

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Савостьянов К.В., Пушков А.А., Басаргина Е.Н., Кузенкова Л.М., Мазанова Н.Н.,
Гандаева Л.А., Жарова О.П., Рябова Е.Е., Жанин И.С., Фисенко А.П.

Селективный скрининг и молекулярная характеристика российских пациентов с болезнью Помпе

ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, 119991, Москва, Россия

Введение. Болезнь Помпе (БП), или гликогеноз II типа — редкая мультисистемная наследственная болезнь накопления, вызываемая дефицитом фермента кислой мальтазы (кислой альфа-1,4-глюкозидазы), сниженная активность которой приводит к накоплению гликогена в различных органах и тканях организма.

Цель исследования — разработка высокопроизводительного метода ранней биохимической диагностики БП и оптимизация её молекулярно-генетической диагностики.

Материал и методы. Характеристика относительных частот и спектра выявленных мутаций были изучены при использовании выборки из 7670 пациентов с подозрением на БП, поступивших в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в рамках селективного скрининга, а также 8 пациентов с БП, лабораторный диагноз которым был поставлен вне рамок данного скрининга.

Результаты. В результате селективного скрининга БП у российских пациентов из групп высокого риска выявляемость составила 0,47%. Приведены клинические и возрастные характеристики детей и взрослых с БП, а также вычислены относительные частоты и охарактеризован спектр 47 патогенных вариантов гена *GAA*, ответственных за возникновение и развитие БП, у 44 пациентов. Выявлены и изучены 17 новых мутаций гена *GAA*, не описанные ранее, что пополняет базу данных HGMD на 2,7%.

Заключение. Предложена оптимизация алгоритма молекулярной диагностики БП у российских пациентов.

Ключевые слова: болезнь Помпе; селективный скрининг; tandemная масс-спектрометрия; секвенирование; мутации; ген *GAA*

Для цитирования: Савостьянов К.В., Пушков А.А., Басаргина Е.Н., Кузенкова Л.М., Мазанова Н.Н., Гандаева Л.А., Жарова О.П., Рябова Е.Е., Жанин И.С., Фисенко А.П. Селективный скрининг и молекулярная характеристика российских пациентов с болезнью Помпе. *Неврологический журнал имени Л.О. Бадаляна*. 2021; 2(4): 203–215.
<https://doi.org/10.46563/2686-8997-2021-2-4-203-215>

Для корреспонденции: Рябова Екатерина Евгеньевна, аспирант ФГАУ «НМИЦ здоровья детей», e-mail: ryabchikko@gmail.com

Участие авторов:

Савостьянов К.В. руководство лабораторной частью работы, концепция и дизайн исследования, написание текста рукописи, редактирование, ответственность за целостность всех частей рукописи.
Пушков А.А. методическое и статистическое сопровождение исследования, выполнение молекулярно-генетических исследований.
Басаргина Е.Н. руководство клинической частью работы, утверждение клинических критериев отбора пациентов.
Кузенкова Л.М. руководство клинической частью работы, утверждение клинических критериев отбора пациентов.
Мазанова Н.Н. разработка и валидация ферментативной диагностики болезни Помпе.
Гандаева Л.А. разработка критериев селективного скрининга, сбор биологического материала.
Жарова О.П. разработка критериев селективного скрининга, сбор биологического материала.
Рябова Е.Е. статистическая обработка результатов, редактирование текста рукописи.
Жанин И.С. выполнение молекулярно-генетических исследований, статистическая обработка результатов.
Фисенко А.П. утверждение окончательного варианта рукописи, утверждение концепции и дизайна исследования.

Финансирование. Тема-комплекс № 01201050982 «Диагностика и терапия редких болезней у детей» в рамках государственного задания по платформе «Педиатрия».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.11.2021

Принята к печати 30.11.2021

Опубликована 25.12.2021

Kirill V. Savostyanov, Alexander A. Pushkov, Elena N. Basargina, Lyudmila M. Kuzenkova,
Natalia N. Mazanova, Leila A. Gandaeva, Olga P. Zharova, Ekaterina E. Ryabova, Ilya S. Zhanin,
Andrey P. Fisenko

Selective screening and molecular characteristics of Russian patients with Pompe disease

National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, 119991, Russian Federation

Introduction. Pompe disease (PD) or type II glycogenosis is a rare multisystem hereditary accumulation disease caused by a deficiency of the enzyme acid maltase (acid alpha-1,4-glucosidase), which leads to reduced activity to the accumulation of glycogen in various organs and tissues of the body.

The **aim** of the study is to develop a high-performance method of early biochemical diagnosis of PD and optimization of its molecular genetic diagnosis.

Materials and methods. The characteristics of the relative frequencies and spectrum of the detected mutations were studied using a sample of 7670 patients with suspected Pompe disease admitted to the National Medical Research Center of Children's Health of the Ministry of Health

of Russia as part of the selective screening, as well as eight patients with PD, whose laboratory diagnosis was made outside the framework of this selective screening.

Results. As a result of selective screening of PD in Russian patients from high-risk groups, the detectability was 0.47%. PD's clinical and age characteristics in both children and adults are described. The relative frequencies are calculated, and the spectrum of 47 pathogenic variants of the GAA gene responsible for the occurrence and development of Pompe disease in 44 patients is characterized. Seventeen new mutations of the GAA gene, unknown previously, have been identified and described, adding 2.7% to the HGMD database.

Conclusion. Optimization of the algorithm of molecular diagnosis of Pompe disease in Russian patients is proposed.

Keywords: Pompe disease; selective screening; tandem mass spectrometry; sequencing; mutations; GAA gene

For citation: Savostyanov K.V., Pushkov A.A., Basargina E.N., Kuzenkova L.M., Mazanova N.N., Gandaeva L.A., Zharova O.P., Ryabova E.E., Zhanin I.S., Fisenko A.P. Selective screening and molecular characteristics of Russian patients with Pompe disease. *Nevrologicheskiy Zhurnal imeni L.O. Badalyana* (L.O. Badalyan Neurological Journal). 2021; 2(4): 203–215 (In Russ.). <https://doi.org/10.46563/2686-8997-2021-2-4-203-215>

For correspondence: Ekaterina E. Ryabova, MD, postgraduate student, National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: ryabchikko@gmail.com

Information about authors:

Savostyanov K.V., <https://orcid.org/0000-0003-4885-4171>
Pushkov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6648-2063>
Basargina E.N., <https://orcid.org/0000-0002-0144-2885>
Kuzenkova L.M., <https://orcid.org/0000-0002-9562-3774>
Mazanova N.N., <https://orcid.org/0000-0002-3473-2897>
Gandaeva L.A., <https://orcid.org/0000-0003-0890-7849>
Zharova O.P., <https://orcid.org/0000-0003-4221-8406>
Ryabova E.E., <https://orcid.org/0000-0001-5177-475X>
Zhanin I.S., <https://orcid.org/0000-0003-1423-0379>
Fisenko A.P., <https://orcid.org/0000-0001-8586-7946>

Contribution:

Savostyanov K.V. concept and design of research, collection and processing of material.
Pushkov A.A. concept and design of research, collection and processing of material.
Basargina E.N. concept and design of research, collection and processing of material.
Kuzenkova L.M. concept and design of research, collection and processing of material.
Mazanova N.N. collecting and processing material, writing text.
Gandaeva L.A. collection and processing of the material.
Zharova O.P. collection and processing of the material.
Ryabova E.E. collection and processing of material, editing.
Zhanin I.S. material processing, statistical processing.
Fisenko A.P. editing.

All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Acknowledgements. Topic-complex No. 01201050982 «Diagnosis and therapy of rare diseases in children» within the framework of the state task on the Pediatrics platform.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received: November 12, 2021

Accepted: November 30, 2021

Published: December 25, 2021

Введение

Болезнь Помпе (БП), или гликогеноз II типа — редкая мультисистемная наследственная болезнь накопления, связанная с дефицитом фермента кислой мальтазы (кислой α -глюкозидазы) в лизосомах [1]. Преимущественное накопление гликогена отмечено в скелетных мышцах, но в разной степени может обнаруживаться и в других органах и тканях, включая сердечную мышцу, печень, нервную систему, гладкую мускулатуру и др. [1]. С учётом единого патогенеза гликогеноза II типа выделяют только два варианта БП в зависимости от времени манифестации клинических симптомов:

- младенческая БП (МБП) манифестирует в период новорождённости или в младенческом возрасте. МБП характеризуется тяжёлым прогрессирующим течением и быстрым развитием полиорганной патологии. Смерть при МБП без своевременного лечения чаще всего наступает на 1-м году жизни от лёгочно-сердечной недостаточности;
- БП с поздним началом (БППН) отличается от МБП более мягкими клиническими проявлениями и

течением, отсутствием полиорганной патологии (поражение сердца крайне редко) и более поздними осложнениями со стороны дыхательной системы в результате слабости мышц диафрагмы и межребёрной мускулатуры. Время гибели пациентов при БППН зависит от момента начала и последующего характера течения болезни и может наступить в детстве, юношеском, взрослом или преклонном возрасте [1].

Причиной развития БП служат мутации гена *GAA* (OMIM 606800), кодирующего кислую α -1,4-глюкозидазу, сниженная активность которой приводит к накоплению гликогена в различных органах и тканях организма. Механизм наследования мутаций в ряду поколений носит аутосомно-рецессивный характер. Частота встречаемости БП колеблется от 1 случая на 14 тыс. живых новорождённых [2] до 1 случая на 600 тыс. живых новорождённых [3] в зависимости от географической или этнической групповой принадлежности, составляя примерно 15% всех форм ГБ. МБП чаще встречается среди афроамериканцев [4], в южном Китае и на Тайване [5], тогда как БППН распространена в Дании и Нидерландах [6]. Наиболее

высокая частота встречаемости БП была продемонстрирована в результате неонатального скрининга, проведённого в Австрии. Среди 34 736 новорождённых удалось выявить 4 случая БП, что составило рекордный 1 случай на 8684 образца крови, изъятых у новорождённых в период с января по июль 2010 г. [7].

