

Nocna napadowa hemoglobinuria — aktualny stan wiedzy, diagnostyka, dostępne terapie i perspektywy na przyszłość

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria — current state
of knowledge, diagnostics, accessible therapies
and future perspectives

Agnieszka Piekarska¹, Krzysztof Lewandowski²

¹Katedra i Klinika Hematologii i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

²Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Streszczenie

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH) jest sierocą chorobą o charakterze klonalnym, wywołaną nabytą mutacją krwiotwórczej komórki macierzystej. Mutacja w genie *PIGA* skutkuje niedoborem lub brakiem na komórkach potomnych białek błonowych związanych z kotwicą glikozylfosfatydyloinozytolu, w tym inhibitorów dopełniacza CD55 i CD59. Brak kontroli nad aktywacją dopełniacza prowadzi do ciągłej hemolizy, co w głównej mierze odpowiada za powikłania zakrzepowo-zatorowe będące zasadniczą przyczyną chorobowości i śmiertelności w PNH.

Od roku 2019 dostępna jest w Polsce terapia ekulizumabem — przeciwciałem monoklonalnym zarejestrowanym do leczenia pacjentów z hemolizą i wysoką aktywnością choroby lub powikłaniami zakrzepowymi. Program lekowy poprawił perspektywę pacjentów i zmienił podejście do kwalifikacji do transplantacji allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych w Polsce. Dodatkowo, w 2019 roku, zarejestrowano w Europie rawulizumab, skutecznie kontrolujący hemolizę przy podaży co 8 tygodni. Trwają również badania kliniczne nad nowymi lekami. W opiece nad chorymi leczonymi inhibitorami dopełniacza nie można zapominać o ryzyku infekcji bakteriami otoczkowymi.

W opracowaniu przedstawiono patomechanizm kluczowych zaburzeń oraz omówiono współczesne zalecenia diagnostyczne i opcje terapeutyczne w PNH.

Słowa kluczowe: nocna napadowa hemoglobinuria, hemoliza, dopełniacz, zakrzepica, ekulizumab, rawulizumab

Hematologia 2020; 11, 1: 30–44

Abstract

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is one of the orphan diseases caused by the acquired clonal mutation of hematopoietic stem cell. The mutation of the *PIGA* gene results in a lack or deficiency of the membrane glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on the surface of the progeny, including complement inhibitors CD55 and CD59. Uncontrolled complement activation leads to chronic hemolysis, which in turn is responsible for thromboembolic complications — the main reason for morbidity and mortality in PNH.

Adres do korespondencji: Agnieszka Piekarska, Klinika Hematologii i Transplantologii, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Smoluchowskiego 17, 80–214 Gdańsk, e-mail: babajaga@gumed.edu.pl

In Poland since 2019, there is access to eculizumab, monoclonal antibody inhibiting the complement, registered to the treatment of PNH patients with hemolysis and the high disease activity or thrombotic complications. It improved perspectives of the PNH patients and modified indications for allogeneic hematopoietic cell transplantation in our country. Moreover, ravulizumab, able to control hemolysis with 8-week-dosing intervals, was registered in Europe in 2019. Clinical trials with novel drugs are ongoing. Taking care of patients treated with anti-complement agents, one should not omit a risk of infections with the encapsulated bacteria.

In this manuscript, we present the pathomechanism of key abnormalities observed in PNH and discuss current diagnostic guidelines and therapeutic options in PNH.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, hemolysis, complement, thrombosis, eculizumab, ravulizumab

Hematologia 2020; 11, 1: 30–44

Wprowadzenie

Nocna napadowa hemoglobinuria (PNH, *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*) jest rzadkim schorzeniem należącym do tak zwanych chorób sierocych, wywołanym klonalnym nienowotworowym rozrostem pochodzącym z nieprawidłowej krwiotwórczej komórki macierzystej. Choroba jest rozpoznawana w każdej grupie wiekowej, najczęściej około 30. roku życia [1, 2]. Z danych epidemiologicznych wynika, że około 35% pacjentów leczonych objawowo umiera w ciągu 5 lat od rozpoznania, a główną przyczyną zgonów są powikłania zakrzepowo-zatorowe wynikające przede wszystkim z przewlekłej, niekontrolowanej hemolizy wewnątrznacyniowej [3–5]. Przyczyną hemolizy jest brak lub niedobór na powierzchni erytrocytów inhibitorów dopełniacza (CD55 i CD59) wywołany zaburzoną syntezą glikosylfosfatidyloinozytolu (GPI, *glycosylphosphatidylinositol*), co prowadzi do ciągłej aktywacji dopełniacza drogą alternatywną (CAP, *complement alternative pathway*) na erytrocytach [2, 6]. W patofizjologię powikłań wciągnięte są również płytki krwi (PLT, *platelets*), granulocyty i śródbłónki naczyń, których aktywacja przez dopełniacz pośrednio i bezpośrednio nasila wywołany hemolizą stan nadkrzepliwości [4].

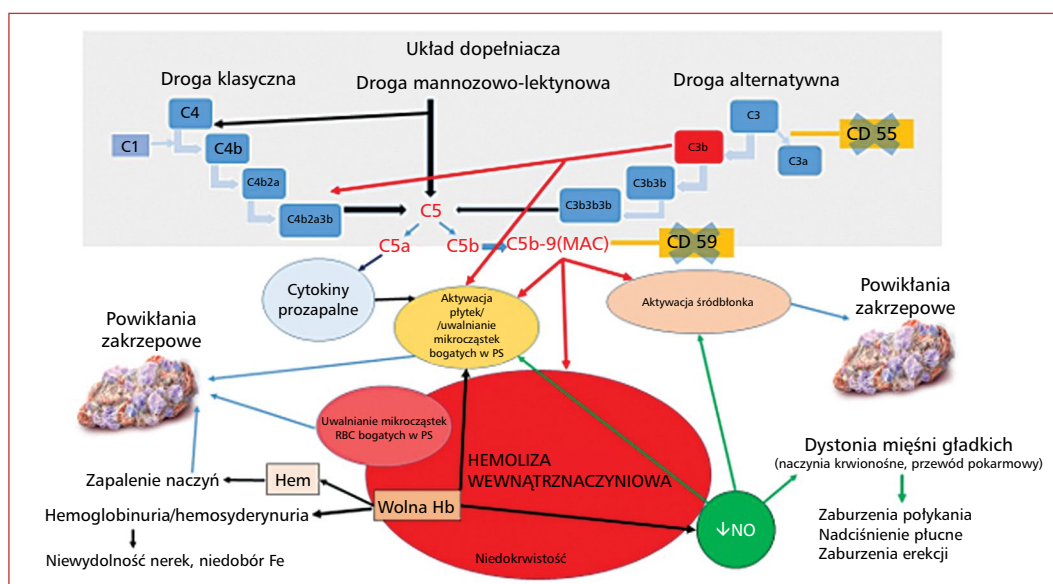
Od 2019 roku w Polsce jest dostępna terapia eculizumabem — przeciwciałem monoklonalnym zarejestrowanym do leczenia pacjentów z hemolizą i wysoką aktywnością choroby lub powikłaniami zakrzepowymi. Program lekowy poprawił perspektywę pacjentów i zmienił podejście ich kwalifikacji do przeszczepienia allogenicznego krwiotwórczych komórek macierzystych (HSCT, *hematopoietic stem cell transplantation*), która jednak pozostaje jedyną metodą wyleczenia z choroby. Toczy się wiele badań klinicznych nad nowymi cząsteczkami

i przeciwciałami blokującymi aktywację dopełniacza w częściach proksymalnej i końcowej. W 2019 roku zarejestrowano w Europie rawulizumab, skutecznie kontrolujący hemolizę przy podaży co 8 tygodni.

W ostatnich latach rozwinęła się w Polsce sieć laboratoriów, w których wdrożono wytyczne diagnostyczne PNH oparte na cytofluorometrii, zgodne z rekomendacjami międzynarodowych towarzystw naukowych. Usystematyzowano również kryteria odpowiedzi na leczenie eculizumabem oraz wskazania do przeprowadzania HSCT. W związku z tym pojawiła się potrzeba uaktualnienia stanu wiedzy o tej interesującej chorobie oraz opiece nad pacjentem z PNH.

Patofizjologia PNH

Klon PNH wywodzi się z komórki macierzystej z nabytą mutacją, najczęściej dezaktywującą gen *PIGA* (*phosphatidylinositol glycan class A*), na krótkim ramieniu chromosomu X. Bardzo rzadko za rozwój choroby odpowiada mutacja genów na innych chromosomach [7–9]. Gen *PIGA* koduje podjednostkę enzymu początkowego szlaku syntezy GPI, „kotwicy”, od której zależy ekspresja na błonie komórkowej wielu ważnych białek (GPI-AP, *GPI-anchored proteins*). W patofizjologii PNH najważniejsze są dwa inhibitory układu dopełniacza należące do GPI-AP: CD55 i CD59; CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*) przyspiesza rozkład konwertaz C3, dzięki czemu ogranicza opsonizację krwinek przez składową C3b i jej pochodne (C3d) oraz niszczenie pozanacyniowe krwinek, z kolei CD59 (MIRL, *membrane inhibitor of reactive lysis*) blokuje generację C5b-C8, czyli tak zwanego kompleksu atakującego błonę (MAC, *membrane attack complex*), ograniczając hemolizę wewnątrznacyniową. Wyjątkowa podatność erytrocytów



Rycina 1. Patofizjologia powikłań obserwowanych w nocnej napadowej hemoglobinurii (PNH) — wybrane skutki niekontrolowanej aktywacji układu dopełniacza; MAC — kompleks atakujący błonę; PS — fosfatydyloseryna; Hb — hemoglobina; Fe — żelazo; NO — tlenek azotu; RBC — krwinka czerwona (erytrocyt)

Figure 1. Pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) complications — chosen consequences of uncontrolled complement activation; MAC — membrane attack complex; PS — phosphatidylserine; Hb — hemoglobin; Fe — (lat.) ferrum; NO — nitric oxide; RBC — red blood cell (erythrocyte)

z defektem PNH na hemolizę indukowaną dopełniaczem wynika z tego, że nie mają one na powierzchni innych czynników kontrolujących aktywność dopełniacza, takich jak bezpośrednio związany z błoną komórkową CD46 (MCP, *membrane cofactor protein*), które chroniłyby komórkę przy deficycie CD55 i CD59 [10]. Podłożem większości objawów i powikłań PNH jest hemoliza wewnątrznacyniowa, ale również aktywacja płytek, granulocytów i komórek śródbłonnka nacyniowego [2, 4, 11, 12].

