

# НАЛИЧИЕ КЛОНА ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ НОЧНОЙ ГЕМОГЛОБИУРИИ И ДРУГИЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОСУПРЕССИВНОЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ ИДИОПАТИЧЕСКОЙ АПЛАСТИЧЕСКОЙ АНЕМИЕЙ

Фидарова З. Т.\*, Абрамова А. В., Лучкин А. В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** В основе патогенеза приобретенной апластической анемии (АА) лежит иммуноопосредованное развитие костномозговой недостаточности. Отсутствие однозначных причин развития иммунной агрессии делает актуальными исследования, направленные на изучение генетических нарушений в оставшемся пуле гемопоэтических стволовых клеток, в кроветворной нише, а также механизмов срыва иммунологической толерантности.

**Цель** настоящего обзора литературы — описание наиболее актуальных маркеров, позволяющих охарактеризовать больных АА в зависимости от возможного ответа на ИСТ и сформировать группы риска развития рефрактерности и клональной эволюции.

**Основные сведения.** Вероятность общей выживаемости больных АА, которым проведена программная иммуносупрессивная терапия (ИСТ), сопоставима с результатами трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток крови (алло-ТГСК) от родственного донора в первой линии терапии. Согласно современным отечественным и международным рекомендациям, выбор тактики лечения больных АА определяется возрастом больного и наличием HLA-идентичного сиблинга. Методом выбора лечения больных младше 40 лет является алло-ТГСК от родственного HLA-идентичного донора, но возможность проведения алло-ТГСК ограничена наличием донора. Несмотря на то что вероятность бессобытийной выживаемости при проведении ИСТ уступает результатам алло-ТГСК, для большинства больных АА ИСТ остается основным методом лечения. С целью минимизации неблагоприятных исходов необходимо учитывать наличие предикторов эффективности лечения и вероятность развития поздней клональной эволюции уже на этапе диагностики АА. Оценка и формирование групп риска больных позволит на этапе планирования выбрать оптимальный подход, включающий добавление к ИСТ агонистов тромбопоэтиновых рецепторов, или поиск неродственного HLA-совместимого донора и переход к алло-ТГСК в более ранние сроки.

**Ключевые слова:** апластическая анемия, иммуносупрессивная терапия, клон пароксизмальной ночной гемоглобинурии

**Конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование:** исследование не имело спонсорской поддержки.

**Для цитирования:** Фидарова З.Т., Абрамова А.В., Лучкин А. В. Наличие клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии и другие факторы, влияющие на эффективность иммуносупрессивной терапии у больных идиопатической апластической анемией. Гематология и трансфузиология. 2019; 64(3):342–352. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-342-352>

# CLONE OF PAROXYSMAL NOCTURNAL HAEMOGLOBINURIA AND OTHER PREDICTORS OF THE RESPONSE TO IMMUNOSUPPRESSIVE THERAPY IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC APLASTIC ANAEMIA

Fidarova Z. T.\*, Abramova A. V., Luchkin A. V.

National Research Center for Hematology, 125167, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**Introduction.** The pathogenesis of acquired aplastic anaemia (AA) is based on immune-mediated development of bone marrow failure. The absence of clear reasons for the development of immune aggression determines the relevance of investigations aimed at studying genetic disorders in the remaining pool of hematopoietic stem cells, in the hematopoietic niche, as well as mechanisms underlying the failure of immunological tolerance.

**Aim.** The present literature review describes the most relevant markers used for characterising AA patients on the basis of their possible response to immunosuppressive therapy (IT) and for forming groups being at risk of developing refractoriness and clonal evolution.

**General findings.** The overall survival probability in patients with AA following program IT is comparable to the results of transplanting allogeneic hematopoietic blood stem cells (allo-HSCT) from a related donor in the first line of therapy. According to current Russian and international recommendations, the tactics for treating AA patients is determined by the patient's age and the presence of an HLA-identical sibling. Allo-HSCT from a related HLA-identical donor is a method used for treating patients younger than 40 years; however, the possibility of performing allo-HSCT is limited by donor availability. Although the event-free survival probability during IT is inferior to the results of allo-HSCT, IT remains the main treatment method for most patients with AA. In order to minimise adverse outcomes, it is necessary to consider predictors of treatment efficacy along with the likelihood of developing late clonal evolution as early as at the AA diagnosis stage. Patient evaluation and formation of risk groups will facilitate selection of the most optimal treatment approach at the therapy planning stage, which includes either IT combination with thrombopoietin receptor agonists, or a search for an unrelated HLA-compatible donor and timely allo-HSCT.

**Keywords:** aplastic anaemia, immunosuppressive therapy, clone of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria

**Conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

**Financial disclosure:** the study had no sponsorship.

**For citation:** Fidarova Z.T., Abramova A.V., Luchkin A.V. Clone of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and other predictors of the response to immunosuppressive therapy in patients with idiopathic aplastic anaemia. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2019; 64(3):342–352 (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2019-64-3-342-352>

## Введение

Приобретенная апластическая анемия (АА) является редким, жизнеугрожающим заболеванием, характеризующимся иммуноопосредованной аплазией костного мозга [1, 2]. В исследованиях последних лет выявлены и другие патогенетические механизмы заболевания, связанные с клональными перестройками в гемопоэтических стволовых клетках (ГСК) в резуль-

тате хромосомных аномалий, геномной нестабильности, истощения теломерных участков ДНК в стволовых кроветворных клетках и персистирующими соматическими мутациями, характерными для миелодиспластических синдромов [3, 4].

Иммunosuppressивная терапия (ИСТ) является эффективным методом лечения больных приобретен-

ной АА. Однако прогнозировать ответ на проводимую ИСТ и долгосрочные результаты лечения не представляется возможным ввиду риска развития рефрактерности, рецидивов и появлением аберрантных клонов [5–7]. В качестве маркеров эффективного исхода лечения предложено большое количество параметров (возраст, пол, показатели гемограммы на момент установления диагноза, наличие и размер клона пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ), длина теломерных участков ДНК и др.). В настоящем обзоре представлена значимость и возможность практического применения этих параметров.

**Целью** настоящего обзора литературы является описание наиболее актуальных маркеров, позволяющих охарактеризовать больных АА в зависимости от возможного ответа на ИСТ и сформировать группы риска развития рефрактерности и клональной эволюции.

### Возраст и показатели гемограммы

Возрастной пик заболеваемости АА приходится на два периода: 15–25 и 60–65 лет [8]. Возраст является значимым фактором, определяющим вероятность ответа на ИСТ. В различных исследованиях [7, 9, 10] показано, что больные АА младше 18 лет отвечают на лечение не только лучше, но и быстрее. Р. Scheinberg и соавт. [8] показали, что ответ на ИСТ больных до 18, от 18 до 60 и более 60 лет к шестому месяцу лечения составил 74,4, 58,3 и 52,9 % соответственно. Кумулятивная частота достижения ответа на ИСТ достоверно выше среди молодых взрослых (15–25 лет) в сравнении со взрослыми старше 25 лет и нивелируется при сопоставлении результатов лечения молодых взрослых с детьми (младше 15 лет) [11]. Это позволяет рассматривать возраст на момент заболевания менее 25 лет как фактор эффективности ответа на ИСТ.

