

© 2021 ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 29.01.2021
Принята к печати 25.02.2021

DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-84-96

Несфероцитарная гемолитическая анемия, вызванная дефицитом пируваткиназы эритроцитов: анализ генных нарушений пациентов детского возраста в Российской Федерации

Е.А. Черняк¹, Н.Е. Соколова², К.В. Семиглазова¹, И.Н. Лаврентьева³, Е.К. Донюш⁴, О.И. Плаксина⁵, М.В. Борисова⁶, Н.А. Данилюк⁷, Е.С. Митрофанова⁸, И.П. Батурская⁹, Н.Г. Ревина¹⁰, Т.И. Бурлуцкая¹¹, М.А. Раков¹², А.В. Евстратов¹³, О.М. Целоусова¹⁴, В.В. Лебедев¹⁵, Н.В. Чаплыгина¹⁶, И.В. Корякина¹⁷, Н.С. Осмульская¹⁸, Е.И. Афанасьева¹⁹, О.Е. Никонова²⁰, Л.И. Соколова²¹, Е.Х. Цыденешеева²², И.М. Юнусова²³, Е.О. Зауралов²⁴, И.В. Осипова²⁵, К.С. Асланян²⁶, Е.В. Сипачёва²⁷, О.П. Болдырева²⁸, Г.Р. Казарян²⁹, Е.В. Башарова³⁰, С.Г. Манн¹, М.А. Курникова¹, Е.В. Райкина¹, Н.С. Сметанина¹

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

²СПб ГБУЗ «Детский городской многопрофильный клинический специализированный центр высоких медицинских технологий», Санкт-Петербург

³ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва

⁴Российская детская клиническая больница ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва

⁵ГБУЗ НО «Нижегородская областная детская клиническая больница», Нижний Новгород

⁶Перинатальный центр КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства», Красноярск

⁷ГБУЗ «Областной онкологический диспансер», Пенза

⁸ГУЗ «Тульская детская областная клиническая больница», Тула

⁹ГБУЗ АО «Амурская областная детская клиническая больница», Благовещенск

¹⁰ГБУЗ АО «Архангельская областная детская клиническая больница им. П.Г. Выжлецова», Архангельск

¹¹ОГБУЗ «Детская областная клиническая больница», Белгород

¹²ГБУЗ «Брянская областная детская больница», Брянск

¹³ГБУЗ КО «Калужская областная клиническая детская больница», Калуга

¹⁴ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» ФМБА России, Киров

¹⁵ГБУЗ «Детская краевая клиническая больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края, Краснодар

¹⁶ОБУЗ «Областная детская клиническая больница», Курск

¹⁷ГУЗ «Областная детская больница», Липецк

¹⁸БУЗ ОО «Областная детская клиническая больница», Омск

¹⁹ГБУЗ «Областная детская клиническая больница», Оренбург

²⁰Детский онкогематологический центр им. Ф.П. Газа ГБУЗ «Пермская краевая детская клиническая больница», Пермь

²¹ГБУЗ РМЭ «Йошкар-Олинская детская городская больница». Республиканский детский онкогематологический центр, Йошкар-Ола

²²ГУЗ «Детская республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Бурятия, Улан-Удэ

²³ГБУЗ РД «Детская республиканская клиническая больница им. Н.М. Кураева» Министерства здравоохранения Республики Дагестан, Махачкала

²⁴ГБУЗ РМ «Детская республиканская клиническая больница», Саранск

²⁵ГБУЗ «Детская республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань

²⁶ГБУЗ РО «Областная детская клиническая больница», Ростов-на-Дону

²⁷ГБУЗ «Тамбовская областная детская клиническая больница», Тамбов

²⁸ГБУЗ ТО «Областная детская клиническая больница №1», Тюмень

²⁹БУ «Нижевартовская окружная клиническая детская больница», Нижневартовск

³⁰ГБУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница», Челябинск

Контактная информация:

Черняк Екатерина Александровна,
научный сотрудник отдела оптимизации
лечения гематологических заболеваний
НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева
Минздрава России
Адрес: 117997, Москва,
ул. Саморы Машела, 1
E-mail: ekaterina.chernyak@fccho-moscow.ru

В статье представлен ретроспективный анализ группы пациентов с дефицитом пируваткиназы эритроцитов ($n = 41$; медиана возраста – 5 лет 1 месяц: от 4 месяцев до 26 лет 6 месяцев), проходивших обследование в НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева по поводу неуточненной наследственной гемолитической анемии в период с 2013 по 2020 г. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Всем пациентам диагноз был подтвержден молекулярно-генетическим исследованием, выполненным методом высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS). Гомозиготные мутации в гене *PKLR* были обнаружены у 10 (24,39%) пациентов, компаунд-гетерозиготные мутации – у 31 (75,61%). Среди них

77,78% составили миссенс-мутации. Распределение по полу (мужской:женский) составило 1:1,73. Хотя бы однократно трансфузия эритроцитарной взвеси потребовалась 40 (97,56%) пациентам. Минимальный возраст на момент дебюта трансфузионной зависимости – 1 сутки жизни, максимальный – 4 года. Заменное переливание крови было выполнено 13 детям, тяжелая нормоцитарная гиперрегенераторная анемия с проведением заместительной терапии эритроцитарной взвесью в первые месяцы жизни отмечена у 12 пациентов: на 1-м месяце – у 9, на 2-м месяце – у 8, на 3-м месяце – у 6, на 5-м месяце – у 2 детей, на 1-м году жизни – у 1 ребенка, а у 2 детей трансфузии были выполнены однократно на фоне инфекционных эпизодов в 3 и 4 года. Спленэктомия в связи с высокой трансфузионной зависимостью выполнена 10 пациентам: трансфузионная независимость достигнута у 5 детей, у 5 – увеличение интервала между гемотрансфузиями. Медиана возраста проведения оперативного вмешательства составила 7 лет 4 месяца (от 1 года до 14 лет). Всего у 41 пациента было описано 36 генотипов: с.1529G>A – у 3 детей, с.1137_1139del/c.1456C>T – у 2, с.1079G>A/c.1529G>A – у 2, с.1130T>C/c.1456C>T – у 2, остальные генотипы встречались однократно. С наибольшей частотой встречались 2 мутации: с.1456C>T (16,67%) и с.1529G>A (16,67%). У 19 (46,34%) пациентов зафиксированы ранее не описанные мутации.

Ключевые слова: гемолитическая анемия, дефицит пируваткиназы, пируваткиназа, наследственная несфероцитарная анемия, дети, генетические мутации, мультицентровое исследование

Черняк Е.А. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2021; 20 (2): 84–96.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-84-96

Non-spherocytic hemolytic anemia caused by erythrocyte pyruvate kinase deficiency: the analysis of genetic defects in pediatric patients, living in Russian Federation

E.A. Cherniak¹, N.E. Sokolova², K.V. Semiglazova¹, I.N. Lavrentyeva³, E.K. Donush⁴, O.I. Plaksina⁵, M.V. Borisova⁶, N.A. Danilyuk⁷, E.S. Mitrofanova⁸, I.P. Baturskaya⁹, N.G. Revina¹⁰, T.I. Burlutskaya¹¹, M.A. Rakov¹², A.V. Evstratov¹³, O.M. Tselousova¹⁴, V.V. Lebedev¹⁵, N.V. Chaplygina¹⁶, I.V. Koryakina¹⁷, N.S. Osmulskaya¹⁸, E.I. Afanasyeva¹⁹, O.E. Nikonova²⁰, L.I. Sokolova²¹, E.Kh. Tsedenisheeva²², I.M. Yunusova²³, E.O. Zauralov²⁴, I.V. Osipova²⁵, K.S. Aslanyan²⁶, E.V. Sipacheva²⁷, O.P. Boldyreva²⁸, G.R. Kazaryan²⁹, E.V. Basharova³⁰, S.G. Mann¹, M.A. Kurnikova¹, E.V. Raikina¹, N.S. Smetanina¹

