

НОВЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ СТРАТЕГИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ МЕТАХРОМАТИЧЕСКОЙ ЛЕЙКОДИСТРОФИИ

А.А. Шаймарданова, Д.С. Чулпанова, В.В. Соловьева,
А.И. Муллагулова, К.В. Китаева, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Поступила: 09.04.2020
Принята к печати: 01.06.2020
Опубликована on-line:

NEW THERAPEUTIC STRATEGIES FOR THE TREATMENT OF METACHROMATIC LEUKODYSTROPHY

A.A. Shaimardanova, D.S. Chulpanova, V.V. Solovyeva, A.I. Mullagulova,
K.V. Kitaeva, A.A. Rizvanov

Kazan Federal University, Kazan, Russia

e-mail: rizvanov@gmail.com

Метахроматическая лейкодистрофия — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления, которое характеризуется поражением миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной и периферической нервной системы. Заболевание возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (ARSA) (OMIM 250100) или белка-активатора сапозина В (SapB) (OMIM 249900) и клинически проявляется прогрессирующей двигательной и когнитивной недостаточностью у пациентов. Причиной недостаточности белков ARSA и SapB являются мутации генов *ARSA* и *PSAP*, соответственно. Тяжесть клинических признаков при метахроматической лейкодистрофии определяется уровнем остаточной активности фермента ARSA, зависящей от типа (вида) мутации. В настоящее время не существует эффективного лечения данного заболевания. Описаны клинические случаи применения трансплантации костного мозга или пуповинной крови, однако терапевтическая эффективность данных методов остается недостаточной для предотвращения усугубления неврологических нарушений у пациентов. Обнадешивающие результаты получены с использованием методов генной терапии для доставки гена *ARSA* дикого типа с помощью векторов на основе различных серотипов адено-ассоциированных вирусов, а также с применением мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и комбинированной генно-клеточной терапии. В обзоре обсуждаются терапевтические стратегии для лечения метахроматической лейкодистрофии, а также методы диагностики этой патологии.

Ключевые слова: метахроматическая лейкодистрофия, арилсульфатаза А, сапозин В, генная терапия, трансплантация костного мозга, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки.

Введение

Метахроматическая лейкодистрофия (МЛД) — аутосомно-рецессивное наследственное нейродегенеративное заболевание, относящееся к группе лизосомных болезней накопления (ЛБН), которое характеризуется поражением миелиновой оболочки, покрывающей большинство нервных волокон центральной (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС). МЛД возникает вследствие дефицита лизосомного фермента арилсульфатазы А (arylsulfatase A, ARSA) (OMIM 250100) или белка-активатора сапозина В (saposin B, SapB) (OMIM 249900). Клинически МЛД проявляется прогрессирующей двигательной и когнитивной недостаточностью у пациентов [1]. МЛД является одной из наиболее распространенных лейкодистрофий с частотой встречаемости 1:40000, что соответствует приблизительно 160 000 человек в мире. В некоторых обособленных популяциях частота встречаемости МЛД значительно выше, например, в группе хаббанитов (евреи) — 1:75, у индейского народа навахо — 1:2500, у арабских групп Израиля — 1:8000 [2].

Metachromatic leukodystrophy is an autosomal recessive hereditary neurodegenerative disease belonging to the group of lysosomal storage diseases, which is characterized by the damage of the myelin sheath that covers most of the nerve fibers of the central and peripheral nervous systems. Metachromatic leukodystrophy caused by the deficiency of arylsulfatase A (ARSA) lysosomal enzyme (OMIM 250100) or sphingolipid activator protein B (SapB or saposin B) (OMIM 249900). Clinical manifestations of metachromatic leukodystrophy are progressive motor and cognitive impairment in patients. ARSA and SapB protein deficiency are caused by the mutations in the *ARSA* and *PSAP* genes, respectively. The severity of clinical signs in metachromatic leukodystrophy is determined by the residual ARSA activity, depending on the type of mutation. There is currently no effective treatment for this disease. Clinical cases of bone marrow or cord blood transplantation have been described, however, the therapeutic effectiveness of these methods remains insufficient to prevent aggravation of neurological disorders in patients. Encouraging results were obtained using gene therapy for delivering the wild-type *ARSA* gene using vectors based on various serotypes of adeno-associated viruses, as well as using mesenchymal stem cells and combined gene-cell therapy. This review discusses therapeutic strategies for the treatment of metachromatic leukodystrophy, as well as diagnostic methods for this disease.

Keywords: metachromatic leukodystrophy, arylsulfatase A, saposin B, gene therapy, bone marrow transplantation, mesenchymal stem cells.

При ЛБН нерасщепленные макромолекулы накапливаются внутри лизосом и со временем мигрируют в другие клеточные компартменты. Прогрессирование заболевания и нарушение функции лизосом приводят к вторичному дефициту других лизосомных ферментов, следствием чего является полное нарушение функционирования лизосомной системы. При этом образуется большое количество лизосом, однако вновь образованные лизосомы также нефункциональны из-за наследственных нарушений. Таким образом, лизосомная система отключается, что вызывает нарушения эндоцитоза, аутофагии, индуцирует воспалительные реакции и гибель пораженной клетки [3].

МЛД получила свое название из-за наличия метахроматических гранул в пораженных клетках, образованных в результате накопления сульфатидов — сфинголипидов, содержащихся в миелине. При МЛД сульфатиды накапливаются в олигодендроцитах, микроглии, нейронах ЦНС, шванновских клетках, макрофагах ПНС, а также в клетках внутренних органов, например, желчного пузыря, из-за чего повышается вероятность

возникновения злокачественных новообразований этого органа [4–10].

При МЛД происходит демиелинизация, которая влечет за собой нарушение двигательной функции, спастический тетрапарез, атаксию, судороги, атрофию зрительного нерва и когнитивные расстройства [11, 12]. Точные механизмы демиелинизации при МЛД остаются неизвестными. Предполагают, что причинами демиелинизации являются повышение уровня сульфатидов и уменьшение количества продуктов их расщепления, что обуславливает нестабильность миелиновой оболочки [13]. Кроме того, накопление сульфатидов на мембране эндоплазматического ретикулула вызывает выделение кальция в цитоплазму и изменение кальциевого гомеостаза приводит к клеточному стрессу и апоптозу [9].

Накопление сульфатидов ведет к дегенерации нейронов, дисфункции астроцитов и к запуску воспалительного ответа: у пациентов с МЛД как в плазме, так и в спинномозговой жидкости повышены уровни моноцитарного хемотаксического белка 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1), антагониста рецептора интерлейкина 1 (interleukin (IL)-1 receptor antagonist, IL-1Ra), IL-8, макрофагального белка воспаления 1β (macrophage inflammatory protein-1 β , MIP-1 β) и сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF). Данные цитокины могут стать биомаркерами для выявления МЛД на ранних стадиях и для анализа прогрессии заболевания [14]. При МЛД может отмечаться отсутствие корреляции между демиелинизацией и наличием метакроматического материала. Таким образом, активация комплемента через альтернативный путь усиливает повреждение миелина при МЛД, индуцируя или усиливая иммунный ответ против миелина [15]. Накопление сульфатида и демиелинизация в ПНС способны индуцировать высвобождение воспалительных цитокинов, активировать эндоневральные макрофаги, а также рекрутировать воспалительные миелиоидные клетки и лимфоциты с периферии. Эти процессы участвуют в апоптозе и могут привести к прогрессированию демиелинизации и нейровоспаления, что происходит и при некоторых других метаболических и нейродегенеративных заболеваниях, например, при множественном дефиците сульфатазы, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, болезни Шарко-Мари-Тута [16].

Для деградации сульфатидов и поддержания нормальной жизнедеятельности человека достаточно 10–15% ферментативной активности ARSA [17]. Существует псевдодефицит ARSA, при котором наблюдается низкая ферментативная активность ARSA (около 5–20%), но фенотип заболевания не проявляется, так как остаточная активность фермента достаточна для катаболизма природного субстрата [18]. В некоторых случаях может синтезироваться укороченный белок, но без изменения активности [19]. Предполагают, что псевдодефицит ARSA может быть ассоциирован с хронической болезнью почек, связанной с заболеваниями сердечно-сосудистой системы (чаще всего гипертонии) или диабетом 2 типа, что может быть обусловлено нарушениями в метаболических путях липопротеинов, липидов и глюкозы [20].

