

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ АКТИВАЦИИ КОМПЛЕМЕНТА У БОЛЬНЫХ ПАРОКСИЗМАЛЬНОЙ НОЧНОЙ ГЕМОГЛОБИНУРИЕЙ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКУЛИЗУМАБОМ

Тарасова Ю. В.¹, Климова О. У.², Андреева Л. А.¹, Васина Л. В.¹, Галевская Л. В.¹, Бабенко Е. В.², Кулагин А. Д.^{2*}

¹ Кафедра биологической химии, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022, Санкт-Петербург, Россия

² НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197022, Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Экулизумаб подавляет терминальные этапы активации комплемента и является стандартом лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (ПНГ). Недостаточно стабильная ингибция комплемента обуславливает «прорывной» внутрисосудистый гемолиз и субоптимальный ответ на терапию экулизумабом у части больных ПНГ.

Цель исследования — оценить стабильность ингибирования комплемента при лечении экулизумабом больных ПНГ с помощью тестирования кинетических параметров активации комплемента.

Материалы и методы. В исследование включены 12 больных ПНГ, длительно получающих экулизумаб (медиана — 54 мес, разброс 4–66 мес). Медиана возраста составляла 35 лет (от 22 до 68 лет), 92% больных были лица женского пола. Медиана размера клона ПНГ составляла 96% среди гранулоцитов. Контрольную группу составили 12 здоровых доноров (возраст 25–60 лет, женщины — 75%). Активацию комплемента оценивали непосредственно перед очередной инфузией экулизумаба и далее — через 5 и 10 дней. Кинетические параметры (период индукции, скорость гемолиза, T50 — время, необходимое для достижения 50% гемолиза) регистрировали отдельно для общей активности комплемента и альтернативного пути активации с использованием эритроцитов кролика (ЭК).

Результаты. Параметры активации комплемента непосредственно перед очередным введением экулизумаба соответствовали выраженному торможению общей активности системы. Индукционный период был удлинён в 7 раз по сравнению с контролем (медиана 180 против 25 секунд, $p < 0,0001$), а скорость гемолиза оказалась меньше в 28 раз (медиана 1,6 против $45,1 \times 10^6$ ЭК/мин, $p < 0,0001$). Величина T50 превышала значения контроля в 20 раз (медиана 690 против 35 секунд, $p < 0,0001$). Параметры альтернативного пути активации комплемента были снижены в 2–3 раза по сравнению с контролем. В одном случае повторные тестирования выявили недостаточную ингибцию комплемента, что было ассоциировано с фармакокинетическим «прорывным» гемолизом. Степень дальнейшей ингибции комплемента и тенденция к восстановлению активности существенно варьировали при динамическом тестировании на 5-й и 10-й день после инфузии экулизумаба.

Заключение. Результаты исследования продемонстрировали индивидуальные различия остаточной активности комплемента у больных ПНГ, длительно получающих терапию экулизумабом. Тестирование активности комплемента обосновано при субоптимальном ответе на терапию экулизумабом и при рассмотрении коррекции терапии. Кинетическая регистрация остаточного комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика демонстрирует более высокую чувствительность, чем традиционное исследование CH50.

Ключевые слова: комплемент, кинетика активации, пароксизмальная ночная гемоглобинурия, экулизумаб, прорывной гемолиз

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Для цитирования: Тарасова Ю.В., Климова О.У., Андреева Л.А., Васина Л.В., Галевская Л.В., Бабенко Е.В., Кулагин А.Д. Кинетические параметры активации комплемента у больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией при лечении экулизумабом. Гематология и трансфузиология. 2020; 65(2): 126–137. <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-2-126-137>

KINETIC PARAMETERS OF COMPLEMENT ACTIVATION IN PATIENTS WITH PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA DURING ECULIZUMAB THERAPY

Tarasova Yu. V.¹, Klimova O. U.², Andreeva L. A.¹, Vasina L. V.¹, Galebskaya L. V.¹, Babenko E. V.², Kulagin A. D.^{2*}

¹ Department of Biological Chemistry, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, St. Petersburg, Russian Federation

² Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, 197022, St. Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. Eculizumab inhibits the terminal steps of complement activation and is the standard treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). Unstable complement inhibition causes “breakthrough” intravascular hemolysis and a suboptimal response to eculizumab therapy in some patients with PNH.

Aim: to evaluate the stability of complement inhibition in eculizumab treatment by testing the kinetic parameters of complement activation.

Materials and methods. The study included 12 PNH patients receiving long-term eculizumab therapy (median 54 months, range 4–66 months). The median age was 35 years (from 22 to 68 years), 92% of patients were female. The median PNH clone size was 96 % of the granulocytes. The control group consisted of 12 healthy donors (age 25–60 years, women 75%). Complement activation was evaluated immediately prior to the next eculizumab infusion, and then again after 5 and 10 days. Kinetic parameters (induction period, hemolysis rate, T50—the time required to achieve 50 % hemolysis) were recorded separately for the total complement activity and an alternative activation pathway using rabbit red blood cells (rRBC).

Results. The parameters of complement activation directly before the next eculizumab administration corresponded to a marked inhibition of the overall activity of the system. The induction period was extended by 7 times compared to the control (median 180 vs 25 seconds, $p < 0.0001$), and the hemolysis rate was 28 times less (median 1.6 vs 45.1×10^6 rRBC/min, $p < 0.0001$). The T50 value exceeded the control value by 20 times (median 690 vs 35 seconds, $p < 0.0001$). The parameters of the alternative complement activation pathway were reduced by 2–3 times compared to the control. In one case, repeated tests revealed insufficient complement inhibition, which was associated with pharmacokinetic “breakthrough” hemolysis. The degree of further complement inhibition and the tendency to restore activity varied significantly during dynamic testing on days 5 and 10 after eculizumab infusion.

