

Nocna napadowa hemoglobinuria — patofizjologia, klasyfikacja i nowoczesna diagnostyka

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria — pathophysiology, classification and modern diagnostics

Justyna Spychalska, Ewa Brojer

Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa

Streszczenie

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH) to rzadko występująca nabyta choroba klonalna krwiotwórczej komórki macierzystej wywołana mutacją somatyczną genu PIGA. W wyniku mutacji dochodzi do nienowotworowej ekspansji komórek potomnych pozbawionych cząsteczek glikosylfosfatydyloinozytolu (klon z defektem PNH) oraz, związanych za jego pośrednictwem z błoną komórkową, białek o różnej funkcji, w tym inhibitorów dopełniacza CD55 i CD59. Niedobór lub całkowity brak tych białek na erytrocytach pełni kluczową rolę w patogenezie PNH. U chorych występuje triada wyrażonych w różnym stopniu objawów klinicznych, takich jak hemoliza, zaburzenia zakrzepowe i zaburzenia wynikające z niewydolności szpiku. Uwzględniając objawy kliniczne i wielkość klonu z defektem, obecnie wyróżnia się trzy postacie PNH, tj. klasyczną PNH, klon PNH towarzyszący niewydolności szpiku oraz subkliniczną postać PNH. Podstawą nowoczesnej diagnostyki PNH jest technika cytofluorometrii przepływowej z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych, a także odczynnika FLAER. W pracy omówiono objawy kliniczne choroby i ich patomechanizm, przedstawiono prezentowane w piśmiennictwie teorie tłumaczące nienowotworową ekspansję patologicznego klonu oraz zaprezentowano metody stosowane do wykrywania klonu PNH i do monitorowania jego wielkości.

Słowa kluczowe: nocna napadowa hemoglobinuria, defekt komórki krwiotwórczej, diagnostyka, FLAER

Hematologia 2013; 4, 4: 301–320

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired clonal hematopoietic stem cell disease due to the somatic mutation of the PIGA gene. As a result, the clonal expansion of cells without glycosylphosphatidylinositol molecules (PNH clone) is observed which is associated with the lack of several proteins of different functions, including complement inhibitors CD55 and CD59. The deficiency of these proteins on erythrocyte surface is the main factor of the pathogenesis of PNH. In patients with PNH a triad of symptoms, expressed in varying degrees is observed, including hemolysis, thrombotic disorders and bone marrow failure. PNH is currently classified, taking into account clinical symptoms and the size of the defect into three groups: classical PNH, PNH clone accompanying marrow failure, and subclinical form of PNH. Modern diagnostic methods based

Adres do korespondencji: Justyna Spychalska, Zakład Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, tel./faks: 22 349 66 11, e-mail: jspychalska@ihit.waw.pl

on the flow cytometry analysis, using monoclonal antibodies, as well as FLAER reagent is essential for the detection and monitoring of PNH clone size, which has an important practical significance.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, hematopoietic stem cell defect, diagnosis, FLAER

Hematologia 2013; 4, 4: 301–320

Wprowadzenie

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*) to nabyta choroba klonalna krwiotwórczej komórki macierzystej (HSC, *hematopoietic stem cell*) wywołana mutacją somatyczną genu *PIGA* (*phosphatidylinositol glycan class A*) zlokalizowanego na chromosomie X. Po raz pierwszy chorobę opisał niemiecki lekarz Paul Strübing w 1882 roku u 29-letniego robotnika uskarżającego się na zmęczenie, bóle brzucha i ciężkie nocne napady hemoglobinurii, które nasilały się po spożyciu nadmiernej ilości alkoholu, po wysiłku fizycznym oraz po podaniu soli żelaza. Strübing sądził, że erytrocyty chorego są nadwrażliwe na zakwaszenie osocza podczas snu i w efekcie podatniejsze na hemolizę [1]. W latach 1937–1939 Thomas Hale Ham [2] wykazał, że w warunkach *in vitro* zakwaszenie surowicy wywołuje hemolizę krwinek czerwonych pochodzących od chorych na PNH. Kolejne lata dostarczyły dowodów na udział alternatywnej drogi dopełniacza w tym procesie [3]. Pogląd o szkodliwości kwaśnych potraw dla chorych na PNH podaje się do dziś w niektórych podręcznikach, choć na tezę tę nie ma dowodów klinicznych. Hemoliza wynika z niszczenia krwinek przez białka dopełniacza, może mieć charakter przewlekły i przebiegać nie tylko w nocy. Hemoglobinuria może, lecz nie musi występować. Nazwa choroby jest zatem poniekąd mylna.

Znaczący postęp w rozpoznawaniu PNH wiąże się z udoskonaleniem jej diagnostyki dzięki zastosowaniu czułych technik cytofluorometrycznych, które obecnie całkowicie wyparły stosowane dawniej test Hama i test sacharozowy (inkubacja badanych krwinek w surowicy z dodatkiem sacharozy). Dziś wiadomo, że PNH rozpoznaje się w każdym wieku, choć najczęściej u młodych osób. Występowanie choroby szacuje się na 1,3/mln osób/rok [4].

Gen *PIGA* koduje enzym — podjednostkę A transferazy fosfatydyloinozytolowo-N-acetyloglukozaminowej, który odpowiada za pierwszy etap syntezy związku lipidowego — glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*). Za pozostałe etapy, których jest przynajmniej dziesięć,

są odpowiedzialne enzymy kodowane przez wiele innych genów [5]. Ostatnio u chorego na PNH wykazano, że u podłoża braku ekspresji GPI leżały dwie mutacje dotyczące genu *PIGT* [6].

Glikozylofosfatydyloinozytol stanowi kotwicę dla wielu białek błonowych (tab. 1), zwanych dalej białkami związanymi z GPI (GPI-AP, *GPI anchored proteins*), między innymi dwóch białek pełniących funkcję inhibitorów dopełniacza — CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*) oraz CD59 (MIRL, *membrane inhibitor of reactive lysis*). Na alternatywnej drodze aktywacji dopełniacza białko CD55 zapobiega opsonizacji komórek składnikami C3, natomiast białko CD59 blokuje tworzenie kompleksu atakującego błonę (MAC, *membrane attack complex*). Do GPI-AP należą też białka regulujące procesy adhezji i zatrzymywania komórek krwiotwórczych w szpiku [7, 8].

W efekcie mutacji w genie *PIGA* na etapie multipotencjalnej HSC dochodzi do nienowotworowej, klonalnej ekspansji komórek potomnych pozbawionych cząsteczek GPI oraz GPI-AP. Niedobór lub całkowity brak CD55 i CD59 na erytrocytach prowadzi do przewlekłej wewnątrznaczyniowej hemolizy, epizodów hemoglobinurii oraz zakrzepicy. Obecność klonu komórek GPI-ujemnych (GPI-) obserwuje się również u 50–60% pacjentów z niedokrwistością aplastyczną (AA, *aplastic anemia*) oraz u 15–20% pacjentów z zespołem krwiotwórczych (MDS, *myelodysplastic syndrome*) [10].

Podłoże molekularne

Gen *PIGA*, którego mutacje leżą u podłoża PNH, ma około 17 kb (*kilo base*) długości i składa się z 6 eksonów. Znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu X (Xp22.1). Jego sekwencję poznano w 1993 roku [11]. Gen *PIGA* koduje białko o długości 484 aminokwasów. W komórkach somatycznych jest aktywny tylko jeden chromosom X (u kobiet 1 jest losowo inaktywowany), dlatego wystąpienie mutacji prowadzi do powstania klonu komórek z defektem, zarówno u mężczyzn, jak i u kobiet. Interesujący jest fakt, że u chorych z PNH mutację genu *PIGA* obserwuje się wyłącznie w komórkach

Tabela 1. Białka związane z kotwicami GPI na komórkach krwiotwórczych (wg [9] zmodyfikowano)**Table 1.** GPI-anchored proteins in hematopoietic stem cells (acc. to [9] modified)

Antygen białkowy	Funkcja	Występowanie komórkowe
CD14	Receptor dla lipopolisacharydów (LPS), oddziaływania z TLR4 (<i>toll-like receptor</i>)	Monocyty, słaba ekspresja na granulocytach
CD16 (FcγRIII)	Receptor dla Fc IgG	Granulocyty obojętnochłonne (związany z GPI), komórki NK i limfocyty T (forma transbłonowa)
CD24	Nieznana	Limfocyty B, granulocyty obojętnochłonne
CD48	Adhezja, (?) receptor/ligand dla CD2	Limfocyty, monocyty
CD52	Nieznana	Limfocyty, monocyty
CD55 (DAF), antygen grupowy Cromer	Regulacja aktywacji dopełniacza, ogranicza tworzenie konwertaz C3'	Wszystkie komórki krwiotwórcze, powszechnie występuje na komórkach niekrwiotwórczych
CD58 (LFA-3)	Adhezja, ligand dla CD2 sygnał kostymulujący w odpowiedzi immunologicznej	Wszystkie komórki krwiotwórcze (występuje w formie transbłonowej i związanej z GPI)
CD59 (MIRL)	Hamuje tworzenie MAC i chroni komórki przed lizą zależną od dopełniacza; sygnał komórkowy w aktywacji limfocytów T	Wszystkie komórki krwiotwórcze, powszechnie występuje na komórkach niekrwiotwórczych
CD66b (dawniej CD67)	Adhezja homofilowa/heterofilowa, aktywacja komórkowa	Granulocyty, komórki śródbłónka
CD66c	Adhezja	Komórki mieloidalne od mielocytu
CD66e (CEA, <i>carcinoembryonic antigen</i>)	Marker nowotworowy	Organizm płodu, później różne narządy
CD73 (5' nukleotydaza)	Enzym, immunoregulacja	Limfocyty B i T
CD87 (uPAR)	Receptor, przemiana plazminogenu w plazminę	Limfocyty T, komórki NK, monocyty, granulocyty obojętnochłonne, komórki niekrwiotwórcze, ekspresja wzrasta podczas aktywacji
CD90 (Thy-1)	Regulator adhezji, migracji i kontaktów między komórkami	Komórki macierzyste (MSC, HPC), limfocyty T
CD108 (antygen grupowy JMH)	(?) adhezja	Erytrocyty, słaba ekspresja na limfocytach, wysoka na aktywowanych limfocytach i makrofagach
CD109	Nieznana	Zaktywowane limfocyty T, płytki krwi, megakariocyty, subpopulacja komórek macierzystych CD34+
CD157 (BST-1)	Ektoenzym o aktywności cykazy ADP-rybozylowej i hydrolazy cyklicznej ADP-rybozy, cząsteczka sygnałowa — rola w polaryzacji, migracji i diapedezie	Komórki stromalne szpiku kostnego, monocyty, granulocyty
CD177 (NB1)	Glikoproteina, kofaktor dla proteiny 3, regulacja aktywacji płytek krwi	Granulocyty obojętnochłonne
p50-80		Granulocyty obojętnochłonne
GP500		Płytki krwi
GP175		Płytki krwi
Acetylocholinesteraza (AChE, antygen grupowy Yt)	Enzym	Erytrocyty
Do (antygen grupowy Dombrock)	Enzym ADP-rybozylotransferaza	Erytrocyty, limfocyty
fosfataza alkaliczna	Enzym	Granulocyty obojętnochłonne

(?) — prawdopodobna funkcja; GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) — glikozylfosfatydiloinozytol; NK (*natural killers*) — naturalna cytotoxyczność; MAC (*membrane attack complex*) — kompleks atakujący błonę; uPAR (*urokinase plasminogen activator receptor*) — receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu; MSC (*mesenchymal stem cells*) — mezenchymalne komórki macierzyste; HPC (*hematopoietic progenitor cells*) — progenitorowe komórki krwiotwórcze; ADP (*adenosine diphosphate*) — adenozyndifosforan

krwiotwórczych. Jej pojawienie się w komórkach linii zarodkowej jest letalne [12].

Nocna napadowa hemoglobinuria jest chorobą nabytą. Ponieważ mutacja w *PIGA* pojawia się w multipotencjalnej HSC na wczesnych etapach jej różnicowania, to w konsekwencji dotyczy wszystkich linii komórek krwiotwórczych. Wykazano, że u danego chorego we wszystkich tych liniach obecna jest taka sama mutacja [7, 11, 13]. We krwi obwodowej chorego obok komórek z mutacją (klon PNH) obecne są też komórki prawidłowe, a ich wzajemne proporcje zmieniają się w trakcie przebiegu choroby [14, 15].