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

²Children's City Multidisciplinary Clinical Specialized Center of High Medical Technologies, Saint-Petersburg

³Morozov Children's City Clinical Hospital, Department of Health in Moscow, Moscow

⁴Russian Children's Clinical Hospital of the N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁵Regional Children's Clinical Hospital, Nizhny Novgorod

⁶Krasnoyarsk Regional Clinical Center for Maternity and Childhood Protection, Perinatal Center, Krasnoyarsk

⁷Regional Oncological Dispensary, Penza

⁸Children's Regional Clinical Hospital, Tula

⁹Amur Regional Children's Clinical Hospital, Blagoveshchensk

¹⁰Regional Children's Clinical Hospital named after P.G. Vyzhetsova, Arkhangelsk

¹¹Children's Regional Clinical Hospital, Belgorod

¹²Regional Children's Hospital, Bryansk

¹³Regional Clinical Children's Hospital, Kaluga

¹⁴Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, FMBA of Russia, Kirov

¹⁵Children's Regional Clinical Hospital, Krasnodar

¹⁶Regional Children's Clinical Hospital, Kursk

¹⁷Regional Children's Hospital, Lipetsk

¹⁸Regional Children's Clinical Hospital, Omsk

¹⁹Regional Children's Clinical Hospital, Orenburg

²⁰Perm Regional Children's Clinical Hospital, Perm

²¹Children's city hospital, Republican Children's Oncohematological Center, Yoshkar-Ola

²²Children's Republican Clinical Hospital, Ulan-Ude

²³N.M. Kuraev Children's Republican Clinical Hospital, Ministry of Healthcare of the Republic of Dagestan, Makhachkala

²⁴Children's Republican Clinical Hospital, Saransk

²⁵Regional Children's Clinical Hospital, Kazan

²⁶Regional Children's Clinical Hospital, Rostov-on-Don

²⁷Regional Children's Clinical Hospital, Tambov

²⁸Regional Clinical Hospital №1, Tyumen

²⁹Regional Children's Clinical Hospital, Nizhnevartovsk

³⁰Regional Children's Clinical Hospital, Chelyabinsk

The article presents retrospective data analysis of a cohort of patients with PKD ($n = 41$ patients, aged 4 months – 26.5 years, median of age – 5 years 1 month) who were examined at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology for unspecified hereditary hemolytic anemia during the period 2013–2020. The study was approved by the Independent Ethics Committee of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology. In all patients, the diagnosis was confirmed by Next Generation sequencing (NGS). The homozygous mutations in the *PKLR* gene were found in 10 patients (24.39%), compound heterozygous mutations in 31 patients (75.61%), 77.78% of them were missense mutations. Gender distribution (male:female) was 1:1.73. At least once transfusion of erythrocyte suspension was required to 40 (97.56%) patients. The minimum age at the time of the debut of transfusion dependence was the first day of life, the maximum was 4 years. Exchange blood transfusion was performed in 13 children, severe normocytic hyperregenerative anemia with transfusion of red blood cells in the first days of life was noted in 12 children, at the 1st month of life – in 9 children, at the 2nd month of life – in 8 children, at the 3rd month – in 6 children, at the 5th month – in 2 children, at the 1st year – in 1 child, and 2 children underwent single transfusions on the background of infectious episodes at 3 and 4 years respectively. Splenectomy due to high transfusion dependence was performed in 10 patients: transfusion independence was achieved in 5 patients, in 5 – an increase in the interval between blood transfusions. Median of surgical intervention (9 patients): 7 years 4 months, minimum age – 1 year 4 months, maximum – 14 years 4 months. In total, 36 genotypes were described in 41 patients, among them were: с.1529G>A in 3 patients, с.1137_1139del / с.1456C>T – in 2 patients, с.1079G>A/c.1529G>A in 2 patients, с.1130T>C/c.1456C>T in 2 patients, other genotypes occurred once. Two mutations were the most frequent: с.1456C>T (16.67%) and с.1529G>A (16.67%). 19 (46.34%) of patients had previously not described mutations.

Key words: hemolytic anemia, pyruvate kinase deficiency, pyruvate kinase, hereditary non-spherocytic anemia, genetic mutations, multicenter study

Cherniak E.A., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2021; 20 (2): 84–96.
DOI: 10.24287/1726-1708-2021-20-2-84-96

© 2021 by «D. Rogachev NMRCPHOI»

Received 29.01.2021

Accepted 25.02.2021

Correspondence:

Ekaterina A. Cherniak,
scientific co-worker of the department of
optimizing of treatment of hematological
diseases, Dmitry Rogachev National
Research Center of Pediatric Hematology,
Oncology and Immunology, Moscow, Russian
Federation
Address: Russia, 1179971,
Moscow, Samory Mashela st., 1
E-mail: ekaterina.chernyak@fccho-moscow.ru

Наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия в результате дефекта пируваткиназы (ДПК) занимает одно из первых мест по распространенности среди всех несфероцитарных гемолитических анемий [1], а также является самой частой ферментопатией гликолитического пути эритроцитов [2, 3]. W.N. Valentine и соавт. описали данное заболевание в 1961 г. [4]. Впервые точечные мутации в гене *PKLR*, расположенном на хромосоме 1q21 и состоящем из 12 экзонов, описаны в 1991 г. [5, 6].

В результате гомозиготных либо компаунд-гетерозиготных мутаций в гене *PKLR* снижается выработка фермента пируваткиназы (ПК). Это один из основных ферментов гликолиза, катализирующий в цикле Кребса процесс превращения фосфоенолпирувата в пируват с образованием молекулы аденозинтрифосфата (АТФ). В условиях дефицита фермента нарушается ключевая реакция гликолиза, дающая около 50% АТФ эритроцитов. Недостаточное количество энергии нарушает электрохимический градиент мембраны эритроцитов, сокращая продолжительность их жизни, с преждевременной элиминацией их из кровотока селезенкой [7, 8]. В настоящее время в гене *PKLR* описано больше 300 мутаций [9, 10]. Не описанные ранее мутации гена *PKLR* встречаются примерно у 25% пациентов [11].

Описаны мутации во всех 12 экзонах (чаще всего встречаются экзоны 7, 8, 9 и 11), а также единичные мутации в промоторной области гена [12]. Большую часть мутаций составляют точечные миссенс-мутации, приводящие к функциональным и/или структурным нарушениям белка (66–70% от общего числа мутаций в зависимости от географического региона), и мутации сайта сплайсинга (13%) [11–14]. Для некоторых стран обнаружены более частые мутации гена *PKLR*: замена с.1529G>A (p.R510Q) у пациентов Северной и Центральной Европы и США; с.1456C>T (p.R486W) – в странах Южной и Западной Европы; с. 1468C>T (p.R490W) – в странах Азии [15–18]. Данные международных публикаций, в которых был выполнен анализ клинической картины, информация об активности ПК *in vitro*, а также результаты молекулярно-генетического исследования продемонстрировали взаимосвязь между более тяжелым течением заболевания и наличием нонсенс-мутаций или миссенс-мутаций, затрагивающих активный центр фермента или влияющих на его стабильность [17, 19].

Многообразие патогенных вариантов, каждый из которых оказывает различное влияние на активность ПК, приводит к широкой вариабельности фенотипических особенностей заболевания и затрудняет анализ корреляции генотипа и тяжести клинических проявлений у пациентов. Отсутствие характерных прояв-

лений, отличающих ДПК от других наследственных несфероцитарных гемолитических анемий, трудности диагностики с необходимостью использования специфических методов исследования (молекулярно-генетическое исследование, определение активности фермента) затрудняют оценку частоты встречаемости данной нозологической формы. В зависимости от географического региона данные о частоте встречаемости варьируют от 3 до 5 на 1 000 000 человек [20].