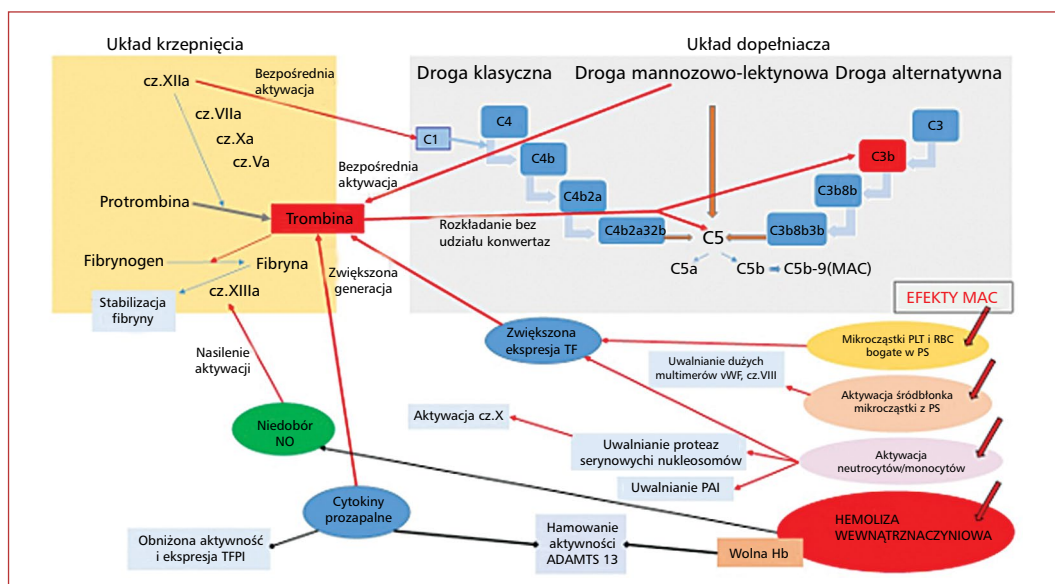
Niekontrolowana aktywacja dopełniacza a powikłania zakrzepowe

W publikacji z 2015 roku pt. „Nowe spojrzenie na nocną napadową hemoglobinurię” (Hematologia 2015; 6: 278–292) przedstawiono szczegółowo zagadnienie konsekwencji klinicznych przewlekłej hemolizy oraz podłoża powikłań zakrzepowo-zatorowych w PNH [13]. W niniejszej aktualizacji warto przypomnieć najważniejsze aspekty tych zależności.

Kompleks MAC tworzy kanał jonowy, co prowadzi do lizy komórki i uwolnienia wolnej hemoglobiny (Hb), toksycznej dla śródbłonnka nacyniowego i wykazującej aktywność prozapalną. Produktem degradacji Hb jest równie toksyczny hem. Usuwanie Hb odbywa się poprzez wiązanie z haptoglobiną

(Hp), natomiast hem jest wiązany przez hemopeksynę (Hx, *haemopexin*). Po wyczerpaniu zapasów Hp i Hx utleniona Hb łączy się nieodwracalnie z tlenkiem azotu (NO, *nitric oxide*), tworząc metheoglobinę (metHb). Dodatkowo uwalniająca się w wyniku hemolizy arginaza zmniejsza ilość substratu — argininy, niezbędnej do odtwarzania puli NO w śródbłonnku nacyniowym. Obniżenie stężenia NO odpowiada za zwiększenie napięcia mięśni gładkich naczyń [14]. Niedobór NO koreluje liniowo z nasileniem hemolizy i wzrostem aktywności markera hemolizy — dehydrogenazy mleczanowej (LDH, *lactate dehydrogenase*) [15]. Nadmiar wolnej Hb ulega resorpcji zwrotnej w proksymalnych kanalikach nerkowych. Uwalniane tam z Hb żelazo wiąże się z hemosyderyną, toksycznie działającą na nerki i odpowiadającą za objaw hemosyderynurii. Po wyczerpaniu zdolności do resorpcji wolnej Hb obserwuje się hemoglobinurię. Schematycznie przedstawiono wyżej opisane zaburzenia na rycinie 1.

Ze względu na złożony patomechanizm powikłań zakrzepowych PNH uważa się za najbardziej podstępny stan nabytej trombofilii [5, 16]. W erze poprzedzającej terapię ekulizumabem zakrzepica stanowiła najczęstszą przyczynę zgonów w PNH (40–67%), a skumulowana częstość incydentów zakrzepowo-zatorowych w okresie 8–10 lat wynosiła 23–30% [1, 2, 4, 17–19]. Zakrzepica w PNH dotyczy



Rycina 2. Patomechanizm powikłań zakrzepowo-zatorowych w nocnej napadowej hemoglobinurii — bliskie współzależności między kaskadą układu krzepnięcia a układem dopełniacza i hemolizą; cz. — czynnik; MAC — kompleks atakujący błonę; NO — tlenek azotu; TF — czynnik tkankowy; TFPI — inhibitor szlaku zależnego od czynnika tkankowego; PLT — płytki krwi; RBC — krwinki czerwone (erytrocyty); vWF — czynnik von Willebranda; ADAMTS13 — metaloproteinaza rozkładająca multimery vWF; PS — fosfatydyloseryna; Hb — hemoglobina; PAI — inhibitor aktywatora plazminogenu

Figure 2. Pathomechanism of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria thrombotic complications — close relationship between the coagulation cascade and the complement pathway and hemolysis; cz. — factor; MAC — membrane attack complex; NO — nitric oxide; TF — tissue factor; TFPI — TF pathway inhibitor; PLT — platelets; RBC — red blood cells (erythrocytes); vWF — von Willebrand factor; ADAMTS 13 — metalloprotease cleaving high molecular weight multimers of vWF; PS — phosphatidylserine; Hb — hemoglobin; PAI — plasminogen activator inhibitor

zarówno naczyń żylnych, jak i tętniczych oraz może mieć przebieg subkliniczny w praktycznie każdej lokalizacji, wliczając ośrodkowy układ nerwowy, naczynia wieńcowe oraz krążenie płucne [20–22]. Najczęstszymi lokalizacjami jawnymi klinicznie są naczynia wewnątrzbrzuszne (żyły wątrobowe, żyła wrotna, naczynia krezkowe i trzewne) oraz krążenie mózgowe (szczególnie zatoka strzałkowa) [3, 4, 23, 24]. Opisywane są też incydenty zakrzepicy naczyń skórnych [25]. Ryzyko rozwoju zakrzepicy istnieje w przypadku występowania niewielkiego klonu PNH na poziomie nieprzekraczającym 10% i przy niskim poziomie hemolizy, ale znacząco wzrasta przy wielkości klonu z defektem GPI ponad 50% granulocytów i aktywnej hemolizie z wartością LDH 1,5 razy powyżej górnej granicy normy (ULN, *upper limit of normal*) [17, 26]. Z tego względu w diagnostyce trombofilii należy uwzględnić PNH, szczególnie w przypadku nietypowej lokalizacji zakrzepicy, podwyższonej wartości LDH czy cytopenii [4].

Na wieloczynnikową patofizjologię powikłań zakrzepowo-zatorowych w PNH składają się głównie wewnętrzne powiązania między układem dopełniacza a kaskadą krzepnięcia, hemoliza we-

wnętrznaczyniowa indukowana niekontrolowaną aktywacją dopełniacza, aktywacja PLT, granulocytów i śródbłonna, obniżona dostępność NO, uwolnienie mediatorów prozapalnych oraz zaburzenia w systemie fibrynolizy (ryc. 2).

W wyniku hemolizy z erytrocytów uwalniają się mikrocząstki błonowe bogate w fosfatydyloserynę (PS, *phosphatidylserine*) [27]. Hem działa prozapalne, a powstałe w wyniku jego przemian toksyczne rodniki żelaza uszkadzają błony lipidowe. Wolna Hb powoduje aktywację oraz dysfunkcję śródbłonna naczyniowego: uwalnianie mikrocząstek, dużych multimetrów czynnika von Willebranda (vWF, *von Willebrand factor*), czynnika VIII, czynnika tkankowego (TF, *tissue factor*), a także hamuje aktywność metaloproteinazy rozkładającej multimery vWF (ADAMTS13, *metalloprotease cleaving high molecular weight multimers of vWF*). Wolna Hb i niedobór NO powodują nasilenie adhezji i agregacji PLT. Gromadzenie się kompleksów MAC na powierzchni PLT wpływa na nie aktywująco, wywołując uwalnianie mikrocząstek bogatych w PS, utratę asymetrii błony oraz zwiększanie ekspresji białek związanych z aktywacją. Aktywowane

płytki powodują uwalnianie z neutrocytów proteaz serynowych i nukleosomów, które synergistycznie aktywują czynnik X. Przewlekłe pobudzenie CAP (poprzez P-selektynę) oraz inicjacja klasycznej drogi aktywacji dopełniacza (CCP, *complement classic pathway*), poprzez pochodzący z płytek siarczan chondroityny, mogą podtrzymywać błędne koło i nasilać zjawiska prokoagulacyjne. Niedobór NO, poza wpływem na PLT i efektem wazokonstrykcyjnym, nasila proliferację endotelium, zwiększa ekspresję P-selektyny oraz stabilizuje skrzep poprzez aktywację czynnika XIII.

Na stan prozakrzepowy w PNH wpływa niedobór innych cząstek, których ekspresja zależy od GPI: CD87 — receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu (u-PAR, *urokinase-type plasminogen activator receptor*), proteiny 3 (PR3), inhibitora szlaku zależnego od czynnika tkankowego (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) oraz siarczanu heparanu. Obniżona ekspresja siarczanu heparanu i TFPI (oba GPI-AP) wynika również z wzmożonej w PNH aktywności cytokin prozapalnych: interleukiny (*interleukin*) 1 (IL-1) oraz czynnika martwiczego nowotworów alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor alpha*). Siarczan heparanu pośredniczy w wiązaniu antytrombiny do komórek śródbłonna, a TFPI jest jedynym fizjologicznym inhibitorem początkowego etapu krzepnięcia. Zaburzenia układu u-PAR osłabiają fibrynolizę, a obniżona ekspresja PR3 zależna od CD177 (GPI-AP) ogranicza regulację aktywacji płytek krwi indukowanej trombiną.

