

Nocna napadowa hemoglobinuria – wieloletnie obserwacje. Charakterystyka kliniczna i analiza wielkości klonu z defektem kotwicy glikozylfosfatydilinozytolowej (GPI)

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria – long lasting observations. Clinical characteristic and analysis of the size of the clone with glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor defect

Barbara Żupańska, Justyna Spychalska, Hanna Pyl, Ewa Mendek-Czajkowska, Ewa Brojer

Streszczenie

Przeanalizowano 105 przypadków NNH zdiagnozowanych od 1995 r. do czerwca 2011 r. Rozpoznanie NNH oparte było na analizie najważniejszych objawów klinicznych oraz ocenie ekspresji białek związanych z kotwicą glikozylfosfatydilinozytolową (GPI) na erytrocytach i granulocytach, metodą fluorocytometryczną (FC). Do analizy włączono chorych, u których wielkość klonu była 1% lub większa. Obserwowane objawy kliniczne to: hemoliza wewnątrznaczyniowa (88,6%), hemoglobinuria (38,6%), małopłytkowość (41,4%), aplazja/hypoplazja szpiku (45,7%), zakrzepy (20,0%). Rozmiar klonu NNH wynosił od kilku procent do 99% i był wyższy w populacji granulocytów niż erytrocytów. Pacjentów podzielono na dwie grupy – klasyczną NNH i NNH z dodatkową niewydolnością szpiku. Hemolizę w obu grupach obserwowano u ok. 90% chorych, hemoglobinurię u ok. połowy chorych z klasyczną NNH, a dwukrotnie rzadziej u chorych z niewydolnością szpiku, małopłytkowość obserwowano u ok. 90% w grupie z niewydolnością szpiku, a rzadko w klasycznej NNH, zakrzepy w obu grupach stwierdzono u 20% chorych. Mediana wielkości klonu z defektem NNH na erytrocytach i granulocytach była znacznie wyższa w klasycznej NNH niż w NNH z niewydolnością szpiku. Wielkość klonu z defektem na granulocytach była w klasycznej NNH zawsze wyższa niż 20%, a u znacznej liczby chorych z niewydolnością szpiku niższa niż 20%. U 8 z tych chorych w kolejnych badaniach obserwowano wzrost odsetka komórek z defektem – wskazuje to na konieczność wielokrotnych badań.

Słowa kluczowe: nocna napadowa hemoglobinuria, objawy kliniczne, rozpoznanie NNH, niewydolność szpiku

Summary

We present the analysis of 105 paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cases diagnosed in the period 1995–June 2011. PNH diagnosis was based on the analysis of the major clinical symptoms and on protein expression associated with glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor on erythrocytes and granulocytes assessed with flow fluorocytometry (FC). The analysis included patients with clone size 1% or bigger. The main clinical symptoms were: intravascular hemolysis (88.6%), hemoglobinuria (38.6%), thrombocytopenia (41.4%), bone marrow aplasia/hypoplasia (45.7%), thromboses (20.0%). PNH clone size ranged from several percent to 99%; it was higher among granulocytes than among erythrocytes. Patients were divided into two groups: classic PNH and PNH with bone marrow failure. In both groups hemolysis was observed in approximately 90% of patients, hemoglobinuria in about 50% of patients with classic PNH and in 25% of patients with bone marrow failure; thrombocytopenia was observed in approximately 90% of patients with bone marrow failure and rarely in classic PNH; thrombotic events were found in 20% of both groups of patients. In classic PNH the median size of clone with defect in PNH erythrocytes and granulocytes was

© by Polskie Towarzystwo Hematologów
i Transfuzjologów
i Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Acta
Haematologica
Polonica;
43 (1): 75–82

Otrzymano: 17.11.2011
Zaakceptowano do druku: 30.12.2011

Instytut Hematologii i Transfuzjologii
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer

Adres do korespondencji:
Prof. dr hab. n. med. Ewa Brojer
Zakład Immunologii Hematologicznej
i Transfuzjologicznej IHIT
ul. Chocimska 5
00-957 Warszawa,
e-mail: ebrojer@ihit.waw.pl
e-mail: bzupanska@ihit.waw.pl

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesu

significantly higher than in PNH with bone marrow failure. Clone size with GPI defect on granulocytes in the classic PNH was always >20%, and <20% in a significant number of patients with bone marrow failure. In 8 such patients, subsequent studies revealed increase in the percentage of cells with defect. Follow up investigation of the size of the PNH clone seem therefore warranted.

Keywords: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, clinical symptoms, PNH diagnosis, bone marrow failure

Niedokrwistość z hemoglobinurią została zauważona w XIX wieku. W latach 1928–1931 opisano kliniczne objawy u chorych i użyto nazwy „nocna napadowa hemoglobinuria” (NNH) (*Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria*; PNH). Po kilku latach wprowadzono do diagnostyki test z zakwaszoną surowicą (test Hama). Służył on długie lata, często łącznie z testem sacharozowym [1].