Do tej pory zidentyfikowano ponad 180 mutacji w genie *PIGA* w komórkach krwiotwórczych pacjentów z PNH. U większości pacjentów z PNH występuje tylko jedna mutacja, u nielicznych stwierdzono, że jest ich więcej [16, 17]. Mutacje są rozłożone w całym regionie kodującym ten gen. Większość mutacji powoduje przesunięcie ramki odczytu, która prowadzi do produkcji nieaktywnego białka *PIGA* i do utraty jego zdolności enzymatycznej. U niektórych chorych w genie *PIGA* występują mutacje punktowe skutkujące jedynie obniżeniem aktywności glikozylotransferazy, z zachowaniem do pewnego stopnia funkcji enzymatycznej. Wyjaśnia to niski poziom ekspresji GPI-AP na komórkach krwiotwórczych u chorych z takim typem mutacji [18–20]. Ostatnie doniesienia wskazują, że za niedobór kotwic GPI mogą być odpowiedzialne mutacje w genach czynników transkrypcyjnych regulujących biosyntezę GPI [21, 22].

Niewielką liczbę komórek GPI ($1/50\ 000 = 0,002\%$) wykrywa się też u osób zdrowych [7, 23, 24]. Komórki te nie ulegają jednak rozprzestrzenieniu i dominacji we krwi obwodowej. Jednym z powodów jest fakt, że u osób zdrowych mutacja w genie *PIGA* pojawia się w komórkach o wyższym stopniu zróżnicowania, na przykład na etapie komórki tworzącej kolonie, które nie mają zdolności samoodnawiania [7, 13, 25]. W badaniach na zwierzętach, u których skutek manipulacji genetycznych gen *PIGA* stał się nieaktywny, wykazano również, że komórki z defektem nie ulegają ekspansji. Dodatkowo u zwierząt obecność klonu z defektem nie prowadzi do choroby analogicznej do PNH [26, 27]. Obserwacje te świadczą o tym, że obecność zmutowanego genu nie wystarcza, by wywołać chorobę.

Istnieje kilka teorii próbujących wyjaśnić przyczyny rozwoju i dominacji klonu z mutacją *PIGA* nad komórkami bez tej mutacji u chorych z PNH [7, 10, 14, 28–30]. Według najwcześniejszej z nich komórki z defektem PNH mogą unikać

ataku immunologicznego na komórki macierzyste szpiku, ponieważ nie mają na swojej powierzchni antygenów GPI-AP, które są celem tego ataku. Natomiast komórki z prawidłową ekspresją GPI-AP są niszczone. Ważną przesłanką do teorii tak zwanej pozytywnej selekcji klonu komórek GPI– jest obserwacja szczególnego związku PNH z AA, w której patomechanizm są zaangażowane procesy immunologiczne. Wydaje się więc, że w PNH komórki z defektem wykazują cechy pozwalające im uniknąć niszczenia na drodze immunologicznej [31, 32]. U chorych na PNH, w porównaniu z osobami zdrowymi, zaobserwowano większą liczbę limfocytów T (głównie CD8+) o właściwościach cytotoksycznych i mających receptory charakterystyczne dla komórek naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killer*) (m.in. CD56, NKG2D). Komórki te, zwane NKT, wykazywały w niektórych testach wyższą aktywność cytolityczną wobec prawidłowych krwiotwórczych komórek progenitorowych CD34+ niż wobec komórek progenitorowych GPI– [33]. W badaniach *in vitro* wykazano również, że komórki z mutacją PNH są mniej wrażliwe na niszczenie przez komórki NK i cytotoksyczne limfocyty T (CD4+) niż komórki bez mutacji [34, 35]. Za teorią immunoselekcji przemawia również występowanie związku między obecnością defektu PNH a określonymi haplotypami ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA, *human leucocyte antigen*) [36–38]. W badaniach Nowaka i wsp. [39] wykazano, że komórki CD34+ (bez rozróżnienia na GPI– i GPI+) u chorych na PNH mają większą liczbę cząsteczek HLA-DR na swej powierzchni niż komórki CD34+ osób zdrowych. Taka nadekspresja antygenów należących do klasy II kompleksu zgodności tkankowej (MHC, *major histocompatibility complex class II*) sugeruje udział limfocytów T regulatorowych w supresji hematopoezy przez cytotoksyczne limfocyty T w PNH [39].

Przeciwnicy tej teorii zwracają jednak uwagę, że nie ma bezpośrednich dowodów na to, by immunologiczny atak w AA był skierowany w sposób szczególny do GPI-AP. Zastanawiający jest też fakt braku jakichkolwiek epitopów tych białek, które są syntetyzowane, a następnie degradowane w komórkach PNH [7]. Być może, autoreaktywne limfocyty T są skierowane bezpośrednio do cząsteczek GPI obecnych na prawidłowych HSC lub też preferencyjna proliferacja komórek HSC GPI– zachodzi dzięki ich zmniejszonej wrażliwości na cytokiny, które są inhibitorami hematopoezy [40]. W najnowszych badaniach Gargiulo i wsp. [41] wykazali, że celem ataku limfocytów T CD8+ pochodzących od pacjentów z PNH były cząsteczki GPI prezen-

towane przez glikoproteiny CD1d (występujące na komórkach prezentujących antygen), co świadczyłoby na korzyść pierwszej z powyższych teorii.

Zgodnie z inną teorią zakłada się, że aby komórka macierzysta z mutacją PNH zaczęła dominować nad komórkami zdrowymi, musi się w niej pojawić dodatkowa, dotychczas niezidentyfikowana mutacja. W pierwszym etapie dochodzi do pozytywnej selekcji komórek pozbawionych GPI-AP, w drugim — do ich klonalnej ekspansji pod wpływem mutacji, która zwiększa ich zdolności proliferacyjne. Za tak zwany dwustopniowy model może przemawiać wykrycie u niektórych chorych na PNH rearanżacji chromosomu 12 prowadzącej do deregulacji ekspresji genu *HMGA2* [42–44]. Badania innych autorów przeczą roli zaburzeń w *HMGA2* w rozwoju PNH [45]. Tym niemniej możliwość zaangażowania innej mutacji, czy nawet mechanizmów epigenetycznych, nie jest wykluczona [7, 43].

Według kolejnej teorii mutacja genu *PIGA* chroni HSC przed zaprogramowaną śmiercią komórek, czyli apoptozą [46, 47]. Nadmierna akumulacja substratu — fosfatydyloinozytolu — mogłaby się przyczynić do rozwoju klonu PNH, ponieważ nadawałby komórkom GPI– zdolność do uniknięcia apoptozy poprzez aktywację fosfolipazy D, kinazy-3-fosfatydyloinozytolu i serynowo-treoninowej kinazy Akt oraz supresję czynników transkrypcyjnych FOXO (*forkhead box O1*). Jak dotąd brakuje jednak dowodów potwierdzających akumulację fosfatydyloinozytolu w komórkach z defektem PNH [39]. Podobnie brak lub obniżona ekspresja kotwic GPI, powodując zaburzenia struktury tratw lipidowych w błonie, mogłaby utrudnić indukcję sygnału prowadzącego do apoptozy [48]. Jednak w badaniach na granulocytach GPI– pochodzących od chorych na PNH i granulocytach GPI+ zdrowych osób nie wykazano różnic w zakresie wrażliwości tych komórek na spontaniczną apoptozę [49]. Ponadto zaobserwowano, że prawidłowe granulocyty chorych na PNH łatwiej ulegają apoptozie niż granulocyty z defektem [50]. Podobnie doświadczenia na komórkach CD34+ z defektem PNH wykazały zbliżony stopień zdolności proliferacyjnych i wrażliwości na czynniki indukujące apoptozę jak komórki CD34+ pochodzące od osób zdrowych. Natomiast komórki CD34+ z prawidłową ekspresją GPI-AP występujące u chorych na PNH były bardziej podatne na apoptozę niż komórki zdrowych osób [51]. Powyższe dane wskazują na udział dodatkowego czynnika, który przyczynia się do nadmiernego niszczenia prawidłowych komórek szpiku u tych osób.

Rozwój klonu PNH i jego dominacja nad komórkami bez mutacji są też tłumaczone obniżeniem ekspresji lub całkowitym brakiem białek indukowanych przez stres (*stress-inducible membrane proteins*), takich jak na przykład ULBP (*UL binding protein*), które należą do GPI-AP. Białka te są ligandami dla glikoproteiny UL-16 cytomegalowirusa. Wykazano, że cząsteczka UL-16 jest celem ataku komórek NK i limfocytów T. Aktywacja tych komórek zachodzi przy udziale NKG2D (*natural-killer group 2, member D*), który jest receptorem dla cząsteczek ULBP. Brak lub obniżona ekspresja ULBP może prowadzić do pozytywnej immunoselekcji klonu PNH [44, 52, 53].

Ostatnio Ratajczak i wsp. [54] zaproponowali kolejną teorię tłumaczącą ekspansję klonu z mutacją w *PIGA* u chorych na PNH. Autorzy ci dowiedli, że komórki z mutacją są bardziej ruchliwe niż komórki bez mutacji — zarówno w obrębie szpiku, jak i podczas mobilizacji do krwi obwodowej. U badanych pacjentów z PNH liczba komórek CD34+/GPI– w krwi obwodowej była 4–25 razy większa niż liczba komórek CD34+/GPI+. Rozwój klonu PNH według tej teorii wiąże się ze zmniejszoną adhezją zmutowanych komórek wskutek zaburzeń w tratwach lipidowych i braku białek zaangażowanych w utrzymywanie HSC w szpiku [54]. Dzięki zwiększonej ruchliwości komórki te wypierają prawidłowe HSC przy zasiedlaniu nisz szpikowych oraz preferencyjnie przemieszczają się do krwi w reakcji na wzrost stężenia sfingozyno-1-fosforanu — związku chemotaktycznego uwalnianego z erytrocytów uszkodzonych przez MAC podczas aktywacji układu dopełniacza [28].

Jak wyżej wykazano, na każdą z powyższych teorii dotyczących przyczyn progresji klonu PNH istnieje wiele dowodów eksperymentalnych i klinicznych. Wydaje się prawdopodobne, że mechanizmy te mogą być różne i zależne od haplotypów HLA [37, 38].

Patofizjologia i objawy kliniczne

Jak opisano powyżej, u podłoża PNH leży mutacja somatyczna w genie *PIGA* kodującego PIGA — podjednostkę A transferazy fosfatydyloinozytolowo-N-acetyloglukozaminowej (UDP-GlcNAc: PI- α -1, 6-GlcNAc-transferazy), tj. enzymu koniecznego do zaistnienia pierwszego etapu biosyntezy cząsteczek GPI [55], która zachodzi w retikulum endoplazmatycznym. Również na obszarze retikulum dochodzi do syntezy białek, które następnie przyłączają się do kotwic GPI i wraz z nimi są transportowane na powierzchnię komórki do

traw lipidowych [56]. Obecnie znanych jest blisko 30 GPI-AP na komórkach krwiotwórczych. Mają one różne funkcje; są to między innymi enzymy, inhibitory dopełniacza i cząsteczki adhezyjne. Są wśród nich również białka, których funkcja nie została jeszcze poznana (tab. 1).

Komórki z mutacją w genie *PIGA* cechuje niedobór wszystkich GPI-AP. Kluczowym dla patofizjologii PNH jest brak lub niedobór na powierzchni komórek dwóch z nich — CD55 i CD59, które pełnią funkcję regulującą aktywację dopełniacza. Ich niedobór powoduje nadmierną wrażliwość krwinek czerwonych na lisę przy udziale dopełniacza [18, 57, 58].

U ludzi układ dopełniacza składa się z 30–50 białek występujących w osoczu i na powierzchni komórek [59]. Aktywacja dopełniacza może zachodzić trzema drogami: klasyczną, alternatywną i lektynową. Odbyna się za pomocą wielu następujących po sobie reakcji proteolizy prowadzących do umieszczenia na komórce docelowej cząsteczek C3b. Zainicjowany szlak aktywacji dopełniacza prowadzi do utworzenia MAC ze składników dopełniacza: C5b, C6, C7, C8 i C9. Kompleks ten tworzy pory w błonie komórkowej i powoduje rozpad komórki docelowej. Ochrona komórek przed niszczącym atakiem dopełniacza następuje poprzez działanie inhibitorów aktywacji. Białko CD55 drastycznie skraca okres półtrwania konwertazy C3, zapobiegając opsonizacji krwinek składnikami C3b, dzięki czemu nie zostają one zniszczone przez makrofagi śledzionowe. Białko CD59 blokuje przyłączenie polimerów C9 do pozostałych składowych C5b-8, zapobiegając tworzeniu MAC i chroniąc komórki przed lisą wewnątrzmaczyniową. Istnieją również inne czynniki regulujące działanie komplementu, między innymi błonowy kofaktor białkowy (MCP, *membrane cofactor protein*, CD46), który wiąże C3b i C4b i jest obecny praktycznie na wszystkich komórkach jądrzastych organizmu. Spośród wymienionych czynników dwa pierwsze są dołączone do powierzchni komórek przez kotwicę GPI, a pozostałe są bezpośrednio osadzone w błonie komórkowej za pośrednictwem domeny transbłonowej. Większość komórek ludzkich, w tym płytki krwi i leukocyty, są zaopatrzone w oba typy inhibitorów. Ludzkie krwinki czerwone nie mają MCP i jedynie białka CD55 i CD59 stanowią ochronę przed procesem lizy wywołanej przez dopełniacz. U chorych na PNH erytrocyty są znacznie bardziej wrażliwe na lisę niż płytki krwi i leukocyty [60, 61].