Возраст манифестации ДПК также может отличаться: от дебюта в антенатальном периоде с водянки плода и потребности в регулярных трансфузиях эритроцитной взвеси с рождения до трансфузионно независимого течения заболевания с анемией легкой степени тяжести и хроническим субкомпенсированным гемолизом. Кроме того, с возрастом возможно изменение тяжести течения заболевания в сторону как увеличения, так и сокращения интервалов между трансфузиями. К общим проявлениям заболевания относятся повышенная утомляемость, одышка, иктеричность кожных покровов и склер, спленомегалия, а также желчнокаменная болезнь (ЖКБ) и вторичная перегрузка железом. Примерно у 10% пациентов развиваются очаги экстрамедуллярного кроветворения в результате неэффективного эритропоэза [20]. Также описана корреляция определенных генотипов с печеночной недостаточностью [21].

На сегодняшний день «золотым стандартом» диагностики ДПК является определение активности фермента с обязательным проведением молекулярно-генетического исследования гена *PKLR*, что затрудняет постановку диагноза для пациентов в Российской Федерации (РФ) в связи с малодоступностью данных методов.

Цель данной работы: провести анализ генных нарушений при несфероцитарной гемолитической анемии, вызванной ДПК эритроцитов, у пациентов детского возраста в РФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное многоцентровое ретроспективное исследование одобрено локальным этическим комитетом и утверждено решением ученого совета ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

Нами были проанализированы данные пациентов, обращавшихся в ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России в связи с неуточненной наследственной гемолитической анемией в период с 2013 по 2020 г. Проанализирована имеющаяся медицинская документация (выписки, результаты обследования). Распределение пациентов по регионам России представлено на *рисунке 1*.

Рисунок 1

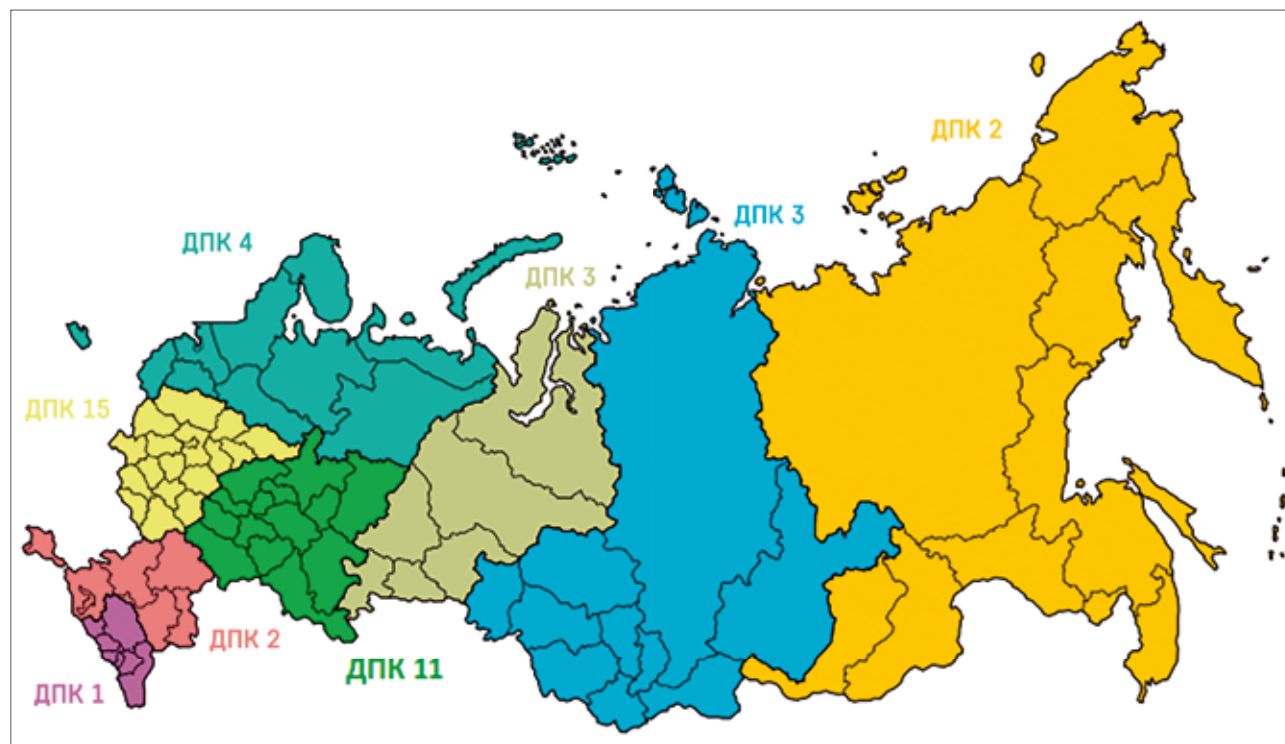
Распределение пациентов с ДПК по регионам РФ ($n = 41$)

Центральный федеральный округ – 15 пациентов; Северо-Западный федеральный округ – 4; Южный федеральный округ – 2; Северо-Кавказский федеральный округ – 1; Приволжский федеральный округ – 11; Уральский федеральный округ – 3; Сибирский федеральный округ – 3; Дальневосточный федеральный округ – 2

Figure 1

Distribution of patients with PKD in the regions of the Russian Federation ($n = 41$)

Central – 15 patients; Northwestern – 4; Southern – 2; North Caucasian – 1; Volga – 11; Ural – 3; Siberian – 3; Far Eastern – 2



Всем пациентам проведено молекулярно-генетическое исследование методом высокопроизводительного секвенирования ДНК (NGS) на приборе NextSeq (Illumina, США) методом парно-концевого чтения (120×2) со средней глубиной прочтения не менее 100х и покрытием целевого региона 99% при глубине прочтения не менее 20х с использованием кастомной панели «Гемолитические анемии» (Roche, Швейцария), включающей 75 генов: *ABCB7*, *ADA*, *ADAMTS13*, *AK1*, *ALDOA*, *AMN*, *ANK1*, *BPGM*, *C15ORF41*, *C3*, *C3AR1*, *CASP10*, *CD46*, *CDAN1*, *CFB*, *CFH*, *CFI*, *CUBN*, *CYB5R3*, *DGKE*, *DHFR*, *EPB41*, *EPB42*, *FAS*, *FASLG*, *G6PD*, *GATA1*, *GCLC*, *GPI*, *GPX1*, *GSR*, *GSS*, *GYPA*, *GYPC*, *HBA1*, *HBA2*, *HBB*, *HBG1*, *HBG2*, *HFE*, *HK1*, *KCNN4*, *KIF23*, *KLF1*, *MTR*, *NT5C3A*, *PFKL*, *PFKM*, *PFKP*, *PGK1*, *PIEZO1*, *PIGA*, *PIGT*, *PKLR*, *PUS1*, *RHAG*, *SEC23B*, *SLC19A2*, *SLC25A38*, *SLC2A1*, *SLC40A1*, *SLC46A1*, *SLC4A1*, *SPTA1*, *SPTB*, *SRD5A3*, *TCN2*, *TF*, *TFR2*, *THBD*, *TMPRSS6*, *TPI1*, *UGT1A1*, *XK*, *YARS2* (названия генов даны в соответствии с HUGO Gene Nomenclature Committee). Для пробоподготовки была использована методика гибридационного селективного обогащения фрагментами ДНК, относящимися к кодирующим областям перечисленных генов. Для поиска протяженных делеций, включающих ген *PKLR* или его фрагменты, использовался MLPA-анализ. Родители

пациентов и совершеннолетние пациенты подписали добровольное информированное согласие на проведение молекулярно-генетического исследования.

Статистическая обработка результатов выполнена методами описательной статистики с применением прикладного пакета программ Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Данные анализировались на соответствие распределения значений изучаемого показателя закону нормального распределения (W-тест Шапиро-Уилка). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (SD) для переменных с нормальным распределением и медиана (Me) (нижний квартиль; верхний квартиль) для переменных с распределением, отличным от нормального. Сравнение переменных между 2 группами пациентов проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клинические данные

По результатам молекулярно-генетического исследования для анализа были отобраны данные 41 пациента с подтвержденным диагнозом: наследственная несфероцитарная гемолитическая анемия,

вызванная ДПК эритроцитов. Распределение по полу (мужской:женский) составило 1:1,73. Медиана возраста пациентов на момент настоящего исследования – 5 лет 1 месяц, минимальный возраст – 4 месяца, максимальный – 26 лет 6 месяцев.