Некоторые показатели гемограммы, определенные в дебюте АА, выделены в ряде исследований как значимые факторы прогноза ответа на лечение. Наиболее благоприятный ответ на ИСТ продемонстрирован у больных нетяжелой формой АА по сравнению с тяжелой (95 и 81,8 % соответственно) [5]. Р. Scheinberg и соавт. [8] в ретроспективном исследовании с помощью мультивариантного анализа установили, что наряду с гранулоцитами прогностическое значение имеет абсолютное число ретикулоцитов (АЧР) и лимфоцитов (АЧЛ). Согласно этому исследованию [8], у больных АА, у которых АЧР  $\geq 25 \times 10^9/\text{л}$  и АЧЛ  $\geq 1 \times 10^9/\text{л}$ , вероятность ответа к шестому месяцу лечения составляет 83,1 % по сравнению 40,7 % ответа у больных АА с АЧР  $\leq 25 \times 10^9/\text{л}$  и АЧЛ  $\leq 1 \times 10^9/\text{л}$ . Связь между эффективностью ИСТ и показателями гемограммы, характеризующими пролиферативную активность остаточного кроветворения (АЧР, АЧЛ), отмечена в нескольких работах [8, 12, 13]. Однако данный факт подтверждается не во всех исследованиях. Исследование, проведенное

в Японии [12], показало, что у больных АА с количеством лейкоцитов крови менее  $2,0 \times 10^9/\text{л}$  ответ на ИСТ был лучше, чем у больных с большим количеством лейкоцитов крови ( $p = 0,0003$ ). Медиана АЧЛ у не ответивших на ИСТ больных была выше и составила  $2,0 \times 10^9/\text{л}$  против  $1,6 \times 10^9/\text{л}$  у ответивших больных. В данном исследовании был выделен фактор «интервал времени» от момента установления диагноза и до начала ИСТ, который у ответивших на лечение больных был короче. Возможно, решение о начале ИСТ принимали в отношении больных, у которых была более выраженная цитопения, тем самым больные, которым ИСТ начата более чем через 90 дней от постановки диагноза, имели необратимые повреждения гемопоэтической ткани. Сверхтяжелая форма АА (АЧН менее  $0,2 \times 10^9/\text{л}$ ) ассоциируется с большим числом жизнеугрожающих инфекционных осложнений и ранней смерти, и к моменту оценки ответа на ИСТ значение данного фактора нивелируется [13].

Таким образом, показатели гемограммы могут ассоциироваться с остаточной кроветворной способностью гемопоэтических стволовых клеток и рассматриваться как фактор прогноза ответа на ИСТ.

### Иммунные механизмы развития аплазии костного мозга

Аплазия костного мозга при АА развивается как следствие иммуноопосредованного повреждения гемопоэза. Патогенез развития приобретенной АА включает нарушения регуляции CD8<sup>+</sup>-цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов (Th) 1-го типа, Th2-типа, регуляторных Т-лимфоцитов и Th17-типа, НК-клеток и НК-Т-клеток, которые посредством аномальной продукцией цитокинов, таких как интерферон (ИНФ)- $\gamma$ , фактор некроза опухоли альфа (ФНО)- $\alpha$ , трансформирующий фактор роста бета (ТФР)- $\beta$ , активируют апоптоз стволовых клеток крови или снижают их пролиферацию [14]. Изменения в полиморфизме генов ИНФ- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ТФР- $\beta$ , так же как и аллелей главного комплекса гистосовместимости (HLA), могут способствовать развитию иммуноопосредованной гибели клеток-предшественниц кроветворения и неэффективности гемопоэза [14].

В результате изучения факторов иммунной и генетической предрасположенности к развитию АА в качестве значимых выделены система главного комплекса гистосовместимости (HLA) и полиморфизм генов цитокинов [15]. В нескольких исследованиях показана связь полиморфизма нуклеотидных последовательностей генных фрагментов определенных молекул HLA с развитием приобретенной АА [16]. На основании существующих данных удалось выделить потенциальное влияние полиморфизма генов HLA на развитие приобретенной АА. Несмотря на то, что проведение исследований в данном направлении ограничивается

небольшими объемами выборок больных, различиями полиморфизма генов в этнических популяциях и возрастом, Y. Zeng и E. Katsanis [3] опубликовали данные о наиболее часто встречающихся HLA-аллелях, ассоциирующихся или не имеющих связи с развитием АА и являющихся предикторами ответа на ИСТ. Противоречивы на сегодняшний день и данные о хорошем прогностическом ответе на ИСТ при сочетании HLA-DRB1\*1501 и ПНГ-клона [15, 16].

В исследовании S. Nakaо и соавт. [15] показано, что сочетание аллелей HLA человека могут играть роль в активации аутореактивных Т-клонов у больных АА. Более того, защитные эффекты HLA молекул недостаточны вследствие снижения генерации Т-регуляторных клеток (Treg), подавляющих аутоиммунитет.

Полногеномный транскрипционный анализ Т-клеток больных АА выявил большое количество аномальных генов в CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>Т-клетках [18]. В сочетании с аномальной экспансией Th1, Th2 и Th17 снижение или изменение иммунофенотипа и функции Treg является определяющей характеристикой тяжести приобретенной АА [19].

R.P. De Latouг и соавт. [20], изучив патофизиологию АА, пришли к выводу, что Th17-иммунный ответ имеет значение в развитии АА. Интерлейкин (ИЛ)-17А, продуцируемый Th17, играя значимую роль в развитии воспалительной реакции, индуцирует гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и молекулы адгезии, приводящие к усилению гранулоцитопоэза. Однако снижение в плазме концентрации ИЛ-17А не наблюдалось у больных с нетяжелой АА, в то время как у больных с тяжелой АА этот цитокин практически не определялся. Таким образом, иммунный ответ через Th1/Th17 приводит к развитию костномозговой недостаточности, что наряду с одновременным снижением Treg приводит к увеличению активности аутореактивных Т-клеток и к клиническим проявлениям АА [21].

## Цитогенетические аберрации при АА

АА сложно дифференцировать с гипопластическими вариантами миелодиспластического синдрома (МДС), поскольку характерные морфологические признаки дисплазии кроветворения трудно выявить в условиях низкой клеточности образцов костного мозга [22]. В 12 % случаев у больных АА могут выявляться цитогенетические аберрации, такие как трисомия 8, трисомия 6, трисомия 15, del(13q) [23]. Эти изменения кариотипа рассматриваются в качестве косвенных маркеров аутоиммунной агрессии [24, 25].

