

DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-121-130

Дефицит пируваткиназы и несфероцитарная гемолитическая анемия

Е.А. Бовт^{1,2}, Л.Д. Колева^{1,2}, Е.А. Черняк¹, Д.С. Прудинник¹, Ф.И. Атауллаханов¹⁻⁴,
Н.С. Сметанина¹, Е. И. Синауридзе^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва

⁴ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Московская область, Долгопрудный

Обзор посвящен одному из основных регуляторных ферментов гликолиза в эритроцитах – пируваткиназе, дефицит которого часто является причиной наследственной несфероцитарной гемолитической анемии. Рассмотрены строение и функция пируваткиназы, известные на сегодняшний день мутации гена этого фермента. Авторы провели анализ связи генетических аномалий с нарушением функции фермента и тяжестью клинических проявлений.

Ключевые слова: гемолиз, гликолиз, дефицит фермента, наследственная несфероцитарная анемия, пируваткиназа, эритроцит

Бовт Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2020; 19 (3): 121–130.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-121-130

Pyruvate kinase deficiency and nonspherocytic hemolytic anemia

E.A. Bovt^{1,2}, L.D. Koleva^{1,2}, E.A. Chernyak¹, D.S. Prudinnik¹, F.I. Ataulakhov¹⁻⁴, N.S. Smetanina¹, E.I. Sinauridze^{1,2}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow

³M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

⁴Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Moscow Region, Dolgoprudny

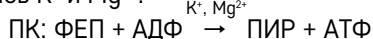
The review is devoted to one of the main regulatory enzymes of glycolysis in erythrocytes – pyruvate kinase, a deficiency of which is often the cause of hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. The article presents data on the structure and function of pyruvate kinase and the currently known mutations of coding this enzyme gene. Authors analyzed associations between various genetic types and impaired enzyme function and the severity of the hemolysis.

Key words: enzyme deficiency, erythrocyte, hemolysis, glycolysis, hereditary nonspherocytic anemia, pyruvate kinase, erythrocyte

Bovt E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2020; 19 (3): 121–130.
DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-3-121-130

Фермент пируваткиназа

Пируваткиназа (ПК; аденозинтрифосфат (АТФ): пируват-2-о-фосфотрансфераза, ЕС 2.7.1.40) – один из основных ферментов гликолиза, который катализирует необратимое превращение фосфоенолпирувата (ФЕП) в пируват (ПИР) с фосфорилированием аденозиндифосфата (АДФ) в АТФ в присутствии ионов K⁺ и Mg²⁺:



Особенно важна эффективность гликолиза в эритроцитах, так как в них он является единственным источником АТФ, обеспечивающим нормальную работу мембранных насосов, а следовательно, сохра-

нение формы, необходимой для функциональной эффективности и выживаемости этих клеток в организме. ПК – один из основных регуляторных ферментов гликолитического пути наряду с гексокиназой и фосфофруктокиназой. Это второй из этапов в гликолизе (рисунк 1), где происходит синтез 50% общего количества АТФ, образующегося в эритроцитах [1].

При сильной недостаточности (дефиците) ПК наблюдается уменьшение эффективности гликолиза, которое приводит к накоплению его промежуточных продуктов и нехватке АТФ, что снижает жизнеспособность эритроцита [2].

© 2020 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России

Поступила 02.12.2019

Принята к печати 28.02.2020

Контактная информация:

Бовт Елизавета Андреевна, лаборант-исследователь лаборатории биофизики ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, аспирантка лаборатории физиологии и биофизики клетки ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ie.bovt.rv@gmail.com

© 2020 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 02.12.2019

Accepted 28.02.2020

Correspondence:

Elizaveta A. Bovt, Junior Researcher of the Laboratory of Biophysics, Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Healthcare of Russian Federation; post-graduate student of the Laboratory of Physiology and Biophysics of the Cell, Center of Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences
Address: Russia, 117997, Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: ie.bovt.rv@gmail.com

У людей существует 2 отдельных гена (*PKLR* и *PKM*), которые кодируют 4 изоформы ПК: PKR, PKL, PKM₁ и PKM₂ (рисунки 2). Гены *PKLR* и *PKM* расположены на хромосомах 1q21 и 15q22 соответственно. Ген *PKLR* кодирует изоформу ПК в эритроцитах (PKR), а также изоформу фермента PKL, которая экспрессируется преимущественно в печени и реже в почках и кишечнике [3]. *PKLR* состоит из 12 экзонов и охватывает 9,5 кб. Экзон 1 специфичен для эритроидной линии, тогда как экзон 2 – для печени [4, 5]. Экспрессия изоформы PKL или PKR в отдельных типах тканей осуществляется тканеспецифичными факторами транскрипции, которые активируются 2 альтернативными промоторами, расположенными в гене *PKLR*. Транскрипт полноразмерной PKR обладает дополнительным экзоном на своем 5'-терминальном конце, кодируя полипептидную цепь из 574 аминокислот. Форма PKL более короткая и состоит из 543 аминокислот (58,4 кДа) [7].

Целый ряд мутаций в гене *PKLR* приводит к дефициту ПК, который может вызывать гемолитическую анемию, связанную либо с понижением экспрессии эритроцитарной изоформы фермента (PKR), либо с нарушением его биохимической функции [8].

Дефицит эритроцитарной ПК, впервые выявленный в начале 1960-х годов [9], является наиболее частым ферментативным нарушением гликолитического пути, вызывающим наследственную несфероцитарную гемолитическую анемию [10]. В общей популяции белого населения заболевание встречается с частотой 1 на 20 000.

В базофильных эритроблестах экспрессируются как PKR-, так и PKM₂-изоформы ПК. Во время дальнейшей дифференцировки и созревания клеток происходит переключение экспрессии изоферментов, в результате чего повышается экспрессия PKR, постепенно заменяющая экспрессию PKM₂ [11]. ПК эритроцитов человека имеет 2 различные изоформы: PKR₁ и PKR₂. PKR₁ преобладает в ретикулоцитах и молодых эритроцитах, тогда как в зрелых эритроцитах в основном находится PKR₂ [12]. PKR₁ является гомотетрамером, состоящим из 4 L'-субъединиц (L'₄). Ограниченная протеолитическая деградация *in vivo* превращает гомотетрамер в гетеротетрамер PKR₂ (L'₂L₂) [13]. Ферментативная активность ПК уменьшается с увеличением возраста эритроцитов.

Ферменты PKM₁ и PKM₂ экспрессируются геном *PKM* (экзон 9 для PKM₁ и экзон 10 для PKM₂) путем альтернативного сплайсинга одной и той же матричной РНК и отличаются только 23 аминокислотами из 531 [14]. Эти 23 аминокислоты, отличающие PKM₁ и PKM₂, сконцентрированы на участке из 56 аминокислот (остатки 378–434) на карбокси-конце белка PKM₂. Из 56 аминокислот 44 принадлежат

C-домену белка PKM₂, который в основном участвует в ассоциации 2 димеров в тетрамерную форму [15]. PKM₁ преобладает в скелетных мышцах, сердце и мозге, а PKM₂ в основном экспрессируется в ранних эмбриональных и пролиферирующих тканях. В ходе развития PKM₂ постепенно заменяется другими тканеспецифичными изоформами (PKM₁, PKR и PKL) [16].

