

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 18.05.2020
Принята к печати 22.06.2020

Контактная информация:
Хаджиева Фатима Ризвановна, врач-гематолог амбулаторного отделения №3 консультативно-диагностического центра ФГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ»
Адрес: 119049, Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9
E-mail: fatima09876@bk.ru

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-90-94

Сложности диагностики дефицита пируваткиназы

Ф.Р. Хаджиева¹, С.Н. Мушанова¹, Т.Н. Кекеева¹, И.Н. Лаврентьева¹, Е.В. Райкина²

¹ФГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

Дефицит пируваткиназы является редкой врожденной несфероцитарной гемолитической анемией, вызванной дефектом гликолитического пути, вследствие компаунд-гетерозиготных или гомозиготных мутаций в гене *PKLR*, расположенном на хромосоме 1q21. В статье представлен анализ литературных данных и разбор клинического случая дефицита пируваткиназы. Родители пациента дали согласие на использование информации, в том числе фотографии ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Ключевые слова: дефицит пируваткиназы, гемолитическая анемия, *PKLR*

Хаджиева Ф.Р. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (3): 90–94.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-90-94

Diagnostic challenges in pyruvate kinase deficiency

F.R. Khadzhieva¹, S.N. Mushanova¹, T.N. Kekeeva¹, I.N. Lavrentyeva¹, E.V. Raykina²

¹Morozov Children's City Clinical Hospital, Department of Health in Moscow, Moscow

²Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

Red cell pyruvate kinase deficiency is a rare congenital, nonspherocytic hemolytic anemia caused by a glycolytic defect that is due to compound heterozygous or homozygous mutations in the *PKLR* gene on chromosome 1q21. The article presents analytical review of literature and the clinical case of pyruvate kinase deficiency. Patient's parents agreed to use personal data and photos in research and publications.

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

Khadzhieva F.R., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (3): 90–94.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-90-94

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 18.05.2020
Accepted 22.06.2020

Correspondence:

Fatima R. Khadzhieva, Hematologist of the Outpatient Department №3 of the Consultative and Diagnostic Center of the Morozov Children's City Clinical Hospital, Department of Health in Moscow
Address: Russia, 119049, Moscow, 4th Dobryninskiy Per., 1/9
E-mail: fatima09876@bk.ru

Дефицит пируваткиназы (ПК) представляет собой редкую аутосомно-рецессивную наследственную гемолитическую анемию, вызванную мутациями в гене *PKLR*. Дефицит эритроцитарной ПК является наиболее частой причиной наследственной несфероцитарной гемолитической анемии, а также наиболее частой аномалией ферментов гликолитического пути. Ген *PKLR* кодирует ПК – гликолитический фермент, который катализирует трансфосфорилирование из фосфоенолпирувата в аденозиндифосфат с образованием пирувата и аденозинтрифосфата (АТФ), создавая 50% общего АТФ эритроцитов. Ген *PKLR* кодирует изоферменты печени и эритроцитов [1]. В настоящее время известно более 300 мутаций в гене *PKLR*.

По некоторым данным, распространенность заболевания составляет 1 на 20 000 белого населения [2]. Зарегистрировано в мире более 600 семей с наличием данной патологии. Среди больных преобладают жители Северной Европы. Зарегистрированных случаев меньше, чем прогнозировалось. Вероятно,

многие случаи дефицита ПК остаются недиагностированными [2].

Первое сообщение о дефиците ПК у 3 пациентов с врожденной несфероцитарной гемолитической анемией было опубликовано в 1961 г. W.N. Valentine и соавт. [3]. В 1962 г. K.R. Tanaka и соавт., наблюдая компенсированную гемолитическую анемию у молодых людей, которые были относительно недееспособными, высказали предположение о том, что отдельные аллели или даже гены в разных локусах являются основанием для клинической гетерогенности [4]. K. Tani и соавт. (1987) и H. Satoh и соавт. (1988) картировали ген *PKLR* в хромосоме 1q21-q22 [5, 6]. Позднее начали появляться публикации с описанием различных генотипов у пациентов различных национальностей с наследственной несфероцитарной гемолитической анемией вследствие дефицита ПК эритроцитов.

