

РЕДКИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ И СИНДРОМЫ

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у пациентов с апластической анемией: проблемы, особенности, анализ клинического наблюдения

*Е.Р. Шилова¹, Т.В. Глазанова¹, Ж.В. Чубукина¹,
О.Е. Розанова¹, М.Н. Зенина¹, А.В. Сельцер¹,
В.И. Ругаль¹, В.А. Балашова¹, В.А. Кобылянская¹,
И.И. Кробинец¹, В.Ю. Удальева¹, И.И. Зотова¹,
Л.В. Стельмашенко¹, Н.А. Романенко¹, Т.Б. Замотина¹,
И.В. Хоршева¹, С.В. Волошин^{1,2,3}*

¹ ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА», ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024

² ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, ул. Академика Лебедева, д. 6, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 194044

³ ФГБВОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191015

РЕФЕРАТ

Актуальность и цели. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — заболевание, обусловленное приобретенным клональным нарушением гемопоэтических стволовых клеток с повышенной чувствительностью мембраны клеток клона к комплементу. ПНГ может быть как самостоятельным заболеванием, так и связанным с другими патологическими состояниями, характеризующимися костномозговой недостаточностью, в первую очередь с апластической анемией (АА). При АА, ассоциированной с ПНГ (АА/ПНГ), величина патологического клона исходно может быть различной. У части больных наблюдается постепенное нарастание ПНГ-клона, появление признаков внутрисосудистого гемолиза и трансформация в классическую гемолитическую ПНГ. В таком случае важно оценить клиническую ситуацию и определить наличие показаний к терапии ингибиторами комплемента. В ходе таргетной терапии необходимо оценить эффективность лечения, основанного на контроле комплемент-обусловленного гемолиза, и определить возможные причины недостаточного эффекта.

Материалы и методы. Работа построена на обсуждении 1 клинического наблюдения. Пациентка, 1964 г.р., с первичным диагнозом АА находилась под наблюдением в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА» с 1989 г. по настоящее время. Лечение больной включало гемокомпонентную терапию, антилимфоци-

RARE HEMATOLOGICAL TUMORS AND SYNDROMES

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in Patients with Aplastic Anemia: Challenges, Characteristics, and Analysis of Clinical Experience

*ER Shilova¹, TV Glazanova¹, ZhV Chubukina¹,
OE Rozanova¹, MN Zenina¹, AV Seltser¹, VI Rugal¹,
VA Balashova¹, VA Kobilyanskaya¹, II Krobinets¹,
VYu Udal'eva¹, II Zotova¹, LV Stelmashenko¹,
NA Romanenko¹, TB Zamotina¹, IV Khorsheva¹,
SV Voloshin^{1,2,3}*

¹ Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024

² SM Kirov Military Medical Academy, 6 Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, Russian Federation, 194044

³ II Mechnikov North-Western State Medical University, 41 Kirochnaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191015

ABSTRACT

Background & Aims. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a disease caused by an acquired clonal disorder of hematopoietic stem cells with clone cell membrane hypersensitivity to the complement. PNH can exist as an independent disease and can also be associated with other pathological conditions characterized by bone marrow deficiency, first of all with aplastic anemia (AA). In PNH-associated AA (AA/PNH) pathological clones may be initially of different size. In some patients a gradual growth of PNH clone is observed together with occurring signs of intravascular hemolysis and transformation into classical hemolytic PNH. In this case it is important to assess the clinical situation and determine eligibility for complement inhibitor therapy. During targeted therapy it is necessary to assess the efficacy of treatment based on monitoring of complement-mediated hemolysis and to identify probable reasons for insufficient effect.

Materials & Methods. The paper deals with 1 clinical case. A female patient born in 1964, with initial diagnosis of AA was followed-up from 1989 till present at the Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology. Her treatment included blood-component therapy, the use of antilymphocyte immunoglobulin, cyclosporine, plasmapheresis, eculizumab, and symptom-relieving drugs.

Results. The study deals with the case of transformation of non-severe AA with remission after immune-suppressive

тарный иммуноглобулин, циклоспорин, лечебный плазмаферез, экулизумаб и симптоматические средства.

Результаты. Представлен случай трансформации тяжелой АА с ремиссией после проведенной иммуносупрессивной терапии в классическую гемолитическую ПНГ. На собственном примере клинического наблюдения обсуждаются особенности течения, вопросы диагностики и лечения АА/ПНГ на различных этапах заболевания, причины неполного эффекта таргетной терапии.

Заключение. Приведенный клинический случай подтверждает актуальность современных методов исследования по выявлению ПНГ-клона на ранних этапах диагностики АА и динамического наблюдения в связи с вероятностью нарастания величины клона с ПНГ-фенотипом, особенно на этапе восстановления гемопоза. Определение размера ПНГ-клона и уровня сывороточной лактатдегидрогеназы необходимо для своевременного изменения стратегии лечения с переходом на долгосрочный таргетный контроль гемолиза, что позволяет избежать необратимых изменений внутренних органов и тяжелых осложнений. При недостаточном эффекте таргетной терапии с сохранением анемии показано проведение пробы Кумбса, поскольку вероятен С3-опосредованный внесосудистый гемолиз.

Ключевые слова: апластическая анемия, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, ПНГ-фенотип, ПНГ-клон, таргетная терапия, С3-опосредованный гемолиз.

Получено: 24 декабря 2018 г.

Принято в печать: 29 мая 2019 г.

Для переписки: Елена Романовна Шилова, ул. 2-я Советская, д. 16, Санкт-Петербург, Российская Федерация, 191024; тел.: +7(981)129-09-77; e-mail: rniht@mail.ru

Для цитирования: Шилова Е.Р., Глазанова Т.В., Чубукина Ж.В. и др. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у пациентов с апластической анемией: проблемы, особенности, анализ клинического наблюдения. Клиническая онкогематология. 2019;12(3):319–28.

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-319-328

therapy into classical hemolytic PNH. The case report describes the characteristic features, AA/PNH diagnosis and treatment issues at different stages of the disease, and the reasons for incomplete effect of targeted therapy.

Conclusion. The case under discussion confirms the relevance of current methods of detecting PNH clone at early stages of AA diagnosis and dynamic follow-up with respect to a probable growth of clone with PNH phenotype, especially at the stage of hematopoietic recovery. Determination of PNH clone size and lactate dehydrogenase serum level is required for timely amendment of treatment strategy with a switch to long-term targeted monitoring of hemolysis which allows to prevent irreversible visceral changes and severe complications. In case of insufficient effect of targeted therapy with ongoing anemia Coombs test is recommended because of probability of C3-mediated extravascular hemolysis.

Keywords: aplastic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH phenotype, PNH clone, targeted therapy, C3-mediated hemolysis.