Istotnym czynnikiem prozakrzepowym w PNH niezależnym od hemolizy, ale zależnym od niekontrolowanej aktywacji dopełniacza, jest wspomniany stan prozapalny, wynikający z uwalniania w wyniku rozkładu C5 składowej C5a. Działanie prozapalne odbywa się za pośrednictwem cytokin IL-6, IL-8 i TNF- α oddziałujących na śródbłonnki naczyń, monocytów i granulocytów z tworzeniem kompleksów NET (*neutrophil extracellular traps*), zwiększaniem ekspresji TF oraz inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI, *plasminogen activator inhibitor*) [28, 29].

Większość wymienionych powyżej zaburzeń prowadzi do zwiększonej generacji trombiny, a tę z kolei cechuje zdolność rozkładania składowej C3 i C5 dopełniania bez udziału konwertaz, stanowiąc *de facto* czwartą drogę aktywacji dopełniacza [30]. Zjawisko błędnego koła stanowiłoby wytłumaczenie obserwowanego nasilania się zakrzepicy oraz występowania kolejnych powikłań zakrzepowo-zatorowych po pierwszym incydencie, mimo stosowania terapii przeciwwkrzepliwiej w przypadku braku leczenia hamującego dopełniacz.

Powikłania narządowe w PNH

Przewlekła choroba nerek (CKD, *chronic kidney disease*) rozwija się wskutek toksycznego działania hemosyderyny, hemosyderynury, hemoglobinurii, powikłań zakrzepowych w naczyniach nerkowych oraz zmniejszonego przepływu nerkowego wywołanego zwiększonym napięciem mięśniówki naczyniowej. U pacjentów nieleczonych ekuizumabem CKD była przyczyną przedwczesnego zgonu (8–18%) przy zapadalności ocenianej na 64%, natomiast terapia hamująca dopełniacz daje szansę na poprawę funkcji nerek [26, 31].

Nadciśnienie płucne w PNH wywołują dysfunkcja śródbłonna naczyniowego, zwiększone napięcie mięśniówki oraz zatorowość płucna wtórne do ekspozycji na wolną Hb i zmniejszony dostęp do NO [21, 32]. Terapia blokująca C5 umożliwia w ciągu kilku tygodni obniżenie napięcia wazomotorycznego i stężenia N-końcowego fragmentu propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP, *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*) oraz zmniejszenie odczuwania duszności [15].

Wśród objawów obniżających jakość życia pacjentów z PNH, a jednocześnie wskazujących na wysoką aktywność choroby, najczęściej zgłaszane są zmęczenie (80%), bóle głowy (63%), zaburzenia erekcji (38% mężczyzn), bóle jamy brzusznej oraz zaburzenia połykania [26].

Postacie kliniczne PNH

Wyróżnia się trzy postacie kliniczne PNH:

- 1) klasyczną PNH, która charakteryzuje się dużą populacją komórek z defektem GPI-AP (najczęściej > 50% granulocytów) z aktywną hemolizą wewnątrznaczyńową oraz występowaniem epizodów hemoglobinurii. Niedokrwistości hemolitycznej może towarzyszyć cytopenia, najczęściej bez cech dysplazji w szpiku kostnym;
- 2) niewydolność szpiku kostnego z towarzyszącym klonem PNH, w której klon z defektem kotwicy GPI stanowi mniej niż 50% granulocytów. W tej postaci występuje mniejsze nasilenie hemolizy, a objawy wynikają głównie z cytopenii wtórnych do choroby podstawowej: anemii aplastycznej (AA, *aplastic anemia*) lub zespołu mielodysplastycznego (MDS, *myelodysplastic syndrome*);
- 3) subkliniczną postać PNH, która przebiega bez jawnej klinicznie hemolizy, ponieważ klon stanowi mniej niż 25%, a najczęściej poniżej 1% komórek, ale obserwuje się różnego stopnia niewydolność szpiku.

Z wieloletnich obserwacji pacjentów z klonem PNH i hipoplazją szpiku lub AA wynika, że u większości z nich dochodzi do systematycznego zwiększania się odsetka komórek pozbawionych GPI i pojawienia się cech istotnej klinicznie hemolizy charakterystycznej dla postaci klasycznej. Dochodzi to tego samoistnie lub pod wpływem leczenia immunosupresyjnego [19, 33–36]. Możliwy jest też zanik klonu szczególnie w przypadku, gdy do mutacji genu *PIGA* dochodzi w komórkach o ograniczonych możliwościach do samoodtwarzania, na przykład jednostkach tworzących kolonię (CFU, *colony-forming union*) [7, 37, 38]. Istnieje wiele teorii tłumaczących naturalny przebieg PNH, która daje komórkom pozbawionym GPI przewagę rozwojową. Związek z AA wskazuje na unikanie przez klon PNH ataku autoimmunologicznego. Wykazano, że klon PNH ma mniejszą wrażliwość na śmierć w mechanizmie apoptozy zależną od komórek naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killers*), a receptorami dla komórek NK są między innymi białka indukowane stresem — ULBP 1 i ULBP2 (*UL16-binding protein*), które należą do GPI-AP [39, 40]. W modelu neutralnej ewolucji klon PNH zyskuje przewagę w ubogokomórkowym szpiku kostnym. W innym modelu klon PNH wypiera prawidłowe komórki krwiotwórcze dzięki zwiększonej mobilności [41, 42]. W ostatnich latach podnoszona jest teza, że to sama cząsteczka GPI jest celem ataku autoimmunologicznego, ponieważ u pacjentów z PNH zidentyfikowano GPI-reaktywne limfocyty CD8+ [43].

Diagnostyka laboratoryjna klonu PNH

Na diagnostykę w kierunku PNH należy kierować pacjentów:

- z hemolizą i ujemnym wynikiem bezpośredniego testu antyglobulinowego (BTA), które mogą towarzyszyć: hemoglobinuria lub hemosyderynuria, neutropenia lub małopłytkowość, niewydolność nerek, zmęczenie, duszność, bóle jamy brzusznej, dysfagia, zaburzenia erekcji, zakrzepica żylna lub tętnicza;
- z dysfunkcją szpiku kostnego (hipoplazją szpiku, MDS, niewyjaśnionymi cytopeniami), które towarzyszą cechom hemolizy, niedobór żelaza, oporność na leczenie, niewyjaśniona zakrzepica oraz przesiewowo wszystkich pacjentów z AA;
- z niewyjaśnioną zakrzepicą tętniczą lub żylną w przypadku młodego wieku, nietypowej lokalizacji (żyły wątrobowe — zespół Budda-Chiariego, inne naczynia wewnątrzbrzuszne, naczynia/zatoki mózgowe, żyły skórne), którym może towarzyszyć hemoliza, cytopenia

lub nieadekwatna odpowiedź na terapię przeciwniekrzepliwą.

Historycznie najstarszymi, wprowadzonymi w latach 30. ubiegłego wieku, metodami wykrywania klonu PNH były testy lityczne, w których oceniano występowanie hemolizy erytrocytów po aktywacji dopełniacza, na przykład w środowisku o niskiej sile jonowej (test sacharozowy) czy w środowisku o niskim pH (test Hama). W latach 90. XX wieku wprowadzono do użycia bardziej specyficzne testy serologiczne, w których za pomocą swoistych przeciwciał wykrywa się niedobory ekspresji antygenów CD55 i CD59. Choć czułość tych testów była większa niż testów litycznych, to wciąż pozostawała dalece niezadowalająca. Ponadto wspólną wadą wszystkich tych testów był brak możliwości identyfikacji nieprawidłowych populacji leukocytarnych. Takich niedostatków jest pozbawiona metoda oparta na cytometrii przepływowej, która pozostaje obecnie „złotym standardem” w diagnostyce PNH. Wysoka czułość tej techniki umożliwia identyfikację klonu erytrocytów PNH na poziomie 0,01% oraz wykrycie nieprawidłowej subpopulacji neutrocytów stanowiącej zaledwie 0,05–0,1% wśród wszystkich komórek tego szeregu [44].

Ze względu na wielkość deficytu w zakresie białek GPI, erytrocyty, neutrocyty oraz monocyty podzielić można na trzy typy:

- typ I — komórki wykazujące prawidłową ekspresję białek;
- typ II — komórki z częściowym niedoborem białek GPI;
- typ III — komórki całkowicie pozbawione białek GPI.

Fizjologicznie we krwi obwodowej powinny się znajdować wyłącznie komórki typu I.

Analizę w kierunku obecności klonu PNH prowadzi się z krwi obwodowej pobranej na kwas wersenowy, inaczej: kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, *ethylene-diamine-tetraacetic acid*). Chociaż niedobór białek GPI na erytrocytach można stwierdzić nawet po kilkunastu dniach przechowywania próbki krwi w temp. $+4 \div +8^{\circ}\text{C}$, to testowanie neutrocytów i monocytów na obecność białek GPI należy przeprowadzić w czasie do 8 h (w przypadku wykrywania defektu antygenów powierzchniowych), ewentualnie w ciągu 48 h (dla analizy FLAER [*fluorescent labelled aerolysin*]) [6]. W teście wykrywającym defekt GPI na erytrocytach (wybramkowanych na podstawie ekspresji antygeny CD235a, tj. glikoforyny A), bada się ekspresję antygeny CD59. Prawidłowe erytrocyty zawierają duże ilości tej glikoproteiny, dlatego mierzona fluorescencja jest silna i jednorodna (krwin-

ki typu I). Klon PNH to populacja erytrocytów o zmniejszonej ilości antygenu CD59 lub całkowicie go pozbawiona (są to erytrocyty odpowiednio typu II oraz III). Ponieważ podtypy II i III erytrocytów różnią się wrażliwością na dopełniacz, to różna jest długość życia tych krwinek (10–15 dni dla typu III i 15–120 dni dla typu II). W raporcie z badania należy podać odsetek każdego podtypu erytrocytów, natomiast klon PNH jest sumą odsetków erytrocytów II i III typu [44]. Należy również mieć na uwadze, że wielkość klonu PNH wśród erytrocytów zmniejsza się po transfuzji koncentratu krwinek czerwonych (kkcz) oraz po incydencie nasilenia hemolizy. Ze względu na fizjologiczne osłabienie ekspresji niektórych antygenów GPI-zależnych na pewnych subpopulacjach limfocytów oraz biorąc uwagę fakt, że część limfocytów to komórki długożyjące, w diagnostyce PNH nie ocenia się wielkości klonu PNH w obrębie komórek układu chłonnego.