Структура и кинетические свойства пируваткиназы

Сведения о структуре ПК были собраны при исследовании кристаллических структур фермента разных биологических видов (*Leishmania mexicana* [17], *Escherichia coli* I типа [18], дрожжи [16], эритроциты человека [19], мышцы кошки [20] и кролика [21]). Было показано, что структура ПК у разных видов является довольно консервативной. Первичная последовательность изоформы эритроцитов человека в высокой степени гомологична PKM₁-изоформе мышц кошки и ферменту *Escherichia coli* I типа [2, 18, 20].

ПК представляет собой тетрамер с молекулярной массой 240 кДа и 4 одинаковыми субъединицами, каждая из которых состоит из 4 доменов (рисунки 3): небольшого N-концевого спирального домена (остатки 1–84), который отсутствует в бактериальных ПК; домена А (остатки 85–159 и 263–431) с топологией (α/β)₈-бочонка; домена В (остатки 160–262), который вставлен между цепочкой β₃ и спиралью α₃; и домена С (остатки 432–574) с топологией α + β. Домен А является наиболее консервативным, в то время как домены В и С более вариабельны [22].

Эритроцитарная ПК является аллостерически регулируемым ферментом. Активный центр фермента находится между доменами А и В, а аллостерический сайт расположен в кармане домена С в 40 Å от активного центра [23]. Домен В способен вращаться отдельно от домена А, создавая «открытую» или «закрытую» конформацию. Домен С содержит сайт связывания для аллостерического регулятора – фруктозо-1,6-дифосфата [24]. В результате многодоменного строения ПК может существовать в различных конформационных состояниях, что способствует регуляции активности фермента [25].

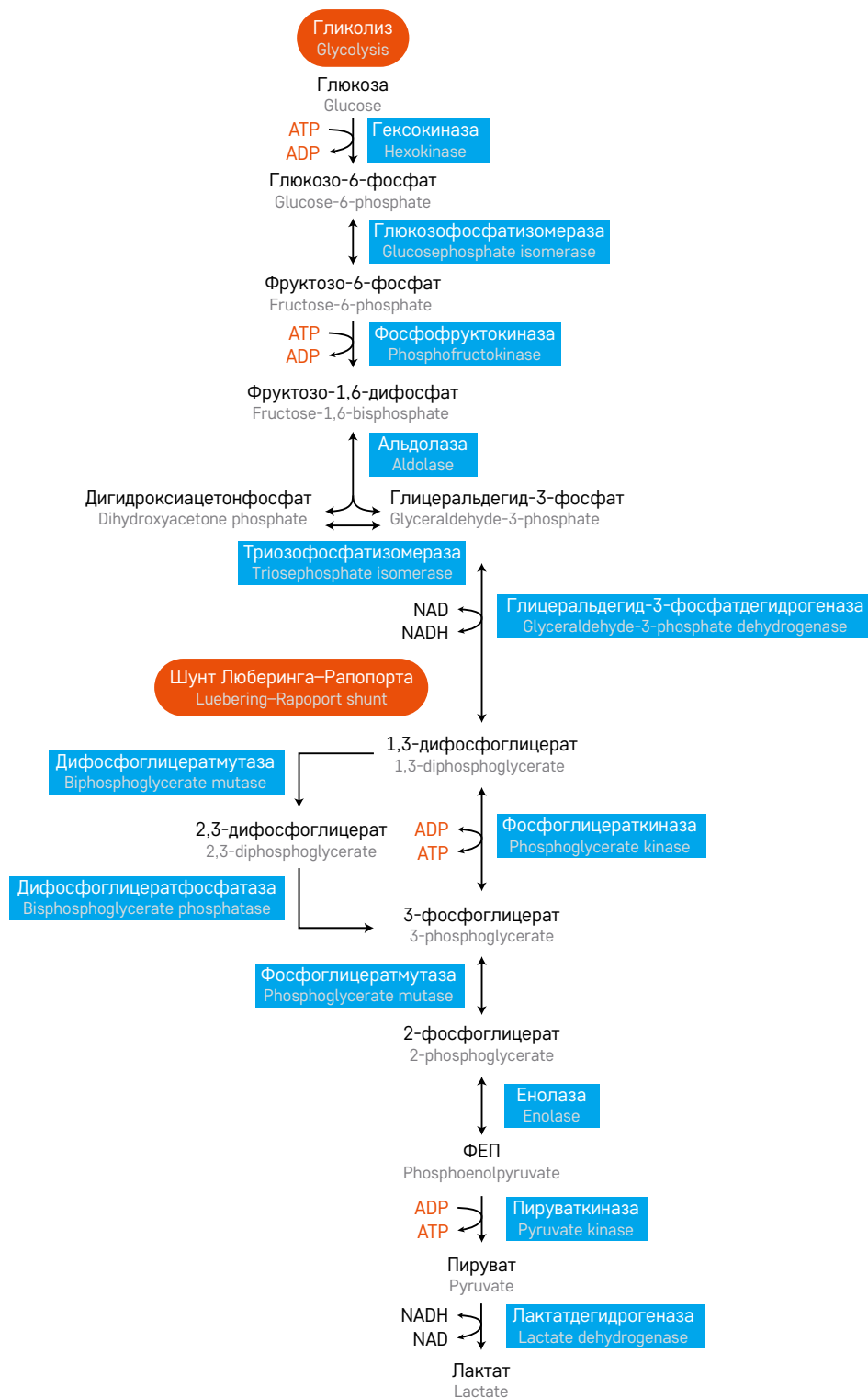
PKR может находиться в 2 конформациях: неактивном T- (tensive, напряженное) и активном R- (resting, расслабленное) состоянии [26–28]. Некоторые детали механизма аллостерической регуляции были выяснены путем сравнения неактивного T-состояния ПК *Escherichia coli* (рисунки 4А) с неаллостерическим мышечным ферментом PKM₁ в активной R-конформации (рисунки 4Б) [18]. При изменении конформации наблюдается комбинация 2 видов движений: вращение доменов В и С (на 17°

Рисунок 1

Схема реакций гликолиза в эритроците человека. Адаптировано из [6]

Figure 1

Glycolysis in human erythrocyte. Adapted from [6]



и 15° соответственно) внутри каждой субъединицы и вращение на 16° каждой субъединицы внутри тетрамера (рисунки 4В) [29]. Исследование показало, что аллостерический переход из низкоаффинного Т-состояния в высокоаффинное R-состояние включает взаимодействия субъединиц А/А' и С/С' и междоменные взаимодействия А/В. Это приводит к изме-

нению конформации фермента и его активного центра, что изменяет сродство фермента к ФЕП [29, 30]. Такое взаимодействие считается ключевым фактором аллостерического ответа.