Przez wiele lat NNH kojarzono tylko z objawami klinicznymi, które sugerowała nazwa, wobec tego rozpoznawano ją bardzo rzadko. Nowe spojrzenie na tę chorobę zaczęło się na przełomie lat 80. i 90. po wykryciu, że jest ona następstwem nabytego, klonalnego defektu hematopoetycznej komórki macierzystej, który dotyczy również innych niż erytrocyty komórek krwi. Defekt ten doprowadza do niedoboru białek połączonych z błoną komórkową za pomocą kotwicy glikozylfosfatydilinozytolowej (GPI). Jest on wynikiem mutacji somatycznej genu *PIG-A* (*phosphatidylinositol glycan class A*) odpowiedzialnego za pierwszy etap biosyntezy kotwicy GPI, a zlokalizowanego na chromosomie X. W NNH dochodzi między innymi do niedoboru białek regulujących aktywność dopełniacza: CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis*; MIRL) i CD55 (*decay accelerating factor*; DAF).

Od lat 90. liczba rozpoznawanych przypadków NNH zaczęła rosnąć, głównie dzięki wprowadzeniu do diagnostyki metody fluorocytometrycznej pozwalającej na ilościową ocenę niedoboru inhibitorów komplementu i innych białek związanych z GPI. Określa się odsetek komórek analizowanej linii, które mają defekt kotwicy GPI. Można dodatkowo analizować stopień niedoboru tych białek na poszczególnych komórkach, co daje podstawę do wyróżnienia komórek z całkowitym (typ III) lub częściowym (typ II) brakiem białek połączonych z błoną komórkową poprzez kotwicę GPI. Stosując nową metodę, wykazywano coraz częściej, że nazwa „nocna napadowa hemoglobinuria” nie odzwierciedla dobrze objawów choroby [2–8]. Zauważano, że 1) hemoliza nie jest napadowa, ale przewlekła i może występować nie tylko w nocy, 2) hemoglobinuria nie zawsze występuje, objawia się raczej okresowo i nie u wszystkich pacjentów, 3) coraz częściej też obserwowano aplazję szpiku, granulocytopenię, małopłytkowość lub pancytopenię – objawy,

których dawniej nie kojarzono z NNH, a które są wynikiem niewydolności szpiku.

Celem pracy jest przedstawienie 105 przypadków NNH zdiagnozowanych metodą fluorocytometryczną w okresie od 1995 roku, kiedy metodę tę wprowadzono w Instytucie Hematologii i Transfuzjologii, do czerwca 2011 r.

Materiał i metody

Rozpoznawanie NNH oparte było na:

- badaniu i analizie najważniejszych objawów klinicznych u pacjentów (hemoliza wewnątrznaczyniowa, hemoglobinuria, trombocytopenia, aplazja/hypoplazja szpiku kostnego, zakrzepy),
- ocenie ekspresji białek związanych z kotwicą GPI na komórkach krwi, metodą fluorocytometryczną (FC).

Do badań wykorzystywano pełną krew obwodową pacjenta pobraną na EDTA, a badania wykonywano w nie później niż 48 godzin po jej pobraniu. Badania defektu wykonywano równolegle na dwóch liniach komórkowych – erytrocytach i granulocytach. Rozpoznanie uznawano za potwierdzone, gdy wielkość klonu NNH na granulocytach była 1% lub większa.

Wykonanie badań fluorocytometrycznych:

Erytrocyty znakowano dwustopniowo. Do testu stosowano przeciwciała monoklonalne anti-CD59 (klon BRIC 229) i anti-CD55 (mieszanina klonów BRIC 110, 216, 220, 230) firmy IBGRL (Bristol, Wielka Brytania) oraz drugorzędowe poliklonalne przeciwciała anti-Ig sprzężone z FITC i R-PE firmy DakoCytomation.

Do znakowania leukocytów w próbkach krwi dokonywano lizy erytrocytów odczynnikami BD Pharm Lyse (Becton-Dickinson). Zawiesinę zawierającą 10^6 komórek znakowano jednostopniowo przeciwciałami sprzężonymi z FITC: anti-CD59 (klon BRIC 229), anti-CD55 (klon BRIC 216) firmy IBGRL oraz anti-CD66b (klon G10F5) firmy BD Pharmingen. Dla zwiększenia czułości testu do wykrywania klonu z defektem typu NNH na granulocytach wprowadzono we wrześniu 2010 r. dodatkowe przeciwciała anti-CD15PE oraz anti-CD45PerCP (Becton-Dickinson).