БП впервые была описана в 1932 г. датским патологоанатомом Йоханнесом Помпе на примере 7-месячной девочки, умершей от идиопатической гипертрофической кардиомиопатии. Помпе обнаружил и описал аномальное «вакуолярное» накопление гликогена во всех исследованных им тканях и органах этой девочки, а также генерализованную мышечную слабость [8]. В том же году в литературе было дано клиническое описание похожих случаев [9, 10]. В 1954 г. болезнь была классифицирована как гликогеновая болезнь накопления, тип II [11]. В 1963 г. бельгийский биохимик А. Херц впервые обнаружил и описал фермент α -глюкозидазу, катализирующий гидролиз гликогена в лизосомах при кислом pH, а также обнаружил отсутствие этого фермента у больных ГБ, тип II [12].

В основе патогенеза БП лежит патологическое изменение референсной последовательности гена *GAA* длиной 18,31 т.п.н., расположенного в хромосомной области 17q25.3 и кодирующего α -глюкозидазу молекулярной массой 105 кДа и состоящую из 952 аминокислотных остатков [13]. Сниженная активность α -глюкозидазы, функция которой состоит в расщеплении 1,4-гликозидных связей молекул гликогена, расположенных в лизосомах, ведёт к накоплению гликогена в клетках всего организма, причём чем ниже активность фермента, тем стремительнее накопление. Патологические механизмы БП изучены не полностью, однако известно, что именно наряду с накоплением гликогена в лизосомах клеток идёт процесс аутофагии, который считается основной причиной разрушения мышц у больных взрослой формой БП [14]. Анализ миобластов, полученных из искусственно созданных клеточных линий мышей с БП, продемонстрировал изменения в клетках мышечных волокон, не ограничивающиеся увеличением размера лизосом [15]. Схожие изменения были зафиксированы у человека с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии, позволившей разделить лизосомы и аутофагосомы при обработке материала различными антителами [16]. Эти исследования показали, что на начальных этапах БП появляются увеличенные лизосомы, заполняемые гликогеном, по мере разрастания которых в процессе прогрессирования болезни стремительно нарастают аутофагосомы, которые и усугубляют мышечную атрофию за счёт аутофагоцитоза с последующей деструкцией мышечных волокон [17]. Причинами такого стремительного аутофагосомального нарастания считаются гипогликемия и окислительный стресс, происходящие во время мышечной дифференцировки [18]. При этом для тяжёлой, инфантильной формы БП основопола-

гающим фактором разрушения мышечных волокон является накопление гликогена с последующим разрывом лизосом и высвобождением гликогена в цитоплазму [19], тогда как для более мягкой, неинфантильной формы БП решающее значение в процессе разрушения мышечных волокон имеет аутофагия, разрушающая клетки [20]. Исследование патофизиологических основ формирования различных фенотипов БП продолжается, однако бесспорным остаётся тот факт, что именно сниженная ферментативная активность запускает патологический процесс разрушения мышечных волокон на молекулярном уровне [21]. Именно остаточная активность фермента во многом определяет возраст манифестации, тяжесть и скорость прогрессирования болезни, а значит, и общепринятую градацию БП на две формы: инфантильную (классическую и неклассическую) и неинфантильную. Российские клинические рекомендации, утверждённые в 2017 г., также подразделяют БП на два варианта в зависимости от возраста манифестации симптомов: МБП и БППН [1].

Многоцентровые исследования признают, что разделение на формы БП в зависимости от возраста дебюта носят весьма условный характер, а зачастую и вовсе нецелесообразны [22], т.к. первые симптомы БППН могут проявиться в раннем детстве, во взрослом и пожилом возрасте [23].

Диагностика БП проводится с помощью функциональных и лабораторных методов при подозрении, возникшем на основании анализа клинической картины пациента. К надёжным методам функциональной диагностики относят электромиографию, игольчатую электромиографию, ангиографию и магнитно-резонансную ангиографию [24]. Золотым стандартом лабораторной диагностики БП уже более 10 лет считается измерение ферментативной активности кислой α -глюкозидазы в сухих пятнах крови с помощью технологии тандемной масс-спектрометрии [25]. При измерении α -глюкозидазы возможно получение ложноотрицательных результатов из-за интерференции с другими ферментами, такими как глюкозидаза II (GANAB), нейтральная α -глюкозидаза C (GANC), мальтаза-глюкоамилаза (MGAM) [26]. Дело в том, что сродство α -глюкозидазы по отношению к своему природному субстрату (гликогену) гораздо выше, чем по отношению к искусственному субстрату (4-метилумбеллиферил- α -D-глюкопиранозид), используемому в диагностике, с которым и происходит конкурентное связывание [27]. Мышечная ткань и культивированные фибробласты не содержат MGAM и позволяют измерять активность α -глюкозидазы как отношение активности нейтральной глюкозидазы к активности кислой глюкозидазы (GANAB+GANC/GAA). Поскольку MGAM экспрессируется в нейтрофилах, а не в лимфоцитах, эту же формулу вычисления активности α -глюкозидазы используют для диагностики БП в очищенных лимфоцитах. С использованием мальтозы или акарбозы

в качестве ингибитора активности MGAM стало возможным проводить измерение активности α -глюкозидазы в сухих пятнах крови. Именно это измерение теперь служит основой для скрининга новорождённых на БП [25, 28].

Подтверждающей диагностикой, позволяющей исключить ложные результаты ферментативной диагностики, является молекулярно-генетическая диагностика, зачастую проводимая с использованием метода классического двунаправленного секвенирования кодирующих и прилегающих интронных областей гена *GAA*. Выявление мутаций позволяет спрогнозировать и тяжесть БП, используя фенотипические корреляции, выявленные ранее.

К настоящему времени в базе HGMD описаны 629 патогенных вариантов гена *GAA*, 400 (64%) из которых составляют миссенс/нонсенс мутации, 113 (18%) — небольшие делеции/инсерции, 94 (15%) — варианты гена, оказывающие влияние на сплайсинг, и 22 (3%) — варианты, включающие протяжённые делеции/инсерции и структурные перестройки [29]. Комбинации мутаций, которые приводят к полному отсутствию активности α -глюкозидазы, наблюдаются чаще у лиц с инфантильной формой болезни, в то время как остальные комбинации позволяют выявлять остаточную активность фермента с более поздними клиническими проявлениями БП [30]. Наиболее частой мутацией гена *GAA* является сплайсинговая мутация *c.-32-13G>A*, на которую приходится более половины всех выявленных у европеоидов случаев взрослой формы БП [31]. Наиболее частой мутацией гена *GAA* среди монголоидных пациентов с МБП является миссенс-мутация *p.Asp645Glu* [32]. Среди африканцев и афроамериканцев с МБП чаще всего встречается нонсенс-мутация *p.Arg854X* гена *GAA* [33]. У датчан с инфантильной формой БП преобладает делеция экзона 18 гена *GAA* либо *c.525del* [6]. Такие находки позволяют предполагать эффект основателя для БП в этих популяционных группах. Подавляющее большинство мутаций не имеет строгих корреляций с фенотипом заболевания, о чём свидетельствуют значительные различия в тяжести болезни у пациентов в рамках одной семьи, особенно для БППН [34], по сравнению с МБП [35]. Одни и те же мутации встречаются у больных разными формами болезни, но с различными частотами. К примеру, *c.525del* в 13,8% случаев встречается при МБП и лишь в 3,8% случаев — при БППН среди итальянцев, тогда как *c.2237G>A*, напротив, в 3,4% случаев встречается среди детей раннего возраста и в 10,3% — у взрослых [36, 37]. Наиболее ярким примером генотипического различия, предопределяющего тяжесть клинической картины, служит сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G*, которая никогда не встречается в гомозиготном состоянии среди пациентов с классической МБП [38]. Однако бывает, что компаунд-гетерозиготное носительство *c.-32-13T>G* с мутациями, вызывающими тяжёлый фенотип БП, приводит к тяжёлым клиническим прояв-

лениям [39]. Сочетание двух нуклеотидных замен гена *GAA*: *c.1726G>A (p.G576S)* и *c.2065G>A (p.E689K)*, известное как псевдодефицитный комплексный аллель, приводит к сниженной активности α -глюкозидазы у здоровых людей и является довольно распространённым явлением в азиатских популяциях [40, 41]. Так, среди здоровых японцев приблизительно у 3,9% новорождённых являются носителями этого комплексного аллеля в гомозиготном состоянии, что значительно осложняет скрининг новорождённых, демонстрируя ложноположительные значения ферментативной активности в этой популяции [42].

Лечение БП требует скоординированных усилий команды специалистов (невролога, кардиолога, педиатра, терапевта, ортопеда, диетолога и др.), имеющих опыт в лечении нервно-мышечных нарушений. Наиболее эффективным средством лечения БП является ранняя ферментозаместительная терапия (ФЗТ) препаратами Myozyme® и Lumizyme®, произведёнными корпорацией «Genzyme» для ФЗТ пациентов с инфантильной формой БП и для ФЗТ пациентов старше 8 лет соответственно. Специалисты сходятся во мнении, что ФЗТ значительно увеличивает выживаемость, уменьшает кардиомегалию, улучшает функции сердца и скелетных мышц. Лучший клинический ответ со стороны скелетных мышц на препарат был отмечен у пациентов с ранним началом ФЗТ, до развития тяжёлого повреждения скелетных мышц [43].

Своевременная диагностика и раннее начало патогенетической терапии способны существенно улучшить состояние большинства больных ГБ, тип II, поэтому **цель** настоящего исследования — разработка высокопроизводительного метода ранней биохимической диагностики БП, а также оптимизации молекулярно-генетической диагностики ввиду значительной протяжённости гена *GAA*.