Conclusion. The results of this study demonstrate individual differences in the residual activity of complement in PNH patients receiving long-term eculizumab therapy. Testing of complement activity is necessary with a suboptimal response to eculizumab therapy and when considering therapy correction. Kinetic registration of residual complement-dependent lysis of rabbit red blood cells demonstrates a higher sensitivity than the traditional CH50 study.

Keywords: complement, activation kinetics, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, eculizumab, breakthrough hemolysis

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

Financial disclosure: the study had no sponsorship.

For citation: Tarasova Yu.V., Klimova O.U., Andreeva L.A., Vasina L.V., Galebskaya L.V., Babenko E.V., Kulagin A.D. Kinetic parameters of complement activation in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during eculizumab therapy. Russian Journal of Hematology and Transfusiology (Gematologiya i transfuziologiya). 2020; 65(2): 126–137. (in Russian). <https://doi.org/10.35754/0234-5730-2020-65-2-126-137>

Введение

Пароксизмальная ночная гемоглобинурия (ПНГ) — это приобретенное заболевание, связанное с соматической мутацией в стволовых кроветворных клетках гена *PIG-A*, который кодирует ранние этапы синтеза гликозилфосфатидинозитолового (GPI) якоря [1]. GPI-якорь осуществляет фиксацию на мембране мно-

гих белков, включая ингибиторы каскада комплемента CD55 и CD59 [2]. Эти мембранные белки препятствуют комплемент-зависимому разрушению собственных клеток механизмом реактивного лизиса. Отсутствие на эритроцитарных мембранах CD55 и CD59 приводит к выраженному комплемент-опосредованному

внутрисосудистому гемолизу, уменьшению времени жизни эритроцитов более чем в 2 раза, гемоглобинемии, деплеции оксида азота [3, 4]. Развиваются характерные для ПНГ симптомы и осложнения: анемия, гемоглинурия, желтуха, дисфагия, боли, тромбозы, нарушение функции почек, которые приводят к инвалидизации и высокой смертности больных [5–7]. В России клиническая характеристика и прогноз ПНГ у взрослых и детей были детально изучены в больших когортных исследованиях ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова [8, 9].

Применение гуманизированных моноклональных антител к компоненту C5 (экулизумаб), блокирующих C5-конвертазу как альтернативного (АПК), так и классического (КПК) путей активации комплемента, купирует внутрисосудистый гемолиз, значительно улучшает состояние и снижает смертность больных ПНГ [10–13]. Однако у 30% больных развивается лишь субоптимальный ответ на терапию экулизумабом, у них может сохраняться анемия и потребность в трансфузиях эритроцитов, возникать «прорывной» внутрисосудистый или *de novo* C3-опосредованный внесосудистый гемолиз [14]. Это объясняется комплексом причин и механизмов, среди которых рассматриваются сопутствующая костномозговая недостаточность, индивидуальные параметры фармакокинетики экулизумаба, комплемент-активирующие состояния (КАС), опсонизация эритроцитов фрагментами C3 компонента комплемента и другие [15]. В поддерживающей фазе препарат вводится в стандартной дозе 900 мг один раз в 14 дней. При этом достигаемый индивидуальный профиль и устойчивость ингибиции комплемента изучены недостаточно. «Прорывной» внутрисосудистый гемолиз является одним из ключевых компонентов субоптимального ответа на терапию экулизумабом, развивается на фоне регулярной терапии в стандартном дозовом режиме и характеризуется возвратом клинических и лабораторных проявлений ПНГ (слабость, гемоглинурия, боли, увеличение сывороточной концентрации лактатдегидрогеназы, уменьшение концентрации гемоглобина крови и другие), в том числе с риском тяжелого гемолитического криза, острого повреждения почек и тромбозов. В связи с этим для индивидуализации терапии ПНГ экулизумабом целесообразно проводить промежуточную оценку состояния системы комплемента [16, 17].

Общепринятый метод оценки функциональной активности комплемента — это величина CH50, то есть количество комплемента, которое лизирует 50% стандартной взвеси сенсibilизированных эритроцитов барана [18]. Сенсibilизированные эритроциты барана являются инициаторами только КПК, к которому путем амплификации подключается АПК. Раздельная регистрация активности КПК и АПК с применением этих клеток невозможна. Эритроциты кролика счи-

таются инициаторами АПК. Это действительно так, но только в условиях блокады КПК с помощью хелации ионов кальция добавлением к сыворотке крови этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА). Без ЭГТА эритроциты кролика, атакованные природными антителами (IgG и IgM) человека, иницируют КПК [19]. Антигеном мембраны эритроцитов кролика, к которому в сыворотке крови человека имеется высокий титр антител, является углеводный компонент Gal alpha-1,3Gal beta-1,4GlcNAc-R (α -галактозилный эпитоп), широко распространенный среди микроорганизмов [20]. Ранее нами был предложен и охарактеризован кинетический метод раздельного определения активности комплемента по АПК и КПК, который отличался высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью [21].

В настоящей работе впервые изучены параметры лизиса эритроцитов кролика по АПК и по общему комплементу (ОК), АПК + КПК в сыворотке крови больных ПНГ в динамике одного цикла введения экулизумаба. Оценена стабильность ингибирования комплемента на фоне терапии экулизумабом с помощью кинетического метода тестирования активности комплемента.

Цель исследования — оценить стабильность ингибирования комплемента при лечении экулизумабом с помощью тестирования кинетических параметров активации комплемента

Материалы и методы

Больные

В исследование включались больные с верифицированным диагнозом ПНГ, постоянно получающие терапию экулизумабом в НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Размер клона ПНГ определяли методом высокочувствительной проточной цитометрии по ранее детально описанному стандартному протоколу [22]. Медиана времени от последнего тестирования размера клона до включения в исследование составила 18 (5–131) дней.

