https://doi.org/10.21682/2311-1267-2020-7-2-86-93

CC BY 4.0

Дефицит пируваткиназы: эпидемиология, молекулярно-генетическая характеристика и современные подходы к диагностике (обзор литературы)

А.В. Банколе[1], Е.А. Черняк[2]

[1]ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1;
[2]ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

Контактные данные: *Екатерина Александровна Черняк ekcherniak@yandex.ru*

Наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия вследствие дефицита пируваткиназы – наиболее распространенная среди всех ферментопатий эритроцитов. Фермент пируваткиназа необходим для последней ключевой стадии гликолиза – образования енольной формы пирувата и аденозинтрифосфата (АТФ) (50 % всей энергии АТФ эритроцитов). Недостаточное количество АТФ напрямую влияет на продолжительность жизни эритроцитов – сокращая ее. Поврежденные эритроциты разрушаются в капиллярах селезенки, приводя к развитию хронической гемолитической анемии. Дефицит пируваткиназы является аутосомно-рецессивным заболеванием в результате гомозиготных и компаунд-гетерозиготных мутаций в гене PKLR. Точные данные о частоте встречаемости дефицита пируваткиназы отсутствуют, однако оцениваемая частота варьирует от 3:1 000 000 до 1:20 000. Клинические проявления заболевания варьируют по степени тяжести, которая может меняться с возрастом. Диагностика дефицита пируваткиназы основана на определении активности пируваткиназы и молекулярно-генетическом исследовании гена PKLR. Многообразие клинических проявлений, возможных осложнений, а также малодоступность диагностических методов затрудняют постановку диагноза.

Ключевые слова: *наследственная гемолитическая анемия, дефицит пируваткиназы*

Для цитирования: *Банколе А.В., Черняк Е.А. Дефицит пируваткиназы: эпидемиология, молекулярно-генетическая характеристика и современные подходы к диагностике (обзор литературы). Российский журнал детской гематологии и онкологии 2020;7(2):86–93.*

Pyruvate kinase deficiency: epidemiology, molecular analyses and modern diagnostic approaches (literature review)

A.V. Bankole[1], E.A. Chernyak[2]

[1]N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia;
[2]Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow, 117997, Russia

Red cell pyruvate kinase deficiency is the most common glycolytic defect causing congenital nonspherocytic hemolytic anemia. Pyruvate kinase is the enzyme involved in the last step of glycolysis – the transfer of a phosphate group from phosphoenolpyruvate producing the enolate of pyruvate and ATP (50 % of total energy ATP of erythrocytes). ATP deficiency directly shortened red cell lifespan. Affected red blood cells are destroyed in the splenic capillaries, leading to the development of chronic hemolytic anemia. It is an autosomal recessive disease, caused by homozygous and compound heterozygous mutations in the PKLR gene. There are no exact data on the incidence of pyruvate kinase deficiency, but the estimated frequency varies from 3: 1,000,000 to 1:20,000. The clinical features of the disease and the severity are highly variable. Diagnosis of pyruvate kinase deficiency is based on the determination of pyruvate kinase activity and molecular genetic study of the PKLR gene. The variety of clinical manifestations, possible complications, as well as the inaccessibility of diagnostic methods complicate the diagnosis.

Key words: *congenital hemolytic anemia, pyruvate kinase deficiency*

For citation: *Bankole A.V., Chernyak E.A. Pyruvate kinase deficiency: epidemiology, molecular analyses and modern diagnostic approaches (literature review). Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology 2020;7(2):86–93.*

Информация об авторах
А.В. Банколе: студентка РНИМУ им. Н.И. Пирогова, e-mail: vanmiradoctor@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-9533-6583
Е.А. Черняк: врач-гематолог консультативного отделения, научный сотрудник отдела оптимизации лечения гематологических заболеваний Института гематологии, иммунологии и клеточных технологий НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, e-mail: ekcherniak@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-3852-9634

Information about the authors
A.V. Bankole: Student N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia, https://orcid.org/0000-0001-9533-6583
E. A. Chernyak: Hematologist Advisory Department, Researcher Department for Optimizing the Treatment of Hematological Diseases of the Institute of Hematology, Immunology and Cell's Technology Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology Ministry of Health of Russia, e-mail: ekcherniak@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-3852-9634

Вклад авторов
А.В. Банколе: написание текста статьи, анализ полученных литературных данных, подготовка списка литературы
Е.А. Черняк: поиск литературных данных, разработка дизайна статьи, анализ научного материала, литературное редактирование, составление резюме

Authors' contributions
A.V. Bankole: writing the text of the article, data analysis, preparing the list of the references
E.A. Chernyak: selection of topics for publication, design of the article, analysis of scientific material, literary editing, composing a resume

Благодарность
Авторы выражают благодарность своим коллегам (В.С. Пахолкиной, М.И. Корнеевой) за предоставленную помощь.

Thanks
The authors are grateful to their colleagues (V.S. Pakholkina, M.I. Korneeva) for the help provided.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. / ***Conflict of interest.*** *The authors declare no conflict of interest.*

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки. / ***Funding.*** *The study was performed without external funding.*

Введение

Наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия вследствие дефицита пируваткиназы – наиболее распространенная среди всех анемий в результате дефекта гликолитических ферментов [1, 2]. Фермент пируваткиназа необходим для последней ключевой стадии гликолиза – образования енольной формы пирувата и выделения энергии в виде аденозинтрифосфата (АТФ) (50 % от всей энергии АТФ эритроцитов) [3]. Дефицит фермента приводит к сокращению продолжительности жизни эритроцитов, провоцируя гемолиз. Точные данные о частоте встречаемости заболевания отсутствуют. Вероятно, значительную роль в данной проблеме играют трудности диагностики.

