

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей и взрослых: сравнительный клинический профиль и долгосрочный прогноз

А.Д. Кулагин, О.У. Климова, А.В. Добронравов, Т.А. Рудакова, И.К. Голубовская, А.В. Лапина, М.О. Иванова, А.Г. Смирнова, Т.А. Быкова, В.Н. Овечкина, А.А. Осипова, Е.В. Бабенко, Т.Л. Гиндина, В.В. Байков, Л.С. Зубаровская, В.А. Добронравов, Б.В. Афанасьев

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Минздрава России, НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой, Санкт-Петербург, Россия

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) у детей – крайне редкое, недостаточно изученное заболевание. Распространена точка зрения о превалировании в детском возрасте вариантов ПНГ с выраженной костномозговой недостаточностью, менее интенсивным гемолизом, меньшей частотой развития тромбозов и органных нарушений. В нашем исследовании дана сравнительная клинико-лабораторная характеристика и определен долгосрочный прогноз ПНГ, дебютировавшей у детей и взрослых. В ретроспективное и проспективное исследования включали пациентов с активной гемолитической ПНГ, верифицированной по результатам проточной цитометрии (клон ПНГ > 10% среди гранулоцитов), клиническими и лабораторными данными (уровень лактатдегидрогеназы выше 1,5 верхней границы нормы). Выделяли классическую ПНГ (кПНГ) и форму, развившуюся у пациентов с доказанной апластической анемией (АА/ПНГ). Проведен детальный анализ клинической манифестации, первичных диагнозов, осложнений и общей выживаемости в зависимости от возраста дебюта заболевания (до и после 18 лет). На август 2018 года в исследование включено 355 больных (56% – женщины и 44% – мужчины) с кПНГ (49%) и АА/ПНГ (51%). Медиана возраста на момент дебюта и установления диагноза – 27 (от 5 до 80) и 30 (от 7 до 80) лет соответственно. Медиана размера клона ПНГ среди гранулоцитов и эритроцитов – 92 и 33% соответственно; уровня ЛДГ – 5,5 верхней границы нормы. Дебют гемолитической ПНГ документирован в детском возрасте у 51 (14%) пациента, с одинаковой частотой кПНГ ($n = 27$; 16%) и АА/ПНГ ($n = 24$; 13%) ($p = 0,549$). Диагнозы кПНГ и АА/ПНГ установлены в детском возрасте у 9 (5%) и 21 (12%) пациента соответственно. В 81% случаев кПНГ, дебютировавшей у детей, первично был установлен ошибочный диагноз; медиана времени до установления диагноза кПНГ – 52 (от 4 до 426) месяца. При дебюте ПНГ у детей и взрослых размер клона ПНГ (медиана – 93 и 91% соответственно; $p = 0,321$) и интенсивность гемолиза по уровню ЛДГ (медиана – 4,95 и 5,76 верхней границы нормы; $p = 0,690$) не отличались. Частота отдельных симптомов гемолиза в дебюте заболевания коррелировала с размером клона и была выше при кПНГ по сравнению с АА/ПНГ, но не зависела от возраста на момент дебюта: слабость – у 98% детей и 96% взрослых; гемоглобинурия – у 51 и 55%; боли – у 39 и 45%; желтуха – у 46 и 52%, дисфагия – у 21 и 28% соответственно. Возраст дебюта ПНГ не влиял на частоту ранних (до установления диагноза «ПНГ») тромбозов (8 и 13%; $p = 0,482$) и эпизодов острого повреждения почек (ОПП) (10 и 9%; $p = 0,788$). При длительном наблюдении прослеживается тенденция к более высокой кумулятивной частоте тромбозов при дебюте ПНГ у взрослых: 5 лет – 21 и 12%; 10 лет – 33 и 19%, однако в более отдаленном периоде эти различия нивелируются ($p = 0,151$). Кумулятивная частота ОПП оказалась сопоставимой при дебюте ПНГ у детей и взрослых: 5 лет – 16 и 20% соответственно; 10 лет – 23 и 22% ($p = 0,500$). Частота зависимости от трансфузий, формирования хронической болезни почек и легочной гипертензии, общая выживаемость также не зависели от возраста дебюта заболевания. Результаты исследования крупной когорты пациентов с активной гемолитической ПНГ свидетельствуют об отсутствии существенных различий в клиническом профиле и отдаленном прогнозе у детей и взрослых. Превалирование варианта АА/ПНГ у детей связано с ошибками диагностики и поздним распознаванием кПНГ.

Ключевые слова: пароксизмальная ночная гемоглобинурия, апластическая анемия, дети, взрослые, клиническая манифестация, прогноз

Кулагин А.Д. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2018; 17 (3): 11–21.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21

Контактная информация:

Кулагин Александр Дмитриевич, доктор мед. наук, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова Минздрава России. Адрес: 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6/8
E-mail: kulagingem@rambler.ru

© 2018 by NMRC PHOI

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in children and adults: comparative clinical profile and long-term prognosis

Correspondence:
Alexander D. Kulagin, Dsci, Professor,
Chair of Hematology, Transfusiology
and Transplantation, Pavlov First
Saint Petersburg State
Medical University,
Address: Russia, 197022,
St. Petersburg, L'va Tolstogo str., 6/8
E-mail: kulagingem@rambler.ru

A.D. Kulagin, O.U. Klimova, A.V. Dobronravov, T.A. Rudakova, I.K. Golubovskaya, A.V. Lapina, M.O. Ivanova, A.G. Smirnova, T.A. Bykova, V.N. Ovechkina, A.A. Osipova, E.V. Babenko, T.L. Gindina, V.V. Baykov, L.S. Zubarovskaya, V.A. Dobronravov, B.V. Afanasyev

Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute for Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, St. Petersburg, Russian Federation

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an extremely rare and still poorly understood disease in children. It is generally accepted that PNH in children is characterized by severe bone marrow failure, less intensive hemolysis, and less often complicated by thrombosis and organ dysfunction. Aim: to compare the clinical and laboratory characteristics and to determine the long-term prognosis of PNH with disease onset in children and adults. Retrospective and prospective study included patients with active hemolytic PNH, defined by flow cytometry results (clone more than 10% in granulocytes), clinical and laboratory criteria (lactate dehydrogenase (LDH) level above 1.5 of the upper limit of normal (ULN)). The classical PNH and aplastic anemia/PNH (AA/PNH) were studied. A detailed analysis of clinical manifestations, primary diagnoses, complications and overall survival was performed depending on the age of PNH onset (before and after age 18 years). As of August 2018, 355 patients were included in the study (56% female, 44% male) with classic form (49%) and AA/PNH (51%). The median age at the PNH onset and the diagnosis was 27 (5–80) and 30 years (7–80), respectively. The median PNH clone size in granulocytes and red blood cells was 92% and 33%, respectively, and the LDH level of 5.5 ULN. Hemolytic PNH onset during childhood was in 51 patients (14%) with the same frequency of classical form ($n = 27$; 16%) and AA/PNH ($n = 24$, 13%) ($p = 0.549$). The diagnosis of classical form and AA/PNH was confirmed in childhood in 9 (5%) and 21 (12%) patients respectively. In 81% of classical PNH presenting in children, a misdiagnosis was initially established, and the median time before precise diagnosis was 52 months (4–426). The PNH clone size (median 93% vs 91%, $p = 0.321$) and hemolysis intensity according to LDH level (median 4.95 vs. 5.76 ULN, $p = 0.690$) did not differ in children and adults. The frequency of hemolysis symptoms in the onset of the disease correlated with the clone size and was higher in classical PNH compared with AA/PNH, but did not depend on onset age: weakness (98% in children vs. 96% in adults), hemoglobinuria (51% vs 55%), pain (39% vs 45%), jaundice (46% vs 52%), dysphagia (21% vs 28%). The age of PNH onset did not influence the frequency of early (before the diagnosis of PNH) thrombosis (8% vs 13%, $p = 0.482$) and episodes of acute kidney injury (AKI, 10% vs 9%, $p = 0.788$). With prolonged follow-up, there is a tendency towards a higher cumulative incidence of thromboses in adults: 5 years 21% vs 12%, 10 years 33% vs 19%, however in the more distant period these differences become insignificant ($p = 0.151$). The cumulative incidence of AKI was similar in children and adults: 5 years 16% vs 20%, 10 years 23% vs 22%, respectively ($p = 0.500$). The frequency of transfusion dependence, the development of chronic kidney disease and pulmonary hypertension and overall survival were also independent of the PNH onset age. The results of the study in the large cohort of patients indicate the similar clinical profile and a long-term prognosis of active hemolytic PNH in children and adults. Diagnostic errors and late recognition of classical PNH lead to the relative prevalence of AA/PNH in children.