Received: December 24, 2018

Accepted: May 29, 2019

For correspondence: Elena Romanovna Shilova, 16 2-ya Sovetskaya str., Saint Petersburg, Russian Federation, 191024; Tel.: +7(981)129-09-77; e-mail: rniht@mail.ru

For citation: Shilova ER, Glazanova TV, Chubukina ZhV, et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in Patients with Aplastic Anemia: Challenges, Characteristics, and Analysis of Clinical Experience. Clinical oncohematology. 2019;12(3):319–28 (In Russ).

doi: 10.21320/2500-2139-2019-12-3-319-328

ВВЕДЕНИЕ

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ, болезнь Маркиафавы—Микели) — заболевание, обусловленное приобретенным клональным нарушением гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Заболевание характеризуется нестабильностью мембраны клеток клона ПНГ с повышенной их чувствительностью к комплементу за счет сниженной экспрессии гликозилфосфатидилинозитольных (ГФИ) якорных белков. Якорные белки обеспечивают защиту собственных клеток от деструктивного воздействия активированного комплемента, предотвращают образование мембран-атакующего комплекса (МАК), формируют защитный барьер эритроцитов от комплемент-обусловленного лизиса. Поскольку в

основе формирования ПНГ-клона лежат изменения на уровне ГСК, нарушенная экспрессия якорных белков может быть обнаружена на различных клеточных линиях. В настоящее время стандартом диагностики является метод высокочувствительной проточной цитометрии с использованием скрининговой панели с маркерами CD55 и CD59 (для ретикулоцитов и эритроцитов), CD24/FLAER (для гранулоцитов), CD14/FLAER (для моноцитов) [1, 2]. При проведении таких исследований можно определять популяцию клеток крови с дефицитом ГФИ-якорных белков (ПНГ-клон) с точностью до 0,01 %. Размер клона менее 1 % обычно клинического значения не имеет и не сопровождается существенными отклонениями клинико-лабораторных показателей. Первые клинические и лабораторные проявления заболевания, связанные с наличием ПНГ-клона и внутрисосудистым гемолизом,

выявляются, как правило, при его размере более 10 % от общего количества клеток крови [1, 3, 4]. Характерными клиническими проявлениями ПНГ являются гемолитическая анемия со внутрисосудистым гемолизом и тромбозы, обусловленные сложным патофизиологическим механизмом (сочетанием повышенной активации тромбоцитов и эндотелия, нарушением фибринолиза, вазоконстрикцией и др.) [5, 6].

Взаимосвязь ПНГ с другими заболеваниями, протекающими с костномозговой недостаточностью, в первую очередь с апластической анемией (АА), известна давно. Согласно современным данным, частота обнаружения ПНГ-клона у больных АА достигает 50 % и более [3, 7–9]. Характер такой взаимосвязи до настоящего времени не вполне понятен. По-видимому, в его основе лежат иммунопатологические механизмы. Высказывается предположение о наличии гипермутации в гене PIG-A в стволовых клетках при АА [10, 11].

В соответствии с принятой в настоящее время международной классификацией выделяют классическую гемолитическую ПНГ, субклиническую форму с малой популяцией ПНГ-клеток и отсутствием признаков гемолиза, а также отдельный вариант — ПНГ на фоне заболеваний с костномозговой недостаточностью, в первую очередь это АА, связанная с ПНГ (АА/ПНГ) [12]. Возможны сочетанные формы АА/ПНГ, при которых имеются клинические и/или лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза, а в крови определяется значительный клон клеток с ПНГ-фенотипом. Встречается и субклиническая форма заболевания (АА/субклиническая ПНГ), диагностируемая у пациентов без клинических и лабораторных признаков гемолиза, но при наличии минорного клона клеток с ПНГ-фенотипом (как правило, менее 1 %). У определенной части больных с исходным субклиническим течением наблюдается постепенное нарастание размеров патологического клона, появление признаков хронического внутрисосудистого гемолиза. Последний оценивается по уровню сывороточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Такая динамика отмечается обычно при исходной величине клона более 10 % и положительных результатах иммуносупрессивной терапии АА с восстановлением костномозгового кроветворения [3, 4, 8, 13]. В итоге возможна трансформация в классическую гемолитическую ПНГ.

Подходы к ведению больных с наличием ПНГ-клона зависят от нозологической формы, размера клона, наличия и степени активности внутрисосудистого гемолиза, наличия и/или повышенного риска осложнений, связанных с гемолизом.

В первую очередь как при классической ПНГ, так и при сочетанных патологиях с АА и другими заболеваниями необходимо оценить степень активности имеющегося гемолиза и риск развития тяжелых осложнений, включая тромботические, поражение почек, повышение легочного давления. Несмотря на закономерно повышенное разрушение эритроцитов с дефектом экспрессии ГФИ-якорных белков, уровень гемоглобина не может служить достоверным индикатором активности заболевания, поскольку при ПНГ даже в отсутствие анемии возможен клинически значимый гемолиз с повышенным риском связанных

с ним осложнений, в первую очередь — тромботических. Наиболее информативным показателем — биомаркером гемолиза — является уровень ЛДГ в сыворотке, поскольку ЛДГ напрямую коррелирует с уровнем свободного гемоглобина, а превышение ЛДГ $\geq 1,5$ раза верхней границы нормы (ВГН) почти в 5 раз увеличивает риск смертности у больных ПНГ и является наиболее чувствительным предиктором тромбозов [12, 14]. Пациенты с критическим превышением уровня ЛДГ, свидетельствующим о высокой активности заболевания, требуют тщательного наблюдения и активного лечения.

Как показали многочисленные исследования, традиционные средства поддерживающей терапии, включая компоненты крови, методы экстракорпоральной гемокоррекции, антикоагулянты, существенно не влияют на течение заболевания и не предотвращают тяжелые, угрожающие жизни осложнения. Проведение трансплантации костного мозга при наличии хронического внутрисосудистого гемолиза сопряжено с высоким риском осложнений. Показания к ее выполнению при сочетанных вариантах заболевания определяются тяжестью АА, т. е. общепринятыми стандартными показаниями к трансплантации при тяжелой АА. В настоящее время имеются возможности применения таргетной терапии, кардинально меняющей течение и прогноз ПНГ. Назначение такой терапии ограничено ее высокой стоимостью, а лечение является, в принципе, пожизненным. В связи с этим особенно важно оценить индивидуальные риски у каждого больного ПНГ и определить показания к назначению таргетного препарата экулизумаба, который представляет собой моноклональное антитело, блокирующее образование терминального комплекса активации комплемента на этапе активации C5-компонента комплемента и формирования МАК. Препарат не излечивает заболевание и не уменьшает размер ПНГ-клона, но является единственным эффективным средством патогенетической терапии [6, 12, 15].

При сочетании АА и гемолитической ПНГ тактика лечения может быть комбинированной и направленной как на лечение аплазии с использованием стандартных методов, так и на коррекцию патологических проявлений, обусловленных ПНГ, включая использование таргетной терапии.