Tabela I. Najważniejsze dane kliniczne u chorych na NNH

Table I. The most important clinical data in patients with PNH

	Liczba	Odsetek
Chorzy	105	100
Hemoliza wewnątrznaczyniowa	93	88,6
Hemoglobinuria	40	38,4
Małopłytkowość (<100 *10 ³ /μl PLT)	54	51,4
Niewydolność szpiku	48	45,7
Zakrzepy	21	20,0

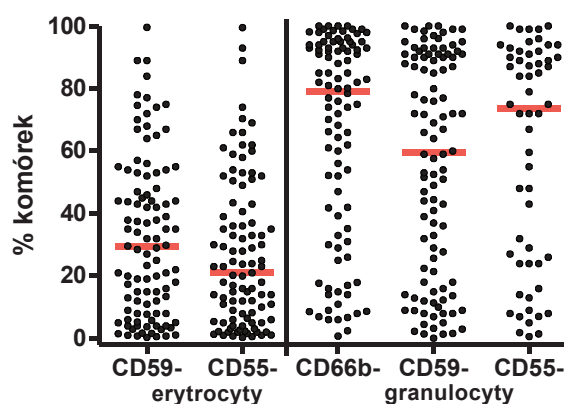
Analizę statystyczną wykonano za pomocą programu GraphPad Prism (wersja 4.01). Wartości zostały zaprezentowane na wykresach dot plot, z zaznaczoną medianą. Do statystycznego porównania median badanych grup (erytrocyty z defektem CD59 i CD55 oraz granulocyty z defektem CD66b, CD59 i CD55) został użyty nieparametryczny test Kruskal-Wallis z analizą wielokrotnych porównań (*Dunn's post-hoc test*). Wartości $p < 0,05$, były uważane za istotne statystycznie.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono częstość występowania podstawowych objawów klinicznych u chorych z rozpoznaną NNH. Było wśród nich 59 kobiet i 46 mężczyzn. Wiek chorych wynosił od 11 do 80 lat.

Hemolizę wewnątrznaczyniową obserwowano u 88,6% chorych. Hemoglobinuria występowała rzadziej – u 38,4%. Małopłytkowość obserwowano u 51,4%, aplazję/hypoplazję szpiku u 45,7%, a zakrzepy u 20% pacjentów.

Na rycinie 1. przedstawiono odsetek komórek z defektem typu NNH u poszczególnych pacjentów oceniony (na początku choroby) przy użyciu przeciwciał anti-CD59 i anti-CD55 na erytrocytach oraz przeciwciał anti-CD66b, anti-CD59 i anti-CD55 na granulocytach.



Ryc. 1. Odsetek komórek z defektem kotwicy GPI u poszczególnych pacjentów, oceniony przy pierwszym badaniu w IHiT przy użyciu przeciwciał anti-CD59 i anti-CD55 na erytrocytach oraz przeciwciał anti-CD66b, anti-CD59 i anti-CD55 na granulocytach. Poziomą kreską oznaczono medianę.

Fig. 1. The percentage of cells with defective GPI anchor in individual patients, (evaluated at the study in IHiT) using anti-CD59 and anti-CD55 on erythrocytes and anti-CD66b, anti-CD59 on granulocytes. Horizontal line marked median.

Rozmiar klonu typu NNH wynosił od kilku procent do 99%. Przeciętny odsetek komórek z defektem był wyższy na granulocytach niż na erytrocytach, niezależnie od analizowanych białek związanych z GPI ($p < 0,001$). Różnice między odsetkiem erytrocytów CD59 ujemnych i CD55 ujemnych oraz granulocytów CD66b ujemnych, CD59 ujemnych i CD55 ujemnych nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

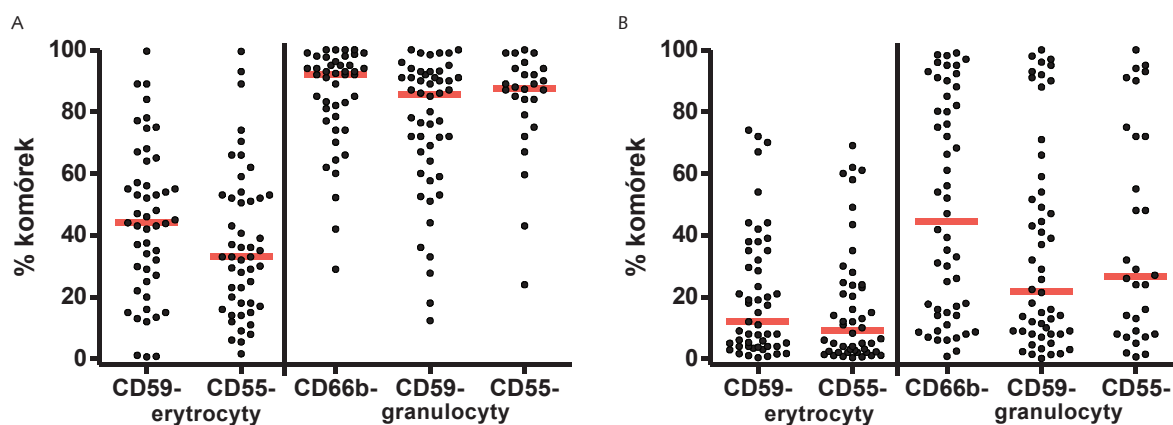
Wszystkich pacjentów podzielono na dwie grupy, a nie jak w poprzednio prezentowanych pracach na trzy (patrz Omówienie). Do pierwszej włączono chorych na tzw. klasyczną NNH, u których nie występowały zaburzenia szpiku. Do grupy drugiej zaliczono chorych, u których obserwowano niewydolność szpiku (aplazja/hypoplazja bez ich różnicowania). Dane kliniczne chorych w obu grupach przedstawiono w tabeli II, a wielkość klonu typu NNH w momencie rozpoznania choroby na rycinie 2.