Выявление трисомии 8 (+8) у больных АА и гипопластическим вариантом МДС ассоциируется с хорошим ответом на ИСТ [25]. Клетки-предшественницы кро-

ветворения у больных с клоном +8 характеризуются повышенной экспрессией гена *WT1*. Активация специфического Т-клеточного ответа к *WT1* белку в качестве побочного эффекта приводит к супрессии нормальных клеток-предшественниц кроветворения. В то же время клон с +8 получает пролиферативное преимущество, избегая иммунной атаки за счет повышенной экспрессии антиапоптотического белка *cyclin D1*, и реализует пролиферативный потенциал за счет повышенной экспрессии *c-myc* [26].

Утрата гетерозиготности без изменения числа копий (*copy-neutral LOH*) короткого плеча хромосомы 6 — приобретенное генетическое событие в гемопоэтических клеточных линиях, в том числе и в ранних предшественницах (CD34<sup>+</sup>), за исключением CD3<sup>+</sup>Т-лимфоцитов. На клетках-предшественницах кроветворения с LOH6p отсутствуют мишени для иммунной атаки, которыми являются молекулы I класса HLA, так как LOH приводит к потере экспрессии HLA-А-антигенов. Таким образом, появляется ростовое и пролиферативное преимущество, приводящее к экспансии патологического клона [27].

К аномалиям кариотипа, при которых признаки дисплазии, характерные для МДС, могут не обнаруживаться, относят del(13q). К. Hosokawa и соавт. [24] на репрезентативной выборке продемонстрировали эффективность ИСТ больных с костномозговой недостаточностью и del(13q). Среди больных с наличием только del(13q) или в сочетании с мутацией гена *PIGA* прогрессия в МДС или ОМЛ не выявлена, тогда как сочетание del(13q) с другими аномалиями кариотипа у 2 из 6 больных ассоциировалось с развитием ОМЛ.

## Соматические мутации

АА необходимо дифференцировать от других заболеваний, проявляющихся костномозговой недостаточностью, но имеющих клональное происхождение. При ПНГ и МДС происходит «ускользание» клонального кроветворения от иммунной агрессии, в результате которой патологический клон получает преимущество в выживании перед нормальным клоном. Совершенствование методов диагностики, как, например, секвенирования ДНК нового поколения (*NGS-next generation sequencing*), позволило в условиях аплазии костного мозга, т.е. при низкой клеточности образцов костного мозга, выявить комплекс мутаций у больных АА в дебюте заболевания. Частота выявления соматических мутаций составляла 33 %. Отмечена невысокая аллельная нагрузка выявленных мутаций [28, 29]. Выявленные мутации охарактеризованы как «благоприятные» и «неблагоприятные». К «благоприятной» группе отнесены мутации, ассоциирующиеся с лучшим ответом на ИСТ и длительной беспрогрессивной выживаемостью, к ним относятся мутации

в генах *PIGA*, *BCOR* и *BCORL1*. К «неблагоприятным» мутациям, с высокой частотой обнаруживаемым при АА, относят *DNMT3A* и *ASXL1* [30].

По данным Королевского колледжа Лондона (King's College Hospital, London), медиана аллельной нагрузки выявленных мутаций невелика и составила 20 % [31]. Однако наличие мутаций увеличивает риск прогрессии в МДС с 6 % (при отсутствии соматических мутаций) до 38 %. При отсутствии ответа на лечение к шестому месяцу риск развития поздних клональных осложнений возрастает до 40 %, что достоверно выше в сравнении с таковым при отсутствии соматических мутаций — 4 % ( $p < 0,001$ ) [31].

## ПНГ-клон

ПНГ-клон — это клон стволовой клетки крови с мутацией в *PIGA* гене, в результате которой нарушается синтез гликозилфосфоинозитола (ГФИ) — гликолипида, с помощью которого к мембранам клеток крепятся белки ГФИ-комплекса, защищающего мембраны клеток крови от воздействия терминальных компонентов собственной системы комплемента [32, 33].

Наличие ПНГ-клона еще не означает заболевание ПНГ. Болезнь ПНГ характеризуется не только наличием ПНГ-клона, но и яркой клинической картиной (гемолитические кризы, тромбозы, почечная недостаточность).

В настоящее время продолжается поиск причинных связей между развитием и эволюцией ПНГ-клона у больных с костномозговой недостаточностью. Различные исследования свидетельствуют о наличии внутренних факторов эволюции ПНГ-клона [34]. Принимая гипотезу иммунной привилегированности, позволяющей ГФИ-дефицитному клону клеток посредством отсутствия на их поверхности мишеней избежать иммуноопосредованной атаки на костномозговое кроветворение, причины эволюционного течения ПНГ-клона с развитием гемолитической формы ПНГ остаются неизвестными [35]. Увеличение размера ПНГ-клона может продолжаться у некоторых больных АА при проведении ИСТ и даже после достижения ремиссии, а у больных с гемолитической формой ПНГ клиническая манифестация не всегда сочетается с клиническими проявлениями костномозговой недостаточности [36]. Более того, у здоровых людей могут определяться небольшие популяции *PIGA* мутантных клеток, что свидетельствует о наличии дополнительных внутренних факторов, способствующих экспансии ГФИ-дефектного клона [37].

В различных исследованиях [38, 39] было показано сочетание ПНГ-клона с редкими хромосомными аномалиями или соматическими мутациями генов *NRAS* и *JAK2*. Наибольший интерес представляют данные, полученные W. Shen и соавт. [40], выдвинувшими идею наличия внутреннего преимущества роста у кло-

на клеток ПНГ. После предварительного разделения гемопоэтических клеток-предшественниц на клетки с ПНГ-фенотипом и «нормальным» фенотипом проведено полногеномное секвенирование ДНК, полученной из клеток костного мозга 12 больных ПНГ, и секвенирование по методу Сенгера с подбором праймеров для 61 гена, мутации которых специфичны для злокачественных миелоидных заболеваний. Обнаружено большое количество мутаций совместно с мутациями *PIGA*, ранее не ассоциировавшихся с ПНГ. Более того, данные дополнительные мутации возникали либо как субклон в пределах *PIGA*-мутантной клеточной популяции, или в качестве инициального генетического случая до приобретения мутации в гене *PIGA*. У 83 % (10 из 12) больных ПНГ выявлены дополнительные соматические мутации, такие как *TET2*, *MAGEC1*, *BRPF1*, *KDM3B*, *STAC3*. Данные мутации выявлены во фракции ПНГ, а не в фенотипически нормальных клетках. Все дополнительные мутации гетерозиготны без потери гетерозиготности в пострадавших локусах. Наличие дополнительной соматической мутации в ПНГ-клетках, по мнению авторов, наиболее вероятно является причиной внутреннего ростового преимущества для экспансии ПНГ-клона. Однако наличие внутреннего преимущества не исключает значимости механизмов избегания иммунной атаки.