Фермент ARSA и белок-активатор SapB

Причина недостаточности белков ARSA и SapB при МЛД — мутации генов ARSA и PSAP, соответственно. Насчитывают около 260 уникальных мутаций гена ARSA и 63 уникальных мутаций гена PSAP, приводящих к развитию МЛД [21]. Недостаточность ARSA не может быть компенсирована другим ферментом [22]. Ген ARSA

(Gene/Locus MIM 607574) расположен на хромосоме 22q13.33 и состоит из 9 экзонов. Белок ARSA синтезируется в виде препротейна, далее в эндоплазматическом ретикулуме происходит расщепление сигнального пептида, в результате чего образуется зрелый белок ARSA, который состоит из 489 аминокислот и весит 51908 Да [23].

Мишенью всех лизосомных ферментов, включая ARSA, являются лизосомы, благодаря наличию остатков маннозо-6-фосфата (М6Ф), которые присоединяются к лизосомным ферментам во время их прохождения через аппарат Гольджи. После попадания внутрь лизосомы остаток М6Ф отщепляется от фермента [24, 25].

В кислой среде лизосом фермент ARSA представляет собой октамер, состоящий из 4 димеров, образующих кольцообразную структуру. При нейтральном pH октамер диссоциирует на димеры. Физиологический субстрат ARSA — сульфатид [3-О-сульфо-галактозилцерамид, цереброзид-3-сульфат, галактозил-3-сульфат церамид] [23].

Сульфатиды — наиболее распространенные сфинголипиды в миелине, выполняют важные функции при дифференцировке миелинирующих клеток (олигодендроцитов и шванновских клеток), участвуют в формировании параузловых областей [26], передаче сигналов и поддержании структуры и функции миелина [27]. Синтез сульфатида начинается в эндоплазматическом ретикулуме: галактоза уридиндифосфат-галактозы переносится на церамид, галактозилцерамид (galactosylceramide, GalC) транспортируется в аппарат Гольджи, где образуется сульфатид с помощью фермента галактозо-3-О-сульфотрансферазы-1 (galactose-3-O-sulfotransferase-1, Gal3st1), который переносит сульфат с 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (galactose-3-O-sulfotransferase-1, PAPS) на GalC (рис. 1) [27].

Сульфатиды различаются длиной ацильной цепи, степенью гидроксирования и их соотношение меняется по мере развития нервной системы, а также зависит от типа клеток [28]. Например, сульфатиды короткоцепочечных жирных кислот (C16:0 и C18:0) содержатся в нейронах и астроцитах, а сульфатидами длинноцепочечных жирных кислот (C24:1 и C24:0) обогащен миелин [29].

Сульфатиды расщепляются в лизосомах, но фермент ARSA гидролизует сульфатную группу только в том случае, если сульфатид образует комплекс с небольшим белком-активатором SapB, который превращает гидрофобный субстрат в растворимую форму (рис. 1) [30].

Фермент ARSA расщепляет широкий спектр субстратов, включая синтетические сульфаты эфиров с оптимальным значением pH 5–6 [23]. Для оценки активности фермента в исследованиях и диагностике МЛД используют искусственные субстраты, например, p-нитрокатехол сульфат (p-nitrocatechol-sulfate, p.NCS) [31].

Ген PSAP (Gene/Locus MIM 176801) расположен на хромосоме 10q21.1, состоит из 15 экзонов [21], кодирует белок-предшественник сапозинов, просапозин (pSap), состоящий из 524 аминокислот. В результате расщепления белка-предшественника образуются четыре типа сапозинов: SapA, SapB, SapC и SapD. Данные сапозины являются белками-активаторами сфинголипидов и необходимы для функционирования некоторых лизосомных ферментов, например, галактозилцерамид β -галактозидазы, α -галактозидазы A, глюкозилцерамидной β -глюкозидазы, кислой церамидазы, ARSA и др. [32].

Мутации в гене PSAP могут вызывать либо дефицит одного из сапозинов, либо дефицит белка-предшественника pSap, при котором наблюдается крайне тяжелая летальная форма нейродистрофии [OMIM 611721]. Дефицит белка-активатора SapB приводит к развитию

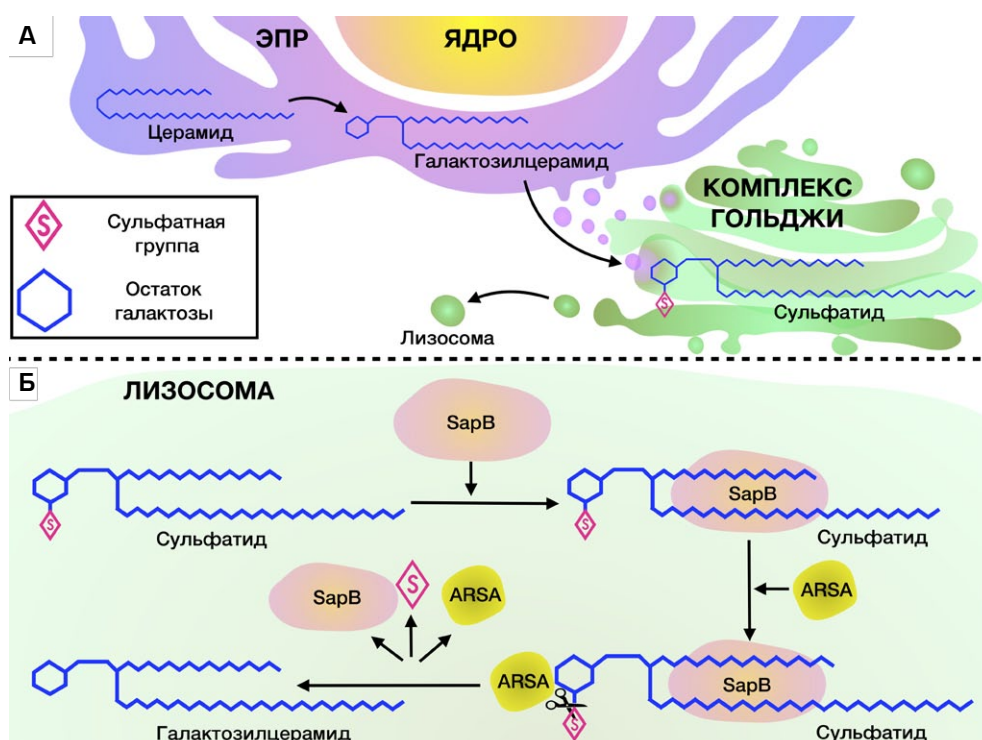


Рис. 1. Метаболизм сульфатидов: А — биосинтез сульфатидов начинается в эндоплазматическом ретикулеуме (ЭПР), где галактозилцерамид образуется путем переноса галактозы на церамид, после чего галактозилцерамид транспортируется в комплекс Гольджи, где сульфатид образуется при добавлении сульфатной группы; Б — деградация сульфатидов происходит в лизосоме. SapB необходим для связывания сульфатид с активным сайтом фермента ARSA. Фермент ARSA гидролизует сульфатид до галактозилцерамида путем расщепления сульфатной группы

МЛД, дефицит SapA и SapC — к атипичным формам болезней Краббе (OMIM 611722) [33] и Гоше (OMIM 610539) [34], соответственно, дефицит SapD не описан в клинической практике. Фенотип МЛД при дефекте SapB схож с классической формой МЛД, вызванной дефицитом фермента ARSA. Кроме того, белок-активатор SapB необходим для расщепления таких субстратов как глоботриаозилцерамид, дигалактозилцерамид и GM3-ганглиозид другими специфичными лизосомными ферментами [32].

Формы метакрохроматической лейкодистрофии

Клинические проявления и степень нейродегенерации при МЛД разнообразны и зависят от типа мутации и степени дефицита фермента ARSA [10, 12]. Клиническая манифестация заболевания также зависит от остаточной активности фермента ARSA: чем меньше его активность, тем раньше проявляется заболевание [13]. Исходя из возраста пациента при клинической манифестации, МЛД подразделяют на позднюю инфантильную, ювенильную и взрослую формы [14, 35].

Клиническая манифестация при поздней инфантильной форме МЛД начинается до 3 лет. Эта форма МЛД считается наиболее распространенной и самой тяжелой, характеризуется серьезным дефицитом фермента ARSA, что влечет за собой быструю нейродегенерацию. При поздней инфантильной форме МЛД наблюдаются слабость, спастичность, истощение мышц, неспособность самостоятельно сидеть и держать голову, нарушение походки. Неизбежные неврологические осложнения ведут к тяжелой психомоторной отсталости, нарушениям глотательных рефлексов и дыхания [36, 37]. Кроме поражения ЦНС, выявляется периферическая невропатия, которая связана с замедлением проводимости по двигательным и чувствительным нервам [12].