У больных с дефицитом ПК снижается количество АТФ в эритроцитах и накапливаются продукты предшествующих этапов – фосфоенолпируват,

3-фосфоглицерат, а содержание пирувата и лактата снижается. В результате снижения концентрации АТФ нарушаются все энергозависимые процессы, в первую очередь работа Na^+K^+ -АТФазы, которая осуществляет транспорт ионов Na^+ из эритроцитов в плазму крови, препятствует накоплению Na^+ в эритроцитах и способствует сохранению геометрической формы эритроцитов (двояковогнутый диск). Лишенный глюкозы эритроцит деградирует, переходит в эхиноцит, сфероцит и затем подвергается осмотическому лизису, поскольку теряет способность поддерживать градиент натрия и калия [7, 8].

Клинические проявления при дефиците ПК разнообразны, в целом такие же, как и при любой другой гемолитической анемии. У некоторых людей в течение всей жизни анемия полностью компенсирована, а у других может наблюдаться тяжелая хроническая трансфузионно-зависимая анемия. Анемия имеет тенденцию к стабилизации во взрослом возрасте, однако усиление гемолиза происходит при острых инфекциях (60%), стрессах (29%) и беременности (51%) [2]. Некоторые пациенты анемию переносят хорошо, вероятно, из-за увеличения 2,3-дифосфоглицерата в эритроцитах, который снижает сродство гемоглобина к кислороду, что приводит к его усиленному поступлению в ткани – сдвигу кривой диссоциации оксигемоглобина вправо. R.F. Crace и соавт. описали 254 пациента с генетически подтвержденным дефицитом ПК, у которых наиболее распространенным осложнением являлась перегрузка железом (48%) [2]. Спленомегалия отмечалась у 80% пациентов. Однако отсутствие спленомегалии не исключает дефицит ПК. Апластические кризы наблюдались у 14% пациентов и были связаны с острой инфекцией. Чаще всего триггером гемолитического криза выступала парвовирусная инфекция B19, которая является цитотоксической для эритроидных предшественников. Большинство пациентов нуждались в заместительной терапии донорскими эритроцитами во время апластического криза. Как правило, криз купировался в течение 10 дней, но в некоторых случаях тяжелая анемия сохранялась более 1 мес. Образование камней в желчном пузыре отмечалось у 45% пациентов, что потребовало проведения холецистэктомии у 40% пациентов. Экстрамедуллярный гемопоэз был зарегистрирован у 9% пациентов. Очаги кроветворения выявлялись в печени, селезенке, паравертебральной области и средостении.

У 4 пациентов в возрасте от 27 до 42 лет были зарегистрированы трофические язвы нижних конечностей, что встречается и при других гемолитических анемиях. У 3% пациентов наблюдалась легочная гипертензия (средний возраст на момент постановки диагноза 39 лет). Из 254 пациентов 7% имели

тромбоз в анамнезе. Переломы костей отмечались у 17% больных [2].

У пациентов с дефицитом ПК в общем анализе крови отмечается снижение числа эритроцитов, концентрации гемоглобина, эритроцитарные индексы чаще не изменены, редко бывает увеличение среднего объема эритроцитов, возможно, за счет высокого ретикулоцитоза. Морфология эритроцитов часто ничем не примечательна, характерны анизоцитоз, пойкилоцитоз, склонность к макроцитозу, нередко наблюдаются эхиноциты 5–20%, количество которых может увеличиваться после спленэктомии. Отмечается ретикулоцитоз до 11% (норма 0–1%), который возрастает до 70% после спленэктомии.

Около половины пациентов имеют содержание ферритина сыворотки более 1000 мкг/л (норма 30–300 мкг/л), часто даже у тех, кто не нуждается в регулярных заместительных гемотрансфузиях.

Определение количественной активности ПК в эритроцитах является «золотым стандартом» для первоначальной диагностики ее дефицита. Для окончательного подтверждения диагноза в настоящее время необходимо проведение молекулярно-генетических исследований гена *PKLR*.

В литературе регулярно встречаются описания пациентов с дефицитом ПК, выявленным в результате ферментной диагностики, у которых в гене *PKLR* не наблюдается либо описана только одна мутация в гетерозиготном состоянии. При этом снижение активности ПК при отсутствии мутации в гене *PKLR* может быть связано с другими причинами, такими как мутация в гене *KLF1*. Мутация в гене *KLF1* вызывает тяжелую врожденную трансфузионно-зависимую гемолитическую анемию, характеризующуюся снижением количества ПК и стойким повышением фетального гемоглобина и сохранением эмбриональных гемоглобинов во взрослом возрасте [9–11].

