije iz epidemiologije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2009/2010. godine. Od 2009. do 2011. godine bio je zaposlen na Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, gde je u zvanju istraživača pripravnika u periodu 2009-2010. godine, a potom je izabran u zvanje istraživača saradnika. Od 2009. do 2011. godine bio je saradnik na projektima broj 156011 i 145083, a od 2011. godine je saradnik na projektu broj 175090 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod rukovodstvom Akademika Prof. dr Vladimira Kostića. Od 2011. godine zaposlen je kao lekar na Klinici za neurologiju Kliničkog Centra Srbije. Specijalizaciju iz oblasti neurologije upisao je 2014. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Kao stipendista EFNSa, tokom 2010. godine usavršavao se u Tel Avivu pod mentorstvom Prof. Nir Giladija.

Član je Srpskog lekarskog društva, Društva neurologa Srbije, Evropske federacije neuroloških društava i Movement disorders society.

Dr Kresojević govori engleski jezik.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani: Nikola Kresojević

broj upisa EP-05/09

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**UČESTALOST I SPECIFIČNOST ISPOLJAVANJA PARKINSONOVE BOLESTI KOD HOMOZIGOTNIH I HETEROZIGOTNIH NOSILACA MUTACIJE GENA ZA GLUKOCEREBROZIDAZU**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

28. 04. 2016

Potpis doktoranda

N. Kresojević

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nikola Kresojević

Broj upisa: EP-05/09

Studijski program: Epidemiologija

Naslov rada: UČESTALOST I SPECIFIČNOST ISPOLJAVANJA PARKINSONOVE BOLESTI KOD HOMOZIGOTNIH I HETEROZIGOTNIH NOSILACA MUTACIJE GENA ZA GLUKOCEREBROZIDAZU

Mentor: prof. dr Vladimir Kostić

Potpisani: Nikola Kresojević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 28.04.2016.

Potpis doktoranda

N. Kresojević

Prilog 3.

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

#### **UČESTALOST I SPECIFIČNOST ISPOLJAVANJA PARKINSONOVE BOLESTI KOD HOMOZIGOTNIH I HETEROZIGOTNIH NOSILACA MUTACIJE GENA ZA GLUKOCEREBROZIDAZU**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu,

28. 04. 2016

Potpis doktoranda

N. Urošević

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.