To, że zaburzenie mechanizmów hamujących tworzenie MAC jest podstawą patofizjologii PNH, było wiadome od wielu lat [3]. Pełne zrozumienie

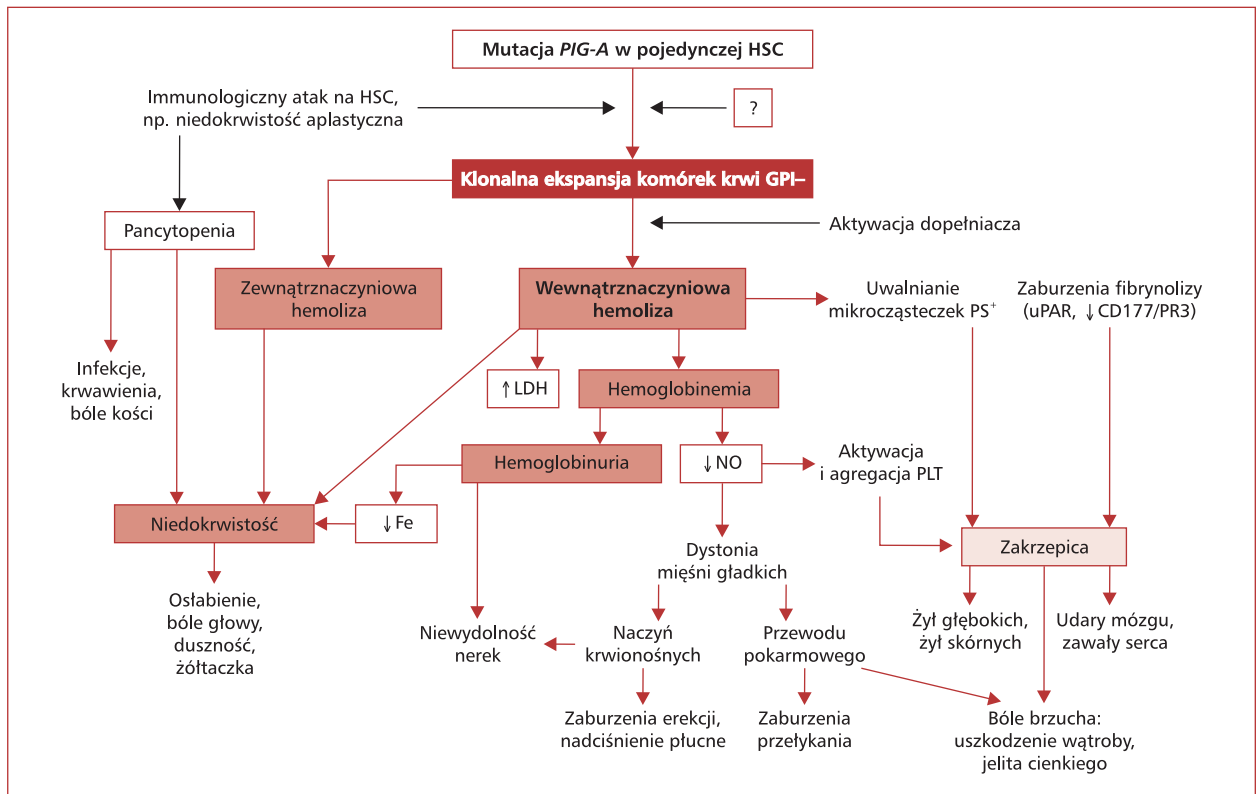
tego procesu pozwoliło na wyprodukowanie i wprowadzenie do leczenia PNH przeciwciała monoklonalnego skierowanego do składnika C5 dopełniacza. Lek ten — ekulizumab (Solaris, Alexion Pharmaceuticals Inc, Cheshire, CT, USA) — uniemożliwia tworzenie C5b z rozpadu C5, hamując w ten sposób aktywację dopełniacza drogą alternatywną [62].

Inne białka, których ekspresja na komórkach jest zmniejszona u chorych na PNH, to acetylocholinesteraza w erytrocytach [63] czy fosfataza alkaliczna w granulocytach [64]. Znaczenie tych zaburzeń w patogenezie PNH jest niejasne.

W patogenezie PNH pewną rolę może odgrywać nagromadzenie w osoczu białek, które u osób zdrowych są obecne jako GPI-AP [65]. Wykazano na przykład, że stężenie receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (uPAR, *urokinase plasminogen activator receptor*, CD87) jest wyższe w osoczu chorych na PNH niż u osób zdrowych [66]. Procesy zaangażowane w patofizjologię PNH i ich skutki kliniczne przedstawiono na rycinie 1.

Hemoliza i jej konsekwencje

Niedokrwistość hemolityczna, która jest wynikiem opisanego wyżej wewnątrzmaczyniowego rozpadu erytrocytów z powodu braku lub niedoboru białek regulujących działanie komplementu, ma bardzo duże i wielorakie konsekwencje kliniczne u chorych na PNH [29, 67]. Obecnie wydaje się, że są one znacznie szersze niż uważano pierwotnie. W wyniku uszkodzania erytrocytów przez dopełniacz do osocza zostaje uwalniana hemoglobina (Hb). Obecna w osoczu haptoglobina wiąże się w kompleksy z dimerami Hb. Kompleksy te są rozpoznawane przez receptory znajdujące się na powierzchni monocytów i makrofagów i ostatecznie niszczone w drodze fagocytozy [68]. Po wyczerpaniu się puli haptoglobiny wolno krążące cząsteczki hemoglobiny wiążą się nieodwracalnie z tlenkiem azotu (NO, *nitric oxide*), co doprowadza do zmniejszenia dostępności tego związku we krwi obwodowej. Dodatkowo synteza NO również jest ograniczona w wyniku uwolnienia z erytrocytów arginazy — enzymu, który unieczynnia substrat L-argininę. Tlenek azotu jest bardzo ważnym, endogennym czynnikiem wazorelaksacyjnym i przeciwzakrzepowym. Jest również niezbędnym regulatorem napięcia mięśniowego. Tlenek azotu bierze również udział w regulacji aktywności płytek krwi przez hamowanie ich zdolności do agregacji i adhezji. Wyczerpanie się jego zasobów w wyniku związania z Hb ma więc też wpływ na funkcję komórek śródbłonna. Obniżone stężenie NO prowadzi do skurczu mięśni gładkich, a w konsekwencji do



Rycina 1. Patofizjologia nocnej napadowej hemoglobinurii; HSC — krwiotwórcza komórka macierzysta; GPI — glikozylfosfatydilinozitol; uPAR — receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu; PR3 — proteinaza 3; LDH — dehydrogenaza mleczanowa; PS — fosfatydylseryna; NO — tlenek azotu; Fe — żelazo; PLT — płytki krwi

Figure 1. Pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; HSC — hematopoietic stem cell; GPI — glycosylphosphatidylinositol; uPAR — urokinase plasminogen activator receptor; PR3 — proteinase 3; LDH — lactate dehydrogenase; PS — phosphatidylserine; NO — nitric oxide; Fe (łac.) — *ferrum*; PLT — platelets

zwężenia naczyń krwionośnych, co doprowadza do wystąpienia nadciśnienia płucnego, skurczu przełyku i dysfagii oraz zaburzeń erekcji. W wyniku niedoboru NO dochodzi także do zwężenia światła jelit [69–71]. Wiele objawów klinicznych obserwowanych u chorych na PNH, takich jak: bóle brzucha, wzdęcia, bóle pleców, bóle głowy, zmęczenie, można wiązać z niedoborem NO [68].

Wolna Hb oraz uwolniona z niej utleniona forma hemu wykazują bezpośrednie działanie cytotoksyczne, prooksydacyjne i prozapalne na komórki śródbłonna. Produkty rozpadu Hb przyczyniają się do aktywacji tych komórek, co sprzyja procesom zakrzepowym [72].

Hemoliza wewnątrznaczyniowa może doprowadzić do niewydolności nerek [73, 74]. Epizody hemoglobinurii prowadzą do uszkodzenia nerek przez cząsteczki hemu i uwolnionej z niego toksycznej formy żelaza, zmniejszając przepływ nerkowy, co przyczynia się do zakrzepicy żył nerkowych i niedrożności kanalików. Obserwuje

się, szczególnie u kobiet, nawracające zakażenia dróg moczowych. Po latach występowania hemoglobinurii dochodzi do progresywnej, przewlekłej niewydolności nerek, która wiąże się z martwicą kłębuszków nerkowych, atrofią kanalików i włóknieniem śródmiąższowym [60].

Liza erytrocytów wewnątrz naczyń krwionośnych wiąże się z uwolnieniem do osocza dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*). Stopień hemolizy można ocenić, badając aktywność tego enzymu w surowicy. W pracy Pu i wsp. [75] zaobserwowano liniową zależność między rozmiarem klonu PNH erytrocytów i granulocytów a aktywnością LDH w surowicy chorych. Wykazano, że klon z defektem typu PNH, który nie przekracza 3–5% erytrocytów oraz 23% granulocytów, nie skutkuje wzrostem aktywności LDH powyżej $1,5 \times$ normy [75]. Nie zwiększa również ryzyka powikłań prowadzących do przedwczesnej śmierci [76]. U pacjentów z defektem PNH, u których we krwi znajduje się więcej niż 20% erytrocytów CD59–

(typu III), najczęściej są obserwowane objawy i powikłania związane z wewnątrznaczyniową hemolizą. Natomiast u pacjentów z dużym odsetkiem erytrocytów z częściowym niedoborem CD59 (typu II) i brakiem klonu typu III nie stwierdza się nasilonej hemolizy (nieznacznie podwyższona aktywność LDH w surowicy, retikulocytoza) [4]. Przy dużym klonie erytrocytów typu II niedokrwistość hemolityczna może się okresowo zaostrzać podczas zwiększonej aktywności dopełniacza, na przykład w trakcie infekcji, urazu, zabiegu chirurgicznego, ciąży i wyjątkowego stresu [67].

Zakrzepica

U pacjentów z PNH obserwuje się wysoką częstość epizodów zakrzepowych — według różnych danych co najmniej jeden wystąpił u 29–44% chorych. Zakrzepica jest najczęstszą przyczyną zgonów w PNH [72]. Prawdopodobieństwo występowania epizodów zakrzepowych wzrasta wraz z rozwojem nieprawidłowego klonu i jest ściśle skorelowane z nasileniem hemolizy [77]. Pacjenci z dużym odsetkiem granulocytów GPI- (> 50%) są obciążeni zwiększonym ryzykiem epizodów zakrzepowych, nawet jeśli nie mają objawów hemolizy [78]. Natomiast subkliniczna postać zakrzepicy może występować u 6 na 10 pacjentów z tą chorobą. Takie subkliniczne zakrzepy mogą doprowadzić do uszkodzeń narządów, między innymi mięśnia sercowego [70].

Zakrzepica występuje zazwyczaj w obrębie krążenia żylnego, często w nietypowych miejscach, na przykład w: wątrobie, żyłach trzewnej, zatoce jamistej, żyłach krezkowych, żyłach skórnych [79]. Zakrzepica żylna zwykle objawia się nagłymi burzliwymi powikłaniami, takimi jak silne bóle brzucha, szybko powiększająca się wątroba i wodobrzusze przy zakrzepicy żył wątrobowych (zespół Budd-Chiari) [80]. Zakrzepica tętnic również może wystąpić u chorych na PNH. Opisano przypadki zakrzepicy tętniczej w ośrodkowym układzie nerwowym, krążeniu wieńcowym czy w tętnicach krezkowych wątroby [79].

Patogeneza stanu nadkrzepliwości w PNH ciągle jeszcze nie jest do końca wyjaśniona [77, 78]. Wydaje się, że na procesy prozakrzepowe wpływają uwolniona do osocza Hb i w konsekwencji zmniejszona biodostępność NO. Reaktywne formy tlenu pochodzące z produktów degradacji Hb mogą prowadzić do stanów zapalnych śródbłonna i w konsekwencji do zakrzepowego zapalenia żył [72]. Natomiast niedobór NO obniża aktywność cykazy guanylowej — enzymu niezbędnego do powstania wtórnego przekaźnika cyklicznego

guanozynomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*). Obniżone stężenie cGMP prowadzi do dystonii mięśni gładkich i zwężenia światła naczyń krwionośnych oraz przyczynia się do zwiększonej aktywacji i agregacji płytek [68].

