

### А.Д. Кулагин

🏢 НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», ул. Льва Толстого, д. 6/8, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022

✉ Для переписки:  
Александр Дмитриевич Кулагин,  
д-р мед. наук, профессор, ул. Льва Толстого, д. 6/8,  
Санкт-Петербург, Российская Федерация, 197022;  
e-mail: kulagingem@rambler.ru

### AD Kulagin

🏢 RM Gorbacheva Scientific Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation; IP Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022

✉ For correspondence:  
Prof. Aleksandr Dmitrievich Kulagin, MD, PhD, 6/8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russian Federation, 197022;  
e-mail: kulagingem@rambler.ru

## ИНТЕРВЬЮ

### Пароксизмальная ночная гемоглинурия: современные представления о редком заболевании

А.Д. Кулагин

Интервью проводил д-р мед. наук, профессор Е.А. Османов в рамках XII Международного симпозиума памяти Р.М. Горбачевой «Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток. Генная и клеточная терапия», 20–22 сентября 2018 г., Санкт-Петербург.

## INTERVIEWS

### Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Current View on a Rare Disease

AD Kulagin

The interview was conducted by Prof. E.A. Osmanov, MD, PhD, at the XII International R.M. Gorbacheva Memorial Symposium “Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Gene and Cell Therapies”, September 20–22, 2018, Saint Petersburg.

#### 1. Глубокоуважаемый Александр Дмитриевич, первый вопрос более общего свойства. В чем Вы видите ключевые особенности одного из редких заболеваний — пароксизмальной ночной гемоглинурии?

В первую очередь, Евгений Александрович, разрешите поблагодарить Вас за предложение сделать это интервью и уникальную возможность обратиться к большой аудитории журнала «Клиническая онкогематология». И в самом начале должен отметить, что представления о пароксизмальной ночной гемоглинурии (ПНГ), которыми я сегодня хотел бы поделиться, — это результат длительного сотрудничества с гематологами практически всех регионов России и работа большого коллектива НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, который я имею честь представлять сегодня.

ПНГ — это уникальное заболевание, настоящий клубок проблем, связанных со сложным патогенезом, полиморфной клинической манифестацией, тяжелыми осложнениями, серьезным прогнозом при есте-

ственном течении и наличием современного эффективного лечения, в котором, впрочем, остается также много нерешенных вопросов. Трудно себе представить другое заболевание, которое бы сочетало в себе:

- 1) причинную соматическую мутацию в стволовой кроветворной клетке (СКК);
- 2) клональность, но первично без классических признаков злокачественности;
- 3) иммунопатогенез как условие для клональной экспансии;
- 4) признаки костномозговой недостаточности и тесную связь с апластической анемией;
- 5) нарушение контроля за активацией комплемента и хронический комплемент-опосредованный гемолиз с широкой гаммой клинических проявлений и осложнений;
- 6) выраженную приобретенную тромбофилию, которая во многих случаях определяет неблагоприятный прогноз;
- 7) вовлечение множества органов как вследствие гемолиза, так и в результате артериальных и венозных тромбозов;
- 8) высокую степень инвалидизации и летальности при естественном течении заболевания;
- 9) вероятность развития редких, абсолютно противоположных исходов — спонтанного выздоровления или трансформации в миелодиспластический синдром (МДС) высокого риска/острый миелоидный лейкоз (ОМЛ);
- 10) широкий терапевтический выбор от тактики наблюдения до таргетной антикомплементарной терапии и аллогенной трансплантации костного мозга (ТКМ) (рис. 1).

## 2. И все это у одного больного?

Да, нередко именно так. Например, больной дебютировал с глубокой панцитопенией в рамках диагноза апластической анемии (АА) с наличием минорного клона ПНГ, было успешно проведено лечение антиtimoцитарным глобулином и циклоспорином А. Пациент наблюдался в течение 5 лет в стабильной хорошей частичной ремиссии АА. В дальнейшем, при экспансии клона вплоть до 90 %, в течение 1 года возникли клинические проявления внутрисосудистого гемолиза, эпизоды острого повреждения почек на фоне гемолитических кризов, абдоминальная боль, развились повторные ишемические инсульты, рецидивировала глубокая анемия с потребностью в трансфузиях эритроцитов, но уже с высоким уровнем ретикулоцитов, а костный мозг на этом этапе оказался весьма клеточным по сравнению с дебютом.

Или другой вариант. У прежде здорового молодого пациента постепенно нарастает слабость, а после провоцирующего фактора активации комплемента, например инфекции, развивается интенсивный гемолиз, наблюдаются эпизоды выделения темной мочи с болями ощущениями в животе и затрудненным глотанием, иногда со рвотой и жидким стулом. Быстро присоединяются тромбозы, например, глубоких вен нижних конечностей и тромбоз синуса головного мозга, а при обследовании выявляется изолированная анемия без



Рис. 1. Клинические и патофизиологические сложности ПНГ

Fig. 1. Clinical and pathophysiological complexity of PNH

выраженной тромбоцитопенией и нейтропенией. И это далеко не все варианты течения заболевания.

## 3. Таким образом, даже на основании приведенных Вами клинических наблюдений можно выделить два базовых аспекта ПНГ: комплемент-опосредованный внутрисосудистый гемолиз и недостаточность костного мозга. Как Вы думаете, именно это затрудняет понимание болезни? Нельзя ли более подробно остановиться на понятии «костномозговая недостаточность» с указанием его англоязычного эквивалента?

Действительно, при ПНГ всегда имеет место сочетание внутрисосудистого гемолиза и разной степени выраженности костномозговой недостаточности, клиническим проявлением которой является цитопения. И поэтому ПНГ традиционно относят к приобретенным синдромам костномозговой недостаточности, которые в англоязычной литературе обозначаются как «bone marrow failure syndromes». Если уточнить, ПНГ, как и АА, является иммуноопосредованной костномозговой недостаточностью. С другой стороны, в МКБ-10 ПНГ находится в разделе «гемолитические анемии» (код D59.5). Кстати, это фактически единственный пример гемолитической анемии с внутренним дефектом эритроцитов приобретенного характера.

И я соглашусь с Вами, что наряду с крайней редкостью и недостаточной осведомленностью это главная причина сложностей, с которыми сталкиваются врачи, обращаясь к проблеме ПНГ. Это заболевание представляет собой динамический спектр клинических проявлений, отражающих гемолиз и недостаточность костного мозга. Эта особенность ПНГ нашла свое отражение и в классификации, и в исторически сложившихся направлениях изучения и восприятия этой проблемы в профессиональном сообществе. Часть исследователей и практических врачей традиционно акцентируют свое внимание на ПНГ преимущественно как на проблеме гемолиза, а другие — формируют свои представления в большей степени сквозь призму АА. Но, как Вы правильно отметили, полноценное понимание проблемы возможно только в том случае, когда мы видим обе стороны, другими словами — весь

клинический спектр ПНГ, и можем интерпретировать его динамику как у отдельного больного, так и в крупных когортах. Именно такой подход к проблеме является основополагающим для нас уже более 20 лет.

Но есть и другие причины, почему ПНГ остается в числе трудных диагнозов и терапевтических решений. Это истинная мультидисциплинарная проблема, что связано с различными вариантами дебюта заболевания. Например, с болью в животе или тромбозом большой первично попадает к хирургу, при остром повреждении почек — к нефрологу, с инфарктом миокарда — к кардиологу, при ишемическом инсульте или тромбозе венозных синусов головного мозга — к неврологу и т. д. И эти синдромальные маски ПНГ иногда долго остаются ошибочной доминирующей концепцией заболевания. С другой стороны, даже после установления диагноза значение мультидисциплинарного взаимодействия не уменьшается. По опыту нашей группы, требуется постоянная кооперация с нефрологами, понимание проблемы хирургами, а у значительной части молодых женщин актуальна совместная курация с акушерами-гинекологами.

#### **4. Выше Вы уже упомянули о генетической природе заболевания. В этой связи каковы причины развития ПНГ? Какие молекулярно-генетические нарушения лежат в ее основе и определяют ее патогенез?**

Клональная природа ПНГ была строго документирована по наличию одного изотипа глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФД) в ПНГ-эритроцитах у гетерозигот в классических работах L. Luzatto еще в начале 1970-х годов. Клоны ПНГ происходят из СКК с одной или несколькими приобретенными мутациями гена *PIG-A*, который локализуется в хромосоме X. Данный ген кодирует ранние этапы синтеза гликозилфосфатидилинозитолового (GPI) якоря, который фиксирует большое число молекул на мембранах клеток крови, в т. ч. ингибиторы комплемента CD59 и CD55. Отсутствие или снижение экспрессии данных молекул на мембране эритроцитов приводит к неконтролируемой активации комплемента и служит причиной развития комплемент-опосредованного внутрисосудистого гемолиза. Последующие события связаны с развитием гемолитической анемии, степень которой может сильно варьировать, но в большей мере имеет значение высвобождение свободного гемоглобина с быстрым истощением оксида азота (NO). Это может привести к выраженным симптомам дистонии гладкой мускулатуры, к усталости, развитию тромбозов и легочной гипертензии.

В крайне редких случаях развитие ПНГ связано с мутациями других генов, участвующих в синтезе GPI-якоря. В частности, недавно описан случай типичной клинической картины ПНГ при мутации обоих аллелей гена *PIG-T*, локализованного в хромосоме 20.

Однако наличия только мутации *PIG-A* недостаточно для развития болезни. Для экспансии клона ПНГ требуются дополнительные внешние и внутренние факторы. Мы уверены в этом, поскольку в многочисленных работах показано наличие минимальных популяций ПНГ-клеток у здоровых лиц, а в

экспериментах на мышах нокаут *PIG-A* не приводил к экспансии клонов ПНГ.

Главным внешним фактором признается подавление нормального поликлонального GPI+ кроветворения в условиях иммуноопосредованной недостаточности кроветворения, из-под которого клетки GPI- клон ПНГ ускользают («immune escape»), и формируется клональная селекция. Именно поэтому мы видим частое сочетание ПНГ и АА. Транскриптом CD34+ клеток с фенотипом ПНГ оказался сходным с таковым у здоровых доноров, тогда как в резидуальных «нормальных» GPI+CD34+ клетках костного мозга выявлялась повышенная экспрессия генов апоптоза и клеточной смерти, как это наблюдается у больных с АА.

Гипотетически эта относительная резистентность к иммунному повреждению обусловлена глобальным дефицитом на клетках клона ПНГ GPI-якоря как такового и связанных молекул, необходимых для формирования потенциальных мишеней для Т-лимфоцитов. По крайней мере, есть прямые подтверждения этого механизма по экспансии GPI-специфических CD1d-рестриктированных Т-клеток у больных ПНГ.

Однако и наличия иммунной селекции недостаточно для экспансии клона ПНГ. В пользу этого свидетельствуют литературные и собственные данные. В нашей когорте у 58 % больных АА с наличием клона ПНГ его размер оставался стабильным при длительном наблюдении, а у 19 % — отмечалось его уменьшение. При этом устойчивый рост размера клона ПНГ имел место у 23 % больных.

Вероятно, имеется второй этап, а точнее — механизм экспансии клона ПНГ, который обусловлен приобретением дополнительных соматических мутаций внутри определенного клона ПНГ, который может стать доминантным. Так, у части больных ПНГ с аномалией хромосомы 12 (12q13-15) или без таковой описана гиперэкспрессия гена *HMG2A*, характерная для ряда доброкачественных мезенхимальных опухолей, в частности липом. Гиперэкспрессия гена *HMG2A* вызывает экспансию человеческих и мышинных СКК *in vivo* и не зависит от мутаций *PIG-A*.