Key words: *paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, children, adults, clinical manifestation, prognosis*

Kulagin A.D., et al. *Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology*, 2018; 17 (3): 11–21.
DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21

Диагностика и лечение пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ) представляют трудности в клинической практике. Внутри-сосудистый гемолиз разной степени выраженности, тромбозы, органные нарушения и костномозговая недостаточность создают динамически изменяющийся уникальный клинический профиль каждого пациента [1]. Накопленные данные крупных исследований, в том числе в России, суммированы в текущих рекомендациях по диагностике и лечению ПНГ [2]. Тем не менее осведомленность врачей о ПНГ остается недостаточной, что обуславливает высокую частоту ошибок диагностики и терапевтической тактики, в особенности это касается уникальных клинических ситуаций, к которым относится ПНГ в детском и подростковом возрасте [3].

В литературе на основании анализа небольших когорт и данных Международного регистра ПНГ постулируется ряд особенностей ПНГ у детей: превалирование ПНГ, связанной с апластической анемией (АА/ПНГ), меньший размер клона, менее выраженный гемолиз и редкое развитие тромбозов [4–6]. Исследование когорты взрослых пациентов с активной гемолитической ПНГ показало нередкий дебют классической формы заболевания в детском возрасте и позднее установление диагноза во взрослой

практике [7, 8]. Кроме этого, большинство больных с АА развивают активную гемолитическую ПНГ уже во взрослом возрасте. Все это ставит под сомнение как таковые особенности ПНГ у детей и требует изучения клинико-лабораторных проявлений при длительном наблюдении.

В настоящем крупном когортном исследовании проведен сравнительный анализ особенностей клинической манифестации, сроков установления диагноза, размера клона, интенсивности гемолиза, тромботических и органных осложнений и отдаленный прогноз активной гемолитической ПНГ, дебютировавшей у детей и взрослых.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на базе НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова в кооперации с гематологическими отделениями и центрами 75 регионов России, а также республик Беларусь, Казахстан, Кыргызстан, Украина и Таджикистан.

В ретроспективный (диагноз установлен до 2010 года включительно) и проспективный анализ (2011–

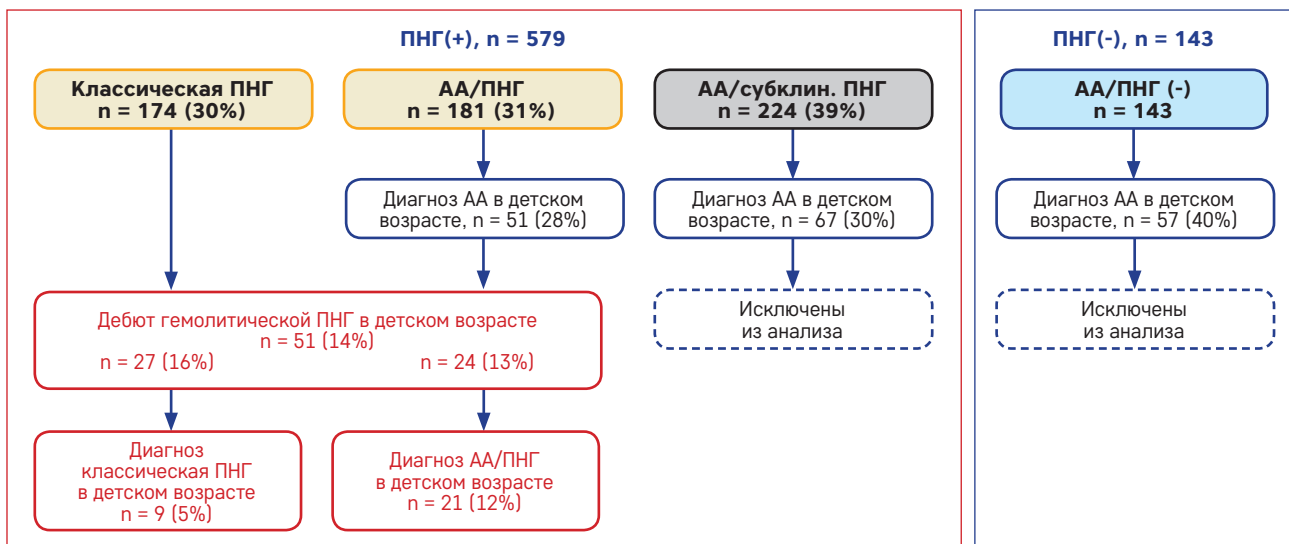
2018 годы) включали пациентов с доказанной ПНГ и активным внутрисосудистым гемолизом по следующим критериям: клон ПНГ > 10% среди гранулоцитов; уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) выше 1,5 верхней границы нормы (ВГН) или в пределах 1–1,5 ВГН при превалировании клеток II типа и наличии симптомов или осложнений гемолиза. Форму ПНГ классифицировали согласно принятой номенклатуре с выделением классической формы и ПНГ при доказанной АА [9]. Пациентов с субклинической ПНГ/АА не включали в исследование.

Подтверждение наличия и оценку размера клона ПНГ проводили методом проточной цитометрии с анализом экспрессии GPI-якоря (FLAER) на гранулоцитах, моноцитах и GPI-связанных белков на эритроцитах (CD59), гранулоцитах (CD24) и моноцитах (CD14) согласно опубликованному унифицированному протоколу [10].

Детальный анализ клинической манифестации заболевания проводился по ранее описанному алгоритму [7]. Документировали симптомы внутрисосудистого гемолиза, осложнения, включая манифестные тромбозы, эпизоды критерияльного острого повреждения почек (ОПП) [11], хроническую болезнь почек (ХБП), легочную гипертензию, зависимость от трансфузий эритроцитов, предшествующие диагнозы и варианты лечения. Дебютом ПНГ считали анамнестическую и/или документированную дату возникновения первых клинических и лабораторных симптомов, связанных с внутрисосудистым гемолизом. Верификация диагноза ПНГ определялась датой первого тестирования клона при классической форме или первого тестирования с размером клона более 10% и наличием признаков гемолиза при АА. Соответственно проводили стратификацию больных по возрасту (младше и старше 18 лет) на момент дебюта и установления диагноза ПНГ.