Ostatnio podnoszone jest znaczenie krążących mikrocząstek pochodzenia płytkowego, które wykryto u chorych na PNH z incydentami zakrzepowymi [72]. Podobnie jak erytrocyty, płytki krwi z defektem PNH są bardziej wrażliwe na działanie układu dopełniacza. Tworzenie się MAC w błonach tych krwinek przyczynia się do ich aktywacji. Aktywowane płytki mają zdolność złuszczenia ze swej powierzchni fragmentów błon zawierających MAC. Zarówno liza erytrocytów, jak i aktywacja płytek prowadzą do uwolnienia do krążenia mikrocząstek z ekspresją fosfatydyloseryny (PS, *phosphatidylserine*) na powierzchni. Takie mikrocząstki cechuje wysoka zdolność prokoagulacyjna i wydają się bardzo istotnym czynnikiem w patomechanizmie zakrzepic, ponieważ PS pełni rolę miejsca wiązania dla kompleksów protrombinazy i tenazy. Jednocześnie aktywacja płytek przyczynia się do zakrzepicy przez ich wpływ na uwalnianie proteaz serynowych z granulocytów obojętnochłonnych [72].

W procesach zakrzepowych ma też znaczenie aktywacja granulocytów i monocytów wywołana związaniem na powierzchni komórek składnika dopełniacza C5a. Uszkodzone przez dopełniacz leukocyty GPI- wykazują nadmierną adherencję do komórek śródbłonna i uaktywniają procesy prozapalne. Aktywacja kaskady dopełniacza zwiększa ekspresję czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*) — kluczowego składnika w inicjacji procesu zakrzepowego. Mikrocząstki z leukocytów z defektem PNH zawierają TF, który promuje uwolnienie cytokin prozapalnych [81].

Na występowanie powikłań zakrzepowych w PNH wpływa również obniżone tempo fibrynolizy. Przyczyną tego zjawiska może być brak na powierzchni leukocytów cząsteczek uPAR — receptora dla urokinazy, który jest zaangażowany w przemianę plazminogenu w plazminę prowadzącą do rozpadu skrzepu. Także zwiększona osoczkowa pula rozpuszczalnego uPAR hamuje tworzenie plazminy u chorych na PNH [29].

Dyskutuje się również nad rolą zaburzeń w białkach o własnościach przeciwzakrzepowych w patofizjologii PNH, na przykład inhibitora drogi krzepnięcia zależnej od TF (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) oraz proteinazy 3 (PR3, *proteinase 3*), które do pełnienia swych funkcji wymagają obecności GPI-AP jako kofaktora [72, 78].

Tabela 2. Klasyfikacja nocnej napadowej hemoglobinurii (PNH) według *International PNH Interest Group* (źródła [10, 67])**Table 2.** International PNH Interest Group classification of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) (sources [10, 67])

Kategoria	Postać	Hemoliza wewnątrznaczyniowa*	Szpicz kostny	Odsetek klonu PNH**
1	Klasyczna	Znaczna — wysokie wartości LDH (2–10× powyżej normy), czasem epizody hemoglobinurii	Prawidłowy lub bogatokomórkowy z hiperplazją linii erytroidalnej	Duży — w większości przypadków > 50%
2	Klon PNH towarzyszący niewydolności szpiku	Łagodna — często z minimalnie podwyższoną wartością LDH (ok. 1,5× normy)	Zespół niewydolności — AA, MDS-RA, RCMD, in.	Umiarkowany — 25–50%
3	Subkliniczna	Brak cech klinicznych i biochemicznych	Zespół niewydolności — AA, MDS-RA, RCMD, in.	Mały — < 25%, najczęściej < 1%

*Na podstawie makroskopowej oceny hemoglobinurii oraz biochemicznych markerów hemolizy (stężenia LDH, bilirubiny pośredniej i haptoglobiny w surowicy oraz liczby retikulocytów); **odsetek granulocytów GPI-ujemnych oceniony metodą cytometrii przepływowej (wg [10], zmodyfikowano); LDH (*lactate dehydrogenase*) — dehydrogenaza mleczanowa; AA (*aplastic anemia*) — niedokrwistość aplastyczna; MDS-RA (*myelodysplastic syndrome-refractory anemia*) — zespół mielodysplastyczny–niedokrwistość oporna na leczenie; RCMD (*refractory cytopenia with multilineage dysplasia*) — cytopenia oporna na leczenie z wieloliniową dysplazją

Niewydolność szpiku

U wszystkich pacjentów z klonem PNH obecne są — manifestujące się w różnym stopniu — zaburzenia funkcjonowania szpiku [29]. U niektórych z nich mogą się rozwijać takie choroby, jak AA, MDS czy ostra białaczka szpikowa (AML, *acute myeloid leukemia*) [82].

Cytopenie — dotyczące jednej, dwóch lub wszystkich trzech linii komórkowych — obserwuje się u większości chorych na PNH już w momencie rozpoznania, gdyż 88–94% pacjentów ma niedokrwistość, 41–72% — leukopenię, a 51–80% — trombocytopenię [83]. Czas przeżycia granulocytów i płytek u chorych jest prawidłowy, co świadczy o tym, że obniżenie liczby wymienionych komórek we krwi obwodowej wynika z niedostatecznej ich produkcji, a nie jest skutkiem niszczenia obwodowego, jak ma to miejsce w przypadku erytrocytów ulegających hemolizie z powodu braku inhibitorów komplementu. Nawet w przypadkach gdy u chorego na PNH we krwi obwodowej i w szpiku nie obserwuje się cytopenii, stwierdza się obniżenie liczby komórek CD34+, komórek tworzących kolonie oraz prekursorów limfocytów B w szpiku [84, 89].

W piśmiennictwie podkreśla się ścisły związek PNH z aplazją i mielodysplazją szpiku. Z jednej strony u wielu, szczególnie młodych, chorych na PNH w przebiegu choroby rozwija się AA [67, 90, 91]. Z drugiej strony u chorych z rozpoznaną AA po leczeniu immunosupresyjnym może się rozwijać PNH [92]. Według dostępnych danych klasyczna forma PNH rozwija się u około 30% chorych na AA [83], a w momencie rozpoznania AA u około 70% chorych obecny jest niewielki klon PNH [93,

94]. Klon PNH wykrywa się również u około 20% pacjentów z MDS [92]. Obecność klonu PNH wiąże się głównie z hipoplastyczną postacią MDS [95].

Z obserwacji wielu autorów, a także z obserwacji chorych diagnozowanych w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii (IHT) wynika, że wielkość klonu PNH u chorych na AA i MDS, początkowo śladowa, często narasta i może się u nich rozwinąć klasyczna forma PNH [75, 96–99]. Konsekwencje tego zjawiska dla prawidłowego prowadzenia diagnostyki omówiono dalej. W badaniach prowadzonych w IHT wykazano, że połowa pacjentów z niewydolnością szpiku miała klon granulocytów z defektem PNH poniżej 20%, a większość — poniżej 10% [96].

Klasyfikacja

Zależnie od tego, czy w obrazie klinicznym dominuje niedokrwistość hemolityczna czy też zahamowanie hematopoezy w szpiku obecnie PNH klasyfikuje się na trzy podtypy (tab. 2), zgodnie z zaleceniami *International PNH Interest Group* [10, 67].

W pierwszej grupie, klasycznej postaci PNH, cechą dominującą jest znaczna wewnątrznaczyniowa hemoliza, której markerami są podwyższona retikulocytoza, wysoka aktywność LDH i niewykrywalne stężenie haptoglobiny. Postaci tej mogą towarzyszyć epizody hemoglobinurii. W szpiku kostnym nie obserwuje się żadnych zaburzeń morfologicznych; jego komórkowość jest prawidłowa bądź też może być bogatokomórkowy z hiperplazją linii erytroidalnej. We krwi obwodowej najczęściej stwierdza się obecność dużej populacji (50–100%)

granulocytów GPI-. U większości pacjentów oprócz niedokrwistości występuje granulocytopenia i/lub trombocytopenia [96, 100, 101].

Do drugiego podtypu klasyfikuje się klon PNH towarzyszący niewydolności szpiku. U takich pacjentów najczęściej występuje łagodna hemoliza wewnątrznaczyniowa, która występuje w przebiegu AA, w zespole mielodysplastycznym–niedokrwistości odpornej na leczenie (MDS-RA, *myelodysplastic syndrome–refractory anemia*), w cytopenii odpornej na leczenie z wieloliniową dysplazją (RCMD, *refractory cytopenia with multilineage dysplasia*) lub innych zaburzeń w szpiku prowadzących do cytopenii. U chorych klon granulocytów GPI- we krwi obwodowej może stanowić od 0,01 do 50%, przeważnie jednak wynosi 25–50%.

Do trzeciej grupy zalicza się pacjentów, u których brakuje klinicznych i biochemicznych dowodów na hemolizę wewnątrznaczyniową, a mała populacja (< 25%, najczęściej < 1%) granulocytów GPI- towarzyszy wspomnianym wyżej zespołom niewydolności szpiku. Jest to tak zwana subkliniczna postać PNH.

Diagnostyka

Wskazania

Najważniejsze objawy, przy których występowaniu należy zlecać badania w kierunku PNH, wymieniono w tabeli 3. Badaniami powinni być objęci pacjenci z wewnątrznaczyniową hemolizą, a także z objawami niewydolności szpiku. U pacjentów z raz rozpoznany defektem wskazane są okresowe badania kontrolne, które pozwolą na monitorowanie rozwoju lub progresji klonu PNH. Ponadto należy monitorować pacjentów podczas leczenia ekulizumabem, a także po przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT, *hematopoietic stem cell transplantation*). Corocznymi badaniami powinni być objęci również pacjenci z AA i MDS niezależnie od tego, czy w pierwszym badaniu wykryto komórki GPI-, czy nie [99, 102].

„Złotym standardem” w diagnostyce PNH jest zastosowanie metod cytometrii przepływej [4, 67]. Badania cytometryczne od połowy lat 90. XX wieku wykonuje się za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych do różnych białek połączonych z błoną komórkową poprzez kotwice GPI. Badanie ma charakter pośredni, ponieważ o obecności komórek z defektem wnioskuje się nie na podstawie badania kotwic GPI, ale w oparciu o brak lub niedobór związanych z nimi białek. Należy ocenić przynajmniej dwa białka, aby uniknąć niebezpieczeństwa uzyskania fałszywie dodatnie-

Tabela 3. Zalecenia dotyczące diagnostyki i monitorowania klonu nocnej napadowej hemoglobinurii (PNH) (wg [4, 15])

Table 3. Recommendations for diagnosis and monitoring paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clone (acc. to [4, 15])

Badania	Objawy występujące u pacjentów
Przesiewowe	Hemoglobinuria Hemoliza wewnątrznaczyniowa z ujemnym wynikiem testu antyglobulinowego Hemoliza wewnątrznaczyniowa i epizody dysfagii lub bólu brzucha Zakrzepica: zespół Budd-Chiari, zakrzepcy w żyłę kręzkowej lub wrotnej, w żyłach mózgowych, skórnych Niewydolność szpiku: AA, MDS, hipoplazja, niewyjaśnione cytopenie
Okresowe	Hemoliza i obecny klon PNH: • co 6–12 miesięcy przez pierwsze 2 lata • później raz w roku • każdorazowo przy zmianie objawów klinicznych (progresja lub ustępowanie choroby) • podczas leczenia ekulizumabem Po przeszczepieniu szpiku kostnego Rozpoznanie AA lub MDS (RA, RCUD) bez objawów hemolizy — raz w roku

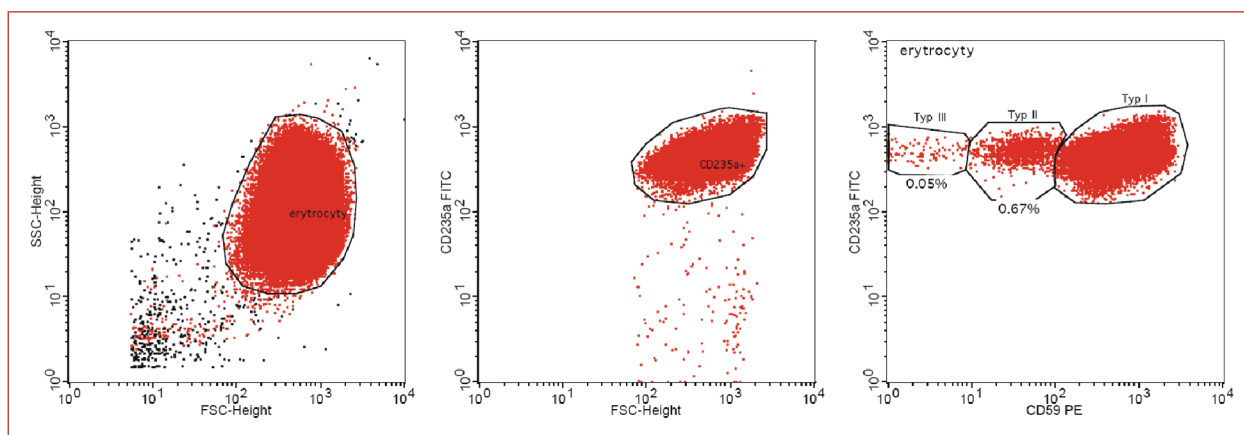
AA (*aplastic anemia*) — niedokrwistość aplastyczna; MDS (*myelodysplastic syndrome*) — zespół mielodysplastyczny; RA (*refractory anemia*) — niedokrwistość oporna na leczenie; RCUD (*refractory cytopenia with unilineage dysplasia*) — cytopenia oporna na leczenie z jednoliniową dysplazją

go wyniku testu w kierunku PNH w sytuacjach wrodzonego niedoboru badanego białka. Od kilku lat w diagnostyce ma też zastosowanie metoda bezpośrednia z wykorzystaniem aerolizyny — toksyny bakteryjnej, która wiąże się specyficznie z cząsteczkami GPI. W badaniach cytometrycznych jest stosowana inaktywowana postać aerolizyny związana z barwnikiem fluorescencyjnym (FLAER, *fluorescently labeled aerolysin*) [103]. Coraz częściej w diagnostyce PNH stosuje się kombinację obu metod — pośredniej i bezpośredniej (tab. 4).