Спектр других кандидатных генов и мутаций довольно большой (*WT1*, *NRAS*, *JAK2* и др.). При этом следует отметить, что мутации *JAK2* при ПНГ связаны с повышенным уровнем лейкоцитов и тромбоцитов. Такие редчайшие случаи следует трактовать как ПНГ/миелопролиферативное заболевание.

Новейшие данные по полноэкзомному секвенированию и глубокому целевому секвенированию еще более усложнили понимание генетического ландшафта ПНГ. Оказалось, что дополнительные мутации присутствуют у более 80 % больных, в ряде случаев они формируют субклоны внутри клона с мутацией *PIG-A*, а в других случаях — предшествуют ей. Важно подчеркнуть, что дополнительные мутации затрагивали гены, известные своей ролью при миелоидных опухолях (*TET2*, *SUZ12*, *ASXL1*, *JAK2*, *U2AF1*). Однако значение этих мутаций требует уточнения, поскольку риск развития МДС и ОМЛ при ПНГ не превышает 5 %.

Важно, что все рассмотренные выше представления о клональной экспансии при ПНГ строятся на реализации механизма «отбора» клонов СКК с генетически детерминированными большими или

меньшими шансами на выживание в условиях иммуноопосредованного повреждения кроветворения (внешний механизм) и пролиферацию (внутренний механизм). Однако существует альтернативная стохастическая гипотеза, которая находит подтверждение на современном этапе компьютерного моделирования динамики СКК с мутациями *PIG-A*. Согласно данной модели, клональная экспансия ПНГ является следствием нейтрального дрейфа внутри небольшого пула пролиферирующих СКК, обеспечивающих кроветворение, а не направленного отбора. Результаты этих, как принято сейчас обозначать *in silico*, исследований оказались интригующе близкими к имеющимся данным об эпидемиологии ПНГ, возрасте больных, размере клона и вероятности его спонтанного исчезновения. И в этом аспекте ПНГ вновь оказывается в центре внимания уже как уникальная биологическая модель изучения механизмов клональной эволюции.

**5. Как понимать один из тезисов, сформулированных Вами в ответе на первый вопрос, «...клональность, но первично без классических признаков злокачественности...»? Такое возможно? А разве клональность сама по себе не служит главным и самым доказательным признаком злокачественности? Или это не всегда так? ПНГ характеризуется как «nonmalignant clonal expansion». Как Вы относитесь к этой формулировке и ее смысловой составляющей?**

В онкологии и гематологии термин «клональный» нередко отождествляется с опухолевым или злокачественным ростом, но в ряде случаев это не вполне корректно. Клональность можно рассматривать как первый шаг к злокачественному росту.

Так, ПНГ — клональное, но не истинное опухолевое заболевание, не лейкоз, что в англоязычной литературе обозначается как «nonmalignant clonal expansion». В отличие от злокачественного (лейкемического) клона клетки ПНГ сами по себе не подавляют нормальное кроветворение, а скорее замещают дефицит последнего. Стволовые клетки ПНГ сохраняют способность к нормальной дифференцировке и поддерживают кроветворение в течение всей жизни пациентов. Гиперплазированный эритропоэз, как и в норме, зависит от эритропоэтина. При ПНГ мы никогда не видим инфильтрации в негемопоэтических тканях. И наконец, следует повторить, что риск трансформации ПНГ в лейкоз на протяжении всей жизни не превышает 5 %, а наиболее частой причиной смерти пациентов при естественном течении бывают тромбозы. При этом нельзя исключать, что улучшение выживаемости пациентов на фоне современной антикомплементарной терапии может привести к увеличению количества случаев трансформации ПНГ в лейкоз. Таким образом, за исключением клональности, первично ПНГ не имеет других типичных характеристик злокачественного роста.

**6. Александр Дмитриевич, позволю себе задать вопрос, который выходит за рамки темы**

**Вашего интервью. Можно ли привести другие примеры клональных заболеваний, которые не относятся к злокачественным опухолям, т. е. не включены в международные классификации опухолевых заболеваний, или ПНГ в этом смысле — единственная уникальная модель с формулировкой «nonmalignant clonal expansion»?**

Конечно, ПНГ не является уникальным примером незлокачественной клональной экспансии, происходящей из СКК. Начнем с того, что в основе адаптивного иммунного ответа лежит клональная экспансия антигенспецифических Т- и В-лимфоцитов. Если говорить о заболеваниях, то клональные аутореактивные Т-лимфоциты с дополнительными соматическими мутациями описаны при аутоиммунных заболеваниях, в частности при ревматоидном артрите. Еще ближе к ПНГ пример АА, при которой описана экспансия клонов больших гранулярных лимфоцитов с мутацией *STAT3*.

Другая группа примеров — это такие состояния, как моноклональные гаммапатии неопределенного значения (MGUS), моноклональный В-клеточный лимфоцитоз, которые лишь у части их носителей в течение жизни трансформируются во множественную миелому, хронический лимфолейкоз или лимфомы. В качестве примера миелоидной клональной первично незлокачественной пролиферации можно привести относительно недавно введенное понятие «клональный гемопоэз неопределенного потенциала» (CHIP — clonal hematopoiesis of indeterminate potential), частота которого отчетливо повышается у здоровых лиц пожилого возраста, однако вероятность трансформации в МДС, ОМЛ не превышает 0,5–1 % в год. В результате большинство пациентов с этими клональными состояниями умирают вовсе не от злокачественной опухоли, а по другим причинам.

Если еще раз вернуться к АА и непосредственно к ПНГ, то согласно последней номенклатуре ВОЗ, выявление цитогенетических клональных (обнаруживаемых в 2 метафазах и более) нарушений при наличии цитопении, но в отсутствие морфологических критериев и повышения числа бластных клеток трактуется как МДС только при моносомии 7. Аналогичная ситуация при выявлении трисомии 8,  $-Y$ ,  $del(20q)$  требует тщательного мониторинга и недостаточна для установления диагноза МДС.

**7. Что такое клон ПНГ? О каких клональных клетках в системе крови идет речь? Насколько важно определение его размера?**

Клоном ПНГ называют клетки крови всех линий дифференцировки, являющиеся потомками СКК с мутацией *PIG-A*, а маркером клональности служит отсутствие или резкое снижение экспрессии GPI-якоря/GPI-связанных белковых молекул. Важно отметить, что у многих больных выявляется несколько таких клонов, что по крайней мере подтверждается одновременным наличием популяций клеток с полным отсутствием GPI (III тип) и со сниженной экспрессией GPI (II тип). То есть, строго говоря, в этих случаях имеет место олигоклональность.

Размер клона ПНГ, определяемый как процент нейтрофильных гранулоцитов или моноцитов с дефицитом/отсутствием GPI-якоря, — это одна из ключевых характеристик заболевания, поскольку интенсивность внутрисосудистого гемолиза закономерно выше у пациентов с большим клоном. Как правило, при классической форме заболевания и при активной АА/ПНГ этот показатель, т. е. размер клона ПНГ, превышает 50–60 % и даже 90 %.

**8. Что Вы скажете о рабочей классификации, предложенной экспертами международной группы по изучению ПНГ в 2005 г.?**

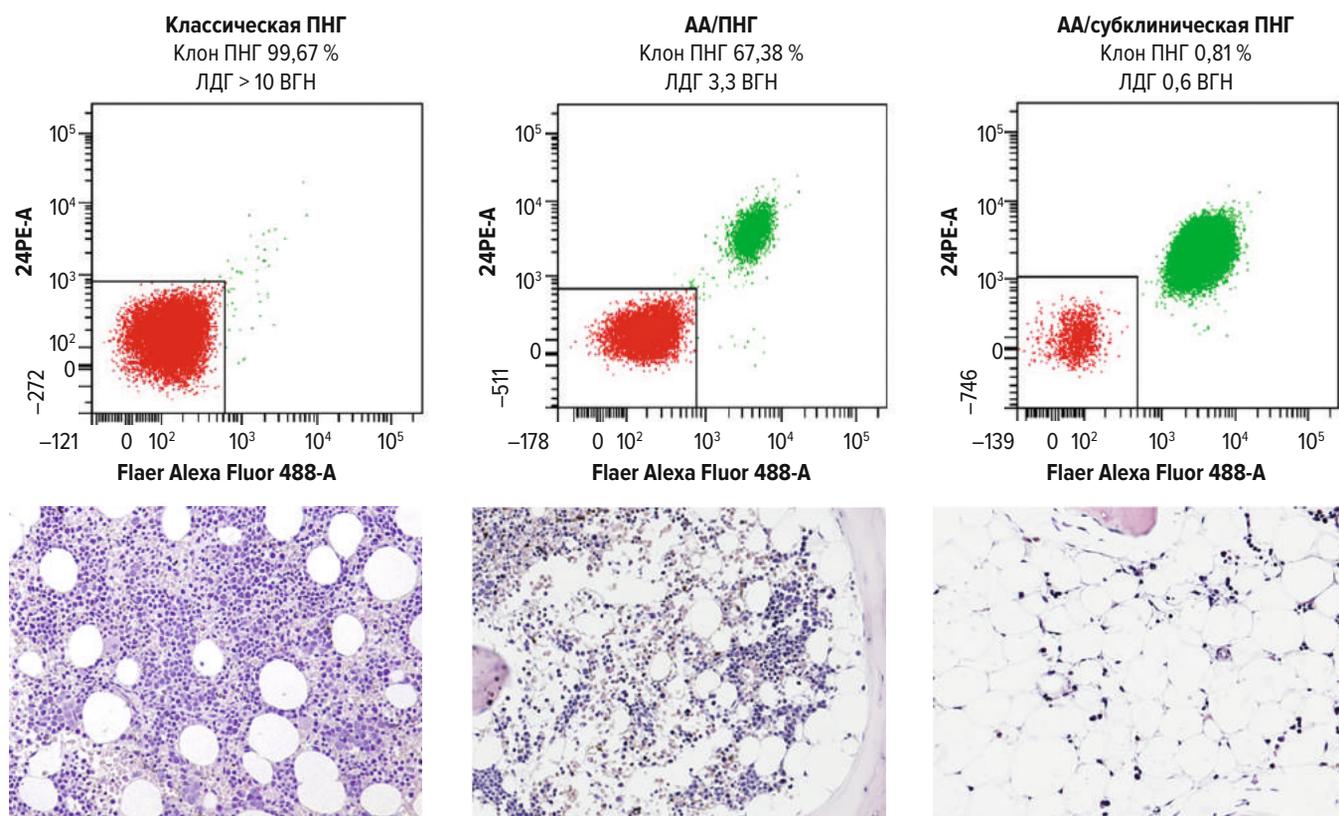
**Насколько она востребована в клинике и Ваше отношение к ней? Претерпела ли она какие-либо изменения с 2005 г. и почему? Каковы критерии диагностики каждой из трех клинических форм, обозначенных экспертами международной группы по изучению ПНГ?**

Евгений Александрович, классифицировать ПНГ трудно. Возвращаясь к одному из Ваших первых вопросов, в идеале классификация должна отражать весь динамический клинический спектр ПНГ в контексте интенсивности внутрисосудистого гемолиза и выраженности недостаточности костного мозга. Упо-

мянутая Вами рабочая классификация 2005 г. лишь частично удовлетворяет этот запрос, однако остается действующей и принципиально не изменилась, поскольку позволяет интерпретировать и формально подразделять большинство клинических ситуаций с выявлением клона ПНГ.