Хотя клинические особенности дефицита пируваткиназы у отдельных пациентов могут существенно различаться, общие признаки и симптомы включают утомляемость, одышку, желтуху и спленомегалию, а также желчекаменную болезнь [4]. Заболевание часто манифестирует в неонатальном периоде с гемолитической анемии, однако с возрастом тяжесть его течения может меняться, но при отсутствии адекватной трансфузионной и симптоматической терапии оно может приводить к гибели пациента [5]. Частым осложнением является перегрузка железом, требующая проведения хелаторной терапии. В литературе также описаны случаи печеночной недостаточности, ассоциированные с дефицитом пируваткиназы [6].

Эпидемиология

Первый случай дефицита пируваткиназы был зарегистрирован в 1961 г. [7], на сегодняшний день есть данные о распространенности заболевания во всем мире. Точные данные о частоте встречаемости дефицита пируваткиназы отсутствуют, однако предположительная частота варьирует от 3:1 000 000 до 1:20 000 [8]. Распространенность заболевания выше среди представителей европеоидной расы, особенно в Европе и Северной Америке, и рассчитана как 5:100 000 [9], существуют и другие оценки, основанные на регистрах пациентов, которые предполагают более низкую заболеваемость – примерно 1:100 000 (в Северной Европе) [2, 10]. По данным других исследований, частота встречаемости в США и Европе составляет 1:20 000 человек [10], гомозиготных или компаунд-гетерозиготных мутаций у пациентов с хронической гемолитической анемией различной интенсивности [11–14]. Данное различие может быть связано с большим числом пациентов, имеющих легкие проявления дефицита пируваткиназы, вследствие чего дообследование не проводилось и их заболевание не диагностировано до настоящего времени. Докладываемая частота встречаемости гетерозигот среди различных популяций – 0,15–6 %. Более высокая частота встречаемости может отражать кровное родство или наиболее часто «эффект основателя» [8]. Описана более высокая частота в определенных этнических группах: у амишей Пенсильвании и Огайо (гомозиготная мутация 1436G>A) и в цыганских общинах (делеция 1149 и потеря экзона 11) [10, 15]. Высокая частота встречаемости заболевания наблюдается в популяциях Ближнего Востока и Тропической Африки, эндемичных по малярии. Доказательства протективного эффекта были получены в исследованиях на моделях мышей с малярией, кроме того, снижение репликации малярийного плазмодия в эритроцитах и усиление фагоцитоза зараженных эритроцитов описано у пациентов с дефицитом пируваткиназы [2, 8, 16]. Среди населения Китая зарегистрированы только спорадические случаи заболевания [7].

Молекулярно-генетическая характеристика

Гемолитические анемии, вызванные гликолитическими энзимопатиями, встречаются относительно редко в отличие от дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. При этом описаны аномалии практически каждого гликолитического фермента, но более чем в 90 % случаев энзимопатий эритроцитов гемолитическая анемия вызвана дефицитом пируваткиназы.

В активной форме пируваткиназа является гомотетрамером, у позвоночных в тканях присутствует 4 изофермента: L (печень, кора почек и тонкая кишка), R (эритроциты), M1 (мышцы и мозг) и M2 (ткань плода, пролиферирующие ткани взрослого человека)

[2, 12, 17–21]. R- и L-субъединицы экспрессируются с разных тканеспецифичных промоторов гена *PKLR*, локализующегося на хромосоме 1q21 [18]. Кодирующая область включает в себя 12 экзонов, причем 10 из них имеются как в L-, так и в R-изоферментах, другие 2 экзона – 1 и 2 – специфичны для типов R и L соответственно.

Идентифицировано более 300 различных мутаций гена *PKLR*, являющихся причиной хронической гемолитической анемии. Заболевание наследуется аутосомно-рецессивно, в его основе лежат гомозиготные или компаунд-гетерозиготные мутации в гене *PKLR* [20]. Около 70 % составляют миссенс-мутации [10]. За исключением некоторых этнических групп (амиши, цыгане) мутации характеризуются большой разнородностью и редко повторяются, примерно у 25 % пациентов описывают впервые обнаруженные мутации [10]. При дефиците пируваткиназы вследствие «нулевых» мутаций может произойти реверсия синтеза изоэнзима М2, что приводит к спасению потенциально летального фенотипа [8, 21, 22]. В типичных случаях активность фермента у гомозигот составляет менее 25 % и у гетерозигот 40–60 %, хотя при некоторых дефицитных вариантах активность *in vitro* остается нормальной или близкой к нормальной [8].

Данные о мутациях в гене *PKLR* и их распределении

В 2015 г. G. Canu et al. опубликовали результаты исследования, в котором были систематизированы данные о 260 мутациях в гене *PKLR*, кроме того, был выполнен анализ 256 вариантов, среди которых: полиморфизмы – 6 (2 %), однонуклеотидные замены – 184 (72 %, 172 миссенс и 12 нонсенс), делеции – 23 (9 %), инсерции – 8 (3 %), малые инсерции и микроделеции – 2 (~ 1 %), мутации, затрагивающие промотор и интрон, – 33 (13 %). Также варианты были разделены по распространенности: Европа (155/60 %), Азия (55/21 %), США и Канада (18/7 %), Средний Запад США и Африка (12/5 %), Австралия (2/1 %), другие, включая Бразилию и цыган (4/2 %) [12].

При анализе различных международных публикаций: наиболее частыми мутациями в Испании являются c.721G>T (26,6 %), c.1456 C>T (13,3 %) [11], в Центральной и Северной Европе, США – вариант c.1529G>A [15, 23, 24], на юге и западе Европы – c.1456C>T, а вариант 1468C>T – в Азии [15]. В рамках скрининг-исследования в Бразилии были проанализированы данные 500 здоровых человек, вариант c.1456C>T был идентифицирован в 0,1 % аллелей, c.1529G>A не найден. В общей популяции частоты составили 0,28 % и 0,04 % соответственно [23].