W badaniach można zastosować techniki o różnej czułości. Na czułość wpływa między innymi liczba komórek poddanych analizie cytofluorometrycznej. W rutynowych badaniach diagnostycznych, które służą do rozpoznawania i monitorowania rozwoju klonu PNH u pacjentów z hemolizą i/lub zakrzepicą (niezależnie od tego, czy towarzyszy jej niewydolność szpiku), czułość testów powinna pozwolić na wykrycie poniżej 1% komórek z defektem PNH. Do tej pory na ogół stosowano analizę o czułości 0,1%, która jest zalecana w międzynarodowych rekomendacjach. W uzasadnionych przypadkach czułość testu zwiększa się do 0,01% [104].

Tabela 4. Przykłady zastosowania aerolizyny związanej z barwnikiem fluorescencyjnym (FLAER) i przeciwciał monoklonalnych skierowanych do antygenów białkowych związanych z GPI w diagnostyce nocnej napadowej hemoglobinurii**Table 4.** Examples using fluorescently labeled aerolysin (FLAER) and monoclonal antibodies to GPI-AP for the paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosis

	Badania		
	Przesiewowe	Rutynowe	Ultraczułe
Czułość (liczba analizowanych komórek)	$\geq 0,5\%$ (20 000–100 000)	0,1–1,0% (50 000)	$\leq 0,01\%$ (250 000)
Granulocyty	FLAER	CD24/CD15 CD66b/CD15 CD16/CD15 ($\pm$ CD45)	FLAER/CD24/CD15/CD45
Granulocyty i monocyty	FLAER	–	FLAER/CD157/CD15/CD45 FLAER/CD24/CD14/CD64/CD15 FLAER/CD24/CD14/CD64/CD15/CD45
Erytrocyty	–	CD59 ($\pm$ CD235a)	CD235a/CD59

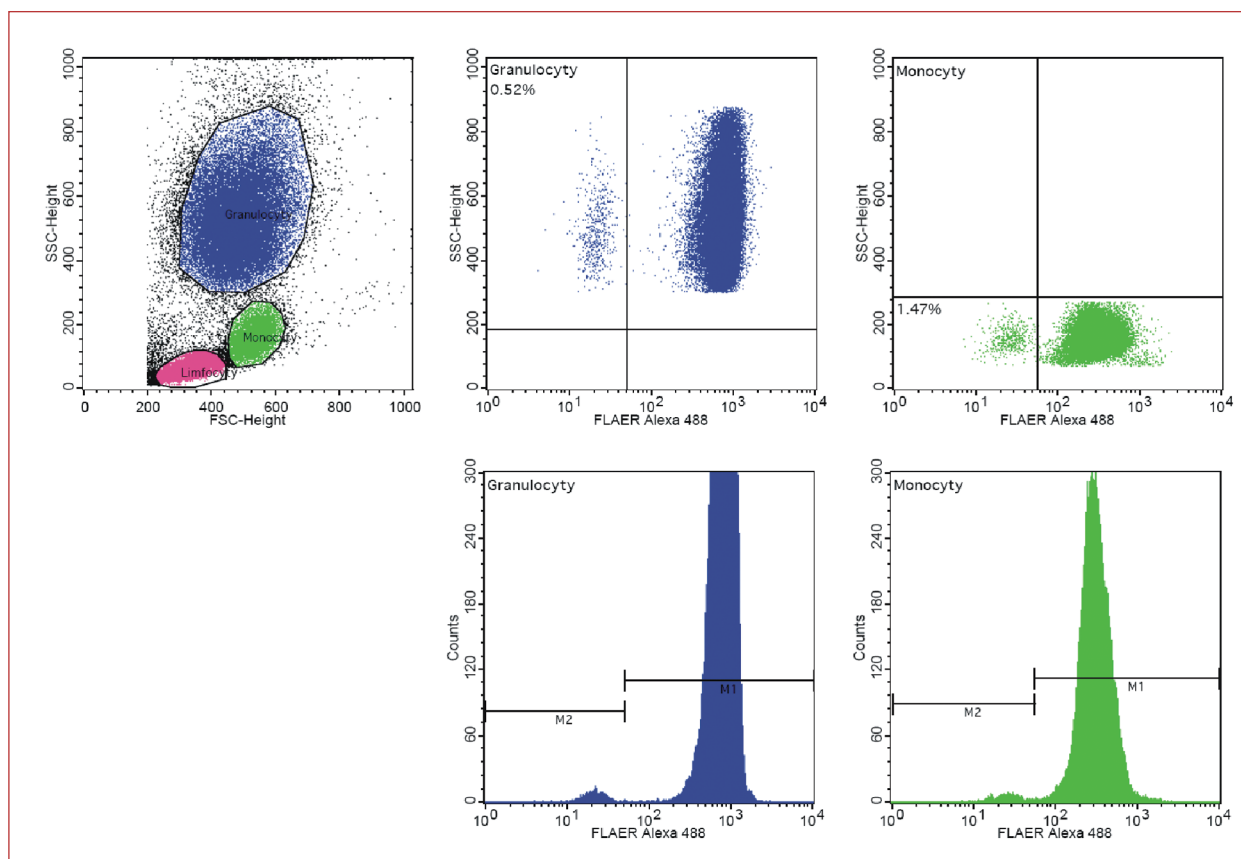
GPI (*glycosylphosphatidylinositol*) — glikozylfosfatydylinozytol;**Rycina 2.** Dwukolorowa ultraczuła analiza erytrocytów**Figure 2.** Two-color high-sensitivity analysis of erythrocytes

Istotne znaczenie w diagnostyce PNH ma dobre zdefiniowanie komórek, na których bada się obecność defektu. By poddać analizie poszczególne populacje (granulocyty, monocyty, limfocyty T czy in.), do ich oznakowania stosuje się przeciwciała skierowane do charakterystycznych dla nich markerów. Natomiast za pomocą kolejnych przeciwciał i/lub FLAER identyfikuje się defekt kotwic GPI [105, 106].

Celem badania w kierunku PNH jest nie tylko wykrycie i oszacowanie wielkości klonu komórek z defektem, ale też ocena odsetka komórek typu II i III, czyli komórek z różnym stopniem niedoboru GPI-AP (ryc. 2) [4].

Material

Materiałem do badań cytometrycznych powinna być pełna krew pobrana na antykoagulant (EDTA, heparyna, ACD). Granulocyty i monocyty nadają się do analizy w ciągu 48 godzin od pobrania, a erytrocyty — w czasie do 7 dni, pod warunkiem że są przechowywane w warunkach chłodniczych. Ocena komórek szpiku jest niewskazana, ze względu na trudności z interpretacją wyniku. Obecność frakcji komórek prekursorowych pozbawionych cząsteczek GPI i białek z nimi związanych, a także zmniejszona ekspresja niektórych antygenów w związku z różnymi stadiami dojrzałości komórek mogą dawać wyniki fałszywie dodatnie [4, 107].



Rycina 3. Przykład wiązania aerolizyny związanej z barwnikiem fluorescencyjnym do granulocytów i monocytów
Figure 3. Example of fluorescently-labeled aerolysin binding to granulocytes and monocytes

Wstępne badanie w kierunku PNH powinno polegać na ocenie granulocytów, ponieważ najlepiej oddaje ono aktualny rozmiar klonu PNH z trzech powodów: 1) granulocyty GPI– nie mają skróconego czasu przeżycia w porównaniu z granulocytami prawidłowymi; 2) na odsetek granulocytów GPI– nie wpływa przetaczanie preparatów krwiopochodnych pacjentowi przed badaniem; 3) granulocyty krążą we krwi obwodowej do 48 godzin.

Oprócz granulocytów można dodatkowo badać monocyty, pod warunkiem że ich liczba jest dostateczna [4]. Nie należy oceniać populacji limfocytów, które ze względu na długi czas przeżycia nie odzwierciedlają aktualnego rozmiaru klonu, a dodatkowo charakteryzują się zmienną ekspresją GPI-AP [9, 40, 108].

Badanie erytrocytów stanowi uzupełnienie diagnostyki w przypadku wykrycia defektu PNH w populacji granulocytów. Ponadto analizę erytrocytów wykonuje się w celu monitorowania rozwoju klonu, a także odpowiedzi na podawanie ekulizumabu [4, 109].

Analiza leukocytów

Jako badanie przesiewowe od kilku lat zaleca się ocenę wiązania FLAER do leukocytów [110, 111]. Test FLAER jest szybki, czuły i swoisty; pozwala na wykrycie powyżej 0,5% granulocytów GPI– [103, 111, 112]. Ponadto w większości przypadków możliwa jest jednoczesna ocena granulocytów i monocytów (ryc. 3). W przypadku pacjentów z MDS, we krwi których obserwuje się hipogranulację granulocytów, brak zróżnicowania komórek pod względem wielkości i ziarnistości na populacje granulocytów i monocytów oraz występowanie niedojrzałych komórek mieloidalnych, rezultat oceny wiązania FLAER do leukocytów może być niejednoznaczny [95, 113]. Wyniki fałszywie dodatnie mogą dotyczyć pacjentów, u których we krwi obwodowej obecne są komórki blastyczne (np. w AML), ponieważ komórki prekursorowe słabiej wiążą FLAER [114, 115].

Obecność niewielkiej liczby komórek GPI– (< 1%) w przesiewowym teście FLAER lub jego wątpliwy wynik należy uzupełnić dodatkowym

badaniem polegającym na ocenie ekspresji białek związanych z cząsteczkami GPI na dwóch liniach komórek. Analizy ekspresji antygenów CD55 i CD59 na granulocytach nie zaleca się ze względu na niezadowalającą czułość i trudności w interpretacji wyników [116, 117]. Obecnie do analizy granulocytów GPI– standardowo stosuje się przeciwciała skierowane do antygenów CD16, CD24 i CD66b. Wykazano, że eozynofilia, mielodysplazja, niedojrzałość komórek oraz polimorfizmy antygeny CD16 mogą utrudniać interpretację testów przy użyciu przeciwciał anti-CD16 [118]. Do identyfikacji monocytów GPI– najczęściej stosuje się przeciwciała monoklonalne skierowane do antygeny CD14. Należy pamiętać, że prawidłowe monoblasty, a także komórki dendrytyczne oraz monocytoidalne w białaczkach i mielodysplazji mogą wykazywać zróżnicowaną ekspresję antygeny CD14 i imitować monocyty GPI– [118].

W przypadku pacjentów z niewydolnością szpiku kostnego i bez objawów hemolizy niezbędne jest zastosowanie wieloparametrowej, ultraczułej analizy cytometrycznej, która umożliwia wykrycie śladowej ilości ($\leq 0,01\%$) komórek GPI–. Podejście to sprawdza się również podczas monitorowania choroby resztkowej po HSCT [4].

W ultraczułej metodzie zaleca się zastosowanie barwnika FLAER łącznie z przeciwciałami anti-CD24 oraz przeciwciałami skierowanymi do markerów linii mieloidalnej (CD45 i CD15), co umożliwia identyfikację pojedynczych granulocytów GPI– (ryc. 4) [4, 104]. Za pomocą znakowania leukocytów barwnikiem FLAER, łącznie z przeciwciałami anti-CD157, możliwa jest jednoczesna analiza granulocytów i monocytów [119, 120]. W przypadku zastosowania nowoczesnych cytometrów przepływowych możliwe jest użycie jednocześnie pięciu lub sześciu przeciwciał z fluorochromami o różnej długości fali (tab. 4).