Hemoliza wewnątrznaczyniowa w obu grupach była obserwowana u około 90% chorych. Hemoglo-

Tabela II. Dane kliniczne chorych z klasyczną formą NNH (grupa 1) i chorych z niewydolnością szpiku (grupa 2)

Table II. Clinical data of patients with classic PNH (group 1) and in patients with bone marrow failure (group 2)

	Grupa 1 „klasyczna” NNH N=50		Grupa 2 NNH z niewydolnością szpiku N=55	
	liczba	%	liczba	%
Hemoliza wewnątrznaczyniowa	45	90,0	48	87,3
Hemoglobinuria	27	54,0	13	23,6
Małopłytkowość (<100 *10 ³ /μl PLT)	8	16,0	46	83,6
Zakrzepy	12	24,0	9	16,4



Ryc. 2. Wielkość klonu typu NNH na początku choroby u pacjentów z „klasyczną” NNH (A) i u chorych, u których obserwowano niewydolność szpiku (B), badana przy użyciu przeciwciał anti-CD59 i anti-CD55 na erytrocytach oraz przeciwciał anti-CD66b, anti-CD59 i anti-CD55 na granulocytach. Poziomą kreską oznaczono medianę.

Fig. 2. PNH clone size at the beginning of the disease in patients with "classic" PNH (A) and in patients with bone marrow failure (B), detected using anti-CD59 and anti-CD55 on erythrocytes and anti-CD66b, anti-CD59 and anti-CD55 on granulocytes. Horizontal line marked median.

binuria występowała dwukrotnie rzadziej wśród chorych z niewydolnością szpiku niż wśród chorych z klasyczną formą choroby (23,6% versus 54%). Małopłytkowość stwierdzano u blisko 90% chorych z niewydolnością szpiku, a jedynie u 16% chorych z klasyczną formą NNH. Zakrzepy w obu grupach stwierdzano u około 20% chorych.

Mediana wielkości klonu z defektem NNH zarówno na erytrocytach, jak i na granulocytach była statystycznie istotnie wyższa ($p < 0,001$) u chorych z klasyczną formą NNH niż u chorych z niewydolnością szpiku (Ryc. 2). Zwraca uwagę fakt, że wśród chorych z klasyczną NNH wielkość klonu z defektem badana na granulocytach jest wyższa niż 20% – jedynie w dwóch przypadkach za pomocą jednego z przeciwciał (anty-CD59) wynik był $< 20\%$. W grupie chorych z niewydolnością szpiku wielkość klonu typu NNH na granulocytach układa się natomiast w bardzo szerokim zakresie; u blisko połowy z nich (przy badaniach przeciwciałem anti-CD66b i anti-CD55), a nawet ponad połowy z nich (badanie

przeciwciałem CD59) częstość komórek z defektem jest mniejsza niż 20%.

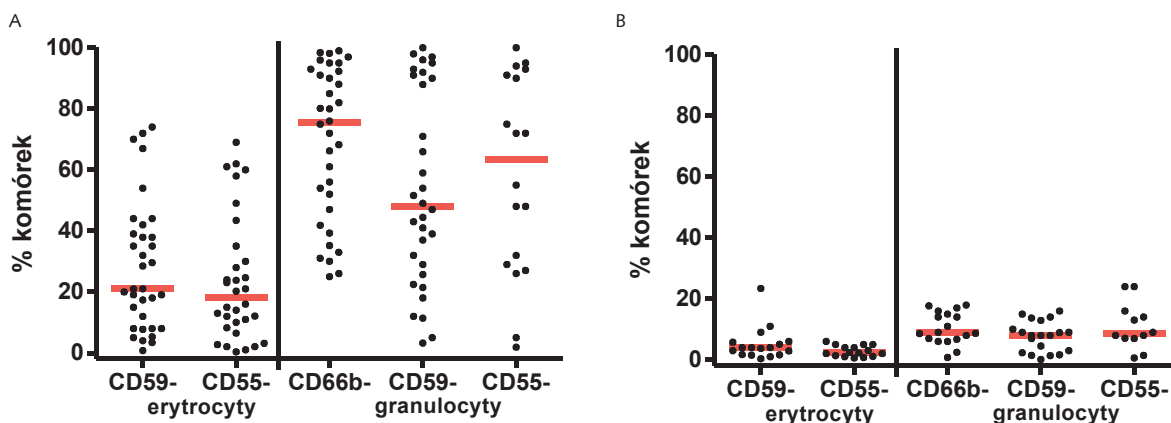
W tabeli III porównano dane kliniczne chorych z różnym odsetkiem komórek z klonem NNH na granulocytach (grupa 2a $> 20\%$ i grupa 2b $< 20\%$), a na rycinie 3. przedstawiono wielkość klonu NNH w momencie rozpoznania choroby badaną zarówno na erytrocytach, jak i granulocytach w tak podzielonych grupach. Częstość występowania hemolizy wewnątrznaczyniowej, hemoglobinurii, małopłytkowości i zakrzepów była zbliżona w obu grupach.