Проведение хотя бы одной трансфузии эритроцитной взвеси потребовалось 40 (97,56%) пациентам; не проводились гемотрансфузии только 1 ребенку в возрасте 2 лет с концентрацией гемоглобина (Hb) 83–89 г/л. Минимальный возраст на момент дебюта трансфузионной зависимости – 1 сутки жизни, максимальный – 4 года. Заменное переливание крови (ЗПК) в раннем неонатальном периоде выполнено 13 (31,71%) пациентам. Тяжелая нормоцитарная гиперрегенераторная анемия, потребовавшая заместительной трансфузии эритроцитной взвеси, в первые месяцы жизни отмечена у 12 (29,27%) детей: на 1-м месяце жизни – у 9 (21,95%), на 2-м месяце – у 8 (19,51%); на 3-м месяце – у 6 (14,63%); на 5-м месяце – у 2 (4,88%); на 1-м году жизни (медицинская документация с точной датой первой трансфузии утеряна) – у 1 (2,44%) ребенка. У 2 (4,88%) детей заместительные трансфузии потребовались однократно за время наблюдения на фоне инфекционных эпизодов в 3 и 4 года.

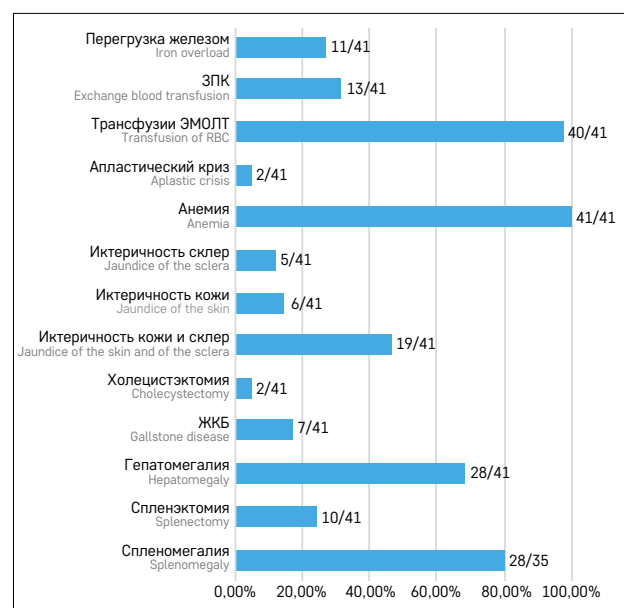
В клинической картине среди основных проявлений заболевания (рисунк 2) были: спленомегалия – у 28/35 (80%) пациентов; гепатомегалия – у 28/41 (68,29%); иктеричность кожи и склер – у 19/41 (46,34%); перегрузка железом – у 11/41 (26,83%); ЖКБ – у 7/41 (17,07%); иктеричность кожи – у 6/41 (14,63%); иктеричность склер – у 5/41 (12,2%).

Рисунок 2

Клиническая характеристика пациентов с ДПК
ЭМОЛТ – эритроцитная масса, обедненная лейкоцитами и тромбоцитами

Figure 2

Clinical characteristics of PKD patients
RBC – red blood cells



Спленэктомия была выполнена 10 (24,39%) пациентам. В связи с высокой трансфузионной зависимостью (ежемесячные трансфузии эритроцитной взвеси) оперативное вмешательство выполнено 9 детям, еще 1 пациенту операция проведена в связи с хронической гипербилирубинемией. У 4 пациентов до проведения хирургического вмешательства наблюдалась спленомегалия, данные о размерах селезенки до спленэктомии у 6 пациентов были недоступны. Медиана возраста проведения оперативного вмешательства ($n = 9$) составила 7 лет 4 месяца, минимальный возраст – 1 год 4 месяца, максимальный – 14 лет 4 месяца. Двум пациентам первоначально была выполнена эндоваскулярная окклюзия селезенки. Одному ребенку первоначально проведена эмболизация селезеночной артерии в возрасте 1 года, в 2 года 5 месяцев у этого пациента была отмечена выраженная гипертрофия оставшейся после окклюзии паренхимы селезенки, после чего в возрасте 6 лет 4 месяцев ему была выполнена спленэктомия. Второму ребенку оперативное вмешательство проводилось в 3 этапа: в 6 и 9 месяцев – окклюзия сосудов на 75% и 90% соответственно, в 1 год 2 месяца – окклюзия дополнительной артерии, в результате чего была достигнута трансфузионная независимость. Трансфузионная независимость после спленэктомии достигнута у 5 (50%) детей, при этом нормализация Hb с полной компенсацией гемолиза не произошла ни у одного пациента (Hb от 78 до 101 г/л, ретикулоцитоз 1,7–31,32%, при биохимическом исследовании сыворотки крови гипербилирубинемия составила 28,9–171,6 мкмоль/л). У 5 (50%) пациентов после спленэктомии было достигнуто увеличение интервала между гемотрансфузиями: у 1 ребенка в течение 5 лет после оперативного вмешательства выполнено 3 трансфузии эритроцитной взвеси по требованию, у 1 – увеличение интервала между трансфузиями до 2 мес, у 2 – до 3 мес, у 1 – до 4 мес. У 1 пациента в послеоперационном периоде отмечено осложнение в виде ятрогенного спленоза.

ЖКБ при обследовании обнаружена у 7 (17,07%) пациентов: в 2 случаях потребовалось проведение холецистэктомии, 5 детей получали консервативную терапию. Также у 11 (26,83%) больных отмечена вторичная перегрузка железом. Одна пациентка не получает хелаторную терапию в связи с индивидуальной непереносимостью деферазирокса. Хелаторную терапию деферазироксом в лекарственной форме таблетки диспергируемая получают 6 больных, в лекарственной форме таблетки, покрытая пленочной оболочкой, – 3 детей (2 пациентам смена лекарственной формы деферазирокса проведена в связи с плохой комплаентностью), у 1 пациента через 6 мес после начала терапии препарат временно отменен в связи с повышением активности

печеночных трансаминаз. Средний возраст начала хелаторной терапии составил $4,8 \pm 3,8$ года.

Среди сопутствующих заболеваний у пациентов описаны: синдром Жильбера – у 3 (7,32%) детей, болезнь Виллебранда – у 1 (2,44%), болезнь Крона – у 1 (2,44%), нейросенсорная тугоухость – у 1 (2,44%), расщелина губы, твердого и мягкого неба (оперативное вмешательство: хейлоринопластика первичная справа по Милларду) – у 1 (2,44%).

Таблица 1

Результаты лабораторного исследования у пациентов с ДПК ($n = 41$)

Table 1

Results of laboratory studies of patients with PKD ($n = 41$)

Параметр Indicator	Результаты Results	n
Общий анализ крови Routine blood test		
Нб, г/л Hb, g/l	$84,3 \pm 11,7$	41
Ретикулоциты, % Ret, %	$11,1 \pm 11,1$	40
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ RBC, $\times 10^{12}/l$	$2,8 \pm 0,5$	41
MCV, фл MCV, fl	$89,2 \pm 9,2$	37
MCH, пг MCH, pg	$30,1 \pm 2,6$	36
MCHC, г/л MCHC, g/l	$336,7 \pm 17,5$	35
Тромбоциты, $\times 10^9/л$ PLT, $\times 10^9/l$	$432,5 \pm 197,5$	41
Лейкоциты, $\times 10^9/л$ WBC, $\times 10^9/l$	$8,7 \pm 4,0$	41
Биохимический анализ крови Blood chemistry test		
Общий билирубин, мкмоль/л Total bilirubin, $\mu\text{mol}/l$	$79,7 \pm 60,8$	36
Прямой билирубин, мкмоль/л Conjugated bilirubin, $\mu\text{mol}/l$	$9,2 \pm 3,2$	33
Лактатдегидрогеназа, Ед/л Lactate dehydrogenase, U/l	$850,4 \pm 729,7$	35
Ферритин, мкг/л Ferritin, $\mu\text{g}/l$	$723,6 \pm 791,10$	37

Примечание. MCV – средний объем эритроцитов; MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроците.