Для обеспечения специфических метаболических потребностей различных типов клеток каждый изофермент проявляет различные кинетические и

Рисунок 2

Изоформы ПК и их распределение в тканях. Адаптировано из [7]

Figure 2

Pyruvate kinase isoforms and tissue distribution. Adapted from [7]

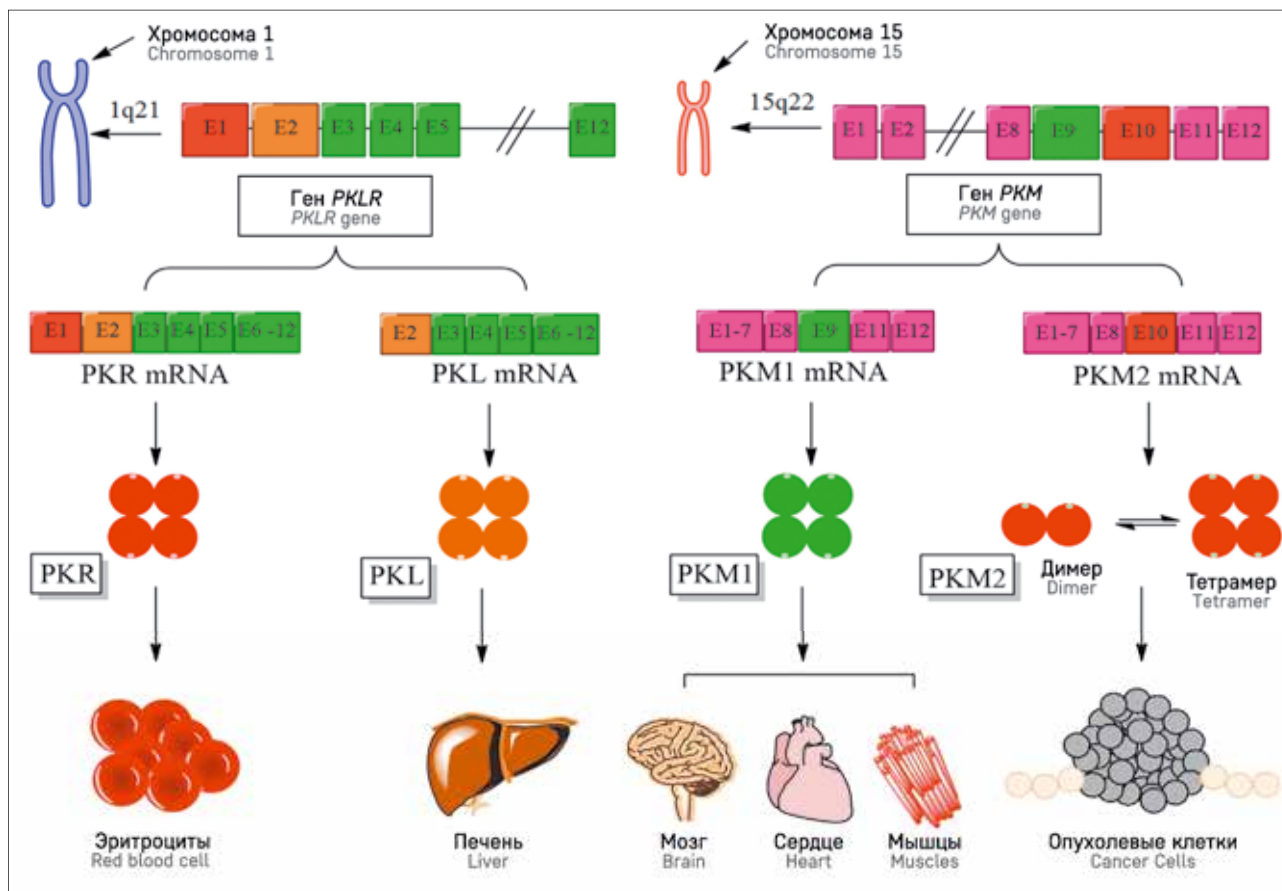
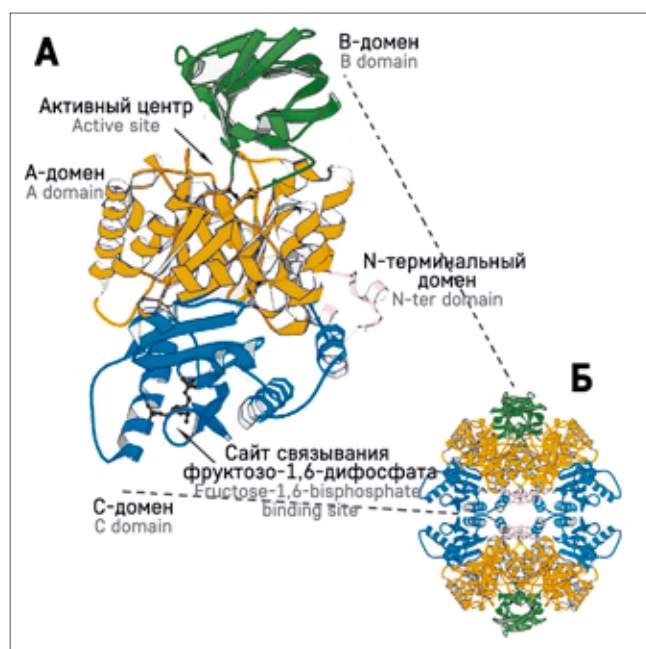


Рисунок 3

Трехмерная кристаллическая структура мономера (А) и тетрамера (Б) эритроцитарной ПК. Адаптировано из [26]

Figure 3

Three-dimensional crystal structure of erythrocyte pyruvate kinase monomer (A) and tetramer (B). Adapted from [26]



регуляторные свойства [11]. В качестве примера в таблице 1 представлены биохимические свойства и молекулярные характеристики изоферментов человеческой ПК [19, 31].

PKM₁ не имеет механизма аллостерической активации и обладает большим сродством к ФЕП, а также имеет гиперболическую кинетику, соответствующую уравнению Михаэлиса–Ментен. Изоферменты PKM₂, PKL и PKR имеют меньшее сродство к ФЕП. Они аллостерически активируются фруктозо-1,6-дифосфатом и ингибируются АТФ и аланином [13, 32]. Аффинность PKM₂ к ФЕП варьирует в зависимости от четвертичной структуры фермента (димер или тетрамер). Исследование кинетических характеристик 2 олигомерных форм PKM₂ показало, что тетрамер PKM₂ обладает высоким сродством к своему субстрату (ФЕП) и является ферментативно активным, тогда как димерная форма PKM₂ имеет очень слабое сродство к ФЕП и не обладает ферментативной активностью в физиологических условиях [33].

