

Лабораторные исследования и болезнь Помпе: от подозрения до мониторинга терапии

К.В. Савостьянов¹, С.С. Никитин², К.Е. Карпачёва³

¹Лаборатория молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава России; Россия, 119991, Москва, Ломоносовский проспект, 2 стр. 1

²Региональная общественная организация «Общество специалистов по нервно-мышечным болезням», Медицинский центр «Практическая неврология»; Россия, 117218, Москва, ул. Кржижановского, 17, корп. 2;

³Представительство АО «Санофи-авентис груп»; Россия, 125009, Москва, ул. Тверская, 22;

Контакты: Клавдия Евгеньевна Карпачёва klavdiya.karpacheva@sanofi.com

Болезнь Помпе (БП) — редкое, прогрессирующее, часто фатальное наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, диагностика которого затруднена высокой гетерогенностью клинических проявлений и низкой осведомленностью врачей. Доступность лабораторной диагностики редких болезней растет с каждым годом, и БП не является исключением. Лаборатории России и мира за последние несколько лет достигли значительных успехов в ускорении и увеличении точности диагностики БП. К сожалению, в русскоязычной литературе недостаточно актуальной информации о лабораторной диагностике БП. Данный обзор призван заполнить этот пробел.

Ключевые слова: болезнь Помпе, поясно-конечностная прогрессирующая мышечная дистрофия, ген GAA, лабораторная диагностика редких болезней, гликогеноз II типа, лизосомные болезни накопления, секвенирование нового поколения, креатинкиназа, сухое пятно крови, перекрестно реагирующий иммунологический материал, антитела к α -глюкозидазе, орфанные болезни

DOI: 10.17650/2222-8721-2016-6-1-54-62

Laboratory studies and Pompe disease: from suspicion to therapy monitoring

K.V. Savost'yanov¹, S.S. Nikitin², K.E. Karpacheva³

¹Laboratory of Molecular Genetics and Cell Biology Scientific Center of Children's Health; Build 1, 2 Lomonosovskiy prospekt, Moscow, 119991, Russia

²Society of Experts in Neuromuscular Diseases, Medical Center "Practical Neurology"; Build. 2, 17 Krzhizhanovskogo St., Moscow, 117218, Russia;

³Representative Office, Sanofi Aventis Group; 22 Tverskaya St., Moscow, 125009, Russia;

Pompe disease (PD) is a rare, progressive, commonly fatal inherited autosomal recessive disease that is difficult to diagnose due to its obvious clinical heterogeneity and low awareness among physicians. Access to the laboratory diagnosis of rare diseases increases every year. In the past several years, Russian and foreign laboratories have achieved considerable success in accelerating and improving the diagnostic accuracy of PD. Unfortunately, the Russian-language literature contains scarce relevant information on the laboratory diagnosis of PD. This review is to fill up this gap.

Key words: Pompe disease, limb-girdle muscular dystrophy, GAA gene, rare diseases laboratory diagnosis, glycogenesis type II, lysosomal storage diseases, next generation sequencing, creatine kinase, dry blood spot, cross-reactive immunological material, anti- α -glucosidase antibodies, orphan diseases

Введение

Болезнь Помпе (БП, OMIM: 232300 — ORPHA 365), или гликогеноз II типа (glycogen storage disease II), относится к наследственным лизосомным болезням накопления вследствие дефицита фермента кислой α -глюкозидазы (GAA) [1]. БП — орфанное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, для лечения которого разработана ферментная заместительная терапия (ФЗТ). В 2006 г. было получено разрешение на применение рекомбинантной α -глюкозидазы в Европе как единственного препара-

тата патогенетической терапии для пациентов, страдающих БП [2].

Несмотря на значительные успехи в лабораторной диагностике БП, часто срок постановки диагноза и значения патогенетической терапии увеличивается на годы и даже десятилетия. Принимая во внимание, что распространенность БП по разным оценкам составляет от 1:140 000 до 1:40 000 [3, 4], а по результатам скрининга среди новорожденных — 1:5400 [5], более 95 % российских пациентов с БП не знают о своем диагнозе. Данный обзор рассматривает прак-

тические моменты, касающиеся 3 групп лабораторных исследований: тех, что позволяют заподозрить, подтвердить диагноз БП и мониторировать состояние пациентов (см. таблицу).

Показатели лабораторных исследований, результаты которых при болезни Помпе могут выходить за пределы референсных значений

КК — внутриклеточный фермент, обеспечивающий энергией быстрое мышечное сокращение. При разрушении мышечных клеток КК попадает в кровь. Необходимо измерять уровень КК в крови у всех пациентов с жалобами на мышечную слабость, так как слабость мышц вследствие разрушения мышечных волокон является одним из кардинальных симптомов БП [6].

Существуют различные изоформы КК, но даже стандартный лабораторный анализ, указывающий на повышение общей активности КК, должен насторожить относительно БП. Обычно при БП уровень КК повышен, хотя описаны редкие случаи с нормальными показателями КК [7–9].

Повышение уровня КК в крови при БП — важный, но не специфический показатель, характерный для многих приобретенных или наследственных мышечных заболеваний. КК повышается у всех без исключения больных с младенческой формой заболевания [10], а при БП с поздним дебютом (БППД) повышение КК отмечается в 91–95 % случаев [11]. При младенческой форме БП уровень КК повышен, как правило, в 2–5 раз, а при БППД чаще всего незначительно превышает верхнюю границу нормы. Независимо от формы заболевания для БП нехарактерно превышение уровня КК более чем в 15 раз от верхней границы нормы. При БППД повышение КК может быть бессимптомным, что должно быть основанием для дальнейшего наблюдения за пациентом и проведения обследования [12, 13].