Материалы и методы

Характеристики относительных частот и спектра выявленных мутаций были изучены при использовании выборки пациентов, поступивших в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» в рамках селективного скрининга с подозрением на БП и показавших истинное снижение активности α -1,4-глюкозидазы, а также 8 пациентов с БП, лабораторный диагноз которым был поставлен вне рамок проведения данного селективного скрининга.

Критериями отбора МБП являлись выраженная диффузная мышечная гипотония, миопатия, кардиомегалия, кардиомиопатия, макроглоссия, нарушения ритма сердца; БППН — диффузная мышечная гипотония, мышечная слабость, наличие приёмов Говерса при вставании, трудности при ходьбе, повышение уровня креатинфосфокиназы в сыворотке крови.

Активность α -1,4-глюкозидазы измеряли на тандемном масс-спектрометре «Bruker Maxis Impact» с положительной ионизацией в электроспрее методом МС-МС. В качестве биологического материала использо-

вали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге. Контрольные образцы хранили согласно рекомендациям V.R. De Jesus и соавт. [44]. Пробоподготовку проводили с использованием субстратов и внутренних стандартов производства компании «CDC», согласно протоколу, рекомендованному компанией-производителем. В качестве элюента использовали смесь ацетонитрила и воды с добавлением муравьиной кислоты. Детекцию ионов проводили с помощью проточно-инжекционного анализа с использованием метода MRM-мониторинга. Масс-анализатор работал в режиме детектирования ионов в диапазоне 100–550 m/z с точностью определения масс не ниже 5 ppm и разрешением не менее 20 000 (FWHM). Время анализа одной пробы составляло 3 мин. Полученные данные обрабатывались с использованием встроенного пакета программ «Bruker Data Analysis 4.1». В случае снижения активности анализируемого фермента проводили измерение активности другого лизосомного фермента в качестве контрольного. В случае снижения активности контрольного фермента анализ проводили на новом образце. Значение отрезной точки для активности α -1,4-глюкозидазы, равное 2,30 мкмоль/л/ч, было выбрано на основе значения отрезной точки в работах зарубежных авторов [45, 46], с учётом полученных нами референсных значений активности α -1,4-глюкозидазы, а также значений активности этого фермента в группе пациентов с БП.

Геномную ДНК выделяли с помощью набора реактивов «DNA Blood Mini Kit» («QIAGEN») на автоматической станции «QIAQUBE» («QIAGEN»), согласно протоколу, рекомендованному производителем [47]. В качестве биологического материала использовали пятна крови, высушенные на фильтровальной бумаге (карта-фильтр № 903), и цельную кровь. Элюцию ДНК осуществляли в 100–200 мкл Low TE буфера («QIAGEN»). Качество и количество ДНК оценивали при помощи спектрофотометра «NanoVue» («GE Healthcare»), а также флуориметра нового поколения «Qubit 3.0» («Invitrogen»). В случае выделения ДНК из клеток буккального эпителия и биоптата ворсин хориона или амниотической жидкости использовали метод фенол-хлороформной экстракции [48].

Все олигонуклеотиды подбирали при помощи компьютерной программы «Beacon Designer 8.10» («PREMIER Biosoft International»). Специфичность пар праймеров проверяли с помощью программы «Primer-BLAST» [49]. Синтез олигонуклеотидов осуществлялся компанией ЗАО «Евроген» (Россия) фосфорамидитным методом на автоматических синтезаторах ДНК («Applied Biosystems»).

Амплификацию проводили на термоциклерах «Bio-Rad T100» («Bio-Rad») и «ProFlex» («Thermo Fisher Scientific») в 10–20 мкл реакционной смеси «Amplitaq Gold 360» («Thermo Fisher Scientific»), содержащей 500 нмоль праймеров и 20–50 нг геномной ДНК. Условия ПЦР: при 95°C 2 мин — 1 цикл;

при 94°C 10 с, при 54–66°C 30 с, при 72°C 5 с — 34–40 циклов; при 72°C 40 с — 1 цикл. Идентификацию продуктов реакции проводили в 1–2% агарозном геле, приготовленном из агарозы («Amresco»).

Секвенирование методом Сэнгера осуществляли при помощи набора реактивов «BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («Thermo Fisher Scientific») в соответствии с протоколами и рекомендациями производителя [50]. Капиллярный электрофорез осуществляли на автоматических секвенаторах ДНК «ABI 3500XL» и «ABI 3500» («Thermo Fisher Scientific»). Полученные последовательности сравнивали с референсными последовательностями RefSeqGene из базы данных Национального центра биотехнологической информации [51].

Для поиска делеций и дупликаций в целевых геномных областях применяли метод мультиплексной лигазозависимой амплификации проб (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification — MLPA). Исследования проводили с использованием набора реагентов MLPA P453 («MRC Holland»), содержащего 27 олигонуклеотидных проб с продуктами амплификации длиной 130–400 п.н., а также 9 контрольных фрагментов. Амплификацию и лигирование проводили на термоциклерах «Bio-Rad T100» («Bio-Rad») и «ProFlex» («Thermo Fisher Scientific») согласно протоколам, рекомендованным производителем [51]. Капиллярный электрофорез осуществляли на автоматическом секвенаторе ДНК «ABI 3500» («Thermo Fisher Scientific»). Анализ полученных данных проводили в компьютерной программе «Coffalyser», рекомендованной производителем наборов [52]. Для валидации всех выявленных протяжённых делеций и дупликаций проводили количественную ПЦР в режиме реального времени с использованием смеси с интеркалирующим красителем «iQ™ SYBR Green Supermix» («Bio-Rad»). Результаты нормировали по уровню экспрессии референсного гена *HBB* в исследуемом образце, используя олигонуклеотиды HBB-F (TGGGCAACCCTAAGGTGAAG) и HBB-R (GTGAGCCAGGCCATCACTAAA-3).

Все найденные минорные варианты исследованных генов в кодирующих и прилегающих интронных областях с частотой встречаемости менее 1% в соответствии с информационной базой gnomAD [53], в том числе новые нуклеотидные варианты, не описанные в мире ранее, были подвергнуты биоинформатическому анализу в программе «Alamut Visual» («Interactive Biosoftware»). Последовательности нуклеотидов сравнивали с референсной базой данных GenBank Accession [54] с использованием программы «Geneious v.R10» («Biomatters»). Патогенность новых нуклеотидных вариантов определяли с помощью «Руководства по интерпретации данных последовательности ДНК человека» [55], основанного на стандартах ACMG [56]. Все значимые изменения референсной последовательности ДНК были подвергнуты семейному анализу. Для номенклатуры мутаций были использованы рекомендации HGVS [57].

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью пакета «Statistica 10.0»

(«StatSoft») [58]. Для количественных данных применяли *p*-критерий Манна–Уитни. Для определения оптимальной отрезной точки, соответствующей максимальным показателям чувствительности и специфичности разработанных методик, использовали метод ROC-анализа согласно протоколу [59]. Обсчёт был реализован с помощью программы «SPSS» [60] и среды программирования R [61]. Расчёт референсных интервалов проводили с учётом рекомендаций P.S. Horn и соавт. [62].

Результаты и обсуждение

Разработанный и валидированный метод определения сниженной активности кислой α -1,4-глюкозидазы в пятнах крови, высушенных на фильтровальной бумаге, позволил выявить 38 пациентов в возрасте от 1 мес до 62 лет с активностью фермента 0,03–2,09 мкМ/л/ч при селективном скрининге 7670 пациентов, у которых была заподозрена БП. При этом у 2 пациентов в результате молекулярно-генетического исследования были выявлены нуклеотидные варианты *c.1726G>A*, *p.G576S* и *c.2065G>A*, *p.E689K* в гене *GAA*, описанные ранее как псевдодефицитные [63], которые явились причиной двух ложноположительных значений активности кислой α -1,4-глюкозидазы.

Согласно полученным данным были рассчитаны чувствительность и специфичность метода определения активности кислой α -1,4-глюкозидазы. При выбранной отрезной точке, равной 2,30 мкМ/л/ч, чувствительность метода составила 100%, специфичность — 99,01%. По результатам ROC-анализа была скорректирована оптимальная отрезная точка для определения актив-

ности α -1,4-глюкозидазы. Новое значение отрезной точки составило 2,15 мкМ/л/ч, что соответствовало чувствительности 100% и позволило увеличить специфичность методики до 99,5% за счёт переноса значения ферментативной активности одного пациента, показавшего ложноположительный результат, в группу истинно отрицательных (рис. 1).

Для подтверждения БП у 36 пациентов со сниженной ферментативной активностью, а также для выявления мутаций у 8 пациентов, диагноз которым был поставлен ранее, был разработан метод, позволяющий выявлять мутации в кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GAA*. В результате удалось обнаружить и охарактеризовать патогенные варианты в общей сложности у всех 44 пациентов с БП: 22 женщин, 22 мужчин в возрасте от 1 мес до 62 лет, медиана 20 лет. У 16 (38,1%) пациентов была установлена МБП, у 26 (61,9%) — БППП, 2 пациентам подтип БП установить не удалось. Медиана возраста манифестации МБП у обследованных пациентов составила 1 мес, тогда как медиана возраста дебюта БППН — 12 лет.