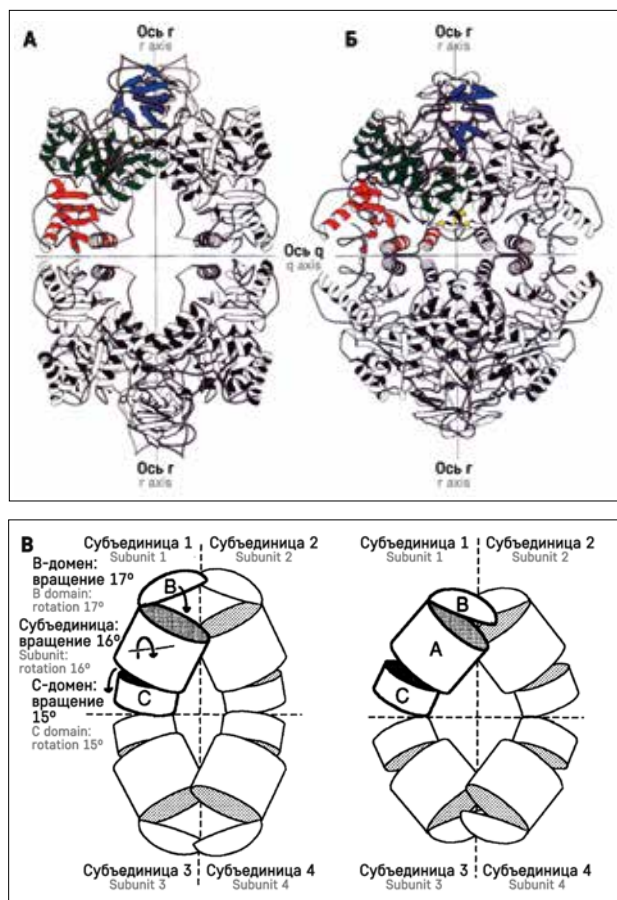
Фруктозо-1,6-дифосфат, который является аллостерическим активатором ПК, может сильно изменять сродство фермента к его субстрату ФЕП. Если сравнить кинетические параметры активной ПК

Рисунок 4

Структура ПК в различных состояниях: А – тетрамерная ПК из *Escherichia coli* в неактивном Т-состоянии; Б – структура РКМ₁ кролика в активном R-состоянии; В – схематическое представление вращения доменов и субъединиц, происходящего при переходе ПК из Т- в R-состояние; Т-состояние представлено слева [18, 29]

Figure 4

Structure of pyruvate kinase in different states: А – tetrameric *E. coli* pyruvate kinase in the inactive T-state; Б – structure of the rabbit PKM₁ in the active R-state; В – schematic representation of the domain and subunit rotations occurring on the T- to R-state PK transition. The T-state structure is on the left [18, 29]



Leishmania mexicana в R-конформации [34] с неактивной ПК *Escherichia coli* в Т-состоянии [35], то константа Михаэлиса (K_m) для ФЕП в R-состоянии ПК *Leishmania mexicana* составляет 1,44 мМ, а с фруктозо-1,6-дифосфатом – 0,84 мМ, тогда как K_m для ФЕП неактивной Т-формы ПК *Escherichia coli* равна 5,12 мМ, а при активации фруктозо-1,6-дифосфата – 0,087 мМ.

Дефицит пируваткиназы

Первый случай дефицита ПК был зарегистрирован в 1961 г. [9]. В 1991 г. были описаны первые 2 точечные мутации, вызывающие дефицит ПК [36, 37]. Благодаря клонированию комплементарной ДНК человека стало возможным анализировать мутации ПК непосредственно на уровне ДНК [38]. С тех пор

Таблица 1

Характеристика изоферментов ПК человека*

Table 1

Properties of human pyruvate kinase isoforms*

| Свойство Property | Изоферменты ПК Pyruvate kinase isoforms | | | |
|--|--|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | PKR | PKL | PKM ₁ | PKM ₂ |
| Молекулярная масса, кДа Molecular weight, kDa | 61,8 | 58,4 | 58 | 58 |
| Количество аминокислот Number of aminoacids | 574 | 543 | 531 | 531 |
| $S_{0,5}$ или K_m для ФЕП, мМ $S_{0,5}$ or K_m for phosphoenolpyruvate, mM | 1,1 ($S_{0,5}$) | 0,1–0,8 ($S_{0,5}$) | 0,05 (K_m) | 1,7 ($S_{0,5}$) |
| $S_{0,5}$ или K_m для АДФ, мМ $S_{0,5}$ or K_m for adenosine diphosphate, mM | 0,17 ($S_{0,5}$) | 0,18 ($S_{0,5}$) | Нет данных No data | Нет данных No data |
| $S_{0,5}$ или K_m для фруктозо-1,6-дифосфата, мМ $S_{0,5}$ or K_m for fructose-1,6-bisphosphate, mM | 0,18 ($S_{0,5}$) | 0,1 ($S_{0,5}$) | 0,05 (K_m) | 0,55 ($S_{0,5}$) |
| Ген Gene | PKLR | | PKM | |

Примечание. * – для реакций, подчиняющихся уравнению Михаэлиса–Ментен, представлены величины K_m , а для аллостерических реакций, описываемых кривыми сигмоидальной формы, приведены величины $S_{0,5}$, не являющиеся K_m в обычном смысле. Обе величины характеризуют концентрацию субстрата, при которой достигается полумаксимальная скорость реакции.
Note. * – Michaelis constant (K_m) and $S_{0,5}$ are presented for enzymes with Michaelis–Menten mechanism and enzymes with allosteric regulation respectively.

было исследовано множество пациентов с дефицитом ПК и в литературе описано более 256 мутаций [39], которые влияют на каталитическую активность PKR, ее стабильность [40] или экспрессию белка [2]. Чаще всего сообщается о миссенс-мутациях – точечных мутациях, при которых одна-единственная аминокислота заменяется другой (70% общего числа мутаций), сплайсинговых мутациях, при которых изменяются сайты сплайсинга в интронных областях гена, что приводит либо к делеции смежного с мутацией экзона, либо, наоборот, к тому, что соответствующий интрон в ходе процессинга первичного РНК-транскрипта остается невырезанным (13%), и нонсенс-мутациях, т.е. точечных мутациях в последовательности ДНК, приводящих к возникновению стоп-кодона, который препятствует дальнейшему синтезу белка (15%). Другие виды мутаций, такие как небольшие делеции, вставки и мутации сдвига рамки считывания являются редкими [41–43]. Наиболее распространенными миссенс-мутациями являются: 1529G>A в США и Европе, 1456C>T в Южной Европе и 1468C>T в Азии. Другие мутации, в частности 721G>T и 994G>A, присутствуют у европейцев с меньшей частотой [26, 44]. В отдельных сообществах отмечена более высокая распространенность заболевания, связанная с мутацией 1436G>A (особенно в сообществе амишей в Пенсильвании) [45] и с делецией 1149bp, приводящей к потере экзона 11 (в сообществах цыган) [46].