В исследование были включены 12 больных, краткая характеристика которых приведена в таблице 1. В когорте преобладали женщины (92%), медиана возраста составила 35 лет (от 22 до 68 лет). Классическая форма заболевания (кПНГ) имела у 8 (67%) больных, 4 (33%) больных имели анамнез апластической анемии (АА/ПНГ). Размер клона ПНГ (медиана) на момент исследования составлял 96% среди гранулоцитов и моноцитов и 81% среди эритроцитов. Все больные до начала лечения имели интенсивный хронический внутрисосудистый гемолиз и показания для терапии экулизумабом согласно текущим

Таблица 1. Характеристика больных
Table 1. Patient characteristics

| № больного UPN | Возраст, лет Age, years | Пол Gender | Вариант ПНГ PNH type | Размер клона ПНГ, % PNH clone size, % | | | ЛДГ, ×ВГН LDH, ×ULN | | Терапия экулизумабом, мес Eculizumab therapy, months | «Прорывной» внутрисудистый гемолиз ВГН |
|--|-------------------------------|------------------|----------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--|--|---|
| | | | | гранулоциты granulocytes | моноциты Monocytes | эритроциты RBC | До лечения Before therapy | На момент исследования At the time of the study | | |
| 1 | 28 | Ж F | кПНГ cPNH | 97,08 | 96,54 | 99,40 | 24,74 | 1,25 | 4 | нет no |
| 2 | 27 | Ж F | АА/ПНГ AA/PNH | 39,98 | 63,3 | 16,87 | 2,09 | 1,42 | 12 | нет no |
| 3 | 32 | Ж F | кПНГ cPNH | 95,99 | 95,75 | 70,23 | 8,06 | 1,09 | 66 | КАС CAC |
| 4 | 68 | М M | кПНГ cPNH | 53,49 | 72,03 | 21,19 | 3,59 | 1,41 | 56 | нет no |
| 5 | 65 | Ж F | кПНГ cPNH | 99,96 | 99,97 | 99,59 | 11,64 | 1,76 | 42 | КАС CAC |
| 6 | 33 | Ж F | кПНГ cPNH | 99,67 | 99,81 | 98,38 | 10,83 | 1,93 | 60 | КАС CAC |
| 7 | 26 | Ж F | АА/ПНГ AA/PNH | 96,10 | 95,73 | 99,77 | 12,03 | 0,77 | 42 | нет no |
| 8 | 46 | Ж F | кПНГ cPNH | 96,08 | 95,86 | 88,14 | 14,75 | 1,29 | 30 | КАС CAC |
| 9 | 37 | Ж F | кПНГ cPNH | 79,08 | 74,7 | 57,29 | 9,21 | 1,26 | 60 | КАС CAC |
| 10 | 37 | Ж F | АА/ПНГ AA/PNH | 93,32 | 91,73 | 41,66 | 6,85 | 1,58 | 66 | ФК и КАС FC and CAC |
| 11 | 49 | Ж F | кПНГ cPNH | 96,06 | 94,64 | 95,86 | 6,24 | 1,01 | 54 | нет no |
| 12 | 22 | Ж F | АА/ПНГ AA/PNH | 99,83 | 99,35 | 74,06 | 3,63 | 1,26 | 54 | ФК FC |
| Медиана, диапазон Median, range | 35 (22–68) | НП NA | | 96,07 (39,98– 99,96) | 95,74 (63,3– 99,97) | 81,10 (16,87– 99,77) | 8,84 (2,09–24,74) | 1,28 (0,77–1,93) | 54 (4–66) | НП NA |

Примечание. Ж — женщины; М — мужчины; кПНГ — классическая ПНГ; АА/ПНГ — апластическая анемия/ПНГ; ВГН — верхняя граница нормальных значений; ФК — фармакокинетический «прорывной» гемолиз; КАС — комплемент-активирующие состояния; НП — не применимо.

Note. UPN — unique patient number; F — female; M — male; cPNH — classic PNH; AA/PNH — aplastic anemia/PNH; Gran. — granulocytes; Mon. — monocytes; RBC — red blood cells; ULN — the upper limit of normal values; BTH — breakthrough intravascular hemolysis; FC — complement-activating conditions; CAC — complement-activating conditions; NA — not applicable.

Национальным рекомендациям [23]. Концентрация лактатдегидрогеназы (ЛДГ) сыворотки крови до начала терапии экулизумабом у всех больных значительно превышала 1,5 верхней границы нормальных значений (ВГН), медиана составила 8,8 ВГН (2,1–24,7).

Исследование проводилось на этапе поддерживающей терапии. Продолжительность терапии экулизумабом варьировала от 4 до 66 мес, медиана — 54 мес. Препарат экулизумаб (Солирис®, Alexion Pharmaceuticals, Inc., Boston, MA, США) вводили внутривенно по 900 мг каждые 14 дней.

«Прорывной» внутрисосудистый гемолиз диагностировался в случае возобновления клинических симптомов и лабораторных проявлений ПНГ на фоне регулярной терапии экулизумабом в стандартном дозовом режиме. Лабораторным критерием «прорывного» гемолиза было повышение сывороточной концентрации ЛДГ выше 2 ВГН при документации ее снижения ниже 1,5 ВГН на предшествующих этапах лечения экулизумабом.

Критерием фармакокинетического «прорывного» гемолиза был повторяющийся (стереотипный) характер развития клинических и лабораторных проявлений за 1–4 дня до очередного введения экулизумаба. Фармакодинамический «прорывной» гемолиз диагностировался при документированной связи эпизода с комплемент-активирующим состоянием (инфекция, операция, беременность и др.).