Wśród chorych, u których wielkość klonu badana za pomocą przeciwciał anti-CD66b na granulocytach była większa od 20% (grupa 2a), mediana wyników wynosiła 78%. Zastosowanie innych przeciwciał (anty-CD59 i anti-CD55) do oceny rozmiaru klonu typu NNH na granulocytach dało wyniki niższe – mediany wynosiły odpowiednio 48% i 63%. Przy badaniach tymi przeciwciałami u szeregu chorych odsetek granulocytów z defektem był więc niższy niż 20%. Mediana wyników badań klonu NNH na ery-

Tabela III. Dane kliniczne chorych z niewydolnością szpiku, u których wykryto $> 20\%$ (grupa 2a) lub $< 20\%$ granulocytów z defektem typu NNH (grupa 2b)

Table III. Clinical data of patients with bone marrow failure with $> 20\%$ (group 2a) or $< 20\%$ neutrophils with a PNH defect (group 2b)

	grupa 2a $> 20\%$		grupa 2b $< 20\%$	
	liczba	%	liczba	%
Chorzy	35	63,6	20	34,4
Hemoliza wewnątrznaczyniowa	34	94,4	14	73,3
Hemoglobinuria	9	25,0	4	21,1
Małopłytkowość ($< 100 \cdot 10^3 / \mu\text{l PLT}$)	27	75,0	19	100
Zakrzepy	6	16,7	3	15,8



Ryc. 3. Wielkość klonu typu NNH na początku choroby badana przy użyciu przeciwciał anti-CD59 i anti-CD55 na erytrocytach oraz przeciwciał anti-CD66b, anti-CD59 i anti-CD55 na granulocytach u chorych z różnym odsetkiem komórek z klonem typu NNH na granulocytach (grupa 2a >20% i grupa 2b <20%). Poziomą kreską oznaczono medianę.
Fig. 3. PNH type clone size at the beginning of the disease detected using anti-CD59 and anti-CD55 on erythrocytes and anti-CD66b, anti-CD59 and anti-CD55 on granulocytes in patients with varying percentage of PNH clone in granulocytes (group 2a >20% and group 2b <20%). Horizontal line marked median.

trocytach w tej grupie chorych (2a) była niższa niż 20% zarówno przy użyciu przeciwciał anti-CD59, jak i anti-CD55. Odsetek komórek z defektem na erytrocytach był niższy niż 20% u ponad połowy z nich.

W grupie chorych, u których na początku choroby wielkość klonu typu NNH badana za pomocą przeciwciała anti-CD66b na granulocytach była niższa od 20% (grupa 2b), przeciętny rozmiar klonu oceniany za pomocą anti-CD59 i anti-CD55 był zbliżony. Mediany wyników badań klonu typu NNH na erytrocytach były niższe niż na granulocytach, choć u jednego chorego wynik badania przeciwciałem anti-CD59 wynosił 25%.

U 8 spośród 18 chorych z grupy 2b (u których wielkość klonu typu NNH w czasie rozpoznania choroby była <20%) przeprowadzono badania ponownie. W badaniach tych wykazano wzrost odsetka komórek z defektem NNH (Tab. IV).

Omówienie

W prezentowanej pracy zajmowaliśmy się dwoma zagadnieniami – prezentacją głównych objawów klinicznych u chorych z wykrytym defektem kotwicy GPI oraz analizą wyników wielkości klonu typu NNH u tych chorych, w badaniach za pomocą różnych przeciwciał monoklonalnych na dwóch liniach komórek – erytrocytach i granulocytach.