Note. RBC – red blood cells; MCV – mean corpuscular volume; MCH – mean concentration hemoglobin; MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT – Platelets; WBC – white blood cell, Ret – reticulocytes.

Результаты лабораторного обследования пациентов с ДПК представлены в таблице 1.

До проведения молекулярно-генетического исследования, позволившего установить окончательный диагноз ДПК, 24 пациента наблюдались гематологами с диагнозом: неуточненная гемолитическая анемия, 6 – с диагнозом: врожденная дизэритропоэтическая анемия, 1 – с диагнозом: наследственный эллиптоцитоз и 1 – с диагнозом: наследственная гемолитическая анемия вследствие ДПК, верифицированного по оценке активности ПК эритроцитов. Кроме того, 9 человек наблюдались с диагнозом: наследственная сфероцитарная гемолитическая анемия (НСГА), 4 из них в целях снижения трансфузионной зависимости и гипербилирубинемии была проведена спленэктомия. В связи с отсутствием

эффекта от проведенного оперативного вмешательства после появления технической возможности было принято решение о проведении ДНК-диагностики для уточнения диагноза.

Учитывая неоднозначность результатов, получаемых при использовании стандартных методов диагностики наследственных гемолитических анемий, было проведено сравнение данных обследования пациентов с ДПК, выполнявших в рамках первичного обследования эритроцитометрию ($n = 24$) с расчетом среднего диаметра эритроцитов, индекса сферичности (ИС), с результатами обследования больных с НСГА ($n = 25$) (таблица 2). В анализ были включены результаты 24 пациентов с ДПК с первичными диагнозами: наследственный сфероцитоз ($n = 7$), неуточненная гемолитическая анемия ($n = 16$), врожденная дизэритропоэтическая анемия ($n = 1$). По результатам статистически значимых различий в количестве ретикулоцитов не выявлено ($p = 0,56$). У пациентов с ДПК MCV был выше, чем у пациентов с НСГА, при более низких значениях MCHC. У пациентов с НСГА по данным эритроцитометрии значимо ниже оказались средний диаметр эритроцита, ИС и количество сфероцитов в мазке. При этом обращает на себя внимание, что средние значения ИС для когорты пациентов с ДПК ниже нормальных показателей (3,4–3,9), что подтверждает необходи-

Таблица 2

Результаты обследования пациентов с ДПК и НСГА

Table 2

Results of examination of patients with PKD and hereditary spherocytosis hemolytic anemia (HSHA)

Показатель Index	ДПК ($n = 24$) PKD ($n = 24$)	НСГА ($n = 25$) HSHA ($n = 25$)	p
Общий анализ крови Routine blood test			
Нб, г/л Hb, g/l	$87,08 \pm 11,30$	$104,80 \pm 17,37$	$< 0,001$
Ретикулоциты, % Ret, %	$10,16 \pm 9,86$	$7,37 \pm 2,80$	0,560
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$ RBC, $\times 10^{12}/l$	$2,96 \pm 0,52$	$3,68 \pm 0,52$	$< 0,001$
MCV, фл MCV, fl	$88,65 \pm 8,63$	$77,92 \pm 6,39$	$< 0,001$
MCH, пг MCH, pg	$30,13 \pm 2,33$	$28,28 \pm 2,81$	0,014
MCHC, г/л MCHC, g/l	$340,70 \pm 17,98$	$361,29 \pm 14,32$	$< 0,001$
Эритроцитометрия Erythrocytometry			
Средний диаметр эритроцита, мкм Average erythrocyte diameter, μm	$7,10 \pm 0,39$	$6,35 \pm 0,29$	$< 0,001$
ИС Spherocytosis index	$3,24 \pm 0,68$	$2,57 \pm 0,25$	$< 0,001$
Сфероциты, % Spherocytes, %	$1,01 \pm 1,09$	$16,01 \pm 10,57$	$< 0,001$
Пойкилоцитоз, % Poikilocytosis, %	$19,09 \pm 7,11$	$23,08 \pm 11,62$	0,312
Анизоцитоз, % Anisocytosis, %	$7,73 \pm 1,58$	$9,21 \pm 1,35$	0,002

мость комплексной оценки результатов обследования больных для верной постановки диагноза.

Анализ мутаций

Из 41 семьи детей с ДПК для обследования были доступны 16, в которых были обследованы 29 родителей пациентов, при этом в 13 семьях были доступны для анализа оба родителя пробанда, а в 3 – только один из родителей. По результатам анализа ДНК у 27 человек из 29 были обнаружены гетерозиготные мутации в гене *PKLR*.

Гомозиготные мутации в гене *PKLR* были обнаружены у 10 (24,39%) пациентов, компаунд-гетерозиготные мутации – у 31 (75,61%). Всего было проанализировано 72 мутации в гене *PKLR*, среди них большинство составили миссенс-мутации – 56 (77,78%), также описаны такие варианты, как мутации сайта сплайсинга – 7 (9,72%), нонсенс-мутации – 5 (6,94%), делеции без сдвига рамки считывания – 2 (2,78%), мутация со сдвигом рамки считывания – 1 (1,39%) и 1 (1,39%) крупная делеция.

Анализ распределения по кодирующим областям гена для уникальных мутаций выявил наиболее частую встречаемость мутаций в экзоне 8 – 8 мутаций, в экзоне 10 – 7 мутаций; в экзонах 7 и 9 – 5 мутаций; в экзоне 4 – 4 мутации; в экзонах 1, 5, 6 и 11 – 1 мутация; протяженная делеция экзонов 1–2 (рисунок 3). В экзонах 3 и 12 мутации не обнаружены.

Всего при обследовании было обнаружено 36 различных генотипов. Наиболее часто встречающимися среди них были: с.1529G>A/с.1529G>A ($n = 3$; 7,32%), с.1079G>A/с.1529G>A ($n = 2$; 4,88%), с.1130T>C/с.1456C>T ($n = 2$; 4,88%), с.1137_1139del/с.1456C>T ($n = 2$; 4,88%). Самыми частыми среди обнаруженных в гене *PKLR* мутаций стали: с.1456C>T ($n = 12$; 16,67%), с.1529G>A ($n = 12$; 16,67%), что соответствует международным данным, также часто встречались такие патогенные варианты, как с.101-1G>A ($n = 5$; 6,94%), с.1079G>A ($n = 4$; 5,56%), с.1130T>C ($n = 3$; 4,17%), с.1318G>T ($n = 3$; 4,17%), с.1137_1139del ($n = 2$; 2,78%), с.1436G>A ($n = 2$;

2,78%), с.1583A>T ($n = 2$; 2,78%), с.665G>A ($n = 2$; 2,78%), с.994G>A ($n = 2$; 2,78%).

Также был проведен анализ генотипов пациентов после спленэктомии. Среди трансфузионно независимых после оперативного вмешательства пациентов у 2 были идентифицированы компаунд-гетерозиготные миссенс-мутации (с.1021G>A/с.1456C>T; с.1223C>T/с.1529G>A), у 1 – гомозиготная миссенс-мутация (с.1529G>A), у 1 – миссенс-мутация (с.1529G>A) и вставка нуклеотида со сдвигом рамки считывания (с.415dupG), у 1 – миссенс-мутация (с.1456C>T) и делеция без сдвига рамки считывания (с.1137_1139del).

