

## Распространенность болезни Помпе у пациентов с идиопатической гиперкреатинкиназемией и слабостью поясно-конечностных мышц (анализ 3076 случаев)\*

Zoltan Lukacs<sup>1</sup>, Paulina Nieves Cobos<sup>1</sup>, Stephan Wenninger<sup>2</sup>, Tracey A. Willis<sup>3</sup>, Michela Guglieri<sup>4</sup>, Marc Roberts<sup>5</sup>, Rosaline Quinlivan<sup>6</sup>, David Hilton-Jones<sup>7</sup>, Teresinha Evangelista<sup>4</sup>, Stephan Zierz<sup>8</sup>, Beate Schlotter-Weigel<sup>2</sup>, Maggie C. Walter<sup>2</sup>, Peter Reilich<sup>2</sup>, Thomas Klopstock<sup>2</sup>, Marcus Deschauer<sup>8</sup>, Volker Straub<sup>4</sup>, Wolfgang Müller-Felber<sup>9</sup>, Benedikt Schoser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Newborn Screening and Metabolic Diagnostics Unit, Hamburg University Medical Center; Hamburg, Germany;

<sup>2</sup>Department of Neurology, Friedrich-Baur-Institut, Medizinische Klinik, University of Munich; Munich, Germany;

<sup>3</sup>The Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital NHS Foundation Trust; Oswestry, United Kingdom;

<sup>4</sup>Institute of Genetic Medicine; Newcastle, United Kingdom;

<sup>5</sup>Salford Royal NHS Foundation Trust; Salford, United Kingdom;

<sup>6</sup>UCL Institute of Neurology and National Hospital, Queen Square; London, United Kingdom;

<sup>7</sup>Department of Neurology, Oxford University Hospital; Oxford, United Kingdom;

<sup>8</sup>Department of Neurology, Halle University; Halle, Germany;

<sup>9</sup>Department of Neuropediatrics, Dr. Von Haunersche Kinderklinik Ludwig Maximilian University of Munich; Munich, Germany

**Контакты:** Benedikt Schoser [bschoser@med.uni-muenchen.de](mailto:bschoser@med.uni-muenchen.de)

Проведен проспективный скрининг дефицита фермента кислой α-глюкозидазы (GAA) европейской когорты пациентов с гиперкреатинкиназемией (гиперКК) и/или слабостью поясно-конечностных мышц (СПКМ) неустановленной этиологии с помощью метода сухого пятна крови (dry blood spot, DBS).

**Материалы и методы.** Образцы DBS были собраны у 3076 взрослых пациентов, проходивших обследование в 7 немецких и британских нервно-мышечных центрах. Все образцы были исследованы на дефицит GAA методом флуорометрии. При выявлении пониженной ферментативной активности определяли наличие мутации гена GAA.

**Результаты.** Из 3076 образцов DBS в 232 (7,6 %) случаях обнаружена низкая ферментативная активность GAA. У 55 (24 %) из 232 пациентов наблюдали изолированную гиперКК, а у 176 (76 %) — гиперКК и СПКМ. При комбинации 2 признаков у 94 % больных активность GAA была снижена. Мутационный анализ выявил мутации гена GAA у 74 (2,4 %) пациентов, при этом 70 больных были гетерозиготными по распространенной мутации сайта сплайсинга гена GAA с. -32-13T>G. У пациентов с подтвержденной болезнью Помпе основной симптомокомплекс состоял из СПКМ (85,3 %) в сочетании с дыхательной недостаточностью (61 %). У 12,0 % больных наблюдали изолированную гиперКК, а у 2,7 % — гиперКК и дыхательную недостаточность.

**Заключение.** В большой когорте пациентов с гиперКК и/или СПКМ распространенность болезни Помпе с поздним началом составляет 2,4 %, что требует проведения целевого скрининга активности GAA у пациентов с гиперКК и/или СПКМ неустановленной этиологии.