Клинические характеристики пациентов с МБП и БППН представлены на рис. 2. У всех обследованных пациентов МБП клинически проявлялась диффузной мышечной гипотонией, ГКМП, массивной кардиомегалией и гепатомегалией. Задержка моторного развития была обнаружена у 90,9% пациентов, макрогlossия — у 81,8%, дыхательная недостаточность — у 72,7%, дефицит массы тела — у 45,5%, деформация грудной клетки — у 27,3%, гипермобильность суставов — у 18,2%. Все пациенты с БППН имели мышечную слабость, ГКМП была выявлена у 50% пациентов,

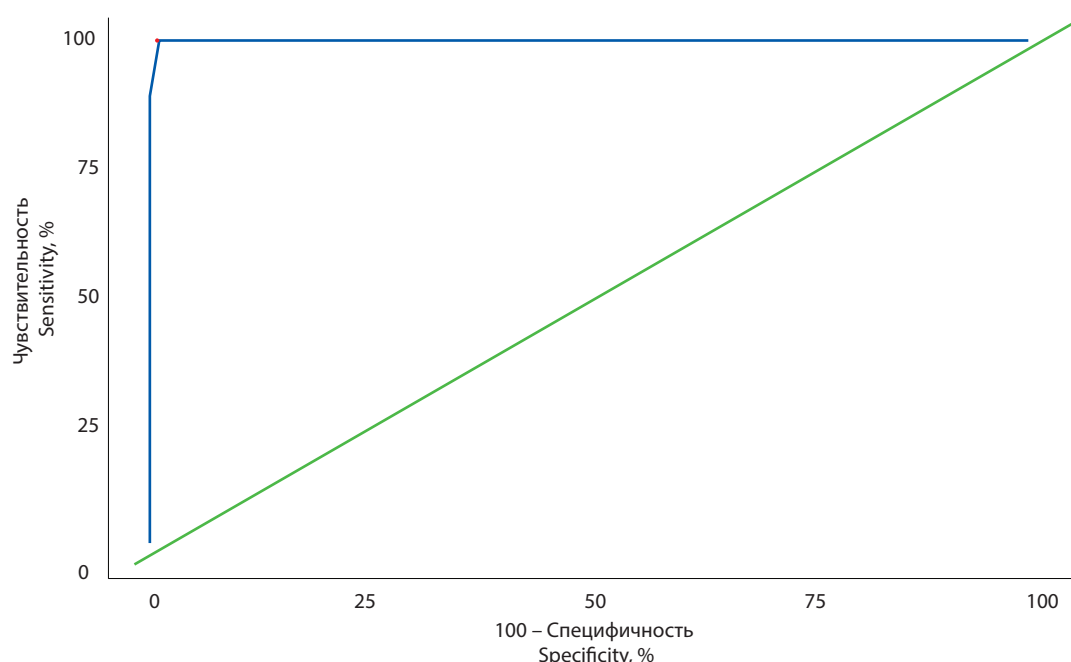


Рис. 1. ROC-кривая метода определения активности α -1,4-глюкозидазы.

Fig. 1. ROC curve of the method for determining the activity of α -1,4-glucosidase.

дефицит массы тела — у 60%, рахитообразные изменения скелета — у 40%, гепатомегалия и гипермобильность суставов — у 20%. Полученные нами результаты в целом сопоставимы с данными, описанными в публикациях зарубежных коллег [64–66].

В результате проведённого исследования удалось

выявить 47 различных патогенных вариантов гена *GAA*, явившихся причиной развития БП у обследованных нами пациентов из 40 неродственных российских семей (рис. 3).

Наибольшей долей обладала сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G*, расположенная в промотерной

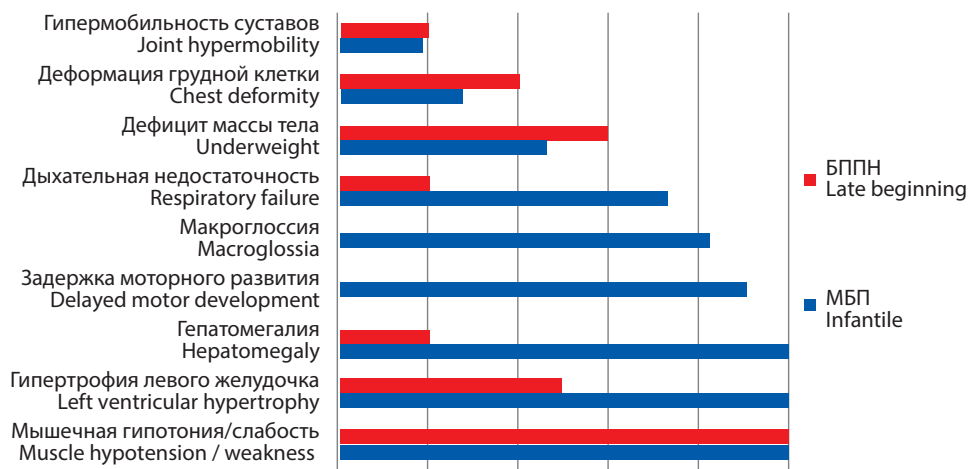


Рис. 2. Клинические характеристики БП у наблюдаемых пациентов.

Fig. 2. Clinical characteristics of Pompe disease in the observed patients.

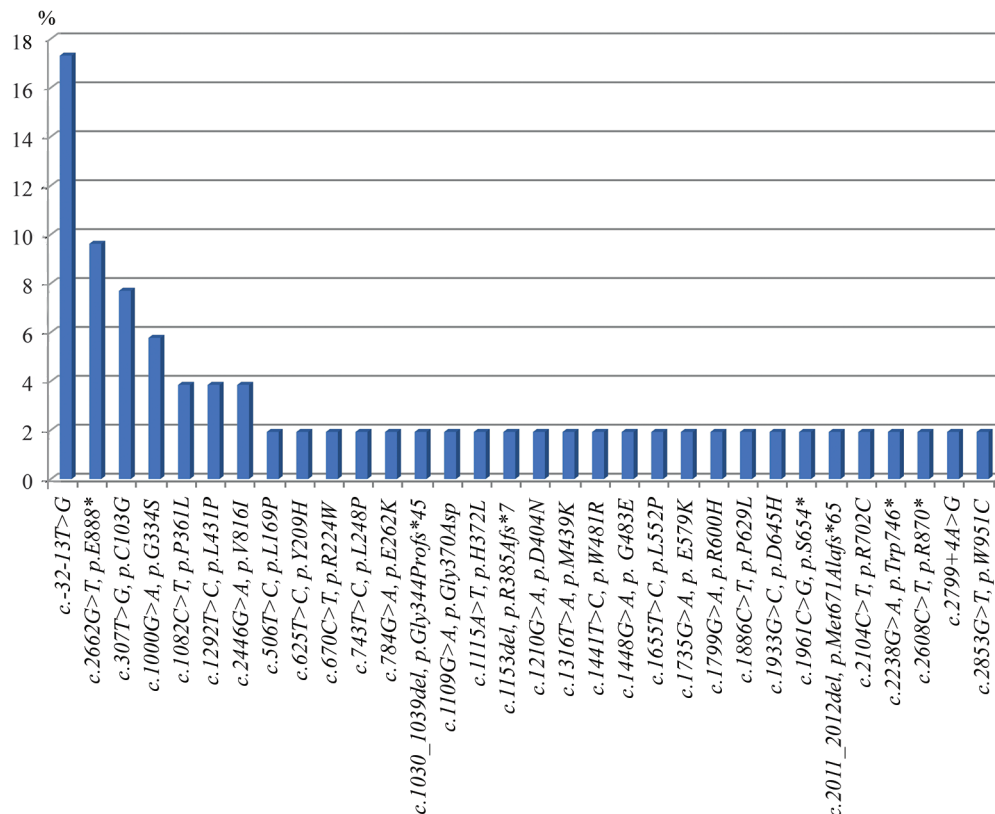


Рис. 3. Относительные частоты и спектр мутаций гена *GAA*, выявленные у обследованных пациентов с БП.

Fig. 3. Relative frequencies and spectrum of *GAA* gene mutations detected in examined patients with Pompe disease.

области гена *GAA* и встретившаяся на 18 (20,5%) аллелях у 18 (40,9%) пациентов, 17 из которых страдают БППН: 7 мужчин и 10 женщин в возрасте 26–62 года на момент проведения диагностики. Мутация была описана ранее как мажорная и в других популяционных группах [67]. Она формирует генотип приблизительно 80% пациентов, страдающих БППН [68, 69], что согласуется с данными нашего исследования. Второй по относительной частоте оказалась нонсенс-мутация *c.2662G>T, p.E888**, обнаруженная на 9 (10,2%) поражённых хромосомах у 9 (20,4%) пациентов в 6 неродственных семьях. Эта мутация также была описана как мажорная мутация в ряде других исследований и считается мутацией, вызывающей МБП с тяжёлым фенотипом [70, 71]. У 3 пациентов, генотип которых был представлен этой мутацией в гетерозиготном состоянии, БП манифестировала в первые месяцы жизни и сопровождалась тяжёлой прогрессирующей мышечной слабостью и поражением сердечно-сосудистой системы. Один из них погиб от сердечной недостаточности, несмотря на проводимую патогенетическую терапию. Клинические проявления БП у 2 других пациентов манифестировали в позднем возрасте, что может быть связано с наличием мутации *c.-32-13T>G* в качестве второго аллеля, сформировавшего генотип. Это предположение подтверждается другими учёными [72]. Клиническая картина БП у 3 мужчин из родственных семей неизвестна, однако известно, что БП была диагностирована у них в возрасте 35, 40 и 52 лет, при этом вторым аллелем являлась мутация *c.1856G>A, p.S619N*, числящаяся в базе данных Pompe Erasmus Database у 3 пациентов с БППН [73]. Мутация *c.307T>G, p.C103G*, вызывающая МБП [74], представлена в нашем исследовании 5 (5,7%) аллелями, обнаруженными у 5 детей. У 3 — с МБП, манифестировавшей в возрасте 2–5 мес. У 2 других пациентов БП была диагностирована в возрасте 34 и 60 лет в компаунд-гетерозиготном состоянии с интронным вариантом *c.-32-13T>G*, что подчёркивает её тяжесть при отсутствии «мягких» вариантов гена *GAA*. Мутация *c.1000G>A, p.G334S*, описанная ранее у пациента с детской неинfantильной формой БП [75], была выявлена на 3 (3,4%) хромо-

сомах у 2 детей с БП. Генотип, формируемый гомозиготной мутацией *c.1000G>A* у 10-летней девочки, также позволяет предположить, что она ассоциирована с БППН, манифестирующей в ювенильном возрасте, тогда как ранняя манифестация БП у мальчика, видимо, связана со второй мутацией *c.1735G>A, p.E579K*, ассоциированной с МБП [76]. Остальные патогенные варианты гена *GAA* были выявлены с долями менее 5%. Мутации *c.1082C>T, p.P361L*; *c.1655T>C, p.L552P*, *c.2104C>T, p.R702C* и *ex18del* встретились дважды в неродственных семьях. Остальные мутации встретились единожды среди неродственных пациентов.