ЛДГ — внутриклеточный гликолитический фермент, который обильно экспрессируется в сердечной и скелетной мускулатуре и является одним из важнейших сывороточных маркеров повреждения мышечной ткани [14]. Показано, что при младенческой форме БП

активность ЛДГ варьирует от нормальной (но близкой к верхней границе нормы) до повышенной в 2–5 раз. При БППД активность ЛДГ повышена примерно в 96 % случаев [9].

АСТ и **АЛТ** — ферменты, которые активны во всех клетках организма, больше всего их содержится в сердце, печени, почках и мышцах. Характерное для БП нарушение работы печеночной и мышечной ткани приводит к повышению активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови. АСТ — более информативный маркер, нежели АЛТ. У пациентов с младенческой формой болезни активность АСТ в 3–10 раз превышает норму, АЛТ варьирует от нормы до превышения в 2–7 раз. При БППД активность АЛТ повышена в 94 % и АСТ — в 95 % случаев [9, 11].

Необходимо знать:

- во всех описанных в литературе случаях БП был повышен уровень хотя бы одного фермента (КК, ЛДГ, АСТ, АЛТ) [9, 10];
- чтобы заподозрить БП, важно помнить о возможной связи повышения уровня «печеночных» (АЛТ и АСТ), и мышечных (КК и ЛДГ) ферментов;
- повышенный уровень КК — важный маркер БП, определяющий необходимость скрининга на БП в группе пациентов с необъясненной гиперККемией [6].

Еще одна лабораторная находка, характерная для пациентов с БП (особенно с младенческой формой) — **наличие в лимфоцитах периферической крови крупных вакуолей**, которые выглядят прозрачными при окраске мазка по Романовскому–Гимзе [11]. Более информативной является оценка мазка, окрашенного реактивом Шиффа (periodic acid Schiff, PAS). Наличие вакуолей в лимфоцитах типично для различных заболеваний накопления, однако PAS-позитивные вакуоли специфичны для БП [9, 11].

Тесты, позволяющие диагностировать болезнь Помпе

Среди лабораторных исследований, применяемых для диагностики БП, следует особо выделить так называемые рутинные тесты. Эти тесты просты в испол-

Роль лабораторных исследований в диагностике и мониторинге БП

Показатели лабораторных исследований, результаты которых могут выходить за пределы референсных значений	Тесты, позволяющие диагностировать БП		Тесты, проводимые пациентам с подтвержденным диагнозом БП
	рутинные	дополнительные	
<ul style="list-style-type: none"> • КК • ЛДГ • АСТ/АЛТ • вакуолизация лимфоцитов 	<ul style="list-style-type: none"> • Активность GAA в DBS • ДНК-анализ гена GAA 	<ul style="list-style-type: none"> • Активность GAA в лимфоцитах/фибробластах/мышечном биоптате • Биопсия мышц • Glc4 в моче • NGS-исследование 	<ul style="list-style-type: none"> • CRIM-статус • Антитела IgG к рекомбинантной GAA • Glc4 в моче • КК

Примечание. ЛДГ — лактатдегидрогеназа; АСТ — аспартатаминотрансфераза; АЛТ — аланинаминотрансфераза; GAA — глюкозидаза-альфа-кислая; DBS — сухие пятна крови (dried blood spots); Glc4 — глюкозотетрасахарид; NGS — секвенирование нового поколения (next generation sequencing); CRIM — перекрестнореагирующий иммунологический материал (cross-reactive immunological material); КК — креатинкиназа

нении, выполняются достаточно большим количеством лабораторий, относительно недороги и при этом имеют хорошие показатели чувствительности и специфичности. Именно рутинные тесты должны быть в первую очередь сделаны пациенту с подозрением на БП. В России рутинно выполняются два теста, направленных на диагностику БП: определение активности α -глюкозидазы А в сухих пятнах крови (DBS — dry blood spots) и молекулярно-генетический анализ (он же ДНК-анализ) гена *GAA*.

Другие исследования, результаты которых могут указывать на БП, можно назвать дополнительными. Ключевое отличие дополнительных тестов заключается в том, что их информативность не всегда оправдывает затраты и усилия, которые нужно потратить на их выполнение. Такими тестами является определение активности α -глюкозидазы А в биоматериалах, отличных от DBS (лимфоциты цельной крови, культивируемые фибробласты, мышечный биоптат), определение тетрасахаридов в моче и секвенирование с использованием технологии нового поколения. К дополнительным тестам разумно обращаться тогда, когда результаты рутинных исследований неоднозначны, противоречивы или не согласуются с клиническими данными.

Рутинные тесты. Патогенетическая причина БП — снижение или отсутствие активности *GAA*, поэтому **определение активности *GAA*** — базовый тест в диагностике БП [15]. Активность *GAA* можно определять в различных биологических материалах (периферических лимфоцитах, культивируемых фибробластах, мышечном биоптате и др.), но для скрининга оптимальным является тест с использованием DBS. Он сочетает в себе высокую чувствительность «традиционных» способов определения активности *GAA* (например, в лимфоцитах или фибробластах) с простотой выполнения и возможностью применять для скрининга большого числа пациентов из групп риска [16]. Несмотря на отсутствие строгой корреляции между остаточной активностью фермента и тяжестью болезни, при младенческой форме наблюдается почти полное отсутствие активности *GAA*, в то время как при остальных фенотипах остаточная активность значительно варьирует и может достигать 30 % средней нормы [11].