Стереотипный фармакокинетический «прорывной» внутрисосудистый гемолиз предполагался у 2 больных (№ 10 и 12), еще у 5 больных имелись отдельные эпизоды фармакодинамического «прорывного» гемолиза, связанные с беременностью ($n = 3$) и инфекцией ($n = 2$). На момент исследования во всех случаях имелся клинический контроль внутрисосудистого гемолиза, сывороточная концентрация ЛДГ составляла 1,28 ВГН (0,77–1,93).

Контрольную группу составили 12 здоровых доноров (9 женщин и 3 мужчин) в возрасте от 25 до 60 лет. Исследование носило наблюдательный характер, одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, от всех больных было получено информированное согласие в соответствии с Хельсинкской декларацией.

Определение кинетических параметров активации комплемента

Забор образцов крови для исследования проводили непосредственно перед очередной инфузией экулизумаба ($n = 12$). Динамическое тестирование через 5 и 10 дней после инфузии выполнено у 11 больных. Выбор точек исследования предполагал остаточную ингибицию комплемента перед очередным введением экулизумаба, максимальное ингибирование — на пятый день и тенденцию к утрате ингибиции

к десятому дню цикла лечения в случае развития фармакокинетического прорывного гемолиза.

В качестве инициаторов как КПК, так и АПК использовали трижды отмытые 0,9% раствором хлорида натрия эритроциты кролика (ЭК). В термостатированную при 37°С кювету спектрофотометра СФ-2000 (ООО «ЛЮМО», Санкт-Петербург) вносили 0,1 мл сыворотки крови, 0,4 мл 5 мМ вероналово-мединалового буфера (VBS; pH = 7,4) и 0,2 мл физиологического раствора. Смесь прогревали в течение 3 мин и добавляли 0,1 мл стандартной взвеси эритроцитов кролика ($1,8 \times 10^6$ клеток/мл). С этого момента проводили 5-секундную регистрацию динамики оптической плотности при 800 нм. Полученные параметры характеризовали суммарную активность КПК и АПК, т. е. ОК. Для регистрации комплементзависимого гемолиза в условиях активации комплемента только по АПК вместо VBS вносили ЭГТА-VBS, то есть буфер, содержащий 10 мМ ЭГТА, блокирующий КПК. После завершения гемолиза измеряли параметры активности комплемента, а именно: lag-t (индукционный период от момента внесения ЭК до начала снижения экстинкции, с); V (скорость гемолиза, $\times 10^6$ ЭК/мин) и T50 (период времени от внесения ЭК до лизиса 50% клеток, с).

Статистический анализ. В связи с небольшой выборкой и отличным от нормального распределением числовых рядов для описательной характеристики использованы медианы, минимальные и максимальные значения. Различия значений кинетических параметров активации комплемента между анализируемой группой больных и контрольной группой здоровых доноров оценивались с помощью U-теста Манна — Уитни. О наличии изменений параметров активации комплемента на 5-й и 10-й дни после введения экулизумаба судили по величине критерия Фридмана. Корреляционные связи показателей активации комплемента между собой, с длительностью терапии экулизумабом и с концентрацией билирубина тестировались с использованием рангового коэффициента Спирмена. Тестирование альтернативной гипотезы было двусторонним, статистически значимым при значении $p < 0,05$. Статистический анализ проводился с использованием пакетов Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) и EZR, версия 2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing, Вена, Австрия).

Результаты

Кинетические параметры активации системы комплемента больных перед очередной инфузией экулизумаба

Параметры активации комплемента в сыворотке крови, полученной непосредственно перед очередным введением экулизумаба, соответствовали выраженному торможению активности системы по сравнению с контролем (рис. 1).

Особенно значительным было снижение параметров суммарной активности КПК + АПК: по сравнению с контролем индукционный период был увеличен в 7 раз (медиана 180 с (50–300 с) против 25 с (20–30 с), $p < 0,0001$), а скорость гемолиза оказалась меньше в 28 раз (медиана $1,6 \times 10^6$ ЭК/мин ($1,0–9,7 \times 10^6$ ЭК/мин) против $45,1 \times 10^6$ ЭК/мин ($35,9–52,8 \times 10^6$ ЭК/мин), $p < 0,0001$). Соответственно величина $T50$ превышала значения контроля почти в 20 раз (медиана 690 с (110–900 с) против 35 с (30–45 с), ($p < 0,0001$).

Активность АПК как по скорости гемолиза, так и по величинам индукционного периода и $T50$ у больных также была снижена, однако не столь значительно по сравнению с ОК. Медиана $\text{lag-}t$, скорости гемолиза и времени лизиса 50% клеток составили 350 с (270–450 с), $3,0 \times 10^6$ ЭК/мин ($2,3–7,6 \times 10^6$ ЭК/мин) и 585 с (440–720 с) против 152,5 с (100–190 с), $9,25 \times 10^6$ ЭК/мин ($7,3–10,9 \times 10^6$ ЭК/мин) и 307,5 с (230–380 с) соответственно в контрольной группе ($p < 0,0001$) (рис. 1).

Поскольку компонент C5 участвует во всех путях активации комплемента, можно предположить, что более значительное торможение ОК обусловлено дополни-

тельными причинами. В связи с известной способностью высоких концентраций неконъюгированного билирубина тормозить цитолиз по КПК был проведен дополнительный анализ потенциального значения этого феномена. У 10 из 12 обследованных больных (кроме больных 5 и 7) концентрация билирубина превышала норму и колебалась от 28,7 до 91,1 мкмоль/л за счет конъюгированного билирубина (22,6–79,9 мкмоль/л). Существенного повышения сывороточной концентрации неконъюгированного билирубина не отмечалось (5,1–13,3 мкмоль/л). В связи с этим корреляция между параметрами активации комплемента и концентрацией неконъюгированного билирубина в сыворотке крови отсутствовала (ОК $\text{lag-}t$, $r = -0,09$; ОК V , $r = 0,01$; ОК $T50$, $r = -0,21$, $p > 0,05$).