Выделяют три клинические формы заболевания, которые в ряде случаев являются текущим этапом развития болезни у одного и того же пациента (рис. 2):

- 1) классическая ПНГ с наличием большого клона, клинически и лабораторно выраженного гемолиза и отсутствием дефинитивных признаков других заболеваний крови, а именно АА, МДС, первичного миелофиброза (ПМФ);
- 2) ПНГ, связанная с другими синдромами костномозговой недостаточности (АА/ПНГ, реже МДС/ПНГ и крайне редко ПМФ/ПНГ), с наличием клинических и лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза и большого клона ПНГ (как правило, более 10 % среди лейкоцитов);
- 3) субклиническая ПНГ (сПНГ) на фоне других синдромов костномозговой недостаточности (АА/сПНГ, МДС/сПНГ, ПМФ/сПНГ) с отсутствием клинических и лабораторных признаков гемолиза и наличием минорного клона клеток с ПНГ-фенотипом (как правило, менее 1 % среди лейкоцитов).



**Рис. 2.** Клинические формы ПНГ с результатами проточной цитометрии периферической крови (наличие гранулоцитов CD15+CD24–FLAER–) и гистологического исследования костного мозга (фото любезно предоставлены В.В. Байковым, Е.В. Бабенко)

АА — апластическая анемия; ВГН — верхняя граница нормы; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

**Fig. 2.** Clinical forms of PNH and the results of peripheral blood flow cytometry (CD15+CD24–FLAER– granulocytes) and bone marrow histology (photographs courtesy of V.V. Baykov and E.V. Babenko)

АА — aplastic anemia; ВГН — upper limit of normal; ЛДГ — lactate dehydrogenase; ПНГ — paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

В связи с этим прецизионный диагноз каждой из форм ПНГ, наряду с тестированием клона ПНГ, базируется на формальной оценке цитопении и полном исследовании костномозгового кроветворения. Важно отметить, что клеточность костного мозга в трепанобиоптате при классической ПНГ может быть высокой, нормальной или умеренно сниженной, а уровень тромбоцитов и нейтрофильных гранулоцитов выше критериев диагностики АА. Одновременно с этим клеточность костного мозга при АА/ПНГ может варьировать от глубокой аплазии до нормальной или даже повышенной в случаях с полным восстановлением кроветворения за счет клона ПНГ.

Важность использования общепринятой номенклатуры очевидна. Я могу привести только один пример. При анализе медицинской документации мы видим самые разные обозначения одной и той же второй формы заболевания АА/ПНГ: синдром АА/ПНГ, ПНГ с гипоплазией костного мозга, ПНГ с глубокой цитопенией, АА с гемолитическим компонентом, АА с большим клоном ПНГ и др. Безусловно, это неприемлемо и мы должны стараться разговаривать на одном языке.

При разработке национальных рекомендаций в России наибольшую критику моих коллег вызвало понятие «субклиническая ПНГ». Действительно, наличие минорных популяций гранулоцитов и моноцитов с дефицитом GPI-связанных молекул (например, 0,1 %) при АА вряд ли можно назвать болезнью. Поэтому субклиническая ПНГ не является самостоятельным диагнозом, однако требует соответствующего клинического и лабораторного мониторинга в связи с возможностью экспансии клона и развития второй формы ПНГ с клинически значимым гемолизом, наиболее строгими критериями которой являются уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ)  $\geq 1,5 \times$  ВГН (верхняя граница нормы) и размер клона ПНГ  $> 10 \%$  среди лейкоцитов.

С другой стороны, наша группа традиционно использует термин «субклиническая ПНГ» для дополнительной биологической характеристики АА и, реже, МДС, поскольку прогноз при проведении иммуносупрессивной терапии существенно отличается у больных с наличием и отсутствием клона ПНГ.

### 9. На чем основана современная диагностика ПНГ? Что такое диагностикум FLAER? В связи с этим и в целом: каково значение проточной цитометрии? И вообще, как заподозрить и установить диагноз ПНГ?

Проба Хема, позволявшая выявлять эритроциты с повышенной чувствительностью к комплементу, ушла в прошлое. Иногда на лекциях мы демонстрируем фотографию результата пробы Хема, чтобы молодые коллеги имели представления о том, с чего все начиналось в 30-е годы прошлого столетия (рис. 3).

Современная диагностика ПНГ базируется на выявлении популяций клеток периферической крови с отсутствием или снижением экспрессии GPI-якоря и/или различных белков, связанных с мембраной посредством GPI-якоря, методом проточной цитофлуориметрии. В этом направлении мы прошли очень длинный путь. В России с начала 1990-х годов в

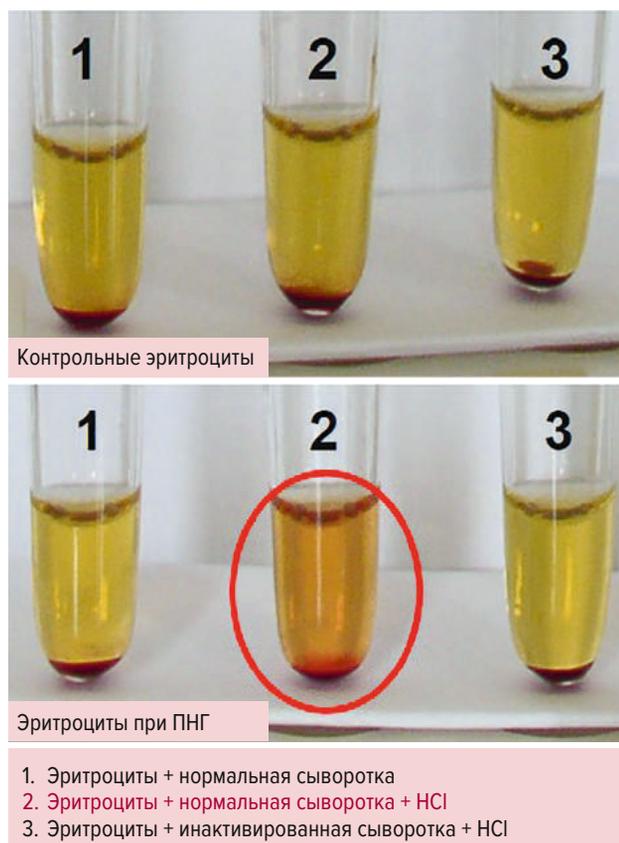


Рис. 3. Проба Хема: избирательный лизис эритроцитов при ПНГ в присутствии комплемента и его активации при закислении сыворотки (фото любезно предоставлены Н.В. Кристосовой)

Fig. 3. Ham test: selective lysis of PNH red blood cells in the presence of complement and its activation during acidification of the serum (photographs courtesy of N.V. Kristosova)

течение 10 лет мы использовали проточную цитометрию со стандартной чувствительностью, которая позволяла нам выявлять относительно большие клоны GPI-дефицитных клеток (как правило, от 1 %). Затем мы внедрили высокочувствительную методику, которая была несколько раз модифицирована, дополнена реактивом FLAER, а главное — с нашей помощью стандартизована во многих лабораториях нашей страны. Текущим стандартом чувствительности проточной цитометрии для клинических целей является выявление до 0,01 % клеток с фенотипом ПНГ.

Общепринятым является обязательное тестирование клона ПНГ среди гранулоцитов, моноцитов и эритроцитов, а за истинный размер клона принимается процент GPI-дефицитных клеток среди лейкоцитов, обычно гранулоцитов FLAER-CD24- и моноцитов FLAER-CD14-. Следует подчеркнуть, что при тестировании эритроцитов оценка размера клона, как правило, значительно занижена вследствие избирательного гемолиза дефектных эритроцитов и, нередко, трансфузий донорских эритроцитов. Тестирование эритроцитов позволяет надежно идентифицировать клетки с нормальной экспрессией (I тип), частичным дефицитом (II тип) и полным отсутствием (III тип) экспрессии CD59, различающиеся по своей чувствительности к комплементу и длительности жизни (рис. 4).

Диагностикум FLAER (fluorescently-labeled aerolysin reagent) представляет собой меченный флюорох-

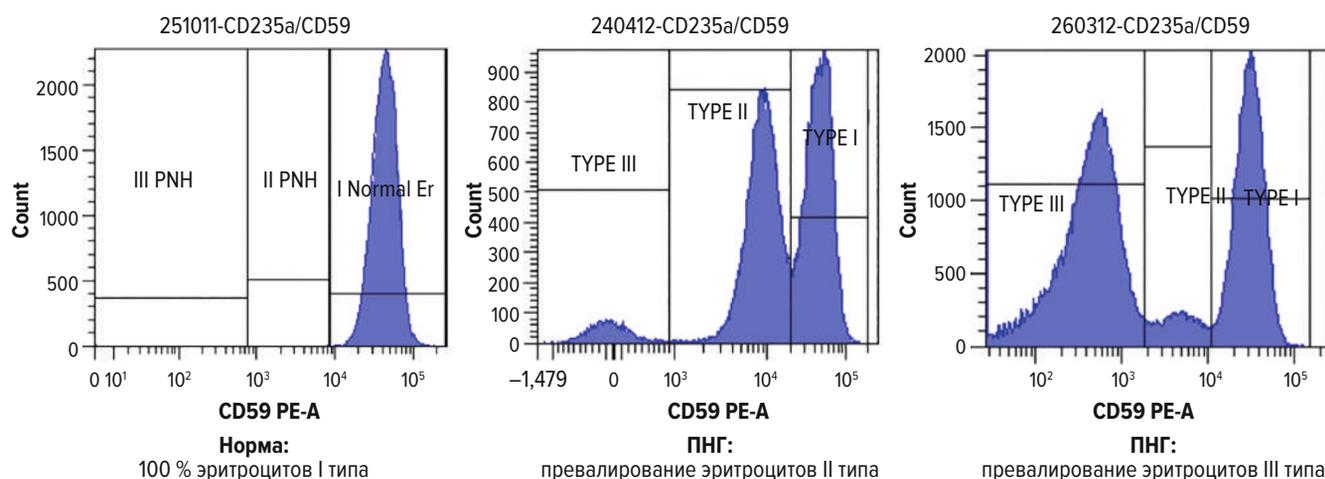


Рис. 4. Результаты проточной цитометрии периферической крови с оценкой экспрессии CD59 на эритроцитах у здорового человека и при ПНГ (фото любезно предоставлены Е.В. Бабенко)

Fig. 4. Results of peripheral blood flow cytometry and estimation of CD59 expression in erythrocytes in a healthy person and in a PNH patients (photographs courtesy of E.V. Babenko)

ромом, обычно Alexa 488, инактивированный токсин аэролизин, продуцируемый бактериями *Aeromonas hydrophila*. В отличие от моноклональных антител, используемых для детекции GPI-связанных белков, FLAER непосредственно связывается с GPI-якорем на гранулоцитах и моноцитах. Одновременное тестирование самого GPI-якоря с помощью FLAER и GPI-связанных молекул позволяет очень надежно и точно выявлять популяции клеток с их дефицитом и делает диагноз ПНГ прецизионным.

Проблема состоит не в диагностике, а в том, как заподозрить ПНГ. Неспецифическая клиническая манифестация заболевания, в т. ч. с тяжелых осложнений, делает актуальным проведение скрининга в группах риска по ПНГ.