Analiza erytrocytów

Do identyfikacji subpopulacji erytrocytów z defektem PNH są obecnie stosowane przeciwciała monoklonalne anti-CD59. U chorego mogą współistnieć trzy subpopulacje erytrocytów — z prawidłową ekspresją białka CD59 (typu I), z częściowym niedoborem CD59 (typu II) oraz z całkowitym brakiem CD59 (typu III). Rozmiar klonu PNH w populacji erytrocytów stanowi suma komórek typu II i III [116]. Obecnie zaleca się stosowanie ultraczułej, wieloparametrowej analizy krwinek czerwonych z zastosowaniem przeciwciał anti-CD59 łącznie z przeciwciałami przeciw glikoforynie A (CD235a), która jest znacznikiem linii erytroidalnej (ryc. 2)

[4, 104]. Przy ocenie 250 000 komórek CD235a+ czułość tego testu wynosi 0,01% (tab. 4).

Wykazano, że rozmiar klonu PNH badany w populacji erytrocytów jest znacznie mniejszy niż w populacji granulocytów [9, 111, 121]. W związku z powyższym nie zaleca się oceny erytrocytów jako samodzielnego badania, ponieważ niewielki defekt może zostać przeoczony [4, 116]. Zaniżony odsetek erytrocytów GPI– wiąże się ze skróconym czasem przeżycia tych krwinek, w porównaniu z prawidłowymi erytrocytami. W badaniach dowiedziono, że rozmiar klonu jest większy i bardziej zbliżony do odsetka granulocytów z defektem, gdy analizuje się frakcję młodych krwinek czerwonych — retikulocytów [122]. Nie jest to metoda popularna ze względu na niewielką liczbę retikulocytów we krwi obwodowej. Również transfuzje pełnej krwi lub koncentratu krwinek czerwonych (kkcz) przyczyniają się zaniżenia odsetka erytrocytów z defektem PNH [9]. Ponadto w badaniach *in vitro* wykazano, że istnieje możliwość uwalniania fragmentów błon (mikrocząstki) bogatych w cząsteczki CD59 z prawidłowych komórek i przyłączenia się ich do komórek GPI–, co może maskować defekt typu PNH [117, 123]. Należy pamiętać, że również inne schorzenia mogą wpływać na ekspresję białek należących do GPI-AP na erytrocytach [124–126].

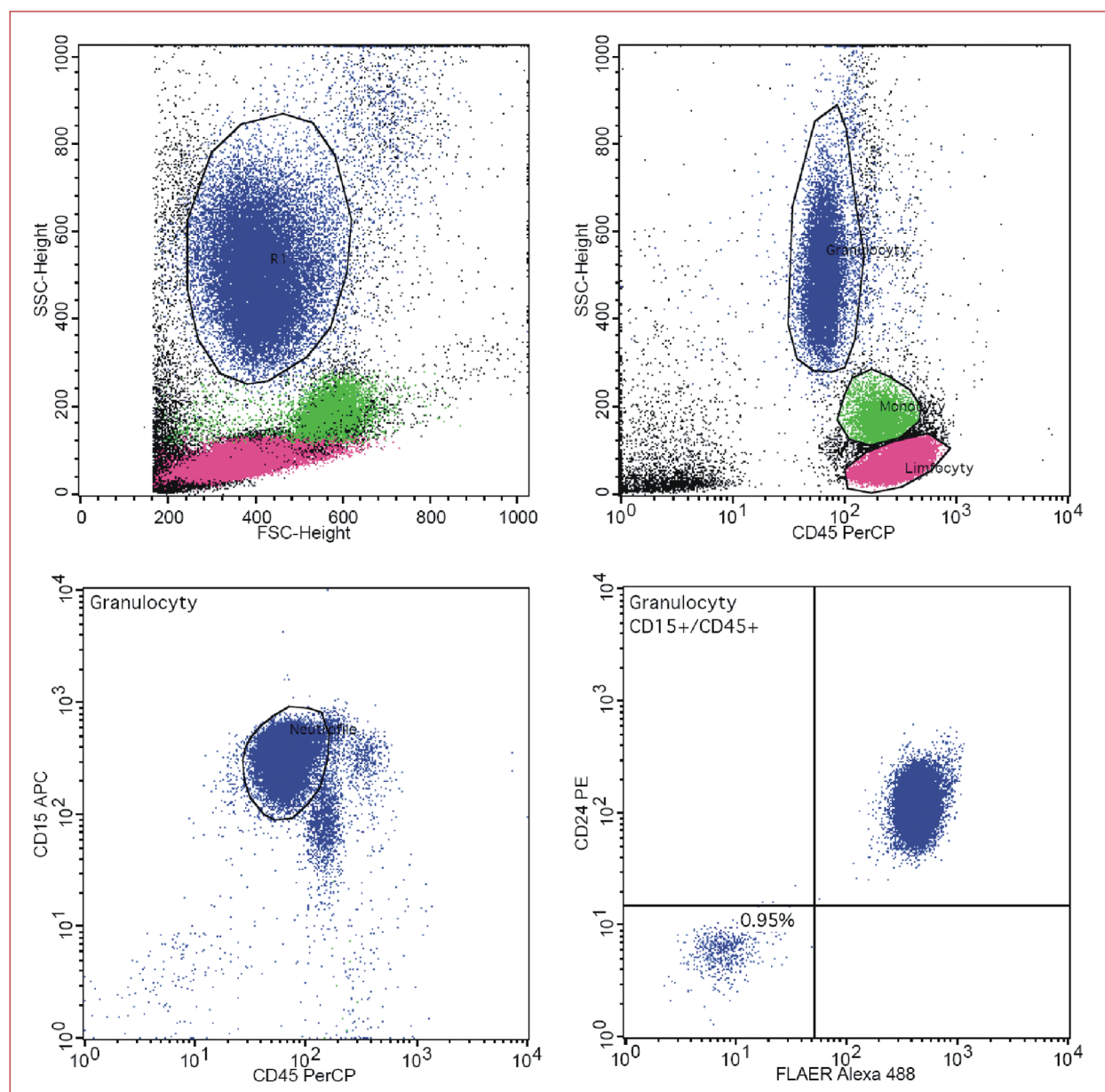
Interpretacja wyników

Wynik badania powinien zawierać informacje o obecności klonu PNH, odsetku nieprawidłowych komórek w poszczególnych liniach komórkowych oraz liczebności subpopulacji komórek typu II i III. Identyfikacja komórek GPI– powyżej 1% jest jednoznaczna z występowaniem klonu PNH. Obecność we krwi pacjenta 0,1–1,0% komórek GPI– opisuje się jako „nieznaczny klon PNH”, a identyfikację poniżej 0,1% komórek GPI– jako „obecność nie-licznych komórek o fenotypie PNH”.

Leczenie

Jak wyżej opisano, u chorych na PNH występuje triada, w różnym stopniu wyrażonych, objawów klinicznych — hemolizy, zaburzeń zakrzepowych i zaburzeń wynikających z cytopenii. Zasady i wyniki leczenia objawowego, a także efekty HSCT — jedyne przyczynowe leczenia PNH — są opisywane w wielu pracach poglądowych [29, 67, 72, 101, 127–130]. W niniejszym opracowaniu podano tylko wybrane, najnowsze aspekty zagadnień terapeutycznych.

Według Brodskiego [131] pacjenci z klonem komórek GPI– poniżej 10%, u których nie ma



Rycina 4. Ultraczuła wieloparametrowa analiza granulocytów obojętnochłonnych

Figure 4. High-sensitivity multiparameter analysis of neutrophils

nieprawidłowości w szpiku kostnym, nie wymagają leczenia PNH. Rozwój klonu u tych osób powinien być monitorowany co 3–6 miesięcy w 1. roku od rozpoznania, następnie przez 2 lata — co 6–12 miesięcy, w późniejszym okresie — raz w roku. Każda zmiana w liczbie komórek krwi (morfologia), stężeniu Hb, odsetku retikulocytów oraz aktywności LDH w osoczu wymaga dodatkowej oceny klonu PNH ze względu na możliwość spontanicznej remisji lub progresji choroby [67, 131].

Leczenie niedokrwistości

Przed rozpoczęciem terapii konieczne jest przeprowadzenie badań diagnostycznych w celu określenia stopnia niedokrwistości i jej przyczyn, tj. tego, czy dominuje hemoliza czy zaburzona erytropoeza w szpiku [67].

Pacjenci z klonem komórek PNH wynoszącym 10% i więcej zazwyczaj wymagają objawowego leczenia niedokrwistości hemolitycznej. Stosuje się suplementację kwasem foliowym i witaminą B₁₂,

a w razie konieczności również preparatami żelaza. Szczególnie chorzy z objawami hemoglobinurii i/lub hemosyderynirii są narażeni na niedobory żelaza [67, 101, 130].

Dyskusyjna jest terapia kortykosteroidami. Wykazano korzyści z podawania prednizonu pacjentom z przełomem hemolitycznym [101]. Nie zaleca się jednak długoterminowego leczenia steroidami przewlekłej niedokrwistości hemolitycznej [10]. Dobre wyniki w kontrolowaniu przewlekłej hemolizy uzyskiwano w przypadku zastosowania małych dawek androgenów [67].

U pacjentów z objawami ciężkiej niedokrwistości zaleca się transfuzje kkcż [101]. Przetaczanie kkcż obniża aktywność erytropoetyczną szpiku. W przypadku niedokrwistości w wyniku niewydolności szpiku częste transfuzje mogą być przyczyną wtórnej hemochromatozy [67].

We wszystkich pracach, w których są omawiane aspekty kliniczne PNH, podkreśla się, że wprowadzenie ekulizumabu ma ważne znaczenie w rozszerzeniu możliwości leczenia tej choroby. Podany dożylnie ekulizumab zapobiega rozpadowi C5, a w konsekwencji — tworzeniu MAC w błonie erytrocytów i ich lizie, kompensując w ten sposób brak cząsteczek CD59 [131]. Lek ten podaje się przede wszystkim chorym, którzy wymagają bardzo częstych przetoczeń kkcż oraz u których obserwowano zagrażające życiu epizody zakrzepowe [61, 72, 127]. Wykazano, że terapia znosi hemolizę wewnątrznaczyniową (normalizacja aktywności LDH), stabilizuje stężenie Hb, ogranicza lub całkowicie eliminuje potrzebę przetoczeń kkcż, ale także redukuje nadciśnienie płucne oraz ryzyko zakrzepów, a ponadto zapobiega niewydolności nerek i bólom brzucha [129, 132]. Lek jest więc efektywny w ograniczaniu objawów klasycznej postaci PNH i u większości pacjentów znacząco poprawia jakość ich życia.

Zespół Luzzatto [101] zaproponował stosowanie pięciu kryteriów przy podejmowaniu decyzji o wprowadzeniu ekulizumabu do terapii: 1) obecności przewlekłej hemolizy, wysokiej retikulocytozy, zwiększonej aktywności LDH, hemoglobinurii, dużej populacji erytrocytów GPI- ($\geq 20\%$); 2) średniego stężenia Hb 10 g/dl albo mniej przez ostatnie kilka miesięcy; 3) wyraźnego pogłębienia się niedokrwistości z obserwowaną hemoglobinurią (częściej niż raz w roku); 4) objawów przypisywanych wewnątrznaczyniowej hemolizie (bóle brzucha, dysfagia, zaburzenia erekcji), które znacząco pogarszają jakość życia; 5) woli pacjenta do poddania się wlewowi leku co 2 tygodnie. Według autorów kryteria 1) oraz 5) są uważane

za konieczne do spełnienia, natomiast do innych można podchodzić fakultatywnie.

W badaniach nad skutecznością terapii ekulizumabem wykazano, że podawanie leku nie zabezpiecza pacjentów przed hemolizą zewnątrznaczyniową [133, 134]. Pod wpływem aktywacji dopełniacza erytrocyty GPI- (pozbawione CD55) są nadmiernie opsonizowane składnikami C3b, a następnie przedwcześnie niszczone przez makrofagi śledziony i wątroby. Dlatego niektórzy pacjenci z niedokrwistością, retikulocytozą i hiperbilirubinemią nadal wymagają transfuzji kkcż, choć w mniejszym stopniu niż przed leczeniem ekulizumabem [129, 132].

Nowym lekiem, który będzie można zastosować do hamowania zarówno hemolizy wewnątrz-, jak i zewnątrznaczyniowej jest TT30 (Alexion Pharmaceuticals Inc.) — rekombinowane białko fuzyjne o wielkości 65 kDa [135]. Białko to składa się z: 1) fragmentu białka regulatorowego — czynnika H (fH, *factor H*), który ma właściwości hamowania konwertaz C3 i C5, między innymi przez wiązanie C3b i jego inaktywację do iC3b oraz 2) fragmentu receptora dopełniacza typu II (CR2, *complement receptor type II*) odpowiedzialnego za wiązanie i degradację składowych iC3b/C3dg dopełniacza. W testach *ex vivo* TT30 z powodzeniem zastępuje CD55 oraz CD59 w ochronie erytrocytów przed lizą pod wpływem alternatywnej drogi aktywacji komplementu [61]. Trwają także badania nad kolejnymi substancjami o właściwościach inhibitorów dopełniacza (Cp30 oraz mini-fH), które mogłyby zapobiegać hemolizie erytrocytów w PNH [136].