Анализ профиля экспрессии генов в ГФИ-позитивных («нормальных»)  $CD34^+$ -клетках костного мозга больных ПНГ показал повышение регуляции экспрессии генов, участвующих в иммунном ответе, тогда как в ГФИ-негативных  $CD34^+$ -паттерн экспрессии не отличался от здоровых доноров. Экспрессия генов, ответственных за пролиферацию, не отличалась в популяциях  $CD34^+$  ГФИ-позитивных и ГФИ-негативных [41]. Наличие пролиферативного дефекта в ГФИ-позитивных (нормальных)  $CD34^+$ , выделенных у больных ПНГ, показано в исследованиях J.P. Maciejewski и соавт. [41], R. Chen и соавт. [42], что, в дополнение к предыдущему исследованию, свидетельствует в пользу внутриклеточных механизмов экспансии ПНГ-клона.

Внедрение высокочувствительных методов анализа с помощью проточной цитометрии, а также открытие патогенетических механизмов развития ПНГ стали толчком для ранней диагностики ПНГ, основанной на выявлении дефицита ГФИ-связанных белков  $CD55$  и  $CD59$  на поверхности эритроцитов [43, 44]. Исторически первым вариантом поиска ПНГ-клона было исследование популяции эритроцитов, что делало подход ограниченным из-за нестабильности популяции ПНГ-эритроцитов, подвергающихся постоянному гемолизу, а также невозможности динамического наблюдения за течением заболевания. Включение в анализ лейкоцитарной популяции, не подвергающейся комплемент-опосредованному лизису, стало необходимым

для более точной диагностики [45]. Однако применение разных протоколов диагностики ПНГ-клона, основанных на выявлении дефицита различных ГФИ-связанных белков на поверхности разных популяций лейкоцитов, не позволяло достоверно сравнивать полученные результаты [46, 47]. Инициативной группой исследователей Международной ассоциации клинической цитометрии (International Clinical Cytometry Society) был создан и опубликован в 2010 г. протокол, в котором был детально описан метод и предложен набор реагентов [47]. Данный протокол в настоящий момент широко применяется по всему миру, позволяя достоверно сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях. Многоцентровое исследование, проведенное в России, показало валидизацию полученных результатов по выявлению минорных и значительных ПНГ-клонов во всех сертифицированных лабораториях, независимо от вида цитометра [48].

Высокая частота выявления ПНГ-клона у больных с костномозговой недостаточностью, в частности АА, привела к необходимости поиска связей между этими заболеваниями и маркерами эффективности иммуносупрессивного воздействия на костномозговое кроветворение. Являясь косвенным маркером иммунной депрессии кроветворения, ПНГ-клон может рассматриваться как прогностически благоприятный маркер ответа больных АА на ИСТ [7]. Результаты существующих на сегодняшний день крупных исследований не позволяют сделать однозначные выводы о значении наличия ПНГ-клона и ответа на ИСТ. Сопоставление полученных данных ограничивается не только возрастом больных и формой АА, но и различием диагностических протоколов по определению ПНГ-клона и нижнего предела выявления ГФИ-негативных клеток. Ретроспективное исследование группы NIN [49], включавшее 76 больных АА, не подтвердило большую эффективность ИСТ у больных с ПНГ-клоном (60,6 % больных АА без ПНГ-клона ответили на ИСТ против 58,9 % больных АА с ПНГ-клоном,  $p = 0,89$ ). Драматично противоположные данные получены группой исследователей из Японии, по данным которых наличие ПНГ-клона у больных АА ассоциировалось с лучшим ответом на ИСТ [50].

Наиболее крупное проспективное исследование, в котором изучалось прогностическое значение выявления ПНГ-клона у больных АА, было проведено в нашей стране А.Д. Кулагиным и соавт. [51]. Исследование включало 125 больных АА, частота выявления ПНГ-клона у которых составила 59 %. Полученные результаты свидетельствуют, что наличие ПНГ-клона является благоприятным признаком не только достижения гематологического ответа на ИСТ к шестому месяцу лечения (у 67,6 % больных АА-ПНГ+ против 45,1 % больных АА-ПНГ-,  $p = 0,0164$ ), но также в группе больных АА-ПНГ+ была достоверно выше частота

достижения полного ответа (41,9 % против 15,7 % АА-ПНГ-). Ответ на второй курс терапии антитимочитарным глобулином также достоверно чаще развивался у больных с ПНГ-клоном (73 % против 27 % больных без ПНГ-клона).

Л. Zhao и соавт. [52], проанализировав ответ на ИСТ 97 больных тяжелой АА, показали отсутствие различий в достижении общего ответа у больных АА-ПНГ+ и АА-ПНГ-, однако достоверные различия получены при оценке развития полной ремиссии к шестому месяцу (66,7 % против 31,5 % соответственно,  $p < 0,002$ ) и к 12-му месяцу ИСТ (75,0 % против 46,6 %,  $p < 0,015$ ).

По данным З.Т. Фидаровой и соавт. [53], ПНГ-клон выявлен у 59 % больных приобретенной АА, при этом у 68 % АА-ПНГ+ значение ПНГ-клона не превышало 10 %. Первоначальный ответ к третьему месяцу от начала ИСТ, определенный как гематологическое улучшение, был достигнут у 47,4 % больных АА-ПНГ+ и лишь у 26,3 % больных АА-ПНГ-.

Наличие ПНГ-клона и АЧР более  $30 \times 10^9/\text{л}$  выделены в качестве положительного прогностического индекса в исследовании А.Д. Кулагина и соавт. [51]. Частота достижения частичного ответа к шестому месяцу при совокупности двух параметров до проведения первого курса терапии антитимочитарным глобулином (АТГ) составила 85 %, при наличии одного из выбранных параметров — 71,7 %, при отсутствии обоих факторов — 35,9 % ( $p = 0,00001$ ) [51].

Выявление ПНГ-клона может исключать диагноз конституциональной АА, а его отсутствие диктует необходимость дальнейшей дифференциальной диагностики [54]. В представленном исследовании авторами проанализировано 20 больных с установленным диагнозом конституциональной АА, ни у одного из них не был выявлен ПНГ-клон.

Таким образом, выявление ПНГ-клона у больных АА нельзя однозначно отнести к прогностическим критериям эффективности ИСТ, однако можно считать положительным фактором высокой частоты и быстроты развития ответа на ИСТ, дифференциальной диагностики с конституциональной АА. Возможно, первоначальный фактор аутоагрессии при АА-ПНГ+ и определяет чувствительность к ИСТ.

ПНГ-клон как косвенный маркер иммунной агрессии, направленной против собственного кроветворения, вместе с показателями пролиферативного потенциала оставшегося пула ГСК могут рассматриваться как значимые факторы прогноза ответа на ИСТ.

## Длина теломерных участков ДНК

Укорочение теломерных участков ДНК (теломер) как фактор, приводящий к ранней клональной трансформации, может определяться у 30 % больных приобретенной АА. Теломеры представляют собой концевые участки хромосом, состоящие из повторя-

ющихся небелковых кодирующих последовательностей ДНК, которые покрыты белковым комплексом. У людей теломерная ДНК состоит из tandemных повторов нуклеотидов «TTAGGG». Основная функция теломер заключается в сохранении смысловой последовательности ДНК, так как при каждом делении клетки в результате «концевой недорепликации» происходит уменьшение длины концевых фрагментов ДНК. Критически короткие теломеры активируют р53-опосредованный апоптоз, приводя к органной недостаточности, злокачественной трансформации и развитию ряда заболеваний у человека [55]. Прогрессирующее укорочение теломер у больных АА приводит к снижению пула кроветворных стволовых клеток, геномной нестабильности, повышению риска развития аномалий 7-й хромосомы, соматических мутаций, злокачественной трансформации в МДС/ОМЛ [56, 57].