Врожденная гемолитическая анемия, связанная с дефицитом PKR, передается как аутомомно-рецессивный признак, и клинические симптомы обычно возникают только у гомозиготных и сложных гетерозиготных пациентов с 2 различными мутантными аллелями [47]. Степень тяжести анемии сильно

варьирует: от очень легких или полностью компенсированных форм до угрожающей жизни неонатальной анемии, требующей переливания эритроцитов, и даже до внутриутробной смерти или смерти через несколько дней после рождения. Известно, что у некоторых пациентов может наблюдаться нормальная или даже повышенная активность ПК, что может быть связано с контаминацией нормальными донорскими эритроцитами после недавнего переливания, повышенным содержанием ретикулоцитов, в которых активность фермента выше, неполным удалением лейкоцитов или вкладом компенсаторной изоформы PKM₂ в молодых эритроцитах [48]. На данный момент не существует полностью стандартизированной методики измерения активности эритроцитарной ПК. Измеряемая активность может зависеть как от использованных реактивов, так и от применяемых для исследования приборов. Вследствие этого значения нормальных величин активности ПК, измеряемой в эритроцитах доноров, достаточно сильно варьируют в различных лабораториях, поэтому каждая клиника обычно самостоятельно определяет величины нормальных значений активности этого фермента. В целом нормальное значение составляет от 6,7 до 15 Ед/гНб [2, 43, 49–55].

При исследовании активности ПК у пациентов с ее дефицитом установлено, что нет прямой зависимости тяжести анемии и степени гемолиза от

активности ПК [27]. У одной части пациентов незначительное снижение активности ПК приводит к тяжелой врожденной гемолитической анемии, тогда как у других (с сильно сниженной активностью фермента) наблюдается лишь легкая степень анемии [26]. Таким образом, возникает вопрос: является ли наблюдаемый дефицит ПК первичной причиной анемии? Чтобы разобраться, что же является причиной гемолиза при дефиците ПК, необходимо исследовать, какие изменения происходят в эритроците помимо снижения активности ПК и как степень гемолиза зависит от стабильности фермента.

Связь между молекулярным дефектом пируваткиназы и тяжестью заболевания

В разных работах были исследованы рекомбинантные формы ПК с самыми распространенными мутациями. Эти исследования позволяют установить связь между клиническими симптомами у пациентов с дефицитом ПК и молекулярными свойствами мутантных ферментов. Характеристика мутантных белков показывает, что аминокислотные замены в домене А или С влияют, хотя и в разной степени, на стабильность (мутации 994G>A, 1091G>A, 1529G>A и 1594C>T), каталитическую активность (мутации 994G>A, 1091G>A, 1151C>T, 1168G>A, 1456C>T) и регуляторные свойства (мутации 1529G>A и 1594C>T) ПК (таблица 2) [19, 24, 28]. Кроме того,

Таблица 2

Степень тяжести гемолитической анемии и изменение стабильности и кинетических параметров ПК для некоторых известных мутаций фермента [19, 24, 28]

Table 2

Severity of hemolytic anemia, enzyme stability and kinetic parameters of different pyruvate kinase forms [19, 24, 28]

| Фермент Enzyme | Мутация Mutation | Стабильность фермента*, % Enzyme stability*, % | Степень тяжести анемии Severity of anemia | K _m для ФЭП, мМ K _m for phosphoenolpyruvate, mM | kcat, с ⁻¹ kcat, s ⁻¹ | K _m для АДФ, мМ K _m for adenosine diphosphate, mM | После активации фруктозо-1,6-дифосфата (1 мМ) Activated by fructose-1,6-bisphosphate (1 mM) | |
|---------------------------|---------------------|---|--|--|--|--|--|--|
| | | | | | | | K _m для ФЭП, мМ K _m for phosphoenolpyruvate, mM | kcat, с ⁻¹ kcat, s ⁻¹ |
| Нативная PKR Wild-type | — | 85 | | 1,1 | 355 | 0,17 | 0,18 | 355 |
| G332S | 994G>A | 20 | Тяжелая Severe | 3,79 | 137 | 0,49 | 0,38 | 152 |
| G364D | 1091G>A | 0 | Тяжелая Severe | 0,93 | 104 | 0,16 | 0,75 | 118 |
| T384M | 1151C>T | 70 | Средняя Moderate | 1,24 | 149 | 0,15 | 0,36 | 172 |
| D390N | 1168G>A | 90 | Тяжелая Severe | 1,4 | 0,48 | 0,25 | 0,34 | 0,55 |
| R479H | 1436G>A | 90 | Тяжелая Severe | 1,1 | 390 | 0,2 | 0,08 | 386 |
| R486W | 1456C>T | 95 | Легкая Mild | 1,69 | 195 | 0,24 | 0,4 | 203 |
| R532W | 1594C>T | 30 | Тяжелая Severe | 0,63 | 183 | 0,2 | 0,66 | 187 |
| R510Q | 1529G>A | 5 | Средне-тяжелая Severe/moderate | 1,6 | 340 | 0,24 | 0,31 | 304 |

Примечание. * – остаточная активность фермента (%) после 30 мин инкубации при 53°C, pH 6,5.
Note. * – residual enzyme activity (%) after 30 minutes of incubation 53°C, pH 6,5.

иногда мутация приводит к пониженной экспрессии фермента.

Мутации домена А

Мутация 994G>A в гидрофобном ядре домена А влияет на остаток, который попадает в очень консервативную область активного центра. Фермент демонстрирует существенное снижение каталитической эффективности. Эта мутация приводит к нестабильности фермента и очень тяжелой гемолитической анемии [44, 56].

Мутация 1091G>A приводит к серьезной нестабильности белка, что объясняет тяжелую анемию у пациентов с этим дефицитом ПК. У мутантного фермента активность в 3 раза ниже, чем у нормального [19].

Мутация 1456C>T является одной из самых распространенных. Ее характеристика показывает, что такая замена аминокислоты приводит к небольшому влиянию на молекулярные свойства. Arg486, замещенный на Trp, находится на расстоянии 20 Å от каталитического центра [19]. Эффект «дальнего действия» мутации может отражать измененные динамические свойства. Известно, что домен В принимает разные конформации в зависимости от связывания лиганда. Введение ароматического кольца Trp может ограничивать общую способность фермента претерпевать конформационные изменения, происходящие во время катализа, нарушая тем самым кинетику реакции [57]. Стабильность такой ПК даже выше, чем у нормального белка, а аллостерические свойства практически не изменены (таблица 2). Единственное существенное изменение заключается в снижении каталитической эффективности, которая падает до 30% от значения, измеренного для нормальной ПК дикого типа [26].

Мутации, изменяющие междоменное взаимодействие субъединиц А/А'

Мутация 1168G>A не затрагивает стабильность фермента, однако приводит к практически полной его инактивации и тяжелой степени анемии. На основе сравнения структур ПК *Escherichia coli* в Т-состоянии и изоформы PKM₁ было установлено, что Asp390 является крайне важным для аллостерического перехода из-за сочетания изменений в четвертичной структуре с изменениями в геометрии активного центра [18, 19].