Техника получения DBS проста и не требует особой подготовки персонала и инструментов, подходит как венозная, так и капиллярная кровь, полученная из пальца или пятки (см. рисунок). После нанесения пятен крови на карту необходимо оставить образец при комнатной температуре на 4 ч до полного высыхания. После высыхания карта готова к отправке в лабораторию. В качестве карты используется специальная бу-

мага Whatman 903, позволяющая сохранить материал пригодным для анализа на протяжении многих месяцев при комнатной температуре. DBS пересылаются по почте без каких-либо особых условий транспортировки. Они пригодны не только для ферментного, но и для молекулярно-генетического анализа, который необходимо проводить при положительном или сомнительном результате ферментного теста.

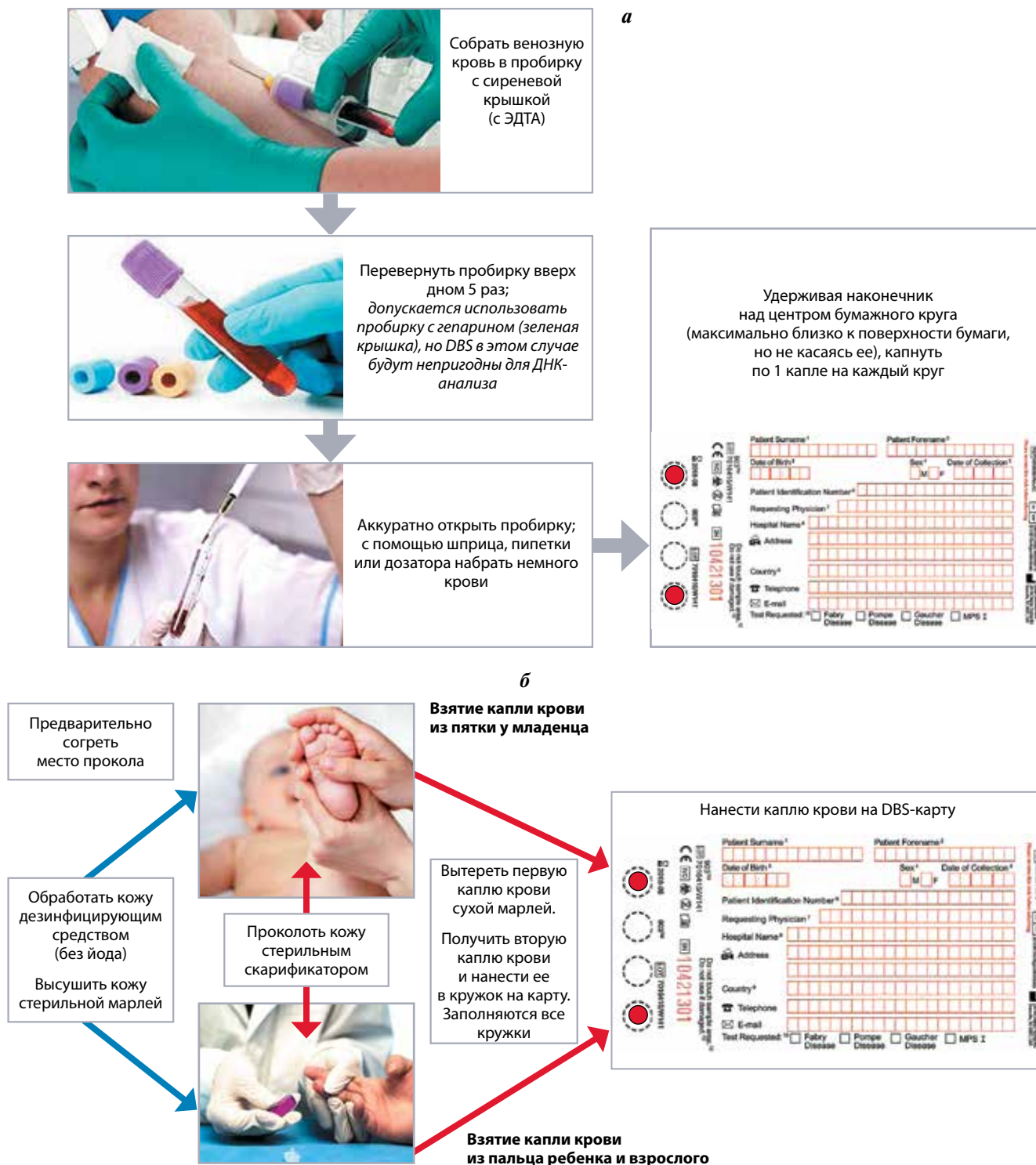
Аналитические характеристики теста на активность *GAA* в DBS не отличаются от других скрининговых тестов: чувствительность приближается к 100 %¹ [15], специфичность не так высока. Иными словами, отрицательный результат теста с высокой вероятностью свидетельствует об отсутствии болезни, а положительный с определенной вероятностью может быть ложным и требует дополнительной проверки. В связи с этим ферментный тест не является самодостаточным в диагностике БП. Существует множество факторов, из-за которых результат ферментного теста может быть ложноположительным. К ним, в первую очередь, относится нарушение простых правил получения сухих пятен крови, условий их хранения и транспортировки, а также факт гетерозиготного носительства БП и т. д.