Предполагается, что у больных идиопатической АА выраженное укорочение длины теломерных районов ДНК является следствием пролиферативного гемопоэтического стресса стволовых клеток-предшественниц [58]. Обнаружение мутаций в генах, кодирующих белки теломеразного комплекса, может свидетельствовать в пользу конституционального характера заболевания. Значимое укорочение теломерных участков ДНК у больных с врожденным дискератозом может быть единственным косвенным признаком врожденной апластической анемии [59]. В исследовании N.S. Young и соавт. [60] выявлена связь между выявлением более коротких теломер и развитием рецидива АА, клональной трансформацией и низкой вероятностью общей выживаемости, но не с ответом на лечение. Возраст является значимым фактором при интерпретации результатов измерения теломер, так как с возрастом происходит их естественное укорочение. В отечественной публикации не получено достоверных доказа-

тельств значимости укорочения теломер для прогноза ответа на лечение [61].

Японскими исследователями [62] в мультивариантном анализе с логистической регрессией выделено три независимых фактора неблагоприятного ответа на ИСТ к шестому месяцу лечения: низкое количество ретикулоцитов крови, отсутствие ПНГ-клона, короткие теломеры. При распределении больных АА на группы благоприятного (ПНГ-клон и длинные теломеры) и неблагоприятного прогноза (отсутствие ПНГ-клона и короткие теломеры) качество ответа к шестому месяцу терапии было значимо выше в первой группе (70 % против 19 %,  $p < 0,001$ ). Не получено достоверных различий в пятилетней кумулятивной частоте развития рецидива (0 % против 16 %,  $p = 0,392$ ) и клональной эволюции (5 % против 3 %,  $p = 0,849$ ) в группе неблагоприятного и благоприятного прогноза соответственно. Значимо выше в группе благоприятного прогноза оказалась вероятность выживаемости без ТГСК и выживаемости, свободной от неудач лечения (72 % против 48 %,  $p = 0,003$ , и 52 % против 22 %,  $p < 0,001$  соответственно).

Таким образом, за последние десятилетия АА перешла из группы редких заболеваний с крайне плохим исходом в группу излечимых болезней, с высокой вероятностью длительной ремиссии. Современная гематология ставит задачи не только снижения количества рефрактерных больных и частоты развития клональной эволюции, но и улучшения качества жизни больных АА, раннее достижение ответа на лечение с целью минимизации последствий сопроводительной терапии и инфекционных осложнений. Формирование программы лечения с дифференцированным подходом, основанным на оценке риска на момент первичной прицельной диагностики, позволит улучшить результаты лечения и снизить количество абсолютно рефрактерных больных АА.

## Литература

1. Bacigalupo A. Aplastic anemia: pathogenesis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 23–8. DOI: 10.1182/asheducation-2007.1.23
2. Young N.S. Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 72–7. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.72
3. Zeng Y., Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015; 180: 361–70. DOI: 10.1111/cei.12605
4. Babushok D.V., Perdigones N., Perin J.C. et al. Emergence of clonal hematopoiesis in the majority of patients with acquired aplastic anemia. *Cancer Genet*. 2015; 208: 115–28. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.01.007
5. Михайлова Е.А., Фидарова З.Т., Устинова Е.Н. и др. Комбинированная иммуносупрессивная терапия больных апластической анемией: повторные курсы анти-thymocytic глобулина. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59: 11–8.
6. Scheinberg P., Nunez O., Wu C., Young N.S. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclo-

## References

1. Bacigalupo A. Aplastic anemia: pathogenesis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 23–8. DOI: 10.1182/asheducation-2007.1.23
2. Young N.S. Pathophysiologic mechanisms in acquired aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006; 72–7. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.72
3. Zeng Y., Katsanis E. The complex pathophysiology of acquired aplastic anaemia. *Clin Exp Immunol*. 2015; 180: 361–70. DOI: 10.1111/cei.12605
4. Babushok D.V., Perdigones N., Perin J.C. et al. Emergence of clonal hematopoiesis in the majority of patients with acquired aplastic anemia. *Cancer Genet*. 2015; 208: 115–28. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.01.007
5. Mikhailova E.A., Fidarova Z.T., Ustinova E.N. et al. Combined immunosuppressive therapy of aplastic anemia: repeated courses of horse antithymocytic globulin. *Gematologiya i transfusiologiya*. 2014; 59: 11–8 (In Russian).
6. Scheinberg P., Nunez O., Wu C., Young N.S. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclo-

- sporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol.* 2006; 133: 606–11. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06085.x
7. Marsh J. Making therapeutic decisions in adults with aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006: 78–85. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.78
8. Scheinberg P., Wu C.O., Nunez O., Young N.S. Long-Term Outcome of Pediatric Patients with Severe Aplastic Anemia Treated with Antithymocyte Globulin and Cyclosporine. *J Pediatr.* 2008; 153: 814–9. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.06.004
9. Bacigalupo A., Giammarco S., Sica S. et al. Bone marrow transplantation versus immunosuppressive therapy in patients with acquired severe aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2016; 104: 168–74. DOI: 10.1007/s12185-016-2037-8
10. Dufour C., Pillon M., Sociè G. et al. Outcome of aplastic anaemia in children. A study by the severe aplastic anaemia and paediatric disease working parties of the European group blood and bone marrow transplant. *Br J Haematol.* 2015; 169: 565–73. DOI: 10.1111/bjh.13297
11. Cabannes-Hamy A., Boissel N., Peffault De Latour R. et al. The effect of age in patients with acquired aplastic anaemia treated with immunosuppressive therapy: comparison of Adolescents and Young Adults with children and older adults. *Br J Haematol.* 2018; 183(5): 766–74. DOI: 10.1111/bjh.15650
12. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A. et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica.* 2011; 96: 771–4. DOI: 10.3324/haematol.2010.032805
13. Scheinberg P., Wu C.O., Nunez O., Young N.S. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2009; 144: 206–16. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07450.x
14. Zeng W., Chen G., Kajigaya S. et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood.* 2004; 103: 325–32. DOI: 10.1182/blood-2003-02-0490
15. Nakao S., Takami A., Takamatsu H. et al. Isolation of a T-cell clone showing HLA-DRB1\*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. *Blood.* 1997; 89: 3691–9.
16. Sugimori C., Yamazaki H., Feng X. et al. Roles of DRB1 \*1501 and DRB1 \*1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. *Exp Hematol.* 2007; 35: 13–20. DOI: 10.1016/j.exphem.2006.09.002
17. Nakao S., Takami A., Sugimori N. et al. Response to immunosuppressive therapy and an HLA-DRB1 allele in patients with aplastic anaemia: HLA-DRB1\*1501 does not predict response to antithymocyte globulin. *Br J Haematol.* 1996; 92: 155–8.
18. Zeng W., Kajigaya S., Chen G. et al. Transcript profile of CD4+ and CD8+ T cells from the bone marrow of acquired aplastic anemia patients. *Exp Hematol.* 2004; 32: 806–14. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.06.004
19. Ren J., Hou X.Y., Ma S.H. et al. Elevated expression of CX3C chemokine receptor 1 mediates recruitment of T cells into bone marrow of patients with acquired aplastic anaemia. *J Intern Med.* 2014; 276: 512–24. DOI: 10.1111/joim.12218
20. De Latour R., Visconte V., Takaku T. et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood.* 2010; 116: 4175–84. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266098
21. Gu Y., Hu X., Liu C. et al. Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2008; 142: 109–14. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07161.x
22. Ольшанская Ю.В., Михайлова Е.А., Домрачева Е.В. и др. Клональные хромосомные перестройки у больных апластической анемией в начале заболевания и при трансформации. *Терапевтический архив.* 2006; 78: 31–7.
23. Stanley N., Olson T.S., Babushok D.V. Recent advances in understanding clonal haematopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2017; 177: 509–25. DOI: 10.1111/bjh.14510
- sporin and mycophenolate mofetil. *Br J Haematol.* 2006; 133: 606–11. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06085.x
7. Marsh J. Making therapeutic decisions in adults with aplastic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2006: 78–85. DOI: 10.1182/asheducation-2006.1.78
8. Scheinberg P., Wu C.O., Nunez O., Young N.S. Long-Term Outcome of Pediatric Patients with Severe Aplastic Anemia Treated with Antithymocyte Globulin and Cyclosporine. *J Pediatr.* 2008; 153: 814–9. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.06.004
9. Bacigalupo A., Giammarco S., Sica S. et al. Bone marrow transplantation versus immunosuppressive therapy in patients with acquired severe aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2016; 104: 168–74. DOI: 10.1007/s12185-016-2037-8
10. Dufour C., Pillon M., Sociè G. et al. Outcome of aplastic anaemia in children. A study by the severe aplastic anaemia and paediatric disease working parties of the European group blood and bone marrow transplant. *Br J Haematol.* 2015; 169: 565–73. DOI: 10.1111/bjh.13297
11. Cabannes-Hamy A., Boissel N., Peffault De Latour R. et al. The effect of age in patients with acquired aplastic anaemia treated with immunosuppressive therapy: comparison of Adolescents and Young Adults with children and older adults. *Br J Haematol.* 2018; 183(5): 766–74. DOI: 10.1111/bjh.15650
12. Yoshida N., Yagasaki H., Hama A. et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica.* 2011; 96: 771–4. DOI: 10.3324/haematol.2010.032805
13. Scheinberg P., Wu C.O., Nunez O., Young N.S. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2009; 144: 206–16. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07450.x
14. Zeng W., Chen G., Kajigaya S. et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood.* 2004; 103: 325–32. DOI: 10.1182/blood-2003-02-0490
15. Nakao S., Takami A., Takamatsu H. et al. Isolation of a T-cell clone showing HLA-DRB1\*0405-restricted cytotoxicity for hematopoietic cells in a patient with aplastic anemia. *Blood.* 1997; 89: 3691–9.
16. Sugimori C., Yamazaki H., Feng X. et al. Roles of DRB1 \*1501 and DRB1 \*1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. *Exp Hematol.* 2007; 35: 13–20. DOI: 10.1016/j.exphem.2006.09.002
17. Nakao S., Takami A., Sugimori N. et al. Response to immunosuppressive therapy and an HLA-DRB1 allele in patients with aplastic anaemia: HLA-DRB1\*1501 does not predict response to antithymocyte globulin. *Br J Haematol.* 1996; 92: 155–8.
18. Zeng W., Kajigaya S., Chen G. et al. Transcript profile of CD4+ and CD8+ T cells from the bone marrow of acquired aplastic anemia patients. *Exp Hematol.* 2004; 32: 806–14. DOI: 10.1016/j.exphem.2004.06.004
19. Ren J., Hou X.Y., Ma S.H. et al. Elevated expression of CX3C chemokine receptor 1 mediates recruitment of T cells into bone marrow of patients with acquired aplastic anaemia. *J Intern Med.* 2014; 276: 512–24. DOI: 10.1111/joim.12218
20. De Latour R., Visconte V., Takaku T. et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood.* 2010; 116: 4175–84. DOI: 10.1182/blood-2010-01-266098
21. Gu Y., Hu X., Liu C. et al. Interleukin (IL)-17 promotes macrophages to produce IL-8, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2008; 142: 109–14. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2008.07161.x
22. Olshanskaya J.V., Mikhailova E.A., Domracheva E.V. et al. Clonal chromosomal rearrangements in patients with aplastic anemia at the onset of the disease and during transformation. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2006; 78: 31–7 (In Russian).
23. Stanley N., Olson T.S., Babushok D.V. Recent advances in understanding clonal haematopoiesis in aplastic anaemia. *Br J Haematol.* 2017; 177: 509–25. DOI: 10.1111/bjh.14510