Поиск новых мутаций и генотипически-фенотипические корреляции

За последние 5 лет были опубликованы данные о большом количестве новых мутаций, анализе связи генотипа с тяжестью клинического фенотипа, что затрудняется многообразием мутаций. Тяжелая анемия обычно встречается у больных с такими мутациями, как формирование стоп-кодона, сдвиг рамки считывания, сплайсинг и крупные делеции, миссенс-мутации, непосредственно затрагивающие активный сайт или стабильность белка. Анализ корреляции между молекулярным дефектом и тяжестью заболевания у большой когорты пациентов, выполненный M.C.C.M. Svidnicki et al., показал, что проявления различаются в зависимости от типа и положения варианта в гене *PKLR* [23].

Благодаря проведенным в последние годы исследованиям удалось проследить корреляцию между некоторыми генотипами и фенотипами (таблица).

При проведении ретроспективного анализа (Pyruvat Kinase Deficiency Natural History Study) в международной когорте была идентифицирована корреляция генотип–фенотип: у пациентов с двумя миссенс-мутациями в гене *PKLR* отмечена более низкая вероятность проведения спленэктомии, меньшее число трансфузий в течение жизни и более низкая скорость развития перегрузки железом, а пациенты с двумя не миссенс-мутациями реже имели ответ на спленэктомию. При этом у всех исследуемых генотипов частота осложнений была очень высокой. Учитывая отсутствие специфичных изменений для конкретного генотипа, по данным проведенных исследований, генотип не может быть прогностическим фактором клинического течения у пациентов [27]. T. Aksu et al. описали клинический случай больного, имеющего проявления гемолитической анемии, которые становились более выраженными при воздействии высокой температуры окружающей среды из-за фермента с тепловой нестабильностью (гомозиготная миссенс-мутация c.581G>C, p.Arg194Pro) [28].

Кроме того, были описаны гетерозиготные варианты, характеризующиеся мягким клиническим фенотипом (c.182T>A, c.1282G>A, c.965+1G>A). Исследования указывают, что наличие гетерозиготной мутации в гене *PKLR* в сочетании с другими наследственными гемолитическими анемиями (ферментопатии, мембранопатии, дизэритропоэтические анемии) утяжеляет их течение, провоцируя более частые кризы [29]. Вместе с тем родители пациентов, гетерозиготы по мутации гена *PKLR*, не имея клинических и лабораторных проявлений гемолитической анемии, могут демонстрировать умеренно сниженные активности пируваткиназы [30].

Патофизиология

Эритроциты, не имеющие ядра, митохондрий и рибосом, получают энергию за счет метаболизма глюкозы, который происходит двумя основными путями: гликолитическим и гексозомонофосфатным. Основными продуктами гликолиза являются АТФ (источник энергии для многочисленных мембранных и метаболических реакций эритроцитов), никотинамидадениндинуклеотид (НАДН, необходимый кофактор для восстановления метгемоглобина

Корреляция между генотипом и тяжестью анемии у пациентов с дефицитом пируваткиназы
Correlation between genotype and severity of anemia for patients with pyruvate kinase deficiency

Мутация гена *PKLR* *PKLR mutation*	Зиготность *Zygosity*	Тяжесть анемии *Severity of anemia*	Число пациентов *Number of patients*
c.994G>A [23, 25]	Гомозигота *Homozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия *Transfusion-dependent anemia*	2 + 1, гетерозигота *heterozygote*
c.1708G>T [20]	Гомозигота *Homozygote*	Анемия легкой степени тяжести *Mild anemia*	2
c.346delA [26]	Гомозигота *Homozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия *Transfusion-dependent anemia*	3
c.1529G>A [6] c.1091G>A	Компаунд-гетерозигота *Compound heterozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия, печеночная недостаточность → трансплантация печени *Transfusion-dependent anemia, liver failure → liver transplant*	1
c.1529G>A [6] c.1195del	Компаунд-гетерозигота *Compound heterozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия, печеночная недостаточность → трансплантация печени *Transfusion-dependent anemia, liver failure → liver transplant*	1
c.1529G>A	Гомозигота *Homozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия *Transfusion-dependent anemia*	*
c.993C>A c.1456C>T	Компаунд-гетерозигота *Compound heterozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия *Transfusion-dependent anemia* / Анемия легкой степени тяжести *Mild anemia*	*
c.72A>G c.1456C>T	Компаунд-гетерозигота *Compound heterozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия *Transfusion-dependent anemia* / Анемия легкой степени тяжести *Mild anemia*	*
c.721G>T c.1195del	Компаунд-гетерозигота *Compound heterozygote*	Трансфузионно-зависимая анемия, печеночная недостаточность *Transfusion-dependent anemia, liver failure*	1

Примечание. ** – нет данных.*
Note. ** – no data.*

цитохром-b5-редуктазой) и 2,3-дифосфоглицерат (2,3-ДФГ, важный промежуточный продукт, который модулирует сродство гемоглобина к кислороду). Гликолитический путь обеспечивает не только синтез АТФ, но и образование 2,3-ДФГ и никотинамидадениндинуклеотидфосфата, требующихся для модуляции аффинности гемоглобина к кислороду и энзиматической редукции метгемоглобина соответственно.

Пируваткиназа является гомотетрамером, хотя она может существовать в разных формах, от мономера до декамера. Мономер пируваткиназы включает в себя 3 основных домена: домен А, домен В, COOH-концевой С-домен. Также есть 4-й небольшой NH2-концевой домен.