Параметры активации комплемента перед очередной инфузией экулизумаба не зависели от длительности предшествующей терапии (ОК $\text{lag-}t$, $r = -0,06$; ОК V , $r = 0,13$; ОК $T50$, $r = -0,36$, $p > 0,05$). Но при индивидуальном сравнении параметров активации комплемента был обнаружен ряд особенностей. У больной № 10 параметры активации ОК оказались близки значениям,

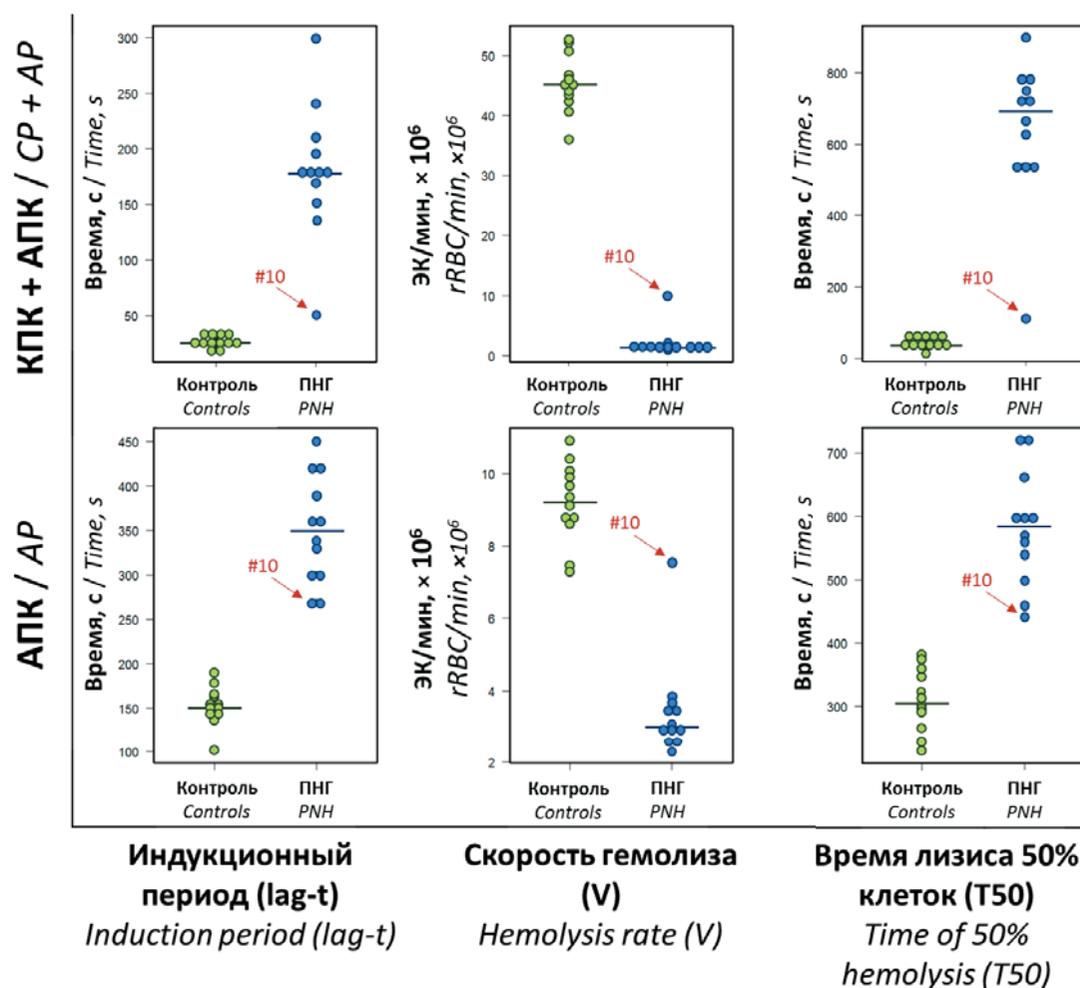


Рисунок 1. Кинетические параметры активации комплемента у здоровых доноров ($n = 12$) и больных ПНГ ($n = 12$) непосредственно перед очередной инфузией экулизумаба (день 0). КПК — классический путь активации комплемента; АПК — альтернативный путь активации комплемента; ЭК — эритроциты кролика

Figure 1. Kinetic parameters of complement activation in healthy donors ($n = 12$) and patients with PNH ($n = 12$) immediately before the infusion of eculizumab (day 0). CP — classical pathway; AP — alternative pathway; rRBC — rabbit red blood cell

характерным для контрольной группы (рис. 1). Именно показатели этой больной ($lag-t = 50$ с, $V = 9,7 \times 10^6$ ЭК/мин, $T50 = 110$ с) обусловили большой разброс данных по параметрам ОК во всей группе обследованных. При повторном исследовании в другом цикле введения препарата были вновь получены близкие результаты ($lag-t = 45$ с, $V = 35 \times 10^6$ ЭК/мин, $T50 = 130$ с), соответствующие показателям здоровых доноров. При этом параметры активации комплемента по альтернативному пути у данной больной, за исключением скорости гемолиза, были близки к параметрам остальных больных, то есть к моменту очередной инфузии экулизумаба АПК оставался подавленным. Следовательно, высокая активность ОК у данной больной была преимущественно обусловлена повышенной активностью КПК.

Среди особенностей этого случая следует отметить сравнительно низкий процент клона дефектных по CD59 эритроцитов (42%) при истинном размере клона более 90% и повышение сывороточной активности ЛДГ более 1,5 ВГН, что свидетельствует о сохранении достаточно активного внутрисосудистого гемолиза к моменту очередного введения экулизумаба. У данной больной имело место сочетание эпизодов фармакодинамического «прорывного» внутрисосудистого гемолиза, связанного с КАС (впервые дебютировавшая целиакия) с последующими стереотипными

эпизодами фармакокинетического «прорывного» гемолиза непосредственно перед очередным введением экулизумаба, уже в отсутствие отчетливых КАС.