Рисунок 1

База данных АА и ПНГ ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова на 15.08.2018 (n = 722)



Анализ результатов проведен на 15 августа 2018 года. Описательные характеристики включали пропорции, медианы, минимальные и максимальные значения, межквартильные размахи (МКР), 95%-е доверительные интервалы (ДИ). Различия между анализируемыми группами оценивали с помощью точного теста Фишера и U-критерия Манна–Уитни для категориальных и количественных характеристик соответственно. Кумулятивную частоту развития тромбозов и ОПП рассчитывали с использованием метода конкурирующих рисков [12]. В качестве конкурирующих рисков были приняты смерть до события от других причин и аллогенная трансплантация костного мозга (ТКМ). Пациенты, получавшие терапию экулизумабом, были цензурированы датой начала лечения. Общую выживаемость оценивали по методу Каплана–Майера. При сравнении выживаемости между группами использовали логранговый критерий.

Тестирование альтернативной гипотезы было двусторонним, статистически значимым при $p < 0,05$. Статистический анализ проводили с использованием пакетов STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США), NCSS 2007 (Kaysville, UT, США) и R, версия 2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика когорты. На 15.08.2018 в базе данных Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова Минздрава России (далее – ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова) состояло 756 больных с иммуноопосредованными синдромами костномозговой недостаточности, в том числе 722 – с известным статусом наличия или отсутствия клона ПНГ (рисунком 1).

После исключения пациентов с ПНГ(-) АА и субклинической ПНГ в исследование включили 355

Таблица 1
Характеристика пациентов с ПНГ (n = 355)

Характеристика		Значение
Больные, n (%)		355 (100)
Пол, n (%)	мужчины	155 (44)
	женщины	200 (56)
Форма ПНГ, n (%)	классическая	174 (49)
	АА/ПНГ	181 (51)
Возраст, лет, медиана (диапазон)	на момент дебюта ПНГ	27,3 (5,2–80,3)
	на момент диагноза ПНГ	30,0 (7,3–80,3)
Год установления диагноза, n (%)	до 2000	24 (7)
	2000–2010	98 (27)
	2011–2018 (проспективная фаза)	233 (66)
Интервал «дебют – диагноз ПНГ», мес., медиана (диапазон)		32,3 (0–455) ¹
Интервал «диагноз АА – диагноз ПНГ», мес., медиана (диапазон)		35,5 (-20–361) ²
Время с момента установления диагноза, лет медиана (диапазон)		5,1 (0,05–41)

¹ Расчет для пациентов с классической ПНГ (n = 174).

² Расчет для пациентов с АА/ПНГ (n = 181).

Таблица 2
Размер клона ПНГ и уровень ЛДГ (n = 355)

Показатель	Значение		
	медиана	диапазон	межквартильный размах
Эритроциты II тип, %	4,12	0,00–95,53	1,00–12,98
Эритроциты III тип, %	21,53	0,00–98,60	8,70–37,90
Суммарный размер клона в эритроцитах (II + III тип), %	32,68	0,01–99,20	15,40–54,50
Гранулоциты, CD15+CD24-FLAER-, %	91,65	10,49–99,83	73,92–97,24
Моноциты, CD64+FLAER-CD14-, %	90,84	9,10–99,90	73,13–96,80
Лактатдегидрогеназа, × ВГН	5,52	1,10–24,74	3,03–8,74

больных с активной гемолитической ПНГ, в том числе с классической формой (кПНГ) – 174 (49%) и с АА/ПНГ – 181 (51%) (таблица 1).

Возраст дебюта ПНГ варьировал от 5 до 80 лет (медиана – 27 лет), при этом верификация диагноза происходила в более старшем возрасте (медиана – 30 лет). В основном это касалось пациентов с классической ПНГ, сроки установления диагноза которой

варьировали от 0 до 455 мес. (медиана – 32 мес.). В большинстве же случаев АА/ПНГ, при соблюдении протокола динамического контроля размера клона и интенсивности гемолиза, дебют и диагноз гемолитической ПНГ документировали одновременно при констатации принятых критериев (клон > 10% и уровень ЛДГ > 1,5 ВГН). Медиана времени от постановки диагноза АА до развития ПНГ составила 36 мес., при этом в ряде случаев проявления гемолиза предшествовали или документировались одновременно с диагнозом АА.

Характеристика клона ПНГ представлена в таблице 2. Медиана размера клона составляла 92% среди гранулоцитов и 91% – среди моноцитов и была ожидаемо меньше среди эритроцитов (33%) вследствие избирательного гемолиза и эффекта разведения при трансфузиях донорских эритроцитов.

Все пациенты имели выраженный внутрисосудистый гемолиз, ключевым лабораторным маркером которого был уровень ЛДГ с медианой, превышающей 5 ВГН. Лишь у 5 больных с АА/ПНГ уровень ЛДГ был в пределах 1,1–1,5 ВГН. Эти пациенты имели большой клон с превалированием клеток II типа и были включены в анализ в связи с наличием симптомов и осложнений ПНГ.

Анализируемая когорта представляется репрезентативной в связи с большим количеством наблюдений, преимущественным формированием в проспективной фазе исследования (66%), устойчивым соотношением кПНГ и АА/ПНГ, близким к 1:1 в течение последних 5 лет, достаточной длительностью наблюдения после установления диагноза ПНГ (медиана – 5,1 года) и смешанным возрастным составом, позволяющим анализировать особенности ПНГ у детей.

Характеристика ПНГ, дебютировавшей у детей и взрослых. Дебют активной гемолитической ПНГ в возрасте до 18 лет имел место у 51 пациента (14% всей когорты), с одинаковой частотой при классической форме (27/174; 16%) и АА/ПНГ (24/171; 13%) ($p = 0,549$) (рисунки 1). При этом диагноз кПНГ в детском возрасте был верифицирован только у 9 (5%) больных, а в остальных 18 случаях это произошло во взрослой практике; медиана – 17 лет (7–48 лет). Частично это объясняется тем, что первые клинические проявления кПНГ в 15 из 27 случаев приходились на возраст от 16 до 18 лет; медиана – 16,8 года (5–18 лет) (рисунки 2).

Весьма показательным в этом аспекте наблюдение № 6: у девочки в возрасте 13 лет были впервые документированы изолированная анемия (гемоглобин – 80 г/л), минимальная желтушность и эпизоды выделения темной мочи. В дальнейшем до возраста 46 лет превалировал анемический синдром с редкими эпизодами гемоглобинурии, который трактовали как

Рисунок 2

Классическая ПНГ, дебютировавшая у детей (n = 27)