Активный сайт фермента находится между доменами А и В. Пируваткиназа катализирует ключевую реакцию гликолиза, образования енольной формы пирувата и выделения энергии в виде АТФ, что играет центральную роль в клеточном энергетическом метаболизме. Эта реакция является последним этапом гликолитического пути и необратима в физиологических условиях. В эритроцитах тетрамерный PK-R аллостерически активируется фосфоенолпируватом и фруктозо-1,6-бисфосфатом и дезактивируется АТФ [21]. Жесткая регуляция активности пируваткиназы имеет большое значение не только для самого гликолиза, но также и для всего метаболизма. Так как зрелые эритроциты лишены митохондрий, они полностью зависят от гликолиза для производства АТФ для поддержания целостности клеток и некоторых критических функций, что подчеркивает важность гликолиза и объясняет тот факт, что дефекты любого из гликолитических ферментов могут привести к гемолитической анемии.

Ретикулоциты с дефицитом пируваткиназы, генерирующие АТФ только посредством митохондриального окислительного фосфорилирования, при попадании в селезенку с лимитированным содержанием кислорода и глюкозы оказываются в условиях ограничения эффективного окислительного фосфорилирования. Ограничение гликолиза приводит к метаболическому блоку и аккумуляции промежуточных продуктов до пируваткиназной реакции: фосфоенолпирувата, 2-фосфоглицерата, 3-фосфоглицерата и 2,3-ДФГ, которые могут увеличиваться до 3 раз от нормальных значений. Аккумуляция 2,3-ДФГ может способствовать в дальнейшем снижению темпов гликолиза при дефиците пируваткиназы путем ингибирования гексокиназы. Таким образом, дефицит пируваткиназы приводит к снижению содержания АТФ и сокращению продолжительности жизни ретикулоцитов и эритроцитов из-за неспособности поддерживать электрохимический градиент эритроцитов и целостность мембраны, а также повреждения и разрушения эритроцитов в селезенке [27, 31]. При этом, хотя формирование АТФ нарушено в дефицитных по пируваткиназе эритроцитах, снижение концентрации АТФ не является постоянным критерием из-за высокого содержания АТФ в ретикулоцитах [8].

Клинические проявления

Возраст дебюта заболевания может различаться от внутриутробного (водянка плода) до дебюта в млад-

шем или даже взрослом возрасте. Ранний дебют гемолитической анемии обычно связан с более тяжелым клиническим течением. Как правило, с возрастом течение заболевания меняется на более легкое с увеличением интервала между трансфузиями, однако возможны и обратные ситуации.

Перинатальные осложнения

Перинатальные осложнения зарегистрированы у 28 % пациентов, среди них: преждевременные роды, пренатальная анемия, требующая трансфузий компонентов крови. У 24 % беременных отмечалась задержка внутриутробного развития и/или внутриутробная гипоксия плода, у 16 % – водянка плода. Такие осложнения, как задержка внутриутробного развития, водянка плода, незрелость, преждевременные роды наблюдаются у четверти пациентов и не являются специфичными [2, 8, 10].

Неонатальные проявления

Дебют трансфузионной зависимости у большой группы пациентов описан с первых суток жизни. Тяжелый гемолиз требует заменного переливания крови (46 %), а также проведения фототерапии (93 %) в связи с непрямой гипербилирубинемией (59–90 %) [27]. Кроме того, после рождения возможно появление петехиальной сыпи – признак кожного экстрамедуллярного кроветворения [8].

Следует отметить, что у некоторых детей с дефицитом пируваткиназы желтуха не возникает при рождении, а присутствует лишь легкая или полностью компенсированная хроническая гемолитическая анемия.

Клинические проявления у детей и взрослых

Клинические проявления дефицита пируваткиназы в более старшем возрасте включают в себя признаки хронического гемолиза: анемию различной степени тяжести (90–95 %), иктеричность кожных покровов и склер (40–70 %), спленомегалию (80–85 %) либо гепатоспленомегалию, желчекаменную болезнь (30–45 %).

Степень анемии варьирует от легкой или полностью компенсированного гемолиза до тяжелой трансфузионно-зависимой анемии с развитием гиперспленизма, желчекаменной болезни и перегрузки железом. У детей раннего возраста с тяжелой анемией вследствие выраженного расширения эритроидного ростка костного мозга возможны костные деформации (выступание лобных бугров). Анемия может хорошо переноситься пациентами из-за увеличения содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах, что приводит к смещению кривой диссоциации кислорода гемоглобина вправо. Клинические проявления анемии имеют тенденцию исчезать с возрастом, а течение заболевания часто становится относительно стабильными во взрослом возрасте, хотя в результате стресса, острых инфекций или беременности могут возникать гемолитические кризы, требующие трансфузионной поддержки. В случае сонаследования наследственного дефицита пируваткиназы и наследственного сфероцитоза заболевание протекает более тяжело [14]. Перегрузка железом часто развивается как у трансфузионно-зависимых, так и у трансфузионно-независимых пациентов.

Менее распространены осложнения, включающие апластический криз (2–14 %), деформации костей (9 %), экстрамедуллярный эритропоэз (9 %), задержку полового развития (8 %), гиперпигментацию (6 %), трофические язвы нижних конечностей и легочную гипертензию (2–3 %). У 17 % пациентов также были зарегистрированы переломы костей [27].

Конкременты желчного пузыря чаще обнаруживаются у больных старше 10 лет и могут возникать даже после спленэктомии. Наличие синдрома Жильбера повышает риск их возникновения. Описаны редкие случаи тяжелого холестаза и/или молниеносной печеночной недостаточности, связанной с дефицитом пируваткиназы [2, 6, 27, 32].