Показания к скринингу подробно изложены в национальных рекомендациях по диагностике и лечению ПНГ (2014). Если говорить кратко, тестирование на наличие клона ПНГ должно выполняться во всех случаях гемолиза с отрицательной прямой антиглобулиновой пробой, гемоглинурией/гемосидеринурией и почечной дисфункцией. Вторая группа показаний связана с синдромами костномозговой недостаточности (АА, МДС с признаками гемолиза, гипоплазией кроветворения, неуточненными цитопениями). Кстати, выявление минорного клона ПНГ при цитопениях является сильным аргументом в пользу иммуноопосредованного синдрома костномозговой недостаточности и фактически исключает периферические цитопении (идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру [ИТП], аутоиммунную гемолитическую анемию [АИГА], иммунные нейтропении) и конституциональные синдромы (анемию Фанкони, врожденный дискератоз и др.). Наконец, тестирование клона ПНГ необходимо при необъяснимых тромбозах в сочетании с признаками гемолиза и цитопенией либо при необычных локализациях тромбоза.

**пароксизмы внутрисосудистого гемолиза и гемоглинурии классическими и самыми частыми проявлениями болезни? Как часто встречались «пароксизмы гемоглинурии или темной мочи» в Вашей клинической практике? В этой связи, а какова история описания ПНГ как конкретной нозологически очерченной болезни или синдрома? Можно ли вообще говорить о клинической очерченности ПНГ? А как Вы относитесь к высказыванию, что ПНГ — это просто широкий спектр или набор различных клинических синдромов?**

Название слабо отражает суть болезни, поскольку было дано задолго до изучения его этиологии, патогенеза и даже получения полных представлений о клинической картине. В целом важно понимать, что гемолиз при ПНГ носит постоянный характер. Ошибочно предполагать, что он развивается только в период типичных гемолитических кризов (пароксизмов). Во-вторых, усиление гемолиза в ночные часы в связи с повышенной активацией комплемента на фоне физиологического снижения рН крови с выделением темной мочи утром характерно, но вовсе не обязательно для ПНГ (рис. 5). Что касается гемоглинурии как таковой, то в наиболее известной когорте, описанной J.V. Dacie и S.M. Lewis в 1972 г., только у



Рис. 5. Гемоглинурия

Fig. 5. Hemoglobinuria

**10. Насколько термин ПНГ отражает суть заболевания? Можно ли считать ночные**

26 % больных развились эпизоды гемоглобинурии в дебюте заболевания. В отобранной группе больных классической ПНГ с выраженным хроническим гемолизом этот симптом наблюдался только в 57 % случаев (данные ПСПБГМУ им. И.П. Павлова).

Тем не менее мне запомнилось название превью к первой публикации результатов исследования экулизумаба в NEJM в 2004 г. «Black Mornings, Yellow Sunsets — A Day with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria», которое вряд ли требует перевода.

История изучения ПНГ — это отдельная, длинная и очень интересная тема. Некоторое время назад я достаточно глубоко погрузился в этот вопрос и, если есть такая возможность, остановлюсь на этом подробнее.

По разным предположениям, первое описание ПНГ принадлежит шотландскому хирургу Charles Stewart (1794, «необычные периодические выделения крови из уретры...»), который практиковал в Архангельске, врачу из Нидерландов Johannes Schmidt или англичанину сэру William Gull (1886, «интермиттирующая гематурия»). В России первое сообщение о ПНГ сделал профессор Петербургской медико-хирургической академии Яков Яковлевич Стольников в 1880 г. («гемоглобинурия»). Первое детальное клиническое описание ПНГ относится к 1882 г. и принадлежит Paul Strubing, который не только описал типичную клиническую картину пароксизмов гемоглобинурии с наличием слабости, одышки, боли в груди и спазмов пищевода, но и разграничил это состояние с холодовой и маршевой гемоглобинурией, а также высказал гипотезу о первичной дефектности эритроцитов. В 1911 г. А.А. Hijmans Van Den Bergh показал, что эритроциты больных ПНГ лизируются нормальной сывороткой при ее подкислении. Описания ПНГ, сделанные Ettore Marchiafava и Ferdinando Micheli, на самом деле были более поздними (1911, 1928 и 1931 гг.), однако термин «болезнь Маркиафавы—Микели» используется нередко и сейчас и даже фигурирует в МКБ-10. А собственно термин ПНГ предложил J. Enneking уже в 1928 г.

Тезисно хотелось бы отметить ключевые вехи дальнейшего изучения ПНГ:

- 1937–1939, Thomas H. Ham: лизис эритроцитов вследствие повышенной чувствительности к комплементу, которая не зависит от антител;
- 1938, сэр John V. Dacie: лизис эритроцитов *in vitro* зависит от pH и наличия сыворотки;
- 1949, Н.М. Кончаловская: описание ПНГ в СССР (гемолитическая анемия с ночной гемоглобинурией);
- 1950, W.H. Crosby, W. Dameshek: тромбофилия при ПНГ, тромбозы — основная причина инвалидизации и смерти;
- 1951–1954, J.W. Harris, W.S. Jordan, L. Pillemer, J.F. Desforges: чувствительность эритроцитов к комплементу при ПНГ зависит от магния и ингибируется кальцием;
- 1954, L. Pillemer et al.: выделение пропердина и концепция центральной роли пропердина во врожденном иммунитете, что заложило основы в понимание альтернативного пути активации комплемента без участия антител;
- 1963, сэр John V. Dacie: гипотеза соматической мутации СКК;
- 1966–1973, W.F. Rosse и J.V. Dacie: мозаицизм эритроцитов с различной чувствительностью к комплементу;
- 1967, S.M. Lewis и J.V. Dacie, W. Dameshek: взаимосвязь ПНГ и АА;
- 1970, L. Luzzatto et al.: доказательство клональности ПНГ (наличие одного изотипа ГбФД в эритроцитах ПНГ+ у гетерозигот);
- 1973–1985, исследовательские группы Duke University и Rochester University (G.L. Logue et al., C.J. Parker et al., T.A. Rouault et al., C.H. Packman et al.): серия исследований функциональных основ повышенной чувствительности ПНГ-эритроцитов к комплементу, повышенное связывание С3-компонента с эритроцитами ПНГ+. Чувствительность ПНГ-эритроцитов к комплементу реализуется на двух этапах: активации С3-компонента и формирования мембран-атакующего комплекса;
- 1983–1989, M.K. Pangburn et al., A. Nicholson-Weller et al.: дефицит фактора ускорения деградации С'-конвертаз, фиксированных на мембране (DAF — decay accelerating factor, или CD55); L.S. Zalman et al.: дефицит С8 (С8bp)-связывающего белка или гомологичного фактора рестрикции (HRF); M.H. Holguin et al.: дефект ПНГ-эритроцитов III типа в регуляции белков С5–9, дефицит мембранного ингибитора реактивного лизиса (MIRL — membrane inhibitor of reactive lysis, или CD59);
- 1978–1986, M.G. Low et al.: высвобождение ацетилхолинэстеразы, щелочной фосфатазы, 5'-нуклеотидазы, DAF под действием фосфолипазы С; способ фиксации белков (фосфатидилинозитол); гипотеза о дефиците всех GPI-связанных белков при ПНГ;
- 1987, Н.С. Турбина и др.: описание крупнейшей в СССР когорты больных ПНГ;
- 1990–1991, С.Е. van der Schoot et al., J. Schubert et al., W.F. Rosse et al.: проточная цитометрия с моноклональными антителами против GPI-связанных белков для диагностики ПНГ;
- 1992–1993, С. Armstrong et al., P. Hillmen et al., M. Takahashi et al.: дефект раннего этапа биосинтеза GPI-якоря;
- 1993, Taroh Kinoshita et al.: клонирование гена фосфатидилинозитол-гликана класса А (PIG-A); дефицит GPI-якоря вызван соматической мутацией гена PIG-A;
- 1989–2008: мутация PIG-A — необходимое, но недостаточное условие для развития ПНГ; необходимость дополнительных событий; селекция «устойчивых» к повреждению клонов ПНГ при иммуноопосредованных синдромах недостаточности костного мозга. В. Rotoli и L. Luzzatto: дуалистическая теория; L. Luzzatto et al.: «относительное преимущество клона ПНГ»; N. Young и J. Maciejewski: «спасение клона ПНГ»; D. Dingli et al.: теория «нейтральной эволюции» (стохастическая) — математическая модель, которая согласуется с эпидемиологией ПНГ;
- 2004–2008, P. Hillmen et al.: результаты ключевых клинических исследований монокло-

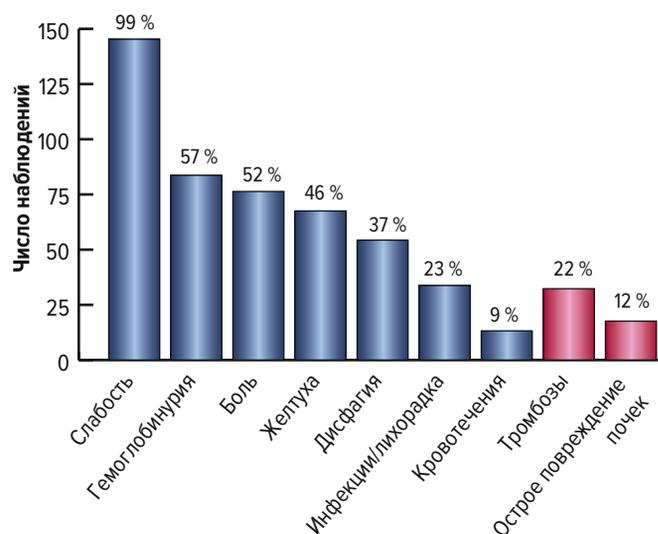


Рис. 6. Клинические проявления в дебюте классической ПНГ

Fig. 6. Clinical manifestations at the onset of classic PNH

нальных антител к C5-компоненту комплемента (экулизумаба) при ПНГ;

- 2007: одобрение экулизумаба при ПНГ FDA (Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США); формирование новой концепции лечения ПНГ, основанной на долгосрочном контроле внутрисосудистого гемолиза; новое понимание спектра клинических проявлений ПНГ, связанных с гемолизом и исчезающих или резко уменьшающихся на фоне эффективной терапии экулизумабом (боль, спазмы пищевода, эректильная дисфункция, тромбозы, легочная гипертензия, нефропатия и др.).

Мне кажется, этот исторический экскурс позволяет сделать вывод, что мы говорим о довольно четко очерченной нозологической форме, а не о наборе синдромов. Одновременно с этим нельзя отрицать клиническую гетерогенность ПНГ, что стало особенно очевидным, когда появилась возможность точно измерять размер клона ПНГ.

**11. Очень интересно! Действительно такой исторический экскурс позволяет лучше понять ПНГ. И все же, Александр Дмитриевич, с чего начинается, т. е. как дебютирует эта редкая болезнь?**

Клиническая манифестация ПНГ связана с проявлениями и осложнениями гемолиза, включая поражение органов и тромбозы, а также с последствиями цитопении, которая в ряде случаев АА/ПНГ или МДС/ПНГ может быть выраженной.

В 2017 г. году мы опубликовали прецизионный анализ клинической манифестации в крупной когорте больных с классической ПНГ. Позвольте лишь коротко напомнить эти данные. Дебют классической ПНГ варьирует от длительного этапа умеренного хронического гемолиза с разной степенью выражен-

ности слабости и утомляемости до ярких симптомов внутрисосудистого гемолиза, иногда возникающих остро: выраженная слабость, одышка, выделение темной мочи, в т. ч. в утренние часы, желтуха, боль в животе, спине, груди, головная боль, лихорадка, дисфагия, в отдельных случаях — рвота и диарея (рис. 6).