В настоящее время накоплен опыт долгосрочного безопасного использования таргетной терапии у больных ПНГ, в т. ч. в сочетании с иммуносупрессивной терапией по поводу АА. Отмечен быстрый положительный эффект у абсолютного большинства пациентов. Изучены причины недостаточной эффективности экулизумаба у части больных, которая может быть связана с генетическим полиморфизмом молекулы C5, особенностями фармакокинетики и фармакодинамики препарата, присоединением антителообусловленного внесосудистого гемолиза, сохранением аплазии кроветворения при сочетанных формах [15–17].

Мы представляем клиническое наблюдение трансформации нетяжелой АА (по стандартным критериям В.М. Samitta [18]) в манифестную классическую ПНГ с наличием показаний к таргетной терапии.

КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Больная И., 1964 года рождения, находится под наблюдением в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА» с 1989 г. по настоящее время. Основанием для постановки первоначального диагноза АА послужили клинические проявления, связанные преимущественно с анемическим синдромом, и данные комплексного обследования, включавшего повторные миелограммы и трепанобиопсию. Показатели соответствовали диагнозу нетяжелой АА. На начальных этапах колебания уровня гемоглобина были в пределах 75–95 г/л, эритроцитов — $2,5\text{--}3,7 \times 10^{12}/\text{л}$ при уровне ретикулоцитов 0,7–0,9 %, лейкоцитов — $1,5\text{--}3,5 \times 10^9/\text{л}$ (гранулоциты — $0,6\text{--}1,3 \times 10^9/\text{л}$), тромбоцитов — $30\text{--}70 \times 10^9/\text{л}$.

Особенностью заболевания у этой пациентки была близкая к норме клеточность костного мозга по аспирату при сужении нейтрофильного ростка (около 10 %) и относительной сохранности эритроидного ростка. В анамнезе обращали на себя внимание частые острые респираторные вирусные инфекции и бронхиты (до 5–6 раз в год) с затяжным течением.

Полная ремиссия с нормализацией показателей гемограммы констатирована в 1991 г. после 2 курсов комбинированной терапии антилимфоцитарным иммуноглобулином с глюкокортикоидами и приема андрогенов. Гемоглобин стабилизировался на уровне 120–123 г/л, число лейкоцитов колебалось в пределах $4\text{--}6 \times 10^9/\text{л}$, содержание тромбоцитов составляло $120\text{--}130 \times 10^9/\text{л}$. Однако через 6 мес. после достижения ремиссии в контрольных анализах крови стали отмечаться значительные колебания основных показателей с тенденцией к развитию анемии нормохромного характера, с периодическим снижением лейкоцитов до $2,5\text{--}2,6 \times 10^9/\text{л}$. Число тромбоцитов колебалось от 100 до $230 \times 10^9/\text{л}$, периодически выявлялся умеренный ретикулоцитоз. Данные миелограммы и гистологическая картина в трепанобиоптате свидетельствовали о нормальной клеточности костного мозга с восстановлением всех ростков кроветворения, что не позволяло интерпретировать снижение показателей крови как рецидив АА. В то же время при исследовании костного мозга обращало на себя внимание расширение эритроидного ростка (до 60 %) с наличием мегалобластоидных форм в большинстве повторных миелограмм. При этом уровень витамина B_{12} и фолатов в сыворотке соответствовал нормальным значениям. Выявлялись диспластические изменения в виде макрогенераций промиелоцитов с уродливыми ядрами, микрогенерациями мегакариоцитов по данным цитологического анализа, нарушение строения эритроидных островков и интрамедуллярного расположения бластных клеток по данным трепанобиопсии костного мозга.

В связи с этим на начальных этапах обсуждался вопрос о наличии миелодиспластического синдрома (МДС). Однако отсутствие критерияльно значимых диспластических изменений со стороны клеток костного мозга, нормальный кариотип костномозговых клеток делали диагноз МДС сомнительным. По факту обращавшего на себя внимание периодически

выявлявшегося умеренного ретикулоцитоза было высказано предположение о гемолитическом характере анемии. Учитывая отрицательный тест Кумбса, наличие в анализах мочи кровяного детрита и (периодически) гемосидерина, были проведены тесты на повышенную чувствительность эритроцитов к активированному комплементу. Результаты исследования не были однозначными, поскольку первоначально проба Хема была отрицательной при положительной сахарозной пробе. Тем не менее по данным повторных исследований у больной была диагностирована ПНГ.

С 1994 г. стали отмечаться отчетливые клинические признаки гемолиза (иктеричный оттенок кожи и склер, потемнение мочи), появились гемолитические кризы, дальнейшее снижение гемоглобина (до 60 г/л), сохранялась тенденция к лейкопении. В период кризов наблюдалась темная (до черной) моча, боль в поясничной области, периодически повышался билирубин до 35 ммоль/л преимущественно за счет непрямой фракции. В периоды обострения отмечались явления дисфагии, субфебрильная температура тела. Усиление гемолиза провоцировалось респираторными инфекциями, физическими нагрузками, приемом препаратов железа или возникало без явных провоцирующих факторов.

По мере прогрессирования заболевания стали появляться признаки дефицита железа и явления нефропатии в виде транзиторной альбуминурии.

Состояние больной расценивалось как трансформация АА в гемолитическую ПНГ.

Лечение включало прием препаратов фолиевой кислоты, клопидогрела для профилактики тромбоцитарных осложнений, инфузионную, дезинтоксикационную и глюкокортикоидную терапию короткими курсами, лечебный плазмаферез во время гемолитических кризов, трансфузии эритроцитарной массы (преимущественно, отмытые или размороженные эритроциты по индивидуальному подбору). С октября 1998 г. по август 1999 г. была предпринята попытка терапии циклоспорином А в дозе 3 мг/кг в сутки. Основанием для его назначения послужило появление работ, указывающих на положительный опыт применения циклоспорина А у данной категории больных с улучшением гематологических параметров, снижением трансфузионной зависимости [19, 20]. Был получен определенный положительный эффект в виде уменьшения интенсивности гемолиза, потребности в гемотрансфузиях, но с сохранением вялотекущего гемолиза и анемии средней степени тяжести. Коррекция дефицита железа была затруднена из-за плохой переносимости железосодержащих препаратов (усиление гемолиза), а заместительная гемоконпонентная терапия сопровождалась развитием посттрансфузионных реакций.

Следует отметить, что в дебюте заболевания тесты на наличие ауто- и аллоантител к клеткам крови были отрицательными. Однако с 1996 г. появились периодические гипертермические и аллергические реакции на трансфузии компонентов крови, что могло быть связано с реакцией на белки донорской плазмы или, в случае использования отмытой эритроцитарной взвеси, на цитрат натрия, являющийся компонентом консервирующего раствора. В 2006 г. у пациентки

Таблица 1. Результаты обследования пациентки при госпитализации (ноябрь 2004 г.)

