

## Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии\*

А.Д. Кулагин<sup>1</sup>, И.А. Лисуков<sup>2</sup>, В.В. Птушкин<sup>3</sup>, Е.Р. Шилова<sup>4</sup>, Н.В. Цветаева<sup>5</sup>, Е.А. Михайлова<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава России;

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии

и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва;

<sup>4</sup>ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург;

<sup>5</sup>ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва

**Контакты:** Александр Дмитриевич Кулагин kulagingem@rambler.ru

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) является редким приобретенным клональным заболеванием крови, развивающимся в результате соматической мутации гена фосфатидилинозитол гликана класса А (PIG-A) в стволовых клетках. ПНГ характеризуется хроническим внутрисосудистым гемолизом, костномозговой недостаточностью, тромбозами, нарушением функции почек и другими тяжелыми клиническими синдромами. Настоящие клинические рекомендации включают определение, классификацию, методы и критерии диагностики ПНГ, показания для скрининга, оптимальную терапевтическую тактику с включением таргетного препарата экулизумаба, трансплантации костного мозга и симптоматической терапии.

**Ключевые слова:** пароксизмальная ночная гемоглобинурия, апластическая анемия, комплемент, гемолиз, проточная цитометрия, тромбоз, трансплантация костного мозга, экулизумаб

### National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

A.D. Kulagin<sup>1</sup>, I.A. Lisukov<sup>2</sup>, V.V. Ptushkin<sup>3</sup>, Ye.R. Shilova<sup>4</sup>, N.V. Tsvetaeva<sup>5</sup>, Ye.A. Mikhailova<sup>5</sup>

<sup>1</sup>First I.P. Pavlov State Medical University of St.-Petersburg, Ministry of Health of Russia;

<sup>2</sup>I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Ministry of Health of Russia, Saint Petersburg;

<sup>3</sup>Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology named after Dmitry Rogachev, Ministry of Health of Russia, Moscow;

<sup>4</sup>Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Russian Federal Biomedical Agency, Saint Petersburg;

<sup>5</sup>Hematology Research Center, Ministry of Health of Russia, Moscow

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired clonal blood disorder caused by somatic mutation of the phosphatidylinositol glycan complementation group A gene (PIG-A) in a hematopoietic stem cell. PNH is characterized by chronic intravascular hemolysis, bone marrow failure, thrombosis, renal dysfunction and other severe clinical syndromes. These clinical guidelines include definition, classification, methods and diagnostic criteria of PNH, indications for screening, optimal treatment including targeted therapy with eculizumab, bone marrow transplantation and symptomatic therapy.

**Key words:** paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, complement, hemolysis, flow cytometry, thrombosis, bone marrow transplantation, eculizumab

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — это редкое приобретенное клональное заболевание крови, характеризующееся хроническим внутрисосудистым гемолизом, костномозговой недостаточностью, повышенным риском развития тромботических осложнений, почечной недостаточности и легочной гипертензии. В основе этиологии ПНГ лежит соматическая мутация в X-сцепленном гене фосфатидилинозитол гликана класса А (PIG-A), приводящая к дефициту гликозилфосфатидилинозитоловой «якорной» структуры, которая осуществляет фиксацию широкого спектра белков на мембранах клеток крови. Отсутствие этих связанных с мембраной белков, в частности CD55 и CD59, нарушает регуляцию системы комплемента и приводит к выраженному хрониче-

скому внутрисосудистому комплемент-опосредованному гемолизу.

Ранняя диагностика ПНГ играет важнейшую роль в своевременном назначении эффективного лечения. Однако гетерогенность клинических симптомов и редкость данного заболевания, как правило, приводят к удлинению сроков диагностики, тяжелой инвалидизации пациентов и повышению риска угрожающих жизни осложнений и смертности.

Данные рекомендации сформулированы Российским экспертным советом. Информация предназначена для широкого круга специалистов, включая гематологов, терапевтов, нефрологов, специалистов по диализу, гастроэнтерологов, кардиологов и хирургов. По мере накопления опыта диагностики и лечения ПНГ

\* Настоящие клинические рекомендации были представлены и одобрены на заседании Национального гематологического общества 14 февраля 2014 г.

содержание данных рекомендаций будет уточняться и дополняться.

## 1. Определение, классификация и диагностические критерии

### 1.1. Определение

ПНГ — это редкое, приобретенное, жизнеугрожающее, прогрессирующее системное заболевание, характеризующееся хроническим внутрисосудистым гемолизом. ПНГ ассоциируется со значительным повышением риска смерти, развитием артериальных и венозных тромбозов, поражением внутренних органов и резким снижением качества жизни пациентов. Крупнейшие эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что несмотря на проведение современной сопроводительной терапии 35 % пациентов с классической формой ПНГ погибают в течение первых 5 лет после установления диагноза, а через 10 лет летальность достигает 50 % [1, 2]. От 40 до 67 % летальных исходов при ПНГ обусловлены тромботическими осложнениями [2–6]. К другим тяжелым осложнениям данного заболевания относятся почечная недостаточность, легочная гипертензия, боли в грудной клетке и животе, выраженная общая слабость, дисфагия, эректильная дисфункция [6, 7].