Charakterystyka objawów klinicznych występujących u chorych, u których w trakcie 16 lat prowadzenia badań wykryto klon typu NNH, jest zbliżona do obserwowanej przez innych autorów. Badania prezentowanych przez nas chorych były szczegółowo omówione w poprzednio opublikowanych pracach [2–8]. U większości chorych, podobnie jak to wykazują inni autorzy, obserwowana jest wewnątrzmaczy-

Tabela IV. Rozwój klonu NNH u 8 pacjentów w grupie 2b (podano odsetek granulocytów CD66b ujemnych)

Table IV. In 8 patients, from group 2b, subsequent studies revealed an increase in the percentage of cells with defect

Pacjent	% granulocytów CD66b ujemnych		
	Badanie		okres
	pierwsze	ostatnie	
1	15,0	98,0	8 lat
2	6,0	72,0	6 lat
3	1,0	70,0	7 lat
4	18,0	97,0	2 lata
5	8,6	37,0	1 rok
6	8,7	37,1	1 rok
7	7,0	26,0	10 miesięcy
8	11,0	25,0	8 miesięcy

niowa hemoliza, która jest najczęstszym powodem skierowania chorego na badania w kierunku NNH [1]. Hemoglobinuria, która przez wiele lat uważana była za podstawowy objaw kliniczny NNH (stąd nazwa – nocna napadowa hemoglobinuria), obserwowana była u prezentowanych chorych jedynie w około 40% przypadków. Inni autorzy podają jeszcze rzadsze występowanie tego objawu u analizowanych chorych, np. według danych podawanych przez Parkera i wsp. nawet tylko 26% [9]. Te różnice mogą wynikać z innych, szerszych wskazań do kierowania na badania w kierunku NNH.

Należy też podkreślić, że hemoglobinuria może nie być zgłoszona przez chorego; może też pozostać

niezauważona przez personel medyczny w trakcie pobytu chorego w szpitalu. W około 50% przypadków prezentowanych w tej pracy chorych z wykrytym klonem typu NNH obserwowana była niewydolność szpiku. Na wykrywanie klonu typu NNH u takich chorych zwrócono w literaturze uwagę w momencie wprowadzenia nowoczesnej diagnostyki, opartej na technice cytofluorometrii [10]. Obserwacje kliniczne i ich korelacja z wynikami badań laboratoryjnych doprowadziły do wycofania się z podziału choroby na typ 1, 2 i 3, a zastąpienie jej podziałem na:

- klasyczną NNH – gdy istnieją laboratoryjne dowody na istnienie klonu z defektem NNH, lecz w której nie obserwuje się żadnych nieprawidłowości w funkcjonowaniu szpiku lub tylko hiperplazję linii erytroidalnej,
- NNH z dodatkową niewydolnością szpiku,
- przypadki trudne do zakwalifikowania, najrzadziej występujące, z bardzo niskim klonem NNH, bez hemoglobinurii, ale często z niewydolnością szpiku, czasami w przeszłości [9].

Taki podział kliniczny wprowadziliśmy w naszych poprzednich publikacjach. Praca Żupańskiej i wsp. [7] opisująca utajony defekt typu nocnej napadowej hemoglobinurii była jedną z pierwszych, która omawiała takie przypadki. Wiadomo od dawna, że klasyfikacja NNH jest bardzo trudna. Można stwierdzić, że czasami pacjenci mają „własną” NNH. Rozwój metod diagnostycznych, a także prowadzenie wielokrotnych oznaczeń klonu NNH u pacjentów może doprowadzić do uproszczenia klasyfikacji. Przykładem jest zastosowany przez nas w obecnej pracy podział pacjentów na dwie, a nie jak dotychczas na trzy grupy. W grupie z bardzo niskim klonem NNH <20% u ośmiu chorych klon NNH zwiększył się stopniowo do wartości powyżej 20%, co utwierdziło nas, że nie ma potrzeby, by chorzy ci byli zaklasyfikowani do dawnej grupy trzeciej. Podobną myśl związaną ze zmianami w trakcie rozwoju NNH w czasie prezentują zarówno Luzzatto i wsp. [17], jak i de Latour i wsp. [16].

Według danych z literatury, klon z defektem typu NNH może być wykryty nawet u 70% chorych z anemią aplastyczną. Odsetek komórek z defektem jest na ogół u tych chorych niewielki, w przeciwieństwie do chorych z klasyczną formą NNH [13, 14]. Analogiczne obserwacje co do wielkości klonu poczyniliśmy w naszych badaniach: u chorych z niewydolnością szpiku wielkość klonu w czasie rozpoznania choroby była statystycznie istotnie niższa niż wśród chorych z klasycznym NNH. Uważa się, że chorzy z zaburzeniami szpiku w początkowym okresie choroby, gdy klon NNH jest niewielki, mogą nie mieć typowych objawów NNH. Obserwacje takie potwierdzają się też wśród naszych chorych – w grupie chorych z niewydolnością szpiku częstość obserwowania hemoglobinurii była dwukrotnie niższa niż w grupie chorych z tzw.

klasyczną formą NNH. Dane literaturowe wskazują, że chorzy, u których wielkość klonu NNH jest niższa niż 10%, na ogół nie wymagają leczenia [15, 16]. Zaleca się jednak u nich monitorowanie wielkości klonu typu NNH co 6–12 miesięcy, ponieważ klon ten może się rozwinąć [16]. Nasze badania potwierdzają to zjawisko – wzrost odsetka komórek z defektem w kolejnym badaniu obserwowaliśmy u wszystkich 8 chorych, którzy byli badani ponownie. W literaturze opisywane są też przypadki samoistnego zanikania klonu NNH – uważa się, że ok. 15% pacjentów traci klon typu NNH [17]. W analizowanej w obecnej pracy grupie eliminacji klonu NNH obserwowano jedynie u chorych poddanych przeszczepieniu szpiku (wyniki nie przedstawione).