Показатель	Результат исследования
Анализ крови	
Гемоглобин, г/л	69
Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	2,33
MCV, фл	100,4
MCH, пг	28,9
Лейкоциты, $\times 10^9/л$	4,3
Нейтрофилы, $\times 10^9/л$	3,1
Тромбоциты, $\times 10^9/л$	309
Билирубин общий/прямой, мкмоль/л	21,5/3,0
Свободный гемоглобин, г/л	0,28
Анализ мочи	
Удельный вес	1015
Белок, г/л	1,0
Эритроциты	1–2 в поле зрения
Лейкоциты	2–4–5 в поле зрения

МСН — среднее содержание гемоглобина в эритроците; MCV — средний объем эритроцитов.

были впервые выявлены антиэритроцитарные анти-С-аллоантитела, а в 2011 г. — анти-Е-аллоантитела как результат многочисленных трансфузий компонентов крови, проводившихся в различных лечебных учреждениях. Аутоантитела к эритроцитам за период с 1989 по 2014 г. не обнаруживались.

В показателях серии коагулограмм существенных отклонений не выявлялось. Однако при проведении функциональной оценки тромбоцитов определялись признаки их повышенной внутрисосудистой активации с увеличением суммы активных форм до 45–47 % (пределы нормальных колебаний от 7,9–13,7 до 17,7–25,3 %). Это, наряду с данными о повышенном риске тромботических осложнений у данной категории больных, послужило причиной профилактического назначения клопидогрела.

Из дополнительных лабораторных анализов в 2005 г. проведено исследование функциональной активности нейтрофилов методом Райта с использованием суточной инактивированной культуры *Staphylococcus aureus* штамма Р-209 [21]. Количественный анализ фагоцитарной активности гранулоцитов показал нормальное содержание фагоцитов. Качественный анализ выявил незначительное снижение поглотительной функции фагоцитов (снижено число фагоцитированных микробных частиц, приходящихся на 1 фагоцит, — 3,9 vs 4–9 в норме), при этом переваривающая функция была не нарушена, а процесс фагоцитоза характеризовался как заверченный (индекс завершенности фагоцитоза более 1).

Данные одного из обследований, проведенных при госпитализации в связи с очередным гемолитическим кризом в ноябре 2004 г., приведены в табл. 1. Пациентка при поступлении предъявляла жалобы на общую слабость, периодические тяжесть и ноющую боль в поясничной области, темную мочу до цвета чайной заварки в течение недели (рис. 1), одышку и сердцебиение при минимальной физической нагрузке. При осмотре обращала на себя внимание бледность с иктеричным оттенком, пастозность лица. При



Рис. 1. Вид мочи больной в период гемолитического криза

Fig. 1. Patient's urine during hemolytic crisis

пальпации увеличения лимфатических узлов, печени и селезенки не отмечено. Пульс 88 уд./мин в покое, АД 130/80 мм рт. ст. Границы сердца на 1 см расширены влево. В легких хрипов не прослушивалось. Живот мягкий, безболезненный. Умеренная чувствительность при поколачивании по поясничной области.

Пациентке проведены стерильная пункция и УЗИ брюшной полости, расширенное исследование свертывающей системы крови.

Количество миелокариоцитов в миелограмме — $112 \times 10^9/л$, клеток нейтрофильного ряда — 44,8 % без нарушения созревания, эритроидного ряда — 40 %. В клетках гранулоцитарного ряда отмечались умеренные признаки дисплазии: скудность специфической зернистости в цитоплазме созревающих форм. Эритроидный росток усилен за счет полихроматофильных форм (33 %), неэффективный, без признаков дисплазии. В препарате более 30 мегакариоцитов с преобладанием мезо- и микрогенераций с гипоплоидными ядрами. При цитогенетическом исследовании костного мозга кариотип нормальный — 46,XX.

По данным коагулограммы: протромбиновый индекс — 104 %, фибриноген — 3,5 г/л, тромбиновое время — 8 с, индекс АЧТВ — 0,84, D-димеры — 1000 нг/мл. Исследование показателей внутрисосудистой активации тромбоцитов: дискоциты — 78,5 %, дискоэхиноциты — 21,5 %, сфероциты — 0 %. Сумма активных форм тромбоцитов — 21,5 % (норма 7,9–17,7 %). Число тромбоцитов, вовлеченных в агрегаты, — 11,8 % (норма 6,1–7,4 %).

По данным УЗИ отмечены хронический некалькулезный холецистит, умеренное увеличение печени (правая доля 15,6 см, левая — 6 см), селезенки (12,0 \times 8,6 \times 6,0 см), хронический пиелонефрит, моче-кислый диатез.

Повторно были проведены исследования на наличие ПНГ-клона. В пробе Хема определено 58 % гемолизированных эритроцитов в сравнении с 7 % в контроле. При проведении сахарозной пробы гемолиз 97 vs 5 % в контроле.

Исследование методом проточной цитометрии (нестандартизованная методика, 2004 г.) показало снижение экспрессии антигена CD14 на моноцитах до 1,18 % (норма 95–99 %) и CD16 на нейтрофильных гранулоцитах до 2,19 % (норма 95–99 %), что также позволило предположить наличие ПНГ. Это заключение было сделано, исходя из существовавших на тот момент данных о сниженной при ПНГ экспрессии

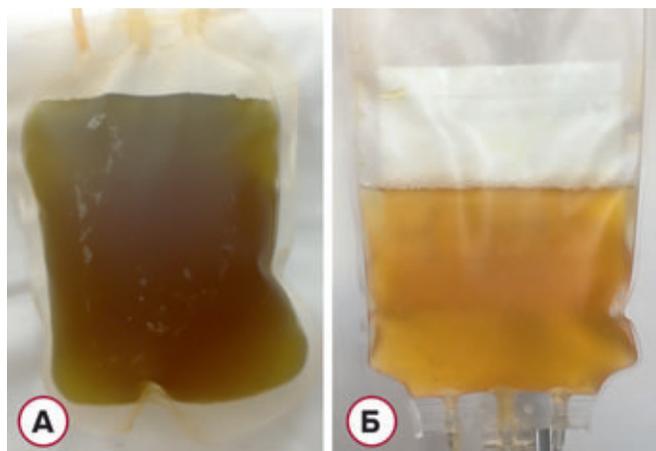


Рис. 2. Вид плазмы (А) больной и (Б) донора

Fig. 2. Plasma of (A) patient and (B) donor

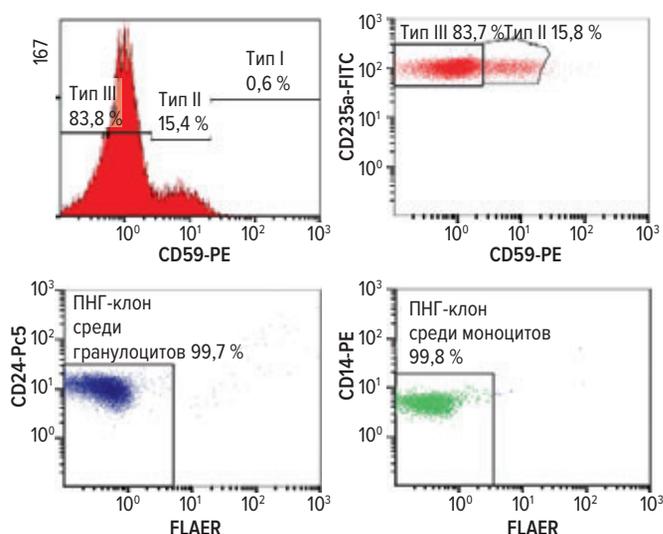


Рис. 3. Результат определения ПНГ-клона путем проточной цитофлуориметрии (26.09.2012 г.)