На сегодняшний день отсутствуют клинические рекомендации по диагностике, ведению и мониторингу детей и взрослых с дефицитом ПК. В настоящее время лечение состоит из регулярных трансфузий донорских эритроцитов, хелаторной терапии и спленэктомии. R.F. Crace и соавт. описывают, что большинству зарегистрированных больных с дефицитом ПК была проведена спленэктомия (150 (59%) из 254), после которой у 90% пациентов отмечались уменьшение трансфузионной зависимости, повышение гемоглобина в среднем на 16 г/л [2]. Предикторами ответа на спленэктомию, по мнению авторов, были концентрация гемоглобина более 80 г/л и отсутствие выраженной гипербилирубинемии до спленэктомии. Постспленэктомиический сепсис наблюдался у 7% пациентов. В катамнезе у спленэктомизированных больных наблюдалось повышение частоты тромбозов (17 (11%) из 150) в сравнении с

когортой пациентов, которые не были спленэктомированы.

Было установлено, что у пациентов с дефицитом ПК спленэктомия не уменьшает риск образования камней в желчном пузыре и после нее остается угроза развития желчекаменной болезни. Однако даже при отсутствии камней в желчном пузыре, учитывая 50% вероятность поздней холецистэктомии, необходимо рассмотреть вопрос об одновременной сплено- и холецистэктомии у всех пациентов с дефицитом ПК. Из 121 пациента, перенесшего спленэктомию без предварительной или одновременной холецистэктомии, 58 (48%) больным холецистэктомия потребовалась в более позднее время [2]. Таким образом, было сделано заключение о том, что спленэктомия показана только при развитии гиперспленизма и выраженной спленомегалии с угрозой разрыва селезенки.

В настоящее время трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) используется для лечения пациентов с тяжелым гемолизом. Первый случай проведения ТГСК описан в 2000 г. (мальчику в возрасте 5 лет от HLA-идентичной сестры с нормальной активностью ПК) с восстановлением активности ПК и нормализацией гемограммы [12]. В 2018 г. был опубликован отчет о 16 пациентах с дефицитом ПК, перенесших ТГСК в странах Европы и Азии. В этой когорте пациентов применялись разные режимы кондиционирования и стратегии ведения больных. Полученные результаты свидетельствуют о 74% кумулятивной выживаемости и высокой частоте реакции «трансплантат против хозяина», особенно у пациентов, которым на момент лечения было более 10 лет. Учитывая применение различных типов доноров, режимов кондиционирования и отличия в проведении сопроводительной терапии, наиболее эффективный и безопасный трансплантационный режим у пациентов с дефицитом ПК пока не ясен. Соотношение риска и пользы остается неизвестным [13].

На сегодняшний день активно изучают соединение, называемое митапиватом (AG-348), которое, являясь аллостерическим активатором, повышает активность ПК во всех клетках больных, при этом концентрация гемоглобина повышается более чем на 10 г/л в среднем через 10 дней от начала приема. Также отмечено повышение содержания АТФ (в среднем в 1,5 раза), что позволяет предположить возможность восстановления активности гликолитического пути. Однако вероятность ответа на терапию данной молекулой зависит от генотипа заболевания, т. е. наличия белка ПК в эритроцитах больных. Первоначальные исследования показали, что пероральное введение дважды в день может быть эффективным и хорошо переносимым [14, 15].

В России дефицит ПК эритроцитов мало изучен, в связи с чем приводим наше клиническое наблюдение.

КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ

Родители дали согласие на использование информации, в том числе фотографий ребенка, в научных исследованиях и публикациях.

Мальчик А., от 3-й беременности, протекавшей с нарастанием антирезусных антител, в связи с чем вводили антирезусный иммуноглобулин, 2-х срочных родов путем операции «кесарево сечение». При рождении масса тела 3490 г, рост 50 см. В раннем неонатальном периоде отмечались иктеричность кожных покровов, гипербилирубинемия с приростом 10 мкмоль/ч. В связи с чем проведено частичное заменное переливание крови эритроцитарной взвесью. На 10-е сутки ребенок выписан домой в удовлетворительном состоянии. В возрасте 2 месяцев мальчик был госпитализирован в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ» с жалобами на желтушный оттенок кожных покровов.