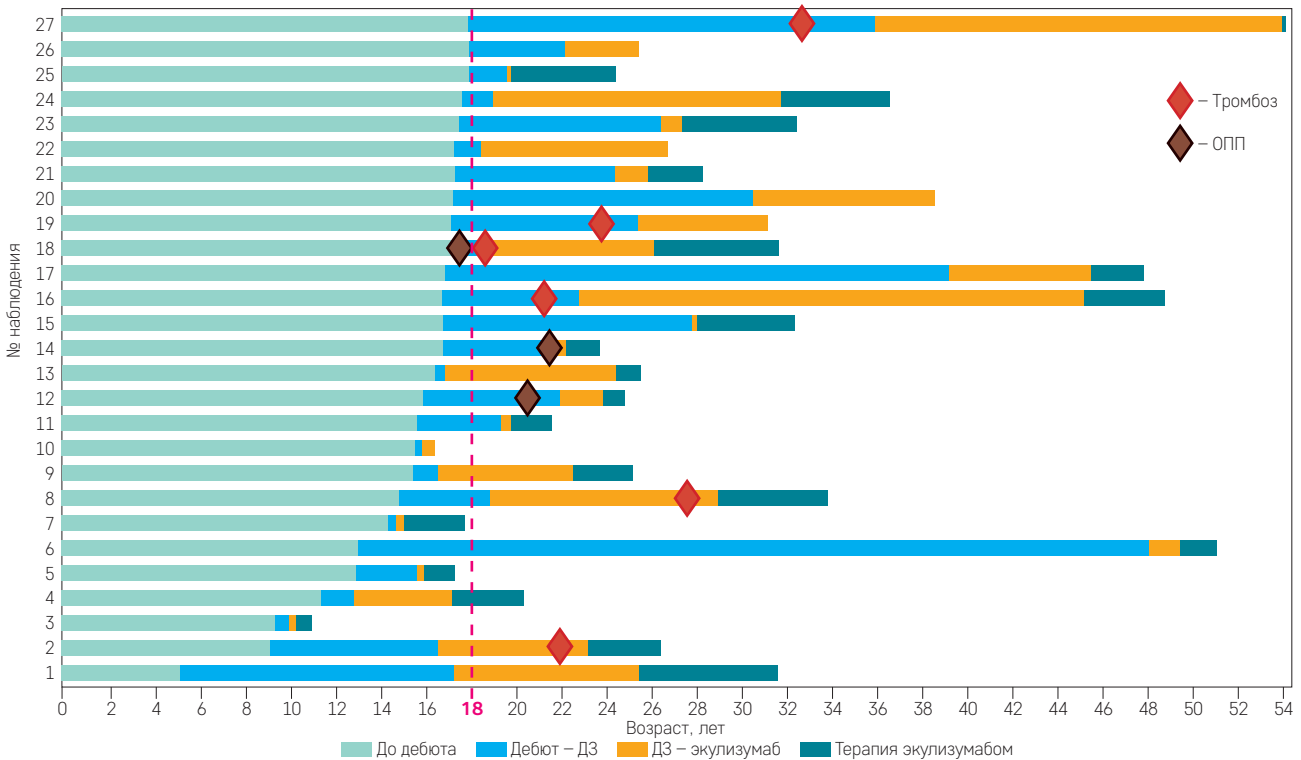


Таблица 3

Первичный диагноз при классической ПНГ, дебютировавшей у детей

Первичный диагноз	n (%)
ПНГ	5 (19)
Ошибочный диагноз	22 (81)
АИГА	3
АИГА, ЖДА	1
АИГА, В12-ДА	1
Гемолитическая анемия неуточненная	1
СКВ, вторичный антифосфолипидный синдром	1
ИТП	3
МДС	3
Гипопластическая анемия	1
Цитопения неуточненная	1
ЖДА	1
ЖДА, В12-ДА, «гемолитический компонент»	1
ЖДА, болезнь Виллебранда	1
Гепатит	1
Гепатит, ЖДА	1
Гепатит, синдром Жильбера, ЖДА	1
Не уточнен	1

Примечание: АИГА – аутоиммунная гемолитическая анемия; ЖДА – железодефицитная анемия; В12-ДА – витамин В12-дефицитная анемия; СКВ – системная красная волчанка; ИТП – иммунная тромбоцитопения; МДС – миелодиспластический синдром.

рефрактерное железодефицитное состояние, без потребности в трансфузиях эритроцитов, документированных манифестных тромбозов и ОПП. В возрасте 46 лет течение заболевания стало более тяжелым: развиваются повторные гемолитические кризы с наличием абдоминальных болей и эпизодов выраженной дисфагии, углубляется анемия (гемоглобин – 60–40 г/л) с постоянной зависимостью от трансфузий, выявляется минимальная тромбоцитопения и нейтропения, и только через 2 года, в возрасте 48 лет, во время очередного тяжелого гемолитического криза у пациентки заподозрена и верифицирована классическая ПНГ с размером клона 94%.

В противоположность этому распознавание ПНГ в контексте АА в детском возрасте происходило намного эффективнее (у 21 из 24 пациентов), только в 3 случаях диагноз был установлен во взрослом возрасте. Таким образом, в отличие от дебюта, формальный диагноз активной гемолитической ПНГ в возрасте до 18 лет был верифицирован только у 30 больных (8% всей когорты), и в этой группе отчетливо преобладали больные с АА/ПНГ (n = 21; 70%) по сравнению с классической формой (n = 9; 30%).

У 22 (81%) из 27 детей с кПНГ первично был установлен ошибочный гематологический или иной диагноз (таблица 3). Медиана времени до установления диагноза кПНГ составила 52 мес. (3,6–426 мес.). Высокая частота диагностических ошибок и длительный период до прецизионного диагноза кПНГ приводили к неадекватным терапевтическим интервенциям

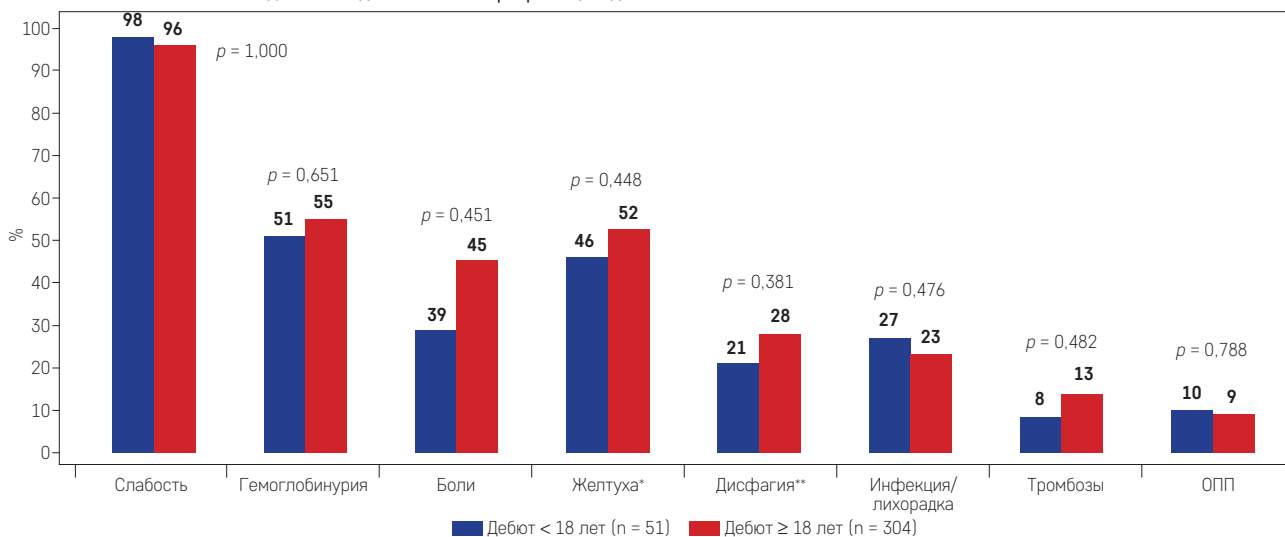
Таблица 4

Характеристика клона ПНГ и интенсивности внутрисосудистого гемолиза на момент последнего тестирования в зависимости от возраста дебюта заболевания