Главным патогенетическим механизмом развития ПНГ, обуславливающим органные поражения и летальность, является нарушение регуляции системы комплемента. Система комплемента — часть врожденного иммунитета, она подразделяется на 2 ключевых этапа активации: проксимальный и дистальный (терминальный) [8]. Проксимальный этап включает 3 основных пути активации комплемента: классический, альтернативный и лектиновый. Все пути активации ведут к важнейшему этапу — формированию C3-конвертазы, белка, расщепляющего C3 на C3a и C3b. Компонент C3b принимает участие в образовании C5-конвертазы, которая, в свою очередь, расщепляет C5-компонент комплемента на C5a и C5b. Белок C5a является провоспалительным и протромботическим, а C5b способствует формированию мембраноатакующего комплекса (МАК). Именно МАК обуславливает гемолиз эритроцитов, образование прокоагулянтных мембранных микрочастиц и активацию тромбоцитов [9–11].

В норме активация C5-конвертазы блокируется гликозилфосфатидилинозитол (GPI)-связанным ингибитором CD55. На мембране клеток при ПНГ CD55 полностью отсутствует, либо имеет место его дефицит, что приводит к повышенному расщеплению C5. Избыточное образование C5a вызывает активацию лейкоцитов и тромбоцитов, стимулирует воспаление и развитие тромбозов. Формирование МАК на поверхности клеток в норме блокирует другой GPI-связанный ингибитор комплемента — CD59 [8, 12]. При отсутствии CD59 МАК вызывает лизис эритроцитов. Тромбоциты, лишенные CD55 и CD59, подвергаются комплементзависимой агрегации и активации [12, 13].

Метод проточной цитометрии позволяет выявить клетки с дефицитом GPI-связанных белков (GPI-AP) и является «золотым стандартом» диагностики ПНГ [14–18]. Различают 3 типа эритроцитов: эритроциты I типа с нормальной экспрессией GPI-AP на поверхности клеток, эритроциты II типа с частичной GPI-AP экспрессией и III типа с полным отсутствием GPI-AP. Наиболее информативно определение дефицита GPI-AP на лейкоцитах, особенно на гранулоцитах, что позволяет поставить точный диагноз [15]. Кроме того, у пациентов с небольшой популяцией GPI-AP дефицитных клеток данное исследование имеет смысл проводить и на моноцитах [15].

### 1.2. Классификация

Различают 3 основных формы ПНГ [12, 19].

1. **Классическая форма** характеризуется клинико-лабораторными признаками внутрисосудистого гемолиза без признаков других заболеваний, связанных с недостаточностью костного мозга (апластическая анемия (АА), миелодиспластический синдром (МДС), идиопатический миелофиброз).

2. ПНГ, диагностируемая у пациентов с АА (**АА/ПНГ**), МДС (**МДС/ПНГ**) и крайне редко с миелофиброзом (**идиопатический миелофиброз / ПНГ**), когда при этих заболеваниях имеются клинические и/или лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза, а в периферической крови определяется клон клеток с ПНГ-фенотипом.

3. **Субклиническая форма** заболевания (**АА/сПНГ**, **МДС/сПНГ**, **идиопатический миелофиброз / сПНГ**), диагностируемая у пациентов без клинических и лабораторных признаков гемолиза, но при наличии минорного клона клеток с ПНГ-фенотипом (как правило, < 1 %). Следует отметить, что субклиническое течение ПНГ может отмечаться и при большем размере клона.

Выделение субклинической формы ПНГ не имеет самостоятельного клинического значения, но необходимо для обеспечения мониторинга таких пациентов в связи с вероятностью нарастания размера клона и прогрессии гемолиза, который может доминировать среди клинических проявлений и требовать соответствующей терапии.

С учетом того, что субклиническая форма ПНГ при АА и/или МДС не имеет самостоятельного клинического значения, Экспертный совет в процессе обсуждения проекта рекомендаций не пришел к единому мнению о целесообразности использования термина «субклиническая пароксизмальная ночная гемоглобинурия» при формулировке диагноза и, соответственно, критерия 0,01 % лейкоцитов с дефицитом GPI-связанных белков для подтверждения диагноза ПНГ. Тем не менее все авторы консенсуса пришли к единой рекомендации о необходимости мониторингирования размера клона ПНГ, клинических и лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза у всех больных с наличием  $\geq 0,01$  % лейкоцитов с дефицитом GPI-связанных белков.

*Классическая форма пароксизмальной ночной гемоглинурии*

У пациентов с классической ПНГ, как правило, наблюдается выраженный внутрисосудистый гемолиз с повышением уровня лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови, ретикулоцитозом и снижением уровня гаптоглобина [12]. При данном варианте ПНГ отсутствуют дефинитивные морфологические признаки другой патологии костного мозга (АА, МДС, миелофиброз) и не характерны аномалии кариотипа [12].

*Пароксизмальная ночная гемоглинурия на фоне синдромов костномозговой недостаточности (апластическая анемия / пароксизмальная ночная гемоглинурия, миелодиспластический синдром / пароксизмальная ночная гемоглинурия)*

У пациентов с АА/ПНГ и МДС/ПНГ диагностируются клинико-лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза. На разных этапах развития заболевания могут превалировать симптомы недостаточности костного мозга или внутрисосудистого гемолиза, а в ряде случаев имеется их сочетание [12, 19]. Несмотря на то, что у пациентов с малым размером ПНГ-клона заболевание обычно протекает с минимальными симптомами и отмечаются только лабораторные признаки внутрисосудистого гемолиза, необходимо проведение мониторинга (2 раза в год). Это связано с тем, что со временем возможна экспансия клона с развитием тяжелого гемолиза и высоким риском тромботических осложнений [20, 21].