Мутация 1151C>T приводит к аминокислотной замене Thr384Met. Thr384 лежит очень близко к двойной оси А/А'. Основное отличие между мутантным (Thr384Met) и нативным белком заключается в 2-кратном снижении k_{cat} (таблица 2). Мутация не изменяет параметры термостабильности. Thr384 не является частью сайтов связывания для ФЕП и АДФ, а кристаллическая структура белка показывает,

что мутация не влияет на геометрию активного сайта [19]. Примечательно, что степень тяжести анемии у гомозигот с данной мутацией варьирует от легкой до тяжелой, подразумевая, что даже умеренные изменения каталитической силы фермента могут приводить к патологическим эффектам [2, 36, 37].

Мутации в аллостерическом центре

1594C>T, 1436G>A и 1529G>A представляют собой мутации в аллостерическом центре связывания. У пациентов с мутацией 1594C>T наблюдается тяжелая степень анемии [58]. Молекулярный анализ белка указывает на пониженную стабильность ПК и полную потерю чувствительности фермента к фруктозо-1,6-дифосфату (таблица 2) [19].

Мутация 1436G>A обнаружена у пациентов, страдающих тяжелой анемией [45]. Данная мутация практически не влияет на кинетику фермента и его стабильность, однако уровень транскрипции гена *PKLR* существенно снижен [59].

Мутация 1529G>A в гомозиготном состоянии приводит к очень низкой остаточной активности ПК (10–25% от нормы), связанной с тяжелой и умеренной гемолитической анемией [2]. Рекомбинантный мутантный белок демонстрирует по отношению к ФЕП и АДФ кинетическое поведение, очень похожее на поведение нативного фермента [28]. Мутация приводит к высокой нестабильности фермента и повышенной восприимчивости к ингибированию АТФ. Таким образом, дефицит ПК, связанный с мутацией 1529G>A, по-видимому, является главным образом результатом пониженного внутриклеточного уровня ПК.

Дальнейшие исследования характеристик мутантных форм PKR могут оказаться ценным инструментом для прогнозирования и корректировки терапии гемолитических анемий, связанных с дефицитом ПК.

Диагностика дефицита пируваткиназы

Диагноз дефицита ПК основывается на наличии клинических признаков и симптомов, лабораторных маркеров хронической гемолитической анемии, сниженной ферментативной активности ПК и обнаружении сложных гетерозиготных и гомозиготных мутаций в гене *PKLR* [60].

Симптомы дефицита пируваткиназы у новорожденных

Осложнения, связанные с дефицитом ПК, нередко наблюдаются у детей еще на стадии внутриутробного развития. Они могут включать задержку внутриутробного развития, отек плода и недоношенность [61]. У новорожденных часто наблюдается желтушность (60–90%), а раннее течение заболевания может осложняться тяжелой непрямой гипербилирубинемией.

мией и значительным гемолизом, требующим переливания крови. Однако не у всех новорожденных появляется желтуха, иногда наблюдается только легкая анемия. Редко при рождении может присутствовать геморрагическая сыпь по типу «черничного кекса», свидетельствующая об экстрамедуллярном (внекостномозговом) кроветворении главным образом в печени и селезенке.

Симптомы дефицита пируваткиназы у детей и взрослых

Наиболее частые симптомы дефицита ПК связаны с анемией (90–95% случаев; от легкой до требующей трансфузии), спленомегалией (80–85%; с различной степенью увеличения селезенки), желтухой (40–70%) и желчными камнями (30–45%). Менее распространенные проявления включают апластический криз (2–14%), деформации костей (9%), экстрамедуллярный эритропоэз (9%), отсроченное половое созревание (8%), гиперпигментацию (6%), язвы ног и легочную гипертензию (2–3%) [2, 27, 61, 62]. Гемолиз обычно усугубляется острыми инфекциями, стрессом и беременностью. У многих пациентов с дефицитом ПК наблюдается усталость и недостаток сил, связанные с анемией, что отрицательно сказывается на их повседневной жизни [63].

Морфология эритроцитов варьирует от нормы до проявления некоторой степени анизоцитоза (увеличение ширины распределения эритроцитов по размеру), пойкилоцитоза (изменение формы части эритроцитов) и полихромазии (появление в периферической крови полихроматофилов – молодых эритроцитов, одинаково хорошо окрашивающихся как кислыми, так и основными красителями, это может быть вызвано ускоренным выходом эритроцитов из костного мозга, связанным с их регенерацией). Иногда наблюдается различная доля эхиноцитов (5–20%), особенно после спленэктомии [27]. Концентрация гемоглобина у таких пациентов обычно низкая (колеблется от 65 до 110 г/л), но чаще всего после спленэктомии она повышается примерно на 15 г/л. Ретикулоциты обычно бывают повышены с 4 до 11% и значительно увеличиваются после спленэктомии (до 20–70%) [63]. Медиана непрямого гипербилирубинемии составляет около 60 мкмоль/л, а более высокие значения почти всегда подразумевают сосуществующий синдром Жильбера, сопровождающийся снижением захвата билирубина гепатоцитами. Уровень ферритина часто повышен. Около половины пациентов имеют уровень ферритина более 1000 мкг/л [61]. Перегрузка железом является распространенным осложнением дефицита ПК [60]. Для его терапии проводят хелатную терапию, заключающуюся во введении препаратов, связывающих и выводящих из организма ионы железа [26].

Терапия анемии, связанной с дефицитом пируваткиназы

Разнообразные экспериментальные методы лечения дефицита ПК находятся на стадии разработки и клинических испытаний, включая генную терапию [64, 65] и единственный существующий лекарственный препарат – аллостерический активатор ПК – AG-348 [66]. Тем не менее на сегодняшний день не существует хорошего терапевтического решения (за исключением трансплантации костного мозга), которое восстанавливало бы функцию ПК, снижало гемолиз эритроцитов и обеспечивало нормальный уровень гемоглобина и ретикулоцитов [67]. Нынешний стандарт лечения дефицита ПК, включающий переливание крови, спленэктомию, фототерапию (снижающую уровень билирубина в крови при облучении ее видимым светом, что приводит к образованию водорастворимых комплексов билирубина, которые могут выводиться, не откладываясь в печени) и хелатную терапию для устранения перегрузки железом, является поддерживающим [60].