При положительном или сомнительном результате ферментного теста требуется проведение подтверждающих тестов, в качестве которых может выступать определение активности *GAA* в другом биологическом материале или **молекулярно-генетический анализ** гена *GAA*. Последний является предпочтительным и наиболее часто используемым. Со времени клонирования гена *GAA* (OMIM: 606800), кодирующего кислотную α -глюкозидазу, описано более 350 патогенных мутаций этого гена [17]. Большинство больных являются компаунд-гетерозиготными (т. е. несут 2 различные патогенные мутации). Полный список мутаций в гене *GAA* представлен на сайте Центра болезни Помпе им. Эразмуса при Роттердамском университете [18].

Результаты эпидемиологических исследований показали, что при БП некоторые мутации встречаются чаще в некоторых этнических группах, но даже это не позволяет избежать полного анализа гена *GAA*, так как в большинстве популяций отсутствуют founder-мутации. Сегодня секвенирование всех экзонов и приэкзонных участков интронов не представляет особых трудностей и является предпочтительным вариантом молекулярно-генетического анализа гена *GAA*. Исключение составляет обследование sibсов и других родственников больного, при котором разумно определять носительство мутаций пробанда.

У значительной части пациентов при молекулярно-генетическом анализе выявляются новые, не описанные

¹В ранних публикациях иногда приводится информация о невысокой чувствительности ферментного теста, из-за которой около 11 % результатов оказывались ложноотрицательными вследствие интерференции активностей кислой и нейтральной α -глюкозидаз [10]. Проблема была решена около 2006 г. внедрением в реакционную смесь акарбозы (специфического ингибитора нейтральной α -глюкозидазы), благодаря чему чувствительность ферментного теста значительно возросла.



Способы получения сухих пятен крови для диагностики БП: а — из венозной крови; б — из капиллярной крови

в литературе нуклеотидные замены в гене *GAA*. Определение клинического статуса таких замен может представлять некоторые трудности. В этом случае на помощь приходит специализированное программное обеспечение, которое позволяет предсказывать вероятность того, что данная нуклеотидная замена влияет на функцию белка и, соответственно, может быть патогенной [19].

Тип мутаций и уровень остаточной активности *GAA* диктуют клиническое течение заболевания, хотя модифицирующие факторы также играют существенную роль. Следует отметить, что мутационный анализ не может заменить оценку активности фермента. Мутации в интронах или промоторе могут быть упущены или неправильно истолкованы. Методы оценки такого рода

мутаций существуют, но являются трудоемкими и не рассматриваются как рутинные.

Молекулярно-генетический анализ также важен для выявления носителей мутаций в семье пациента. При подтверждении диагноза БП пациентам и их родным рекомендуется пройти медико-генетическое консультирование. Информация о мутациях, являющихся причиной БП у пациента, важна и для проведения пренатальной и преимплантационной диагностики.

Дополнительные тесты. Можно определить *активность GAA в лимфоцитах, фибробластах, мышечном биоптате*, поскольку этот фермент экспрессируется всеми тканями организма. Однако существуют изоферменты GAA, которые, хотя и кодируются другими генами, обладают сходной активностью [20]. Если для анализа использовать ткани, экспрессирующие эти изоферменты, результаты теста могут быть искажены (активность изофермента «замаскирует» недостаточность активности GAA, что приведет к ложноотрицательному результату). Самыми распространенными изоферментами GAA являются сахараза-изомальтаза, мальтаза-глюкоамилаза, глюкозидаза II и нейтральная α -глюкозидаза [20]. Мальтаза-глюкоамилаза (почечный изофермент) присутствует в нейтрофильных лейкоцитах, но не в лимфоцитах. Чтобы избежать интерференции с этим ферментом, для анализа используются лимфоциты. Исследование выполняется при кислом pH, чтобы исключить влияние нейтральной α -глюкозидазы, также присутствующей в нейтрофилах. В реакционную смесь добавляется акарбоза — специфический ингибитор изоферментов GAA [21]. «Загрязнение» изоферментами возможно при неполном их подавлении ингибитором или при погрешностях методики отделения лимфоцитов.

На ранних этапах становления лабораторной диагностики БП активность фермента определяли в культивируемых фибробластах и мышечном биоптате, чтобы избежать влияния ряда изоферментов [20]. Сегодня благодаря развитию методов «подавления» активности изоферментов нет необходимости прибегать к этим трудоемким и не всегда доступным исследованиям (по крайней мере, на первом этапе обследования). Доля пациентов, у которых диагноз БП установлен благодаря исследованию ферментативной активности GAA в фибробластах и/или мышечном биоптате, снижается с начала двухтысячных [22].

Биопсия мышц традиционно использовалась для диагностики БП до появления новых более точных методов. Гликоген, накапливаемый в клинически пораженных мышцах, составляет около 5 % их веса. В слабо пораженных мышцах и в мышцах с явным преобладанием соединительной ткани содержание гликогена в расчете на грамм ткани может оказаться в пределах нормы. Отложение гликогена в лизосомах создает гистологическую картину вакуольной миопатии. Степень вакуолизации, как правило, коррелирует с тяжестью клинических симптомов [20]. При младенческой фор-

ме БП практически все мышечные волокна заполнены большими вакуолями. При более легких формах вакуолизация выражена в меньшей степени. В клинически непораженных мышцах изменения в биоптатах неспецифичны. Вакуоли с повышенным содержанием гликогена окрашиваются реактивом Шиффа и дают положительную реакцию с кислой фосфатазой, что указывает на их лизосомальное происхождение. Прежде чем использовать реакцию PAS, поперечные гистологические срезы следует обработать раствором диастазы для дифференциации гликогена, гликопротеинов и гликолипидов. Диастазная обработка ведет к исчезновению гликогена из клеток, оставляя гликопротеины и гликолипиды. Таким образом, негативная реакция на диастазу в сочетании с позитивной PAS-реакцией говорит о накоплении гликогена [23].