### Введение

Болезнь Помпе (генерализованный гликогеноз, гликогеноз II типа, дефицит кислой мальтазы) — орфанное аутосомно-рецессивное мультисистемное метаболическое заболевание, вызываемое дефицитом активности лизосомального фермента α-1,4-глюкозидазы (GAA) [1]. Болезнь Помпе с поздним началом (БППН) характеризуется полиморфизмом фенотипических проявлений и временем манифестации симптомов. Частой причиной обращения к врачу у большинства больных является слабость аксиальных и проксимальных скелетных мышц. Как правило, причина смерти пациентов с БППН связана с разви-

тием дыхательной недостаточности в результате слабости дыхательной мускулатуры [2]. Разработка и внедрение в практику ферментной заместительной терапии диктуют необходимость повышения осведомленности о заболевании специалистов различных медицинских специальностей. Своевременную диагностику БППН затрудняют неспецифичность жалоб, а также минимальная выраженность и постепенность прогрессирования симптомов со стороны периферической нервно-мышечной системы в дебюте болезни, которым уделяют недостаточное внимание [3]. Задержка постановки правильного диагноза составляет в среднем 7–10 лет [4].

\* Neurology 2016;87(3):295–8. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002758. PMID: 27170567.

### Материалы и методы

В проспективное исследование были отобраны пациенты, проходившие обследование в период 2009–2014 гг. в 7 стационарных и амбулаторных нервно-мышечных центрах Германии (Мюнхен, Галле) и Великобритании (Лондон, Ньюкасл, Освестри, Оксфорд, Солфорд).

Критерием включения являлось наличие недифференцированной слабости поясно-конечностных мышц (СПКМ) и/или устойчивой гиперкреатинкиназемии (гиперКК) сыворотки невыясненной этиологии. Под СПКМ понимали слабость проксимальных мышц плечевого пояса и рук, аксиальных мышц, мышц тазового пояса и бедер [1–3]. ГиперКК определяли как повышение уровня креатинкиназы (КК) в 2 раза относительно верхней границы нормы (для женщин < 180 МЕ/л, для мужчин < 200 МЕ/л).

**Взятие проб и флуорометрия.** Образец крови брали из периферической вены в пробирку с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА), после чего кровь сразу наносили пятнами на фильтровальную бумагу для сбора образцов Whatman 903. Все образцы были анонимизированы и в последующем проанализированы в лаборатории метаболизма Института клинической биохимии медицинского центра Гамбургского университета (Германия) в целях определения активности GAA при флуорометрическом исследовании [5].

**Статистика.** Результаты обрабатывали с использованием статистической программы SPSS для Windows версии 23.0.

**Генетическое секвенирование.** Если активность GAA в 2 отдельно взятых образцах сухого пятна крови (dry blood spot, DBS) была ниже 0,9 нмоль/пункция × 21 ч, то проводили секвенирование по Сенгеру кодирующей и экзонфланкирующей области гена GAA.

**Утверждение стандартных протоколов, регистрация и согласие пациентов.** Перед взятием образцов крови все пациенты дали устное и письменное информированное согласие на проведение анализа. Исследование было выполнено в соответствии с положениями Хельсинкской декларации и одобрено комитетом по этике Мюнхенского университета Людвиг–Максимилиана (№ 201-09, Германия).

### Результаты

В исследование были включены 3076 пациентов в возрасте 18–89 лет (средний возраст 48 лет); из них 58,2 % – женщины. Демографические и клинические характеристики исследованной когорты представлены в табл. 1. Показатели активности GAA были в пределах нормы у 2844 (92,2 %) пациентов. Средний уровень КК у всех пациентов составил  $563 \pm 371$  МЕ/л (норма до 15000 МЕ/л). Активность GAA была ниже порогового значения 0,9 нмоль/пункция × 21 ч у 232 пациентов (средний возраст 40,7 года).