*Субклиническая форма пароксизмальной ночной гемоглинурии (апластическая анемия / субклиническая пароксизмальная ночная гемоглинурия, миелодиспластический синдром / субклиническая пароксизмальная ночная гемоглинурия)*

У пациентов с субклинической ПНГ отсутствуют какие-либо клинические или лабораторные признаки гемолиза. Малые популяции клеток с дефицитом GPI-AP можно обнаружить только при использовании метода высокочувствительной проточной цитометрии. Субклиническая форма ПНГ может диагностироваться на фоне заболеваний, характеризующихся нарушением функции костного мозга, в основном АА и МДС. Очень важно проводить тщательный мониторинг этих пациентов с целью выявления признаков гемолиза и экспансии клона, поскольку у 15–17 % пациентов с АА / субклинической ПНГ со временем развивается гемолитическая форма АА/ПНГ [21, 22].

### **1.3. Основные диагностические критерии**

Метод проточной цитометрии позволяет выявить пациентов, имеющих в периферической крови клетки с дефицитом GPI-AP, что является главным отличительным признаком ПНГ (см. разд. 4 «Диагностика пароксизмальной ночной гемоглинурии»). Для более

точной диагностики исследование должно проводиться как на эритроцитах, так и на лейкоцитах (гранулоциты и моноциты). Определение количества GPI-негативных эритроцитов может быть затруднено предшествующими трансфузиями эритроцитарной массы или вследствие массивного гемолиза.

Исследование лейкоцитов, особенно гранулоцитов и моноцитов, позволяет с наибольшей точностью определить размер ПНГ-клона [12]. Для определения клинической формы ПНГ у конкретного пациента необходимо проводить клинико-лабораторную оценку параметров гемолиза и выполнить гистологический, цитологический и цитогенетический анализ костного мозга. Основные диагностические критерии, необходимые для верификации диагноза, приведены в табл. 1.

Для эффективного лечения пациентов с ПНГ важную роль играет ранняя и точная диагностика [5, 12]. Разнообразие клинических проявлений, а также редкость данного заболевания затрудняют диагностику ПНГ. В результате диагноз может быть установлен только через несколько лет после дебюта заболевания, а в отдельных случаях задержка может составлять до 10 и более лет [1, 12].

### **2. Дополнительные методы диагностики для оптимизации лечения**

Для выбора оптимального метода лечения ПНГ необходимо оценить целый ряд факторов, влияющих на прогноз и клинические проявления заболевания. Рекомендуемый перечень исследований для пациентов с ПНГ представлен в табл. 2.

### **3. Показания для скрининга на пароксизмальную ночную гемоглинурию**

ПНГ является редким заболеванием, часто сопровождающимся такими симптомами, как тромбозы, анемия и другие цитопении. Однако проводить скрининг на ПНГ всем пациентам с тромботическими осложнениями, анемией или цитопенией нецелесообразно, поскольку эти проявления часто встречаются и при других заболеваниях. Тем не менее всем пациентам с тромбозами в сочетании с цитопениями или внутрисосудистым гемолизом, неясными цитопениями, гемолитической анемией с отрицательной пробой Кумбса необходимо проводить скрининг на ПНГ [15, 21]. Наличие других клинических симптомов (табл. 3), как подчеркивается в рекомендациях Международного общества клинической цитометрии (ICCS) [15], значительно увеличивает вероятность выявления ПНГ-клона. Пациентам, имеющим любые из этих проявлений, показано проведение скрининга на ПНГ [12, 20, 21].

Гемоглинурия отмечается у 25–27 % пациентов с ПНГ в дебюте заболевания, все пациенты с данным симптомом должны быть обследованы на ПНГ. В течение жизни гемоглинурия той или иной степени

**Таблица 1.** Основные методики и цитометрические критерии, необходимые для диагностики и классификации ПНГ [12, 15]

Классическая ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Проточная цитометрия для выявления клеток крови с дефицитом GPI-AP при помощи скрининговой панели с маркерами CD55 и CD59 (ретикулоциты и эритроциты), CD24/FLAER (гранулоциты), CD14/FLAER (моноциты): первичная диагностика и последующий мониторинг</li> <li>• Отсутствие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе</li> <li>• Клинико-лабораторные признаки гемолиза, такие как ретикулоцитоз, повышение уровня ЛДГ, билирубина (прямого и непрямого) и снижение гаптоглобина</li> </ul>
ПНГ на фоне заболеваний с костномозговой недостаточностью AA/ПНГ, МДС/ПНГ, идиопатический миелофиброз / ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Проточная цитометрия для выявления клеток крови с дефицитом GPI-AP при помощи скрининговой панели с маркерами CD55 и CD59 (ретикулоциты и эритроциты), CD24/FLAER (гранулоциты), CD14/FLAER (моноциты): первичная диагностика и последующий мониторинг</li> <li>• Наличие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе</li> <li>• Клинико-лабораторные признаки гемолиза, такие как ретикулоцитоз, повышение уровня ЛДГ, билирубина (прямого и непрямого) и снижение гаптоглобина</li> </ul>
Субклиническая ПНГ AA/субклиническая ПНГ, МДС / субклиническая ПНГ, идиопатический миелофиброз / субклиническая ПНГ	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Количество клеток с дефицитом GPI клинически незначимо и может быть определено только при помощи высокочувствительной цитометрии (обычно менее 1 %)</li> <li>• Наличие дефинитивных признаков синдромов костномозговой недостаточности на момент диагностики или в анамнезе</li> <li>• Отсутствие клинико-лабораторных признаков гемолиза</li> </ul>