Среди обнаруженных мутаций гена *GAA* значительно преобладали (29/62%) миссенс-мутации, вторыми по частоте (8/17%) были делеции; кроме того, были найдены 5 (11%) различных нонсенс-мутаций, 2 (4%) мутации сайта сплайсинга, 2 вставки и 1 мутация стартового кодона, что сопоставимо с данными международной базы HGMD [29] (рис. 4). Варианты, преждевременно терминирующие кодируемый белок, составили 36,2% всех выявленных вариантов и были найдены у 23 (52,3%) пациентов.

Отдельно следует отметить нуклеотидные варианты *c.1726G>A, p.G576S* и *c.2065G>A, p.E689K*, обнаруженные у 2 пациентов с незначительным снижением ферментативной активности. Обе нуклеотидные замены, усреднённая мировая частота которых составляет 1,7 и 5,5% соответственно, были описаны ранее у пациентов со сниженной (псевдодефицитной) активностью кислой α -1,4-глюкозидазы, не являясь этиологическими причинами развития БП как в гетерозиготном, так и в гомозиготном состоянии [40, 41, 71].

Разработанный метод молекулярно-генетической диагностики БП с помощью секвенирования по Сэнгеру позволил выявить лишь по 1 гетерозиготе в 4 случаях. Это заставило нас воспользоваться методом MLPA для поиска протяжённых делеций и дупликаций, в результате чего были обнаружены делеция экзона 2–11, не описанная ранее, а также делеция экзона 18 гена *GAA*, описанная ранее у пациента с МБП [66]. Эти находки могут свидетельствовать в пользу четырехстадийного алгоритма диагностики БП, доказывая отсутствие единственного универсального метода диагностики БП в настоящее время.

У 17 (38,6%) пациентов были выявлены 17 (36,2%) не описанных в базе HGMD вариантов гена *GAA*, среди которых преобладали 7 новых миссенс-мутаций: *c.1292T>C, p.L431P* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4) в гомозиготном состоянии у девочки с МБП; *c.2853G>T, p.W951C* (PS3, PM2, PM3; PP3, PP4), *c.625T>C, p.Y209H* (PS3, PM1, PM2, PP3, PP4), *c.1109G>A, p.G370D* (PS3, PM2, PM3, PP3, PP4) у мальчиков с МБП, *c.1933G>A, p.D645N* у мальчика с МБП; *c.1448G>A, p.G483E* (PS3, PM1, PM2, PM5, PP3, PP4), *c.1886C>T, p.P629L* и *c.2120C>G, p.P707R* у 1 мужчины и 2 женщин с БППН. Кроме того, удалось описать 5 новых небольших делеций, приводящих к сдвигу рамки чи-

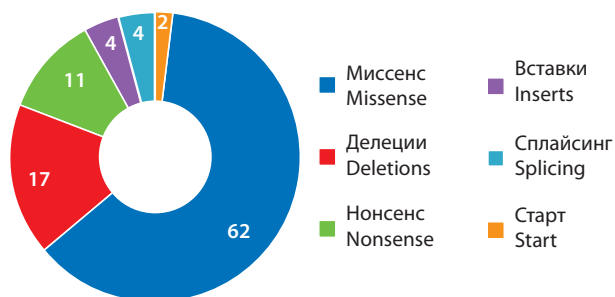


Рис. 4. Распределение различных типов мутаций гена *GAA* у российских пациентов с БП.

Fig. 4. Distribution of different types of *GAA* gene mutations in Russian patients with Pompe disease.

Расчёт корреляции возрастных особенностей БП со сплайсинговой мутацией *c.-32-13T>G* (Me; 25%–75%)

Calculation of the correlation of age-related features of Pompe disease with the splicing mutation *c.-32-13T>G* (Me; 25%–75%)

Возрастные характеристики Age characteristics	Мутация <i>c.-32-13T>G</i> Mutation <i>c.-32-13T>G</i>	Другие мутации Other mutations	<i>p</i> (Манна–Уитни) <i>p</i> (Mann–Whitney U-test)
Возраст манифестации, мес Age of manifestation, months	219 (3–362)	2 (0.03–6)	<0.001
Возраст диагностики, мес Age of diagnosis, months	468 (372–607)	10 (4–130)	<0.001

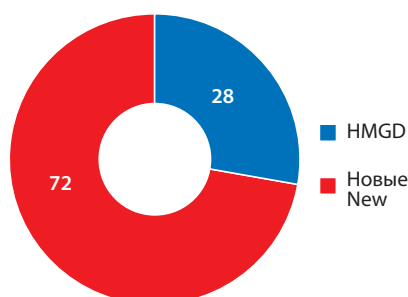


Рис. 5. Соотношение патогенных вариантов гена *GAA*, описанных и не описанных ранее в международной базе данных HGMD, %.

Fig. 5. The ratio of pathogenic variants of the α -glucosidase (*GAA*) gene, described and not previously described in the international Human Gene Mutation Database (HGMD®), %.

тывания. Четыре из них: *c.73_77del, p.A25Pfs*8* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.1030_1039del, p.G344Pfs*45* (PVS1, PS3, PM2, PP4); *c.2011_2012del, p.M671Afs*65* (PVS1, PS3, PM2, PP4) и *c.2740del, p.Q914Sfs*29* (PVS1, PS3, PM2, PP4) были выявлены у 4 пациентов с МБП, а пятая *c.375del, p.W126Gfs*16* (PVS1, PS3, PM2, PP4) — у 2 пациентов с БППН в компаунд-гетерозиготном состоянии с вариантом *c.-32-13T>G*. Две новые вставки *c.1476_1477ins17, p.P493Gfs*33* и *c.2483dup, G830Wfs*54*, вызывающие сдвиг рамки считывания, были обнаружены у 2 пациентов с МБП. Кроме того, 1 новая нонсенс-мутация *c.1961C>G, p.S654** (PVS1, PS3, PM1, PM2, PP4) была обнаружена у женщины с мягкой формой БППН, что, видимо, обусловлено её компаунд-гетерозиготным состоянием со сплайсинговым вариантом *c.-32-13T>G*. Протяжённая делеция экзонов 2–11 была обнаружена нами у 2 сестёр с МБП (рис. 5).

Большинство нонсенс-мутаций и делеций, сдвигающих рамку считывания, в нашем исследовании коррелирует с МБП и тяжёлой клинической картиной БП, в то время как наличие сплайсинговой мутации *c.-32-13T>G* коррелирует с БППН (таблица).

Обращает на себя внимание, что в нашем исследовании сплайсинговая мутация *c.-32-13T>G* встретилась лишь у 1 пациента с классической МБП и мутацией *c.307T>G, p.C103G* в компаунд-гетерозиготном состоянии. В остальных 17 случаях *c.-32-13T>G* обусловила развитие БППН, даже в компаунд-гетерозиготном состоянии с нонсенс-мутациями *c.1961C>G, p.Ser654**, *c.2662G>T, p.E888** и *c.2238G>A, p.Trp746**,

вызывая БППН. Выявленная тенденция позволяет предположить, что в некоторых случаях знание генотипа может служить важным прогностическим фактором для предсказания фенотипа пациентов с БП, определяя подтип болезни и корректируя терапию. Это приобретает особую значимость в рамках неонатального скрининга.

Согласно полученным данным, диагностика мажорных мутаций *c.-32-13T>G*, *c.2662G>T* и *c.307T>G* позволяет выявлять 36,4% патогенных вариантов гена *GAA*, а диагностика варианта *c.-32-13T>G* у пациентов с БППН — 34,6% патогенных вариантов гена *GAA*.

Таким образом, можно рекомендовать следующую оптимизацию молекулярной диагностики БП у российских пациентов:

- 1) измерение активности кислой α -1,4-глюкозидазы методом МС/МС;
- 2) в случае сниженной активности фермента — поиск 3 наиболее частых мутаций *c.-32-13T>G*, *c.2662G>T* и *c.307T>G* гена *GAA*;
- 3) в случае невыявления этих патогенных биаллельных вариантов — поиск мутаций во всех кодирующих и прилегающих интронных областях гена *GAA*;
- 4) в случае невыявления биаллельных патогенных вариантов гена *GAA* — поиск протяжённых делеций и дупликаций методом MLPA.

Заключение

Разработанный метод диагностики БП позволил провести селективный скрининг 7670 пациентов с подозрением на БП, выявить 36 (0,47%) новых случаев этой редкой болезни, описать клинические и возрастные особенности, а также спектр и относительные частоты 47 патогенных вариантов гена *GAA* у 44 российских пациентов с БП, вычислив достоверные корреляции позднего возраста манифестации и диагностики БП у пациентов с интронной мутацией *c.-32-13T>G* и описав 17 нуклеотидных вариантов гена *GAA*, ещё не включённых в базу HGMD.