Incydenty zakrzepicy obserwowano w analizowanej przez nas grupie u 20% chorych. Występowały one ze zbliżoną częstością wśród chorych z klasyczną formą NNH i chorych z niewydolnością szpiku. W pracach innych autorów zakrzepicę obserwowano u około 40% chorych, choć są też nieliczne prace podające niższy odsetek chorych, u których ona występuje (7,2%) [12]. Wiadomo, że zakrzepy są główną przyczyną śmierci chorych z NNH i że chorzy ci powinni być odpowiednio leczeni lekami przeciwzakrzepowymi, a czasem trombolitycznymi, w zależności od lokalizacji zakrzepu. Takie leczenie jest u chorych z NNH [12] tylko częściowo skuteczne. Według Brodskiego oraz innych, lekiem wskazanym u takich chorych jest przeciwciało monoklonalne eculizumab [11, 18].

W naszej pracy prezentujemy wyniki oceny wielkości klonu NNH za pomocą techniki cytofluorometrii. Wyniki te potwierdzają wnioski innych autorów, że badanie granulocytów cechuje się większą czułością dla wykrywania klonu typu NNH niż badanie erytrocytów. Wartości odsetkowe komórek z defektem były statystycznie istotnie wyższe na granulocytach niż na erytrocytach. Największe znaczenie miało to dla diagnozowania klonu typu NNH w grupie chorych z niewydolnością szpiku. U połowy z nich wielkość klonu na granulocytach była niższa od 20%, a odsetek erytrocytów z defektem u większości tych chorych wynosił nie więcej niż 10. Obserwowane różnice czułości badań wynikają z tego, że erytrocyty z defektem kotwicy GPI u chorych z NNH mają skrócony czas przeżycia i są niszczone przez układ dopełniacza. Dodatkowo wyniki badań erytrocytów mogą być istotnie zaniżone z powodu obecności w krążeniu chorego erytrocytów pochodzących z przetoczonej krwi od dawców. Niemniej badanie klonu NNH na erytrocytach jest zalecane [19]. Pacjenci z dużym odsetkiem erytrocytów typu III mają ewidentną hemolizę, natomiast jeśli dominuje populacja typu II – hemoliza wykrywana jest metodami biochemicznymi, lecz może się zaostrzyć przy zwiększonej aktywacji dopełniacza (infekcja, itp). W naszych badaniach prowadziliśmy obserwacje nasilenia defektu, lecz w obecnej pracy

wyników tych nie analizujemy. Należy podkreślić, że badanie klonu typu NNH na granulocytach może być utrudnione lub niemożliwe u chorych z granulocytopenią. Jest ono możliwe do wykonania do 48 godzin od pobrania. Zarówno w naszym laboratorium, jak i w innych prowadzących diagnostykę NNH prowadzi się badania na obu liniach komórek.

Wybór przeciwciał monoklonalnych do analizy białek połączonych z GPI podlegał zmianom. Przeciwciała skierowane do CD55 i CD59 wykorzystywane były przez wielu autorów zarówno do badań erytrocytów, jak i granulocytów. Stosowaliśmy je też w naszych badaniach i potwierdziliśmy, że do analiz erytrocytów CD59 jest lepszym markerem niż CD55. Badanie tych białek na granulocytach cechuje się jednak znacząco niższą czułością niż białka CD66b, które obecnie jest zaleca i stosowane przez nas [19]. Należy podkreślić, że analiza klonu NNH musi zawsze odbywać się za pomocą przeciwciał monoklonalnych skierowanych do przynajmniej dwóch różnych białek połączonych za pomocą kotwicy GPI, by ustrzec się wyników fałszywie ujemnych w przypadkach wrodzonych defektów obserwowanych u niektórych ludzi.

Ograniczenia związane z badaniami z użyciem przeciwciał monoklonalnych znosi badanie za pomocą odczynnika FLAER [20–22] (*fluorescent-labeled inactive toxin aerolysin*). Dzięki niemu identyfikujemy na komórce kotwicę GPI, a nie połączone z nią białka. Ten bezpośredni charakter badania sprawia, że jest ono wysoko czułe, coraz więc powszechniej stosuje się i zaleca je w rekomendacjach [19]. Wykonane w naszym laboratorium wstępne badania potwierdzają jego wysoką czułość i użyteczność. Badanie to można wykonać na granulocytach i monocytach, erytrocyty należy badać nadal za pomocą anti-CD59.