**Таблица 2.** Дополнительные анализы, необходимые для оптимизации лечения пациентов [12]

• Медицинский анамнез с акцентом на симптомах гемоглобинурии, тромбоземболии, дисфагии, одиофагии, болях в животе и нарушении эрекции
• Проточная цитометрия: процент ПНГ эритроцитов I, II и III типов
• Определение скорости клубочковой фильтрации
• Уровень креатинина и мочевины в сыворотке крови
• Функциональные печеночные пробы
• Обмен железа (уровень сывороточного железа, общая железосвязывающая способность сыворотки, уровень ферритина)
• Концентрация фолиевой кислоты, витамина В <sub>12</sub>
• Уровень гемосидерина в моче
• HLA-типирование

выраженности отмечается, как правило, у всех пациентов с классической формой ПНГ, но при AA/ПНГ или МДС/ПНГ признаки гемоглобинурии могут отсутствовать из-за относительно небольшого размера ПНГ-клона. В связи с тем, что для ПНГ характерен внутрисосудистый гемолиз, в анализах крови практически всегда отмечается повышенный уровень ЛДГ. Таким образом, обследование на ПНГ должно быть инициировано у каждого пациента, имеющего признаки внутрисосудистого гемолиза с повышенным уровнем ЛДГ. Однако необходимо иметь в виду, что у некоторых больных уровень ЛДГ может быть незначительно повышен или даже находиться в пределах нормативных значений, несмотря на большой размер ПНГ-клона, что часто наблюдается при превалировании клеток II типа.

**Таблица 3.** Клинические проявления, требующие проведения скрининга на ПНГ [15]

Клинические показания
• Внутрисосудистый гемолиз по данным гемоглобинурии или повышению уровня гемоглобина в плазме
• Необъяснимый гемолиз в комбинации с одним из следующих признаков: <ul style="list-style-type: none"> <li>– дефицит железа</li> <li>– боли в животе</li> <li>– тромбоз</li> <li>– гранулоцитопения и/или тромбоцитопения</li> </ul>
• Другая приобретенная Кумбс-негативная, гемолитическая анемия (без шизоцитов в анализе крови, не связанная с инфекциями)
• Тромбоз с необычными проявлениями: <ul style="list-style-type: none"> <li>– необычная локализация: печеночные вены (синдром Бадда–Киари), другие внутрибрюшные вены (портальная, селезеночная, чревная), церебральные синусы, кожные вены</li> <li>– признаки сопутствующей гемолитической анемии (см. выше)</li> <li>– необъяснимая цитопения</li> </ul>
• Признаки недостаточности костного мозга: <ul style="list-style-type: none"> <li>– предполагаемая или доказанная AA</li> <li>– МДС: рефрактерная цитопения с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией, гипопластический вариант МДС</li> <li>– другие цитопении неясной этиологии после подробного обследования</li> </ul>

Даже при отсутствии признаков гемолиза всем пациентам с AA рекомендуется проводить скрининг на ПНГ [12]. Все пациенты с AA и МДС низкого риска должны быть обследованы на ПНГ при помощи высокочувствительной проточной цитометрии [15].

Одним из самых распространенных осложнений ПНГ являются тромбозы [1, 2], хотя в зависимости от формы ПНГ заболевание диагностируется в связи с тем или иным тромботическим событием только

у 7 % пациентов [19]. Поэтому не рекомендуется проводить рутинный скрининг всем пациентам с тромбозами, за исключением случаев с необычной локализацией тромбоза (синдром Бадда—Киари, церебральный тромбоз, тромбозы вен кожи), а также при его сочетании с внутрисосудистым гемолизом, сопутствующей цитопенией или двумя этими признаками одновременно [12, 15]. Пациенты с тромбозами других локализаций, которые невозможно объяснить обычными и наиболее частыми причинами, также должны проходить скрининг на ПНГ.

От 10 до 20 % пациентов с ПНГ на момент диагностики заболевания предъявляют жалобы на боли в животе и другую симптоматику со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (дисфагия). Эти симптомы особенно распространены у пациентов с классической формой ПНГ, при которой их частота достигает 33 % [19]. В скрининге всех пациентов с подобными жалобами необходимости нет, однако тестирование должно обязательно проводиться при наличии абдоминальных болей, дисфагии в сочетании с клинико-лабораторными признаками внутрисосудистого гемолиза.

Данные по проведению скрининга в различных группах пациентов суммированы в табл. 4.

Таблица 4. Частота проведения скрининговых мероприятий

Состояние/симптомы	Тестирование и мониторинг
АА	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Гипопластический МДС	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Рефрактерная цитопения с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией	Во время диагностики и 2 раза в год при выявлении ПНГ-клона
Тромбоз	При необычной локализации и/или наличии или ухудшении внутрисосудистого гемолиза или сопутствующей цитопении
Боли в животе или жалобы со стороны ЖКТ	При наличии или усилении клинико-лабораторных признаков внутрисосудистого гемолиза
Внутрисосудистый гемолиз и повышение уровня ЛДГ	Если при обследовании не удалось выявить причину данных изменений или при ухудшении данных проявлений
Размер ПНГ-клона > 1 %	Два раза в год или незамедлительно при ухудшении клинического состояния

#### 4. Диагностика пароксизмальной ночной гемоглобинурии

##### 4.1. Проточная цитометрия

При подозрении на ПНГ метод проточной цитометрии позволяет установить точный диагноз [15, 16]. Проточная цитометрия является наиболее чувствительным и информативным методом. Для диагностики и мониторинга ПНГ следует использовать рекоменда-