Клиническая и молекулярно-генетическая характеристика группы пациентов с впервые выявленными вариантами в гене *PKLR*

У 19 (46,34%) из 41 пациента обнаружены не описанные ранее мутации гена *PKLR* (таблица 3): в 2 случаях они были выявлены в гомозиготном состоянии (с.1318G>A и с.1269+1G>A), в 1 случае – в компаунд-гетерозиготном состоянии (с.1583A>T/с.1510C>T), в остальных 16 случаях ранее не описанные варианты встретились в компаунд-гетерозиготном состоянии с ранее описанными вариантами. У всех больных анемия была нормохромной, нормоцитарной гиперрегенераторной. Четверем пациентам проведена спленэктомия: 3 ребенка (генотипы с.415dupG/с.1529G>A, с.1021G>A/с.1456C>T, с.1137_1139del/с.1456C>T) в дальнейшем оставались трансфузионно независимыми, несмотря на сохраняющуюся анемию до 78 г/л минимально; у 1 девочки (с.1130T>C/с.1318G>T) после операции отмечено увеличение интервала между трансфузиями с 4 нед до 4 мес. ЖКБ зафиксирована у 2 пациентов (с.415dupG/с.1529G>A, с.1021G>A/с.1456C>T), 1 из них проведена холецистэктомия. Вторичная перегрузка железом, потребовавшая хелаторной

Рисунок 3
Распределение уникальных мутаций по экзонам гена *PKLR*

Figure 3
Distribution of unique mutations by exons of the *PKLR* gene

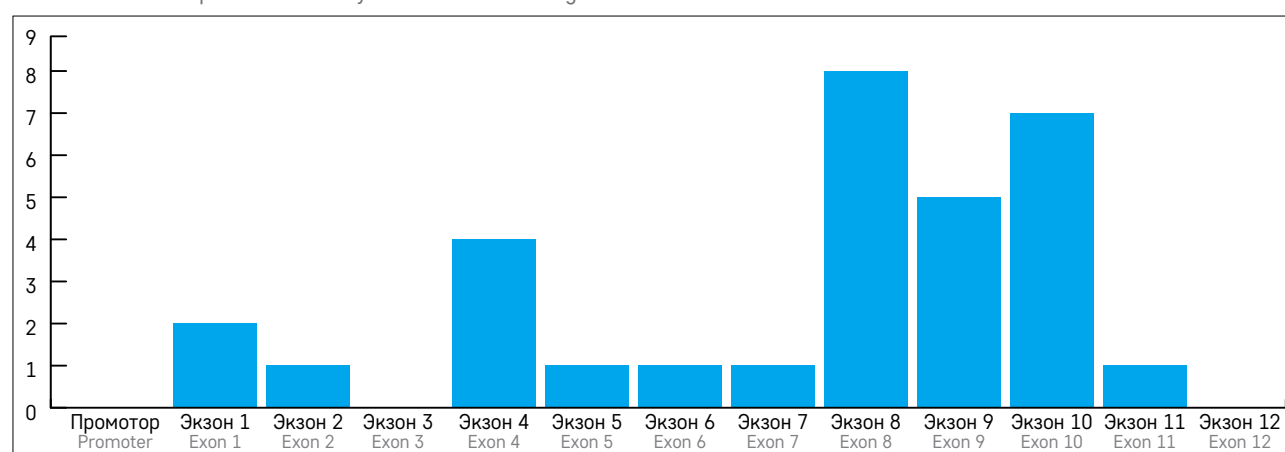


Таблица 3
Результаты молекулярно-генетического исследования

Table 3
Results of genetic research

№	Пациент, пол Patient, gender	Мутация Mutation	Экзон/ интрон Exon/ Intron	Тип мутации Mutation type	Примечание Note	Мутация Mutation	Экзон/ интрон Exon/ Intron	Тип мутации Mutation type	Примечание Note
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Б.М., мужской B.M., male	c.1079G>A (p.C360Y)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[22]	c.1079G>A (p.C360Y)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[22]
2	Г.У., женский G.U., female	c.1528C>T (p.R510Ter)	Экзон 10 Exon 10	Нонсенс Nonsense	[23]	c.1528C>T (p.R510Ter)	Экзон 10 Exon 10	Нонсенс Nonsense	[23]
3	Г.И., мужской G.I., male	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1079G>A (p.C360Y)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[22]
4	Д.Э., женский D.E., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
5	К.У., женский K.U., female	c.1637T>C (p.L546P)	Экзон 11 Exon 11	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
6	К.Д., мужской K.D., male	c.1594C>T (p.R532W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[25]	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
7	К.С., женский K.S., female	c.1429A>G (p.T477A)	Экзон 9 Exon 9	Миссенс Missense	[26]	c.665G>A (p.G222E)	Экзон 5 Exon 5	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
8	К.Д., женский K.D., female	c.1130T>C (p.M377T)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
9	Л.М., женский L.M., female	c.1137_1139del (p.K380del)	Экзон 8 Exon 8	Делеция без сдвига рамки считывания Deletion	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
10	М.А., мужской M.A., male	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.994G>A (p.G332S)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[28]
11	П.Р., женский P.R., female	c.1583A>T (p.D528V)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1436G>A (p.R479H)	Экзон 9 Exon 9	Миссенс Missense	[27]
12	П.Е., мужской P.E., male	c.1318G>A (p.E440K)	Экзон 9 Exon 9	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1318G>A (p.E440K)	Экзон 9 Exon 9	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
13	С.М., женский S.M., female	c.101-1G>A	Интрон 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]	c.101-1G>A	Интрон 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]
14	С.Д., мужской S.D., male	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.101-1G>A	Интрон 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]
15	С.В., женский S.V., female	c.401T>A (p.V134D)	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	[24]	c.401T>A (p.V134D)	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	[24]
16	Т.М., женский T.M., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1072G>T (p.G358W)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
17	Я.М., женский Ya.M., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
18	Б.Т., мужской B.T., male	c.665G>A (p.G222E)	Экзон 5 Exon 5	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1318G>T (p.E440Ter)	Экзон 9 Exon 9	Нонсенс Nonsense	[30]
19	Б.А., женский B.A., female	c.1181C>T (p.A394V)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	[26]	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
20	В.А., женский V.A., female	c.1130T>C (p.M377T)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1318G>T (p.E440Ter)	Экзон 9 Exon 9	Нонсенс Nonsense	[30]
21	К.А., мужской K.A., male	c.1174G>A (p.A392T)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	[25]	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
22	К.Н., мужской K.N., male	c.101-1G>A	Интрон 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]	c.787G>A (p.G263R)	Экзон 6 Exon 6	Миссенс Missense	[31]
23	М.Р., мужской M.R., male	c.394G>C (p.A132P)	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
24	С.В., женский S.V., female	c.1436G>A (p.R479H)	Экзон 9 Exon 9	Миссенс Missense	[27]	c.487C>T (p.R163C)	Экзон 4 Exon 4	Миссенс Missense	[32]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
25	X.P., женский H.R., female	c.1269+1G>A (p.?)	Инtron 8 Intron 8	Сайт сплайсинга Splicing site	Впервые выявлена First discovered	c.1269+1G>A (p.?)	Инtron 8 Intron 8	Сайт сплайсинга Splicing site	Впервые выявлена First discovered
26	T.T., мужской T.T., male	c.415dupG (p.E139fs*82)	Экзон 4 Exon 4	Сдвиг рамки считывания Frameshift mutation	Впервые выявлена First discovered	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
27	C.C., женский S.S., female	c.994G>A (p.G332S)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[28]	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
28	Z.A., женский Z.A., female	c.1021G>A (p.G341S)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
29	H.K., женский N.K., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1079G>A (p.C360Y)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[22]
30	G.I., мужской G.I., male	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	Протяженная делеция, экзоны 1–2 Large deletion, exons 1–2			
31	M.A., женский M.A., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1007C>T (p.A336V)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
32	R.A., женский R.A., female	c.101-1G>A	Инtron 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]	c.1318G>T (p.E440Ter)	Экзон 9 Exon 9	Нонсенс Nonsense	[30]
33	Z.A., женский Z.A., female	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1223C>T (p.T408I)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	[33]
34	M.E., мужской M.E., male	c.1462C>T (p.R488Ter)	Экзон 10 Exon 10	Нонсенс Nonsense	[26]	c.1462C>T (p.R488Ter)	Экзон 10 Exon 10	Нонсенс Nonsense	[26]
35	F.A., женский F.A., female	c.1583A>T (p.D528V)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1510C>T (p.R504C)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
36	Z.E., мужской Z.E., male	c.1130T>C (p.M377T)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
37	S.N., женский S.N., female	c.101-1G>A	Инtron 1 Intron 1	Сайт сплайсинга Splicing site	[25]	c.1079G>A (p.C360Y)	Экзон 7 Exon 7	Миссенс Missense	[22]
38	S.A., женский S.A., female	c.1178A>G (p.Asn393S)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	[29]	c.1436+5G>C (p.?)	Инtron 9 Intron 9	Сайт сплайсинга Splicing site	Впервые выявлена First discovered
39	Ch.K., женский Ch.K., female	c.1137_1139del (p.K380del)	Экзон 8 Exon 8	Делеция без сдвига рамки считывания Deletion	Впервые выявлена First discovered	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]
40	Ya.M., женский Ya.M., female	c.1456C>T (p.R486W)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1157C>T (p.A386V)	Экзон 8 Exon 8	Миссенс Missense	Впервые выявлена First discovered
41	K.S., мужской K.S., male	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]	c.1529G>A (p.R510Q)	Экзон 10 Exon 10	Миссенс Missense	[24]