Przedstawione powyżej podsumowanie badań diagnostycznych NNH pozwala na oszacowanie częstości rozpoznawania tego schorzenia w Polsce. Z naszych danych wynika, że jest wysoce prawdopodobne, iż większość chorych z Polski jest diagnozowana w naszym laboratorium, ze względu na jego wieloletnie doświadczenie. W ciągu 16 lat klon NNH wykryto u 105 chorych, co daje liczbę 6,6/rok/38 mln mieszkańców. Według światowych szacunków, częstość NNH wynosi 1,3/rok/milion. W Polsce nowych przypadków powinno być więc około 38 rocznie. Wskazuje to na duże niedodiagnozowanie NNH w naszym kraju. Istotne jest upowszechnienie wiedzy na temat tego schorzenia i częstsze kierowanie chorych na badania. Głównym wskazaniem do badań jest: 1) niedokrwistość hemolityczna u osób z ujemnym odczynem Coombsa, 2) hemoliza wewnątrznaczyniowa, zwłaszcza z hemoglobinurią, 3) niedobory żelaza bez wyraźnych przyczyn, 4) niedokrwistość aplastyczna lub hypoplastyczna, 5) niewyjaśniona cytopenia, mielodysplazja, 6) niewyjaśnione zakrzepy, zespół Budd-Chiari.

Należy też zaznaczyć, że badania u chorych, u których są kliniczne przesłanki do podejrzeń występowania klonu NNH, powinny być powtarzane. W literaturze podkreśla się, że w pierwszym badaniu klon może nie być wykryty, a pojawia się w badaniach następnych. Hochsmann i Rojewski wykonali ponowne badania u 480 chorych, u których nie wykryto klonu NNH, i u 47 z nich (10%) wyniki były dodatnie i pozwoliły na ustalenie rozpoznania NNH [23]. Konieczne jest też systematyczne badanie pacjentów z raz rozpoznany klonem typu NNH, szczególnie prowadzenie badań kolejno pobranych próbek u chorych z niskim klonem NNH, co wykazują nasze badania. Odpowiednio wczesna diagnoza pozwala na zastosowanie leczenia, które jest obecnie dostępne.

Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania wszystkim lekarzom, którzy w ciągu 16 lat kierowali do naszego laboratorium chorych na badania umożliwiające rozpoznanie NNH. Uzyskane wyniki i udostępnione nam dane kliniczne umożliwiły powstanie tego opracowania.

Dziękujemy mgr. Pawłowi Turowskiemu za dokonanie analizy statystycznej i wykonanie rycin prezentowanych w pracy.

Piśmiennictwo

1. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;93–103.
2. Bogdanik I, Pyl H, Zupańska B, Robak T. Badania defektu erytrocytów i granulocytów chorych z napadową nocną hemoglobinurią przy użyciu fluorocytometrii przepływowej. *Acta Haematol Polonica* 1998;29:69–72.
3. Zupańska B, Uhrzynowska M, Konopka L. Transfusion-related acute lung injury due to granulocyte-agglutinating antibody in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 1999;39:944–947.
4. Zupańska B, Bogdanik I, Fabijańska-Mitek J, Pyl H. Autoimmune haemolytic anaemia with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-like defect. *Eur J Haematol* 1999;62:346–349.
5. Żupańska B, Bogdanik I, Pyl H. A gel microtyping system for diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Immunohematology* 2002;18:9–12.
6. Zupańska B, Konopka L, Robak T, Dwilewicz-Trojaczek J, Bogdanik I, Pyl H. Nocna napadowa hemoglobinuria – analiza 27 chorych. *Acta Haematol Polonica* 2002;33:361–369.
7. Zupańska B, Konopka L, Bogdanik I, Pyl H. Utajony defekt typu nocnej napadowej hemoglobinurii. *Acta Haematol Polonica* 2005;36:207–214.
8. Zupańska B: Nocna Napadowa Hemoglobinuria – analiza kliniczna i diagnostyczna. *Acta Haematol Polonica* 2009;40 (supl):6–11.

9. Parker C, Omine M, Richards S, et al. International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005;106:3699–709.
10. Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndromes: clonal expansion of PIG-A-mutant hematopoietic cells in bone marrow failure. *Haematologica* 2009;94:3–7.
11. Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a personal view. *Br J Haematol*. 2011;153:709–20.
12. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease sub-categories. *Blood* 2008;112:3099–106.
13. Mukhina GL, Buckley JT, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor deficient hematopoiesis in untreated aplastic anemia. *Br J Haematol* 2001;115:476–482.
14. Maciejewski JP, Rivera C, Kook H, Dunn D, Young NS. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* 2001;115:1015–22.
15. Brodsky Robert A. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009;113:6522–6527.
16. Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, et al. Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 2009;147:102–12.
17. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *New Engl J Med* 1995;333:1253–1258.
18. Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008;116–23.
19. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:211–30.
20. Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. Improved detection and characterization of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000;114:459–66.
21. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, et al. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol* 2009;132:564–72.
22. Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, et al. Diagnosing PNH with FLAER and multiparameter flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72:167–77.
23. Hochsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. *Ann Hematol* 2011;90:887–99.