У пациентов с поздней инфантильной формой МЛД симптомам поражения ЦНС часто предшествует быстро прогрессирующая периферическая невропатия, которая характеризуется неловкостью движений, мышечной слабостью, сенсорной недостаточностью и арефлексией. Однако по мере прогрессирования заболевания симптомы периферической невропатии постепенно маскируются развитием спастического тетрапареза и других проявлений дисфункции ЦНС. Симптомами поражения ПНС также являются нейрогенная дисфункция мочевого пузыря, невропатическая боль и деформация стопы [16].

Ювенильная форма МЛД развивается в возрасте 3–16 лет и характеризуется менее выраженными клиническими проявлениями по сравнению с поздней инфантильной формой. При ювенильной форме часто отмечаются когнитивные ухудшения и поведенческие изменения, за которыми следуют ухудшение центральной и периферической моторики и эпилепсия. Часто возникают проблемы с обучением ребенка и трудности с поведением [35, 38, 39]. При поздней инфантильной и ранней ювенильной формах наблюдается быстрая прогрессия заболевания и при отсутствии терапии летальный исход наступает в течение нескольких лет от начала заболевания [11, 14]. Однако при поддерживающем лечении, включая использование назогастрального зонда для кормления и антибиотикотерапию при инфекциях, удается сохранять жизнь пациентов в течение многих лет [12, 40].

Клиническая манифестация при взрослой форме МЛД начинается в позднем подростковом возрасте, обычно после 16 лет. Взрослая форма МЛД — менее тяжелая форма заболевания. При взрослой форме наблюдаются психозы [41], когнитивные и поведенческие изменения [38, 42], атаксия, полиневропатия и эпилептические припадки [43]. У пациентов отмечаются депрессивные расстройства и внезапные перемены настроения. Также

характерной чертой являются психотические симптомы, такие как галлюцинации и иллюзии, что может быть связано с нарушением кортикокортикальных и кортико-субкортикальных связей, особенно лобных долей [10]. Взрослая форма МЛД встречается намного реже, чем другие формы, прогрессирует медленно, часто ошибочно диагностируется как деменция с ранним началом [44] или шизофрения [42, 45].

Существует некая корреляция между генотипом и фенотипом при МЛД. Например, нулевые аллели часто ведут к полному отсутствию активности фермента ARSA и ранней прогрессии заболевания [17]. При ювенильной и взрослой формах МЛД симптомы заболевания появляются значительно позже, что обусловлено остаточной активностью фермента ARSA. Однако определить точную связь генотипа с остаточной активностью фермента ARSA и фенотипом МЛД на сегодняшний день сложно. Важно отметить, что начало заболевания и фенотип МЛД могут отличаться даже у родных братьев и сестер, имеющих одинаковые мутации. Причины этого феномена до сих пор остаются неизвестными и требуют систематического анализа. Предполагают, что на клинический фенотип заболевания могут влиять разные биохимические и эпигенетические факторы [46].

Диагностика метакроматической лейкодистрофии

Своевременная и правильная диагностика МЛД очень важна, но является серьезной проблемой, поскольку заболевание в большинстве случаев не проявляется у новорожденных и резко прогрессирует в раннем детстве или позже, в зависимости от формы заболевания. Выявление МЛД часто занимает длительное время, а проблема постановки точного диагноза возникает из-за того, что взрослую форму МЛД часто ошибочно принимают за шизофрению [42] или другие типы психических расстройств [38, 44, 47], отдалая момент начала терапии. Тем не менее доказано, что при многих терапевтических подходах важно начать лечение до проявления симптомов заболевания, так как после проявления даже очень ранней симптоматики эффективность лечения значительно снижается [48].

На сегодняшний день МЛД диагностируют по клиническим проявлениям, с помощью генетического анализа на наличие мутаций генов *ARSA* и *PSAP*, магнитно-резонансной томографии (МРТ) головного мозга и биохимических тестов на ферментативную активность ARSA в фибробластах кожи, лейкоцитах и моче пациентов [49].

При МЛД в биологических жидкостях пациентов увеличивается количество сульфатидов, что дает возможность определять их уровень в плазме крови и моче с помощью масс-спектрометрии. Было показано, что у пациентов с МЛД повышен уровень всех 14 изоформ сульфатидов в плазме крови по сравнению с контрольной группой здоровых доноров, пациентов с другими ЛБН и с псевдодефицитом ARSA. Данный метод позволяет минимизировать ложноположительный результат при псевдодефиците ARSA, а также полезен для мониторинга лечения пациентов с МЛД [28]. Сравнение общего уровня сульфатидов в моче и плазме крови у пациентов с МЛД выявило, что в моче уровень сульфатидов значительно выше [50].

МРТ является чувствительным и высокоинформативным методом, с помощью которого на ранних этапах идентифицируют повреждения белого вещества головного мозга и оценивают тяжесть заболевания [51, 52]. На начальных стадиях ранней инфантильной формы демиелинизация начинается с теменно-затылочной центральной части белого вещества, затем вовлекается

лобная центральная часть. При ювенильной форме сначала затрагиваются центральное и перивентрикулярное белое вещество. По мере развития заболевания могут затрагиваться подкорковые структуры мозга. При крайне тяжелых случаях отмечается поражение проекционных волокон, а также появление «тигroidного паттерна» (полосы, которые связаны с сохранением миелина в перивентрикулярных областях). Иногда поражается мозолистое тело [51, 53, 54]. Изменений мозжечка обычно не наблюдается, миелинизация субкортикальных U-волокон сохраняется и ассоциируется с тяжелой моторной дисфункцией [55].

Особенно важна пренатальная диагностика плода на ранних сроках беременности, в частности, в семьях из группы риска. Для этого измеряют активность фермента ARSA в клетках амниотической жидкости и оценивают накопление сульфатидов для исключения псевдодефицита фермента ARSA [56]. Также активность фермента ARSA можно определить в образцах ворсинок хориона [57, 58].

Лечение метакроматической лейкодистрофии

Трансплантация костного мозга

Основная сложность при терапии заболеваний, затрагивающих нервную систему, обусловлена особенностями проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который ограничивает доступ лекарственных веществ в клетки нервной системы при их системном введении, что предопределяет низкую эффективность многих терапевтических подходов [59, 60]. Важно отметить, что для предотвращения прогрессии МЛД необходимо обеспечить распределение терапевтического препарата по всей нервной системе, включая ПНС.

Одними из первых и наиболее эффективных на сегодняшний день подходов для лечения МЛД стали трансплантация костного мозга (ТКМ) или гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) [61]. В ряде исследований было показано, что ТКМ приводит к стабильному увеличению активности фермента в лейкоцитах и остановке развития нарушений когнитивной и моторной функций у пациентов с ювенильной формой МЛД [62, 63]. Однако данные когортных исследований продемонстрировали, что у пациентов с ювенильной формой МЛД в 31% случаев после ТКМ продолжала прогрессировать демиелинизация, но причина этого явления неясна [62]. ТКМ не оказывала влияния на естественное течение заболевания у детей с поздней детской и ювенильной формами МЛД, которым проводили ТКМ уже после появления симптомов заболевания [62, 64]. Пациенты с бессимптомной формой МЛД считаются наиболее перспективными с точки зрения эффективности терапии методом ТКМ. Тем не менее, были случаи, когда после ТКМ у таких пациентов состояние продолжало ухудшаться и через месяц после ТКМ на МРТ головного мозга были выявлены характерные при лейкодистрофиях аномалии белого вещества во фронтальной и затылочной областях. Несмотря на сохранение нормального уровня фермента в плазме крови и моче на протяжении всего наблюдения, степень поражения белого вещества в головном мозге возрастала, через 2 года после ТКМ развилась эпилепсия [64, 65].

При проведении ТГСК до начала проявления симптомов у пациентов с ювенильной формой отмечали значительное замедление снижения психомоторных функций по сравнению с их сиблингами, которым выполняли ТГСК после проявления первых симптомов [66].