Do badania klonu PNH wśród leukocytów zaleca się stosowanie jednoprobówkowego testu złożonego z pięciu przeciwciał. W pierwszej kolejności, na podstawie ekspresji antygenów CD45, CD15 i CD64, identyfikuje się populacje neutrocytów (CD45+/CD15+) oraz monocytów (CD45++/CD64++). Następnie na obu populacjach ocenia się ekspresję FLAER i CD157. Prawidłowe neutrocyty oraz monocyty są FLAER+/CD157+. Aerolizyna to toksyna wytwarzana przez *Aeromonas hydrophila*. Jest wydzielana jako proenzym — proaerolizyna, który po połączeniu z fluorochromem (Alexa Fluor 488) stanowi odczynnik FLAER wykazujący powinowactwo do białek GPI, zawartych między innymi na neutrocytach i monocytach. W przypadku niedoboru GPI pojawiają się populacje z różnym stopniem niedoboru, aż do całkowitego braku wiązania FLAER i ekspresji CD157. Alternatywnie wśród neutrofilów klon PNH można zidentyfikować, stosując kombinację FLAER i CD24, natomiast w przypadku monocytów — FLAER i CD14. W tym wypadku konieczne jest jednak zastosowanie koktajlu złożonego z sześciu przeciwciał lub wykonanie testu w dwóch próbkach, osobno dla neutrofilów i dla monocytów [45]. Wielkość klonu PNH wśród neutrocytów i monocytów podaje się jako sumę komórek typu II i III.

Do opisu wielkości klonów z defektem białek GPI stosuje się standardową terminologię, zgodnie z którą:

- populację komórek PNH o wielkości ponad 1% określa się jako „klon PNH”;
- populacja komórek PNH w zakresie od 0,1% do mniej niż 1% jest „niewielką populacją komórek PNH”;

- populacja komórek PNH o ilości poniżej 0,1% to „nieliczne komórki z niedoborem białek GPI” [44].

Częstość przeprowadzenia badań kontrolnych u pacjentów ze stwierdzonym klonem PNH powinna uwzględniać stan kliniczny. Standardowo badania należy wykonywać raz w roku, pod warunkiem stabilnego obrazu klinicznego. Znacząca zmiana parametrów laboratoryjnych lub stanu klinicznego pacjenta powinna skłaniać do szybszego przeprowadzenia badania kontrolnego. U pacjentów z niedokrwistością aplastyczną i ze współistniejącym klonem PNH badania kontrolne należy przeprowadzać początkowo co 3–6 miesięcy. Po 2 latach obserwacji, jeśli wielkość klonu pozostaje stabilna, częstotliwość oznaczeń można zmniejszyć [46].

Dostępne opcje terapeutyczne

Postać kliniczna choroby i nasilenie objawów hemolizy wpływają na wybór opcji terapeutycznej. W przypadku dominującej niewydolności szpiku bez cech hemolizy (przy wielkości klonu < 10%) postępowanie lecznicze jest skupione na cytopeniach. W AA w zależności od ciężkości choroby, wieku pacjenta i dostępności dawcy stosuje się immunosupresję, immunoablację, analogi trombopoetyny lub HSCT [47, 48]. W przypadku współwystępowania niewydolności szpiku o etiologii immunologicznej i cech hemolizy uzasadnione jest jednoczesne lub sekwencyjne zastosowanie immunoablacji i blokowanie układu dopełniacza [49, 50]. W klasycznej postaci PNH terapia powinna się koncentrować na blokowaniu dopełniacza, aby zapobiegać powikłaniom hemolizy [50, 51].

Transplantacja szpiku kostnego

Niezależnie od podtypu PNH jedyną metodą wyleczenia z choroby jest HSCT. Nadal podkreśla się rolę HSCT w klasycznej postaci PNH w krajach bez dostępu do ekulizumabu. U pacjentów leczonych ekulizumabem tę opcję proponuje się w przypadku braku odpowiedzi hematologicznej albo pojawienia się niewydolności lub dysplazji szpiku kostnego [50, 52–55]. W przypadku pacjenta nieleczzonego ekulizumabem aktywna hemoliza, aktywacja śródbłonek i PLT zwiększają ryzyko rozwoju choroby weno-okluzyjnej i ostrej niewydolności nerek po HSCT. Ponadto istnieje ryzyko wystąpienia ostrej i przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi, dlatego należy je zmniejszyć, wybierając szpik kostny jako źródło komórek krwiotwórczych [50]. Według opublikowanych danych długoletnie przeżycie pacjentów z klasyczną PNH bez przeby-

tego incydentu zakrzepowo-zatorowego wynosi $86 \pm 6\%$ [55]. W przypadku pacjentów po przebytych epizodach zakrzepowo-zatorowym ryzyko wczesnej śmiertelności pozostaje wysokie. Opcją dla pacjentów starszych, z chorobami towarzyszącymi oraz młodych pragnących zachować płodność może być zastosowanie kondycjonowania o obniżonej intensywności [53, 55, 56]. W przypadku braku zgodnego dawcy można przeprowadzić HSCT od dawcy haploidentycznego [57, 58].

Terapia wspomagająca niedokrwistość

W przypadku objawowej niedokrwistości przy braku dostępu do ekulizumabu lub niepełnej odpowiedzi na terapię hamującą dopełniacz (w tym hemolizy z przełamania) wskazane jest przetoczenie kkc. Przewlekłe pobudzenie erytropoezy wymaga zazwyczaj terapii uzupełniającej — substytucji kwasu foliowego, czasem również żelaza i witaminy B₁₂. Do niedoboru żelaza prowadzi również przewlekła utrata drogą nerek. U pacjentów z CKD może się pojawić konieczność stosowania erytropoetyny [5, 19, 51].

Terapia blokująca aktywność dopełniacza — ekulizumab

Ekulizumab (przeciwciało monoklonalne anty-C5) zastępuje funkcję deficytowego inhibitora CD59, blokując możliwość powstania MAC, a tym samym chroniąc chorego przed powikłaniami hemolizy wewnątrznaczyniowej. U chorych z PNH po włączeniu do terapii ekulizumabu znacząco ograniczono zapotrzebowanie na przetoczenia kkc, ograniczono skutki hemolizy, w tym powikłania zakrzepowo-zatorowe oraz istotnie poprawiono jakość życia i całkowite przeżycie [15, 31, 59–64].

Zgodnie z kryteriami programu lekowego w Polsce terapię można zaproponować pacjentom z klonem PNH ponad 1% oraz:

- 1) stężeniem LDH przekraczającym ULN co najmniej 1,5 razy i występowaniem co najmniej jednego z powikłań związanych z hemolizą (niewydolność nerek, nadciśnienie płucne, znaczne zmęczenie ocenione wg *Functional Assessment of Chronic Illness Therapy* [FACIT]);
- 2) zakrzepicą albo innym poważnym zdarzeniem naczyniowym.

Ekulizumab podaje się dożylnie w fazie wysycającej co tydzień przez pierwsze 4 tygodnie, a od 5. tygodnia co 14 dni (± 2 dni) — zgodnie z charakterystyką produktu leczniczego (ChPL). Pierwszym podaniem leku często towarzyszy ból głowy wynikający ze wzrostu stężenia NO [12, 59].

U niektórych pacjentów przed podaniem kolejnej dawki występują tak zwane przełamujące (BTH, *breakthrough hemolysis*) epizody hemolizy wewnątrznaczyniowej, które zgodnie z wytycznymi wymagają skrócenia o 1–2 dni odstępu między podaniami lub zwiększenia dawki [12, 59]. Pojedyncze epizody BTH wywołane odwracalnym czynnikiem, takim jak uraz lub infekcja, przejściowo powodującym silniejszą aktywację dopełniacza, nie wymagają stałej zmiany rytmu infuzji leku [12]. Pacjent musi być świadomy, że konieczne jest regularne podawanie leku do końca życia, a odstępianie od terapii ze względu na dużą pulę erytrocytów GPI-AP(–) grozi ciężkim epizodem hemolizy wewnątrznaczyniowej z wszystkimi tego konsekwencjami [65].

Klasyfikację odpowiedzi na leczenie inhibitorem komplementu opracowaną przez SAAWP EBMT (*Severe Aplastic Anemia Working Party of European Society of Blood and Marrow Transplantation*) oparto na konieczności transfuzji kkc i stężeniu Hb, natomiast LDH i retikulocytoza służą jako pomocnicze wskaźniki do odróżnienia odpowiedzi całkowitej i większej oraz odpowiedzi z podkategorii suboptymalnych. Wyodrębniono 6 kategorii: odpowiedź całkowita, większa, dobra, częściowa, mniejsza i brak odpowiedzi, a kryteria dla poszczególnych stopni przedstawiono w tabeli 1 [50].

Odpowiedź kliniczna na ekulizumab zależy od czynników genetycznych (np. polimorfizmu genu kodującego receptor dopełniacza typu I lub mutacji genu kodującego C5), wielkości klonu, infekcji, wydolności szpiku oraz nasilenia hemolizy zewnątrznaczyniowej erytrocytów w wątrobie i śledzionie [50, 66, 67]. U większości pacjentów leczonych ekulizumabem pojawia się dodatni odczyn BTA (IgG– i C3+) odsłaniający podatność krwinek PNH na opsonizację składowymi iC3b, C3dg oraz C3d wywołaną brakiem aktywności inhibitora CD55. Nasilenie hemolizy zewnątrznaczyniowej jest różnicowane i zależne od polimorfizmu genów, dotyczy 25–50% pacjentów leczonych ekulizumabem i stało się celem nowych terapii w PNH [50].