Еще у одной больной (№ 12) с предполагаемым фармакокинетическим «прорывным» гемолизом степень ингибиции комплемента непосредственно перед очередной инфузией экулизумаба была выраженной и не отличалась от других больных. Последующее углубленное тестирование и эффективный контроль заболевания на фоне экспериментальной терапии ингибитором С3 показали ключевой вклад С3-опосредованного внесосудистого гемолиза в субоптимальный ответ на экулизумаб в данном наблюдении.

Динамика изменения параметров активации комплемента в процессе лечения экулизумабом

Варьирование степени ингибиции комплемента непосредственно до очередного введения экулизумаба подтверждалось при динамическом тестировании на 5-й и 10-й дни цикла лечения (рис. 2).

На пятый день после инфузии экулизумаба изменения всех показателей, как ОК, так и АПК, свидетельствовали о достоверном дальнейшем торможении системы: скорость комплементзависимого гемолиза (V) снижалась, а $lag-t$ и $T50$ увеличивались. По параме-

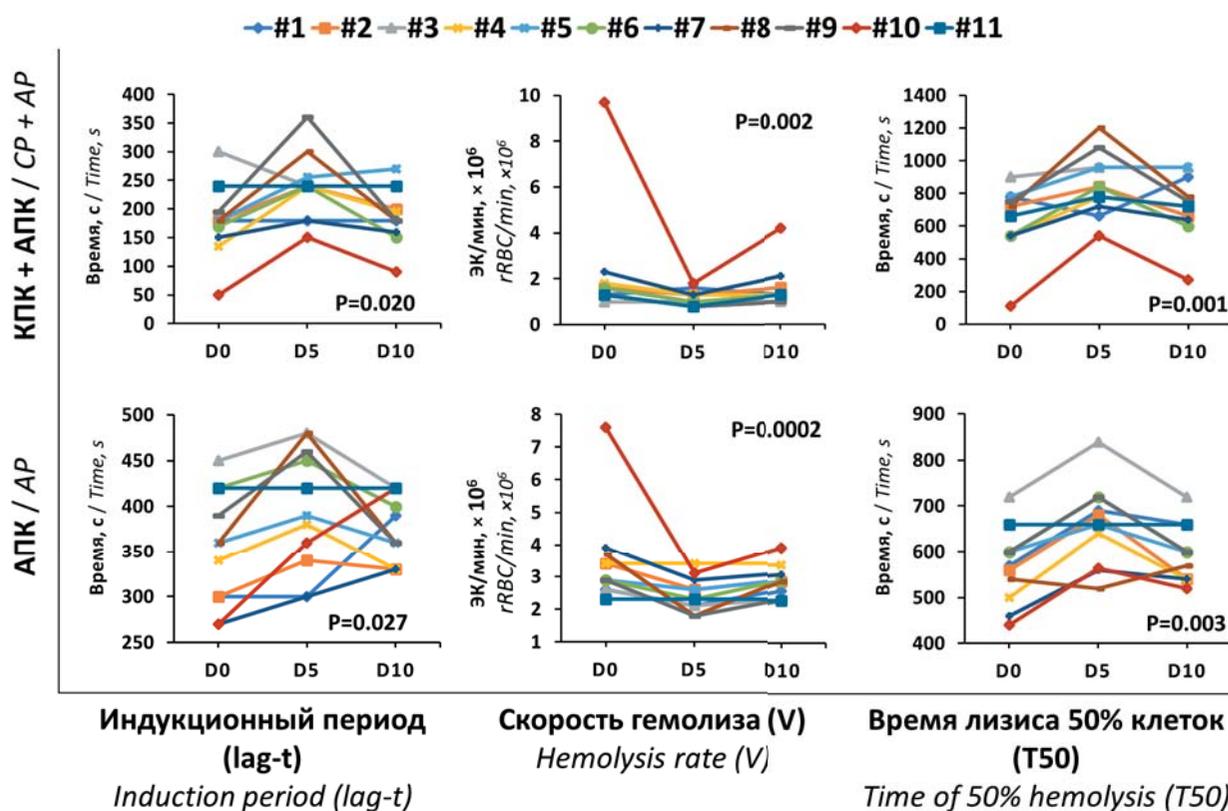


Рисунок 2. Динамика параметров активации комплемента у больных ПНГ ($n = 11$) в процессе одного цикла поддерживающего лечения экулизумабом (D0 — до инфузии экулизумаба, D5 — 5-й день, D10 — 10-й день). КПК — классический путь активации комплемента; АПК — альтернативный путь активации комплемента; ЭК — эритроциты кролика

Figure 2. Dynamics of complement activation parameters in patients with PNH ($n = 11$) during one cycle of maintenance treatment with eculizumab (D0 — before infusion of eculizumab, D5 — Day 5, D10 — Day 10). CP — classical pathway; AP — alternative pathway; rRBC — rabbit red blood cell

трам ОК дальнейшего торможения не было выявлено, или оно было минимальным у 3 больных (№ 1, 2 и 11) по lag-периоду и у двух (№ 1 и 3) — по скорости гемолиза. В АПК исключений было меньше: у больной № 11 не было изменений ни lag-периода, ни скорости гемолиза, а у больного № 4 — только скорости гемолиза.

На десятый день цикла лечения экулизумабом изменения параметров активации комплемента были индивидуальны. У 5 больных торможение АПК еще усилилось (больные № 1, 2, 7, 9, 10), у троих больных (№ 5, 8, 11) параметр вернулся к исходному значению и еще у троих (больные № 3, 4, 6) стал ниже исходной величины.