У пациентов со взрослой формой МЛД после ТГСК также наблюдали замедление прогрессии заболевания через 12–24 мес. и стабилизацию заболевания в течение 18 лет по результатам электроэнцефалографии (ЭЭГ), МРТ головного мозга, а также по оценке неврологического статуса по сравнению с пациентами контрольной группы — их старшими братьями или сестрами, которые не получали терапию. Однако стоит отметить, что возраст начала прогрессии заболевания у всех пациентов контрольной группы был меньше по сравнению с их сиблингами, получавшими терапию [67].

По результатам имеющихся ретроспективных когортных исследований, включающих 43 пациента и 27 пациентов, и наблюдения за отдельными клиническими случаями можно сказать, что связь между продолжительностью жизни, подтипом МЛД и наличием симптомов после ТГСК не была обнаружена [63, 66]. У пациентов, получавших ТГСК до начала появления симптомов или сразу после их обнаружения, заболевание стабилизировалось, скорость потери общих моторных и когнитивных функций снизилась. Однако снижение демиелинизации ЦНС, детектируемое с помощью МРТ, не означает стабилизацию полиневропатии [68] и влияние ТГСК на развитие периферической невропатии остается спорным [63].

Еще одним подходом, схожим с ТГСК, является трансплантация клеток пуповинной крови (ТКПК), поскольку считается, что клетки пуповинной крови эффективно мигрируют в ЦНС [65]. Кроме того, существуют банки пуповинной крови, что позволяет быстро найти подходящего донора и сократить время между постановкой диагноза и трансплантацией [69]. Пуповинная кровь — альтернативный источник ГСК, но помимо ГСК, содержит и другие типы клеток, такие как мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), эндотелиальные клетки-предшественницы и соматические стволовые клетки [70]. Было показано, что эффективность ТКПК существенно не отличается от эффективности ТГСК. Пациенты с ранней инфантильной и ювенильной формами МЛД, которым проводили ТКПК до начала появления симптомов, сохраняли нормальную когнитивную функцию, однако серьезная периферическая невропатия оставалась нерешенной проблемой [71]. Важно отметить, что прогрессия нейродегенерации у пациентов после ТКПК была заметно ниже по сравнению с пациентами контрольной группы [69].

В настоящее время разрабатывается препарат MGTA-456, который позволяет увеличить процент приживления клеток микроглии после ТКПК. Препарат MGTA-456 представляет собой популяцию CD34⁺CD90⁺-клеток, являющихся предшественниками клеток микроглии. Термин «приживление» в данном случае подразумевает сохранение жизнеспособности CD34⁺CD90⁺-клеток и их дифференцировку в клетки микроглии. После терапии препаратом MGTA-456 у иммунодефицитных мышей эффективность приживления клеток микроглии увеличилась в 10 раз по сравнению с мышами контрольной группы, которым проводили трансплантацию только CD34⁺-клеток пуповинной крови [72]. Эффективность препарата MGTA-456 в настоящее время проверяют во второй фазе клинического исследования (NCT03406962), результаты пока не предоставлены.

Терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками

В поисках эффективного инструмента для терапии МЛД не остались без внимания ММСК, поскольку они имеют более высокий уровень экспрессии гена

ARSA по сравнению с моноцитами из периферической крови [73], а также способны мигрировать в головной мозг, и дифференцироваться в астроциты [74]. Пациентам с МЛД, которые ранее прошли успешную ТКМ, трансплантировали аллогенные ММСК, полученные из костного мозга. В результате трансплантации ММСК у 4 из 6 пациентов наблюдали улучшение скорости проведения импульсов по периферическим нервам. Авторы предполагают, что либо ММСК обеспечивают нормальную активность фермента в периферических нервах, либо ММСК дифференцируются в шванновские клетки *in vivo*. Однако не было отмечено положительных изменений психического и физического состояния пациентов [75].

Описан клинический случай применения ММСК у 23-летней женщины со взрослой формой МЛД, развившейся в течение одного года с прогрессирующим неврологическим ухудшением. Пациентке была проведена аллогенная ТГСК и сопутствующая инфузия аллогенных ММСК, выделенных из костного мозга. Было обнаружено, что приживление происходило быстро без значительной токсичности или побочных эффектов, связанных с инфузией. Через 40 месяцев у пациентки стабилизировались все неврологические проявления заболевания. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности и потенциальной эффективности аллогенной ТГСК в сочетании с инфузией ММСК для пациентов со взрослой формой МЛД [76].

Заместительная терапия

Заместительная терапия также стала одним из первых подходов, которые были использованы для повышения уровня нормального (не мутантного) фермента, однако ее применение столкнулось с рядом трудностей. Эксперименты на мышах с моделью МЛД показали, что после внутривенного введения однократной дозы рекомбинантного фермента ARSA человека большая часть рекомбинантного белка (97%) была выявлена в печени, 3% в почках и <0,1% в ЦНС и периферических нервах. Период полувыведения составил около 4 сут. [77]. Введение однократной дозы рекомбинантного фермента приводило к значительному снижению количества сульфатидов в почках, но не в головном мозге [78]. Отсутствие фермента в головном мозге объясняется, скорее всего тем, что ГЭБ предотвращает прямой перенос рекомбинантного фермента ARSA из кровотока в ЦНС. Для преодоления ГЭБ мышам с моделью МЛД вводили рекомбинантный фермент ARSA в спинномозговую жидкость. Было обнаружено уменьшение отложений сульфатидов на 51–56% в том полушарии, в которое в течение 4 недель непрерывно вводили фермент через спинномозговую жидкость правого бокового желудочка головного мозга. Одним из недостатков такого метода является период полувыведения фермента из спинномозговой жидкости, который составляет всего 10 минут [78].

Интересные данные были получены при исследовании эффективности заместительной терапии в зависимости от тяжести симптомов заболевания. Терапия мышей, имитирующих предсимптомную, раннюю и прогрессирующую стадии заболевания, минимально эффективной дозой фермента (20 мкг/кг) показала, что для эффективного удаления сульфатидов лечение должно начинаться на предсимптоматической стадии. Когда лечение начинается после проявления прогрессирующих дисфункций нервной системы (прогрессирующая стадия заболевания), оно практически бесполезно. Кроме того,

на ранней стадии заболевания, когда скорость проведения импульсов по периферическим нервам только начинает снижаться, лечение имеет низкую эффективность, поскольку невозможно добиться полного расщепления сульфатидов. Авторы предполагают, что белок-активатор SapB не может проникать в гидрофобное ядро гранул накопившихся сульфатидов и сделать его доступным для расщепления ферментом [79].

Еще одним подходом для увеличения эффективности заместительной терапии стало создание химерного белка ARSA, сшитого с доменами IgG к мышечному рецептору трансферрина в случае экспериментов на мышах с моделью МЛД [80], или с доменами IgG к человеческому рецептору инсулина в экспериментах на макаках-резус [81]. Домены IgG доставляют ARSA в мозг через ГЭБ, транспортируя его с помощью рецепторов трансферрина мыши или инсулина человека, соответственно. На макаках-резус дикого типа было обнаружено, что химерный белок быстро проникает в мозг макаки и распределяется в периваскулярной ткани во всех частях головного мозга животных [81]. Доклинические исследования, проведенные на мышах с моделью МЛД, доказали безопасность рекомбинантного химерного белка [80].

Несмотря на перспективные результаты заместительной терапии, полученные на мышах с моделью МЛД, клинические исследования, проведенные на сегодняшний день, демонстрируют довольно спорные результаты. Например, введение в спинномозговую жидкость 100 мкг препарата рекомбинантного фермента ARSA человека (HGT-1110) в течение 38 недель (20 инъекций через неделю) не привело к улучшению моторной функции, глотательной функции, а также к улучшению качества жизни пациентов (NCT01510028). В ряде клинических исследований другого препарата на основе рекомбинантного фермента ARSA человека (HGT-1111) также не было показано замедления потери моторной функции и изменений уровня сульфатидов в спинномозговой жидкости (NCT00681811, NCT00633139).

Генная терапия

Интрацеребральная доставка адено-ассоциированного вирусного вектора (adeno-associated virus, AAV), кодирующего ген *ARSA*, может обеспечить быструю остановку нейродегенеративного процесса в головном мозге у пациентов с МЛД, поскольку AAV являются одними из самых безопасных векторов для клинического применения и могут эффективно трансдуцировать нейроны *in vivo* [82]. Введение AAV 5 серотипа (AAV5), кодирующего кДНК гена *ARSA* (AAV5-*ARSA*), в мозг мышей с моделью МЛД позволило добиться продолжительной экспрессии гена *ARSA* в головном мозге (3–15 месяцев), что обеспечило почти полное исчезновение патологических изменений в головном мозге и предотвращение накопления сульфатидов [83].