Показатель	≤ 18 лет (n = 51) Медиана (диапазон)	> 18 лет (n = 304) Медиана (диапазон)	<i>p</i>
Эритроциты II тип, %	3,96 (0,00–47,14)	4,21 (0,00–95,53)	0,2820
Эритроциты III тип, %	23,60 (0,17–91,40)	21,00 (0,00–98,60)	0,9186
Суммарный размер клона в эритроцитах (II + III тип), %	26,29 (0,24–98,80)	34,00 (0,01–99,20)	0,1843
Гранулоциты, CD15+CD24-FLAER-, %	93,20 (11,85–99,70)	91,46 (10,49–99,83)	0,3210
Моноциты, CD64+ CD14-FLAER-, %	94,60 (18,94–99,71)	90,73 (9,10–99,90)	0,4574
Лактатдегидрогеназа, × ВГН	4,95 (1,34–16,54)	5,76 (1,10–24,74)	0,6897

Рисунок 3

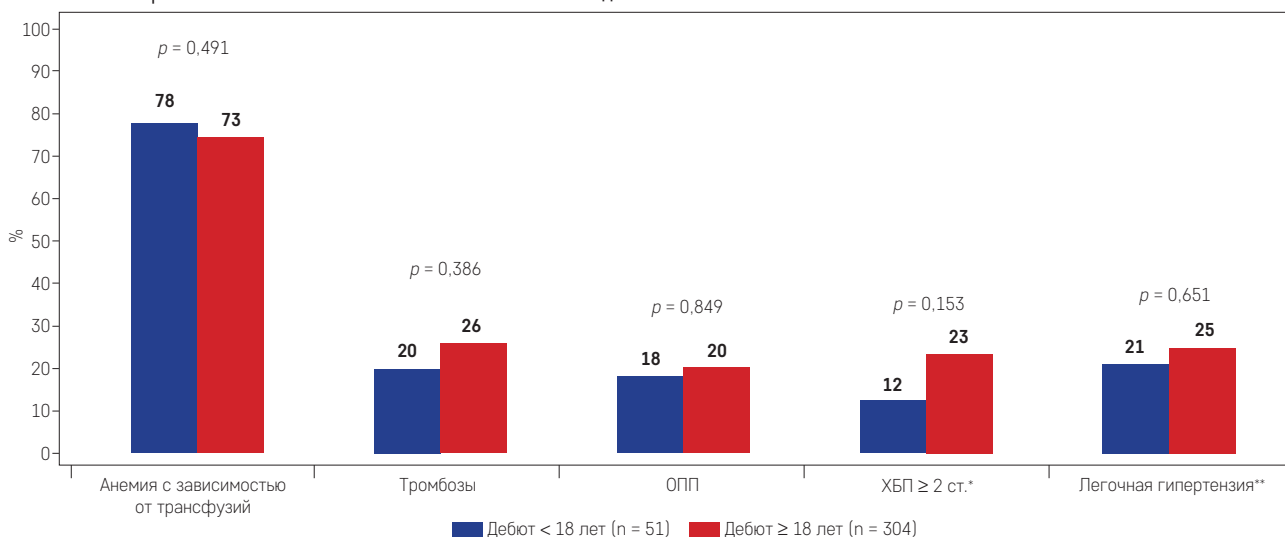
Симптомы и осложнения в дебюте и до момента верификации диагноза ПНГ



Примечание: ОПП – острое повреждение почек; * оценено у 346 больных; ** оценено у 338 больных.

Рисунок 4

Клинические проявления и осложнения ПНГ на момент последнего контакта



Примечание: ОПП – острое повреждение почек; ХБП – хроническая болезнь почек; * оценено у 305 больных; ** оценено у 266 больных

как в педиатрической практике, так и в дальнейшем, во взрослой гематологической службе: спленэктомии ($n = 6$), хронической терапии глюкокортикостероидными гормонами ($n = 15$) и иммуносупрессивной терапии с включением ритуксимаба, азатиоприна и гидроксихлорохина ($n = 4$).

Размер клона ПНГ на момент его последнего тестирования не отличался в зависимости от возраста дебюта заболевания (медиана $> 90\%$ при тестировании гранулоцитов и моноцитов) (таблица 4). Соответственно интенсивность внутрисосудистого гемолиза до начала таргетной терапии, определяемая по повышению уровня ЛДГ относительно ВГН, также была сопоставимой.

Спектр и частота клинических проявлений и осложнений как при манифестации, так и при длительном наблюдении существенно не отличались в зависимости от возраста на момент дебюта гемолитической ПНГ (рисунки 3, 4).

В дебюте заболевания дети, как и взрослые пациенты, развивали слабость (98%), эпизоды гемоглобинурии (51%), боли, преимущественно в животе (39%), желтушность кожных покровов и слизистых (46%), эпизоды дисфагии (21%). В 27% случаев яркие клинические проявления ПНГ у детей были спровоцированы инфекционным эпизодом или включали стереотипную лихорадку как симптом интенсивного гемолиза. Наблюдалась тенденция к меньшей частоте ранних тромботических осложнений у детей (8% против 13% у взрослых), тогда как частота эпизодов ОПП до или на момент установления диагноза была идентичной (10 и 9%).

В дебюте заболевания вне зависимости от возраста частота отдельных симптомов, связанных с интенсивностью внутрисосудистого гемолиза, зависела от размера клона ПНГ и, за исключением желтухи, была выше при классической форме заболевания по сравнению с АА/ПНГ: слабость – 99 и 94% ($p = 0,036$);

гемоглобинурия – 61 и 47% ($p = 0,008$); боли – 52 и 36% ($p = 0,003$); желтуха – 51 и 52% ($p = 0,914$); дисфагия – 34 и 20% ($p = 0,005$) соответственно.

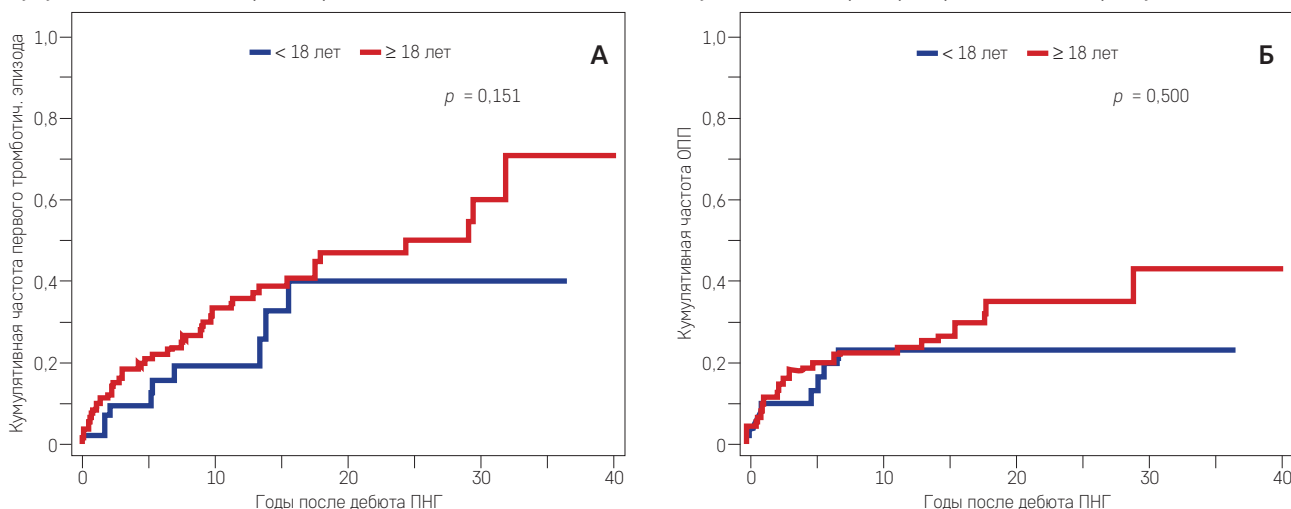
Наряду с оценкой клинической манифестации в дебюте ПНГ у детей и взрослых был проведен анализ результатов длительного наблюдения. В целом сформированные когорты достоверно не отличались по частоте ключевых клинических проблем, определяющих тяжесть и прогноз ПНГ (рисунок 4). При этом сохранялась тенденция к меньшей частоте развития тромбозов у пациентов с дебютом заболевания в детстве (20 против 26%). Кроме того, в исходно детской когорте несколько реже документирована ХБП со снижением скорости клубочковой фильтрации (≥ 2 -й стадии).