Niedokrwistość u chorych na PNH może również wynikać z niewydolności szpiku (np. w AA i MDS). W takich przypadkach podawanie ekulizumabu nie jest skuteczną metodą leczenia. Należy wówczas rozważyć podawanie androgenów, a także erytropoetyny, gdy jej stężenie jest nieadekwatnie niskie do stopnia niedokrwistości [101]. Chorzy powinni być ściśle monitorowani, ponieważ erytropoetyna może nasilić hemolizę poprzez zwiększenie produkcji erytrocytów z defektem PNH [67].

Leczenie i zapobieganie zaburzeniom zakrzepowym

Zaburzenia zakrzepowe są najczęstszą przyczyną zgonów w wyniku PNH. Ryzyko incydentów zakrzepowych zwiększa się wraz ze wzrostem odsetka komórek z defektem [67]. U pacjentów z zakrzepicą lub po epizodzie zakrzepowym, a także u osób obciążonych wysokim ryzykiem zakrzepicy ($> 50\%$ granulocytów GPI-) do leczenia powinno się profilaktycznie włączyć antykoagulanty [67,

130]. Podawanie warfaryny obniża ryzyko zakrzepów, ale może być przyczyną silnego krwawienia. Ponadto trombocytopenia może być przeciwwskazaniem do stosowania antykoagulantów [72]. W takich przypadkach zaleca się przetaczanie koncentratów krwinek płytkowych — najskuteczniejsze jest jednak podawanie ekulizumabu [72, 132, 137] lub HSCT, które jednak wiąże się z ryzykiem powikłań i zgonu [128].

Podsumowanie

W pracy zaprezentowano usystematyzowaną wiedzę na temat podłoża molekularnego, patofizjologii i objawów klinicznych PNH — choroby, która w Polsce wydaje się nadal mało znana i zbyt rzadko rozpoznawana. W ostatnich latach PNH wzbudza ogromne zainteresowanie hematologów, zwłaszcza badających podłoże i możliwości terapeutyczne chorób związanych z niewydolnością szpiku — AA i MDS. Wydaje się, że obecność klonu PNH odgrywa rolę w patofizjologii i prognozowaniu rozwoju tych chorób, a także w wyborze i skuteczności leczenia [102, 138].

W świetle tych faktów obserwuje się wzrastające zapotrzebowanie na prawidłowo prowadzoną diagnostykę, umożliwiającą wykrywanie klonu PNH oraz śledzenie jego rozwoju. Instytut Hematologii i Transfuzjologii dysponuje warsztatem umożliwiającym najnowocześniejszą diagnostykę PNH (rutynową oraz ultraczułą). Jest ona prowadzona pod nadzorem międzynarodowej zewnętrznej kontroli jakości (UK NEQAS, *United Kingdom National External Quality Assessment Service*).

Leczenie chorego na PNH wymaga indywidualnego podejścia. Manifestacje kliniczne są różnorodne i dotyczą jednocześnie wielu narządów, co wymusza współpracę lekarzy kilku specjalności. Wprowadzenie do leczenia przeciwciała monoklonalnego, które wiąże fragment C5 komplementu, w znacznym stopniu zapobiega kaskadzie objawów chorobowych wynikających z hemolizy wewnątrznaczyniowej, w tym zagrażających życiu — zakrzepicy i niewydolności nerek. Istnieje perspektywa wprowadzenia do terapii innych przeciwciał hamujących hemolizę zarówno wewnątrz-, jak i wewnątrznaczyniową. Te sposoby leczenia są jednak bardzo drogie i nie prowadzą do wyleczenia choroby, a jedyną, jak dotąd, metodą dającą szansę na całkowite wyleczenie jest HSCT.

Należy również wspomnieć, że zagadnienia dotyczące PNH są coraz szerzej poruszane na wielu forach internetowych poświęconych nie tylko bezpośrednio tej chorobie (www.pnhinterestgroup.org,

The International PNH Interest Group; www.pnhregistry.com, *The International PNH Registry*), ale też schorzeniom z nią powiązanym (www.aamds.org, *The Aplastic Anemia & MDS International Foundation*). Stanowią one bardzo istotne źródło aktualnej wiedzy — zarówno dla chorych, jak i dla lekarzy zainteresowanych PNH.

Podziękowania

Pragniemy serdecznie podziękować Pani Profesor dr hab. n. med. Barbarze Żupańskiej za zainicjowanie w Polsce diagnostyki PNH przy użyciu cytometrii przepływowej. Pani Profesor wraz z mgr Ireną Bogdanik wprowadziły takie badania w Zakładzie Immunologii Hematologicznej i Transfuzjologicznej IHT już w roku 1995. Bez entuzjazmu i wytrwałości Pani Profesor obecny wysoki poziom badań diagnostycznych nie byłby możliwy.

Piśmiennictwo

1. Crosby W.H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria — a classic description by Strubing Paul in 1882, and a bibliography of the disease. *Blood* 1951; 6: 270–284.
2. Ham T.H., Dingle J.H. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J. Clin. Invest.* 1939; 18: 657–672.
3. Parker C.J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2008; 93–103.
4. Borowitz M.J., Craig F.E., DiGiuseppe J.A. i wsp. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2010; 78: 211–228.
5. Luzzatto L. PNH from mutations of another PIG gene. *Blood* 2013; 122: 1099–1100.
6. Krawitz P.M., Hochsmann B., Murakami Y. i wsp. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 2013; 122: 1312–1315.
7. Brodsky R.A. How do PIG-A mutant paroxysmal nocturnal hemoglobinuria stem cells achieve clonal dominance? *Expert Rev. Hematol.* 2009; 2: 353–356.
8. Wysoczynski M., Reza R., Ratajczak J. i wsp. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood* 2005; 105: 40–48.
9. Richards S.J., Rawstron A.C., Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42: 223–233.
10. Parker C.J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr. Opin. Hematol.* 2012; 19: 141–148.
11. Takeda J., Miyata T., Kawagoe K. i wsp. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal-nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993; 73: 703–711.

12. Johnston J.J., Gropman A.L., Sapp J.C. i wsp. The phenotype of a germline mutation in PIGA: the gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am. J. Human Genet.* 2012; 90: 295–300.
13. Hu R., Mukhina G.L., Piantadosi S. i wsp. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005; 105: 3848–3854.
14. Endo M., Ware R.E., Vreeke T.M. i wsp. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 2546–2557.
15. Parker C., Omine M., Richards S. i wsp. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699–3709.
16. Bessler M., Mason P., Hillmen P., Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994; 343: 951–953.
17. Nishimura J., Inoue N., Wada H. i wsp. A patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria bearing four independent PIG-A mutant clones. *Blood* 1997; 89: 3470–3476.
18. Holguin M.H., Wilcox L.A., Bernshaw N.J., Rosse W.F., Parker C.J. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 1387–1394.
19. Nafa K., Bessler M., Castro-Malaspina B., Jhanwar S., Luzzatto L. The spectrum of somatic mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria includes large deletions and small duplications. *Blood Cells Mol. Dis.* 1998; 24: 370–384.
20. Bessler M., Mason P., Hillmen P., Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994; 343: 951–953.
21. Hu R., Mukhina G.L., Lee S.H. i wsp. Silencing of genes required for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Burkitt lymphoma. *Exp. Hematol.* 2009; 37: 423–434.
22. Chen G., Ye Z., Yu X. i wsp. Trophoblast differentiation defect in human embryonic stem cells lacking PIG-A and GPI-anchored cell-surface proteins. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 345–355.
23. Araten D.J., Nafa K., Pakdeesuan K., Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 5209–5214.
24. Hu R., Mukhina G.L., Piantadosi S. i wsp. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005; 105: 3848–3854.
25. Traulsen A., Pacheco J.M., Dingli D. On the origin of multiple mutant clones in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Stem Cells* 2007; 25: 3081–3084.
26. Kawagoe K., Kitamura D., Okabe M. i wsp. Glycosylphosphatidylinositol anchor deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 3600–3606.
27. Visconte V., Raghavachari N., Liu D. i wsp. Phenotypic and functional characterization of a mouse model of targeted PIG-A deletion in hematopoietic cells. *Haematologica* 2010; 95: 214–223.
28. Ratajczak J., Kucia M., Mierzejewska K. i wsp. A novel view of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria pathogenesis: more motile PNH hematopoietic stem/progenitor cells displace normal HSPCs from their niches in bone marrow due to defective adhesion, enhanced migration and mobilization in response to erythrocyte-released sphingosine-1 phosphate gradient. *Leukemia* 2012; 26: 1722–1725.
29. Rachidi S., Musallam K.M., Taher A.T. A closer look at paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur. J. Intern. Med.* 2010; 21: 260–267.
30. Tiu R., Maciejewski J. Immune pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int. J. Hematol.* 2006; 84: 113–117.
31. Hertenstein B., Wagner B., Bunjes D. i wsp. Emergence of CD52(–), phosphatidylinositolglycan anchor deficient T-lymphocytes after in vivo application of CAMPATH-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1995; 86: 1487–1492.
32. Kelly R.J., Richards S.J., Cullen M. i wsp. An in vitro model of the bone marrow in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria showing a direct effect of T-cells within the bone marrow allowing clonal expansion. *Blood* 2011; 118: 331–331.
33. van Bijnen S.T.A., Withaar M., Preijers F. i wsp. T cells expressing the activating NK-cell receptors KIR2DS4, NKG2C and NKG2D are elevated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and cytotoxic toward hematopoietic progenitor cell lines. *Exp. Hematol.* 2011; 39: 751–762.
34. Nagakura S., Ishihara S., Dunn D.E. i wsp. Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood* 2002; 100: 1031–1037.
35. Murakami Y., Kosaka H., Maeda Y. i wsp. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2002; 100: 4116–4122.
36. Lombardi M.L., Terrazzano G., Cosentini E. i wsp. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Significant association with specific HLA-A, -B, -C, and -DR alleles in an Italian population. *Hum. Immunol.* 2008; 69: 202–206.
37. Nowak J., Mika-Witkowska R., Mendek-Czajkowska E. i wsp. Association of HLA Haplotypes with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transplant. Proc.* 2010; 42: 3266–3270.
38. Nowak J., Mika-Witkowska R., Mendek-Czajkowska E. i wsp. The patterns of MHC association in aplastic and non-aplastic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2011; 59: 231–238.
39. Nowak J., Wozniak J., Mendek-Czajkowska E. i wsp. Potential link between MHC-self-peptide presentation and hematopoiesis; the analysis of HLA-DR expression in CD34-positive cells and self-peptide presentation repertoires of MHC molecules associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell Biochem. Biophys.* 2013; 65: 321–333.
40. Katagiri T., Qi Z.R., Ohtake S., Nakao S. GPI-anchored protein-deficient T cells in patients with aplastic anemia and low-risk myelodysplastic syndrome: implications for the immunopathophysiology of bone marrow failure. *Eur. J. Haematol.* 2011; 86: 226–236.
41. Gargiulo L., Papaioannou M., Sica M. i wsp. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013; 121: 2753–2761.
42. Inoue N., Izui-Sarumaru T., Murakami Y. i wsp. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2006; 108: 4232–4236.
43. Murakami Y., Inoue N., Shichishima T. i wsp. Deregulated expression of HMGA2 is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 2012; 156: 383–387.
44. Hanaoka N., Murakami Y., Nagata M. i wsp. Occupancy of whole blood cells by a single PIGA-mutant clone with HMGA2 amplification in a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria patient having blood cells with NKG2D ligands. *Br. J. Haematol.* 2013; 160: 114–116.
45. Kelly R.J., Tooze R.M., Doody G.M., Richardst S.J., Hillmen P. The investigation of HMGA2 dysregulation and promoter mutations in PIG-M in the molecular pathogenesis of paroxysmal