24. Hosokawa K., Katagiri T., Sugimori N. et al. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: A suggestion for revision of the WHO «MDS-U» designation. *Haematologica* 2012; 97: 1845–9. DOI: 10.3324/haematol.2011.061127
25. Maciejewski J.P., Risitano A., Sloand E.M. et al. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood* 2002; 99: 3129–35. DOI: 10.1182/blood.V99.9.3129
26. Sloand E.M., Pfannes L., Chen G. et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood*. 2007;109:2399–405. DOI: 10.1182/blood-2006-01-030643
27. Katagiri T., Sato-Otsubo A., Kashiwase K. et al. Frequent loss of HLA alleles from hematopoietic stem cells in patients with hepatitis-associated aplastic anemia. *Blood* 2011; 118 (21): 6601–10. DOI: 10.1182/blood-2011-07-365189
28. Lane A.A., Odejide O., Kopp N. et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. *Leukemia*. 2013; 27: 968–71. DOI: 10.1038/leu.2013.30
29. Heuser M., Schlarmann C., Dobbernack V. et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica*. 2014; 99(9): 165–7. DOI: 10.3324/haematol.2013.101642
30. Yoshizato T., Dumitriu B., Hosokawa K. et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2015; 373: 35–47. DOI: 10.1056/NEJMoa1414799
31. Kulasekararaj A.G., Jiang J., Smith A.E. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2014; 124: 2698–704. DOI: 10.1182/blood-2014-05-574889
32. Цветаева Н.В. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия. В кн: Руководство по гематологии. Ред. Воробьев А.И. М.: Ньюдиамед, 2007; 797–805.
33. Parker C.J. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*. 2007; 35: 523–33. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.01.046
34. Bessler M., Mason P.J., Hillmen P. et al Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*. 1994; 13: 110–7.
35. Inoue N., Izui-Sarumaru T., Murakami Y. et al. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2006; 108: 4232–6. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025148
36. Miano M., Dufour C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *Int J Hematol*. 2015; 101: 527–35. DOI: 10.1007/s12185-015-1787-z
37. Hu R., Mukhina G.L., Piantadosi S. et al. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. 2005; 105: 3848–54. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1472
38. Mortazavi Y., Tooze J.A., Gordon-Smith E.C., Rutherford T.R. N-RAS gene mutation in patients with aplastic anemia and aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during evolution to clonal disease. *Blood*. 2000; 95: 646–50.
39. Fouassier M., Girodon F., Cleyrat C. et al. Absence of JAK2-V617F in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-associated thrombosis. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 180–2. DOI: 10.1160/TH09-03-0140
40. Shen W., Clemente M.J., Hosono N. et al. Deep sequencing reveals step-wise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014; 124: 4529–38. DOI: 10.1172/JCI74747
41. Maciejewski J.P., Tiu R.V., O’Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2009; 146: 479–88. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07757.x
42. Chen G., Zeng W., Maciejewski J.P. et al. Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in «normal» phenotype cells. *Leukemia*. 2005; 19: 862–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403678
24. Hosokawa K., Katagiri T., Sugimori N. et al. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: A suggestion for revision of the WHO «MDS-U» designation. *Haematologica*. 2012; 97: 1845–9. DOI: 10.3324/haematol.2011.061127
25. Maciejewski J.P., Risitano A., Sloand E.M. et al. Distinct clinical outcomes for cytogenetic abnormalities evolving from aplastic anemia. *Blood*. 2002; 99: 3129–35. DOI: 10.1182/blood.V99.9.3129
26. Sloand E.M., Pfannes L., Chen G. et al. CD34 cells from patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome (MDS) express early apoptotic markers but avoid programmed cell death by up-regulation of antiapoptotic proteins. *Blood*. 2007; 109: 2399–405. DOI: 10.1182/blood-2006-01-030643
27. Katagiri T., Sato-Otsubo A., Kashiwase K. et al. Frequent loss of HLA alleles from hematopoietic stem cells in patients with hepatitis-associated aplastic anemia. *Blood*. 2011; 118 (21): 6601–10. DOI: 10.1182/blood-2011-07-365189
28. Lane A.A., Odejide O., Kopp N. et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. *Leukemia*. 2013; 27: 968–71. DOI: 10.1038/leu.2013.30
29. Heuser M., Schlarmann C., Dobbernack V. et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. *Haematologica*. 2014; 99(9): 165–7. DOI: 10.3324/haematol.2013.101642
30. Yoshizato T., Dumitriu B., Hosokawa K. et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in aplastic anemia. *N Engl J Med*. 2015; 373: 35–47. DOI: 10.1056/NEJMoa1414799
31. Kulasekararaj A.G., Jiang J., Smith A.E. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. *Blood*. 2014; 124: 2698–704. DOI: 10.1182/blood-2014-05-574889
32. Tsvetaeva N.V. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Edited by Vorobiev A.I. Moscow: NewDiamed, 2007; 797–805 (In Russian).
33. Parker C.J. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol*. 2007; 35: 523–33. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.01.046
34. Bessler M., Mason P.J., Hillmen P. et al Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the PIG-A gene. *EMBO J*. 1994; 13: 110–7.
35. Inoue N., Izui-Sarumaru T., Murakami Y. et al. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2006; 108: 4232–6. DOI: 10.1182/blood-2006-05-025148
36. Miano M., Dufour C. The diagnosis and treatment of aplastic anemia: a review. *Int J Hematol*. 2015; 101: 527–35. DOI: 10.1007/s12185-015-1787-z
37. Hu R., Mukhina G.L., Piantadosi S. et al. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood*. 2005; 105: 3848–54. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1472
38. Mortazavi Y., Tooze J.A., Gordon-Smith E.C., Rutherford T.R. N-RAS gene mutation in patients with aplastic anemia and aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during evolution to clonal disease. *Blood*. 2000; 95: 646–50.
39. Fouassier M., Girodon F., Cleyrat C. et al. Absence of JAK2-V617F in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-associated thrombosis. *Thromb Haemost*. 2009; 102: 180–2. DOI: 10.1160/TH09-03-0140
40. Shen W., Clemente M.J., Hosono N. et al. Deep sequencing reveals step-wise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest*. 2014; 124: 4529–38. DOI: 10.1172/JCI74747
41. Maciejewski J.P., Tiu R.V., O’Keefe C. Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies. *Br J Haematol*. 2009; 146: 479–88. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2009.07757.x
42. Chen G., Zeng W., Maciejewski J.P. et al. Differential gene expression in hematopoietic progenitors from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients reveals an apoptosis/immune response in “normal” phenotype cells. *Leukemia*. 2005; 19: 862–8. DOI: 10.1038/sj.leu.2403678