В ряде случаев первыми проявлениями заболевания становятся тромбозы различной локализации и эпизоды острого повреждения почек (ОПП). В качестве провоцирующих факторов внутрисосудистого гемолиза в дебюте болезни могут выступать инфекции, травмы, операции и беременность. Я хорошо помню один из наших первых случаев классической ПНГ в середине 1990-х годов. Подросток, неудачно используя фейерверк, получил термический ожог кисти, который спровоцировал первый тяжелый гемолитический криз с развитием ОПП с потребностью в гемодиализе.

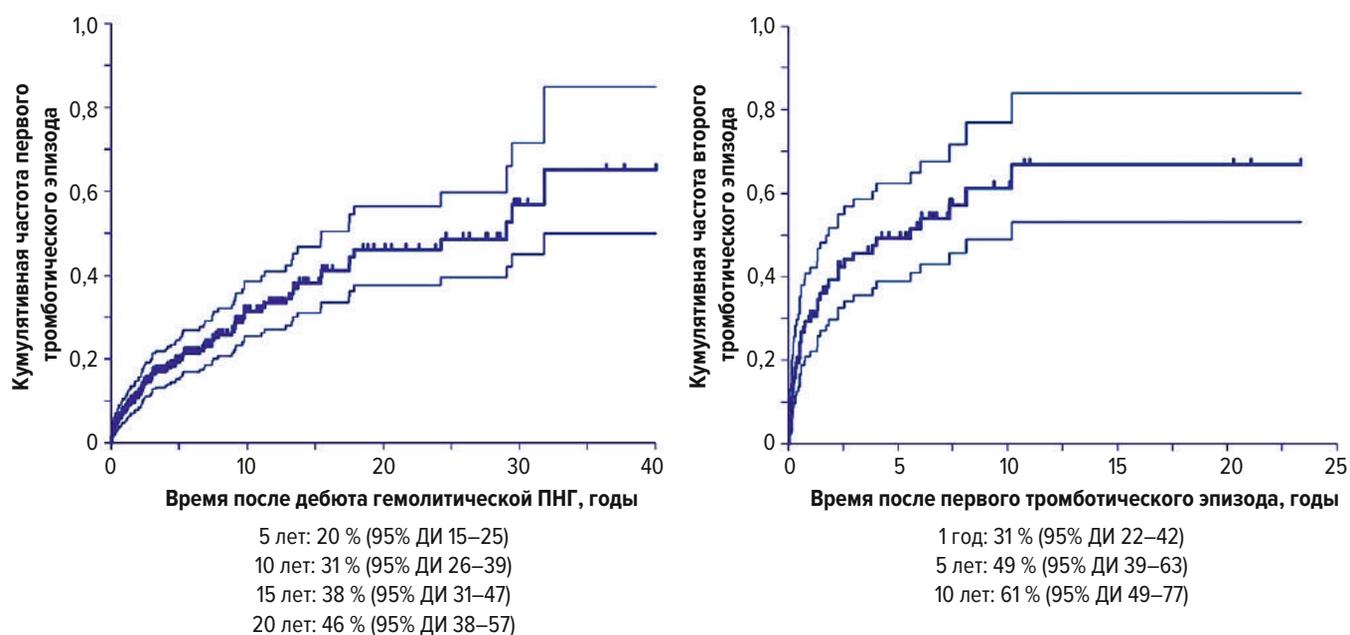
**12. Как часто развиваются и каковы особенности артериальных и венозных тромбозов при ПНГ?**

Отвечая на Ваш вопрос, не могу не привести наиболее цитируемое утверждение одного из самых уважаемых специалистов в этой области, профессора Lucio Luzzatto: «We can safely say that PNH is the most vicious acquired thrombophilic state known in medicine», что в переводе звучит так: «Мы можем с уверенностью сказать, что ПНГ является наиболее порочным (или опасным) приобретенным тромбофилическим состоянием, известным в медицине». Есть еще одно утверждение, оно менее известно, но важно то, что сделала его наша соотечественница Нина Сергеевна Турбина в книге «Депрессии кроветворения» в 1987 г. при описании крупнейшей на тот момент в нашей стране когорты больных ПНГ: «...образование тромбов в крупных сосудах — 20 %, в мелких сосудах — 100 %».

Главными особенностями тромбозов при ПНГ является их частота, молодой возраст больных, необычные локализации и низкая эффективность традиционной первичной и вторичной профилактики.

В целом в наиболее крупных исследованиях сообщалось о развитии клинически манифестных тромбозов у 18–44 % больных, в т. ч. у 6–19 % в дебюте заболевания до установления диагноза ПНГ. По данным корейских авторов, риск тромбозов при ПНГ существенно повышается при сочетании таких факторов, как уровень ЛДГ  $\geq 1,5 \times$  ВГН, абдоминальная боль, боль в груди, диспноэ и гемоглобинурия. По нашим данным, независимыми факторами риска манифестных тромбозов являются наличие боли и более старший возраст в дебюте заболевания.

При тщательном ретроспективном анализе и работе с проспективной когортой мы имеем собственные устоявшиеся представления о частоте манифестных тромбозов при ПНГ. Ко времени последнего анализа в когорте ПСПбГМУ им. И.П. Павлова у 90 (25 %) из 358 больных с активной гемолитической ПНГ развилось 190 манифестных тромботических эпизодов. К сожалению, эта статистика постоянно пополняется. И буквально за несколько дней до этого интервью мы верифицировали диагноз ПНГ еще у одного молодого мужчины, дебютировавшего с тромбоза селезеночной



**Рис. 7.** Кумулятивная частота манифестных тромбозов при ПНГ  
95% ДИ — 95-й доверительный интервал; ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

**Fig. 7.** Cumulative incidence of manifest thrombosis in PNH  
95% ДИ — 95% confidence interval; ПНГ — paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

вены. Данный случай представляет особый интерес в связи с резким превалированием клона II типа с частичным дефицитом GPI-якоря. В результате формально гемолиз выражен очень деликатно, уровень ЛДГ лишь в 1,4 раза превышает ВГН, а минимальный уровень гемоглобина составлял 111 г/л. Но несмотря на это, развитие тромбоза делает риск болезни максимальным.

С учетом разной продолжительности заболевания и наличия конкурирующих рисков более точное представление дает анализ кумулятивной частоты тромбозов (рис. 7). Кумулятивная частота первого тромботического эпизода составила 20, 31 и 38 % в течение 5, 10 и 15 лет от дебюта заболевания соответственно. Несмотря на вторичную профилактику, у половины пациентов развиваются повторные тромбозы, кумулятивная частота которых составляет 31 и 49 % в течение 1 и 5 лет соответственно, медиана времени после первого тромбоза — 7 мес. (диапазон 0,3–122 мес.).

Другими словами, у каждого третьего пациента развивается первый тромботический эпизод в течение 10 лет от дебюта заболевания и у каждого третьего развивается второй тромбоз в течение 1 года после первого. И конечно, эта статистика не учитывает тромбозы мелких сосудов, которые выявляются при использовании различных чувствительных методов. Однако чаще они остаются нераспознанными.

Только венозные тромбозы имели место у 66 % больных, только артериальные — у 21 %, в остальных 13 % случаев выявлены как венозные, так и артериальные тромбозы. В целом удельный вес венозных и артериальных тромбозов составил 75 и 25 % соответственно. Преобладающими локализациями венозных тромботических эпизодов были глубокие (25 %), интраабдоминальные (19 %), поверхностные (13 %) и церебральные (5 %) вены, а также тромбоз легочной артерии (12 %). Среди артериальных тром-



**Рис. 8.** Локализация 190 манифестных тромбозов при ПНГ  
ТЭЛА — тромбоз легочной артерии.

**Fig. 8.** Location of manifest thromboses (190 cases) in PNH  
ТЭЛА — pulmonary thromboembolism.

бозов доминировал ишемический инсульт (19 %) и инфаркт миокарда (4 %) (рис. 8).

**13. Хорошо. А собственно, как часто встречается ПНГ? Проводились ли эпидемиологические исследования этого редкого заболевания в России и за рубежом?**

ПНГ относится к орфанным заболеваниям как по критериям, принятым за рубежом, так и по более жестким — российским. Напомню, что в России, согласно с. 44 Федерального закона от 21.11.2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в РФ», к орфанным относят заболевания, которые имеют распространенность не более 10 случаев на 100 000 населения.

К сожалению, мы пока не имеем масштабных эпидемиологических исследований ПНГ в России. В связи с этим, учитывая отсутствие теоретических предпосылок для значимых географических и этнических различий в заболеваемости ПНГ, мы экстраполируем на Россию данные наиболее эффективных национальных регистров. Так, по данным ведущей исследовательской группы профессора Р. Hillmen, заболеваемость ПНГ в Великобритании составляет 1,3 случая на 1 млн населения в год, а расчетная распространенность, с учетом новых случаев и выживаемости, достигает 15,9 случая на 1 млн населения. Принимая за основу эти данные, в России можно прогнозировать появление около 190 новых больных в год, а общее число оценивать в 2300. Предполагается, что часть случаев длительно не распознается и больные могут умирать, в частности, от тромботических осложнений с неуточненным первичным диагнозом. С другой стороны, с учетом существенного улучшения выживаемости пациентов на фоне современного лечения распространенность ПНГ будет увеличиваться.

Конечно, приведенные расчеты весьма приближены, но так или иначе, если гематолог не работает в федеральном центре, специализирующемся на проблеме, он может за всю профессиональную жизнь увидеть всего несколько первичных пациентов с ПНГ.

**14. Становятся очевидными причины недостаточной осведомленности врачей о проблеме. Давайте разберем ее более подробно. Кто болеет ПНГ?**

ПНГ может развиваться в любом возрасте, в т. ч. у детей и лиц пожилого и старческого возраста, однако, по данным наиболее крупных исследований, медиана возраста на момент установления диагноза составляет 30–45 лет. В базе данных ПСПБГМУ им. И.П. Павлова этот показатель составляет 32 (диапазон 10–72 года) и 28 лет (диапазон 7–80 лет) при классической форме и гемолитической ПНГ у больных с приобретенной апластической анемией (АА/ПНГ) соответственно. Соотношение больных по полу приближается к эквивалентному, или имеется небольшое превалирование женщин (до 55–59 %).

Около половины всех случаев ПНГ составляют пациенты с АА в анамнезе или настоящим диагнозом АА. В остальных случаях имеет место классическая форма ПНГ с отсутствием дефинитивных признаков других заболеваний крови.

**15. Что Вы скажете о ПНГ в связи с апластической анемией, миелодиспластическими синдромами и первичным миелофиброзом? Как эти самостоятельные и нозологически очерченные болезни взаимно увязываются с ПНГ? Или это просто «случайная» комбинация (ассоциация) с каждой из них?**

Случайность таких комбинаций крайне маловероятна, поскольку имеется отчетливая патогенетическая связь данных заболеваний, о которой мы уже говорили

выше. И в первую очередь, это селекция GPI-дефицитных СКК в условиях иммуноопосредованного повреждения GPI+ кроветворения при АА и, реже, при МДС. Ситуация менее понятна при сочетании ПНГ с миелопролиферативными заболеваниями, в частности с ПМФ. Это уникальные случаи; например, в России мы знаем только о 3 хорошо документированных наблюдениях.

**16. Как объяснить высокую частоту обнаружения клона ПНГ именно при приобретенной апластической анемии?**

Объяснение одно — универсальная иммунопатология АА, а именно Т-клеточное повреждение компартмента СКК и предшественников, создает условия для экспансии клонов ПНГ.