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики исследуемой когорты

Показатель	Значение
<i>Всего</i>	
Число обследованных пациентов	3076
Возраст, медиана (диапазон), лет	48 (18–89)
Пол, <i>n</i> (%):	
женщины	1784 (58)
мужчины	1292 (42)
Клинические проявления, <i>n</i> (%):	
изолированная гиперКК	738 (24)
гиперКК + генерализованная СПКМ	2338 (76)
<i>Пациенты с БППН (положительный тест DBS и 2 мутации гена GAA)</i>	
Число пациентов, <i>n</i> (%)	74 (2,4)
Возраст, медиана (диапазон), лет	48 (18–81)
Пол, <i>n</i> (%):	
женщины	42 (56)
мужчины	32 (44)
Клинические проявления, <i>n</i> (%):	
изолированная гиперКК	9 (12)
гиперКК + генерализованная СПКМ + дыхательная недостаточность	45 (61)
гиперКК + слабость мышц плечевого пояса	7 (9,5)
гиперКК + слабость мышц тазового пояса	11 (14,8)
гиперКК + дыхательная недостаточность	2 (2,7)

**Примечание.** DBS – сухое пятно крови; БППН – болезнь Помпе с поздним началом; GAA – кислая α-глюкозидаза; КК – гиперкреатинкиназемия; СПКМ – слабость поясно-конечностных мышц.

Пациенты, у которых диагноз БППН в дальнейшем не подтвердился, имели среднюю активность GAA (в DBS при анализе со специфическим ингибитором акарбозой), равную 1,73 нмоль/пункция × 21 ч (медиана 1,22 нмоль/пункция × 21 ч). Для сравнения: у 74 пациентов (42 женщины и 32 мужчины) с подтвержденной БППН активность GAA с ингибитором была 0,18 нмоль/пункция × 21 ч (медиана 0,12 нмоль/пункция × 21 ч). При секвенировании гена GAA выявлены 2 известные гетерозиготные патогенные мутации, в том числе распространенная мутация сайта сплайсинга гена GAA с.-32-13T>G в 1 аллели у 70 пациентов. По пограничному значению ферментативной активности GAA первоначально было идентифицировано 158 больных, возможных носителей болезни Помпе, но 2-й DBS-тест выявил нормальную ферментативную активность GAA у 123 пациентов. В конечном итоге у 52 из 123 пациентов были установлены следующие альтернативные диагнозы: рецессивная поясно-конечностная мышечная дистрофия (*n* = 32), мышечная дистрофия Беккера (*n* = 4), миотоническая дистрофия II типа (*n* = 8), миозит (*n* = 6), поясно-конечностная форма миастенического синдрома (*n* = 1), спинальная амиотрофия III типа (*n* = 1). У 95 больных с пограничной ферментативной активностью GAA диагноз остался неустановленным. У 24 из 95 пациентов не удалось провести DBS-тест повторно. Установлено, что

**Таблица 2.** Основные результаты исследований с использованием DBS в качестве метода скрининга при БППН

Год публикации	Страна [ссылка]	Число обследованных взрослых пациентов	DBS-метод исследования	Число положительных проб DBS	Число пациентов с подтвержденной БППН по результатам 2-го теста	Распространенность БППН, %
Данное исследование	Германия, Великобритания	3076	Флуорометрия	232	74 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	2,4
2015	Испания [12]	241	Флуорометрия	3	1 (анализ мутации гена <i>GAA</i> ) 1 (анализ активности фермента в лейкоцитах)	0,8
2015	Испания [6]	348	Флуорометрия	20	16 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	4,6
2015	Италия [7]	1051	Флуорометрия	30	17 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	1,6
2014	Дания [8]	103	Флуорометрия	3	3 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	2,9
2014	Финляндия [9]	108	Флуорометрия	0	0	0
2013	Италия [10]	137	Флуорометрия	8	3 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	2,2
2009	США [11]	671	Флуорометрия	111	28 (исследование фибробластов кожи) 7 (анализ мутации гена <i>GAA</i> )	4,1
<i>Всего</i>		<i>5735</i>		<i>407</i>	<i>142</i>	<i>2,5</i>

**Примечание.** DBS – сухое пятно крови; *GAA* – кислая  $\alpha$ -глюкозидаза; БППН – болезнь Помпе с поздним началом.

11 больных являются гетерозиготными по распространенной мутации сайта сплайсинга гена *GAA* с.-32-13T>G, без обнаружения 2-й мутации гена *GAA*.