Следует отметить, что экстрамедуллярный гемопоэз различной локализации может наблюдаться даже у взрослых пациентов с дефицитом пируваткиназы, что затрудняет постановку диагноза. Экстрамедуллярный гемопоэз, вызванный неэффективным эритропоэзом, встречается примерно у 10 % пациентов [8]. У большинства он развивается в печени и селезенке, но также может иметь и другую локализацию [33]. Это подчеркивает важность использования неинвазивных диагностических процедур у пациентов с бессимптомным течением хронического гемолиза вследствие дефицита пируваткиназы эритроцитов.

Дифференциальная диагностика

Дифференциальный диагноз включает гетерогенную группу как врожденных, так и приобретенных гемолитических анемий. Учитывая характер наследования дефицита пируваткиназы, как правило, оценка семейного анамнеза не позволяет проследить возможный диагноз. Дефицит пируваткиназы следует рассматривать как потенциальный диагноз у трансфузионно-зависимых пациентов с гемолитической анемией, у новорожденных с немотивированной гипербилирубинемией, у больных с неуточненным гемолизом после спленэктомии с повышением ретикулоцитоза, а также у пациентов с отягощенным семейным анамнезом.

Диагностика

Диагностика дефицита пируваткиназы основана на анализе клинических данных и лабораторных исследований. В 2016 г. была создана Международная рабочая группа по дефициту пируваткиназы, состоящая из 24 экспертов из 20 центров (Европа, США, Азия). На встрече группы были изучены существующие проблемы диагностики в целях создания диагностических рекомендаций. Сложности диагностики заболевания на сегодняшний день связаны с проблемами малодоступности специфических методов диагностики, отсутствием у большей части пациентов отягощенной наследственности, регулярными заместительными трансфузиями, затрудняющими

диагностику, и отсутствием единого мнения о том, когда и как следует проводить диагностику дефицита пируваткиназы при наблюдении пациента с гемолитической анемией.

Лабораторная диагностика

У пациентов в общем анализе крови отмечается анемия от легкой до тяжелой степени тяжести (концентрация гемоглобина – 65–110 г/л), с анизоцитозом, пойкилоцитозом эритроцитов, ретикулоцитозом. В тяжелых случаях единичные эритробласты могут наблюдаться в мазке периферической крови как следствие неэффективного эритропоэза. В биохимическом анализе крови отмечаются характерные признаки гемолиза: снижение гаптоглобина, гипербилирубинемия (медиана около 60 мкмоль/л), при этом активность лактатдегидрогеназы, как правило, в норме. В литературе описаны случаи, когда при наличии у пациентов только непрямой гипербилирубинемии диагноз дефицита пируваткиназы устанавливался спустя несколько лет, кроме того, стойкое повышение непрямой фракции билирубина > 60 мкмоль/л указывает на необходимость исключения сопутствующего синдрома Жильбера [20].

У пациентов после спленэктомии по результатам ряда исследований отмечается нарастание ретикулоцитоза, иногда до 70 %, даже при уменьшении тяжести анемии [27, 34, 35]. Это связано с большей продолжительностью жизни ретикулоцитов после спленэктомии. В миелограмме часто обнаруживаются признаки дизэритропоэза, что приводит к ошибочному диагнозу врожденной дизэритропоэтической анемии. Осмотическая резистентность эритроцитов может быть как нормальной, так и измененной. Таким образом, этот метод исследования не является информативным.

При исследовании обмена железа даже у пациентов с однократными или редкими трансфузиями донорских эритроцитов может отмечаться повышение ферритина сыворотки, кроме того, наблюдается несоответствие между содержанием ферритина сыворотки и оценкой перегрузки железом по данным магнитно-резонансной томографии в режиме Т2.

Активность фермента эритроцитов

Ферментативная активность пируваткиназы обычно определяется в лизатах эритроцитов с помощью спектрофотометрического анализа [8]. В этом анализе активность фермента рассчитывается исходя из скорости образования пирувата, связанного с окислением НАДН в реакции, опосредованной лактатдегидрогеназой. Уменьшение оптической плотности, которое происходит при окислении НАДН, измеряют с помощью спектрофотометра при 340 нм. [2] Время проведения исследования составляет 2–3 ч. При данном методе исследования ложные нормальные значения активности пируваткиназы эритроцитов могут быть следствием ретикулоцитоза (молодые циркулирующие эритроциты могут иметь нормальную или почти нормальную активность фермента); примеси донорских эритроцитов у пациентов [15, 30]; неполного удаления тромбоцитов и лейкоцитов; компенсаторной экспрессии изофермента М279; наличия аномальных ферментов, которые, хотя и неэффективны *in vivo*, могут демонстрировать нормальную и даже повышенную активность *in vitro*.

Кроме того, ложноположительные результаты могут быть следствием плохих условий хранения образца (обязателен контрольный вариант, хранившийся в аналогичных условиях).

Важно отметить, что отсутствует четкая корреляция между тяжестью клинического фенотипа и снижением активности пируваткиназы в анализе *in vitro*: у пациентов с умеренно выраженными симптомами может быть значительно снижена активность пируваткиназы. Также снижение активности фермента было обнаружено у гетерозиготных носителей [8, 30]. Поэтому, даже если при тестировании выявляется низкая активность пируваткиназы, исследование гена *PKLR* эритроцитов настоятельно рекомендуется для подтверждения диагноза молекулярно-генетическим методом, особенно в случае планируемого оперативного вмешательства.