43. Venneker G.T., Asghar S.S. CD59: A molecule involved in antigen presentation as well as downregulation of membrane attack complex. *Exp Clin Immunogenet.* 1992; 9: 33–47.
44. Richards S.J., Rawstron A.C., Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry.* 2000; 42: 223–33.
45. Sutherland D.R., Illingworth A., Keeney M., Richards S.J. High-Sensitivity Detection of PNH Red Blood Cells, Red Cell Precursors, and White Blood Cells. *Curr Protoc Cytom.* 2015; 72: 6.37.1–30. DOI: 10.1002/0471142956.cy0637s72
46. Nishimura J.-I., Kanakura Y., Ware R.E. et al. Clinical Course and Flow Cytometric Analysis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore).* 2004; 83: 193–207. DOI: 10.1097/O1.md.0000126763.68170.46
47. Borowitz M.J., Craig F.E., Digiuseppe J.A. et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytom Part B. Clin Cytom.* 2010; 78: 211–30. DOI: 10.1002/cyto.b.20525
48. Sipol A.A., Babenko E.V., Borisov V.I. et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. *Hematology.* 2015; 20: 31–8. DOI: 10.1179/1607845414Y.0000000162
49. Young N.S., Maciejewski J.P., Sloand E. et al. The relationship of aplastic anemia and PNH. *Int J Hematol.* 2002; 76(2): 168–72.
50. Sugimori C., Chuhjo T., Feng X. et al. Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood.* 2006; 107: 1308–14. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2485
51. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M. et al Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: Results of two-centre prospective study. *Br J Haematol.* 2014; 164: 546–54. DOI: 10.1111/bjh.12661
52. Zhao X., Zhang L.L., Jing L. et al. The role of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in response to immunosuppressive therapy of patients with severe aplastic anemia. *Ann Hematol.* 2015; 94: 1105–10. DOI: 10.1007/s00277-015-2348-5
53. Фидарова З.Т., Михайлова Е.А., Гальцева И.В. и др. Динамика ПНФ-клона у больных апластической анемией в процессе иммуносупрессивной терапии. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61: 490–4.
54. DeZern A.E., Symons H.J., Resar L.S. et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure syndromes. *Eur J Haematol.* 2014; 92: 467–70. DOI: 10.1111/ejh.12299.
55. Winkler T., Hong S.G., Decker J.E. et al. Defective telomere elongation and hematopoiesis from telomerase-mutant aplastic anemia iPSCs. *J Clin Invest.* 2013; 123: 1952–63. DOI: 10.1172/JCI67146
56. Townsley D.M., Dumitriu B., Young N.. Bone marrow failure and the telomeroopathies. *Blood.* 2015; 124: 2775–84. DOI: 10.1182/blood-2014-05-526285
57. Calado R.T., Cooper J.N., Padilla-Nash H.M. et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia.* 2012; 26: 700–7. DOI: 10.1038/leu.2011.272
58. Brümmendorf T.H., Maciejewski J.P., Mak J. et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood.* 2001; 97: 895–900. DOI: 10.1182/blood.V97.4.895
59. Демина И.А., Овсянникова Г.С., Калинина И.И. и др. Значение длины теломера для индивидуализации терапии апластической анемии. *Педиатрия.* 2017; 96 (5): 97–103. DOI: 10.24110/0031-403X-2017-96-5-97-103
60. Young N.S. Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 2010: 30–5.
43. Venneker G.T., Asghar S.S. CD59: A molecule involved in antigen presentation as well as downregulation of membrane attack complex. *Exp Clin Immunogenet.* 1992; 9: 33–47.
44. Richards S.J., Rawstron A.C., Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry.* 2000; 42: 223–33.
45. Sutherland D.R., Illingworth A., Keeney M., Richards S.J. High-Sensitivity Detection of PNH Red Blood Cells, Red Cell Precursors, and White Blood Cells. *Curr Protoc Cytom.* 2015; 72: 6.37.1–29. DOI: 10.1002/0471142956.cy0637s72
46. Nishimura J.-I., Kanakura Y., Ware R.E. et al. Clinical Course and Flow Cytometric Analysis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore).* 2004; 83: 193–207. DOI: 10.1097/O1.md.0000126763.68170.46
47. Borowitz M.J., Craig F.E., Digiuseppe J.A. et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytom Part B. Clin Cytom.* 2010; 78: 211–30. DOI: 10.1002/cyto.b.20525
48. Sipol A.A., Babenko E.V., Borisov V.I. et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. *Hematology.* 2015; 20: 31–8. DOI: 10.1179/1607845414Y.0000000162
49. Young N.S., Maciejewski J.P., Sloand E. et al. The relationship of aplastic anemia and PNH. *Int J Hematol.* 2002; 76(2): 168–72.
50. Sugimori C., Chuhjo T., Feng X. et al. Minor population of CD55-CD59-blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood.* 2006; 107: 1308–14. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2485
51. Kulagin A., Lisukov I., Ivanova M. et al Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: Results of two-centre prospective study. *Br J Haematol.* 2014; 164: 546–54. DOI: 10.1111/bjh.12661
52. Zhao X., Zhang L.L., Jing L. et al. The role of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in response to immunosuppressive therapy of patients with severe aplastic anemia. *Ann Hematol.* 2015; 94: 1105–10. DOI: 10.1007/s00277-015-2348-5
53. Fidarova Z.T., Mikhailova E.A., Galtseva I.V. et al. PNH-clon dynamics in aplastic anemia patients during immunosuppressive therapy. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2016; 61: 490–4 (In Russian).
54. DeZern A.E., Symons H.J., Resar L.S. et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones to exclude inherited bone marrow failure syndromes. *Eur J Haematol.* 2014; 92: 467–70. DOI: 10.1111/ejh.12299
55. Winkler T., Hong S.G., Decker J.E. et al. Defective telomere elongation and hematopoiesis from telomerase-mutant aplastic anemia iPSCs. *J Clin Invest.* 2013; 123: 1952–63. DOI: 10.1172/JCI67146
56. Townsley D.M., Dumitriu B., Young N.. Bone marrow failure and the telomeroopathies. *Blood.* 2015; 124: 2775–84. DOI: 10.1182/blood-2014-05-526285
57. Calado R.T., Cooper J.N., Padilla-Nash H.M. et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia.* 2012; 26: 700–7. DOI: 10.1038/leu.2011.272
58. Brümmendorf T.H., Maciejewski J.P., Mak J. et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood.* 2001; 97: 895–900. DOI: 10.1182/blood.V97.4.895
59. Demina I.A., Ovsyannikova G.S., Kalinina I.I. et al. Telomere length value for individualization of aplastic anemia therapy. *Pediatr.* 2017; 96(5): 97–103. DOI: 10.24110/0031-403X-2017-96-5-97-103 (In Russian).
60. Young N.S. Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010; 2010: 30–5.

61. Кулагин А.Д., Борисов В.И., Пронкина Н.В. и др. Частота и прогностическое значение укорочения теломерных участков ДНК при апластической анемии. *Гематология и трансфузиология*. 2014; 59: 20.

62. Narita A., Muramatsu H., Sekiya Y. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica*. 2015; 100: 1546–52. DOI: 10.3324/haematol.2015.132530

### Информация об авторах

**Фидарова Залина Таймуразовна\***, кандидат медицинских наук, заведующая отделением химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с дневным стационаром ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: zalinafidarova@mail.ru;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

**Абрамова Анастасия Владимировна**, врач отделения высокодозной интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: anastasia.abramova@list.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8113-6115>;

**Лучкин Антон Владимирович**, врач отделения высокодозной интенсивной химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения с круглосуточным стационаром ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
e-mail: a\_luchkin@rambler.ru, тел.: +7(495) 612-45-92;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4400-4711>

### \* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 25.04.2019

Принята к печати: 12.09.2019

61. Kulagin A.D., Borisov V.I., Pronkina N.V. et al. The frequency and prognostic value of the shortening of telomeric DNA regions in aplastic anemia. *Gematologiya i transfusiologiya* 2014; 59:20 (In Russian).

62. Narita A., Muramatsu H., Sekiya Y. et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. *Haematologica*. 2015; 100: 1546–52. DOI: 10.3324/haematol.2015.132530

### Information about the authors

**Zalina T. Fidarova\***, Cand. Sci. (Med.), Head of the Department of Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoiesis Depressions with a Day In-patient Facility, National Research Center for Hematology,  
e-mail: zalinafidarova@mail.ru;  
ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0934-6094>

**Anastasia V. Abramova**, MD, Department of High-Dose Intensive Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoiesis Depressions with a 24-hour In-patient facility, National Research Center for Hematology,  
e-mail: anastasia.abramova@list.ru  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8113-6115>;

**Anton V. Luchkin**, MD, Department of High-Dose Intensive Chemotherapy for Hemoblastoses and Hematopoiesis Depressions with a 24-hour In-patient facility, National Research Center for Hematology,  
e-mail: a\_luchkin@rambler.ru, тел.: +7(495) 612-45-92;  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4400-4711>

### \* Corresponding author

Received 25 Apr 2019

Accepted 12 Sep 2019