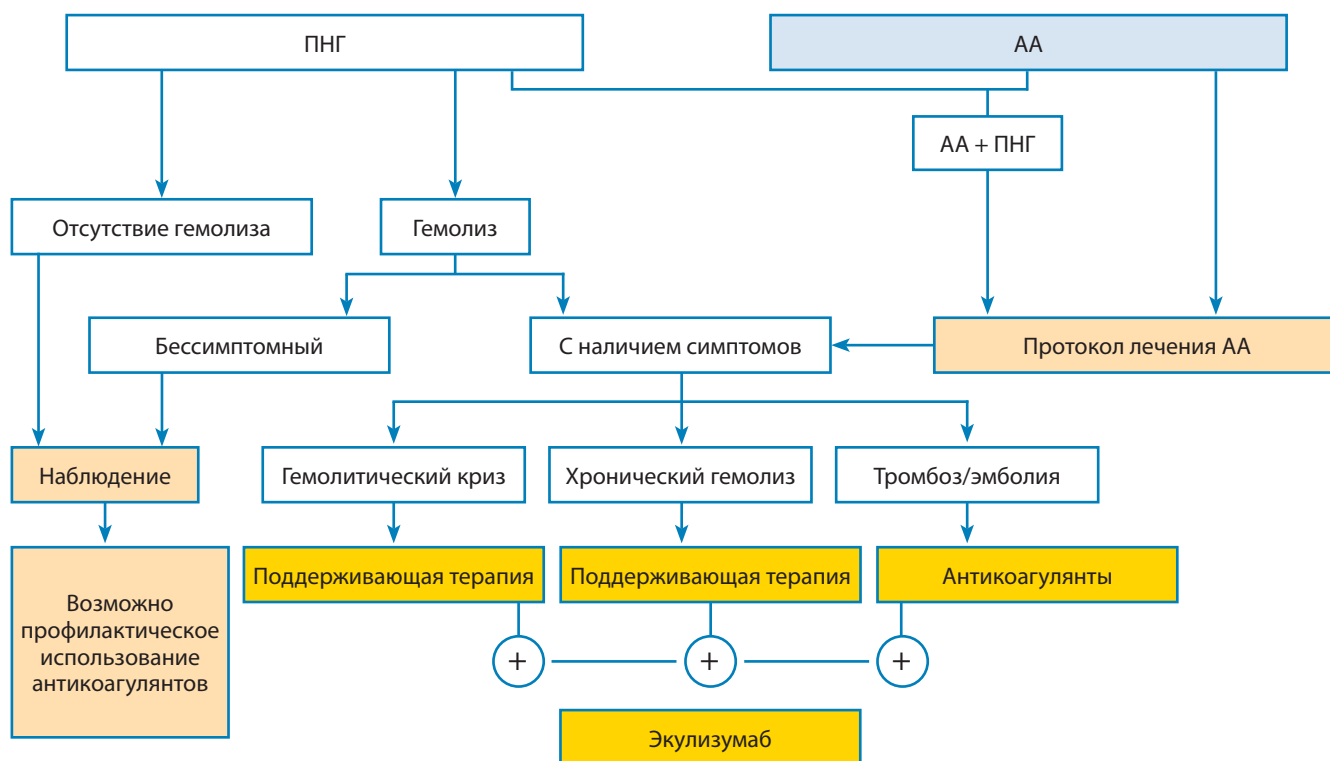
ции ICCS 2010 г. Методические аспекты диагностики изложены в специализированной литературе [15].

При выявлении клона  $\geq 0,01$  % лейкоцитов с полным или частичным дефицитом GPI-связанных белков, т. е. количество клеток с ПНГ-фенотипом или размер ПНГ-клона составляет  $\geq 0,01$  %, пациенты подлежат последующему наблюдению и мониторингу размера клона [15]. Мониторинг размера клона при исходном значении < 1 % достаточно проводить с частотой 1 раз в год, при наличии клона  $\geq 1$  % дальнейшие контрольные измерения следует проводить с частотой 2 раза в год.

При первичной диагностике и для исключения врожденного изолированного дефицита одного из GPI-связанных белков необходимо провести исследование 2 или более GPI-связанных белков [12]. Пациентам со стабильным течением заболевания и размером клона < 1 % исследование периферической крови на экспрессию GPI-AP достаточно проводить 1 раз в год. Однако, поскольку размер клона может увеличиваться со временем, пациентам с клоном  $\geq 1$  % мониторинг следует проводить не реже 1 раза в 6 мес [21]. Более того, при клиническом ухудшении, развитии тромбоэмболических осложнений или усилении гемолиза исследование необходимо повторить немедленно. Принимая во внимание то обстоятельство, что клон со временем может уменьшаться или даже исчезать, анализ следует проводить и при клиническом улучшении [14]. Данная рекомендация базируется на том, что тромботическая активность зависит от размера ПНГ-клона, поэтому уменьшение количества гранулоцитов с дефицитом GPI-связанных белков может потребовать изменений в профилактической антикоагуляционной терапии (см. разд. 5 «Лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии») [23–25].

Диагностику ПНГ могут затруднять предшествующие трансфузии эритроцитарной массы, поскольку при трансфузиях увеличивается количество эритроцитов с нормальной экспрессией CD55 и CD59, что, в свою очередь, отражается на результатах проточной цитометрии. В связи с этим для определения точного количества эритроцитов с дефицитом GPI-AP проточную цитометрию рекомендуется проводить в свободный от трансфузий период либо через 2 нед после трансфузии, либо непосредственно перед ней [12]. Анализ дефицита белков GPI-AP рекомендуется проводить как на эритроцитах, так и на лейкоцитах, поскольку ПНГ-эритроциты лизируются под действием комплемента, изменяя общий размер клона. В отличие от эритроцитов продолжительность жизни ПНГ-лейкоцитов не отличается от продолжительности жизни лейкоцитов здоровых людей [26]. Поэтому точный размер клона ПНГ определяют по значению тестирования гранулоцитов или моноцитов.