Прецизионная сравнительная оценка частоты тромбозов и эпизодов ОПП с учетом зависимости осложнений ПНГ от продолжительности болезни и возможности точной документации даты их развития проведена с помощью построения кривых кумулятивной частоты (рисунки 5 А, Б).

Во всей когорте как минимум один манифестный тромбоз развился у 89 больных с кумулятивной частотой 20% (95% ДИ: 15–25) и 31% (95% ДИ: 25–39) в течение 5 и 10 лет соответственно. При стратификации больных по возрасту на момент дебюта ПНГ прослеживается тенденция к более высокой кумулятивной частоте тромбозов у взрослых: 5 лет – 21% (95% ДИ: 16–27) против 12% (95% ДИ: 5–28); 10 лет – 33% (95% ДИ: 27–42) против 19% (95% ДИ: 10–38) ($p = 0,151$) (рисунок 5 А). Медиана времени до первого тромботического эпизода у детей составила 5,1 года, у взрослых – 2,4 года ($p = 0,288$). В более отдаленном периоде эти различия нивелируются. Примечательно, что в многофакторном анализе всей когорты возраст на момент дебюта заболевания, наряду с наличием боли, был независимым фактором риска развития тромбозов (данные не приведены).

Рисунок 5

Кумулятивная частота первого тромботического эпизода (А) и ОПП (Б) у пациентов, стратифицированных по возрасту дебюта ПНГ

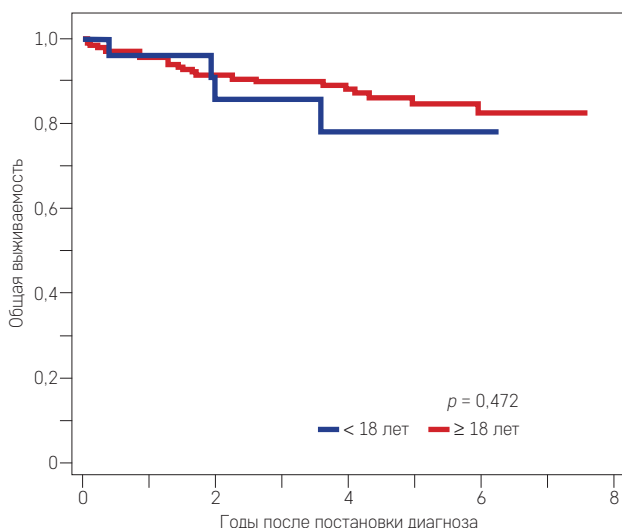


Эпизоды ОПП документированы у 69 пациентов (9 детей и 60 взрослых) с кумулятивной частотой 19% (95% ДИ: 15–25) и 23% (95% ДИ: 18–28) в течение 5 и 10 лет соответственно. При этом вновь отсутствовали достоверные различия между сравниваемыми группами дебюта ПНГ у детей и взрослых: 5 лет – 16% (95% ДИ: 8–32) и 20% (95% ДИ: 15–26); 10 лет – 23% (95% ДИ: 13–42) и 22% (95% ДИ: 18–29) ($p = 0,500$) (рисунок 5 Б).

Особо отметим, что на момент развития этих осложнений большинство больных уже выбыли из-под наблюдения детских врачей. Так, в когорте дебютировавших в детском возрасте только 2 пациента развили первый тромботический эпизод до 18 лет, а остальные 8 – в возрасте от 19 до 33 лет, медиана возраста – 21 год (7–33 года).

Рисунок 6

Общая выживаемость пациентов, стратифицированных по возрасту дебюта ПНГ (проспективная фаза, $n = 233$)



К моменту анализа данных погибли 44 (12%) и были живы 311 (88%) пациентов. С учетом длительности формирования когорты для минимизации селекции длительно выживающих пациентов анализ общей выживаемости был проведен в проспективной фазе исследования у пациентов с установленным диагнозом кПНГ или АА/ПНГ начиная с 2011 года ($n = 233$). К моменту проведения анализа погибли 28 (12%) пациентов, включая 4/28 (14%) и 24/205 (12%), дебютировавших в детском и взрослом возрасте соответственно. При медиане наблюдения в 3,7 года (0,1–7,6 года) вероятность выживаемости в течение 5 лет после установления диагноза составила 86% (95% ДИ: 80–91) без существенных различий в зависимости от возраста дебюта гемолитической ПНГ: 78% (95% ДИ: 58–98) и 87% (95% ДИ: 81–92) до 18 лет и старше соответственно ($p = 0,472$) (рисунок 6).

В 19 (68%) из 28 случаев летальный исход произошел среди пациентов, не получавших таргетный контроль гемолиза с помощью экулизумаба. Доминирующими причинами были тромбозы ($n = 11$), цитопенические осложнения ($n = 8$) и развитие МДС ($n = 2$). Остальные случаи обусловлены осложнениями аллогенной ТКМ по поводу прогрессирующей АА ($n = 3$, в том числе два случая без таргетного контроля гемолиза) и травмой, не связанной с ПНГ ($n = 1$). Причина смерти еще трех взрослых пациентов, не получавших таргетную терапию, осталась неуточненной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Представления врачей о редких болезнях формируются на эпизодическом клиническом опыте и часто носят фрагментарный характер. В полной мере это

Таблица 5

Сравнительная характеристика крупных исследований ПНГ у детей

Исследование	n	Возраст дебюта, лет (диапазон)	Возраст диагноза, лет (диапазон)	Классическая ПНГ n (%)	Анамнез АА, МДС n (%)	Размер клона ПНГ, % (диапазон)	Гемоглобинурия в дебюте n (%)	Тромбозы n (%)
Ware R.E., et al., 1991 [4]	26	14,3 (0,8–21,4)	НД	13 (50)*	АА 13 (50)	33 (2–100)**	4 (15)	8 (31)
van den Heuvel-Eibrink M.M., et al., 2005 [13]	11	НД (6–15)	12 (9–17)	0 (0)	АА 7 (64) МДС 4 (36)	НД (10–80)	3 (27)	2 (18)
Naithani R., et al., 2008 [14]	18	НД	16 (11–18)	9 (50)	АА 9 (50)	НД	7 (39)	1 (6)
Curran K.J., et al., 2011 [15]	12	13 (3–17)	НД (5–20)	1 (8)	АА 6 (50) МДС 5 (42)	НД (35–92)	1 (8)	6 (50)
Mercuri A., et al., 2017 [16]	16	15 (7,8–25,8)	16,2 (8,7–28,4)	6 (38)	АА 5 (31) МДС 5 (31)	58,5 (2,5–95)	9 (56)	3 (19)
Urbano-Ispizua A., et al., 2017 (Регистр ПНГ) [6]	99	14 (1–17)***	< 18	20 (20)	АА 77 (78) МДС 2 (2)	> 10% у 43% больных	НД (19,3)	4 (4)
Настоящее исследование, 2018	51	16,8 (5–17)	17 (7–48)	27 (53)	АА 24 (47)	93 (12–100)	26 (51)	9 (18)

* Включая случаи с первичным ошибочным диагнозом.