**17. Как изменился долгосрочный прогноз при ПНГ с наступлением эры новых таргетных препаратов, а точнее — моноклональных антител?**

Не знаю точных критериев для термина «эра», но уверен, что мы можем использовать его применительно к блокаде терминальных этапов активации комплемента с помощью моноклонального антитела экулизумаба против C5-компонента при ПНГ. Если не говорить об опыте аллогенной ТКМ, то впервые было преодолено естественное течение болезни. Терапия экулизумабом быстро купирует гемолиз и все симптомы, связанные с ним. В долгосрочной перспективе при регулярной терапии экулизумабом мы практически не видим новых органических нарушений, повторных тромбозов, инвалидизации и летальности, связанной с неконтролируемым внутрисосудистым гемолизом, а выживаемость пациентов приближается к популяционной.

**18. Когда и по каким показаниям принимается решение о проведении ТКМ в эру эффективных таргетных препаратов? Каковы преимущества и недостатки аллоТКМ и таргетной терапии? Как часто Вы в своей практике выполняете аллоТКМ при ПНГ?**

К настоящему времени существует две терапевтические опции, потенциально изменяющие естественное течение и отдаленный прогноз ПНГ: аллоТКМ и таргетная ингибция терминального этапа активации комплемента с помощью анти-C5-моноклонального антитела (экулизумаб). Несмотря на недостаточную корректность прямого сравнения этих методов, можно констатировать ряд преимуществ и недостатков каждого из них (табл. 1).

Ключевым преимуществом аллоТКМ является коррекция костномозговой недостаточности и эрадикация клона ПНГ. Однако непосредственный риск процедуры ТКМ и вероятность отдаленных осложнений могут перевешивать ее преимущества у больных с отчетливым превалированием гемолиза, когда может

**Таблица 1.** Преимущества и недостатки аллогенной ТКМ и таргетной терапии при ПНГ

АллоТКМ	Экулизумаб
<i>Преимущества</i>	
Излечивающий метод	Высокоэффективный долгосрочный контроль гемолиза и его осложнений
Коррекция костномозговой недостаточности	Выживаемость, сравнимая с популяционной
<i>Недостатки</i>	
Летальность, связанная с процедурой	Пожизненный неизлечивающий метод
Ограничения по возрасту и наличию HLA-совместимого донора	Не влияет на костномозговую недостаточность
Вероятность хронической реакции «трансплантат против хозяина»	Естественный риск развития МДС/ОМЛ (до 5 %)
Вероятность отторжения	Внесосудистый гемолиз за счет опсонизации эритроцитов фрагментами С3
Вторичные опухоли	Прорывной гемолиз и необходимость коррекции дозы
Инфекционные осложнения	Повышенный риск менингококковой инфекции
Сложная инфраструктура	Высокая стоимость лечения

быть использована безопасная и эффективная таргетная терапия экулизумабом.

В целом текущее отношение к аллоТКМ при ПНГ я бы выразил в трех ключевых тезисах. Во-первых, принять решение о проведении ТКМ при ПНГ всегда трудно. ПНГ — неопухоловое заболевание, больные чаще взрослые с длительным анамнезом самого заболевания и трансфузий, часто имеются поражение почек, легких, печени и тромботические осложнения. На нас давит исторический опыт неудовлетворительных результатов ТКМ, а именно высокой летальности, связанной с процедурой. По данным наиболее крупных публикаций, этот показатель достигал 30–40 % в течение первых 2 лет после ТКМ, в результате отдаленная общая выживаемость составляла лишь около 60 %. Совершенно очевидно, что эти результаты хуже даже самых неоптимистических оценок при естественном течении заболевания, когда 5-летняя общая выживаемость составляла 65 %. При этом самые неудовлетворительные результаты ТКМ были у больных с тромбозами, т. е. эта группа пациентов имеет неблагоприятный прогноз как при естественном течении заболевания, так и после ТКМ. Наконец, появление таргетной антикомплемментарной терапии позволяет у большинства больных длительно, безопасно и эффективно контролировать клинические проявления, связанные с гемолизом.

Во-вторых, ТКМ при ПНГ необходимо рассматривать, поскольку это дефект СКК и имеется отчетливая связь с АА, при которой ТКМ считается стандартной терапией первой или второй линии.

В-третьих, мы можем достаточно уверенно говорить, что ТКМ показана при ПНГ, протекающей в сочетании с тяжелой АА, или в редчайших случаях трансформации ПНГ в МДС или ОМЛ. Ключевой является констатация недостаточности кроветворения

(глубокой цитопении) или лейкозной трансформации как доминирующего фактора долгосрочного прогноза. Именно так формулируются показания к ТКМ в современных международных и российских рекомендациях.

Среди неблагоприятных факторов, влияющих на исход ТКМ, ключевое значение имеет анамнез тромботических событий. При этом риск процедуры, связанный с активным гемолизом, может быть снижен за счет предтрансплантационной терапии экулизумабом.

Историю аллоТКМ при ПНГ, а точнее — при АА с активной гемолитической ПНГ, в нашем Центре можно разделить на два этапа. На первом мы эпизодически проводили ТКМ по классическим показаниям при АА и в целом не учитывали вклад гемолиза. С 2014 г., накопив достаточный опыт таргетной терапии ПНГ, мы реализуем новый протокол с предтрансплантационным использованием экулизумаба для купирования гемолиза и снижения рисков ТКМ. На сегодня по этому протоколу мы провели аллоТКМ уже 17 больным с АА/ПНГ, и это, пожалуй, одна из крупнейших одноцентровых когорт в мире. Мы потеряли 1 пациентку в ранние сроки от тяжелой инфекции, столкнулись с 1 случаем отторжения трансплантата, потребовавшим повторной ТКМ со сменой режима кондиционирования, с 1 случаем тяжелой острой реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), которую удалось купировать на второй линии терапии. В результате при медиане наблюдения, превышающей 2 года, общая и свободная от болезни и тяжелой РТПХ выживаемость составляет 94 и 82 % соответственно. Это, безусловно, очень хорошие результаты с учетом длительности болезни и серьезной предшествующей терапии у большинства пациентов.

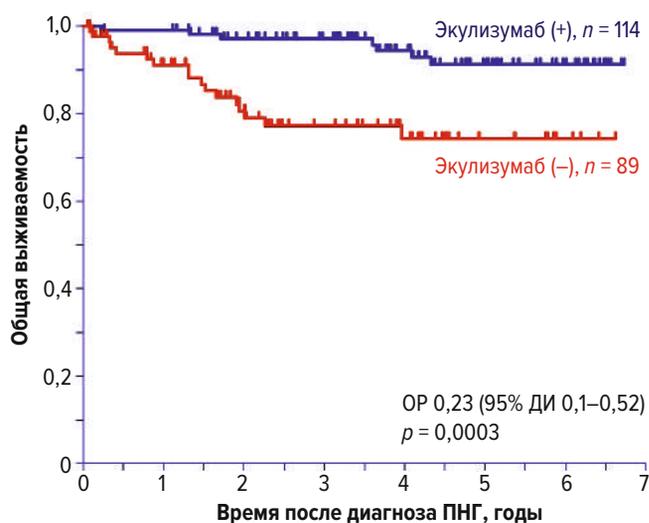
В целом же наша активность с точки зрения выполнения ТКМ при иммуноопосредованных синдромах костномозговой недостаточности, включая АА/ПНГ, составляет около 14–15 %. Это связано с известными ограничениями для ТКМ (возраст пациента, наличие донора, обоснованность показаний и возможных противопоказаний), а также использованием альтернативных эффективных и более безопасных методов лечения. Однако уверен, что по мере улучшения результатов ТКМ, особенно от неродственных и гаплоидентичных доноров, эта цифра будет возрастать.

### 19. Кому и когда следует начинать терапию экулизумабом?

Согласно национальным рекомендациям (2014), терапия экулизумабом рекомендована при документированном активном внутрисосудистом гемолизе (классическая ПНГ, АА/ПНГ, МДС/ПНГ) по следующим показаниям:

- наличие тромботических осложнений;
- хронический гемолиз, сопровождающийся нарушением функции органов и систем;
- трансфузионная зависимость вследствие хронического гемолиза;
- беременность.

Следует констатировать, что данные показания не охватывают всех пациентов группы высокого риска,



**Рис. 9.** Общая выживаемость 203 больных ПНГ, диагностированной после ноября 2011 г.

95% ДИ — 95%-й доверительный интервал; ОР — отношение рисков; ПНГ — пароксизмальная ночная гемоглобинурия.

**Fig. 9.** Overall survival of 203 patients with PNH diagnosed since November 2011

95% ДИ — 95% confidence interval; ОР — hazard ratio; ПНГ — paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.

у которых следует рассматривать раннюю терапию. В частности, больные без документированных тромбозов, тяжелой органной дисфункции и анамнеза трансфузий могут иметь интенсивный гемолиз с выраженной слабостью, анемией, болевым синдромом, одышкой, дисфагией, эректильной дисфункцией. Тактика наблюдения и симптоматическая терапия в подобных ситуациях сопряжены с высоким риском угрожающих жизни и инвалидизирующих тромботических и органных осложнений.

Развивающейся концепцией является начало терапии гемолиза при констатации высокой активности болезни, в качестве критериев которой предложены сочетание уровня ЛДГ  $\geq 1,5 \times$  ВГН с одним признаком и более: слабость, гемоглобинурия, абдоминальная боль, диспноэ, анемия (гемоглобин  $< 100$  г/л), неблагоприятное сосудистое событие, включая тромбозы, дисфагия и эректильная дисфункция.

Важно подчеркнуть, что у больных АА/ПНГ терапия экулизумабом не является альтернативой стандартным методам терапии костномозговой недостаточности (аллоТКМ или комбинированной иммуносупрессивной терапии), а дополняет их по изложенным выше показаниям у пациентов с большим клоном ПНГ и выраженным внутрисосудистым гемолизом.

## **20. Что следует ожидать от терапии экулизумабом? И несколько слов о рефрактерности к препарату.**

Постоянная терапия экулизумабом при строгом соблюдении режима введения препарата позволяет длительно и эффективно контролировать внутрисосудистый гемолиз у подавляющего большинства больных ПНГ. В ключевых международных исследо-

ваниях продемонстрировано быстрое и эффективное купирование внутрисосудистого гемолиза, прекращение или уменьшение зависимости от трансфузий эритроцитов, улучшение качества жизни, снижение риска тромботических осложнений, улучшение функции почек и уменьшение легочной гипертензии. Главным результатом эффективного контроля внутрисосудистого гемолиза и его осложнений является улучшение показателей выживаемости пациентов. К сожалению, в России быстрый доступ к терапии пока остается серьезной проблемой. Возможно, она станет менее актуальной при подтверждении эквивалентной эффективности и безопасности двух отечественных биоаналогов экулизумаба, находящихся на разных этапах клинических исследований.

Совместно с коллегами из большинства регионов России мы накопили уже очень серьезный опыт длительной терапии экулизумабом. Более 200 больных получали терапию с середины 2012 г. Однако прецизионно анализировать выживаемость следует в проспективной когорте, которая включает 203 пациента с установленным диагнозом в период формальной доступности экулизумаба (после ноября 2011 г.) и наличием показаний к терапии, согласно национальным рекомендациям. Терапию экулизумабом получало чуть больше половины пациентов (114), из которых ко времени проведения анализа под наблюдением оставалось 107 (94 %), умерло 7 (6 %). Остальные 89 пациентов не получали терапию, что определило существенно более высокую летальность ( $n = 17$ ; 19 %). В результате вероятность 5-летней общей выживаемости составила 91 (95%-й доверительный интервал [95% ДИ] 85–98 %) и 74 % (95% ДИ 63–85 %) в группах, получавших и не получавших экулизумаб соответственно ( $p = 0,0003$ ) (рис. 9).