Fig. 3. Detection of PNH clone by means of flow cytometry (26.09.2012)

ГФИ-связанных белков на отдельных видах клеток крови [22, 23].

В период госпитализации проведена симптоматическая терапия, включавшая инфузионную дезинтоксикационную терапию, 5-дневный курс дексаметазона по 8 мг/сут с постепенной отменой, сеансы лечебного плазмафереза. Вид удаленной плазмы больной представлен на рис. 2.

Пациентка была выписана без клинических признаков активного гемолиза при уровне гемоглобина 82 г/л.

При дальнейшем наблюдении клинические и лабораторные показатели свидетельствовали о постоянном вялотекущем гемолизе с периодами обострений, гемолитических кризов при наличии провоцирующих моментов (респираторные вирусные инфекции, обострение имеющегося у пациентки хронического холецистита, прием лекарственных средств) или без видимых причин. Сохранялась анемия с периодическим снижением уровня гемогло-

бина до 63–70 г/л и склонностью к макроцитозу при нормальном уровне витамина B_{12} и фолиевой кислоты в сыворотке. Отмечался постоянный умеренный ретикулоцитоз, индекс продукции ретикулоцитов колебался в пределах 0,8–4,9. В повторных анализах мочи выявлялся гемосидерин от следового количества до значительного присутствия. Сохранялся постоянно повышенный уровень ЛДГ с тенденцией к нарастанию. В течение 2013 г. колебания ЛДГ были в пределах 18,99–36,0 мккат/л, что составляло 6–11 × ВГН.

В 2011 г. проводилась оценка концентрации С3- и С4-компонентов системы комплемента в сыворотке. Концентрация С3-компонента составила 78 мг/дл (норма 79–152 мг/дл), С4 — 23,6 мг/дл (норма 16–38 мг/дл).

В 2012 г. проведено исследование на наличие ПНГ-клона с помощью высокочувствительной проточной цитометрии по стандартизованному международному протоколу с использованием моноклонального антитела к ГФИ-якорным белкам [1]. Определен выраженный ПНГ-клон среди моноцитов (99,8%), гранулоцитов (99,7%) и эритроцитов (общий размер клона 99,5%). Среди эритроцитов преобладали клетки III типа (83,7%) с абсолютным дефицитом CD59. Данные исследования от 26.09.2012 г. приведены на рис. 3.

Решением врачебного консилиума, учитывая тяжелое течение заболевания с признаками высокой активности, высокий риск развития опасных для жизни осложнений, была рекомендована таргетная терапия экулизумабом. После предварительной вакцинации менингококковой полисахаридной вакциной Менцевакс® 13.11.2012 г. начата терапия экулизумабом в стандартных дозах (600 мг 1 раз в неделю). Переносимость препарата на всем протяжении лечения удовлетворительная. У больной отмечалась только кратковременная умеренная головная боль при первых введениях препарата и периодически небольшая гиперемия кожи лица при последующих введениях. Лечение экулизумабом в режиме поддерживающей терапии (900 мг 1 раз в 2 нед.) продолжается до настоящего времени. В плановые сроки проводится ревакцинация менингококковой вакциной.

На фоне таргетной терапии отмечено значительное улучшение общего самочувствия больной, быстрое снижение уровня ЛДГ до показателей, близких к ВГН. Динамика ЛДГ приведена на рис. 4. Данный анализ крайне важен для оценки активности заболевания при ПНГ, поскольку уровень гемоглобина и другие лабораторные исследования не всегда показательны для оценки рисков тяжелых осложнений. В настоящее время такая корреляция в отношении ЛДГ подтверждена рядом исследователей. Показано, что риск осложнений ПНГ, в т. ч. угрожающих жизни, значительно возрастает при повышении ЛДГ > 1,5 × ВГН [12, 14].

Уровень гемоглобина в первые месяцы терапии повысился до 110 г/л без трансфузионной поддержки. Сохранялся макроцитоз при показателях MCV 105–120 фл, несмотря на постоянный прием препаратов фолиевой кислоты и отсутствие данных за дефицит фолатов и витамина B_{12} .

В ходе лечения дважды наблюдались кратковременные признаки усиления гемолиза с потемнением

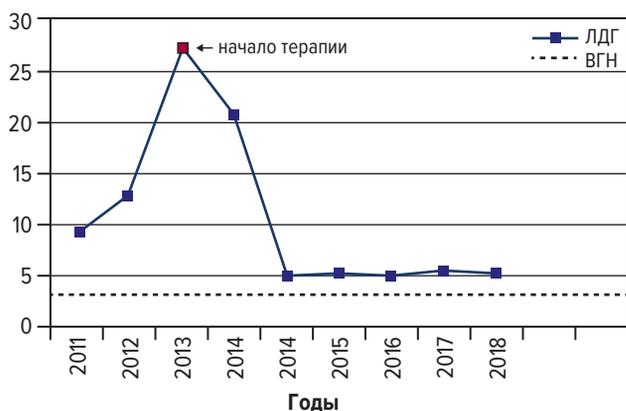


Рис. 4. Колебания уровня лактатдегидрогеназы — средние показатели за год

VGN — верхняя граница нормы; ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

Fig. 4. Lactate dehydrogenase fluctuations — annual mean values
VGN — upper limit of normal; ЛДГ — lactate dehydrogenase.