** Клон среди эритроцитов в тесте чувствительности к комплемент-опосредованному лизису.

*** Возраст включения в Регистр.

относится к ПНГ – редкому заболеванию крови, которое может развиваться в любом возрасте, характеризуется полиморфизмом клинической манифестации, трудностью распознавания и неблагоприятным прогнозом при естественном течении.

Данные о ПНГ у детей вследствие редкости этого заболевания остаются крайне ограниченными. Наиболее крупные одноцентровые исследования включали 11–26 наблюдений (таблица 5) [4, 6, 13–16]. В России первые описания ПНГ у детей и подростков, верифицированные методом проточной цитометрии, относятся к 1990-м годам [5, 17].

Гемолитическая ПНГ у детей и подростков диагностируется реже, чем у взрослых. Пациенты младше 21 года составляют, по разным источникам, 12–21%, и только около 4% из них младше 10 лет [4, 18]. По данным Международного регистра, диагноз классической ПНГ до 18 лет был установлен только у 49 (10%) из 497 больных [19]. Болезнь дебютирует преимущественно в подростковом возрасте, но известны случаи развития ПНГ в первые годы жизни [А.А. Масчан, персональная коммуникация]. Принято считать, что ПНГ у детей в основном развивается из предшествующей приобретенной АА, а классическая форма без выраженной костномозговой недостаточности встречается намного реже.

В проспективном исследовании, проведенном нашей группой в 2005–2013 годах, частота выявления клона ПНГ у первичных больных с АА в возрасте до 18 лет составила 44%, у взрослых – 65% [20]. Сходные данные (50%) были получены в исследовании НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии (НМИЦ ДГОИ) им. Д. Рогачева [3]. В других источниках данный показатель варьирует от 21 до 73% [21–23].

Следует обратить внимание, что далеко не все пациенты с АА и наличием клона ПНГ развивают активную гемолитическую ПНГ. В срезовом анализе НМИЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава России размер клона ПНГ превышал 1% у 26% больных, и лишь 17% детей имели критерии активного гемолиза (ЛДГ > 1,5 ВГН) [3]. По данным Международного регистра ПНГ, включающего 99 случаев ПНГ у детей, размер клона ПНГ был более 10% и уровень ЛДГ превышал 1,5 ВГН у 43 и 40% детей соответственно [6].

Более точные представления о частоте развития ПНГ при АА дает оценка кумулятивной частоты с учетом конкурирующих рисков. По данным нашей группы, опубликованным в 2014 году, в когорте больных с АА (n = 248) вне зависимости от исходного ПНГ-статуса кумулятивная частота гемолитической ПНГ составила 18% в течение 10 лет после иммуносупрессивной терапии [24]. Фактически же этот риск реализуется и достигает 29% (95% ДИ: 19–45) только

у пациентов с наличием клона ПНГ на момент диагностики АА. В качестве независимых факторов риска развития гемолитической ПНГ идентифицированы: исходный размер клона > 1% (отношение рисков – 5,3) и уровень ЛДГ > 0,94 ВГН (отношение рисков – 3,6), а возраст > 18 лет на момент диагностики АА не имел значения в многофакторном анализе. Эти данные подтверждены в недавнем исследовании в Японии: кумулятивная частота гемолитической ПНГ у детей с первичным диагнозом АА и наличием минорного клона ПНГ составила 29% (95% ДИ: 10–51) в течение 10 лет [25]. Следовательно, около трети детей с исходной АА/субклинической ПНГ имеет риск прогрессии в гемолитическую ПНГ, который может реализоваться как в детском, так и во взрослом возрасте.

Оценка классической формы ПНГ у детей существенно более затруднительна и противоречива. В подавляющем числе публикаций, касающихся детских групп, она может быть выделена лишь косвенно, по факту отсутствия диагноза АА, реже – рефрактерной цитопении детского возраста или глубокой цитопении (таблица 4). По данным Международного регистра ПНГ, только у 20 (20%) из 99 детей отсутствовал анамнез костномозговой недостаточности; у взрослых этот показатель составлял 34% [6]. В других одноцентровых исследованиях удельный вес кПНГ достигает 38–50% [4, 14, 16]. Эти данные подтверждают очевидность проблемы формальной интерпретации и классификации отдельных случаев, особенно в рамках многоцентрового исследования.

В литературе часто обсуждаются особенности клинической манифестации ПНГ у детей, в том числе меньшая частота гемоглобинурии (8–27%) [4, 13, 15]. Однако при более тщательном отборе больных с классической/гемолитической ПНГ не наблюдалось никаких различий между детьми и взрослыми при оценке гемоглобинурии, болей в животе, дисфагии, головной боли, одышки и почечной недостаточности [19]. Следовательно, сформировавшаяся оценка частоты и клинических особенностей ПНГ у детей обусловлена критериями включения отдельных исследований.

Настоящее крупное исследование смешанной возрастной когорты с использованием строгих критериев диагноза позволило в значительно большей степени уточнить характер клинической манифестации, течения и отдаленные исходы активной гемолитической ПНГ у детей. Главной отличительной особенностью нашего исследования было формирование сравниваемых групп по возрасту дебюта, а не установления диагноза, что позволило существенно скорректировать сложившиеся представления об особенностях ПНГ у детей. Так, первые клинические проявления внутрисосудистого гемолиза в детском

возрасте были документированы у 14% больных – с одинаковой частотой среди больных с классической формой и АА/ПНГ. В противоположность этому диагноз кПНГ, как правило, устанавливали у больных старше 18 лет, что обуславливает формальный сдвиг в пользу АА/ПНГ у детей.

Причины частых ошибок и поздней диагностики кПНГ детально обсуждались нами ранее [7]. Настоящий анализ подтвердил эти данные в педиатрической когорте с 81%-й частотой первичных диагностических ошибок. Спектр первичных ошибочных диагнозов у детей варьировал от АИГА, ИТП, дефицитных анемий до МДС и синдромальных органных поражений. Превалирующий подростковый возраст дебюта и длительный период до установления критериального диагноза (медиана – 52 мес.) в полной мере объясняют недооценку педиатрами частоты кПНГ.

В отличие от большинства предшествующих сообщений педиатрических групп, мы не выявили различий в частоте основных симптомов ПНГ в дебюте у детей и взрослых. В частности, половина детей, как и взрослых, имела гемоглобинурию в самом начале заболевания. Аналогичная оценка касается течения заболевания и частоты формирования типичных клинических проблем: анемии с зависимостью от трансфузий, тромбозов, эпизодов ОПП, формирования ХБП и легочной гипертензии.

Особого внимания требуют тромботические осложнения ПНГ, которые могут развиваться в любом возрасте. Низкая частота тромбозов у детей в сообществе Международного регистра ПНГ обусловлена, очевидно, включением пациентов с субклинической ПНГ (57% из них имели размер клона менее 10%) и отсутствием осложнений гемолитической ПНГ по определению [6]. В остальных сообщениях педиатрических групп тромбозы документированы у 18–50% пациентов, за исключением одного исследования из Азии [4, 13–16].

В нашем исследовании использована более совершенная оценка частоты тромбозов и ОПП с помощью построения кривой кумулятивной частоты, позволяющей учитывать продолжительность болезни, конкурирующие риски и терапию экулизумабом, которая в свою очередь отчетливо влияет на естественное течение заболевания. В результате впервые показана одинаковая частота тромбозов и эпизодов ОПП у детей и взрослых в отдаленном периоде.