Перспективные результаты также были получены с использованием AAV9, кодирующего ген *ARSA* и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. Введение вируса в яремную вену новорожденных мышей с моделью МЛД привело к длительной экспрессии гена *ARSA* (до 15 недель) в основном в клетках мышц и сердца, однако умеренная экспрессия была обнаружена и в клетках ЦНС. У мышей, получивших терапию, накопление сульфатидов было значительно снижено в головном и спинном мозге и их уровень не отличался от такового у мышей дикого типа [84].

Также описан подход увеличения экспрессии гена *ARSA* в модифицированных клетках за счет введения

в мозг мышей с моделью МЛД не только AAV1-*ARSA*, но еще и AAV1, кодирующего ген формилглицин-генерирующего фермента (formylglycine-generating enzyme, FGE), который необходим для активации сульфатаз [85].

Среди новых серотипов адено-ассоциированного вируса AAVrh.10, выделенный из нечеловекообразных обезьян, более эффективно мигрировал из области интрацеребрального введения, чем AAV1, AAV2, AAV5, AAV7 или AAV8 [86, 87]. Введение AAVrh.10-*ARSA* в мозг 8-мес. мышей с моделью МЛД привело к коррекции накопления определенных видов сульфатидов в олигодендроцитах, поскольку, судя по всему, данный серотип AAV может заражать также и олигодендроциты (до 9%) [87]. Безопасность AAVrh.10-*ARSA* также оценивали на нечеловеческих приматах [88, 89]: после введения животным 12 инъекций вектора AAVrh.10-h*ARSA* в количестве $1,1 \times 10^{11}$ трансдуцирующих единиц на полшарии активность фермента увеличилась на 14–31% от нормального эндогенного уровня и была зафиксирована на расстоянии 12–15 мм от места инъекции [89].

В фазе I/II клинического исследования данного вируса (NCT01801709) 4 ребенка с предсимптомной или очень ранней симптомной стадией получали 12 инъекций в количестве 1×10^{12} или 4×10^{12} (в зависимости от возраста) трансдуцирующих единиц AAVrh.10-*ARSA* в белое вещество головного мозга. Активность *ARSA* в спинномозговой жидкости, не выявляемая до лечения, была зарегистрирована после инъекций, достигая 20–70% от контрольных значений. Однако состояние пациентов продолжало ухудшаться, исследование было остановлено из-за недостаточной эффективности препарата [90].

Генно-клеточная терапия

Помимо вирус-опосредованной генной терапии активно развивается клеточно-опосредованная генная терапия, при которой различные клетки генетически модифицируют для экспрессии гена *ARSA* дикого типа [1]. Одним из самых первых исследований в этой области была трансплантация генетически модифицированных клеток костного мозга. После трансплантации клеток костного мозга, модифицированных ретровирусом, кодирующим ген *ARSA* человека, 6–8 недельным мышам с моделью МЛД было обнаружено увеличение уровня фермента до 33% от нормального уровня в ЦНС, 100% — в почках, 800% — в селезенке и костном мозге [91]. Трансплантация генетически модифицированных клеток снижала накопление липидов в печени, в среднем, примерно до 70% от уровня, выявленного у животных, которым проводили только ТКМ, но никакого эффекта не наблюдали в почках и головном мозге [91]. В другой работе ГСК генетически модифицировали лентивирусом, кодирующим ген *ARSA*, и ввели 6-месячным мышам с моделью МЛД с выраженной дисфункцией ЦНС и ПНС. В результате терапии у мышей заметно снизилось количество сульфатидов, нормализовались все нейрофизиологические нарушения [92].

Обнадёживающие результаты, полученные на животных с моделью МЛД, стали платформой для проведения клинических исследований на пациентах с МЛД. Имеющиеся на сегодняшний день публикации описывают результаты терапии 9 из 21 пациента, принимающих участие в продолжающемся клиническом исследовании (NCT01560182) [48, 93]. Девять пациентов с предсимптомной или с очень ранней симптомной стадией получали $7,2 \times 10^6$ /кг CD34⁺-ГСК, сверхэкспрессирующих ген *ARSA*. Через 2 года после

трансплантации генетически модифицированных ГСК в 5 из 7 образцов биопсии кожи демиелинизированные волокна были обнаружены в незначительном количестве, в двух образцах были выявлены признаки ремиелинизации. Проводимость нейронов как увеличивалась, так и уменьшалась у разных пациентов. У большинства пациентов, получивших трансплантацию генетически модифицированных ГСК, общая двигательная активность развивалась в пределах нормы. Однако, у 1 пациента из 9, у которого на момент начала лечения уже были симптомы заболевания (тяжелая демиелинизация, двигательная и когнитивная дисфункции), показатели двигательной активности не улучшились [48].

С открытием метода перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные клетки, стало возможным использовать собственные клетки пациента в качестве источника аутогенных клеток для трансплантации. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), полученные из фибробластов кожи пациента с МЛД, были перепрограммированы в самообновляющиеся нейроэпителиальные стволовые клетки, генетически модифицированы для сверхэкспрессии *ARSA* и трансплантированы в конечный мозг 1-дневным мышам с моделью МЛД, что привело к значительному уменьшению накопления сульфатидов в мозге [25]. В аналогичном эксперименте, выполненном другой группой авторов, также из ИПСК были получены клетки-предшественницы нейронов, сверхэкспрессирующие *ARSA* [94]. Однако в данном исследовании клетки трансплантировали не только 1-дневным, но и 60-дневным мышам с моделью МЛД. Было показано, что клетки-предшественницы дифференцировались в астроциты и олигодендроциты, в то время как в работе J. Doege с соавт. (2015) [25] маркеров олигодендроцитов обнаружено не было. После трансплантации ИПСК активность фермента у мышей достигала 70% от уровня нормальной активности, а накопление сульфатида было ниже, чем в контроле [94].

В целом, генно-клеточная терапия МЛД выглядит достаточно перспективным подходом, так как, преодолевшие ГЭБ клетки оказываются способны «передавать» фермент в мутантные по гену *ARSA* клетки нервной системы пациентов. Такой механизм кросс-коррекции основывается на том, что небольшая часть новосинтезированного растворимого фермента вместо того, чтобы сразу войти в лизосому, высвобождается из клетки в межклеточное пространство, проникает в соседнюю клетку путем эндоцитоза и попадает в лизосому через М6Ф-рецепторы [25]. Таким образом, значительная сверхэкспрессия гена в генетически модифицированных клетках может обеспечить миграцию фермента на большие расстояния по нервной системе и порождать значимый терапевтический эффект.

Симптоматическая терапия

Поскольку не существует достаточно эффективной терапии МЛД, необходимо нивелировать симптомы развивающегося заболевания с помощью симптоматической терапии, включающей различные подходы, направленные на устранение множества клинических симптомов [95].

Одним из перспективных препаратов для симптоматической терапии МЛД считался варфарин, являющийся антагонистом витамина К. Варфарин регулирует биосинтез сфинголипидов и снижает уровень сульфатидов в мозге у крыс и мышей. Однако в исследовании 13 пациентов с МЛД, которым невозможно было провести ТКМ,

терапия варфарином в течение 45 дней не принесла положительных результатов [96, 97].

Ученые, связывающие демиелинизацию при прогрессировании МЛД с нейровоспалением [64], предположили, что терапия противовоспалительными препаратами может быть эффективна в предотвращении нейровоспаления и в снижении скорости демиелинизации у пациентов с МЛД [64]. На мышах был апробирован препарат симвастатин, поскольку было доказано, что он лучше других статинов преодолевает ГЭБ и ингибирует сигнальный путь MAPK, через который передаются сигналы провоспалительных цитокинов MIP-1 α , MIP-1 β и MCP-1 [98]. Мыши с моделью МЛД получали перорально 20 мг/кг/день препарата симвастатин в течение 30 дней. Прием препарата привел к снижению воспаления в ЦНС, снижению уровня секреции провоспалительных цитокинов MIP-1 β и MCP-1 и снижению инфильтрации мозга Т-клетками. Через 17 месяцев после лечения демиелинизация у мышей, получавших симвастатин, была на 20% ниже в головном мозге и на 42% ниже в спинном мозге по сравнению с животными контрольной группы [64]. Эти обнадеживающие данные требуют проверки в клинических исследованиях.