Гистологический анализ свидетельствует о равной степени поражения мышечных волокон различного типа. Лишь иногда наблюдались преимущественные поражения волокон 1-го типа по сравнению со 2-м. Наличие в отдельных случаях некрозов и дистрофических изменений мышечных волокон может быть неверно истолковано как мышечная дистрофия. В сильно пораженных мышцах наблюдается разрастание соединительной ткани и увеличение числа атрофированных мышечных волокон (от умеренного до значительного). Часто обнаруживаются патологические изменения в мышечных веретенах [24]. Нередко в биоптатах мышц при БППД наблюдаются неспецифические изменения, например, дольчатые волокна, волокна с негативной реакцией при окраске на цитохром с-оксидазу и «рваные красные волокна». «Рваные красные волокна» — поврежденные миофибриллы с повышенной эритрохромией (красная окраска) при окраске методом Гомори Трихром. Однако БП нельзя исключить даже при отсутствии вакуолей и накопления гликогена.

В 25–30 % случаев в мышечных биоптатах не выявляют накопления гликогена [7, 25]. Патологические изменения в мышцах варьируют в широких пределах. Нормальный гистологический анализ у взрослых пациентов не исключает БП. С другой стороны, повышенное содержание гликогена в скелетных мышцах наблюдается и при других заболеваниях. Так, увеличение цитоплазматического гликогена характерно для гликогенозов III, IV, V и VI типов [26]. Гликогенная инфильтрация в мышцах выявляется также при митохондриальных болезнях и длительном вливании глюкозы [27]. При синдроме Данона гликоген тоже накапливается в лизосомах [28].

В целом диагностическая и прогностическая ценность мышечных биопсий при БППД ограничена. Неспецифические изменения в мышечном биоптате не исключают БП [11].

Для *определения Glc4 в моче* применяется метод жидкостной хроматографии. Неспецифичная для БП секреция Glc4 встречается при различных клини-

ческих состояниях, связанных с увеличением кругооборота гликогена или его накопления [29, 30]. У большинства пациентов с БП отмечается повышение Glc4 в моче (при младенческой форме более выраженное, чем при БППД). Этот анализ служит дополнительным подтверждением диагноза [31, 32]. В России данный анализ не выполняется.

NGS-исследование, в отличие от традиционного сэнгеровского секвенирования, позволяет исследовать сразу протяженные участки генома, а не отдельные гены. За один «прогон» прибора может быть расшифрован весь геном человека, или весь экзон, или совокупность генов, отобранных по определенному критерию (генетическая панель). Последний вариант считается оптимальным для практического применения на современном этапе развития NGS.

В генетические панели включают десятки (а иногда сотни) генов, повреждение которых может привести к развитию определенного патологического фенотипа (например, мышечной дистрофии). Когда клиническая картина стерта, неспецифична и совместима со множеством наследственных заболеваний с примерно равной вероятностью, генетические панели могут быть решением проблемы. При проведении исследования на оборудовании средней производительности они обеспечивают лучшее качество прочтения ДНК, чем полноэкзомное секвенирование, а значит, имеют более низкий риск пропустить клинически важное изменение в гене, ответственном за развитие заболевания [33].

Стоимость NGS-исследований постоянно снижается, в то время как стоимость сэнгеровского секвенирования остается стабильной. Возможно, в ближайшем будущем стоимость традиционного секвенирования одного гена, ассоциированного с мышечной дистрофией, сравняется со стоимостью генетической панели, включающей если не все, то большую часть генов мышечных дистрофий. Если клиническая картина не позволяет сузить диагностический поиск до нескольких наиболее вероятных заболеваний, целесообразно принять к рассмотрению панельные NGS-исследования.

Маловероятно, что с широким распространением генетических панелей ценность диагностического опыта врача снизится. Генетические панели позволяют установить диагноз лишь для 16–65 % обследованных пациентов [34–36]. По-прежнему у пациентов выявляются большое количество изменений ДНК неопределенного значения и носительство аутосомно-рецессивных заболеваний. Корректная интерпретация результатов NGS требует от специалиста не только глубоких клинических знаний, но и умения читать и анализировать данные NGS.

Лабораторные тесты, проводимые пациентам с подтвержденным диагнозом болезни Помпе

Важно вести мониторинг состояния больных БП, как получающих патогенетическую терапию, так и не

получающих таковой [37]. Пациенты должны регулярно в установленные сроки проходить комплексное обследование, включающее физикальные, функциональные и лабораторные исследования. Хотя в последних работах по ведению пациентов с БП большее внимание уделяется изменению качества жизни пациентов, а не лабораторным показателям, их исследование остается основным инструментом изучения патофизиологических механизмов и особенностей течения БП.

CRIM-статус. Определение CRIM-статуса – лабораторный тест, результат которого может влиять на прогноз и ведение пациентов с младенческой формой БП. Пациенты, способные производить некоторое количество фермента (с остаточной активностью или без нее), считаются CRIM-положительными, а больные, организм которых не производит фермента вовсе – CRIM-отрицательными. Около 20–25 % пациентов с младенческой формой БП являются CRIM-отрицательными [38].