Nowe terapie ukierunkowane na dopełniacz w PNH

Rawulizumab został zarejestrowany przez Europejską Agencję Leków (EMA, *European Medicines Agency*) do leczenia PNH w lipcu 2019 roku. Jest to przeciwciało monoklonalne skonstruowane na modelu ekulizumabu ze zmodyfikowanym fragmentem zmiennym łańcuchów ciężkich ułatwiającym uwalnianie C5 oraz zmodyfikowanym miejscu domeny CH3 wzmacniającym pH-zależne wiązanie do receptora FcRn w endosomach.

Tabela 1. Klasyfikacja odpowiedzi hematologicznej na inhibitory dopełniacza w nocnej napadowej hemoglobinurii według SAAWP EBMT (Grupy Roboczej ds. Ciężkiej Anemii Aplastycznej Europejskiego Towarzystwa Przeszczepiania Szpiku)**Table 1.** Classification of hematological response to anti-complement agents in in nocturnal paroxysmal hemoglobinuria according to SAAWP EBMT (Severe aplastic anemia Working Party European Society of Blood and Marrow Transplantation)

Kategoria odpowiedzi	Przetoczenia kkc	Hb [g/dl]	LDH*	Retikulocytoza* [G/l]
Całkowita	–	≥ 12	≤ 1,5 × ULN	≤ 150
Większa	–	≥ 12	> 1,5 × ULN	Lub > 150
Dobra	–	≥ 10 i < 12	A. ≤ 1,5 × ULN B. > 1,5 × ULN	Wykluczyć niewydolność szpiku**
Częściowa	Brak lub rzadko (≤ 2/6 mies.)	≥ 8 i < 10	A. ≤ 1,5 × ULN B. > 1,5 × ULN	Jw.**
Mniejsza	Brak lub rzadko (≤ 2/6 mies.) Regularnie (3–6/6 mies.) Redukcja o ≥ 50%	< 8 < 10 < 10	A. ≤ 1,5 × ULN B. > 1,5 × ULN	Jw.**
Brak	Regularnie > 6/6 mies.	< 10	A. ≤ 1,5 × ULN B. > 1,5 × ULN	Jw.**

*Dehydrogenazę mleczanową (LDH, *lactate dehydrogenase*) i retikulocytozę powinno się oceniać na podstawie średnich wartości z okresu 6 miesięcy; **w przypadku retikulocytozy < 60 G/l należy wykluczyć stopień niewydolności szpiku jako przyczyny suboptymalnej odpowiedzi na inhibitor komplementu; kkc — koncentrat krwi-niek czerwonych; Hb — hemoglobina; ULN (*upper limit of normal*) — górna granica normy

Dzięki tym modyfikacjom uzyskano mniejsze straty leku po połączeniu z C5 poprzez jego recykling — zwiększone uwalnianie wolnego rawulizumabu z endosomów i powrót leku do krążenia. Okres półtrwania rawulizumabu jest 4-krotnie dłuższy niż ekulizumabu i dzięki temu skutecznie blokuje dopełniacz przy podaży co 8 tygodni w leczeniu podtrzymującym. W rejestracyjnych badaniach klinicznych wykazano *non-inferiority* w odniesieniu do rawulizumabu we wszystkich punktach końcowych w porównaniu z ekulizumabem i mniej epizodów BTH [68–70]. Terapia lekiem jest wygodniejsza dzięki znacznie rzadszym infuzjom i wydaje się szczególnie cenna dla pacjentów z epizodami BTH wymagającymi głębszego i bardziej długotrwałego hamowania dopełniacza.

Oczekiwane są wyniki badania III fazy z zastosowaniem nomacopan (Coversin) — białka o aktywności anti-C5 z innym miejscem wiązania niż ekulizumab, dzięki czemu jest opcją dla pacjentów z polimorfizmem genu C5 uniemożliwiającym przyłączanie się ekulizumabu. Wszyscy pacjenci leczeni nomacopanem w badaniu II fazy uniezależnili się od przetoczeń kkc [71]. Lek jest przeznaczony do samodzielnego codziennego podawania podskórnego, podobnie jak inne dwie nowe cząsteczki — crovalimab (anty-C5 podawane raz w miesiącu) i cemdisiran (hamujący produkcję C5) [50, 72, 73].

Nowym celem terapii w PNH jest blokada proksymalnej części szlaku CAP, która byłaby

szczególnie pożądana u pacjentów z częściową odpowiedzią na inhibitory C5 z powodu nasilonej hemolizy zewnątrznaczyniowej. Badanie nad TT30 (opisanym w artykule z 2015 roku), cząsteczką o udowodnionej skuteczności w blokowaniu hemolizy zależnej od opsonizacji C3 oraz MAC, zakończono wcześniej niż planowano z powodu krótkiego okresu półtrwania cząsteczki [13]. Trwają badania kliniczne dotyczące dwóch analogów kompstatyny (inhibitora C3) — AMY-101 i APL-2 — oraz doustnych inhibitorów czynnika D CAP — ACH-4471/Danicopan i czynnika B — LNP023 [50, 72].

Bezpieczeństwo terapii inhibitorami dopełniacza

Ekulizumab nie upośledza zdolności do opsonizacji drobnoustrojów i usuwania kompleksów immunologicznych, ale poprzez blokowanie drogi wspólnej dla CAP i CCP zaburza zależną od MAC eliminację bakterii otoczkowych. Największe zagrożenie wiąże się z zakażeniem *Neisseria meningitidis* [12, 59]. Zgodnie z ChPL pacjenci powinni być poddani immunizacji czynnej przynajmniej 2 tygodnie przed podaniem ekulizumabu. Należy jak najszerzej zabezpieczyć pacjenta zgodnie z epidemiologią danego regionu [74]. Według zaleceń CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) z 2020 roku chorzy z przetrwałą niewydolnością dopełniacza lub leczeni inhibitorem dopełniacza (ekulizu-

mabem, rawulizumabem) powinni otrzymać dwie dawki 4-walentnej (zawierającej antygeny serogrup A+C+Y+W-135) szczepionki skoniugowanej (np. Nimenrix[®], Menveo[®]) w odstępie przynajmniej 8 tygodni oraz dwie dawki szczepionki MenB-4C (Bexero[®]) w odstępie przynajmniej 4 tygodni lub trzy dawki szczepionki MenB-FHbp (Trumenba[®]) w schemacie 0, 1–2, 6 miesięcy (preferowane u pacjentów z grupy ryzyka A) lub 0, 6 miesięcy [75–80]. Obie szczepionki MenB są rekomendowane, natomiast niewymienialne, co oznacza, że ten sam rodzaj szczepionki musi być konsekwentnie podawany w serii immunizacji [81]. Z doświadczeń innych ośrodków wynika, że szczepionka Bexsero[®] może wywołać zaostrzenie hemolizy u nieleczonych pacjentów z PNH. Z tego względu bezpieczniejsza dla nich jest immunizacja szczepionką 4-walentną przed włączeniem do programu lekowego, natomiast podanie MenB — po zastosowaniu kilku dawek ekulizumabu, kiedy uzyskiwana jest kontrola nad hemolizą wewnątrznaczyniową. Należy pamiętać, że szczepienie znacząco ogranicza, ale nie eliminuje całkowicie (!) zagrożenia meningokokami u pacjentów z PNH [81]. Z tego względu pacjent musi być uświadomiony i wyposażony w kartę bezpieczeństwa informującą o zagrożeniu infekcją meningokokową, którą powinien zawsze mieć przy sobie.

Według CDC jeśli blokowanie dopełniacza jest utrzymane, to dla bezpieczeństwa pacjentów należy ich poddać reimmunizacji 4-walentną szczepionką skoniugowaną co 5 lat, natomiast MenB — co 2–3 lata (<https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/hcp/imz/adult.html#note-mening>). Wytyczne te mogą się jednak zmienić ze względu na uaktualnione dane z czterech badań klinicznych dotyczące szczepionki Nimenrix[®], zaopiniowane pozytywnie przez EMA, wskazujące na utrzymywanie się odporności przez 10 lat po szczepieniu pierwotnym oraz po podaniu dawki przypominającej [82].

W przypadku wskazań do niezwłocznego zastosowania ekulizumabu trzeba podać szczepionkę i lek jednocześnie, a do czasu wytworzenia przeciwciał ochronnych (≥ 2 tygodnie) aplikować w ramach profilaktyki raz na dobę 250–500 mg ciprofloksacynu [12].

Dodatkowo należy rozważyć ochronę przeciwko innym bakteriom otoczkowym: *Hemophilus influenzae* i *Streptococcus pneumoniae*, odpowiednio szczepionkami Hiberix[®] i Prevenar13[®], które są rekomendowane u pacjentów w innych krajach [74]. Immunizacja czynna przeciwko tym patogenom jest niezbędna w przypadku terapii inhibitorami proksymalnego szlaku aktywacji dopełniacza [50].

Zdaniem autorów publikacji, ze względu na ryzyko zaostrzenia hemolizy wewnątrznaczyniowej towarzyszące infekcjom, warto przeprowadzać sezonowe szczepienie przeciwko wirusowi grypy u wszystkich pacjentów z PNH.

Sytuacje szczególne

Zakrzepica

U pacjenta z PNH może dojść do rozwoju zakrzepicy w naczyniach żylnych lub tętniczych. Jeśli pacjent nie jest leczony inhibitorem dopełniacza, to jak najszybciej powinien zostać poddany terapii skojarzonej ekulizumabem z antykoagulacją właściwą dla typu choroby zakrzepowo-zatorowej.