Еще одним терапевтическим подходом для предотвращения нейровоспаления является иммунотерапия внутривенными иммуноглобулинами (ВИГ), которая широко применяется в настоящее время для лечения аутоиммунных заболеваний ЦНС. Препарат ВИГ представляет собой иммунологически активную белковую фракцию, выделенную из плазмы крови или сыворотки крови доноров. Активный компонент препарата — IgG, обладает способностью связываться с антигенами различных вирусов и бактерий, а также неспецифической и иммунорегуляторной активностью, проявляющейся в повышении резистентности организма к инфекциям и противовоспалительном действии. ВИГ модулируют активацию комплемента, подавляют идиотипические антитела, насыщают Fc-рецепторы на макрофагах и подавляют различные медиаторы воспаления, включая цитокины, хемокины и металлопротеиназы [99]. Таким образом, ВИГ оказывают иммуносупрессивное действие, подавляя воспалительные реакции и активацию микроглии, что предотвращает дальнейшее повреждение нейронов, связанное с воспалением.

Описаны единичные клинические случаи применения ВИГ для лечения МЛД, однако существенного улучшения в результате такого лечения зафиксировано не было [100–102]. Например, инфузии ВИГ (начальная доза — 2 г/кг, поддерживающая доза — 0.4 г/кг 1 раз в две недели) пациенту с МЛД и выраженной периферической невропатией не только не способствовали уменьшению клинической симптоматики, а, наоборот, было обнаружено усугубление симптоматики, после чего инфузии ВИГ отменили [102].

Тем не менее, считается, что иммуномодуляция временно может быть полезна для терапии невропатии на ранних стадиях МЛД. У 4-летней девочки с МЛД во время иммуномодулирующей терапии ВИГ наблюдалось кратковременное функциональное улучшение, но вскоре после него началось ухудшение когнитивных и двигательных функций [103]. В другом исследовании было показано, что после двух курсов ВИГ (один курс составлял 5 дней, доза 2 г/кг/день) у пациента с МЛД полностью устранились дыхательная недостаточность и птоз, тем не менее, авторы допускают случайное совпадение таких результатов [104]. Таким образом, о пользе ВИГ при терапии МЛД на сегодняшний день однозначно сказать нельзя, для определения эффективности

и обоснованности назначения иммуноглобулинотерапии при МЛД необходимы более масштабные исследования.

Преднизолон также назначают для лечения нейровоспаления [16]. Предполагают, что преднизолон может обеспечивать кратковременное функциональное улучшение у пациентов с МЛД [101]. Однако, эти данные довольно сомнительны, поскольку в исследовании К. Стоеск с соавт. (2016) не было выявлено положительных изменений по неврологическим, нейропсихологическим показателям, а также по результатам ЭЭГ и МРТ, через 6 месяцев после перорального приема преднизолона (начальная доза 100 мг/сут., постепенное снижение до 20 мг/сут. в течение 4 недель) [44].

Заключение

В отличие от других лизосомных болезней накопления, для МЛД не существует клинически одобренной специфической терапии. Трансплантация костного мозга или гемопоэтических стволовых клеток помогает у некоторых пациентов замедлить ухудшение неврологических нарушений и общего состояния. Однако трансплантация может вызвать ряд осложнений, в том числе реакцию «трансплантат против хозяина», при которой клетки иммунной системы донора начинают атаковать ткани и органы реципиента из-за несовместимости белков иммунной системы. Более безопасным методом терапии может стать трансплантация клеток пуповинной крови или ММСК, которая также позволяет контролировать усугубление неврологического состояния пациентов с МЛД, но период наблюдения за пациентами и количество пациентов, получавших данную терапию, пока недостаточны для окончательных выводов. В разработке находятся методы заместительной терапии, например, вводимый в спинномозговую жидкость рекомбинантный фермент ARSA человека. С помощью интра-текального введения препарата можно обойти проблему его прохождения через ГЭБ, но даже интратекальная заместительная терапия приводит лишь к незначительному замедлению прогрессирования заболевания. При этом заместительная терапия оказалась эффективной

в *in vivo* исследованиях на мышах с моделью МЛД, что указывает на трудности с трансляцией результатов *in vivo* экспериментов на человека. К сожалению, в настоящее время большинство пациентов получают только симптоматическую терапию, которая, хотя и облегчает их состояние, но не устраняет причину заболевания и не влияет на скорость ее развития.

Новыми перспективными методами для терапии МЛД считаются генная и комбинированная генно-клеточная терапия, из которых стоит отметить применение рекомбинантного адено-ассоциированного вируса AAVrh.10-hARSA и терапию генетически модифицированными аутогенными CD34⁺-ГСК со сверхэкспрессией гена ARSA. Согласно опубликованным данным на сайте компании Orchard Therapeutics, коммерциализирующей эту разработку, период наблюдения за первым пациентом, получившим терапию аутогенными CD34⁺-ГСК со сверхэкспрессией ARSA, уже превысил восемь лет, и он развивается так же, как и его здоровые сверстники. В первой половине 2020 г. компания Orchard Therapeutics планирует подать пакет документов для разрешения на продажу в Европейское агентство лекарственных средств (<https://ir.orchard-tx.com/index.php/news-events/presentations>).

Таким образом, генная и генно-клеточная терапия, которые уже показали безопасность и эффективность в клинических исследованиях, открывают новые способы для лечения пациентов с МЛД с предсимптомной или ранней симптомной стадиями. Дальнейшие исследования уже апробированных методов также могут дать возможность их модернизации для помощи пациентам на поздних стадиях заболевания.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности. Работа выполнялась в рамках программы повышения конкурентоспособности Казанского федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

1. Rosenberg J.B., Kaminsky S.M., Aubourg P. et al. Gene therapy for metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci. Res.* 2016; 94(11): 1169–79.
2. Gomez-Ospina N., Adam M.P., Ardinger H.H. et al. Arylsulfatase A Deficiency. Seattle (WA): University of Washington; 1993. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1130/>.
3. Simonaro C.M. Lysosomes, Lysosomal Storage Diseases, and Inflammation. *J. Inborn Errors Metab. Screen.* 2016; 4: 1–8.
4. Wanner M.R., Karmazyn B., Fan R. Multidetector CT diagnosis of massive hemobilia due to gallbladder polyposis in a child with metachromatic leukodystrophy. *Pediatr. Radiol.* 2015; 45(13): 2017–20.
5. Almarzooqi S., Quadri A., Albawardi A. Gallbladder Polyps in Metachromatic Leukodystrophy. *Fetal Pediatr. Pathol.* 2018; 37(2): 102–8.
6. Kim J., Sun Z., Ezekian B. et al. Gallbladder abnormalities in children with metachromatic leukodystrophy. *J. Surg. Res.* 2017; 208: 187–91.
7. McFadden K., Ranganathan S. Pathology of the gallbladder in a child with metachromatic leukodystrophy. *Pediatr. Dev. Pathol.* 2015; 18(3): 228–30.
8. Kurian J.J., Jacob T.J.K. An unusual presentation of gall bladder papillomatosis in association with metachromatic leukodystrophy. *BMJ Case Rep.* 2018; 2018: bcr2017224162.
9. Van der Knaap M.S., Bugiani M. Leukodystrophies: A proposed classification system based on pathological changes and pathogenetic mechanisms. *Acta Neuropathol.* 2017; 134(3): 351–82.
10. Hyde T.M., Ziegler J.C., Weinberger D.R. Psychiatric disturbances in metachromatic leukodystrophy. Insights into the neurobiology of psychosis. *Arch. Neurol.* 1992; 49(4): 401–6.
11. Ali Mallick M.S., Godil A., Khetpal A. et al. Infantile metachromatic leukodystrophy in an 18 month old girl. *J. Pak. Med. Assoc.* 2016; 66(9): 1197–200.
12. Liaw H.R., Lee H.F., Chi C.S. et al. Late infantile metachromatic leukodystrophy: Clinical manifestations of five Taiwanese patients and Genetic features in Asia. *Orphanet J. Rare Dis.* 2015; 10: 144.
13. Barkovich A.J. Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. *AJNR. Am. J. Neuroradiol.* 2000; 21(6): 1099–109.
14. Thibert K.A., Raymond G.V., Tolar J. et al. Cerebral spinal fluid levels of cytokines are elevated in patients with metachromatic leukodystrophy. *Sci. Rep.* 2016; 6: 24579.
15. Koski C.L., Vanguri P., Shin M.L. Activation of the alternative pathway of complement by human peripheral nerve myelin. *J. Immunol.* 1985; 134(3): 1810–14.
16. Beerepoot S., Nierkens S., Boelens J.J. et al. Peripheral neuropathy in metachromatic leukodystrophy: Current status and future perspective. *Orphanet J. Rare Dis.* 2019; 14(1): 240.
17. Doherty K., Frazier S.B., Clark M. et al. A closer look at ARSA activity in a patient with metachromatic leukodystrophy. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2019; 19: 100460.
18. Fluharty A.L., Meek W.E., Kihara H. Pseudo arylsulfatase a deficiency: Evidence for a structurally altered enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983; 112(1): 191–7.
19. Gieselmann V., Polten A., Kreysing J. et al. Arylsulfatase a pseudo-deficiency: Loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *PNAS USA* 1989; 86(23): 9436–40.
20. Tang D., Fakiola M., Syn G. et al. Arylsulphatase A Pseudodeficiency (ARSA-PD), hypertension and chronic renal disease in Aboriginal Australians. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 10912.
21. Cesani M., Lorioli L., Grossi S. et al. Mutation update of ARSA and PSAP genes causing metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mutat.* 2016; 37(1): 16–27.
22. Furst W., Sandhoff K. Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1992; 1126(1): 1–16.
23. Lukatela G., Krauss N., Theis K. et al. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 1998; 37(11): 3654–64.