Проточная цитометрия позволяет не только идентифицировать популяцию клеток с дефицитом GPI-связанных белков, но также способна определить про-



Алгоритм терапии пациентов с ПNH

цент патологических клеток и отдельные популяции с различной степенью дефицита GPI-связанных белков, особенно на эритроцитах.

Метод высокочувствительной проточной цитометрии позволяет выявить клоны размером 0,01 % [15]. Всем пациентам с АА или рефрактерной цитопенией с 1-, 2- или 3-линейной дисплазией рекомендуется проводить высокочувствительную проточную цитометрию при диагностике заболевания и затем 1–2 раза в год, даже при отсутствии явных клинико-лабораторных признаков гемолиза [12]. Эта рекомендация обусловлена тем, что размер клона со временем меняется, и наличие даже небольшой популяции клеток с дефицитом GPI-AP у этих пациентов имеет прогностическое значение и влияет на выбор терапии [12, 27, 28]. Так, наличие ПNH-клеток при АА или МДС без повышения числа бластных клеток, как было показано в ряде исследований, является благоприятным прогностическим признаком при проведении иммуносупрессивной терапии [28–30].

Одним из лучших реактивов для определения ПNH-клона среди лейкоцитов является FLAER (флуоресцентно меченный аэролизин), связывающийся непосредственно с GPI-якорем [12, 15, 18, 31, 32]. По сравнению с антителами к другим GPI-связанным антигенам, образование связи между FLAER и GPI-якорем меньше зависит от стадии созревания клетки [15]. Кроме того, для выявления ПNH-клонов FLAER можно использовать в многоцветных комбинациях с моноклональными антителами к GPI-связанным и не-GPI-

связанным антигенам [33]. Однако данный метод нельзя применять для анализа эритроцитов, поскольку в условиях, требуемых для проведения метода, реагент плохо связывается с эритроцитами человека по еще недостаточно изученной причине.

#### 4.2. Другие методы диагностики

Такие методы, как сахарозный тест и тест Хема (лизис эритроцитов при снижении pH сыворотки), имеют лишь исторический интерес и в настоящее время для диагностики ПNH не используются, поскольку они недостаточно чувствительны по сравнению с проточной цитометрией [12].

### 5. Лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии

Общий алгоритм лечения больных ПNH в зависимости от формы заболевания и степени выраженности гемолиза представлен на рисунке.

#### 5.1. Экулизумаб

Пациентам с комплемент-опосредованным гемолизом может быть показана терапия экулизумабом (Солирис®, Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT). Экулизумаб – гуманизированное моноклональное антитело, связывающееся с C5-компонентом комплемента. Это препятствует расщеплению C5 на C5a и C5b, за счет чего угнетается образование провоспалительных цитокинов (через C5a) и МАК (через C5b) [34]. В клинических исследованиях и при последующем использовании препарата было показано, что применение

экулизумаба у пациентов с ПНГ приводит к значительному уменьшению гемолиза, частоты тромбозов, трансфузионной зависимости и выраженности таких симптомов, как одышка, слабость и легочная гипертензия. Кроме того, экулизумаб способствует улучшению функции почек и повышению качества жизни пациентов, а при долгосрочном применении увеличивает продолжительность жизни до сравнимой по возрасту в общей популяции [35–39]. Хотя использование данного препарата не приводит к излечению от заболевания, экулизумаб обладает очень хорошим профилем безопасности при длительном применении и позволяет значительно снизить частоту осложнений и смертность пациентов с ПНГ.

При определении показаний к назначению экулизумаба необходимо учитывать клинические и лабораторные признаки. Экулизумаб может быть рекомендован для включения в программу лечения следующих категорий пациентов с ПНГ:

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

При наличии тромботического осложнения в анамнезе экулизумаб показан для предотвращения развития последующих тромбозов.

Риск осложнений ПНГ, в том числе угрожающих жизни, значительно возрастает при повышении уровня ЛДГ  $> 1,5$  верхней границы нормы. Поэтому в случае сочетания хронического гемолиза с уровнем ЛДГ  $> 1,5$  верхней границы нормы и таких проявлений, как тромботические осложнения, анемический синдром, острая или хроническая почечная недостаточность, легочная гипертензия, признаки дистонии гладкой мускулатуры (например, абдоминальные боли, дисфагия, эректильная дисфункция и т. д.), следует рекомендовать применение экулизумаба.

Экулизумаб также показан при наличии трансфузионной зависимости вследствие хронического гемолиза. Применение экулизумаба блокирует гемолиз и способствует значительному снижению числа гемотрансфузий.

В случае беременности у пациентки с ПНГ риск осложнений, в особенности тромботических, усиливается многократно. Поэтому в данном случае, даже если до беременности экулизумаб не был показан, нужно начать лечение препаратом и продолжать его как минимум до 3 мес после родоразрешения. Затем состояние пациентки и риск осложнений следует оценить повторно для решения вопроса о возможном прекращении лечения экулизумабом. *См. также разд. «Беременность при пароксизмальной ночной гемоглобинурии».*

При решении вопроса о назначении экулизумаба рекомендуется проведение врачебного консилиума.