Другие биохимические тесты

В некоторых случаях истинного дефицита пируваткиназы неоднократного использования стандартного ферментативного анализа было недостаточно. Эти пациенты имели дисфункциональные варианты термолабильных ферментов, которые обнаруживались только с помощью теста термостабильности (анализ активности пируваткиназы, выполненный после 1 ч инкубации при 53 °С). Поэтому выполнение дополнительных биохимических исследований, отличных от анализа активности пируваткиназы, может быть полезным для выявления метаболического блока на стадии пируваткиназной реакции или выявления измененных биохимических свойств. Такие тесты включают в себя обнаружение повышенного содержания гликолитических промежуточных соединений в восходящем направлении (2-фосфоглицерат, 3-фосфоглицерат и 2,3-бифосфоглицерат), тест термостабильности пируваткиназы [28], анализ активности пируваткиназы, выполняемый при низкой концентрации субстрата. Эти методы, подробно описанные Международным комитетом по стандартизации в гематологии, в настоящее время редко выполняются в лабораторной практике, но могут способствовать установлению диагноза в конкретных случаях.

Генетическое тестирование

Генетическое тестирование имеет ряд преимуществ по сравнению с биохимическим исследованием: меньший объем крови для исследования, возможность проведения исследования через короткий интервал после гемотрансфузии, использование в качестве пренатальной диагностики, возможность более длительной транспортировки образца в заданных темпе-

ратурных условиях [30]. Однако не все из обнаруженных мутаций могут быть сразу классифицированы как патогенные, даже после анализа программами прогнозирования, без подтверждения функциональными тестами, сопоставления с клинической картиной. В исследованиях A. Zanella et al. были описаны пациенты с гомозиготными и компаунд-гетерозиготными мутациями гена *PKLR*, имеющие нормальную активность пируваткиназы [36].

Таким образом, «золотым стандартом» для постановки диагноза является одновременное исследование активности фермента и генетическое тестирование. В настоящее время признаны 2 подхода: большинство референсных центров проводят скрининг дефицита пируваткиназы путем измерения ферментативной активности и подтверждают диагноз с помощью анализа последовательности гена *PKLR*. Несколько центров сначала проводят секвенирование следующего поколения гена *PKLR*, а затем подтверждают диагноз по ферментативной активности пируваткиназы, если обнаружена новая мутация. В некоторых случаях в качестве дополнительного метода исследования используют метод MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification, мультиплексное усиление зондирования, зависящее от лигирования).

Благодаря точному диагнозу для семей пациентов становится возможным проведение пренатальной диагностики и семейный скрининг [37].

Заключение

В связи с отсутствием специфических признаков дефицита пируваткиназы при стандартных лабораторных исследованиях и распространенностью заболевания, необходимо включать его в круг дифференциальной диагностики для пациентов с хроническими гемолитическими анемиями, особенно, если ранее были исключены аутоиммунный характер гемолиза, мембранопатии эритроцитов, а также гемоглобинопатии. Учитывая сложность диагностики, установление диагноза дефицита пируваткиназы является последним этапом диагностического обследования, основанного не только на лабораторных исследованиях, но и на анализе истории болезни пациента и его семьи и клиническом обследовании, которое в конечном счете зависит от демонстрации сниженной активности фермента и/или выявления причинных мутаций в гене *PKLR*. В связи со сложностью диагностики из-за многообразия генотипов и отсутствия четкой корреляции с фенотипами продолжаются исследования в целях выработки ее оптимального алгоритма.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Quintana-Bustamante O., Fañanas-Baquero S., Orman I., Torres R., Duchateau P., Poirot L., Gouble A., Bueren J.A., Segovia J.C. Gene editing of *PKLR* gene in human hematopoietic progenitors through 5' and 3' UTR modified TALEN mRNA. PLoS One 2019;14(10):e0223775. doi: 10.1371/journal.pone.0223775.
2. Bianchi P., Fermo E., Glader B., Kanno H., Agarwal A., Barcellini W., Eber S., Hoyer J.D., Kuter D.J., Maia T.M., Mañu-Pereira M.D.M., Kalfa T.A., Pissard S., Segovia J.C., van Beers E., Gallagher P.G., Rees D.C., van Wijk R.; with the endorsement of EuroBloodNet, the European Reference Network in Rare Hematological Diseases. Addressing the diagnostic gaps in pyruvate kinase deficiency: Consensus recommendations on the diagnosis of pyruvate kinase deficiency. Am J Hematol 2019;94(1):149–61. doi: 10.1002/ajh.25325.
3. Grace R.F., Cohen J., Egan S., Wells T., Witherspoon B., Ryan A., Salek S.S., Bodie S., Klaassen R.J. The burden of disease in pyruvate kinase deficiency: Patients' perception of the impact on health-related quality of life. Eur J Haematol 2018;101(6):758–65. doi: 10.1111/ejh.13128.
4. Yang H., Merica E., Chen Y., Cohen M., Goldwater R., Kosinski P.A., Kung C., Yuan Z.J., Silverman L., Goldwasser M., Silver B.A., Agresta S., Barbier A.J. Phase 1 Single- and Multiple-Ascending-Dose Randomized Studies of the Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of AG-348, a First-in-Class Allosteric Activator of Pyruvate Kinase R, in Healthy Volunteers. Clin Pharmacol Drug Dev 2019;8(2):246–59. doi: 10.1002/cpdd.604.
5. Salek M.S., Ionova T., Johns J.R., Oliva E.N. Appraisal of patient-reported outcome measures in analogous diseases and recommendations for use in phase II and III clinical trials of pyruvate kinase deficiency. Qual Life Res 2019;28(2):399–410. doi: 10.1007/s11136-018-2025-y.
6. Chartier M.E., Hart L., Paganelli M., Ahmed N., Bilodeau M., Alvarez F. Successful Liver Transplants for Liver Failure Associated With Pyruvate Kinase Deficiency. Pediatrics 2018;141(Suppl 5):S385–9. doi: 10.1542/peds.2016-3896.
7. He Y., Luo J., Lei Y., Jia S., Liao N. A novel *PKLR* gene mutation identified using advanced molecular techniques. Pediatr Transplant 2018;22(2). doi: 10.1111/petr.13143.
8. Grace R.F., Mark Layton D., Barcellini W. How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. Br J Haematol 2019;184(5):721–34. doi: 10.1111/bjh.15758.
9. van Beers E.J., van Straaten S., Morton D.H., Barcellini W., Eber S.W., Glader B., Yaish H.M., Chonat S., Kwiatkowski J.L., Rothman J.A., Sharma M., Neufeld E.J., Sheth S., Despotovic J.M., Kollmar N., Pospíšilová D., Knoll C.M., Kuo K., Pastore Y.D., Thompson A.A., Newburger P.E., Ravindranath Y., Wang W.C., Wlodarski M.W., Wang H., Holzhauer S., Breakey V.R., Verhovsek M., Kunz J., McNaull M.A., Rose M.J., Bradeen H.A., Addonizio K., Li A., Al-Sayegh H., London W.B., Grace R.F. Prevalence and management of iron overload in pyruvate kinase deficiency: report from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study. Haematologica 2019;104(2):e51–3. doi: 10.3324/haematol.2018.196295.
10. Grace R.F., Glader B. Red Blood Cell Enzyme Disorders. Pediatr Clin North Am 2018;65(3):579–95. doi: 10.1016/j.pcl.2018.02.005.
11. Montllor L., Mañú-Pereira M.D., Llaudet-Planas E., Gómez Ramírez P., Sevilla Navarro J., Vives-Corrons J.L. Red cell pyruvate kinase deficiency in Spain: A study of 15 cases. Med Clin (Barc) 2017;148(1):23–7. doi: 10.1016/j.medcli.2016.10.004.
12. Canu G., De Bonis M., Minucci A., Capoluongo E. Red blood cell PK deficiency: An update of PK-LR gene mutation database. Blood Cells Mol Dis 2016;57:100–9. doi: 10.1016/j.bcmd.2015.12.009.
13. Mañú-Pereira M.M., Gonzalez-Roca E., van Solinge W.W., Llaudet-Planas E., Sevilla J., Montllor L., Mensa-Vilaro A., Ploos van Amstel H.K., van Wijk R., Vives-Corrons J. Pyruvate kinase deficiency and severe congenital hemolytic anemia in a double heterozygous patient with paternal transmission of an early germ-line *de novo* mutation. Am J Hematol 2015;90(12):e217–9. doi: 10.1002/ajh.24178.
14. van Zwieten R., van Oirschot B.A., Veldthuis M., Dobbe J.G., Streekstra G.J., van Solinge W.W., Schutgens R.E., van Wijk R. Partial