24. Sommerlade H.J., Selmer T., Ingendoh A. et al. Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(33): 20977–81.
25. Doerr J., Bockenhoff A., Ewald B. et al. Arylsulfatase A overexpressing human iPSC-derived neural cells reduce CNS sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 2015; 23(9): 1519–31.
26. Honke K., Hirahara Y., Dupree J. et al. Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *PNAS USA* 2002; 99(7): 4227–32.
27. Takahashi T., Suzuki T. Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J. Lipid Res.* 2012; 53(8): 1437–50.
28. Saville J.T., Smith N.J., Fletcher J.M. et al. Quantification of plasma sulfatides by mass spectrometry: utility for metachromatic leukodystrophy. *Anal. Chim. Acta* 2017; 955: 79–85.
29. Moyano A.L., Li G., Lopez-Rosas A. et al. Distribution of C16:0, C18:0, C24:1, and C24:0 sulfatides in central nervous system lipid rafts by quantitative ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 2014; 467: 31–9.
30. Eckhardt M. The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* 2008; 37(2–3): 93–103.
31. Lee-Vaupel M., Conzelmann E. A simple chromogenic assay for arylsulfatase A. *Clin. Chim. Acta* 1987; 164(2): 171–80.
32. Henseler M., Klein A., Reber M. et al. Analysis of a splice-site mutation in the sap-precursor gene of a patient with metachromatic leukodystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 58(1): 65–74.
33. Spiegel R., Bach G., Sury V. et al. A mutation in the saposin A coding region of the prosaposin gene in an infant presenting as Krabbe disease: first report of saposin A deficiency in humans. *Mol. Genet. Metab.* 2005; 84(2): 160–6.
34. Tamargo R.J., Velayati A., Goldin E. et al. The role of saposin C in gaucher disease. *Mol. Genet. Metab.* 2012; 106(3): 257–63.
35. Brown T.M., Martin S., Fehnel S.E. et al. Development of the impact of juvenile metachromatic leukodystrophy on physical activities scale. *J. Patient. Rep. Outcomes* 2017; 2(1): 15.
36. Shahzad M.A., Khaliq S., Amar A. et al. Metachromatic leukodystrophy (MLD): a pakistani family with novel ARSA Gene Mutation. *J. Mol. Neurosci.* 2017; 63(1): 84–90.
37. Alam S.T., Akhter S., Rahman M.M. et al. A rare case of metachromatic leukodystrophy confirmed by arylsulfatase A. *Mymensingh Med. J.* 2015; 24(4): 864–7.
38. van Rappard D.F., de Vries A.L.C., Oostrom K.J. et al. Slowly progressive psychiatric symptoms: think metachromatic leukodystrophy. *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry* 2018; 57(2): 74–6.
39. Kumperscak H.G., Paschke E., Gradisnik P. et al. Adult metachromatic leukodystrophy: disorganized schizophrenia-like symptoms and postpartum depression in 2 sisters. *J. Psychiatry Neurosci.* 2005; 30(1): 33–6.
40. Kohlmann R., Barenberg K., Anders A. et al. Acetobacter indonesiensis bacteremia in child with metachromatic leukodystrophy. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(9): 1681–3.
41. Black D.N., Taber K.H., Hurley R.A. Metachromatic leukodystrophy: a model for the study of psychosis. *J. Neuropsychiatry. Clin. Neurosci.* 2003; 15(3): 289–93.
42. Espejo L.M., de la Espriella R., Hernandez J.F. [Metachromatic Leukodystrophy. Case presentation]. *Rev. Colomb. Psiquiatr.* 2017; 46(1): 44–9.
43. Bostantjopoulou S., Katsarou Z., Michelakaki H. et al. Seizures as a presenting feature of late onset metachromatic leukodystrophy. *Acta Neurol. Scand.* 2000; 102(3): 192–5.
44. Stoeck K., Psychogios M.N., Ohlenbusch A. et al. Late-onset metachromatic leukodystrophy with early onset dementia associated with a novel missense mutation in the arylsulfatase A Gene. *J. Alzheimers Dis.* 2016; 51(3): 683–7.
45. Kohler W., Curiel J., Vanderver A. Adulthood leukodystrophies. *Nat. Rev. Neurol.* 2018; 14(2): 94–105.
46. Elgun S., Waibel J., Kehrner C. et al. Phenotypic variation between siblings with metachromatic leukodystrophy. *Orphanet J. Rare Dis.* 2019; 14(1): 136.
47. Velakoulis D., Ting A., Winton-Brown T. et al. Metachromatic leukodystrophy presenting as bipolar disorder. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 2014; 48(12): 1171–2.
48. Sessa M., Lorioli L., Fumagalli F. et al. Lentiviral haemopoietic stem-cell gene therapy in early-onset metachromatic leukodystrophy: an ad-hoc analysis of a non-randomised, open-label, phase 1/2 trial. *Lancet* 2016; 388(10043): 476–87.
49. Rip J.W., Gordon B.A. A simple spectrophotometric enzyme assay with absolute specificity for arylsulfatase A. *Clin. Biochem.* 1998; 31(1): 29–31.
50. Spacil Z., Babu Kumar A., Liao H.C. et al. Sulfatide Analysis by Mass Spectrometry for Screening of Metachromatic Leukodystrophy in Dried Blood and Urine Samples. *Clin. Chem.* 2016; 62(1): 279–86.
51. Eichler F., Grodd W., Grant E. et al. Metachromatic leukodystrophy: a scoring system for brain MR imaging observations. *Am. J. Neuroradiol.* 2009; 30(10): 1893–7.
52. Barkhof F., Scheltens P. Imaging of white matter lesions. *Cerebrovasc. Dis.* 2002; 13 Suppl 2: 21–30.
53. Singh P., Kaur R. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging findings in a case of metachromatic leukodystrophy. *J. Pediatr. Neurosci.* 2016; 11(2): 131–3.
54. Chauhan N.S., Sharma M., Bhardwaj A. Classical case of late-infantile form of metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci. Rural Pract.* 2016; 7(3): 473–5.
55. Groeschel S., Kehrner C., Engel C. et al. Metachromatic leukodystrophy: natural course of cerebral MRI changes in relation to clinical course. *J. Inher. Metab. Dis.* 2011; 34(5): 1095–102.
56. Kihara H., Ho C.K., Fluharty A.L. et al. Prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy in a family with pseudo arylsulfatase A deficiency by the cerebroside sulfate loading test. *Pediatr. Res.* 1980; 14(3): 224–7.
57. Verma J., Bijarnia-Mahay S., Verma I.C. Prenatal diagnosis of lysosomal storage disorders using chorionic Villi. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1594: 265–91.
58. Verma J., Thomas D.C., Sharma S. et al. Inherited metabolic disorders: prenatal diagnosis of lysosomal storage disorders. *Prenat. Diagn.* 2015; 35(11): 1137–47.
59. Bellettato C.M., Scarpa M. Possible strategies to cross the blood-brain barrier. *Ital. J. Pediatr.* 2018; 44(2): 131.
60. Dong X. Current strategies for brain drug delivery. *Theranostics* 2018; 8(6): 1481–93.
61. Penati R., Fumagalli F., Calbi V. et al. Gene therapy for lysosomal storage disorders: recent advances for metachromatic leukodystrophy and mucopolysaccharidosis I.J. *Inher. Metab. Dis.* 2017; 40(4): 543–54.
62. Kidd D., Nelson J., Jones F. et al. Long-term stabilization after bone marrow transplantation in juvenile metachromatic leukodystrophy. *Arch. Neurol.* 1998; 55(1): 98–9.
63. Groeschel S., Kuhl J.S., Bley A.E. et al. Long-term outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with juvenile metachromatic leukodystrophy compared with nontransplanted control patients. *JAMA Neurol.* 2016; 73(9): 1133–40.
64. Stein A., Stroobants S., Gieselmann V. et al. Anti-inflammatory therapy with simvastatin improves neuroinflammation and CNS function in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 2015; 23(7): 1160–8.
65. Bredius R.G., Laan L.A., Lankester A.C. et al. Early marrow transplantation in a pre-symptomatic neonate with late infantile metachromatic leukodystrophy does not halt disease progression. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39(5): 309–10.
66. Boucher A.A., Miller W., Shanley R. et al. Long-term outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for metachromatic leukodystrophy: the largest single-institution cohort report. *Orphanet J. Rare Dis.* 2015; 10: 94.
67. Solders M., Martin D.A., Andersson C. et al. Hematopoietic SCT: a useful treatment for late metachromatic leukodystrophy. *Bone Marrow Transplant.* 2014; 49(8): 1046–51.
68. van Rappard D.F., Boelens J.J., van Egmond M.E. et al. Efficacy of hematopoietic cell transplantation in metachromatic leukodystrophy: the Dutch experience. *Blood* 2016; 127(24): 3098–101.
69. Chen X., Gill D., Shaw P. et al. Outcome of early juvenile onset metachromatic leukodystrophy after unrelated cord blood transplantation: a case series and review of the literature. *J. Child Neurol.* 2016; 31(3): 338–44.
70. Galieva L.R., Mukhamedshina Y.O., Arkhipova S.S. et al. Human umbilical cord blood cell transplantation in neuroregenerative strategies. *Front. Pharmacol.* 2017; 8: 628.
71. Martin H.R., Poe M.D., Provenzale J.M. et al. Neurodevelopmental outcomes of umbilical cord blood transplantation in metachromatic leukodystrophy. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2013; 19(4): 616–24.
72. Goncalves K.A., Li S., Brooks M. et al. Mgt4-456, a First-in-class cell therapy with high doses of CD34+CD90+ Cells, enhances speed and level of human microglia engraftment in the brains of NSG Mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2019; 25: 92–3.
73. Koc O.N., Peters C., Aubourg P. et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp. Hematol.* 1999; 27(11): 1675–81.
74. Azizi S.A., Stokes D., Augelli B.J. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. *PNAS USA* 1998; 95(7): 3908–13.
75. Koc O.N., Day J., Nieder M. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30(4): 215–22.
76. Meuleman N., Vanhaelen G., Tondreau T. et al. Reduced intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation with mesenchymal stromal cells infusion for the treatment of metachromatic leukodystrophy: a case report. *Haematologica* 2008; 93(1): 11–3.
77. Matzner U., Herbst E., Hedayati K.K. et al. Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2005; 14(9): 1139–52.
78. Stroobants S., Gerlach D., Matthes F. et al. Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(14): 2760–9.
79. Matthes F., Stroobants S., Gerlach D. et al. Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21(11): 2599–609.
80. Hui E.K.W., Lu J.Z., Boado R.J. et al. Preclinical studies of a brain penetrating IgG Trojan horse-arylsulfatase fusion protein in the metachromatic leukodystrophy mouse. *Mol. Genet. Metab.* 2019; 126: 177.