W przypadku żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, po opanowaniu ostrej fazy zakrzepicy, w przypadku braku przeciwwskazań heparynę należy zastąpić wtórną profilaktyką antagonistami witaminy K i kontynuować podawanie ekulizumabu [4, 83–86]. Nie ma opublikowanych danych dotyczących stosowania bezpośrednich doustnych antykoagulantów w ostrej fazie zakrzepicy żyłnej [86]. Podłoże powikłań zakrzepowych w PNH powoduje, że sama terapia przeciwkrzepliwa zazwyczaj nie prowadzi do przywrócenia krążenia w zamkniętym naczyniu, a wręcz może dojść do progresji zakrzepicy lub wystąpienia kolejnych epizodów zakrzepicy [23]. W przypadku stosowania heparyny należy pamiętać o podwyższonym ryzyku rozwoju małopłytkowości poheparynowej (HIT, *heparin-induced thrombocytopenia*) wymagającej zamiany heparyny na fondaparynuks [87]. Etiologię HIT w PNH tłumaczy się zwiększonym uwalnianiem czynnika tkankowego 4 (PF4, *platelet factor 4*) z aktywowanych PLT. Z tego względu przedłużoną profilaktykę heparyną u pacjentów z PNH rozważa się jedynie w szczególnych wskazaniach, na przykład w czasie ciąży [5, 88]. Natomiast w przypadku wystąpienia epizodu zakrzepowego u pacjenta leczonego ekulizumabem zaleca się natychmiastowe dołączenie terapii przeciwkrzepliwej oraz podanie dodatkowej dawki ekulizumabu lub zwiększenie dawki o 300 mg. U pacjentów już poddanych antykoagulacji należy skontrolować międzynarodowy współczynnik znormalizowany (INR, *international normalized ratio*) lub aktywność anty-Xa [74, 86].

Próby stosowania trombolizy przed erą ekulizumabu wiązały się z wysokim ryzykiem powikłań krwotocznych, dlatego tromboliza powinna być ograniczona do sytuacji klinicznych z klasycznymi wskazaniem (m.in. wczesna faza udaru niedokrwiennego mózgu, zawał serca z uniesieniem odcinka ST lub wstrząsem kardiogenym przy

niemożności wykonania angioplastyki, zator tętnicy płucnej wysokiego ryzyka i ciężka proksymalna zakrzepica żył głębokich zagrażająca utratą kończyny lub życia) [4, 5, 86, 88].

Złożony patomechanizm powikłań zakrzepowo-zatorowych sprawia, że zarówno profilaktyka pierwotna lekami antyagregacyjnymi, jak i antagonistami witaminy K nie jest w pełni skuteczna, a doniesienia dotyczące bezpośrednich doustnych antykoagulantów są nieliczne. Ogólnie profilaktykę pierwotną należy rozważyć przede wszystkim u pacjentów z klonem PNH ponad 50% granulocytów, chociaż epizody zakrzepowo-zatorowe występują również przy mniejszym poziomie klonu [17, 85, 86]. Preferuje się antykoagulację ukierunkowaną na mechanizmy osoczone, między innymi ze względu na częstsze epizody zakrzepicy żyłnej niż tętniczej. W publikacjach rekomenduje się warfarynę [3, 63, 74, 89]. Jednak zdecydowanie najlepszą profilaktyką przeciwkrzepliwą w PNH jest przerwanie błędnego koła mechanizmów prozakrzepowych związanych z hemolizą wewnątrznaczyniową oraz aktywacją PLT, granulocytów i dysfunkcją endotelium, wtórnych do niekontrolowanego rozkładu składowej C5 na C5a i C5b z tworzeniem MAC. U pacjentów leczonych ekulizumabem wykazano szybkie ograniczenie powstawania trombiny, mikrocząstek z TF, markerów stanu zapalnego i aktywacji śródbłonna, co przekłada się na redukcję liczby epizodów zakrzepowych [59, 63]. Ważnym aspektem klinicznym jest ewentualne zaprzestanie pierwotnej profilaktyki przeciwkrzepliwiej u pacjentów leczonych inhibitorem C5. Wydaje się to bezpieczne u pacjentów z dobrze kontrolowaną hemolizą [59, 63, 86, 90].

Zespół Budda-Chiariego, który jest częstym powikłaniem zakrzepicy naczyń wątrobowych, może doprowadzić do ciężkiej niewydolności wątroby wymagającej przeszczepienia narządu. Przy jednoczesnym stosowaniu ekulizumabu istnieją szanse na powodzenie tej procedury i uniknięcie nawrotu zakrzepicy w przeszczepionej wątrobie [73].

Ciąża, okresy porodu i karmienia piersią

Ciąża u pacjentki z PNH stwarza ryzyko powikłań zarówno dla ciężarnej, jak i dziecka. Jest to związane z pogłębieniem niedokrwistości, ale przede wszystkim z podwyższonym ryzykiem powikłań zakrzepowo-zatorowych [86]. Zgodnie z ChPL i programem lekowym rekomenduje się stosowa-

nie antykoncepcji w czasie terapii ekulizumabem, a kontynuowanie przyjmowania leku w czasie ciąży jest zasadne, gdy korzyści przewyższają ryzyko. Zdaniem ekspertów ciąża u kobiety z klonem PNH przekraczającym 20% to jedno ze wskazań do włączenia terapii ekulizumabem przynajmniej na okres ciąży oraz porodu, i tak jest w wielu krajach [17, 86, 91]. Ekulizumab można bezpiecznie stosować w okresach ciąży i karmienia piersią z korzyścią dla matki i dziecka na podstawie danych z rejestru PNH, chociaż śmiertelność płodów nadal jest wyższa w tej grupie niż w populacji ogólnej. U niektórych pacjentek konieczne było zwiększenie dawki ekulizumabu lub częstości infuzji, szczególnie w III trymestrze ciąży [86, 92–94]. Ponadto przez okresy ciąży i porodu należy stosować pierwotną profilaktykę heparyną drobnocząsteczkową, uzupełniać kwas foliowy, żelazo i w razie konieczności korygować niedokrwistość transfuzjami kkc [5, 74]. W przypadku kobiety z PNH stosującej wtórną profilaktykę po epizodzie zakrzepicy żyłnej lek niezarejestrowany do stosowania w okresie ciąży należy zamienić na bezpieczną heparynę.

Podsumowanie

Dostęp do terapii ekulizumabem w Polsce umożliwił wielu pacjentom z PNH uniknięcie poważnych powikłań niekontrolowanej hemolizy wewnątrznaczyniowej. Wskazania do HSCT zawężyły się do przypadków z dominującą niewydolnością szpiku lub brakiem odpowiedzi na ekulizumab, przy niemożności włączenia pacjenta do badań klinicznych nad nowymi lekami blokującymi dopełniacz. Teraz nastał czas na inne wyzwania, takie jak zapewnienie bezpieczeństwa pacjentom leczonym ekulizumabem lub innymi inhibitorami komplementu oraz zidentyfikowanie przyczyn suboptymalnej odpowiedzi na lek w celu wdrożenia adekwatnego postępowania. Szeroka sieć laboratoriów cytometrii przepływowej, w których wykonuje się badania pozwalające na wykrywanie klonu PNH zgodnie z rekomendacjami międzynarodowymi, dostarczyła narzędzi do diagnozowania i monitorowania pacjentów i powinna poprawić wykrywalność choroby w populacji polskiej. Wydaje się jednak, że nadal trudność stanowi szybka identyfikacja pacjenta z PNH przed wystąpieniem powikłań, co przy wielu obliczach tej choroby staje się problemem interdyscyplinarnym, a nie dotyczącym tylko środowiska hematologów.

Konflikt interesów

A.P.: udział w *SubInv TT30 Trial, PI Cobalt/Conserve Study* oraz *ALXN1210-PNH Study*; *Advisory Board* firmy Alexion, udział w konferencjach i wykładach finansowanych przez firmę Alexion/Swixx. K.L.: wykłady finansowane przez firmę Alexion/Swixx.