pyruvate kinase deficiency aggravates the phenotypic expression of band 3 deficiency in a family with hereditary spherocytosis. Am J Hematol 2015;90(3):e35–9. doi: 10.1002/ajh.23899.

15. Grace R.F., Zanella A., Neufeld E.J., Morton D.H., Eber S., Yaish H., Glader B. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. Am J Hematol 2015;90(9):825–30. doi: 10.1002/ajh.24088.
16. Ayi K., Min-Oo G., Serghides L., Crockett M., Kirby-Allen M., Quirt I., Gros P., Kain K.C. Pyruvate kinase deficiency and malaria. N Engl J Med 2008;358(17):1805–10. doi: 10.1056/NEJMoa072464.
17. Garate Z., Quintana-Bustamante O., Crane A.M., Olivier E., Poirot L., Galetto R., Kosinski P., Hill C., Kung C., Agirre X., Orman I., Cerrato L., Alberquilla O., Rodriguez-Fornes F., Fusaki N., Garcia-Sanchez F., Maia T.M., Ribeiro M.L., Sevilla J., Prosper F., Jin S., Mountford J., Guenechea G., Gouble A., Bueren J.A., Davis B.R., Segovia J.C. Generation of a High Number of Healthy Erythroid Cells from Gene-Edited Pyruvate Kinase Deficiency Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Reports 2015;5(6):1053–66. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.002.
18. Jaouani M., Manco L., Kalai M., Chaouch L., Douzi K., Silva A., Macedo S., Darragi I., Boudriga I., Chaouachi D., Fitouri Z., Van Wijk R., Ribeiro M.L., Abbes S. Molecular basis of pyruvate kinase deficiency among Tunisians: description of new mutations affecting coding and noncoding regions in the *PKLR* gene. Int J Lab Hematol 2017;39(2):223–31. doi: 10.1111/ijlh.12610.
19. Unal S., Gumruk F. Molecular Analyses of Pyruvate Kinase Deficient Turkish Patients from a Single Center. Pediatr Hematol Oncol 2015;32(5):354–61. doi: 10.3109/08880018.2015.1010671.
20. Aydin Köker S., Oymak Y., Bianchi P., Gözmen S., Karapinar T.H., Fermo E., Vergin R.C. A New Variant of *PKLR* Gene Associated With Mild Hemolysis may be Responsible for the Misdiagnosis in Pyruvate Kinase Deficiency. J Pediatr Hematol Oncol 2019;41(1):e1–2. doi: 10.1097/MPH.0000000000001254.
21. Klei T.R.L., Kheradmand Kia S., Veldthuis M., Beuger B.M., Geissler J., Dehbozorgian J., Karimi M., van Bruggen R., van Zwieten R. Residual pyruvate kinase activity in *PKLR*-deficient erythroid precursors of a patient suffering from severe haemolytic anaemia. Eur J Haematol 2017;98(6):584–9. doi: 10.1111/ejh.12874.
22. Miwa S., Nakashima K., Ariyoshi K., Shinohara K., Oda E. Four new pyruvate kinase (PK) variants and a classical PK deficiency. Br J Haematol 1975;29:157–69. doi: 10.1111/j.1365-2141.1975.tb01809.x.
23. Svidnicki M.C.C.M., Santos A., Fernandez J.A.A., Yokoyama A.P.H., Magalhães I.Q., Pinheiro V.R.P., Brandalise S.R., Silveira P.A.A., Costa F.F., Saad S.T.O. Novel mutations associated with pyruvate kinase deficiency in Brazil. Rev Bras Hematol Hemoter 2018;40(1):5–11. doi: 10.1016/j.bjhh.2017.08.007.
24. Christensen R.D., Yaish H.M., Nussenzveig R.H., Agarwal A.M. Siblings with severe pyruvate kinase deficiency and a complex genotype. Am J Med Genet A 2016;170(9):2449–52. doi: 10.1002/ajmg.a.37828.
25. Bagla S., Bhambhani K., Gadgeel M., Buck S., Jin J.P., Ravindranath Y. Compound heterozygosity in *PKLR* gene for a previously unrecognized intronic polymorphism and a rare missense mutation as a novel cause of severe pyruvate kinase deficiency. Haematologica 2019;104(9):e428–31. doi: 10.3324/haematol.2018.214692.