ЛИТЕРАТУРА

1. Союз педиатров России; Российское общество медицинских генетиков. Клинические рекомендации: Болезнь Помпе. МКБ 10: E74.0. М.; 2017. Available at: https://www.pediatr-russia.ru/information/klin-rek/deystvuyushchie-klinicheskie-rekomendatsii/Болезнь%20Помпе%20СПР_17.04.17.pdf
2. Hirschhorn R., Reuser A.J.J. Glycogen storage disease type II: Acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Desnick R.J., Ioan-

- nou Y.A., Eng C.M., Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 3389–420.
3. Pinto R., Caseiro C., Lemos M., Lopes L., Fontes A., Ribeiro H., et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004; 12(2): 87–92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
4. Martiniuk F., Chen A., Mack A., Arvanitopoulos E., Chen Y., Rom W.N., et al. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 79(1): 69–72. <https://doi.org/10.1002/SI-CI1096-86281998082779:1<69::AID-AJMG16>3.0.CO;2-K>
5. Lin C.Y., Hwang B., Hsiao K.J., Jin Y.R. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of α -glucosidase activity. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1987; 10(1): 11–7. <https://doi.org/10.1007/BF01799482>
6. Ausems M.G., Verbiest J., Hermans M.P., Kroos M.A., Beemer F.A., Wokke J.H., et al. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counseling. *Eur. J. Hum. Genet.* 1999; 7(6): 713–6. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200367>
7. Mechtler T.P., Stary S., Metz T.F., De Jesús V.R., Greber-Platzter S., Pollak A., et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet.* 2012; 379(9813): 335–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61266-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61266-X)
8. Pompe J.C. Over idiopathische hypertrophie van het hart. *Pompe. Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1932; (76): 304–12.
9. Bischoff G. Zum klinischen bild der glykogen-speicherungs-krankheit (glykogenose). *Kinderheilkd. Z.* 1932; (52): 722–6. <https://doi.org/10.1007/BF02248461>
10. Putschar M. Über angeborene Glykogenspeicher-Krankheit des herzens. *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.* 1932; (90): 222.
11. Cori G.T. Enzymes and glycogen structure in glycogenosis. *Osterr. Z. Kinderheilkd. Kinderfuersorge.* 1954; 10(1–2): 38–42.
12. Hers H.G. Alpha-glucosidase deficiency in generalize glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem. J.* 1963; (86): 11–6. <https://doi.org/10.1042/bj0860011>
13. Hoefsloot L.H., Hoogveen-Westerveld M., Reuser A.J., Oostra B.A. Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem. J.* 1990; 272(2): 493–7. <https://doi.org/10.1042/bj2720493>
14. Zhu Y., Li X., Kyazike J., Zhou Q., Thurberg B.L., Raben N., et al. Conjugation of mannose 6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in pompe mice. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(48): 50336–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409676200>
15. Fukuda T., Ahearn M., Roberts A., Mattaliano R.J., Zaal K., Ralston E., et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Mol. Ther.* 2006; (14): 831–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.08.009>
16. Raben N., Shea L., Hill V., Plotz P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods. Enzymol.* 2009; (453): 417–449. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04021-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04021-4)
17. Shea L., Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2009; 47 (Suppl. 1): 42–7. <https://doi.org/10.5414/cpp47042>
18. Fuller D.D., ElMallah M.K., Smith B.K., Corti M., Lawson L.A., Falk D.J., et al. The respiratory neuromuscular system in Pompe disease. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2013; 189(2): 241–9. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.007>
19. Thurberg B.L., Lynch Maloney C., Vaccaro C., Afonso K., Tsai A.C., Bossen E., et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab. Invest.* 2006; 86(12): 1208–20. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484>
20. Nascimbeni A.C., Fanin M., Masiero E., Angelini C., Sandri M. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy.* 2012; 8(11): 1697–700. <https://doi.org/10.4161/auto.21691>
21. Chien Y.H., Lee N.C., Huang P.H., Lee W.T., Thurberg B.L., Hwu W.L. Early pathologic changes and responses to treatment in patients with later-onset Pompe disease. *Pediatr. Neurol.* 2012; 46(3): 168–71. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.12.010>
22. Van der Ploeg A.T., Reuser A.J. Pompe's disease. 2008; 372(9646): 1342–53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X)
23. Bembi B., Cerini E., Danesino C., Donati M.A., Gasperini S., Morandi L., et al. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology.* 2008; 71(23 Suppl. 2): S4–11. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e-31818da91e>
24. Hobson-Webb L.D., Dearnley S., Kishnani P.S. The clinical and electrodiagnostic characteristics of Pompe disease with post-enzyme replacement therapy findings. *Clin. Neurophysiol.* 2011; 122(11): 2312–7. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.04.016>
25. Zhang H., Kallwass H., Young S.P., Carr C., Dai J., Kishnani P.S., et al. Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet. Med.* 2006; 8(5): 302–6. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000217781.66786.9b>
26. Савостьянов К.В., Никитин С.С., Карпачёва К.Е. Лабораторные исследования и болезнь Помпе: От подозрения до мониторинга терапии. *Нервно-мышечные болезни.* 2016; 6(1): 54–62. <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2016-6-1-54-62>
27. Dreyfus J., Poenaru L. White blood cells and the diagnosis of alpha-glucosidase deficiency. *Pediatr. Res.* 1980; (14): 342–4. <https://doi.org/10.1203/00006450-198004000-00017>
28. Wisselaar H.A., Kroos M.A., Hermans M.M., van Beeumen J., Reuser A.J. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(3): 2223–31.
29. Niizawa G., Levin C., Aranda C., Blanco M., Chamoles N.A. Retrospective diagnosis of glycogen storage disease type II by use of a newborn-screening card. *Clin. Chim. Acta.* 2005; 359(1–2): 205–6. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.007>
30. Human Gene Mutation Database (HGMD): Gene GAA. Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GAA>
31. Nascimbeni A.C., Fanin M., Tasca E., Angelini C. Molecular pathology and enzyme processing in various phenotypes of acid maltase deficiency. *Neurology.* 2008; 70(8): 617–26. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000299892.81127.8e>
32. Huie M.L., Chen A.S., Tsujino S., Shanske S., DiMauro S., Engel A.G., et al. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T→G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT→CT) mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3(12): 2231–6. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.12.2231>
33. Shieh J.J., Lin C.Y. Frequent mutation of Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum. Mutat.* 1998; 11(4): 306–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11:4<306::AID-HUMU8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<306::AID-HUMU8>3.0.CO;2-S)
34. Becker J.A., Vlach J., Raben N., Nagaraju K., Adams E.M., Hermans M.M., et al. The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62(4): 991–4. <https://doi.org/10.1086/301788>
35. Wens S.C., van Gelder C.M., Kruijshaar M.E., de Vries J.M., van der Beek N.A., Reuser A.J., et al. Phenotypical variation within 22 families with Pompe disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013; 8: 182. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-182>
36. Smith W., Sullivan-Saarela J.A., Li J.S., Cox G.F., Corzo D., Chen Y.T., et al. Sibling phenotype concordance in classical infantile Pompe disease. *Am. J. Med. Genet.* 2007; 143(21): 2493–501. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31936>
37. Pittis M.G., Donnarumma M., Montalvo A.L., Dominissini S., Kroos M., Rosano C., et al. Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease. *Hum. Mutat.* 2008; 29(6): E27–E36. <https://doi.org/10.1002/humu.20753>
38. Pittis M.G., Filocamo M. Molecular genetics of late onset glycogen storage disease II in Italy. *Acta Myol.* 2007; 26(1): 67–71.
39. De Filippi P., Saeidi K., Ravaglia S., Dardis A., Angelini C., Mongini T., et al. Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014; (9): 102. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0102-z>