Наряду с отчетливой лучшей выживаемостью на фоне терапии экулизумабом следует обратить внимание на довольно существенные различия причин летальных исходов. Среди не получавших экулизумаб в 9 (53 %) из 17 случаев причиной смерти стали тромбозы и только в 5 (29 %) из 17 — осложнения цитопении. В противоположность этому на фоне терапии экулизумабом была документирована только одна смерть, обусловленная тромбозом (14 %), тогда как при АА и МДС — в 4 (57 %) из 7 случаев.

Вопрос о рефрактерности к терапии экулизумабом необходимо уточнить. Истинная рефрактерность к терапии экулизумабом в виде отсутствия клинического ответа и снижения уровня ЛДГ описана у 11 (3,2 %) из 345 больных ПНГ в Японии и по 1 случаю в Аргентине и Нидерландах. Данная редкая ситуация обусловлена гетерозиготными миссенс-мутациями гена C5 (с.2654G→A, с.2653C→T и с.2653C→A) и соответствующим полиморфизмом молекулы C5 (p.Arg885His, p.Arg885Cys и p.Arg885Ser), который препятствует ее связыванию с экулизумабом. В настоящее время проводится поиск альтернативных ингибиторов C5 для этих уникальных больных.

Но на практике мы видим не истинную рефрактерность, а ряд клинических проблем, которые можно объединить условным термином «субоптимальный ответ» на терапию экулизумабом. В первую очередь необходимо обсудить так называемый прорывной гемолиз. В ряде

случаев прорывной гемолиз носит эпизодический характер и отчетливо связан с наличием провоцирующего фактора, например инфекции, беременности, травмы, операции. Но, конечно, более актуален стереотипный прорывной гемолиз, повторяющийся на каждом цикле поддерживающей терапии. Такая ситуация возникает у пациентов с индивидуальным более быстрым метаболизмом экулизумаба, в результате чего за 1–3, иногда 4 дня до очередной инфузии препарата развивается возврат клинических и/или лабораторных признаков болезни. Такой фармакокинетический вариант прорывного гемолиза требует либо сокращать интервал между введениями препарата в поддерживающей фазе до 12–10 дней, либо повышать дозу препарата с 900 до 1200 мг. По нашим текущим оценкам, общая частота прорывного гемолиза в российской когорте составляет около 20 %, в т. ч. 9 % — эпизодический, связанный с провоцирующим фактором, и 11 % — стереотипный. Это соответствует литературным данным, в которых частота прорывного гемолиза при терапии экулизумабом оценивается в 10 %.

Второй составляющей субоптимального ответа на экулизумаб является персистирующий экстраваскулярный гемолиз, который связан с опсонизацией эритроцитов С3-компонентом комплемента. Этот феномен подтверждается положительной прямой антиглобулиновой пробой Кумбса, особенно в моноспецифическом анти-С3d-варианте. Чаще эта проблема выражается в гипербилирубинемии и сохранении желтухи, интенсивность которой варьирует. Наш последний анализ показал, что 31 % больных при регулярной терапии экулизумабом с достижением удовлетворительного контроля над внутрисосудистым гемолизом имели постоянное или эпизодическое повышение уровня билирубина за счет непрямого в 2 раза выше нормальных значений, что можно принять за суррогатный маркер выраженного экстраваскулярного гемолиза.

И наконец, третья проблема, лежащая в основе субоптимального ответа на экулизумаб, — это костномозговая недостаточность, та или иная степень которой при ПНГ присутствует всегда. На практике можно ориентироваться на ретикулоцитарный ответ: чем он выше, тем лучше на любом из этапов лечения. И конечно, если у больного развивается глубокая тромбоцитопения (< 20 000 кл./мкл) и нейтропения (< 500 кл./мкл), вклад костномозговой недостаточности становится очевидным. В такой ситуации возникает необходимость изменения терапевтической тактики, рассмотрения возможности аллотКМ или иммуносупрессивной терапии по программе лечения АА. Однако необходимо помнить, что изолированная тромбоцитопения в ряде случаев обусловлена активным потреблением тромбоцитов на фоне тромбозов или связана с гиперспленизмом.

## **21. Каковы особенности и принципы терапии антикоагулянтами при ПНГ?**

Терапия антикоагулянтами остается стандартным компонентом сопроводительного лечения ПНГ, однако имеет ряд существенных недостатков и ограничений.

Среди них низкая эффективность в предотвращении новых тромботических эпизодов в условиях неконтролируемого внутрисосудистого гемолиза, риск кровотечений, невозможность использования у больных с глубокой тромбоцитопенией и др.

Первичная профилактика тромбозов антикоагулянтами оправдана в случаях сочетания большого клона ПНГ ( $\geq 50$  % среди гранулоцитов) и дополнительных факторов риска, таких как беременность, оперативные вмешательства, травмы, инфекции, эпизоды острого повреждения почек, а также при наличии болевого синдрома. В подавляющем большинстве случаев первичная профилактика может быть безопасно отменена при достижении эффективного контроля гемолиза на фоне терапии экулизумабом.

Развитие любого тромботического эпизода при ПНГ является ургентной ситуацией и показанием к немедленной терапии экулизумабом и полной антикоагуляции низкомолекулярным гепарином, желательно под контролем анти-Ха-активности (целевой уровень 0,5–1,0), с дальнейшим переводом на прием варфарина. Отмена вторичной антикоагулянтной профилактики при терапии экулизумабом изучена недостаточно и в настоящее время не рекомендуется.

Пока мы имеем очень небольшой опыт использования новых антикоагулянтов для приема внутрь при ПНГ. Литературные данные ограничены описанием отдельных случаев, поэтому их использование не может быть рекомендовано в рутинной практике.

## **22. Исчезновение клона ПНГ, спонтанное или в результате лечения, — всегда ли благоприятный сценарий развития этого редкого заболевания? Почему?**

И да, и нет. Безусловно, исчезновение клона означает отсутствие субстрата болезни, внутрисосудистого гемолиза и снижение риска связанных с ним осложнений. Правда, чаще мы видим не полное исчезновение, а уменьшение клона до уровня менее 10 %, когда гемолиз становится незначимым и не требует специального лечения. Другой вариант исчезновения клона ПНГ является результатом аллотКМ, но в ряде случаев развивается отторжение трансплантата и восстановление собственного кроветворения, но только за счет клона ПНГ.

Однако спонтанное исчезновение клона может быть проявлением по крайней мере двух очень неблагоприятных сценариев. Первый связан с истощением клона ПНГ без восстановления нормального кроветворения. Речь идет о тотальной и, как правило, рефрактерной костномозговой недостаточности с очень высоким риском для пациента. В такой ситуации мы говорим: «Лучше иметь активное кроветворение из клона ПНГ, чем не иметь никакого». Второй неблагоприятный сценарий обусловлен появлением нового, очень агрессивного «игрока» — МДС, или лейкемического клона, который, собственно, и вытесняет клон ПНГ. Крайне редко лейкемический клон возникает внутри клона ПНГ, т. е. бластные клетки GPI-негативны. В обоих неблагоприятных сценариях реальной альтернативы аллотКМ в настоящее время нет.

### 23. Каковы особенности ПНГ у детей?

Наш Центр имеет уникальную возможность работать как со взрослыми больными, так и с детьми, что позволяет проводить сравнительный анализ характера течения, эффективности терапии, прогноза ПНГ. В связи с этим хотел бы адресовать коллег к недавней публикации нашей группы по этой проблеме.

Согласно литературным источникам, ПНГ у детей составляют около 10 % всех случаев. В нашей базе данных в возрасте до 18 лет диагноз гемолитической ПНГ был установлен у 30 больных, что составляет 8 % всей когорты.

Принято считать, что ключевой особенностью ПНГ у детей является доминирование случаев с выраженной костномозговой недостаточностью. Действительно, среди указанных 30 больных АА/ПНГ имела в 21 (70 %) случае, а классическая форма была диагностирована только у 9 (30 %) детей.

Однако следует обратить внимание, что анамнестически определенный дебют классической ПНГ в детском возрасте встречался значительно чаще ( $n = 27$ ). Первично устанавливались различные ошибочные диагнозы (АИГА, ИТП, МДС, системная красная волчанка, дефицитные состояния и др.). Таким образом, превалирование АА/ПНГ является не столько биологической особенностью, сколько следствием слабого распознавания дебюта классической ПНГ в детском возрасте.

Клинические проявления внутрисосудистого гемолиза в дебюте заболевания не зависели от возраста пациента к этому времени. С одинаковой частотой развивалась слабость (98 % у детей vs 96 % у взрослых), гемоглобинурия (51 vs 55 %), боль (39 vs 45 %), желтуха (46 vs 52 %), дисфагия (21 vs 28 %). И отдаленный прогноз ПНГ, дебютировавшей у детей, принципиально не отличается от такового у взрослых. Это касается кумулятивной частоты тромбозов, острого повреждения почек и, самое важное, выживаемости больных.

Особенностью терапевтической тактики у детей следует признать более обоснованное и широкое рассмотрение аллоТКМ как излечивающей опции.

### 24. Можно ли планировать беременность при ПНГ?

К счастью, Евгений Александрович, этот вопрос становится все более частым, что служит надежным индикатором достигнутого прогресса в лечении заболевания. Планирование беременности при ПНГ касается половины всех больных, поскольку именно эта часть представлена женщинами детородного возраста.

Беременность и послеродовой период сопровождаются физиологической активацией комплемента и гиперкоагуляцией. Кроме того, у пациенток с АА, получавших ИСТ, в период и после беременности может углубляться цитопения или развиваться рецидив заболевания. Все это служит основой более тяжелого течения ПНГ и повышения риска развития осложнений как ПНГ, так и беременности.

В базе данных ПСПбГМУ им. И.П. Павлова до внедрения таргетной терапии только половина беременностей при активной ПНГ завершилась рождением

живого ребенка, а у каждой четвертой женщины, вне зависимости от прерывания или вынашивания беременности, развились тромбозы и эпизоды острого повреждения почек. Прогноз исходов беременности при ПНГ радикально изменился на фоне таргетной терапии. Подобный опыт быстро накапливается в России. В опубликованном многоцентровом анализе тромботических и органных осложнений у пациенток не отмечалось и только 1 из 17 беременностей имела неблагоприятный исход с гибелью глубоко недоношенного ребенка. На данный момент в России уже более 25 пациенток с ПНГ стали матерями на фоне таргетной терапии.

Решение о планировании беременности должно быть тщательно взвешенным и приниматься только после детальной оценки исходного клинического статуса пациентки при условии надежного контроля гемолиза на фоне регулярной терапии экулизумабом или возможности ее быстрого начала. Кроме того, в случаях АА/ПНГ должен быть документирован устойчивый гематологический ответ. Следует учитывать возможность развития прорывного гемолиза и необходимость временного повышения дозы или сокращения интервалов между введениями экулизумаба. Препарат в следовых концентрациях обнаруживается в пуповинной крови, но не снижает активность комплемента у новорожденных. Естественное вскармливание при использовании экулизумаба не противопоказано, поскольку препарат не определяется в грудном молоке.

Ведение беременности при ПНГ возможно только при условии тесного взаимодействия акушеров-гинекологов и гематологов, тщательного клинического и лабораторного мониторинга проявлений гемолиза, недостаточности костного мозга, а также осторожности в отношении осложнений беременности (плацентарная недостаточность, преэклампсия и др.).