Piśmiennictwo

- Socié G, Mary JY, de Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet*. 1996; 348(9027): 573–577, doi: [10.1016/s0140-6736\(95\)12360-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)12360-1), indexed in Pubmed: [8774569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8774569/).
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333(19): 1253–1258, doi: [10.1056/NEJM199511093331904](https://doi.org/10.1056/NEJM199511093331904), indexed in Pubmed: [7566002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7566002/).
- de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, et al. French Society of Hematology, French Association of Young Hematologists. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112(8): 3099–3106, doi: [10.1182/blood-2008-01-133918](https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-133918), indexed in Pubmed: [18535202](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18535202/).
- Hill A, Kelly R, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2013; 121(25): 4985–4996, doi: [10.1182/blood-2012-09-311381](https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-311381).
- Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. *Br J Haematol*. 2011; 153(6): 709–720, doi: [10.1111/j.1365-2141.2011.08690.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08690.x), indexed in Pubmed: [21517820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21517820/).
- Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, et al. Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78(4): 211–230, doi: [10.1002/cyto.b.20525](https://doi.org/10.1002/cyto.b.20525), indexed in Pubmed: [20533382](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20533382/).
- Brodsky RA, Hu R, Hu R, et al. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. 2005; 105(10): 3848–3854, doi: [10.1182/blood-2004-04-1472](https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1472), indexed in Pubmed: [15687243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15687243/).
- Luzzatto LP. PNH from mutations of another PIG gene. *Blood*. 2013; 122(7): 1099–1100, doi: [10.1182/blood-2013-06-508556](https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508556), indexed in Pubmed: [23950173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23950173/).
- Nafa K, Bessler M, Castro-Malaspin H, et al. 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(3): 370–384, doi: [10.1006/bcmd.1998.0203](https://doi.org/10.1006/bcmd.1998.0203), indexed in Pubmed: [10087994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10087994/).
- Loveland BE, Szokolai K, Johnstone RW, et al. Coordinate functions of multiple complement regulating molecules, CD46, CD55, and CD59. *Transplant Proc*. 1994; 26(3): 1070–1071, indexed in Pubmed: [7518104](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7518104/).
- Brodsky RA. Narrative review: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia. *Ann Intern Med*. 2008; 148(8): 587–595, doi: [10.7326/0003-4819-148-8-200804150-00003](https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-8-200804150-00003), indexed in Pubmed: [18413620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18413620/).
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014; 124(18): 2804–2811, doi: [10.1182/blood-2014-02-522128](https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-522128), indexed in Pubmed: [25237200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25237200/).
- Piekarska A, Spychalska J. Novel insight into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematologia*. 2015; 6(3): 278–292.
- Misztal T, Tomasiak M. [Pathophysiological consequences of hemolysis. Role of cell-free hemoglobin]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011; 65: 627–639, doi: [10.5604/17322693.961007](https://doi.org/10.5604/17322693.961007), indexed in Pubmed: [22100795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22100795/).
- Hill A, Rother RP, Wang X, et al. Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2010; 149(3): 414–425, doi: [10.1111/j.1365-2141.2010.08096.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08096.x), indexed in Pubmed: [20230403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20230403/).
- Peacock-Young B, Macrae FL, Newton DJ, et al. The prothrombotic state in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a multifaceted source. *Haematologica*. 2018; 103(1): 9–17, doi: [10.3324/haematol.2017.177618](https://doi.org/10.3324/haematol.2017.177618), indexed in Pubmed: [29246924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29246924/).
- Griffin M, Hillmen P, Munir T, et al. Significant hemolysis is not required for thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2019; 104(3): e94–e6.
- Nishimura JI, Kanakura Y, Ware RE, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004; 83(3): 193–207, doi: [10.1097/01.md.0000126763.68170.46](https://doi.org/10.1097/01.md.0000126763.68170.46), indexed in Pubmed: [15118546](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15118546/).
- Parker C, Omine M, Richards S, et al. International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106(12): 3699–3709, doi: [10.1182/blood-2005-04-1717](https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1717), indexed in Pubmed: [16051736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16051736/).
- Barcellini W, Scola E, Lanfranconi S, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): brain MRI ischemic lesions in neurologically asymptomatic patients. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 476, doi: [10.1038/s41598-017-18936-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-18936-0), indexed in Pubmed: [29323198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29323198/).
- Hill A, Sapsford RJ, Scally A, et al. Under-recognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *Br J Haematol*. 2012; 158(3): 409–414, doi: [10.1111/j.1365-2141.2012.09166.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2012.09166.x), indexed in Pubmed: [22639982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22639982/).
- Meppiel E, Crassard I, Peffault de Latour R, et al. Cerebral venous thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a series of 15 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94(1): e362, doi: [10.1097/MD.0000000000000362](https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000362), indexed in Pubmed: [25569655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25569655/).
- Hoekstra J, Leebeek FWG, Plessier A, et al. European Network for Vascular Disorders of the Liver. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. *J Hepatol*. 2009; 51(4): 696–706, doi: [10.1016/j.jhep.2009.06.019](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.06.019), indexed in Pubmed: [19664836](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19664836/).
- Poulou LS, Vakrinos G, Pomoni A, et al. Stroke in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: patterns of disease and outcome. *Thromb Haemost*. 2007; 98(3): 699–701, indexed in Pubmed: [17849069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17849069/).
- Watt SG, Winhoven S, Hay CRM, et al. Purpura fulminans in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2007; 137(4): 271, doi: [10.1111/j.1365-2141.2007.06522.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06522.x), indexed in Pubmed: [17456051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17456051/).
- Schrezenmeier H, Muus P, Socié G, et al. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*. 2014; 99(5): 922–929, doi: [10.3324/haematol.2013.093161](https://doi.org/10.3324/haematol.2013.093161), indexed in Pubmed: [24488565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24488565/).
- Ninomiya H, Kawashima Y, Hasegawa Y, et al. Complement-induced procoagulant alteration of red blood cell membranes with microvesicle formation in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): implication for thrombogenesis in PNH. *Br J Haematol*. 1999; 106(1): 224–231.

28. Simak J, Holada K, Risitano AM, et al. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol.* 2004; 125(6): 804–813, doi: [10.1111/j.1365-2141.2004.04974.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04974.x), indexed in Pubmed: [15180871](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15180871/).
29. Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34(9): 1977–1984, doi: [10.1161/ATVBA-HA.114.304114](https://doi.org/10.1161/ATVBA-HA.114.304114), indexed in Pubmed: [25012129](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25012129/).
30. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006; 12(6): 682–687, doi: [10.1038/nm1419](https://doi.org/10.1038/nm1419), indexed in Pubmed: [16715088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16715088/).
31. Hillmen P, Elebute M, Kelly R, et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol.* 2010; 85(8): 553–559, doi: [10.1002/ajh.21757](https://doi.org/10.1002/ajh.21757), indexed in Pubmed: [20658586](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20658586/).
32. Rother RP, Bell L, Hillmen P, et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; 293(13): 1653–1662, doi: [10.1001/jama.293.13.1653](https://doi.org/10.1001/jama.293.13.1653), indexed in Pubmed: [15811985](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15811985/).
33. Araten DJ, Bessler M, McKenzie S, et al. Dynamics of hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): no evidence for intrinsic growth advantage of PNH clones. *Leukemia.* 2002; 16(11): 2243–2248, doi: [10.1038/sj.leu.2402694](https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402694), indexed in Pubmed: [12399968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12399968/).
34. Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol.* 2014; 164(4): 546–554, doi: [10.1111/bjh.12661](https://doi.org/10.1111/bjh.12661), indexed in Pubmed: [24261566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24261566/).
35. Pu JJ, Mukhina G, Wang H, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol.* 2011; 87(1): 37–45, doi: [10.1111/j.1600-0609.2011.01615.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2011.01615.x), indexed in Pubmed: [21447004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21447004/).
36. Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell.* 1997; 88(1): 1–4, doi: [10.1016/s0092-8674\(00\)81850-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81850-4), indexed in Pubmed: [9019395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9019395/).
37. Pu JJ, Hu R, Mukhina GL, et al. The small population of PIG-A mutant cells in myelodysplastic syndromes do not arise from multipotent hematopoietic stem cells. *Haematologica.* 2012; 97(8): 1225–1233, doi: [10.3324/haematol.2011.048215](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.048215), indexed in Pubmed: [22315493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315493/).
38. Traulsen A, Pacheco JM, Luzzatto L, et al. Somatic mutations and the hierarchy of hematopoiesis. *Bioessays.* 2010; 32(11): 1003–1008, doi: [10.1002/bies.201000025](https://doi.org/10.1002/bies.201000025), indexed in Pubmed: [20803504](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20803504/).
39. Brodsky RA. How do PIG-A mutant paroxysmal nocturnal hemoglobinuria stem cells achieve clonal dominance? *Expert Rev Hematol.* 2009; 2(4): 353–356, doi: [10.1586/ehm.09.35](https://doi.org/10.1586/ehm.09.35), indexed in Pubmed: [21082939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21082939/).
40. Savage WJ, Barber JP, Mukhina GL, et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficiency confers resistance to apoptosis in PNH. *Exp Hematol.* 2009; 37(1): 42–51, doi: [10.1016/j.exphem.2008.09.002](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2008.09.002), indexed in Pubmed: [19013003](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19013003/).
41. Dingli D, Luzzatto L, Pacheco JM. Neutral evolution in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(47): 18496–18500, doi: [10.1073/pnas.0802749105](https://doi.org/10.1073/pnas.0802749105), indexed in Pubmed: [19011109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011109/).
42. Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, et al. 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(7): 1722–1725, doi: [10.1038/leu.2012.46](https://doi.org/10.1038/leu.2012.46), indexed in Pubmed: [22343521](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22343521/).
43. Gargiulo L, Papaioannou M, Sica M, et al. Glycosylphosphatidylinositol-specific, CD1d-restricted T cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2013; 121(14): 2753–2761, doi: [10.1182/blood-2012-11-469353](https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-469353), indexed in Pubmed: [23372165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23372165/).
44. Illingworth AJ, Marinov I, Sutherland DR. Sensitive and accurate identification of PNH clones based on ICCS/ESCCA PNH Consensus Guidelines-A summary. *Int J Lab Hematol.* 2019; 41 (Suppl 1): 73–81, doi: [10.1111/ijlh.13011](https://doi.org/10.1111/ijlh.13011), indexed in Pubmed: [31069981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31069981/).
45. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 — reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94(1): 23–48, doi: [10.1002/cyto.b.21610](https://doi.org/10.1002/cyto.b.21610), indexed in Pubmed: [29236353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29236353/).
46. Killick SB, Bown N, Cavenagh J, et al. British Society for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of adult aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2016; 172(2): 187–207, doi: [10.1111/bjh.13853](https://doi.org/10.1111/bjh.13853), indexed in Pubmed: [26568159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26568159/).
47. Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood.* 2017; 129(11): 1428–1436, doi: [10.1182/blood-2016-08-693481](https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-693481), indexed in Pubmed: [28096088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28096088/).
48. Townsley DM, Scheinberg P, Winkler T, et al. Eltrombopag added to standard immunosuppression for aplastic anemia. *N Engl J Med.* 2017; 376(16): 1540–1550, doi: [10.1056/NEJMoa1613878](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1613878), indexed in Pubmed: [28423296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28423296/).
49. Griffin M, Kulasekararaj A, Gandhi S, et al. Concurrent treatment of aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria syndrome with immunosuppressive therapy and eculizumab: a UK experience. *Haematologica.* 2018; 103(8): e345–e347, doi: [10.3324/haematol.2017.183046](https://doi.org/10.3324/haematol.2017.183046), indexed in Pubmed: [29545341](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29545341/).
50. Risitano AM, Marotta S, Ricci P, et al. Anti-complement treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: time for proximal complement inhibition? A position paper from the SAAWP of the EBMT. *Front Immunol.* 2019; 10: 1157, doi: [10.3389/fimmu.2019.01157](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01157), indexed in Pubmed: [31258525](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31258525/).
51. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2009; 113(26): 6522–6527, doi: [10.1182/blood-2009-03-195966](https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-195966), indexed in Pubmed: [19372253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19372253/).
52. Bacigalupo A, Socié G, Schrezenmeier H, et al. Aplastic Anemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (WPSAA-EBMT). Bone marrow versus peripheral blood as the stem cell source for sibling transplants in acquired aplastic anemia: survival advantage for bone marrow in all age groups. *Haematologica.* 2012; 97(8): 1142–1148, doi: [10.3324/haematol.2011.054841](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.054841), indexed in Pubmed: [22315497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22315497/).
53. Brodsky RA, Brodsky RA, Prince GM, et al. Peripheral blood harvest of unaffected CD34+ CD38– hematopoietic precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 1995; 86(9): 3381–3386, indexed in Pubmed: [7579441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7579441/).
54. Pantin J, Tian X, Geller N, et al. Long-term outcome of fludarabine-based reduced-intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation for debilitating paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014; 20(9): 1435–1439, doi: [10.1016/j.bbmt.2014.05.012](https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.05.012), indexed in Pubmed: [24844857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24844857/).

55. Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, et al. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2012; 97(11): 1666–1673, doi: [10.3324/haematol.2012.062828](#), indexed in Pubmed: 22689687.
56. Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, et al. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*. 2001; 29(5): 639–642, doi: [10.1016/s0301-472x\(01\)00632-4](#), indexed in Pubmed: 11376878.
57. Brodsky RA, Luznik L, Bolaños-Meade J, et al. Reduced intensity HLA-haploidentical BMT with post transplantation cyclophosphamide in nonmalignant hematologic diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2008; 42(8): 523–527, doi: [10.1038/bmt.2008.203](#), indexed in Pubmed: 18622413.
58. Liu L, Liu S, Zhang Y, et al. Excellent outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single-center study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019; 25(8): 1544–1549, doi: [10.1016/j.bbmt.2019.02.024](#), indexed in Pubmed: 30853571.
59. Hillmen P, Muus P, Röth A, et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013; 162(1): 62–73, doi: [10.1111/bjh.12347](#), indexed in Pubmed: 23617322.
60. Hill A, Rother RP, Hillmen P. Improvement in the symptoms of smooth muscle dystonia during eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2005; 90(12 Suppl): ECR40, indexed in Pubmed: 16464755.
61. 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(12): 4123–4128, doi: [10.1182/blood-2007-06-095646](#), indexed in Pubmed: 17702897.
62. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355(12): 1233–1243, doi: [10.1056/NEJMoa061648](#), indexed in Pubmed: 16990386.
63. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011; 117(25): 6786–6792, doi: [10.1182/blood-2011-02-333997](#), indexed in Pubmed: 21460245.
64. Luzzatto L, Risitano AM, Notaro R. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and eculizumab. *Haematologica*. 2010; 95(4): 523–526, doi: [10.3324/haematol.2009.017848](#), indexed in Pubmed: 20378572.
65. van Bijnen STA, van Rijn RS, Koljenovic S, et al. Possible high risk of thrombotic events in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria after discontinuation of eculizumab. *Br J Haematol*. 2012; 157(6): 762–763, doi: [10.1111/j.1365-2141.2012.09073.x](#), indexed in Pubmed: 22372429.
66. DeZern AE, Dorr D, Brodsky RA. Predictors of hemoglobin response to eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol*. 2013; 90(1): 16–24, doi: [10.1111/ejh.12021](#), indexed in Pubmed: 23046169.
67. Hill A, Rother RP, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica*. 2010; 95(4): 567–573, doi: [10.3324/haematol.2009.007229](#), indexed in Pubmed: 20145265.
68. Connell NT. Ravulizumab: a complementary option for PNH. *Blood*. 2019; 133(6): 503–504, doi: [10.1182/blood-2018-12-891499](#), indexed in Pubmed: 30733201.
69. Kulasekararaj AG, Hill A, Rottinghaus ST, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in C5-inhibitor-experienced adult patients with PNH: the 302 study. *Blood*. 2019; 133(6): 540–549, doi: [10.1182/blood-2018-09-876805](#), indexed in Pubmed: 30510079.
70. Lee JW, Sicre de Fontbrune F, Wong Lee L, et al. Ravulizumab (ALXN1210) vs eculizumab in adult patients with PNH naive to complement inhibitors: the 301 study. *Blood*. 2019; 133(6): 530–539, doi: [10.1182/blood-2018-09-876136](#), indexed in Pubmed: 30510080.
71. Kulasekararaj A, Weston-Davies W, Robak T, et al. Long term nomacopan administration results in complete transfusion independence in previously transfusion-dependent PNH patients. *Blood*. 2019; 134(Suppl_1): 4797–4797, doi: [10.1182/blood-2019-125263](#).
72. Zelek WM, Xie L, Morgan BP, et al. Compendium of current complement therapeutics. *Mol Immunol*. 2019; 114: 341–352, doi: [10.1016/j.molimm.2019.07.030](#), indexed in Pubmed: 31446305.
73. Röth A, Nishimura JI, Nagy Z, et al. The complement C5 inhibitor crovalimab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2020; 135(12): 912–920, doi: [10.1182/blood.2019003399](#), indexed in Pubmed: 31978221.
74. Saevels K, Berneman ZN, Anguille S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Belg J Hematol*. 2017; 8(7): 259–264.
75. Beeslaar J, Absalon J, Balmer P, et al. Clinical data supporting a 2-dose schedule of MenB-FHbp, a bivalent meningococcal serogroup B vaccine, in adolescents and young adults. *Vaccine*. 2018; 36(28): 4004–4013, doi: [10.1016/j.vaccine.2018.05.060](#), indexed in Pubmed: 29861182.
76. Ostergaard L, Vesikari T, Absalon J, et al. B1971009 and B1971016 Trial Investigators. A bivalent meningococcal B vaccine in adolescents and young adults. *N Engl J Med*. 2017; 377(24): 2349–2362, doi: [10.1056/NEJMoa1614474](#), indexed in Pubmed: 29236639.
77. Dhillon S, Pace D. Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT; Nimenrix): a review. *Drugs*. 2017; 77(17): 1881–1896, doi: [10.1007/s40265-017-0828-8](#), indexed in Pubmed: 29094312.
78. Assaf-Casals A, Dbaibo G. Meningococcal quadrivalent tetanus toxoid conjugate vaccine (MenACWY-TT, Nimenrix™): A review of its immunogenicity, safety, co-administration, and antibody persistence. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(7): 1825–1837, doi: [10.1080/21645515.2016.1143157](#), indexed in Pubmed: 26900984.
79. Borja-Tabora CF, Montalban C, Memish ZA, et al. Long-term immunogenicity and safety after a single dose of the quadrivalent meningococcal serogroups A, C, W, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine in adolescents and adults: 5-year follow-up of an open, randomized trial. *BMC Infect Dis*. 2015; 15: 409, doi: [10.1186/s12879-015-1138-y](#), indexed in Pubmed: 26437712.
80. Carter NJ. Multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB; Bexsero®): a review of its use in primary and booster vaccination. *BioDrugs*. 2013; 27(3): 263–274, doi: [10.1007/s40259-013-0029-2](#), indexed in Pubmed: 23575646.
81. Patton ME, Stephens D, Moore K, et al. Updated recommendations for use of MenB-FHbp serogroup B meningococcal vaccine — Advisory Committee on Immunization Practices, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017; 66(19): 509–513, doi: [10.15585/mmwr.mm6619a6](#), indexed in Pubmed: 28520709.
82. Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, et al. 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 15(6): 825–828, indexed in Pubmed: 7581076.
83. Ninomiya H, Kawashima Y, Nagasawa T. Inhibition of complement-mediated haemolysis in paroxysmal nocturnal haemo-

- globinuria by heparin or low-molecular weight heparin. *Br J Haematol.* 2000; 109(4): 875–881, doi: [10.1046/j.1365-2141.2000.02125.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02125.x), indexed in Pubmed: [10929045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10929045/).
84. Paikin JS, Eikelboom JW, Cairns JA, et al. New antithrombotic agents — insights from clinical trials. *Nat Rev Cardiol.* 2010; 7(9): 498–509, doi: [10.1038/nrcardio.2010.101](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.101), indexed in Pubmed: [20585330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20585330/).
85. Van Bijnen STA, Van Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Thromb Haemost.* 2012; 10(1): 1–10, doi: [10.1111/j.1538-7836.2011.04562.x](https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04562.x), indexed in Pubmed: [22077430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22077430/).
86. Griffin M, Munir T. Management of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a clinician's guide. *Ther Adv Hematol.* 2017; 8(3): 119–126, doi: [10.1177/2040620716681748](https://doi.org/10.1177/2040620716681748), indexed in Pubmed: [28246555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246555/).
87. D'Amico EA, Villaga PR, Gualandro SFM, et al. Successful use of Arixtra in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Budd-Chiari syndrome and heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2003; 1(11): 2452–2453, doi: [10.1046/j.1538-7836.2003.0468c.x](https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.0468c.x), indexed in Pubmed: [14629485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14629485/).
88. Araten DJ, Notaro R, Thaler HT, et al. Thrombolytic therapy is effective in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a series of nine patients and a review of the literature. *Haematologica.* 2012; 97(3): 344–352, doi: [10.3324/haematol.2011.049767](https://doi.org/10.3324/haematol.2011.049767), indexed in Pubmed: [22133780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133780/).
89. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol.* 2004; 126(1): 133–138, doi: [10.1111/j.1365-2141.2004.04992.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.04992.x), indexed in Pubmed: [15198744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15198744/).
90. Malato A, Saccullo G, Coco LLo, et al. Thrombotic complications in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a literature review. *Blood Transfus.* 2012; 10(4): 428–435, doi: [10.2450/2012.0161-11](https://doi.org/10.2450/2012.0161-11), indexed in Pubmed: [22790262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22790262/).
91. Miyasaka N, Miura O, Kawaguchi T, et al. Pregnancy outcomes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. *Int J Hematol.* 2016; 103(6): 703–712, doi: [10.1007/s12185-016-1946-x](https://doi.org/10.1007/s12185-016-1946-x), indexed in Pubmed: [26857155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26857155/).
92. Kelly R, Arnold L, Richards S, et al. The management of pregnancy in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria on long term eculizumab. *Br J Haematol.* 2010; 149(3): 446–450, doi: [10.1111/j.1365-2141.2010.08099.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08099.x), indexed in Pubmed: [20151973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20151973/).
93. Kelly RJ, Höchsmann B, Szer J, et al. Eculizumab in pregnant patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 2015; 373(11): 1032–1039, doi: [10.1056/NEJMoa1502950](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1502950), indexed in Pubmed: [26352814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26352814/).
94. Tsutsui M, Gotoh A, Komatsu N. [Successful pregnancy and delivery achieved with eculizumab administration initiated after a preceding missed abortion in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria] [Article in Japanese]. *Rinsho Ketsueki.* 2019; 60(4): 281–285, doi: [10.11406/rinketsu.60.281](https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.281), indexed in Pubmed: [10685556](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10685556/).