- nocturnal haemoglobinuria (PNH). *Br. J. Haematol.* 2008; 141: 110–110.
46. Brodsky R.A., Vala M.S., Barber J.P., Medof M.E., Jones R.J. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 8756–8760.
47. Savage W.J., Barber J.P., Mukhina G.L. i wsp. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH. *Exp. Hematol.* 2009; 37: 42–51.
48. Szpurka H., Schade A.E., Jankowska A.M., Maciejewski J.P. Altered lipid raft composition and defective cell death signal transduction in glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient PIG-A mutant cells. *Br. J. Haematol.* 2008; 142: 413–422.
49. Yamamoto T., Shichishima T., Shikama Y. i wsp. Granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and normal individuals have the same sensitivity to spontaneous apoptosis. *Exp. Hematol.* 2002; 30: 187–194.
50. Kunyaboon R., Wanachiwanawin W., U-Pratya Y., Thedsawad A., Taka O. Mechanism of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clonal dominance: possible roles of different apoptosis and CD8+ lymphocytes in the selection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones. *Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.* 2012; 5: 138–145.
51. Chen G., Zeng W., Maciejewski J.P. i wsp. Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in 'normal' phenotype cells. *Leukemia* 2005; 19: 862–868.
52. Hanaoka N., Kawaguchi T., Horikawa K. i wsp. Immunoselection by natural killer cells of PIGA mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood* 2006; 107: 1184–1191.
53. Hanaoka N., Nakakuma H., Horikawa K. i wsp. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br. J. Haematol.* 2009; 146: 538–545.
54. Ratajczak M.Z., Kim C.H., Wojakowski W. i wsp. Innate immunity as orchestrator of stem cell mobilization. *Leukemia* 2010; 24: 1667–1675.
55. Takahashi M., Takeda J., Hirose S. i wsp. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl phosphatidylinositol, the 1st intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Exp. Med.* 1993; 177: 517–521.
56. Maeda Y., Kinoshita T. Structural remodeling, trafficking and functions of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Prog. Lipid Res.* 2011; 50: 411–424.
57. Nicholsonweller A., March J.P., Rosenfeld S.I., Austen K.F. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulator protein, decay accelerating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Biol. Sci.* 1983; 80: 5066–5070.
58. Holguin M.H., Fredrick L.R., Bernshaw N.J., Wilcox L.A., Parker C.J. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 7–17.
59. Zipfel P.F., Hallstrom T., Riesbeck K. Human complement control and complement evasion by pathogenic microbes — tipping the balance. *Mol. Immunol.* 2013; 56: 152–160.
60. Bessler M., Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2008: 104–110.
61. Risitano A.M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology* 2012; 217: 1080–1087.
62. Hillmen P., Hall C., Marsh J.C.W. i wsp. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 552–559.
63. Auditore J.V., Hartmann R.C., Flexner J.M., Balchum O.J. The erythrocyte acetylcholinesterase enzyme in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Arch. Pathol.* 1960; 69: 534–543.
64. Burroughs S.F., Devine D.V., Browne G., Kaplan M.E. The population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria neutrophils deficient in decay-accelerating factor is also deficient in alkaline phosphatase. *Blood* 1988; 71: 1086–1089.
65. Kozuma Y., Sawahata Y., Takei Y., Chiba S., Ninomiya H. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 2011; 152: 631–639.
66. Sloand E.A., Pfannes L., Scheinberg P. i wsp. Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Exp. Hematol.* 2008; 36: 1616–1624.
67. Parker C., Omine M., Richards S. i wsp. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 3699–3709.
68. Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin — a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653–1662.
69. Hill A., Rother R.P., Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2005; 90: ECR40.
70. Hill A., Sapsford R.J., Scally A. i wsp. Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *Br. J. Haematol.* 2012; 158: 409–414.
71. 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: 133–138.
72. Hill A., Kelly R.J., Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013; 121: 4985–4996.
73. Nair R.K., Khaira A., Sharma A., Mahajan S., Dinda A.K. Spectrum of renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: report of three cases and a brief review of the literature. *Int. Urol. Nephrol.* 2008; 40: 471–475.
74. Ballarin J., Arce Y., Balcells R.T. i wsp. Acute renal failure associated to paroxysmal nocturnal haemoglobinuria leads to intratubular haemosiderin accumulation and CD163 expression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2011; 26: 3408–3411.
75. Pu J.J., Mukhina G., Wang H., Savage W.J., Brodsky R.A. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur. J. Haematol.* 2011; 87: 37–45.
76. Lee J.W., Jang J.H., Kim J.S. i wsp. Uncontrolled complement activation and the resulting chronic hemolysis as measured by LDH serum level at diagnosis as predictor of thrombotic complications and mortality in a large cohort of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2011; 118: 1368–1368.
77. Malato A., Saccullo G., Coco L.L. i wsp. Thrombotic complications in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a literature review. *Blood Transf.* 2012; 10: 428–435.

78. Van Bijnen S.T.A., Van Heerde W.L., Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Thromb. Haemost.* 2012; 10: 1–10.
79. Ziakas P.D., Poulou L.S., Rokas G.L., Bartzoudis D., Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5: 642–645.
80. Hoekstra J., Leebeek F.W.G., Plessier A. i wsp.; European Network for Vascular Disorders of the Liver. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. *J. Hepatol.* 2009; 51: 696–706.
81. Ritis K., Doumas M., Mastellos D. i wsp. A novel c5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J. Immunol.* 2006; 177: 4794–4802.
82. Hillmen P., Lewis S.M., Bessler M., Luzzatto L., Dacie J.V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 1253–1258.
83. Kawaguchi T., Nakakuma H. New insights into molecular pathogenesis of bone marrow failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int. J. Hematol.* 2007; 86: 27–32.
84. Rotoli B., Robledo R., Luzzatto L. Decreased number of circulating BFU-Es in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1982; 60: 157–159.
85. Moore J.G., Humphries R.K., Frank M.M., Young N. Characterization of the hematopoietic defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp. Hematol.* 1986; 14: 222–229.
86. Iwamoto N., Kawaguchi T., Horikawa K. i wsp. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood* 1996; 87: 4944–4948.
87. Maciejewski J.P., Sloand E.M., Sato T., Anderson S., Young N.S. Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clone. *Blood* 1997; 89: 1173–1181.
88. Elebute M.O., Rizzo S., Tooze J.A. i wsp. Evaluation of the haemopoietic reservoir in de novo haemolytic paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 2003; 123: 552–560.
89. Mannelli F., Bencini S., Peruzzi B. i wsp. A systematic analysis of bone marrow cells by flow cytometry defines a specific phenotypic profile beyond GPI deficiency in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2013; 84: 71–81.
90. Dunn D.E., Tanawattanacharoen P., Bocconi P. i wsp. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann. Intern. Med.* 1999; 131: 401–408.
91. Young N.S. Acquired aplastic anemia. *Ann. Intern. Med.* 2002; 136: 534–546.
92. Young N.S. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica* 2009; 94: 3–7.
93. Mukhina G.L., Buckley J.T., Barber J.P., Jones R.J., Brodsky R.A. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient hematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 476–482.
94. Maciejewski J.P., Rivera C., Kook H., Dunn D., Young N.S. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycoposphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. *Br. J. Haematol.* 2001; 115: 1015–1022.
95. Wang S.A., Pozdnyakova O., Jorgensen J.L. i wsp. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009; 94: 29–37.
96. Żupańska B., Spychalska J., Pyl H., Mendek-Czajkowska E., Brojer E. Nocna napadowa hemoglobinuria — wieloletnie obserwacje. Charakterystyka kliniczna i analiza wielkości klonu z defektem kotwicy glikozylofosfatydyloinozytolowej (GPI). *Acta Haematol. Pol.* 2012; 43: 75–82.
97. Li Y., Li X., Ge M. i wsp. Long-term follow-up of clonal evolutions in 802 aplastic anemia patients: a single-center experience. *Ann. Hematol.* 2011; 90: 529–537.
98. Scheinberg P., Marte M., Nunez O., Young N.S. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica* 2010; 95: 1075–1080.
99. Sugimori C., Mochizuki K., Qi Z.R. i wsp. Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br. J. Haematol.* 2009; 147: 102–112.
100. Ge M.L., Li X.X., Shi J., Shao Y.Q., Zheng Y.Z. Clinical features and prognostic factors of Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: results from a single center in China. *Ann. Hematol.* 2012; 91: 1121–1128.
101. Luzzatto L., Gianfaldoni G., Notaro R. Management of Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. *Br. J. Haematol.* 2011; 153: 709–720.
102. Marsh J.C.W., Ball S.E., Cavenagh J. i wsp. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br. J. Haematol.* 2009; 147: 43–70.
103. Spychalska J., Żupańska B., Blocka M., Pyl H., Brojer E. Unowocześnienie diagnostyki nocnej napadowej hemoglobinurii — wstępne wyniki badań przy użyciu odczynnika FLAER. *Acta Haematol. Pol.* 2012; 43: 285–290.
104. Sutherland D.R., 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: 195–208.
105. Wong L.D., Davis B.H. Monochromatic gating method by flow cytometry for high purity monocyte analysis. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2013; 84: 119–124.
106. Battiwala M., Hepgur M., Pan D.L. i wsp. multiparameter flow cytometry for the diagnosis and monitoring of small GPI-deficient cellular populations. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2010; 78: 348–356.
107. Felten C.L., Ewings-DeBaun T., Bauer J., Chan J.A. Detection of PNH cells in bone marrow. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2010; 78: 391–391.
108. Olteanu H., Karandikar N.J., McKenna R.W., Xu Y. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006; 126: 781–788.
109. Richards S.J., Hill A., Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring, and management of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2007; 72: 291–298.
110. Brodsky R.A., Mukhina G.L., Li S.Y. i wsp. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 459–466.
111. Sutherland D.R., Kuek N., Azcona-Olivera J. i wsp. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am. J. Clin. Pathol.* 2009; 132: 564–572.
112. Peghini P.E., Fehr J. Clinical evaluation of an aerolysin-based screening test for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2005; 67: 13–18.

113. Monaghan S.A., Surti U., Doty K., Craig F.E. Altered neutrophil maturation patterns that limit identification of myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2012; 82: 217–228.
114. Sutherland R., Kuek N., Davidson J., Bamford S., Keeney M. Diagnosing PNH and previously undiagnosed acute leukemias with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2005; 68: 36.
115. Sutherland D.R., Kuek N., Davidson J. i wsp. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2007; 72: 167–177.
116. Richards S.J., Whitby L., Cullen M.J. i wsp. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2009; 76B: 47–55.
117. Sloand E.M., Mainwaring L., Keyvanfar K. i wsp. Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2004; 104: 3782–3788.
118. Thomason R.W., Papiez J., Lee R.V., Szczarkowski W. Identification of unsuspected PNH-type cells in flow cytometric immunophenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004; 122: 128–134.
119. Sutherland D.R., Keeney M., Acton E., Davis B.H., Illingworth A. Use of CD157 in FLAER-based assays for high-sensitivity PNH granulocyte and PNH monocyte detection. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2011; 80: 387–387.
120. Challagundla P., Jorgensen J.L. Utility of the GPI-linked antigen CD157 in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) by flow cytometry: advantages over CD14 for analysis of monocytes. *Lab. Invest.* 2012; 92: 327A–327A.
121. Żupańska B., Konopka L., Bogdanik I., Pyl H. Utajony defekt typu nocnej napadowej hemoglobinurii. *Acta Haematol. Pol.* 2005; 36: 207–214.
122. Hoechsmann 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: 887–899.
123. Sloand E.M., Maciejewski J.P., Dunn D. i wsp. Correction of the PNH defect by GPI-anchored protein transfer. *Blood* 1998; 92: 4439–4445.
124. Ruiz-Delgado G.J., Vazquez-Garza E., Mendez-Ramirez N., Gomez-Almaguer D. Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology* 2009; 14: 33–37.
125. Varma S., Varma N., Reddy V.V. i wsp. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-phenotype in patients with chronic lymphocytic leukemia and multiple myeloma. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2012; 55: 206–210.
126. Terpos E., Sarantopoulos A., Kouramba A. i wsp. Reduction of CD55 and/or CD59 in red blood cells of patients with HIV infection. *Med. Sci. Monitor* 2008; 14: CR276–CR280.
127. Parker C.J. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2011; 2011: 21–29.
128. Peffault de Latour R., Schrezenmeier H., Bacigalupo A. i wsp. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2012; 97: 1666–1673.
129. Kelly R.J., Hill A., Arnold L.M. i wsp. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood* 2011; 117: 6786–6792.
130. Roth A., Duhrsen U. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of eculizumab. *Eur. J. Haematol.* 2011; 87: 473–479.
131. Brodsky R.A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009; 113: 6522–6527.
132. Hillmen P., Muus P., Roeth A. i wsp. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br. J. Haematol.* 2013; 162: 62–73.
133. Hill A., Rother R.P., Arnold L. i wsp. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* 2010; 95: 567–573.
134. Risitano A.M., Notaro R., Marando L. i wsp. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009; 113: 4094–4100.
135. Risitano A.M., Holers V.M., Rotoli B. TT30, a novel regulator of the complement alternative pathway (CAP), inhibits hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) erythrocytes and prevents upstream C3 binding on their surface in an in vitro model. *Blood* 2009; 114: 71–71.
136. Risitano A.M., Ricci P., Pascariello C. i wsp. Peptide and protein inhibitors targeting the C3 convertase efficiently prevent surface C3 deposition and subsequent hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) erythrocytes. *Immunobiology* 2012; 217: 1217–1217.
137. Hillmen P., Muus P., Duhrsen U. i wsp. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007; 110: 4123–4128.
138. Galili N., Cerny J., Raza A. Current treatment options: impact of cytogenetics on the course of myelodysplasia. *Curr. Treat. Options Oncol.* 2007; 8: 117–128.