Таким образом, разработка новых терапевтических стратегий для лечения состояния анемии, связанной с дефицитом ПК, является актуальной задачей медицинской науки. Для решения этой задачи необходимо в первую очередь понять, как различные дефекты ПК связаны со степенью гемолиза эритроцитов и тяжестью состояния анемии. Пока эта связь до конца неясна. Работы в этом направлении продолжают во всем мире, при этом основным должно быть установление связи между определенными видами генетических мутаций фермента и его активностью в клетке.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Фундаментальная и клиническая фармакология злокачественных новообразований и незлокачественных болезней крови и иммунной системы у детей» (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России) и при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № АААА-А18-118012390247-0) (ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН), а также поддержана грантом Президиума РАН по программе фундаментальных исследований «Фундаментальные основы технологии физиологических адаптаций» и грантами ФГБУ «Российский фонд фундаментальных исследований» для аспирантов второго года № 19-34-90035 (для Колевой Л.Д.) и № 19-34-90036 (для Бовт Е.А.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Koleva L.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8803-5694>

Bovt E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4724-8647>

Cherniak E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3852-9634>

Prudinnik D.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5995-7702>

Ataullakhanov F.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3403-181X>

Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Sinauridze E.I. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5948-3444>

Литература

- Valentine W.N. Hereditary hemolytic anemias associated with specific erythrocyte enzymopathies. *Calif Med* 1968; 108 (4): 280–94.
- Zanella A., Bianchi P. Red cell pyruvate kinase deficiency: From genetics to clinical manifestations. *Best Pract Res Clin Haematol* 2000; 13 (1): 57–81. DOI: 10.1053/beha.1999.0057
- Yamada K., Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* 1999; 337 (1): 1–11.
- Tani K., Fujii H., Nagata S., Miwa S. Human liver type pyruvate kinase: Complete amino acid sequence and the expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85 (6): 1792–5. DOI: 10.1073/pnas.85.6.1792
- Lenzner C., Nürnberg P., Jacobasch G., Thiele B.J. Complete genomic sequence of the human PK-L/R-gene includes four intragenic polymorphisms defining different haplotype backgrounds of normal and mutant PK-genes. *Mitochondrial DNA* 1997; 8 (1–2): 45–53. DOI: 10.3109/10425179709020884
- Van Wijk R., Van Solinge W.W. The energy-less red blood cell is lost: Erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005; 106 (13): 4034–42. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1622
- Prakasam G., Bamezai R.N.K. Pyruvate Kinase. In: *Encyclopedia of Cancer (Reference Module in Biomedical Sciences)*, 3rd ed. Vol. 3, Elsevier; 2019. P. 311–20. DOI: 10.1016/b978-0-12-801238-3.64999-1. [Электронный ресурс]. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64999-1> [Дата обращения 25.11.2019].
- Meza N.W., Alonso-Ferrero M.E., Navarro S., Quintana-Bustamante O., Valeri A., Garcia-Gomez M., et al. Rescue of pyruvate kinase deficiency in mice by gene therapy using the human isoenzyme. *Mol Ther* 2009; 17 (12): 2000–9. DOI: 10.1038/mt.2009.200
- 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.
- Beutler E., Gelbart T. Estimating the prevalence of pyruvate kinase deficiency from the gene frequency in the general white population. *Blood* 2000; 95 (11): 3585–8.
- Max-Audit I., Testa U., Kechemir D., Titeux M., Vainchenker W., Rosa R. Pattern of pyruvate kinase isozymes in erythroleukemia cell lines and in normal human erythroblasts. *Blood* 1984; 64 (4): 930–6.
- Nakashima K. Further evidence of molecular alteration and aberration of erythrocyte pyruvate kinase. *Clin Chim Acta* 1974; 55 (2): 245–54.
- Kahn A., Marie J. Pyruvate kinases from human erythrocytes and liver. *Methods Enzymol* 1982; 90 (Pt. E): 131–40. DOI: 10.1016/s0076-6879(82)90119-7
- Noguchi T., Inoue H., Tanaka T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 1986; 261 (29): 13807–12.
- Dombrackas J.D., Santarsiero B.D., Mesecar A.D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis. *Biochemistry* 2005; 44 (27): 9417–29.
- Jurica M.S., Mesecar A., Heath P.J., Shi W., Nowak T., Stoddard B.L. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 1998; 6 (2): 195–210.
- Rigden D.J., Phillips S.E.V., Michels P.A.M., Fothergill-Gilmore L.A. The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *J Mol Biol* 1999; 291 (3): 615–35.
- Mattevi A., Valentini G., Rizzi M., Speranza M.L., Bolognesi M., Coda A. Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition. *Structure* 1995; 3 (7): 729–41.
- Valentini G., Chiarelli L.R., Fortin R., Dolzan M., Galizzi A., Abraham D.J., et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. *J Biol Chem* 2002; 277 (26): 23807–14.
- Allen S.C., Muirhead H. Refined three-dimensional structure of cat-muscle (M1) pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 1996; 52 (3): 499–504.
- Larsen T.M., Laughlin L.T., Holden H.M., Rayment I., Reed G.H. Structure of rabbit muscle pyruvate kinase complexed with Mn^{2+} , K^+ , and pyruvate. *Biochemistry* 1994; 33 (20): 6301–9.
- Munoz M.E., Ponce E. Pyruvate kinase: current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003; 135 (2): 197–218.
- Fothergill-Gilmore L.A., Michels P.A.M. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* 1993; 59 (2): 105–235.
- Valentini G., Chiarelli L., Fortini R., Speranza M.L., Galizzi A., Mattevi A. The allosteric regulation of pyruvate kinase: A site-directed mutagenesis study. *J Biol Chem* 2000; 275 (24): 18145–52.
- Van Berkel T.J.C., Staal G.E.J., Koster J.F., Nyessen J.G., van Milligen-Boersma L. On the molecular basis of pyruvate kinase deficiency II. Role of thiol groups in pyruvate kinase from pyruvate kinase-deficient patients. *Biochim Biophys Acta - Enzymol* 1974; 334 (2): 361–7.
- Zanella A., Fermo E., Bianchi P., Chiarelli L.R., Valentini G. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007; 21 (4): 217–31.
- 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.
- Wang C., Chiarelli L.R., Bianchi P., Abraham D.J., Galizzi A., Zanella A.M.A., et al. Human erythrocyte pyruvate kinase: Characterization of the recombinant enzyme and a mutant form (R510Q) causing nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 2001; 98 (10): 3113–20.
- Mattevi A., Bolognesi M., Valentini G. The allosteric regulation of pyruvate kinase. *FEBS Lett* 1996; 389 (1): 15–9.
- Wooll J.O., Friesen R.H.E., White M.A., Watowich S.J., Fox R.O., Lee J.C., et al. Structural and functional linkages between subunit interfaces in mammalian pyruvate kinase. *J Mol Biol* 2001; 312 (3): 525–40.
- Daębrowska A., Pietkiewicz J., Daębrowska K., Czapińska E., Danielewicz R. Interaction of M1 and M2 isozymes pyruvate kinase from human tissues with phospholipids. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* 1998; 1383 (1): 123–9.
- Ikeda Y., Noguchi T. Allosteric regulation of pyruvate kinase M2 isozyme involves a cysteine residue in the intersubunit contact. *J Biol Chem* 1998; 273 (20): 12227–33.
- Luo W., Semenza G.L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23 (11): 560–6.
- Ernest I., Callens M., Oppendoes F.R., Michels P.A.M. Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana* Cloning and analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 64 (1): 43–54.
- Valentini G., Speranza M.L., Iadorola P., Ferri G., Malcovati M. Reactivity of the fructose 1,6-bisphosphate-activated pyruvate kinase from *Escherichia coli* with pyridoxal 5'-phosphate. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1988; 369 (11): 1219–26.
- Kanno H., Fujii H., Hirono A., Miwa S. cDNA cloning of human R-type pyruvate kinase and identification of a single