Между величинами lag- t и V у обследованной группы больных наблюдалась сильная отрицательная корреляция ($r = -0,96$; $p < 0,001$ и $r = -0,87$; $p < 0,01$ соответственно по ОК и КПК). В связи с этим, по нашему мнению, самым информативным является показатель $T50$, который включает и lag- t , и время лизиса до достижения 50% суспензии клеток.

Из рисунка 2 видно, что на пятый день после инфузии экулизумаба у всех больных, кроме больного № 1, величина $T50$ повысилась, что свидетельствовало о дальнейшем выраженном торможении комплемента. Особенно значительным (более чем в 4 раза) было повышение $T50$ у больной № 10, у которой отмечалась высокая исходная общая активность комплемента. Повторное исследование больной № 10 выявило более чем четырехкратного торможения комплемента на пятый день после инфузии экулизумаба. Тем не менее степень ингибиции общей активности комплемента в данном случае не достигала параметров большинства других больных.

Величина $T50$ при активации комплемента по альтернативному пути на пятый день после инфузии экулизумаба повышалась у всех больных, кроме больной № 11. Однако прирост величины не давал таких высоких значений, как при ОК, в отношении некоторых больных, в том числе больной № 10.

На десятый день после инфузии экулизумаба только у 5 больных сохранялось дальнейшее подавление активности комплемента ($T50$ превышало исходную величину), еще у 5 больных показатель $T50$ возвращался к исходному значению, а у 1 больного имелось раннее снижение показателя.

Таким образом, несмотря на хороший клинический эффект длительной терапии экулизумабом, документированы значительные индивидуальные различия остаточной активности комплемента у больных ПНГ. Клиническое значение выявленных индивидуальных параметров подавления комплемента на фоне терапии экулизумабом отчетливо прослеживается у больной № 10, у которой стереотипный характер «прорывного» гемолиза строго связан с недостаточной ингибицией комплемента.

Обсуждение

Терапия ингибитором терминальных этапов активации комплемента — препаратом экулизумаб является стандартом лечения больных ПНГ, улучшающим состояние больных и эффективно предотвращающим новые тромботические и органические осложнения. При этом почти у 20% больных развился «прорывной» внутрисосудистый гемолиз, а анемия разной степени тяжести персистировала, как минимум, у половины больных [14]. Эти клинические признаки свидетельствуют об отсутствии полной блокады комплемента. При этом исследование активации комплемента у больных ПНГ до настоящего времени не входит в стандарты мониторинга эффективности длительной терапии ингибитором C5 компонента комплемента. В настоящем исследовании впервые у больных, длительно получающих терапию экулизумабом, проведен анализ параметров активации комплемента кинетическим методом отдельного определения активности комплемента по АПК и КПК.

По данным P. R. de Latour и соавт. [16], остаточная активность комплемента, определяемая по традиционной величине $CH50$, регистрировалась только в половине образцов сыворотки крови больных ПНГ, получавших экулизумаб. Тем не менее авторы выявили обратную связь между концентрацией экулизумаба и активностью комплемента в крови больных. Другие авторы, отмечая важность регистрации активности комплемента, не выявили комплементзависимого лизиса эритроцитов курицы в сыворотке крови больных ПНГ, получавших экулизумаб [24]. В настоящем исследовании активность комплемента сыворотки крови регистрировалась у всех больных во все временные периоды цикла введения экулизумаба. Это свидетельствует об отсутствии полной блокады комплемента при терапии экулизумабом и более высокой чувствительности кинетического метода регистрации комплемента с использованием эритроцитов кролика.

Самое значительное торможение комплемента, как по АПК, так и по КПК, наблюдалось в настоящей работе на пятый день после введения экулизумаба, что соответствовало повышению концентрации препарата по результатам исследования его фармакокинетики [16]. На десятый день после инфузии экулизумаба направленность изменений параметров активации комплемента у обследованных больных была индивидуальной. По данным литературы [16], в аналогичный период (9-й день) концентрация экулизумаба в крови больных ПНГ становилась низкой, но варьировала у разных больных в широком диапазоне значений.

По данным литературы, неконъюгированный билирубин в концентрациях, превышающих 170 мкмоль/л, ингибировал комплементзависимый цитолиз по КПК путем взаимодействия с компонентом $C1q$ [25]. Настоящее исследование не подтвердило значение этого феномена у обследованных больных

с ПНГ. Изученные параметры активации комплемента не коррелировали с концентрацией неконъюгированного билирубина, что, вероятно, объясняется отсутствием существенного повышения его концентрации, в отличие от конъюгированного билирубина.

Разная степень гемолитических проявлений ПНГ при блокировании компонента С5 может быть обусловлена как особенностями фармакокинетики экулизумаба, так и индивидуальным молекулярным составом белков системы комплемента у больных. При исследовании выраженности внутрисосудистого и внесосудистого гемолиза у больных ПНГ, получавших экулизумаб, авторы показали роль полиморфизма молекулы С5 и разных аллелей рецептора комплемента-1 (CR1) в гемолитических проявлениях [17].

Новые данные свидетельствуют, что остаточная литическая активность терминального пути комплемента зависит от силы активатора комплемента и поверхностной плотности С3b, которая усиливает альтернативный путь через мощную петлю амплификации [26]. При высокой плотности С3b на эритроцитах ингибитор С5 экулизумаб уменьшает, но не отменяет активность терминального комплемента. С5 более восприимчив к расщеплению конвертазами в условиях интенсивного праймирования из-за избытка С3b на эритроцитах, даже в присутствии ингибитора С5. В результате у больного ПНГ, получающего терапию экулизумабом, в условиях сильной активации комплемента (инфекция, операция и др.) происходит изменение конформации С5, которая разрушает стерические помехи, вызванные экулизумабом, что приводит к «прорывному» внутрисосудистому гемолизу.