ПНГ остается жизнеугрожающим заболеванием как у детей, так и у взрослых. Анализ общей выживаемости на современном этапе не выявил различий между пациентами с дебютом заболевания в детском и взрослом возрасте. При этом отчетливо доминируют две причины летальности: тромбозы на фоне неконтролируемого гемолиза и осложнения цитопении при прогрессирующей костномозговой недостаточ-

ности. Соответственно текущая стратегия лечения ПНГ должна включать таргетный контроль гемолиза и риск-адаптированную аллогенную ТКМ, которая в большей мере может быть реализована у детей и молодых взрослых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПНГ представляет собой динамический спектр симптомов и осложнений, обусловленных как интенсивностью внутрисосудистого гемолиза, так и выраженностью недостаточности кроветворения. Срезовые оценки клинического профиля в детском возрасте отражают этап формирования болезни с более частой документацией недостаточности кроветворения. Результаты проведенного исследования со строгими критериями включения и длительным периодом наблюдения за пациентами позволили существенно уточнить характеристики ПНГ у детей:

- классическая ПНГ и АА/ПНГ одинаково часто дебютируют у детей, однако из-за трудностей распознавания диагноз классической ПНГ чаще устанавливают у взрослых;
- клиническая манифестация, частота ключевых осложнений, размер клона не отличаются при активной гемолитической ПНГ, дебютировавшей у детей и взрослых;
- вследствие тромбозов в условиях ограниченного доступа к таргетной терапии и вероятности прогрессии недостаточности кроветворения, вне зависимости от возраста пациентов, ПНГ остается жизнеугрожающим заболеванием.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Не указан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Kulagin A.D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>
Klimova O.U. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7238-729X>
Dobronravov A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3765-0798>
Rudakova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4601-7495>
Golubovskaya I.K. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0469-7338>
Lapina A.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0287-5161>
Ivanova M.O. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1272-3583>
Gindina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-3311>
Bykova T.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4456-2369>
Ovechkina V.N. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3357-1339>
Osipova A.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7629-4293>
Babenko E.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3367-4936>
Gindina T.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1302-3311>
Baykov V.V. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9191-5091>
Zubarovskaya L.S. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2594-7703>
Dobronravov V.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7179-5520>
Afanasyev B.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1235-4530>

Литература

1. Brodsky R.A. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014; 124 (18): 2804–21.
2. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В., Шилова Е.П., Цветаева Н.В., Михайлова Е.А. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология* 2014; 9 (2): 20–8.
3. Новичкова Г.А., Петрова У.Н., Калинина И.И., Масчан А.А. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей (обзор литературы). *Доктор.Ру. Гематология* 2016; 5: 15–20.
4. Ware R.E., Hall S.E., Rosse W.F. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 1991; 325 (14): 991–6.
5. Масчан А.А., Богачева Н.Ю., Байдун Л.В., Логинов А.В., Куликова О.В., Румянцев А.Г. Синдром пароксизмальной ночной гемоглобинурии у детей с приобретенной апластической анемией. *Гематология и трансфузиология* 1996; 41 (3): 20–5.
6. Urbano-Ispizua A., Muus P., Schrezenmeier H., Almeida A.M., Wilson A., Ware R.E. Different clinical characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adult patients. *Haematologica* 2017; 102 (3): e76–e79.
7. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В., Иванова М.О., Рудакова Т.А., Бабенко Е.В. и др. Клиническая манифестация и ошибки диагностики классической пароксизмальной ночной гемоглобинурии: Анализ 150 наблюдений. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2017; 10 (3): 333–41.
8. Кулагин А.Д., Афанасьев Б.В. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия: актуальные вопросы и ответы для практических врачей. В сб.: *Пароксизмальная ночная гемоглобинурия. Актуальные клинические наблюдения редкого заболевания / Под ред. А.Д. Кулагина, Б.В. Афанасьева. – М.: Практическая медицина, 2017. – 136 с.*
9. Parker C., Omine M., Richards S., Nishimura J.I., Bessler M., Ware R., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106 (12): 3699–709.
10. Sipol A.A., Babenko E.V., Borisov V.I., Naumova E.V., Boyakova E.V., Yakunin D.I., et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. *Hematology* 2015; 20 (1): 31–8.
11. Mehta R.L., Kellum J.A., Shah S.V., Molitoris B.A., Ronco C., Warnock D.G., Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11 (2): R31.
12. Fine J.P., Gray R.J. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *Journal of the American statistical association* 1999; 94 (446): 496–09.
13. Van Den Heuvel-Eibrink M.M., Bredius R.G.M., Te Winkel M.L., Tamminga R., de Kraker J., Schouten-van Meeteren A.Y.N., et al. Childhood paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH), a report of 11 cases in the Netherlands. *Br J Haematol* 2005; 128 (4): 571–7.
14. Naithani R., Mahapatra M., Dutta P., Kumar R., Pati H.P., Choudhry V.P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in childhood and adolescence—a retrospective analysis of 18 cases. *Indian J Pediatr* 2008; 75 (6): 575–8.
15. Curran K.J., Kernan N.A., Prockop S.E., Scaradavou A., Small T.N., Kobos R., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric patients. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59 (3): 525–9.
16. Mercuri A., Farruggia P., Timeus F., Lombardi L., Onofrillo D., Putti M.C., et al. A retrospective study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adolescent patients. *Blood Cells Mol Dis* 2017; 64: 45–50.
17. Лисуков И.А., Крючкова И.В., Кулагин А.Д., Гилевич А.В. Клинический случай пароксизмальной ночной гемоглобинурии с ответом на терапию циклоспорином А. *Гематология и трансфузиология* 1998; 43 (5): 46.
18. Socié G., Mary J.Y., de Gramont A., Rio B., Leporrieret M., et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *French Society of Haematology. Lancet* 1996; 348 (9027): 573–7.
19. Urbano-Ispizua A., Schrezenmeier H., Muus P., Maciejewski J.P., Socié G., Szer J., et al. Clinical characteristics of classic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in pediatric patients: a comparison with classic PNH in adults. An International PNH Registry Study. *Blood* 2011; 118 (21): 2102.
20. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M., Golubovskaya I., Kruchkova I., Bondarenko S., et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol* 2014; 164 (4): 546–54.
21. Yoshida N., Yagasaki H., Takahashi Y., Yamamoto T., Liang J., Wang Y., et al. Clinical impact of HLA-DR15, a minor population of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-type cells, and an aplastic anaemia-associated autoantibody in children with acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2008; 142 (3): 427–35.
22. Timeus F., Crescenzo N., Longoni D., Doria A., Foglia L., Pagliano S., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in children with acquired aplastic anemia: a multicentre study. *PLoS one* 2014; 9 (7): e101948.
23. Tutelman P.R., Aubert G., Milner R.A., Dalal B.I., Schultz K.R., Deyell R.J. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype cells and leucocyte subset telomere length in childhood acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2014; 164 (5): 717–21.
24. Kulagin A., Golubovskaya I., Ivanova M., Babenko E., Pronkina N., Kruchkova I., et al. Incidence and risk factors for hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in aplastic anemia (AA) patients. *Bone marrow transplantation* 2014; 49 (S1): S42–S43.
25. Narita A., Muramatsu H., Okuno Y., Sekiya Y., Suzuki K., Hamada M., et al. Development of clinical paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in children with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2017; 178 (6): 954–8.