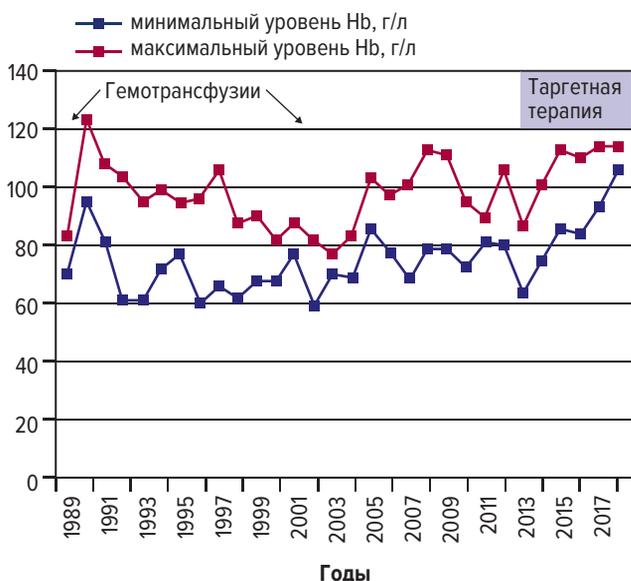


Рис. 5. Диапазон колебаний уровня гемоглобина (Hb) за время наблюдения

Fig. 5. Fluctuation range of hemoglobin (Hb) level during follow-up

мочи до светло-коричневого оттенка, повышением ЛДГ до 2–3 × VGN в течение нескольких дней без значимого снижения уровня гемоглобина и увеличения уровня креатинина. Указанные эпизоды были связаны в одном случае с отсроченным на 3 дня введением экулизумаба, в другом — с проведением под наркозом колоноскопии по поводу полипа толстой кишки. Гемолиз в обоих случаях прекращался после планового введения экулизумаба, госпитализаций в связи с гемолитическими эпизодами не потребовалось.

Несмотря на вполне удовлетворительное самочувствие больной, отсутствие клинических признаков активного внутрисосудистого гемолиза и трансфузионной зависимости, эффективного контроля гемолиза по лабораторным параметрам, полной коррекции анемии достичь не удалось. В последние 3 года колебания гемоглобина составляют 85–114 г/л; данные приведены на рис. 5.

Для выяснения причины неполного эффекта проведены дополнительные исследования. Анализ крови на общую гемолитическую активность комплемента (CH50) [24] проведен группой молекулярной иммунологии ФБУН «МНИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора. В результате показано, что гемолитическая активность комплемента CH50 отсутствует. Определен уровень антител к экулизумабу с помощью иммуоферментного анализа (исследование проведено в том же учреждении; использован набор Alpha Diagnostic Intl.). Присутствие антител к экулизумабу не подтвердилось. Таким образом, считать сохраняющуюся анемию следствием недостаточного ингибирующего эффекта ПНГ, не было оснований.

В 2014 г. у пациентки впервые были обнаружены C3c- и C3d-компоненты комплемента на эритроцитах, что указывало на активацию каскада комплемента. Известно, что моноклональные антитела, входящие в состав экулизумаба, специфически связывают C5-компонент комплемента, тем самым блокируя формирование МАК на поверхности клеток. Однако данный препарат не блокирует ранние этапы каскада комплемента, что является положительным моментом в отношении сохранения противоинойфекционной защиты, но может быть причиной появления положительного результата прямого антиглобулинового теста для C3-компонента комплемента. При этом у части больных, получающих таргетную терапию, определяется остаточный гемолиз низкой интенсивности за счет внесосудистого компонента при C3-опосредованной опсонизации ГФИ-дефицитных эритроцитов с их последующим разрушением в ретикулоэндотелиальной системе [25, 26]. Эти данные, а также периодически определяемое в крови нашей пациентки умеренное повышение уровня билирубина, преимущественно за счет непрямой фракции, и умеренная гепатоспленомегалия по данным УЗИ расценены как проявление внесосудистого компонента гемолиза. Такие состояния обычно не требуют дополнительной терапии и являются клинически компенсированными, что и наблюдается в представляемом нами случае.

Следует отметить значительное улучшение качества жизни больной, несмотря на неполный эффект терапии. За все время лечения экулизумабом госпитализаций по поводу ПНГ у пациентки не было, а общее самочувствие оценивается как вполне удовлетворительное.

Из лабораторных данных, кроме улучшения показателей гемограммы и снижения уровня ЛДГ, обращают на себя внимание положительные изменения функции тромбоцитов на фоне таргетной терапии. Исследования индуцированной агрегации тромбоцитов на оптическом агрегометре Solar проводились в 2010, 2015, 2016 и 2017 гг. По данным проведенных исследований к 2017 г. показатель максимальной амплитуды со всеми агрегирующими агентами (раствором аденозиндифосфата [АДФ], коллагеном) значительно улучшились. Так, при записи с АДФ в дозе 5 мкмоль/л появилась II волна агрегации, отсутствовавшая ранее, а при записи с коллагеном максимальная амплитуда увеличилась до 20,7 %, хотя и не достигла нормальных значений.

ОБСУЖДЕНИЕ

Рассматриваемое клиническое наблюдение иллюстрирует целый ряд особенностей течения ПНГ, отражает широкий круг проблем, связанных с диагностикой и лечением заболевания, а также изменение подходов к ведению больных с данной патологией в последние десятилетия.

Представлен случай классической гемолитической ПНГ, дебютировавшей гипоплазией кроветворения с положительным ответом на иммуносупрессивную терапию в виде полной ремиссии. Подобная ситуация является нередкой в клинической практике. Так, по данным различных авторов, трансформация в классическую ПНГ может наблюдаться у 10–18 % больных АА и отмечается, как правило, при становлении ремиссии за счет селекции клона в период восстановления гемопоэза [4, 8, 13]. Кумулятивная частота гемолитической ПНГ в течение 10 лет в данной группе больных АА/ПНГ достигает 29 %. При этом наличие ПНГ-клона небольшого размера большинство авторов признают предиктором лучшего ответа больных АА на иммуносупрессивную терапию [3, 7, 27]. С другой стороны, имеются данные о том, что среди больных ПНГ лучшие показатели выживаемости наблюдаются в группе с предшествовавшей АА [28]. Наша пациентка находится под наблюдением в ФГБУ «Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА» около 29 лет, а от момента установления диагноза ПНГ — более 20 лет. Ремиссия АА получена у нашей больной в относительно короткие сроки, а прогрессия в классическую ПНГ отмечена на фоне полной ремиссии АА.

Данные в динамике позволяют предполагать у наблюдаемой больной изначальный вариант с наличием ПНГ-клона небольшого размера еще в дебюте АА. Основанием для такого предположения служит достаточно характерная для АА/ПНГ клиническая картина, а также данные о том, что развитие развернутой гемолитической ПНГ всегда связано с экспансией имевшегося исходно ПНГ-клона [3, 29].

Кроме того, вероятность наличия у наблюдаемой больной исходного ПНГ-клона может, на наш взгляд, подтверждать некоторые особенности течения заболевания. Это умеренная степень костномозговой недостаточности при сохранности, а в динамике и тенденции к увеличению эритроидного ростка костного мозга с наличием морфологически измененных клеток красного ряда.