### Обсуждение

На сегодняшний день данное исследование является самым крупным по числу пациентов, у которых проведен проспективный скрининг БППН в когорте, страдающих патологией мышц неуточненной этиологии. Эффективность скрининга DBS была показана у новорожденных, а также в других целенаправленных исследованиях с привлечением небольших групп пациентов с болезнью Помпе (табл. 2) [6–12]. У всех 74 пациентов, у которых был впервые диагностирован гликогеноз II типа, выявлены ключевые клинические признаки БППН (см. табл. 1). Главным результатом нашего исследования является вывод о том, что болезнь Помпе встречается у 2,4 % взрослых пациентов с СПКМ и/или гиперКК неуточненной этиологии. Полученный результат согласуется с данными менее масштабных исследований в которых общая распространенность гликогеноза II типа составляла 2,5 % [6–13]. Несмотря на использование одинаковых флуорометрических методов, во всех 8 скрининговых исследованиях DBS имелись незначительные расхождения в распространенности рассматриваемого орфанного заболевания, что может быть связано с характерной для конкретной страны частотой его возникновения. Известно, что в афроамериканской, голландской и тайваньской популяциях отмечается более высокая распространенность болезни Помпе по сравнению с другими популяциями [1, 4]. При анализе 2-го образца DBS не всегда подтверждается снижение активности *GAA*. Это связано с такими методи-

ческими ошибками, как взятие крови после переливания, неправильные отбор образцов и нанесение пятен на фильтровальную бумагу, а также неприемлимые условия транспортировки (например, нарушение температурного режима). Даже в настоящем исследовании с использованием DBS, полученных из экспертных центров нервно-мышечной патологии, нельзя полностью исключить ошибки при взятии пробы или нарушения условий транспортировки.

Однако при анализе всех полученных DBS проводили внутренний контроль качества посредством измерения активности нейтральной мальтазы. В первых образцах у всех пациентов активность нейтральной мальтазы находилась в пределах допустимых значений. С учетом возможности получения ложноположительного результата мы рекомендуем подтверждать дефицит *GAA* в DBS с помощью исследования других тканей, например фибробластов, мышц, или с использованием «золотого стандарта» – генетического секвенирования *GAA* по Сенгеру. В биоптате мышечной ткани при БППН обычно выявляют вакуолизацию мышечных волокон, скопления гликогена и включения, положительные к кислой фосфатазе. Последние могут наблюдаться без явного скопления гликогена. Однако все специалисты в области нервно-мышечных болезней признают, что скопления гликогена и включения с положительной реакцией на кислую фосфатазу иногда отсутствуют. Это обстоятельство не является основанием для отказа от анализа активности *GAA* по DBS. Во всех случаях, когда есть клинические основания для исключения болезни Помпе, следует выполнять анализ активности *GAA* по DBS.

С учетом относительной редкости БППН, малой специфичности таких клинических признаков, как

слабость проксимальных мышц и повышение уровня КК, а также частого отсутствия результатов биопсии мышц, подтверждающих диагноз, даже специалисты в области нервно-мышечных болезней могут долго не рассматривать диагноз гликогеноза II типа.

Полученные результаты позволяют рекомендовать проведение DBS-теста уже на начальной стадии диагностического обследования пациентов с СПКМ или устойчивой гиперКК неуточненной этиологии для исключения БППН. Главными клиническими признаками, которые должны побудить врача провести скрининг болезни Помпе с использованием DBS, являются слабость аксиальных, тазовых и дыхательных мышц и устойчивое повышение уровня КК.