Дозовый режим применения экулизумаба подробно описан в инструкции по медицинскому приме-

нию. Рекомендованный режим лечения был одобрен к применению на основании результатов долгосрочной исследовательской программы препарата. В исследованиях была доказана важность соблюдения рекомендуемой дозы и интервалов введения экулизумаба при длительной терапии, так как длительное лечение дает наилучшие результаты за счет постоянного подавления неконтролируемой активности терминального пути комплемента [39].

#### *«Прорывной» гемолиз*

Стандартная схема терапии экулизумабом достаточна для полной и стабильной блокады комплемент-опосредованного гемолиза. У некоторых пациентов из-за особенностей метаболизма препарата или при инфекциях может развиваться «прорывной» гемолиз. В этой ситуации признаки гемолиза возникают за 2–3 дня перед очередным введением экулизумаба. У больных могут развиваться гемоглинурия, возвращаться исходные симптомы (одышка, слабость, спазм гладкой мускулатуры и др.), потребность в трансфузиях, повышаться уровень ЛДГ, ретикулоцитов и снижаться уровень гаптоглобина.

Лечение «прорывного» гемолиза предполагает сокращения интервала между введениями экулизумаба до 12 дней или увеличения дозы до 1200 мг на 1–2 введения.

#### *Наблюдение за пациентами, получающими экулизумаб*

Во время лечения экулизумабом необходимо контролировать появление симптомов инфекции и при бактериальных инфекциях своевременно назначать антибиотики. При диагностировании менингококковой инфекции очередное введение препарата отменяется. Механизм действия препарата экулизумаб предполагает повышение риска развития менингококковой инфекции (*Neisseria meningitidis*) на фоне его применения. Всем больным необходимо проводить вакцинацию против менингококка за 2 нед до начала применения препарата, а также ревакцинацию согласно существующим в РФ стандартам. Наиболее предпочтительна конъюгированная тетравалентная вакцина против серотипов А, С, Y и W135. В случае необходимости срочного лечения экулизумабом невакцинированного пациента возможно начало терапии на фоне соответствующей антибиотикопрофилактики, которая должна продолжаться в течение 2 нед после проведения вакцинации против менингококковой инфекции.

В процессе терапии экулизумабом рекомендуется проводить следующие лабораторные анализы: клинический анализ крови с определением ретикулоцитов, ЛДГ, креатинин крови, мозговой натрийуретический пептид В (при возможности выполнения), D-димер, сывороточное железо, ферритин, прямой антиглобулиновый тест. Контроль величины ПНГ-клона проводится на основании результатов высокочувствительной проточной цитометрии.

**Симптоматическая терапия при лечении экулизумабом** включает назначение фолиевой кислоты (5 мг/сут), витамина В<sub>12</sub> (при дефиците), препаратов железа (при дефиците), антикоагулянтов (варфарин, низкомолекулярный гепарин (НМГ)) при тромботических осложнениях, трансфузий препаратов крови в зависимости от клинических симптомов, гидратации при развитии гемолитического криза. Препараты железа должны назначаться с осторожностью в связи с возможностью усиления гемолиза.

#### *Беременность при пароксизмальной ночной гемоглобинурии*

Беременность при ПНГ характеризуется высокой частотой осложнений, материнской и детской смертностью. Показано совместное ведение беременности акушерами-гинекологами и гематологами, повышение дозы препарата в III триместре беременности и при «прорывном» гемолизе (до 900 мг в неделю), профилактическая антикоагулянтная терапия (НМГ), назначение фолиевой кислоты, препаратов железа, трансфузии эритроцитов и тромбоцитов при необходимости.

Экулизумаб не обнаруживается в грудном молоке и пуповинной крови.

#### **5.2. Трансплантация костного мозга**

В то время как экулизумаб позволяет контролировать внутрисосудистый гемолиз и связанные с ним осложнения ПНГ, аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ) остается единственным радикальным методом, позволяющим добиться излечения при данном заболевании. Однако ТКМ сопряжена с высокой летальностью. Так, в ретроспективном исследовании на 26 пациентах с ПНГ из Италии, получивших ТКМ, 10-летняя выживаемость составила 42 %, а вероятность 2-летней выживаемости у 48 пациентов, получивших ТКМ от HLA-идентичного сиблинга, по данным Международного регистра трансплантации костного мозга, составила 56 % [40, 41]. Вне зависимости от показаний, по которым проводится ТКМ, частота осложнений остается очень высокой. Частота реакции «трансплантат против хозяина» у пациентов с ПНГ составляет 42–54 % [40, 42], у половины пациентов развивается веноокклюзионная болезнь печени [43], и, кроме того, сохраняется риск экспансии ПНГ-клона [44]. ТКМ и связанные с ней осложнения негативно влияют на качество жизни пациентов [45, 46].

В связи с этим классическая форма ПНГ, в том числе с тромботическими осложнениями, в настоящее время больше не является показанием для ТКМ. Недавно были опубликованы результаты ретроспективного многоцентрового анализа ТКМ у 211 пациентов, проведенного Европейской группой трансплантации костного мозга и Французским обществом гематологов [47]. Общая 5-летняя выживаемость трансплантированных пациентов с ПНГ составила  $68 \pm 3 \%$  ( $54 \pm 7 \%$  в группе больных с классической ПНГ, трансплантированных в связи с тромботическими осложнениями;  $69 \pm 5 \%$  у пациентов с АА/ПНГ без анамнеза тромботических событий и  $86 \pm 6 \%$  в группе пациентов с классической ПНГ, у которых показанием для ТКМ был рецидивирующий гемолиз). Кроме того, был проведен сравнительный анализ общей выживаемости 24 пар больных ПНГ с тромбозами в анамнезе, получивших и не получивших ТКМ. Выживаемость больных в группе ТКМ была достоверно ниже. Эти данные убедительно показывают, что тромботические осложнения также не могут быть показанием для ТКМ. В связи с этим ТКМ проводится в рамках стандартных показаний при аплазии кроветворения (АА/ПНГ и АА/субклиническая ПНГ), редких случаях клональной трансформации ПНГ в МДС / острый лейкоз или при наличии однойцевого близнеца [3].