терапии, наблюдалась у 5 детей: у 1 пациентки с генотипом c.1637T>C/c.1529G>A в возрасте 10 лет при концентрации ферритина сыворотки крови 468,2 мкг/л по результатам магнитно-резонансной томографии в режиме T2* – перегрузка печени III степени (LIC 7,9 мг Fe/г с.в.), перегрузки миокарда не обнаружено; у 1 пациентки с генотипом c.1583A>T/c.1436G>A в возрасте 1 года; у 1 пациентки (c.1130T>C/c.1318G>T) в 7 лет; у 1 пациентки (c.1269+1G>A/c.1269+1G>A) в 1,5 года, однако в связи с печеночной токсичностью через 6 мес терапия отменена; у 1 пациента (c.415dupG/c.1529G>A) терапия проводилась с 12 лет в течение 1 года. Клиническая характеристика больных, имеющих не описанные ранее мутации, представлена в таблице 4.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

На территории РФ среди пациентов с ДПК, проанализированных в данной работе, заболевание чаще встречается у девочек (соотношение мальчики:девочки – 1:1,73). Хотя бы одну трансфузию в течение жизни получили 40 (97,56%) больных, при этом на первом году жизни – 38 (92,68%) детей. Отмечена невысокая эффективность спленэктомии: даже при достижении трансфузионной независимости сохраняется анемия I–II степени тяжести с ретикулоцитозом, гипербилирубинемией.

На сегодняшний день в гене *PKLR* описано более 300 мутаций, большую часть которых состав-

Таблица 4
Клинические проявления заболевания у пациентов с впервые выявленными мутациями в гене *PKLR*
Table 4
Clinical manifestations of the disease in patients with newly diagnosed mutations in the *PKLR* gene

Клинические данные Clinical data														Общий анализ крови Routine blood test				Биохимический анализ крови Blood chemistry test			Результаты обследо- вания родителей Parent results
№	Возраст Age	Возраст первой трансфу- зии Age of first transfusion	Интервал между трансфузи- ями The interval between transfusions	Гепатоспленомегалия Hepatosplenomegaly		ЖКБ Gallstone disease	Спленэктомия Splenectomy		Нб, г/л Hb, g/l	Ре- ти- ку- ло- ци- ты, % RBC, % Ret, %	Эри- тро- ци- ты, x 10 ¹² /л RBC, x 10 ¹² /l	Тром- боци- ты, x 10 ⁹ /л PLT, x 10 ⁹ /l	Лей- коци- ты, x 10 ⁹ /л WBC, x 10 ⁹ /l	Общий билиру- бин, мк- моль/л Total bilirubin, μmol / l	Прямой билиру- бин, мк- моль/л Conju- gated bilirubin, μmol/l	Фер- ритин, мкг/л Ferritin, μg/l					
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					
5	10 лет 10 years	1 сутки 1 day	1 год: 4 нед 1–4 года: 6 мес с 4 лет: 2 мес 1 year: 4 weeks 1–4 years: 6 months from 4 years: 2 months	+ 4,0	+ 4,0	–	–	76	19,3	2,49	295	5,93	142,1	7,7	468,2	Отец: c.1637T>C het Мать: c.1529G>A het Father: c.1637T>C het Mother: c.1529G>A het					
7	8 лет 8 years	3 года 3 years	Однократно Once	–	–	–	–	97	6,0	3,01	258	4,51	44,1	9,7	121,5	Отец: c.665G>A het Мать: c.1429A>G het Father: c.665G>A het Mother: c.1429A>G het					
8	1 год 1 year	1,5 месяца 1.5 months	3 трансфузии до 4,5 мес 3 transfusions up to 4.5 months	–	Край The edge	–	–	90	9,8	3,2	318	5,25	103,4	6,9	423,87	Отец: c.1456C>T het Мать: c.1130T>C het Father: c.1456C>T het Mother: c.1130T>C het					
9	1 год 1 year	1 месяц 1 months	4 нед до 6 мес 4 weeks up to 6 months	+ 3,0	–	–	–	87	5,9	2,84	541	5,55	46	10,9	415	Н. д. Not performed					
11	8 лет 8 years	ЗПК, 3 месяца Exchange blood transfusion, 3 months	3–4 нед 3–4 weeks	+ 1,5	+ 5,0	–	–	100	2,5	3,57	271	7,87	122,9	16	1514,8	Отец: c.1583A>T het Мать: c.1436G>A het Father: c.1583A>T het Mother: c.1436G>A het					
12	5 лет 5 years	на 1-й неделе 1 week	6 трансфузий 6 transfusions	+ 1,5	+ 1,5	–	–	81	17,2	2,83	293	6,43	110,5	13,18	61,7	Отец и мать: c.1318G>A het Father and mother: c.1318G>A het					
16	9 лет 9 years	на 1-й неделе 1 week	3–4 мес до 3 лет 3–4 months up to 3 years	+ 1,5	+ 4,5	–	–	70	17,9	2,48	497	6,76	56,6	7,9	35,8	Н. д. Not performed					