- amino acid substitution (Thr384----Met) affecting enzymatic stability in a pyruvate kinase variant (PK Tokyo) associated with hereditary hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 (18): 8218–21.
37. Neubauer B., Lakomek M., Winkler H., Parke M., Hofferbert S., Schröter W. Point mutations in the L-type pyruvate kinase gene of two children with hemolytic anemia caused by pyruvate kinase deficiency. *Blood* 1991; 77 (9): 1871–5.
 38. Manco L., Ribeiro M.L., Almeida H., Freitas O., Abade A., Tamagnini G. PK-LR gene mutations in pyruvate kinase deficient Portuguese patients. *Br J Haematol* 1999; 105 (3): 591–5.
 39. 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 (March); 57: 100–9.
 40. Martinov M.V., Plotnikov A.G., Vitvitsky V.M., Ataullakhanov F.I. Deficiencies of glycolytic enzymes as a possible cause of hemolytic anemia. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2000; 1474 (1): 75–87.
 41. Van Wijk R., Van Solinge W.W., Nerlov C., Beutler E., Gelbart T., Rijksen G., et al. Disruption of a novel regulatory element in the erythroid-specific promoter of the human PKLR gene causes severe pyruvate kinase deficiency. *Blood* 2003; 101 (4): 1596–602.
 42. Lenzner C., Nürnberg P., Jacobasch G., Gerth C., Thiele B.J. Molecular analysis of 29 pyruvate kinase-deficient patients from central Europe with hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1997; 89 (5): 1793–9.
 43. Zarza R., Alvarez R., Pujades A., Nomdedeu B., Carrera A., Estella J., et al. Molecular characterization of the PK-LR gene in pyruvate kinase deficient Spanish patients. Red Cell Pathology Group of the Spanish Society of Haematology (AEHH). *Br J Haematol* 1998; 103 (2): 377–82.
 44. Lenzner C., Nürnberg P., Thiele B.J., Reis A., Brabec V., Sakalova A., et al. Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1994; 83 (10): 2817–22.
 45. Kanno H., Ballas S.K., Miwa S., Fujii H., Bowman H.S. Molecular abnormality of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in the Amish. *Blood* 1994; 83 (8): 2311–6.
 46. Baronciani L., Beutler E. Molecular study of pyruvate kinase deficient patients with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1995; 95 (4): 1702–9.
 47. Miwa S., Fujii H. Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: Tabulation of mutant enzymes. *Am J Hematol* 1996; 51 (2): 122–32.
 48. Miwa S., Kanno H., Fujii H. Pyruvate kinase deficiency: Historical perspective and recent progress of molecular genetics. *Am J Hematol* 1993; 42 (1): 31–5.
 49. Baronciani L., Beutler E. Analysis of pyruvate kinase-deficiency mutations that produce nonspherocytic hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90 (9): 4324–7.
 50. Kedar P., Hamada T., Warang P., Nadkarni A., Shimizu K., Fujii H., et al. Spectrum of novel mutations in the human PKLR gene in pyruvate kinase-deficient Indian patients with heterogeneous clinical phenotypes. *Clin Genet* 2009; 75 (2): 157–62.
 51. Kugler W., Willaschek C., Holtz C., Ohlenbusch A., Laspe P., Krügener R., et al. Eight novel mutations and consequences on mRNA and protein level in pyruvate kinase-deficient patients with nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Mutat* 2000; 15 (3): 261–72.
 52. Pissard S., Max-Audit I., Skopinski L., Vasson A., Vivien P., Bimet C., et al. Pyruvate kinase deficiency in France: A 3-year study reveals 27 new mutations. *Br J Haematol* 2006; 133 (6): 683–9.
 53. 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 (in Spanish, abstract in English). DOI: 10.1016/j.medcli.2016.10.004.
 54. Mojzíkova R., Koralkova P., Holub D., Zidova Z., Pospisilova D., Cermak J., et al. Iron status in patients with pyruvate kinase deficiency: Neonatal hyperferritinaemia associated with a novel frameshift deletion in the PKLR gene (p.Arg518fs), and low hepcidin to ferritin ratios. *Br J Haematol* 2014; 165 (4): 556–63.
 55. Castro O., Kato G.J. Iron restriction in sickle cell anemia: Time for controlled clinical studies. *Am J Hematol* 2015; 90 (12): E217.
 56. Zanella A., Bianchi P., Baronciani L., Zappa M., Bredi E., Vercellati C., et al. Molecular characterization of PK-LR gene in pyruvate kinase-deficient Italian patients. *Blood* 1997; 89 (10): 3847–52.
 57. Larsen T.M., Benning M.M., Raymond I., Reed G.H. Structure of the bis(Mg²⁺)-ATP-oxalate complex of the rabbit muscle pyruvate kinase at 2.1 Å resolution: ATP binding over a barrel. *Biochemistry* 1998; 37 (18): 6247–55.
 58. Lakomek M., Huppke P., Neubauer B., Pekrun A., Winkler H., Schröter W. Mutations in the R-type pyruvate kinase gene and altered enzyme kinetic properties in patients with hemolytic anemia due to pyruvate kinase deficiency. *Ann Hematol* 1994; 69 (5): 253–60.
 59. Wijk R., van Wesel A.C.W., Thomas A.A.M., Rijksen G., van Solinge W.W. Ex vivo analysis of aberrant splicing induced by two donor site mutations in PKLR of a patient with severe pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol* 2004; 125 (2): 253–63.
 60. Grace R.F., Layton D.M., Barcellini W. How we manage patients with pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol* 2019; 184 (5): 721–34.
 61. 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.
 62. Grace R.F., Zanella A., Neufeld E.J., Mor-ton D.H., Eber S., Yaish H., et al. Erythrocyte pyruvate kinase deficiency: 2015 status report. *Am J Hematol* 2015; 90 (9): 825–30.
 63. Grace R.F., Cohen J., Egan S., Wells T., Witherspoon B., Ryan A., et al. 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.
 64. Garate Z., Quintana-Bustamante O., Crane A.M., Olivier E., Poirot L., Galetto R., et al. 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.
 65. Garcia-Gomez M., Calabria A., Garcia-Bravo M., Benedicenti F., Kosinski P., Lopez-Manzaneda S., et al. Safe and efficient gene therapy for pyruvate kinase deficiency. *Mol Ther* 2016; 24 (7): 1187–98.
 66. Kung C., Hixon J., Kosinski P.A., Cianchetta G., Histen G., Chen Y., et al. AG-348 enhances pyruvate kinase activity in red blood cells from patients with pyruvate kinase deficiency. *Blood* 2017; 130 (11): 1347–56.
 67. 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.