81. Boado R.J., Lu J.Z., Hui E.K. et al. Pharmacokinetics and brain uptake in the rhesus monkey of a fusion protein of arylsulfatase a and a monoclonal antibody against the human insulin receptor. *Biotechnol. Bioeng.* 2013; 110(5): 1456–65.
82. Taymans J.M., Vandenberghe L.H., Haute C.V. et al. Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. *Hum. Gene Ther.* 2007; 18(3): 195–206.
83. Sevin C., Benraiss A., Van Dam D. et al. Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 2006; 15(1): 53–64.
84. Miyake N., Miyake K., Asakawa N. et al. Long-term correction of biochemical and neurological abnormalities in MLD mice model by neonatal systemic injection of an AAV serotype 9 vector. *Gene Ther.* 2014; 21(4): 427–33.
85. Kurai T., Hisayasu S., Kitagawa R. et al. AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase a efficiently corrects sulfate storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* 2007; 15(1): 38–43.
86. Cearley C.N., Wolfe J.H. Transduction characteristics of adeno-associated virus vectors expressing cap serotypes 7, 8, 9, and Rh10 in the mouse brain. *Mol. Ther.* 2006; 13(3): 528–37.
87. Piguet F., Sondhi D., Piraud M. et al. Correction of brain oligodendrocytes by AAVrh.10 intracerebral gene therapy in metachromatic leukodystrophy mice. *Hum. Gene Ther.* 2012; 23(8): 903–14.
88. Rosenberg J.B., Sondhi D., Rubin D.G. et al. Comparative efficacy and safety of multiple routes of direct CNS administration of adeno-associated virus gene transfer vector serotype rh.10 expressing the human arylsulfatase A cDNA to nonhuman primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2014; 25(3): 164–77.
89. Zerah M., Piguet F., Colle M.A. et al. Intracerebral gene therapy using AAVrh.10-hARSA recombinant vector to treat patients with early-onset forms of metachromatic leukodystrophy: preclinical feasibility and safety assessments in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015; 26(2): 113–24.
90. Sevin C., Roujeau T., Cartier N. et al. Intracerebral gene therapy in children with metachromatic leukodystrophy: Results of a phase I/II trial. *Mol. Genet. Metab.* 2018; 123(2): 129.
91. Matzner U., Hartmann D., Lullmann-Rauch R. et al. Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations. *Gene Ther.* 2002; 9(1): 53–63.
92. Biffi A., Capotondo A., Fasano S. et al. Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice. *J. Clin. Invest.* 2006; 116(11): 3070–82.
93. Biffi A., Montini E., Lorioli L. et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 2013; 341(6148): 1233158.
94. Meneghini V., Frati G., Sala D. et al. Generation of human induced pluripotent stem cell-derived bona fide neural stem cells for ex vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy. *Stem Cells Transl. Med.* 2017; 6(2): 352–68.
95. Ashrafi M.R., Amanat M., Garshasbi M. et al. An update on clinical, pathological, diagnostic, and therapeutic perspectives of childhood leukodystrophies. *Expert Rev. Neurother.* 2020; 20(1): 65–84.
96. Assadi M., Wang D.J., Anderson K. et al. Vitamin k antagonist warfarin for palliative treatment of metachromatic leukodystrophy, a compassionate study of four subjects. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 2012; 4: 73–9.
97. Sundaram K.S., Lev M. Warfarin administration reduces synthesis of sulfatides and other sphingolipids in mouse brain. *J. Lipid Res.* 1988; 29(11): 1475–9.
98. Roy A., Pahan K. Prospects of statins in parkinson disease. *Neuroscientist* 2011; 17(3): 244–55.
99. Orange J.S., Hossny E.M., Weiler C.R. et al. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117(4): 525–53.
100. Roi D., Mankad K., Kaliakatsos M. et al. Thickening of the optic nerves in metachromatic leukodystrophy: A new MRI finding. *Neuroradiol. J.* 2016; 29(2): 134–6.
101. Haberlandt E., Scholl-Burgi S., Neuberger J. et al. Peripheral neuropathy as the sole initial finding in three children with infantile metachromatic leukodystrophy. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 2009; 13(3): 257–60.
102. Gonorazky H.D., Amburgey K., Yoon G. et al. Subacute demyelinating peripheral neuropathy as a novel presentation of late infantile metachromatic leukodystrophy. *Muscle Nerve* 2017; 56(5): 41–4.
103. Nevo Y., Pestronk A., Lopate G. et al. Neuropathy of metachromatic leukodystrophy: improvement with immunomodulation. *Pediatr. Neurol.* 1996; 15(3): 237–9.
104. Dubey R., Chakrabarty B., Gulati S. et al. M. Leukodystrophy presenting as acute-onset polyradiculoneuropathy. *Pediatr. Neurol.* 2014; 50(6): 616–8.