При поступлении в стационар общее состояние расценено как тяжелое за счет анемического синдрома. Наблюдалась выраженная иктеричность кожных покровов и видимых слизистых оболочек. Периферические лимфоузлы мелкие, безболезненные, подвижные, мягкоэластичной консистенции. Носовое дыхание свободное. В легких дыхание пузрильное, проводится во все отделы. Хрипов нет. Тоны приглушены, ритмичные. Пальпаторно печень у края реберной дуги, селезенка +1 см от края реберной дуги. Стул без патологических примесей. Мочевыделение свободное, безболезненное. Моча светлая.

По результатам лабораторного обследования была выявлена анемия III степени (гемоглобин 49 г/л, эритроциты $1,53 \times 10^{12}/л$), в мазке периферической крови выявлены единичные микросфероциты. Прямая реакция Кумбса отрицательная. В биохимическом анализе крови зафиксировано повышение концентрации общего билирубина до 46,4 мкмоль/л (норма 21,50 мкмоль/л), прямого билирубина до 9,6 мкмоль/л (норма 4,5 мкмоль/л), активности лактатдегидрогеназы до 599 Ед/л (норма до 480 Ед/л). По данным ультразвукового исследования органов брюшной полости печень и селезенка не увеличены.

Ребенку была проведена заместительная трансфузия эритроцитарной взвеси, что нормализовало содержание гемоглобина, клинические проявления гемолиза были купированы.

На основании данных семейного анамнеза (у бабушки по линии матери в течение всей жизни

наблюдается анемия, в детском возрасте проведена спленэктомия) и лабораторного обследования ребенка выставлен предварительный диагноз: наследственный микросфероцитоз.

В последующие годы у ребенка наблюдались гемолитические кризы 1 раз в 2–3 мес, сохранялась трансфузионная зависимость от донорских эритроцитов.

В 2016 г. в возрасте 1 года 11 месяцев при очередной госпитализации в связи с гемолитическим кризом в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ»: в гемограмме – гемоглобин 75 г/л, эритроциты $2,46 \times 10^{12}$ /л, умеренный макроцитоз, анизоцитоз, ретикулоцитоз 8,6% (норма 0–2%); в биохимическом анализе крови – гипербилирубинемия за счет непрямого фракции 52,6 ммоль/л (норма до 16,5 ммоль/л), повышение активности лактатдегидрогеназы до 2005 Ед/л (норма до 480 Ед/л). Исследование фракций гемоглобина патологии не выявило (гемоглобин А 96,2%; гемоглобин А2 2,4%; гемоглобин F 1,5%), осмотическая резистентность эритроцитов: минимум 0,56, максимум 0,32 (норма: минимум 0,48–0,52, максимум 0,32–0,30), коэффициент связывания эозин-5-малемида эритроцитами – 1 (норма 0,8–1). Результаты обследования позволили усомниться в правильности предварительного диагноза.

В межгоспитальный период мальчик получал курсами фолиевую кислоту, альфа-токоферола ацетат, урсодезоксихолевую кислоту.

Во время очередной госпитализации в стационар (10.03.2019) в связи с гемолитическим кризом выявлено повышение концентрации ферритина сыворотки до 1055,8 мкг/л (норма 30–300 мкг/л), в связи с чем начата хелаторная терапия деферазироксом.

Учитывая, что по результатам проведенного обследования диагноз «наследственный микросфероцитоз» вызывал сомнения, в целях уточнения диагноза пациент был направлен в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России на генетическое обследование методом высокопроизводительного секвенирования (NGS) ДНК с использованием панели «Гемолитические анемии», включающей 75 генов, мутации в которых приводят к развитию гемолитической анемии.

По результатам генетического обследования в гене *PKLR* обнаружено 2 патогенных генетических

варианта: NM_000298: с.1174G>A, р.(Ala392Thr) и с.1456C>T, р.(Arg486Trp), компаунд-гетерозиготное состояние которых подтверждено исследованием ДНК крови обоих родителей.