26. Shefer Averbuch N., Steinberg-Shemer O., Dgany O., Krasnov T., Noy-Lotan S., Yacobovich J., Kuperman A.A., Kattamis A., Ben Barak A., Roth-Jelinek B., Chubar E., Shabad E., Dufort G., Ellis M., Wolach O., Pazgal I., Abu Quider A., Miskin H., Tamary H. Targeted next generation sequencing for the diagnosis of patients with rare congenital anemias. Eur J Haematol 2018;101(3):297–304. doi: 10.1111/ejh.13097.
27. Grace R.F., Bianchi P., van Beers E.J., Eber S.W., Glader B., Yaish H.M., Despotovic J.M., Rothman J.A., Sharma M., McNaull M.M., Fermo E., Lezon-Geyda K., Morton D.H., Neufeld E.J., Chonat S., Kollmar N., Knoll C.M., Kuo K., Kwiatkowski J.L., Pospíšilová D., Pastore Y.D., Thompson A.A., Newburger P.E., Ravindranath Y., Wang W.C., Wlodarski M.W., Wang H., Holzhauer S., Breakey V.R., Kunz J., Sheth S., Rose M.J., Bradeen H.A., Neu N., Guo D., Al-Sayegh H., London W.B., Gallagher P.G., Zanella A., Barcellini W. Clinical spectrum of pyruvate kinase deficiency: data from the Pyruvate Kinase Deficiency Natural History Study. Blood 2018;131(20):2183–92. doi: 10.1182/blood-2017-10-810796.
28. Aksu T., Yarali N., Fermo E., Marcello A., Hacisalihoğlu Ş., Bianchi P., Özbek N.Y. A Case With Pyruvate Kinase Deficiency Remarkably Sensitive to Heat. J Pediatr Hematol Oncol 2018;40(7):e458–60. doi: 10.1097/MPH.0000000000001073.
29. Pereira J., Bento C., Manco L., Gonzalez A., Vagace J., Ribeiro M.L. Congenital dyserythropoietic anemia associated to a GATA1 mutation aggravated by pyruvate kinase deficiency. Ann Hematol 2016;95(9):1551–3. doi: 10.1007/s00277-016-2720-0.
30. Gallagher P.G., Glader B. Diagnosis of Pyruvate Kinase Deficiency. Pediatr Blood Cancer 2016;63(5):771–2. doi: 10.1002/pbc.25922.
31. Grace R.F., Rose C., Layton D.M., Galactéros F., Barcellini W., Morton D.H., van Beers E.J., Yaish H., Ravindranath Y., Kuo K.H.M., Sheth S., Kwiatkowski J.L., Barbier A.J., Bodie S., Silver B., Hua L., Kung C., Hawkins P., Jouvin M.H., Bowden C., Glader B. Safety and Efficacy of Mitapivat in Pyruvate Kinase Deficiency. N Engl J Med 2019;381(10):933–44. doi: 10.1056/NEJMoa1902678.
32. Olivier F., Wieckowska A., Piedboeuf B., Alvarez F. Cholestasis and Hepatic Failure in a Neonate: A Case Report of Severe Pyruvate Kinase Deficiency. Pediatrics 2015;136(5):e1366–8. doi: 10.1542/peds.2015-0834.
33. Shaikh H., Bakalov V., Shaikh S., Amjad A. Paravertebral Mass and Diffuse Lymphadenopathy in a Patient with Pyruvate Kinase Deficiency: Malignancy or Alternative Etiology? Cureus 2019;11(6):e4849. doi: 10.7759/cureus.4849.
34. Nathan D.G., Oski F.A., Miller D.R., Gardner F.H. Life-span and organ sequestration of the red cells in pyruvate kinase deficiency. N Engl J Med 1968;278(2):73–81. doi: 10.1056/NEJM196801112780203.
35. Zanella A., Fermo E., Bianchi P., Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. Br J Haematol 2005;130(1):11–25. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05527.x.
36. Zanella A., Bianchi P. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 2000;13(1):57–81. doi: 10.1053/beha.1999.0057.
37. Kedar P.S., Harigae H., Ito E., Muramatsu H., Kojima S., Okuno Y., Fujiwara T., Dongerdiye R., Warang P.P., Madkaikar M.R. Study of pathophysiology and molecular characterization of congenital anemia in India using targeted next-generation sequencing approach. Int J Hematol 2019;110(5):618–26. doi: 10.1007/s12185-019-02716-9.

Статья поступила в редакцию: 10.03.2020. Принята в печать: 09.04.2020.
Article was received by the editorial staff: 10.03.2020. Accepted for publication: 09.04.2020.