### 25. В какой из известных международных информационных систем можно найти постоянно обновляющуюся рекомендательную информацию о ПНГ?

Я бы скорее говорил не об информационных системах, а о международных, и в особенности национальных, рекомендациях по диагностике и лечению ПНГ. Обсуждая ПНГ, как и другие редкие болезни, мы понимаем трудность достижения высшего уровня доказательности. Тем не менее мы довольно хорошо представляем, в каких группах пациентов необходимо исключать этот диагноз, какие методы для этого использовать, как классифицировать и определять прогноз, как оптимально лечить больных на текущем этапе. По всем этим вопросам я бы адресовал читателей к текущим национальным рекомендациям, которые были опубликованы в 2014 г.

### 26. А что в перспективе? Как Вы видите терапию ПНГ в будущем?

В ближайшей перспективе у нас будут оставаться два принципиальных подхода: аллоТКМ и таргетная антикомплемментарная терапия. Мы знаем, что до по-

ловины всех больных с активной гемолитической ПНГ имеют в анамнезе АА. По сути, лучшим способом не допустить развитие болезни в этой группе является аллоТКМ еще на этапе лечения АА, а перспектива состоит в оптимизации технологии, которая позволила бы проводить процедуру более безопасно и охватывать большее число больных. В этом аспекте чрезвычайно важно дальнейшее развитие национальной программы неродственного донорства костного мозга, которая позволит проводить ТКМ значительно большему числу пациентов. С другой стороны, ТКМ с подготовкой антикомплентарными препаратами при АА/ПНГ может стать более распространенной.

В области антикомплентарной терапии в дополнение к экулизумабу мы ожидаем целый спектр молекул следующего поколения как к традиционной мишени C5, так и другим мишеням (C3, фактор Н и др.). К настоящему времени завершено исследование равулизумаба — инновационного ингибитора C5, имеющего в 4 раза более длительный период полувыведения по сравнению с экулизумабом. Равулизумаб отличается от экулизумаба заменой 4-х аминокислот, которая изменяет фармакокинетику и фармадинамику препарата. Эти аминокислотные замещения способствуют эндосомальной диссоциации комплекса равулизумаб-C5 с последующей лизосомальной деградацией молекулы C5, в то же время позволяя равулизумабу возвращаться в сосудистое русло благодаря усилению сродства к неонатальным Fc рецепторам. Важными достоинствами равулизумаба является стабильность ингибиции терминальных этапов активации комплемента и, соответственно, клинической эффективности. И конечно, введение препарата 1 раз в 8 нед. намного удобнее для пациента. Должен особо отметить существенный вклад России в исследование этого препарата.

Долгосрочная перспектива лечения ПНГ может быть связана с более глубоким пониманием закономерностей возникновения и прогрессирования болезни. Так, к настоящему времени мы практически ничего не можем сделать на этапе экспансии клона ПНГ у больных АА и, если пациент не является кандидатом на ТКМ, мы вынуждены просто наблюдать, как клон ПНГ нарастает, пока на определенном этапе проблема не станет клинически значимой. При точной идентификации драйверных мутаций, ответственных за экспансию клона, может появиться возможность сдерживать этот процесс с помощью новых таргетных препаратов. Однако сама по себе стратегия подавления или попыток эрадикации клона ПНГ, вероятно, окажется тупиковой, поскольку без восстановления нормального поликлонального GPI+ кроветворения приведет к тотальной костномозговой недостаточности и необходимости выполнения ТКМ.

Однако все это останется сугубо теоретическими рассуждениями без глубокого и всестороннего понимания проблемы в профессиональном сообществе. В связи с этим центры, в которых концентрируются пациенты с таким редким заболеванием, несут главную ответственность — делиться знаниями и опытом коллегами, а еще лучше — вовлекать практических врачей в анализ проблемы. В 2017 г. мы издали уникальный в своем роде сборник актуальных кли-

нических наблюдений ПНГ, в составлении которого участвовало 75 авторов, представляющих 6 федеральных медицинских центров и 9 гематологических отделений. Я еще раз хотел бы подчеркнуть важность многоцентровой кооперации и поблагодарить всех врачей, активно сотрудничающих с нами.

Помощь пациентам с редкими заболеваниями, включая ПНГ, является одним из приоритетов нашего Центра и всецело поддерживается профессором Борисом Владимировичем Афанасьевым. В результате знания и опыт моих молодых коллег в области АА и ПНГ сейчас намного превосходят те, что были у нас в начале пути. И это, пожалуй, главный источник моего оптимизма в оценке перспектив понимания проблемы. Надеюсь, что настоящее интервью также послужит этой цели.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Гаврилов О.К., Файнштейн Ф.Э., Турбина Н.С. Депрессии кроветворения. М.: Медицина, 1987. 256 с.  
[Gavrilov OK, Fainshtein FE, Turbina NS. Depressii krovotvoreniya. (Hematopoeisis depressions.) Moscow: Meditsina Publ.; 1987. 256 p. (In Russ)]
2. Кулагин А.Д., Афанасьев Б.В. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия: актуальные вопросы и ответы для практических врачей. В сб.: Пароксизмальная ночная гемоглобинурия. Актуальные клинические наблюдения редкого заболевания. Под ред. А.Д. Кулагина, Б.В. Афанасьева. М.: Практическая медицина, 2017. 136 с.  
[Kulagin AD, Afanas'ev BV. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current issues for practitioners. In: Kulagin AD, Afanas'ev BV, eds. Parokszimal'naya nochnaya gemoglobinuriya. Aktual'nye klinicheskie nablyudeniya redkogo zabolovaniya. (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Current clinical observations of a rare disease.) Moscow: Prakticheskaya meditsina Publ.; 2017. 136 p. (In Russ)]
3. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В. и др. Клиническая манифестация и ошибки диагностики классической пароксизмальной ночной гемоглобинурии: анализ 150 наблюдений. Клиническая онкогематология. 2017;10(3):333–41. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-333-341.  
[Kulagin AD, Klimova OU, Dobronravov AV, et al. Clinical Manifestation and Errors in the Diagnosis of Classical Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A case series of 150 patients. Clinical oncohematology. 2017;10(3):333–41. doi: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-333-341. (In Russ)]
4. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В. и др. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей и взрослых: сравнительный клинический профиль и долгосрочный прогноз. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2018;17(3):11–21. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21.  
[Kulagin AD, Klimova OU, Dobronravov AV, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in children and adults: comparative clinical profile and long-term prognosis. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2018;17(3):11–21. doi: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21. (In Russ)]
5. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. Онкогематология. 2014;9(2):20–8. doi: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-20-28.  
[Kulagin AD, Lisukov IA, Ptushkin VV, et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Oncohematology. 2014;9(2):20–8. doi: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-20-28. (In Russ)]
6. Новичкова Г.А., Петрова У.Н., Калинина И.И., Масчан А.А. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей (обзор литературы). Доктор.Ру. 2016;5(122):15–20.  
[Novichkova GA, Petrova UN, Kalinina II, Maschan AA. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in Children: Literature Review. Doktor.Ru. 2016;5(122):15–20. (In Russ)]
7. Шашелева Д.А., Масчан А.А., Шелихова Л.Н. и др. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток с деплецией альфа/бета Т-лимфоцитов и коротким курсом экулизумаба у подростков и молодых взрослых с пароксизмальной ночной гемоглобинурией. Терапевтический архив. 2018;90(7):57–64. doi: 10.26442/terarkh201890757-64.  
[Shasheleva DA, Maschan AA, Shelikhova LN, et al. Hematopoietic stem cell transplantation with alpha/beta T-lymphocyte depletion and short course of eculizumab in adolescents and young adults with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Terapevticheskii arkhiv. 2018;90(7):57–64. doi: 10.26442/terarkh201890757-64. (In Russ)]
8. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78 (4):211–30. doi: 10.1002/cyto.b.20525.
9. Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical manifestation, haematology, and nature of the disease. Series Haematol. 1972;5(3):3–23.

10. de Guibert S, de Latour RP, Varoquaux N, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and pregnancy before the eculizumab era: the French experience. *Haematologica*. 2011;96(9):1276–83. doi: 10.3324/haematol.2010.037531.
11. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008;112(8):3099–106. doi: 10.1182/blood-2008-01-133918.
12. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995;333(19):1253–8. doi: 10.1056/NEJM199511093331904.
13. Hillmen P, Muus P, Roth A, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013;162(1):62–73. doi: 10.1111/bjh.12347.
14. Kim JS, Jang JH, Yoon SS, et al. Distinct subgroups of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with cytopenia: results from South Korean National PNH Registry. *Ann Hematol*. 2016;95(1):125–33. doi: 10.1007/s00277-015-2511-z.
15. Kulagin A, Golubovskaya I, Ivanova M, et al. Incidence and risk factors for hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in aplastic anemia (AA) patients. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(Suppl 1):S42–3. doi: 10.1038/bmt.2014.43.
16. Kulagin A, Klimova O, Dobronravov A, et al. Incidence, clinical characteristics and outcome of symptomatic thromboembolic events (TE) in 276 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2016;128(22):5072.
17. Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol*. 2014;164(4):546–54. doi: 10.1111/bjh.12661.
18. Kulagin A, Klimova O, Rudakova T, et al. Benefits and limitations of long-term eculizumab treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Real-world data from large cohort study in Russia. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2018;132:2589; doi: 10.1182/blood-2018-99-120139.
19. Kulagin A, Klimova O, Rudakova T, et al. Eculizumab followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/severe aplastic anemia (hPNH/SAA). *Bone Marrow Transplant*. 2016;51(1):S90. doi: 10.1038/bmt.2016.46.
20. Lee JW, Jang JH, Kim JS, et al. Clinical signs and symptoms associated with increased risk for thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from a Korean Registry. *Int J Hematol*. 2013;97(6):749–57. doi: 10.1007/s12185-013-1346-4.
21. Loschi M, Porcher R, Barraco F, et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2016;91(4):366–70. doi: 10.1002/ajh.24278.
22. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*. 2004;126(1):133–8. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04992.x.
23. Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, et al. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2012;156(3):383–7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x.
24. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004;83(3):193–207. doi: 10.1097/01.md.0000126763.68170.46.
25. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, et al. Genetic Variants in C5 and Poor Response to Eculizumab. *N Engl J Med*. 2014;370(7):632–9. doi: 10.1056/NEJMoa1311084.
26. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106(12):3699–709. doi: 10.1182/blood-2005-04-1717.
27. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005;293(13):1653–62. doi: 10.1001/jama.293.13.1653.
28. Schrezenmeier H, Muus P, Socie G, et al. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*. 2014;99(5):922–9. doi: 10.3324/haematol.2013.093161.
29. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4529–38. doi: 10.1172/JCI74747.
30. Sipol AA, Babenko EV, Borisov VI, et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. *Hematology*. 2015;20(1):31–8. doi: 10.1179/1607845414Y.0000000162.
31. Socie G, Mary JY, de Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet*. 1996;348(9027):573–7. doi: 10.1016/S0140-6736(95)12360-1.
32. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993;73(4):703–11. doi: 10.1016/0092-8674(93)90250-T.
33. Vinogradova M, Kulagin A, Kirsanova T, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treatment during pregnancy. *Haematologica*. 2017;102(Suppl 2):289.
34. Ware RE, Hall SE, Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med*. 1991;325(14):991–6. doi: 10.1056/NEJM199110033251403.