Повышенная чувствительность нейтрофилов при ПНГ к действию активированного комплемента, характерное для этих больных снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов и лимфоцитов могут приводить к повышенной подверженности инфекционно-воспалительным заболеваниям у пациентов данной группы [30]. У нашей же пациентки склонность к таким заболеваниям была отмечена с начала наблюдения, а при исследовании фагоцитарного звена иммунитета как фактора неспецифической защиты организма в 2005 г. было выявлено нарушение функциональной активности нейтрофилов. Однако нельзя исключить влияние на угнетение процесса фагоцитоза самой иммуносу-

прессивной терапии, многократно проводившейся больной к моменту исследования.

Безусловно, приведенные аргументы могут быть предметом дискуссии, тем более что на начальных этапах заболевания не проводилось обследования на ПНГ и на такие показатели скрытого внутрисосудистого гемолиза, как ЛДГ и гаптоглобин. Однако мы полагаем высоковероятным наличие варианта АА, связанного с ПНГ, с самого начала болезни.

Наша пациентка попала в поле зрения гематологов в то время, когда в стандарты обследования больных АА не входило тестирование на ПНГ-клон и не было возможностей для его достоверной лабораторной диагностики. Более того, обращает на себя внимание тот факт, что даже при появлении клинических симптомов гемолитической анемии проведение исследований в связи с подозрением на ПНГ давало неоднозначные результаты.

Согласно Национальным клиническим рекомендациям, всем больным АА следует проводить тестирование на ПНГ-клон методом высокочувствительной проточной цитометрии в динамике с периодичностью 6–12 мес. [12]. Однако возможность такого анализа в соответствии с международными стандартами появилась у нас только с 2012 г., а устаревшие в настоящее время пробы Хема и Хартмана (сахарозная проба) являются недостаточно чувствительными и специфичными, а также не дают достоверной информации о размере клона. Источником комплемента в указанных тестах служит сыворотка донора, к которой добавляют эритроциты больного, а активация комплемента достигается при слабом подкислении сыворотки (с кислотным гемолизом при pH 6,4) в пробе Хема или при уменьшении ионной силы сыворотки за счет использования сахарозы (сахарозный тест на гемолиз — тест Хартмана). Кроме недостаточной чувствительности и специфичности на результаты этих довольно «громоздких» исследований может влиять ряд факторов, включая наличие аутоантител к эритроцитам [5, 31]. Оценка концентрации в крови С3- и С4-компонентов системы комплемента в данном случае также неказательна ни для диагностики, ни для контроля терапии, поскольку активация комплемента и формирование деструктивных комплексов происходят на мембране клеток ПНГ-клона. При включении в программу обследования наблюдаемых в нашем центре больных метода проточной цитометрии уже в 2004 г. у пациентки был выявлен ПНГ-клон значительных размеров, превышающий 90 % по данным исследований последних лет.

Особенностью ПНГ может быть наличие диспластических изменений в костномозговых клетках, что при отсутствии яркой клинической картины гемолиза нередко диктует необходимость дифференциальной диагностики с МДС [29]. Подобная морфологическая картина наблюдалась и у нашей больной.

На этапе трансформации в классическую гемолитическую ПНГ у пациентки отмечались яркие клинические признаки хронического внутрисосудистого гемолиза с периодическими гемолитическими кризами, формированием трансфузионной зависимости и нефропатии, что характерно для данной патологии.

Известно, что ПНГ — опасное протромботическое состояние [5, 6, 14, 28]. У наблюдаемой нами пациентки не было тромботических эпизодов. Тем не менее выявлялись характерные нарушения с повышением показателей внутрисосудистой активации тромбоцитов при отсутствии значимых изменений в стандартной коагулограмме. Данные изменения у пациентки из группы высокого риска послужили причиной профилактического назначения антикоагулянтов.

Приведенный клинический случай наглядно иллюстрирует сложности лечения больных с тяжелыми формами ПНГ в отсутствие возможностей таргетной терапии. До появления экулизумаба — препарата, направленного на блокирование каскада активации комплемента, — эффективной патогенетической терапии не было. Все предпринимаемые до назначения препарата меры имели характер симптоматической поддерживающей терапии, дающей кратковременный частичный эффект. Данные исследований указывают на то, что только использование таргетных препаратов у больных ПНГ влияет на течение заболевания, развитие осложнений и выживаемость [15, 16].

Назначение пациентке экулизумаба — средства таргетной патогенетической терапии ПНГ, специфически связывающего C5-компонент комплемента и блокирующего формирование МАК, позволило эффективно контролировать активацию комплемента на поверхности клеток ПНГ-клона, предотвращая их разрушение. О быстром эффекте в отношении купирования комплемент-обусловленного внутрисосудистого гемолиза говорит резкое снижение уровня ЛДГ после первых же введений препарата. Поскольку риск осложнений ПНГ значительно возрастает при повышении ЛДГ $> 1,5 \times$ ВГН, этот показатель учитывается и при определении показаний к таргетной терапии, и при контроле ее эффективности [12]. У нашей пациентки к моменту назначения экулизумаба показатель ЛДГ многократно превышал ВГН, свидетельствуя наряду с другими клиническими данными о высокой активности заболевания и о том, что пациентка относится к группе высокого риска. На фоне терапии уровень ЛДГ снизился, если не до нормальных значений, то до относительно безопасного уровня, а это, несмотря на сохранение умеренного снижения гемоглобина, подтверждает эффективный контроль над активностью терминального пути комплемента, что и является основной целью терапии.

Появление таргетной терапии ПНГ существенно изменило судьбу пациентов с тяжелым течением заболевания. Однако эффект бывает неполным, с сохранением анемии у части больных и трансфузионной зависимости у некоторых из них. Основными причинами недостаточного эффекта являются костномозговая недостаточность и С3-опосредованный внесосудистый гемолиз [25, 32]. Следует отметить, что, по данным сравнительных исследований, положительный прямой антиглобулиновый тест выявляется у 68 % больных, получавших экулизумаб, в то время как положительный тест у не получавших препарат составлял 8 % [26]. Результаты проведенных в связи с сохранением анемии у описываемой пациентки исследований не подтвердили рецидива АА. В то же время

все данные свидетельствуют в пользу остаточного гемолиза с положительным результатом прямого антиглобулинового теста для С3d-компонента комплемента. Клинически гемолиз субкомпенсирован, общее самочувствие больной остается хорошим. За время терапии экулизумабом необходимости в госпитализациях по поводу ПНГ и проведении заместительных гемотрансфузий не возникало, критического повышения уровня ЛДГ не отмечено. Таким образом, несмотря на неполный эффект, результаты проводимого лечения, безусловно, удовлетворительные.

Планируется продолжение терапии с контрольным обследованием в динамике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенное клиническое наблюдение может служить иллюстрацией многих аспектов, касающихся клинических особенностей ПНГ, сложностей диагностики заболевания при недоступности современных методов исследования, эффективности таргетной терапии и возможных причин ее неполного эффекта.