Показано, что у CRIM-положительных больных более позитивный прогноз выживаемости и независимости от инвазивной вентиляции легких, а также ниже риск развития высокого титра антител иммуноглобулина (Ig) класса G к рекомбинантной α -глюкозидазе при ФЗТ без индукции иммунной толерантности [39]. CRIM-отрицательные пациенты, напротив, хуже отвечают на ФЗТ, так как их организм распознает рекомбинантную α -глюкозидазу как чужеродный иммуногенный материал и вырабатывает к ней нейтрализующие антитела. Однако адекватная иммуномодулирующая терапия, назначенная до начала ФЗТ или вскоре после нее, значительно улучшает прогноз для CRIM-отрицательных пациентов [40].

CRIM-статус определяют методом Вестерн-блоттинга с использованием гомогенатов культивируемых фибробластов пациента, что требует получения кожного биоптата. Эта процедура весьма инвазивна для младенцев. Многообещающим выглядит определение CRIM-статуса на основании типа мутаций гена *GA*. Показано, что CRIM-отрицательные пациенты обычно гомозиготны или компаунд-гетерозиготны по нонсенс-мутациям, мутациям со сдвигом рамки считывания, а также крупным делециям, захватывающим несколько экзонов. CRIM-положительные больные, напротив, несут хотя бы одну миссенс-мутацию или делецию без сдвига рамки считывания. Однако применение этого метода на современном этапе ограничено, так как не только природа мутации определяет степень ее влияния на белковый продукт. Значительная доля пациентов несет хотя бы одну не описанную ранее мутацию, что затрудняет предсказание CRIM-статуса пациента [38]. Разработаны методы определения CRIM-статуса с использованием мононуклеаров периферической крови, но их точность ниже, чем при использовании культивируемых фибробластов, из-за чего их применение пока ограничено [41]. В Рос-

сии анализ на определение CRIM-статуса не выполняется.

Антитела IgG к рекомбинантной GAA. Как и у всех белковых препаратов, у рекомбинантной α -глюкозидазы есть определенный потенциал иммуногенности. Больным, получающим ФЗТ рекомбинантной α -глюкозидазой, титр антител IgG целесообразно определять 1 раз в 3 мес на протяжении первых 2 лет, затем — ежегодно. Пациентам, у которых развились аллергические или другие иммуноопосредованные реакции, можно рассмотреть назначение тестирования на антитела IgG к α -глюкозидазе.

У большинства пациентов, получающих терапию, антитела IgG к препарату появляются в первые 3 мес после первой инфузии [42].

Существуют данные о том, что пациенты, у которых титр антител к α -глюкозидазе длительное время держится выше 12 800, могут иметь худший клинический ответ на терапию и терять моторные функции с нарастанием титра антител. Влияние антител на отдаленный эффект терапии Майозаймом недостаточно изучено. Однако у CRIM-отрицательных младенцев наблюдается снижение эффективности терапии на фоне высокого персистирующего титра антител IgG. Инфузионные реакции чаще случаются у пациентов, имеющих антитела IgG к препарату. Больные, у которых выявляются антитела IgE к препарату, имеют повышенный риск развития анафилактических и серьезных аллергических реакций, в связи с чем таким пациентам следует уделять особое внимание во время процедуры инфузии Майозайма.

Тесты на антитела IgG и IgE к α -глюкозидазе проводятся методом иммуноферментного анализа или радиоиммунопреципитации [43]. В России анализ на определение антител к рекомбинантной α -глюкозидазе не выполняется.

Glc4 в моче. В отличие от сывороточных маркеров, количество Glc4 в моче хорошо коррелирует с содержанием гликогена в скелетных мышцах и ответом на терапию. Пациенты с наилучшим клиническим ответом имели самые низкие уровни Glc4. Отсутствие нормализации Glc4 в течение первых нескольких недель терапии связано с минимальным улучшением моторных функций и плохим прогнозом. Напротив, быстрое снижение уровня Glc4 спустя 4 нед терапии и поддержание такого низкого уровня в дальнейшем ассоциировано с благоприятным прогнозом [43, 44].

Референсные значения для Glc4 определяются лабораторией, выполняющей тестирование. По опубликованным данным, средняя концентрация Glc4 в моче здоровых детей в возрасте до 1 года составляет 8,9 ммоль/моль креатинина (2,4–16,2 ммоль/моль

креатинина), а в той же возрастной группе больных с младенческой формой БП — 39,4 ммоль/моль креатинина (16,6–74,2 ммоль/моль креатинина) [32]. Показано, что у младенцев с младенческой формой БП, выявленной благодаря неонатальному скринингу, средняя концентрация Glc4 в моче значимо ниже (25 ммоль/моль креатинина (18–32 ммоль/моль креатинина), чем у той же группы пациентов, выявленных по наличию симптомов БП (38 ммоль/моль креатинина (24–42 ммоль/моль креатинина) [45]. В России количественное определение Glc4 мочи не выполняется.

Определение уровня КК. Предпринимались попытки увязать динамику уровня КК с состоянием сердечно-сосудистой и мышечной систем у пациентов с БП. Этот сывороточный маркер был повышен у пациентов с наиболее неблагоприятным прогнозом, предположительно вследствие массивного повреждения мышечной ткани, однако КК не показал такой же выраженной корреляции с ответом моторных функций на терапию, как Glc4 [43].

При комплексном наблюдении за состоянием пациентов с БП следует уделять внимание уровню КК при назначении кортизонсодержащих препаратов, повышающих риск остеопении и мышечной атрофии. При назначении статинов следует определить уровень КК через 1 мес после начала приема препаратов; при повышении уровня КК, сопровождающееся крампи и мышечными болями, прием препаратов следует прекратить [46].