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
18	3 года 3 years	на 1-й неделе 1 week	3 мес 3 months	+ 5,0	+ 3,0	–	–	54	3,6	2,11	216	8,75	33,4	5,5	637	Н. д. Not performed
20	8 лет 8 years	ЗПК, 2 месяца Exchange blood transfusion, 2 months	4 нед 4 weeks	–	–	–	7 лет 1 месяц 7 years 1 months	85	34,9	2,61	387	15,55	103,4	8,6	1855,1	Н. д. Not performed
23	5 месяцев 5 months	ЗПК, 1 месяц Exchange blood transfusion, 1 month	4 нед 4 weeks	+ 2,0	–	–	–	75	7,5	2,6	297	7,2	29,4	11,4	568	Н. д. Not performed
25	1 год 1 year	ЗПК, 2 месяца Exchange blood transfusion, 2 months	4 нед 4 weeks	–	+ 1,0	–	–	62	4,3	2,2	436	13,53	57,8	6,1	1701	Отец и мать: с.1269+1G>A het Father and mother: с.1269+1G>A het
26	13 лет 13 years	1 месяц 1 month	4 нед 4 weeks	+ 1,0	–	+	1 год 4 месяца 1 year 4 months	78	1,7	2,5	738	7,6			1000	Н. д. Not performed
28	13 лет 13 years	3 месяца 3 months	4 нед 4 weeks	–	–	+	1 год: окклюзия, 6 лет 4 месяца: удаление 1 year: occlusion, 6 years 4 months: removal	96	11,4	2,72	876	9	171,6	4,21	292,3	Н. д. Not performed
31	6 месяцев 6 months	ЗПК, 5 месяцев Exchange blood transfusion, 5 months	8 нед 8 weeks	Край The edge	Край The edge	–	–	78	3,2	4,24	473	8,76	62,11		402,4	Н. д. Not performed
35	5 лет 5 years	4 года 4 years	Однократно Once	–	–	–	–	101	4,3	3,28	376	6,16	82	8,95	108	Н. д. Not performed
36	6 месяцев 6 months	2 месяца 2 months	2 мес 2 months	+ 1,5	–	–	–	73	7,1	2,75	471	7,5	36,3	10,7	474,1	Н. д. Not performed
38	8 лет 8 years	2,5 месяца 2.5 months	2–3 мес 2–3 months	+ 3,5	+ 5,0	–	–	91	5,3	3,06	222	6,57	112,7	8	695	Н. д. Not performed
39	10 лет 10 years	1 сутки 1 day	4 нед 4 weeks	–	–	–	2 года 7 месяцев 2 years 7 months	101	5,3	3,15	667	17,88	28,9			Н. д. Not performed
40	8 месяцев 8 months	1 месяц 1 month	4–6 нед 4–6 weeks	+ 2,0	+ 1,0	–	–	77	9,1	2,74	593	12,48	48,2	10,2		Н. д. Not performed

Примечание. Н. д. – нет данных, исследование не проводили.

ляют миссенс-мутации, однако также описаны нонсенс-мутации, делеции участков гена и протяженные делеции, мутации сдвига рамки считывания и мутации сайта сплайсинга. В рассмотренной нами группе у 46,34% пациентов выявлены не описанные ранее как патогенные генетические варианты, что превышает порог в 25% новых мутаций в популяции, согласно опубликованным международным данным [11]. В экзонах 3 и 12 мутации обнаружены не были, однако, согласно международным данным, в этих областях также возможно наличие патогенных вариантов [12]. На сегодняшний день, учитывая гетерогенность обнаруженных мутаций и небольшую выборку пациентов, проследить взаимосвязь генотипа с наиболее характерными клиническими проявлениями, а также тяжестью течения заболевания не представляется возможным.

До появления возможности проведения молекулярно-генетического исследования методом NGS пациентам с данной нозологической формой в РФ диагноз не мог быть верифицирован. Часть пациентов наблюдались по месту жительства с неуточненной наследственной гемолитической анемией, другим была установлена НСГА с последующим проведением脾эктомии, что не имело достаточной эффективности в случае ДПК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая отсутствие патогномоничных признаков для наследственной несфероцитарной гемолитической анемии вследствие ДПК эритроцитов, а также риск проведения калечащих оперативных вмешательств при неверно установленном диагнозе, необходимо рассмотреть вопрос об обязательном проведении молекулярно-генетического исследования пациентам при планировании оперативного вмешательства, если точный диагноз не был установлен по результатам рутинных лабораторных тестов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ORCID

Cherniak E.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3852-9634>
Sokolova N.E. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1021-7348>
Semiglazova K.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8148-6310>
Mann S.G. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1014-5196>
Kurnikova M.A. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0900-6874>
Raykina E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7634-2053>
Smetanina N.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2756-7325>

Литература

- 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
- Quintana-Bustamante O., Fañanas-Baquero S., Orman I., Torres R., Duchateau P., Poirot L., et al. 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
- Bianchi P., Fermo E., Glader B., Kanno H., Agarwal A., Barcellini W., et al.; 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
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. PMID: 29935049. DOI: 10.1111/ejh.13128
- Nathan D.G., Oski F.A., Miller D.R. Lifespan and organ sequestration of the red cells in pyruvate kinase deficiency. *N Engl J Med* 1968; 278 (2): 73–81. DOI: 10.1056/NEJM196801112780203
- [Электронный ресурс] Доступно по: <https://databases.lovd.nl/shared/genes.PKLR>. Ссылка активна на 15.04.2021.
- Bianchi P., Fermo E., Lezon-Geyda K., van Beers E.J., Morton H.D., Barcellini W., et al. Genotype-phenotype correlation and molecular heterogeneity in pyruvate kinase deficiency. *Am J Hematol* 2020; 95 (5): 472–82. DOI: 10.1002/ajh.25753
- Grace R.F., Glader B. Red Blood Cell Enzyme Disorders. *Pediatr Clin North Am* 2018; 65 (3): 579–95. PMID: 29803284. DOI: 10.1016/j.pcl.2018.02.005

12. Bianchi P., Fermo E. Molecular heterogeneity of pyruvate kinase deficiency. *Haematologica* 2020; 105 (9): 2218–28. DOI: 10.3324/haematol.2019.241141
13. [Электронный ресурс] Доступно по: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/gene.php?gene=PKLR>. Ссылка активна на 15.04.2021.
14. 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
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. PMID: 26087744. DOI: 10.1002/ajh.24088
16. 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. PMID: 27871768. DOI: 10.1016/j.medcli.2016.10.004
17. Svidnicki M.C.C.M., Santos A., Fernandez J.A.A., Yokoyama A.P.H., Magalhães I.Q., Pinheiro V.R.P., et al. Novel mutations associated with pyruvate kinase deficiency in Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2018; 40 (1): 5–11. PMID: 29519373. DOI: 10.1016/j.bjhh.2017.08.007
18. Christensen R.D., Yaish H.M., Nussenzeig 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. PMID: 27354418. DOI: 10.1002/ajmg.a.37828
19. 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. Epub 2007 Mar 13. PMID: 17360088. DOI: 10.1016/j.blre.2007.01.001
20. 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
21. 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. PMID: 29610156. DOI: 10.1542/peds.2016-3896
22. 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. PMID: 16704447. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06076.x
23. Demina A., Varughese K.I., Barbot J., Forman L., Beutler E. Six previously undescribed pyruvate kinase mutations causing enzyme deficiency. *Blood* 1998; 92 (2): 647–52. PMID: 9657767.
24. 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. DOI: 10.1073/pnas.90.9.4324
25. Lenzner C., Nürnberg P., Thiele B.J., Reis A., Brabec V., Sakalova A., Jacobasch G. Mutations in the pyruvate kinase L gene in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood* 1994; 83 (10): 2817–22. PMID: 8180378.
26. Baronciani L., Bianchi P., Zanella A. Hematologically important mutations: red cell pyruvate kinase (2nd update). *Blood Cells Mol Dis* 1998; 24 (3): 273–9. PMID: 10087985. DOI: 10.1006/bcmd.1998.0193
27. 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. Epub 2008 Aug 28. PMID: 18759866. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2008.01079.x
28. Valentini G., Chiarelli L.R., Fortin R., Dolzan M., Galizzi A., Abraham D.J., et al. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J Biol Chem* 2002; 277 (26): 23807–14. Epub 2002 Apr 17. PMID: 11960989. DOI: 10.1074/jbc.M202107200
29. Baronciani L., Beutler E. Molecular study of pyruvate kinase deficient patients with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1995; 95 (4): 1702–9. PMID: 7706479; PMCID: PMC295683. DOI: 10.1172/JCI117846
30. Sedano I.B., Röthlisberger B., Déléze G., Ottiger C., Panchard M.A., Spahr A., et al. PK Aarau: first homozygous nonsense mutation causing pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol* 2004; 127 (3): 364–6. PMID: 15491302. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05209.x
31. 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. PMID: 9057665.
32. Rajith B., George Priya Doss C. Path to facilitate the prediction of functional amino acid substitutions in red blood cell disorders—a computational approach. *PLoS One* 2011; 6 (9): e24607. Epub 2011 Sep 13. PMID: 21931771; PMCID: PMC3172254. DOI: 10.1371/journal.pone.0024607
33. 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. PMID: 9827908. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1998.01013.x