40. Remiche G., Ronchi D., Magri F., Lamperti C., Bordoni A., Moggio M., et al. Extended phenotype description and new molecular findings in late onset glycogen storage disease type II: a northern Italy population study and review of the literature. *J. Neurol.* 2014; 261(1): 83–97. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7137-2>
41. Kroos M., Pomponio R.J., van Vliet L., Palmer R.E., Phipps M., Van der Helm R., et al. Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Hum. Mutat.* 2008; 29(6): 13–26. <https://doi.org/10.1002/humu.20745>
42. Tajima Y., Matsuzawa F., Aikawa S.I., Okumiya T., Yoshimizu M., Tsukimura T., et al. Structural and biochemical studies on Pompe disease and a “pseudodeficiency of acid α -glucosidase”. *J. Hum. Genet.* 2007; 52(11): 898–906. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0191-9>
43. Kumamoto S., Katafuchi T., Nakamura K., Endo F., Oda E., Okuyama T., et al. High frequency of acid α -glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol. Genet. Metab.* 2009; 97(3): 190–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.03.004>
44. Kishnani P.S., Nicolino M., Voit T., Rogers R.C., Tsai A.C., Waterson J., et al. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in Infantile-onset Pompe disease. *J. Pediatr.* 2006; 149(1): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.02.035>
45. De Jesus V.R., Zhang X.K., Keutzer J., Bodamer O.A., Mühl A., Orsini J.J., et al. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin. Chem.* 2009; 55(1): 158–64. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.111864>
46. Bodamer O.A., Scott C.R., Giugliani R.; Pompe Disease Newborn Screening Working Group. Newborn screening for Pompe disease. *Pediatrics.* 2017; 140(Suppl. 1): S4–S13. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0280C>
47. Scott C.R., Elliott S., Buroker N., Thomas L.I., Keutzer J., Glass M., et al. Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *J. Pediatr.* 2013; 163(2): 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.031>
48. QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; 2016. Available at: <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
49. Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2012.
50. Primer-BLAST: A tool for finding specific primers. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>
51. Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com>
52. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
53. MRC-Holland. Available at: <http://www.mlpa.com>
54. Genome Aggregation Database (gnomAD). Available at: <https://gnomad.broadinstitute.org>
55. GenBank Accession. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
56. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика*. 2019; 18(2): 3–23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23>
57. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015; 17(5): 405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
58. Human Genome Variation Society (HGVS). Available at: <http://www.hgvs.org/>
59. Реброва О.Ю. *Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета программ Statistica*. М.: Медиа Сфера; 2006.
60. Griner P.F., Mayewski R.J., Mushlin A.I., Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med.* 1981; 94(4 Pt. 2): 557–92.
61. Бюль А., Цёфель П. *SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей*. Пер. с нем. СПб.: ДиасофтЮп; 2005.
62. R: The R Project for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>
63. Horn P.S., Pesce A.J. Reference intervals: an update. Review. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 334(1-2): 5–23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00133-5)
64. Mashima R., Okuyama T. Enzyme activities of α -glucosidase in Japanese neonates with pseudodeficiency alleles. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2017; (12): 110–4. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.06.007>
65. Fukuhara Y., Fuji N., Yamazaki N., Hirakiyama A., Kamioka T., Seo J.H., et al. A molecular analysis of the GAA gene and clinical spectrum in 38 patients with Pompe disease in Japan. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2018; (14): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.10.009>
66. Kim M.S., Song A., Im M., Huh J., Kang I.S., Song J., et al. Clinical and molecular characterization of Korean children with infantile and late-onset Pompe disease: 10 years of experience with enzyme replacement therapy at a single center. *Korean J. Pediatr.* 2019; 62(6): 224–34. <https://doi.org/10.3345/kjp.2018.06968>
67. Oba-Shinjo S.M., da Silva R., Andrade F.G., Palmer R.E., Pomponio R.J., Ciociola K.M., et al. Pompe disease in a Brazilian series: clinical and molecular analyses with identification of nine new mutations. *J. Neurol.* 2009; 256(11): 1881–90. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5219-y>
68. Löscher W.N., Huemer M., Stulnig T.M., Simschitz P., Iglseder S., Eggers C., et al. Pompe disease in Austria: clinical, genetic and epidemiological aspects. *J. Neurol.* 2018; 265(1): 159–64. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8686-6>
69. Hagemans M.L., Winkel L.P., Van Doorn P.A., Hop W.J., Loonen M.C., Reuser A.J., et al. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe’s disease in 54 Dutch patients. *Brain.* 2005; 128 (Pt. 3): 671–7. <https://doi.org/10.1093/brain/awh384>
70. Niño M.Y., In’t Groen S.L.M., Bergsma A.J., van der Beek N.A.M.E., Kroos M., Hoogeveen-Westerveld M., et al. Extension of the Pompe mutation database by linking disease-associated variants to clinical severity. *Hum. Mutat.* 2019; 40(11): 1954–67. <https://doi.org/10.1002/humu.23854>
71. Chen X., Liu T., Huang M., Wu J., Zhu J., Guo Y., et al. Clinical and molecular characterization of infantile-onset Pompe disease in Mainland Chinese patients: identification of two common mutations. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2017; 21(6): 391–6. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0424>
72. Labrousse P., Chien Y.H., Pomponio R.J., Keutzer J., Lee N.C., Akmaev V.R., et al. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 99(4): 379–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.014>
73. Kostera-Pruszczyk A., Opuchlik A., Lugowska A., Nadaj A., Bojakowski J., Tylki-Szymanska A., et al. Juvenile onset acid maltase deficiency presenting as a rigid spine syndrome. *Neuromuscul. Disord.* 2006; 16(4): 282–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.02.001>
74. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs=c.1856G%3EA&criteria=or&orderby=aMut_ID1
75. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs=c.307T%3EG&criteria=or&orderby=aMut_ID1
76. Семьякина А.Н., Сухоруков В.С., Букина Т.М., Яблонская М.И., Меркурьева Е.С., Харабадзе М.Н. и др. Болезнь накопления гликогена, тип II (болезнь Помпе) у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2014; 59(4): 48–55.
77. Hermans M.M., van Leenen D., Kroos M.A., Beesley C.E., Van Der Ploeg A.T., Sakuraba H., et al. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum. Mutat.* 2004; 23(1): 47–56. <https://doi.org/10.1002/humu.10286>

REFERENCES

1. Union of Pediatricians of Russia; Russian Society of Medical Geneticists. *Clinical Recommendations: Pompe disease. ICD 10: E74.0 [Klinicheskie rekomendatsii: Bolezнь Pompe. MKB 10: E74.0]*. Moscow; 2017. Available at: <https://www.pediatr-russia.ru/>

- information/klin-rek/deystvuyushchie-klinicheskie-rekomendatsii/Bolezn%20Помпе%20СПР_17.04.17.pdf (in Russian)
2. Hirschhorn R., Reuser A.J.J. Glycogen storage disease type II: Acid alpha-glucosidase (acid maltase) deficiency. In: Desnick R.J., Ioannou Y.A., Eng C.M., Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., et al. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001: 3389–420.
3. Pinto R., Caseiro C., Lemos M., Lopes L., Fontes A., Ribeiro H., et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *Eur. J. Hum. Genet.* 2004; 12(2): 87–92. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201044>
4. Martiniuk F., Chen A., Mack A., Arvanitopoulos E., Chen Y., Rom W.N., et al. Carrier frequency for glycogen storage disease type II in New York and estimates of affected individuals born with the disease. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 79(1): 69–72. <https://doi.org/10.1002/SI-C11096-86281998082779:1<69::AID-AJMG16>3.0.CO;2-K>
5. Lin C.Y., Hwang B., Hsiao K.J., Jin Y.R. Pompe's disease in Chinese and prenatal diagnosis by determination of α -glucosidase activity. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1987; 10(1): 11–7. <https://doi.org/10.1007/BF01799482>
6. Aulsems M.G., Verbiest J., Hermans M.P., Kroos M.A., Beemer F.A., Wokke J.H., et al. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counseling. *Eur. J. Hum. Genet.* 1999; 7(6): 713–6. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200367>
7. Mechtler T.P., Stary S., Metz T.F., De Jesús V.R., Greber-Platzer S., Pollak A., et al. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. *Lancet.* 2012; 379(9813): 335–41. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61266-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61266-X)
8. Pompe J.C. Over idiopathische hypertrophie van het hart. *Pompe. Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1932; (76): 304–12.
9. Bischoff G. Zum klinischen bild der glykogen-speicherungs-krankheit (glykogenose). *Kinderheilkd Z.* 1932; (52): 722–6. <https://doi.org/10.1007/BF02248461>
10. Putschar M. Über angeborene Glykogenspeicher-Krankheit des herzens. *Beitr. Pathol. Anat. Allg. Pathol.* 1932; (90): 222.
11. Cori G.T. Enzymes and glycogen structure in glycogenosis. *Osterr. Z. Kinderheilkd. Kinderfuersorge.* 1954; 10(1–2): 38–42.
12. Hers H.G. Alpha-glucosidase deficiency in generalize glycogen storage disease (Pompe's disease). *Biochem. J.* 1963; (86): 11–6. <https://doi.org/10.1042/bj0860011>
13. Hoefsloot L.H., Hoogeveen-Westerveld M., Reuser A.J., Oostra B.A. Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem. J.* 1990; 272(2): 493–7. <https://doi.org/10.1042/bj2720493>
14. Zhu Y., Li X., Kyazike J., Zhou Q., Thurberg B.L., Raben N., et al. Conjugation of mannose 6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in pompe mice. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(48): 50336–41. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409676200>
15. Fukuda T., Ahearn M., Roberts A., Mattaliano R.J., Zaal K., Ralston E., et al. Autophagy and mistargeting of therapeutic enzyme in skeletal muscle in Pompe disease. *Mol. Ther.* 2006; (14): 831–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.08.009>
16. Raben N., Shea L., Hill V., Plotz P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods. Enzymol.* 2009; (453): 417–449. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04021-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04021-4)
17. Shea L., Raben N. Autophagy in skeletal muscle: implications for Pompe disease. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2009; 47 (Suppl. 1): 42–7. <https://doi.org/10.5414/cpp47042>
18. Fuller D.D., ElMallah M.K., Smith B.K., Corti M., Lawson L.A., Falk D.J., et al. The respiratory neuromuscular system in Pompe disease. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2013; 189(2): 241–9. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.06.007>
19. Thurberg B.L., Lynch Maloney C., Vaccaro C., Afonso K., Tsai A.C., Bossen E., et al. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab. Invest.* 2006; 86(12): 1208–20. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700484>
20. Nascimbeni A.C., Fanin M., Masiero E., Angelini C., Sandri M. Impaired autophagy contributes to muscle atrophy in glycogen storage disease type II patients. *Autophagy.* 2012; 8(11): 1697–700. <https://doi.org/10.4161/auto.21691>
21. Chien Y.H., Lee N.C., Huang P.H., Lee W.T., Thurberg B.L., Hwu W.L. Early pathologic changes and responses to treatment in patients with later-onset Pompe disease. *Pediatr. Neurol.* 2012; 46(3): 168–71. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.12.010>
22. Van der Ploeg A.T., Reuser A.J. Pompe's disease. 2008; 372(9646): 1342–53. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61555-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61555-X)
23. Bembi B., Cerini E., Danesino C., Donati M.A., Gasperini S., Morandi L., et al. Diagnosis of glycogenosis type II. *Neurology.* 2008; 71(23 Suppl. 2): S4–11. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e-31818da91e>
24. Hobson-Webb L.D., Dearnley S., Kishnani P.S. The clinical and electrodiagnostic characteristics of Pompe disease with post-enzyme replacement therapy findings. *Clin. Neurophysiol.* 2011; 122(11): 2312–7. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.04.016>
25. Zhang H., Kallwass H., Young S.P., Carr C., Dai J., Kishnani P.S., et al. Comparison of maltose and acarbose as inhibitors of maltase-glucoamylase activity in assaying acid alpha-glucosidase activity in dried blood spots for the diagnosis of infantile Pompe disease. *Genet. Med.* 2006; 8(5): 302–6. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000217781.66786.9b>
26. Savost'yanov K.V., Nikitin S.S., Karpacheva K.E. Laboratory studies and Pompe disease: from suspicion to therapy monitoring. *Nervno-myshechnye bolezni.* 2016; 6(1): 54–62. <https://doi.org/10.17650/2222-8721-2016-6-1-54-62> (in Russian)
27. Dreyfus J., Poenaru L. White blood cells and the diagnosis of alpha-glucosidase deficiency. *Pediatr. Res.* 1980; (14): 342–4. <https://doi.org/10.1203/00006450-198004000-00017>
28. Wisselaar H.A., Kroos M.A., Hermans M.M., van Beeumen J., Reuser A.J. Structural and functional changes of lysosomal acid alpha-glucosidase during intracellular transport and maturation. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(3): 2223–31.
29. Niizawa G., Levin C., Aranda C., Blanco M., Chamois N.A. Retrospective diagnosis of glycogen storage disease type II by use of a newborn-screening card. *Clin. Chim. Acta.* 2005; 359(1–2): 205–6. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.007>
30. Human Gene Mutation Database (HGMD): Gene GAA. Available at: <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GAA>
31. Nascimbeni A.C., Fanin M., Tasca E., Angelini C. Molecular pathology and enzyme processing in various phenotypes of acid maltase deficiency. *Neurology.* 2008; 70(8): 617–26. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000299892.81127.8e>
32. Huie M.L., Chen A.S., Tsujino S., Shanks S., DiMauro S., Engel A.G., et al. Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T→G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT→CT) mutation. *Hum. Mol. Genet.* 1994; 3(12): 2231–6. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.12.2231>
33. Shieh J.J., Lin C.Y. Frequent mutation of Chinese patients with infantile type of GSD II in Taiwan: evidence for a founder effect. *Hum. Mutat.* 1998; 11(4): 306–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11:4<306::AID-HUMU8>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<306::AID-HUMU8>3.0.CO;2-S)
34. Becker J.A., Vlach J., Raben N., Nagaraju K., Adams E.M., Hermans M.M., et al. The African origin of the common mutation in African American patients with glycogen-storage disease type II. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62(4): 991–4. <https://doi.org/10.1086/301788>
35. Wens S.C., van Gelder C.M., Kruijschaar M.E., de Vries J.M., van der Beek N.A., Reuser A.J., et al. Phenotypic variation within 22 families with Pompe disease. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013; 8: 182. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-182>
36. Smith W., Sullivan-Saarela J.A., Li J.S., Cox G.F., Corzo D., Chen Y.T., et al. Sibling phenotype concordance in classical infantile Pompe disease. *Am. J. Med. Genet.* 2007; 143(21): 2493–501. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31936>
37. Pittis M.G., Donnarumma M., Montalvo A.L., Dominissini S., Kroos M., Rosano C., et al. Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease. *Hum. Mutat.* 2008; 29(6): E27–E36. <https://doi.org/10.1002/humu.20753>
38. Pittis M.G., Filocamo M. Molecular genetics of late onset glycogen storage disease II in Italy. *Acta Myol.* 2007; 26(1): 67–71.
39. De Filippi P., Saeidi K., Ravaglia S., Dardis A., Angelini C., Mongini T., et al. Genotype-phenotype correlation in Pompe disease, a step forward. *Orphanet J. Rare Dis.* 2014; (9): 102. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0102-z>