### Заключение

На сегодняшний день нет сомнений в том, что лечение БППН с использованием ферментной заместительной терапии следует начинать как можно раньше, до того, как появятся необратимые изменения скелетных мышц, что делает раннюю диагностику крайне важной [1, 7, 11, 13, 14].

На территории России с 4:00 до 19:00 по московскому времени работает «горячая линия» лабораторной диагностики болезни Помпе: 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, 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. Доставка материала и выполнение лабораторного исследования бесплатна для направившего ЛПУ и пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- van der Ploeg A.T., Reuser A.J. Pompe's disease. *Lancet* 2008;372(9646):1342–53. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61555-X. PMID: 18929906.
- Güngör D., de Vries J.M., Hop W.C. et al. Survival and associated factors in 268 adults with Pompe disease prior to treatment with enzyme replacement therapy. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:34. DOI: 10.1186/1750-1172-6-34. PMID: 21631931.
- Schüller A., Wénninger S., Strigl-Pill N., Schoser B. Toward deconstructing the phenotype of late-onset Pompe disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2012;160C(1):80–8. DOI: 10.1002/ajmg.c.31322. PMID: 22253010.
- Kishnani P.S., Amartino H.M., Lindberg C. et al. Timing of diagnosis of patients with Pompe disease: data from the Pompe registry. *Am J Med Genet A* 2013;161A(10):2431–43. DOI: 10.1002/ajmg.a.36110. PMID: 23997011.
- Lukacs Z., Nieves C.P., Mengel E. et al. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes: possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis* 2010;33(1):43–50. DOI: 10.1007/s10545-009-9003-z. PMID: 20033296.
- 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. DOI: 10.1016/j.nmd.2015.04.008. PMID: 25998610.
- Musumeci O., la Marca G., Spada M. et al. LOPED Study: looking for an early diagnosis in a late-onset Pompe disease high-risk population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016;87(1):5–11. DOI: 10.1136/jnnp-2014-310164. PMID: 25783438.
- Palmio J., Auranen M., Kiuru-Enari S. et al. Screening for late-onset Pompe disease in Finland. *Neuromuscul Disord* 2014;24(11):982–5. DOI: 10.1016/j.nmd.2014.06.438. PMID: 25047669.
- Spada M., Porta F., Vercelli L. et al. Screening for lateronset Pompe's disease in patients with paucisymptomatic hyperCKemia. *Mol Genet Metab* 2013;109(2):171–3. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.03.002. PMID: 23566438.
- Preisler N., Lukacs Z., Vinge L. et al. Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Mol Genet Metab* 2013;110(3):287–9. DOI: 10.1016/j.ymgme.2013.08.005. PMID: 24011652.
- Goldstein J.L., Young S.P., Changela M. et al. Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory. *Muscle Nerve* 2009;40(1):32–6. DOI: 10.1002/mus.21376. PMID: 19533645.
- Pérez-López J., Selva-O'Callaghan A., Grau-Junyent J.M. et al. Delayed diagnosis of late-onset Pompe disease in patients with myopathies of unknown origin and/or hyperCKemia. *Mol Genet Metab* 2015;114(4):580–3. DOI: 10.1016/j.ymgme.2015.02.004. PMID: 25752415.
- Никитин С.С. Бессимптомная гиперкреатинкиназемия в клинике нервно-мышечных болезней. *Неврологический журнал* 2015;20(5):26–33. DOI: 10.18821/1560-9545-2015-20-5-26-33. [Nikitin S.S. Asymptomatic elevation of creatine kinase in neuromuscular diseases. *Neurologicheskii zhurnal = The Neurological Journal* 2015;20(5):26–33. DOI: 10.18821/1560-9545-2015-20-5-26-33. (In Russ.)].
- Schoser B., Toscano A. Enzyme replacement therapy in late-onset Pompe disease: a systematic literature review. *J Neurol* 2013;260(4):951–9. DOI: 10.1007/s00415-012-6636-x. PMID: 22926164.