Диагностика болезни Помпе в России

На территории России с 04:00 до 19:00 по московскому времени работает «горячая линия» лабораторной диагностики БП: 8-800-100-24-94 (звонок бесплатный). Позвонив на «горячую линию», любой специалист может заказать курьерскую доставку сухих пятен крови своих пациентов для проведения лабораторной диагностики БП, а также получить DBS-бланки (пустые карты для нанесения пятен крови). При заполнении DBS-бланка необходимо написать фамилию, имя и отчество пациента, дату его рождения, пол, дату получения сухих пятен, данные о направляющем лечебно-профилактическом учреждении (ЛПУ) и враче, а также отметить цель исследования — болезнь Помпе. Сухие пятна крови транспортируются при комнатной температуре, без гарантийного письма направляющего ЛПУ. Для каждого образца выполняется скрининговый ферментный тест, а при получении положительного или сомнительного результата — подтверждающий молекулярно-генетический анализ [47]. Доставка материала и выполнение лабораторного исследования не оплачиваются направившим ЛПУ или пациентом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Никитин С.С., Ковальчук М.О., Захарова Е.Ю., Цивилева В.В. Болезнь Помпе с поздним началом: первое клиническое описание в России. Нервно-мышечные болезни 2014;(1):62–8. [Nikitin S.S., Koval'chuk M.O., Zakharova E.Yu., Tsivileva V.V. Pompe disease with late onset: first clinical description in Russia. Nervno-myshechnye bolezni = Neuromuscular Diseases 2014;(1):62–8. (In Russ.)].
2. Kishnani P.S., Nicolino M., Voit T. et al. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in infantile-onset Pompe disease. *J Pediatr* 2006;149(1):89–97.
3. Aulsems M.G., Lochman P., van Diggelen O.P. A diagnostic protocol for adult-onset glycogen storage disease type II. *Neurology* 1999;52(4): 851–3.
4. Poorthuis B.J., Wevers R.A., Kleijer W.J. et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum Genet* 1999;105(1–2):151–6.
5. Hopkins P.V., Campbell C., Klug T. et al. Lysosomal storage disorder screening implementation: findings from the first six months of full population pilot testing in Missouri. *J Pediatr* 2015;166(1):172–7.
6. Никитин С.С. Бессимптомная гиперкреатининемия в клинике нейромышечных болезней. Неврологический журнал 2015;20(5): 26–33. [Nikitin S.S. Asymptomatic hypercreatininemia in the clinic of neuromuscular diseases. *Nevrologicheskii zhurnal = Neurologic Journal* 2015;20(5):26–33. (In Russ.)].
7. Laforêt P., Nicolino M., Eymard P.B. Juvenile and adult-onset acid maltase deficiency in France: genotype-phenotype correlation. *Neurology* 2000;55(8): 1122–8.
8. Kishnani P.S., Steiner R.D., Bali D. et al. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med* 2006;8(5):267–88.
9. Winkel L.P., Hagemans M.L., van Doorn P.A. et al. The natural course of non-classic Pompe's disease; a review of 225 published cases. *J Neurol* 2005;252(8):875–84.
10. van den Hout H.M., Hop W., van Diggelen O.P. et al. The Natural Course of Infantile Pompe's Disease: 20 Original Cases compared with 133 cases from literature. *Pediatrics* 2003;112(2):332–40.
11. Beethmann M., Straub V., Reuser A. Pompe disease. *Bremen: UNI-MED*, 2014.
12. Gutiérrez-Rivas E., Bautista J., Vilchez J.J. et al. Targeted screening for the detection of Pompe disease in patients with unclassified limb-girdle muscular dystrophy or asymptomatic hyperCKemia using dried blood: A Spanish cohort. *Neuromuscul Disord* 2015;25(7):548–53.
13. Fardeau M., Desguerre I. Diagnostic workup for neuromuscular diseases. *Handb Clin Neurol* 2013;113:1291–7.
14. Huijgen H.J., Sanders G.T., Koster R.W. et al. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35(8):569–79.
15. Pompe Disease Diagnostic Working Group, Winchester B., Bali D. et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab* 2008;93(3):275–81.
16. Castilhos C.D., Mezzalana J., Goldim M.P. et al. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 2014;536(2):344–7.
17. Kroos M., Hoogeveen-Westerveld M., Michelakakis H. et al. Update of the pompe disease mutation database with 60 novel GAA sequence variants and additional studies on the functional effect of 34 previously reported variants. *Hum Mutat* 2012; 33(8):1161–5.
18. http://www.erasmusmc.nl/klinische_genetica/research/lijnen/pompe_center.
19. Houdayer C. In silico prediction of splice-affecting nucleotide variants. *Methods Mol Biol* 2011;760:269–81.
20. Hirschhorn R., Reuser A.J. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New-York: McGraw-Hill, 2001. Pp. 3389–420.
21. Jack R.M., Gordon C., Scott C.R. et al. The use of acarbose inhibition in the measurement of acid alpha-glucosidase activity in blood lymphocytes for the diagnosis of Pompe disease. *Genet Med* 2006;8(5):307–12.
22. Kishnani P.S., Amartino H.M., Lindberg C. Methods of diagnosis of patients with Pompe disease: Data from the Pompe Registry. *Mol Genet Metab* 2014; 113(1–2):84–91.
23. Engel A.G., Hirschhorn R., Huie M.L. Acid maltase deficiency. By eds.: A.G. Engel, C. Franzini-Armstrong. *Myology*. New York: McGraw-Hill, 2004. Pp. 1533–52.
24. van der Walt J.D., Swash M., Leake J., Cox E.L. The pattern of involvement of adult-onset acid maltase deficiency at autopsy. *Muscle Nerve* 1987;10(3): 272–81.
25. Müller-Felber W., Horvath R., Gempel K. et al. Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. *Neuromuscul Disord* 2007; 17(9–10):698–706.
26. Shin Y.S. Glycogen storage disease: clinical, biochemical, and molecular heterogeneity. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13(2):115–20.
27. Hansen B.F., Asp S., Kiens B., Richter E.A. Glycogen concentration in human skeletal muscle: effect of prolonged insulin and glucose infusion. *Scand J Med Sci Sports* 1999;9(4):209–13.
28. D'souza R. S., Levandowski C., Slavov D. et al. Danon disease: clinical features, evaluation, and management. *Circ Heart Fail* 2014;7(5):843–9.
29. Rozakis T., Ramsay S.L., Whitfield P.D. et al. Determination of oligosaccharides in Pompe disease by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2002;48(1):131–9.
30. Young S.P., Stevens R.D., An Y. et al. Analysis of a glucose tetrasaccharide elevated in Pompe disease by stable isotope dilution-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003;316(2):175–80.
31. Manwaring V., Prunty H., Bainbridge K. et al. Urine analysis of glucose tetrasaccharide by HPLC; a useful marker for the investigation of patients with Pompe and other glycogen storage diseases. *J Inher Metab Dis* 2012;35(2):311–6.
32. Sluiter W., van den Bosch J.C., Goudriaan D.A. Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for a characteristic glycogen-derived tetrasaccharide in Pompe disease and other glycogen storage diseases. *Clin Chem* 2012;58(7):1139–47.
33. de Koning T.J., Jongbloed J.D., Sikkema-Raddatz B., Sinke R.J. Targeted next-generation sequencing panels for monogenic disorders in clinical diagnostics: the opportunities and challenges. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(1):61–70.
34. Bartoli M., Desvignes J.P., Nicolas L., Martin K. Exome sequencing as a second-tier diagnostic approach for clinically suspected dysferlinopathy patients. *Muscle Nerve* 2014;50(6):1007–10.
35. Seong M.W., Cho A., Park H.W. et al. Clinical applications of next-generation sequencing-based gene panel in patients with muscular dystrophy: Korean experience. *Clin Genet* 2015.
36. Dai Y., Wei X., Zhao Y. et al. A comprehensive genetic diagnosis of Chinese muscular dystrophy and congenital myopathy patients by targeted next-generation sequencing. *Neuromuscul Disord* 2015;25(8): 617–24.
37. Краткий справочник невролога. Приложение к клиническим рекомендациям по неврологии Европейской федерации неврологических сообществ. М: ИД «АБВ-пресс», 2015. С. 448. [Brief