#### **5.3. Антикоагулянтная терапия**

После тромботического события может быть рекомендована длительная (пожизненная) терапия антикоагулянтами (производные кумарина или гепарины). Терапия синдрома Бадда–Киари требует нахождения пациента в специализированном хирургическом отделении для проведения локального и системного тромболитика. Антикоагулянтная терапия для первичной профилактики тромбозов может быть показана в отдельных случаях при выявлении ПНГ-клона в  $\geq 50 \%$  гранулоцитов и при наличии дополнительных рисков тромботических осложнений, за исключением больных с аплазией костного мозга [23].

#### **Благодарность**

*Авторы выражают благодарность профессору Питеру Хиллмену (Университетский госпиталь св. Джеймса, Лидс, Великобритания) за участие в обсуждении и составлении данного документа.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Hillmen P., Lewis S. M., Bessler M. et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995;333:1253–8.
- Socié G., Mary J. Y., 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.
- Kelly R., Richards S., Hillmen P., Hill A. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab. *Ther Clin Risk Manag* 2009;5:911–21.
- McKeage K. Eculizumab: a review of its use in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Drugs* 2011;71:2327–45.
- Hillmen P., Muus P., Dührsen U. et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients



- with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007;110:4123–8.
6. Hill A., Richards S.J., Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2007;137:181–92.
  7. Lee J., Jun Ho J., Sung Soo Y. et al. High prevalence and mortality associated with thromboembolism in Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Haematologica* 2010;95:205–6.
  8. Figueroa J.E., Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:359–95.
  9. Cappellini M.D. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007;74–8.
  10. Bessler M., Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;104–10.
  11. Woodruff T.M., Nandakumar K.S., Tedesco F. Inhibiting the C5–C5a receptor axis. *Mol Immunol* 2011;48:1631–42.
  12. Parker C., Omine M., Richards S. et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699–709.
  13. Parker C.J. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:21–9.
  14. Madkaikar M., Gupta M., Jijina F., Ghosh K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages & limitations. *Eur J Haematol* 2009;83:503–11.
  15. Borowitz M.J., Craig F.E., Digiuseppe J.A. 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.
  16. Schubert J., Alvarado M., Uciechowski P. et al. Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1991;79:487–92.
  17. Höchsmann B., Rojewski M., Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011;90:887–99.
  18. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S. et al. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459–66.
  19. de Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008;112:3099–106.
  20. Brodsky R.A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009;113:6522–7.
  21. Movalia M.K., Weitz I., Lim S.H., Illingworth A. Incidence of PNH clones by diagnostic code utilizing high sensitivity flow cytometry. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2011;118:1033.
  22. Wanachiwanawin W., Siripanyaphinyo U., Piyawattanasakul N., Kinoshita T. A cohort study of the nature of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones and PIG-A mutations in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol* 2006;76:502–9.
  23. Hall C., Richards S., Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003;102:3587–91.
  24. Nishimura J., Kanakura Y., Ware R.E. et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)* 2004;83:193–207.
  25. Moyo V.M., Mukhina G.L., Garrett E.S., Brodsky R.A. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004;126:133–8.
  26. Brubaker L.H., Essig L.J., Mengel C.E. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1977;50:657–62.
  27. Dunn D.E., Tanawattanacharoen P., Bocconi P. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999;131:401–8.
  28. Wang H., Chuhjo T., Yasue S. et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002;100:3897–902.
  29. Sugimori C., Chuhjo T., Feng X. et al. Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 2006;107:1308–14.
  30. 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;164:546–54.
  31. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Nelson K.L. et al. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 1999;93:1749–56.
  32. Mukhina G.L., Buckley J.T., Barber J.P. et al. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient hematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;115:476–82.
  33. Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J. et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:167–77.
  34. Parker C.J. Bone marrow failure syndromes: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:333–46.
  35. Hillmen P., Hall C., Marsh J.C. et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004;350:552–9.
  36. Hillmen P., Young N.S., Schubert J. et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006;355:1233–43.
  37. Brodsky R.A., Young N.S., Antonioli E. et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111(4):1840–7.
  38. Kelly R.J., Hill A., Arnold L.M. et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* 2011;117:6786–92.
  39. 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.
  40. Santarone S., Bacigalupo A., Risitano A.M. et al. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica* 2010;95:983–8.
  41. Saso R., Marsh J., Cevreska L. et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999;104:392–6.
  42. de Latour R.P., Schrezenmeier H., Mary J.Y. et al. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: an ongoing joint study of the AAWP EBMT Group and the French Society of Haematology (EBMT abstract 316). *Bone Marrow Transplant* 2009;43(Suppl 1):57–8.
  43. Armitage J.O. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330:827–38.
  44. Benavides Lopez E. PNH clonal expansion following bone marrow transplant: case report. *Haematologica* 2011;96:524.
  45. Fraser C.J., Bhatia S., Ness K. et al. Impact of chronic graft-versus-host disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 2006;108:2867–73.
  46. Bieri S., Roosnek E., Helg C. et al. Quality of life and social integration after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:819–27.
  47. de Latour R.P., Schrezenmeier H., Bacigalupo A. et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2012;97(11):1666–73.