Исследование активности ПК в эритроцитах ребенка и отца выявило снижение активности: $7,51 \pm 0,08$ МЕ/г Hb и $7,99 \pm 0,17$ МЕ/г Hb соответственно (референсные значения $10,1 \pm 1,17$ МЕ/г Hb).

На основании полученных данных ребенку установлен диагноз: наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия вследствие дефицита ПК.

В дальнейшем планируется динамическое наблюдение за ребенком, контроль клинического анализа крови 1 раз в 4–6 нед с проведением заместительной терапии эритроцитарной взвесью при гемолитических кризах, продолжение хелаторной терапии, профилактики желчнокаменной болезни и приема фолиевой кислоты.

В перспективе возможно применение препарата митапиват (AG-348) после окончания клинических исследований и регистрации его в России.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном случае перед спленэктомией для уточнения диагноза проведен молекулярно-генетический анализ, в результате которого выявлена мутация в гене *PKLR*, приводящая к недостаточности ПК. Это позволило правильно верифицировать диагноз и избежать запланированной спленэктомии, получить возможность консервативного лечения ребенка.

В данном случае проведение спленэктомии не было показано.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Khadzhieva F.R. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9081-5120>

Mushanova S.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4070-3064>

Kekeeva T.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4986-5748>

Lavrentyeva I.N. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2747-695X>

Raykina E.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7634-2053>

Литература

- Zanella A., Fermo E., Bianchi P., Valentini G. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Brit J Haemat* 2005; 130 (1): 11–25. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05527.x
- Grace R.F., Bianchi P., van Beers E.J., Eber S.W., Glader B., Yaish H.M. et al. 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
- Valentine W.N., Tanaka K.R., Miwa S. A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *Trans Assoc Am Physicians* 1961; 74: 100–10.
- Tanaka K.R., Valentine W.N., Miwa S. Pyruvate kinase (PK) deficiency hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 1962; 19: 267–95.
- Tani K., Fujii H., Tsutsumi H., Sukegawa J., Toyoshima K., Yoshida M.C., et al. Human liver type pyruvate kinase: cDNA cloning and chromosomal assignment. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 143 (2): 431–8. DOI: 10.1016/0006-291x(87)91372-6
- Satoh H., Tani K., Yoshida M.C., Sasaki M., Miwa S., Fujii H. The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 132–3. DOI: 10.1159/000132530
- Румянцев А.Г., Токарев Ю.Н., Сметанина Н.С. Гемоглобинопатия и талассемические синдромы. М.: Практическая медицина; 2015. С. 94–104.
- Grace R.F., Zanella A., Neufeld E.J., Holmes Morton D., Eber S., Yaish H., et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am J Hematol* 2015; 90 (9): 825–30. DOI: 10.1002/ajh.24088
- 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
- Bianchi P., Fermo E., Glader B., Kanno H., Agarwal A., Barcellini W., et al. 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
- Viprakasit V., Ekwattanakit S., Rioluang S., Chalaow N., Fisher C., Lower K., et al. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood* 2014; 123 (10): 1586–95. DOI: 10.1182/blood-2013-09-526087
- Tanphaichitr V.S., Suvatte V., Issaragrisil S., Mahasandana C., Veerakul G., Chongkolwatana V., et al. Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26 (6): 689–90. DOI: 10.1038/sj.bmt.1702576
- van Straaten S., Bierings M., Bianchi P., Akiyoshi K., Kanno H., Badell Serra I., et al. Worldwide study of hematopoietic allogeneic stem cell transplantation in pyruvate kinase deficiency. *Haematologica* 2018; 103 (2): e82–6. DOI: 10.3324/haematol.2017.177857
- Rab M.A.E., van Oirschot B.A., Kosinski P.A., Hixon J., Johnson K., Chubukov V., et al. AG-348 (Mitapivat), an allosteric activator of red blood cell pyruvate kinase, increases enzymatic activity, protein stability, and ATP levels over a broad range of PKLR genotypes. *Haematologica* 2020; haematol.2019.238865. DOI: 10.3324/haematol.2019.238865
- Grace R.F., Rose C., Layton D.M., Galacteros F., Barcellini W., Morton H.D., et al. Safety and Efficacy of Mitapivat in Pyruvate Kinase Deficiency. *N Engl J Med* 2019; 381 (10): 933–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1902678