- Neurologist's Reference Book. Exhibit to clinical recommendations in neurology of the EFNS. Moscow: ABV-press, 2015. P. 448. (In Russ.).
38. Bali D.S., Goldstein J.L., Banugaria S. et al. Predicting cross-reactive immunological material (CRIM) status in Pompe disease using GAA mutations: lessons learned from 10 years of clinical laboratory testing experience. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012;160;(1):40–9.
39. Kishnani P.S., Goldenberg P.C., DeArme S.L. et al. Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. *Mol Genet Metab* 2010;99(1):26–33.
40. Banugaria S.G., Prater S.N., Patel T.T. et al. Algorithm for the early diagnosis and treatment of patients with cross reactive immunologic material-negative classic infantile pompe disease: a step towards improving the efficacy of ERT. *PLoS One* 2013;8(6):e67052.
41. Bali D.S., Goldstein J.L., Rehder C. et al. Clinical Laboratory Experience of Blood CRIM Testing in Infantile Pompe Disease. *Mol Genet Metab Rep* 2015;5:76–9.
42. Инструкция по медицинскому применению препарата «Майозайм». [Instruction of the medical application of Mayozaime substance. (In Russ.)].
43. Young S.P., Zhang H., Corzo D. et al. Long-term monitoring of patients with infantile-onset Pompe disease on enzyme replacement therapy using a urinary glucose tetrasaccharide biomarker. *Genet Med* 2009;11(7):536–41.
44. Sluiter W., van den Bosch J.C., Goudriaan D.A. et al. Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for a characteristic glycogen-derived tetrasaccharide in Pompe disease and other glycogen storage diseases. *Clin Chem* 2012;58(7):1139–47.
45. Chien Y.H., Goldstein J.L., Hwu W.L. et al. Baseline Urinary Glucose Tetrasaccharide Concentrations in Patients with Infantile- and Late-Onset Pompe Disease Identified by Newborn Screening. *JIMD Rep* 2015;19:67–73.
46. Bembi B., Cerini E., Danesino C. et al. Management and treatment of glycogenosis type II. *Neurology* 2008;71:12–36.
47. Мазанкова Л.Н., Котлукова Н.П., Сорока С.Г. и др. Трудности диагностики болезни Помпе у детей раннего возраста. *Педиатрия* 2005;(6):89–92. [Mazankova L.M., Kotlukova N.P., Soroka S.G. et al. Difficulties in the diagnostics of Pompe disease at infants. *Pediatrriya = Pediatrics* 2005;(6):89–92. (In Russ.)].