История болезни нашей пациентки еще раз подтверждает тесную взаимосвязь АА и ПНГ и необходимость тестирования всех впервые выявленных больных с АА на наличие ПНГ-клона в соответствии с Международными руководствами и Российскими клиническими рекомендациями. Динамическое наблюдение важно в связи с вероятностью нарастания ПНГ-клона, особенно на этапе восстановления гемопоэза. Определение размера ПНГ-клона и уровня ЛДГ необходимо для своевременного назначения адекватной терапии и изменения стратегии лечения с переходом на долгосрочный контроль гемолиза таргетными препаратами, что позволяет избежать поражения внутренних органов и тяжелых осложнений, связанных с хроническим гемолизом.

Таргетная терапия с использованием экулизумаба позволяет в короткие сроки добиться контроля комплемент-опосредованного гемолиза, сохраняющегося длительное время. При неполном эффекте терапии с сохранением анемии, несмотря на адекватный эффект, оцениваемый по уровню ЛДГ, показано проведение пробы Кумбса, поскольку вероятен С3-опосредованный внесосудистый гемолиз. Такой компонент гемолиза обусловлен тем, что моноклональные антитела специфически связывают C5-компонент комплемента, блокируя образование МАК на поверхности эритроцитов, которые и способствуют их разрушению у больных ПНГ. При этом данный препарат не блокирует ранние этапы каскада комплемента, а прямой антиглобулиновый тест для С3d-компонента комплемента остается положительным, что мы и наблюдаем у нашей пациентки. Подобная ситуация у получающих экулизумаб больных описана неоднократно и не является редкостью, существенного влияния на общую результативность терапии и прогноз заболевания внесосудистый гемолиз не оказывает и, как правило, дополнительного лечения не требует. Тем не менее выявление причин неполного эффекта терапии и динамическое наблюдение в ходе ее необходимы.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование не имело спонсорской поддержки.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Е.Р. Шилова, Т.В. Глазанова, С.В. Волошин.

Сбор и обработка данных: все авторы.

Предоставление материалов исследования: все авторы.

Анализ и интерпретация данных: Е.Р. Шилова, Т.В. Глазанова, Ж.В. Чубукина, М.Н. Зенина, В.А. Кобилянская, И.И. Кробинец, А.В. Сельцер, С.В. Волошин.

Подготовка рукописи: Е.Р. Шилова, Т.В. Глазанова, С.В. Волошин.

Окончательное одобрение рукописи: Е.Р. Шилова, Т.В. Глазанова, С.В. Волошин.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe 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.
- Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2012;82(4):195–208. doi: 10.1002/cyto.b.21023.
- 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.
- Shilova ER, Glazanova TV, Chubukina ZV, et al. Aplastic anemia associated with PNH-clone – a single centre experience. *Blood.* 2016;128(22):5080.
- 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.
- Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2013;121(25):4985–96. doi: 10.1182/blood-2012-09-311381.
- Shresenmeier H, Hertenstein B, Wagner B, et al. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anaemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp Haematol.* 1995;23(2):181.
- Wanachiwanawin W, Siripanyaphinyo U, Piyawattanasakul N, et al. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol.* 2006;76(6):502–9. doi: 10.1111/j.0902-4441.2005.t011-EJH2467.x.
- Glazanova TV, Chubukina ZV, Rozanova OE, et al. Detection of PNH-clone in patients with depression of hemopoiesis. *Haematologica.* 2013;98(Suppl 1):579.
- Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* 2006;108(8):2509–19. doi: 10.1182/blood-2006-03-010777.
- Mortazavi Y, Merk B, McIntosh J, et al. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anaemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutation and evidence of mutational hot spot. *Blood.* 2003;101(7):2833–41. doi: 10.1182/blood-2002-07-2095.
- 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)]

13. 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):S42–43.

14. 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.

15. Loshi 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.

16. Kelly R, Hill A, Hillmen P, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood.* 2011;117(25):6786–92. doi: 10.1182/blood-2011-02-333997.

17. 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.

18. Camitta BM, Rozman C, Marin P, et al. Criteria for severe aplastic anaemia. *Lancet* 1988;331(8580):303–4. doi: 10.1016/s0140-6736(88)90388-1.

19. van Kamp H, van Imhoff G, de Wolf J, et al. The effect of cyclosporine on hematological parameters in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 1995;89(1):79–82. doi: 10.1111/j.1365-2141.1995.tb08907.x.

20. Лисуков И.А., Крючкова И.В., Кулагин А.Д. и др. Клинический случай пароксизмальной ночной гемоглобинурии с ответом на терапию циклоспорином А. *Гематология и трансфузиология.* 1998;43(5):45–6.

[Lisukov IA, Kryuchkova IV, Kulagin AD, et al. Clinical case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with response to cyclosporine A therapy. *Gematologiya i transfuziologiya.* 1998;43(5):45–6. (In Russ)]

21. Подопригора Г.И., Андреев В.Н. Современные методы изучения фагоцитарной активности лейкоцитов in vitro. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1976;53(1):19–26.

[Podoprigora GI, Andreev VN. Current methods of studying the phagocytic activity of leukocytes in vitro. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 1976;53(1):19–26. (In Russ)]

22. 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.

23. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1996;87(12):5332–40.

24. Козлов Л.В. Исследование функциональной активности компонентов факторов системы комплемента человека. *Вопросы медицинской химии.* 2002;48(6):624–31.

[Kozlov LV. Study of functional activity of components and factors of the human complement system. *Voprosy meditsinskoj khimii.* 2002;48(6):624–31. (In Russ)]

25. Risitano A, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood.* 2009;113(17):4094–5100. doi: 10.1182/blood-2008-11-189944.

26. Hill A, Rother R, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica.* 2010;95(4):567–73. doi: 10.3324/haematol.2009.007229.

27. Sugimori C, Chuhjo T, Feng H, et al. Minor population of CD55-CD59- blood cells predict response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anaemia. *Blood.* 2006;107(4):1308–14. doi: 10.1182/blood-2005-06-2485.

28. Sosie G, Mary J-Y, de Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet.* 1996;348(9027):573–7. doi: 10.1016/s0140-6736(95)12360-1.

29. Araten D, Bessler M, McKenzie S, et al. Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia.* 2002;16(11):2243–8. doi: 10.1038/sj.leu.2402694.

30. Cacciapuoti C, Terrazzano G, Barone L, et al. Glycosyl-phosphatidyl-inositol-defective granulocytes from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patients show increased bacterial ingestion but reduced respiratory burst induction. *Am J Hematol.* 2007;82(2):98–107. doi: 10.1002/ajh.20779.

31. Вуд М.Э., Банн П.А. Секреты гематологии и онкологии. Пер. с англ. М.: Бином, 2001.

[Wood M, Bunn P. Hematology/Oncology Secrets. (Russ. ed.: Wood ME, Bunn PA. *Sekrety gematologii i onkologii.* Moscow: Binom Publ.; 2001.)]

32. Brodsky R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2014;124(18):2804–11. doi: 10.1182/blood-2014-02-522128.