40. Remiche G., Ronchi D., Magri F., Lamperti C., Bordoni A., Moggio M., et al. Extended phenotype description and new molecular findings in late onset glycogen storage disease type II: a northern Italy population study and review of the literature. *J. Neurol.* 2014; 261(1): 83–97. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-7137-2>
41. Kroos M., Pomponio R.J., van Vliet L., Palmer R.E., Phipps M., Van der Helm R., et al. Update of the Pompe disease mutation database with 107 sequence variants and a format for severity rating. *Hum. Mutat.* 2008; 29(6): 13–26. <https://doi.org/10.1002/humu.20745>
42. Tajima Y., Matsuzawa F., Aikawa S.I., Okumiya T., Yoshimizu M., Tsukimura T., et al. Structural and biochemical studies on Pompe disease and a “pseudodeficiency of acid α -glucosidase”. *J. Hum. Genet.* 2007; 52(11): 898–906. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0191-9>
43. Kumamoto S., Katafuchi T., Nakamura K., Endo F., Oda E., Okuyama T., et al. High frequency of acid α -glucosidase pseudodeficiency complicates newborn screening for glycogen storage disease type II in the Japanese population. *Mol. Genet. Metab.* 2009; 97(3): 190–5. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.03.004>
44. Kishnani P.S., Nicolino M., Voit T., Rogers R.C., Tsai A.C., Waterston J., et al. Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human acid alpha-glucosidase in Infantile-onset Pompe disease. *J. Pediatr.* 2006; 149(1): 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.02.035>
45. De Jesus V.R., Zhang X.K., Keutzer J., Bodamer O.A., Mühl A., Orsini J.J., et al. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin. Chem.* 2009; 55(1): 158–64. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.111864>
46. Bodamer O.A., Scott C.R., Giugliani R.; Pompe Disease Newborn Screening Working Group. Newborn screening for Pompe disease. *Pediatrics.* 2017; 140(Suppl. 1): S4–S13. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-0280C>
47. Scott C.R., Elliott S., Buroker N., Thomas L.I., Keutzer J., Glass M., et al. Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *J. Pediatr.* 2013; 163(2): 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.031>
48. QIAGEN. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook; 2016. Available at: <https://www.qiagen.com/ch/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>
49. Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2012.
50. Primer-BLAST: A tool for finding specific primers. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>
51. Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.thermofisher.com>
52. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
53. MRC-Holland. Available at: <http://www.mlpa.com>
54. Genome Aggregation Database (gnomAD). Available at: <https://gnomad.broadinstitute.org>
55. GenBank Accession. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
56. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prokhorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Meditsinskaya genetika.* 2019; 18(2): 3–23. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-23> (in Russian)
57. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 2015; 17(5): 405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
58. Human Genome Variation Society (HGVS). Available at: <http://www.hgvs.org/>
59. Rebrova O.Yu. Statistical Analysis of Medical Data. Application of the Statistica Software Package [Statisticheskii analiz meditsinskikh dannykh. Primenenie paketa programm Statistica]. Moscow: Media Sfera; 2006. (in Russian)
60. Griner P.F., Mayewski R.J., Mushlin A.I., Greenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. Principles and applications. *Ann. Intern. Med.* 1981; 94(4 Pt. 2): 557–92.
61. Achim Bühl, Peter Zöfel. *SPSS Version 10. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows [SPSS: The Art of Information Processing. Statistical Data Analysis and Recovery of Hidden Patterns]*. München: Addison-Wesley; 2000. (in German)
62. R: The R Project for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>
63. Horn P.S., Pesce A.J. Reference intervals: an update. Review. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 334(1-2): 5–23. [https://doi.org/10.1016/s0009-8981\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(03)00133-5)
64. Mashima R., Okuyama T. Enzyme activities of α -glucosidase in Japanese neonates with pseudodeficiency alleles. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2017; (12): 110–4. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.06.007>
65. Fukuhara Y., Fuji N., Yamazaki N., Hirakiyama A., Kamioka T., Seo J.H., et al. A molecular analysis of the GAA gene and clinical spectrum in 38 patients with Pompe disease in Japan. *Mol. Genet. Metab. Rep.* 2018; (14): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2017.10.009>
66. Kim M.S., Song A., Im M., Huh J., Kang I.S., Song J., et al. Clinical and molecular characterization of Korean children with infantile and late-onset Pompe disease: 10 years of experience with enzyme replacement therapy at a single center. *Korean J. Pediatr.* 2019; 62(6): 224–34. <https://doi.org/10.3345/kjp.2018.06968>
67. Oba-Shinjo S.M., da Silva R., Andrade F.G., Palmer R.E., Pomponio R.J., Ciociola K.M., et al. Pompe disease in a Brazilian series: clinical and molecular analyses with identification of nine new mutations. *J. Neurol.* 2009; 256(11): 1881–90. <https://doi.org/10.1007/s00415-009-5219-y>
68. Löscher W.N., Huemer M., Stulnig T.M., Simschitz P., Iglseder S., Eggers C., et al. Pompe disease in Austria: clinical, genetic and epidemiological aspects. *J. Neurol.* 2018; 265(1): 159–64. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8686-6>
69. Hagemans M.L., Winkel L.P., Van Doorn P.A., Hop W.J., Loonen M.C., Reuser A.J., et al. Clinical manifestation and natural course of late-onset Pompe's disease in 54 Dutch patients. *Brain.* 2005; 128(Pt. 3): 671–7. <https://doi.org/10.1093/brain/awh384>
70. Niño M.Y., In't Groen S.L.M., Bergsma A.J., van der Beek N.A.M.E., Kroos M., Hoogeveen-Westerveld M., et al. Extension of the Pompe mutation database by linking disease-associated variants to clinical severity. *Hum. Mutat.* 2019; 40(11): 1954–67. <https://doi.org/10.1002/humu.23854>
71. Chen X., Liu T., Huang M., Wu J., Zhu J., Guo Y., et al. Clinical and molecular characterization of infantile-onset Pompe disease in Mainland Chinese patients: identification of two common mutations. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.* 2017; 21(6): 391–6. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0424>
72. Labrousse P., Chien Y.H., Pomponio R.J., Keutzer J., Lee N.C., Akmaev V.R., et al. Genetic heterozygosity and pseudodeficiency in the Pompe disease newborn screening pilot program. *Mol. Genet. Metab.* 2010; 99(4): 379–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.12.014>
73. Kostera-Pruszczyk A., Opuchlik A., Lugowska A., Nadaj A., Bojakowski J., Tylki-Szymanska A., et al. Juvenile onset acid maltase deficiency presenting as a rigid spine syndrome. *Neuromuscul. Disord.* 2006; 16(4): 282–5. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.02.001>
74. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs=c.1856G%3EA&criteria=or&orderby=aMut_ID1
75. Pompe disease GAA variant database (ErasmusMC Rotterdam). Available at: http://www.pompevariantdatabase.nl/pompe_mutations_list.php?qs=c.307T%3EG&criteria=or&orderby=aMut_ID1
76. Semyachkina A.N., Sukhorukov V.S., Bukina T.M., Yablonskaya M.I., Merkur'eva E.S., Kharabadze M.N., et al. Glycogen storage disease, type II (Pompe disease) in children. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii.* 2014; 59(4): 48–55. (in Russian)
77. Hermans M.M., van Leenen D., Kroos M.A., Beesley C.E., Van Der Ploeg A.T., Sakuraba H., et al. Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. *Hum. Mutat.* 2004; 23(1): 47–56. <https://doi.org/10.1002/humu.10286>