Комбинация экулизумаба и коверсина, которые связываются с различными эпитопами С5, обладает аддитивными эффектами и способна отменить остаточную литическую активность даже в присутствии сильной активации [26].

В настоящее время оптимизация лечения ПНГ возможна по следующим направлениям. В случае констатации прогрессирующей костномозговой недостаточности у молодых больных с наличием НЛ-совместимого донора может рассматриваться трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток [27]. Однако в большинстве случаев субоптимальный контроль ПНГ на фоне терапии экулизумабом требует поиска новых вариантов ингибиции комплемента, преодолевающих недостатки экулизумаба [15]. При этом в качестве мишени по-прежнему рассматривается 5-й компонент комплемента, а также новые более проксимальные мишени активации комплемента (С3, фактор D, фактор В). В США, Японии и Европе для лечения ПНГ одобрен равулизумаб — инновационный ингибитор С5 длительного действия. Данный препарат по сравнению с экулизумабом вызывает более стабильную ингибицию С5 [28]. В недавно опубликованных результатах продленной фазы двух

ключевых исследований равулизумаба не было зарегистрировано ни одного случая «прорывного» гемолиза, связанного с повышением свободного С5 выше 0,5 мкг/мл, т. е. концентрации, связанной с полным ингибированием С5 [29].

В проведенном исследовании низкая эффективность стандартной дозы экулизумаба с фармакокинетическим «прорывным» гемолизом была документирована у одной больной, у которой отмечено недостаточное ингибирование комплемента по всем изученным параметрам ОК и АПК. Данный случай представляет особый интерес, поскольку первый эпизод фармакодинамического «прорывного» внутрисосудистого гемолиза был связан с дебютом целиакии, а в дальнейшем сохранялись эпизоды фармакокинетического «прорывного» гемолиза уже без клинических проявлений целиакии на фоне безглютеновой диеты. Известно, что аутоиммунные процессы, в том числе целиакия, сопровождаются усилением потребления комплемента [30]. Возможно, это вызывает повышенную продукцию компонентов КПК и приводит к быстрому нарастанию активности комплемента в промежутках между инфузиями экулизумаба.

В противоположность этому, во втором случае предполагаемый фармакокинетический «прорывной» гемолиз не был подтвержден по изученным параметрам активности комплемента, а субоптимальный ответ на экулизумаб был преимущественно связан с выраженным внесосудистым гемолизом за счет опсонизации эритроцитов фрагментами С3.

Ингибиторы проксимальных этапов активации комплемента, в частности компонента С3, наряду с купированием внутрисосудистого гемолиза призваны решить проблему С3-опосредованного внесосудистого гемолиза, который в той или иной мере проявляется практически у всех больных, получающих экулизумаб [15]. В частности, к настоящему времени получены обнадеживающие данные исследования Ib-фазы циклического пептидного ингибитора С3 (APL-2), представляющего собой пегилированный аналог компстатина [31]. В настоящее время проводится большое рандомизированное исследование APL-2 у больных с субоптимальным ответом на экулизумаб.

Результаты настоящего исследования продемонстрировали индивидуальные различия активности комплемента у больных ПНГ, получающих длительную антикомплентарную терапию экулизумабом. Обоснована необходимость тестирования активности комплемента при субоптимальном ответе на терапию экулизумабом и при внедрении новых методов терапии. Кинетический метод, основанный на раздельной регистрации общей активности комплемента и альтернативного пути активации в модели комплемент-зависимого лизиса эритроцитов кролика, демонстрирует более высокую чувствительность, чем традиционное определение СН50.

Литература

1. Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993; 73(4): 703–11. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90250-T.
2. Davitz M.A., Low M.G., Nussenzweig V. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. *J Exp Med*. 1986; 163(5): 1150–61. DOI: 10.1084/jem.163.5.1150.
3. Rosse W.F. The life-span of complement-sensitive and -insensitive red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1971; 37(5): 556–62. DOI: 10.1182/blood.V37.5.556.556.
4. Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653–62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
5. Hillmen P., Lewis S.M., Bessler M., et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333(19): 1253–8. DOI: 10.1056/NEJM199511093331904.
6. de Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112(8): 3099–106. DOI: 10.1182/blood-2008-01-133918.
7. Parker C., Omine M., Richards S., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106(12): 3699–709. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1717.
8. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В. и др. Клиническая манифестация и ошибки диагностики классической пароксизмальной ночной гемоглобинурии: анализ 150 наблюдений. *Клиническая онкогематология*. 2017; 10(3): 333–41. DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-333-341.
9. Кулагин А.Д., Климова О.У., Добронравов А.В. и др. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия у детей и взрослых: сравнительный клинический профиль и долгосрочный прогноз. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии*. 2018; 17(3): 11–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21.
10. Hillmen P., Hall C., Marsh J.C., et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004; 350(6): 552–9. DOI: 10.1056/NEJMoa031688.
11. Hillmen P., Muus P., Roth A., et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013; 162(1): 62–73. DOI: 10.1111/bjh.12347.
12. Loschi M., Porcher R., Barraco F., et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2016; 91(4): 366–70. DOI: 10.1002/ajh.24278.
13. Кулагин А.Д. Пароксизмальная ночная гемоглобинурия: современные представления о редком заболевании. *Клиническая онкогематология*. 2019; 12(1): 4–20.
14. Kulagin A., Klimova O., Rudakova T., et al. Benefits and limitations of long-term eculizumab treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Real-world data from large cohort study in Russia. *Blood*. 2018; 132 (Supplement 1): 2589. DOI: 10.1182/blood-2018-99-120139.
15. Risitano A.M., Marotta S., Ricci P., et al. Anti-complement treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: time for proximal complement inhibition? A position paper from the SAAWP of the EBMT. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 1157. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01157.
16. de Latour P.R., Fremeaux-Bacchi V., Porcher R., et al. Assessing complement blockade in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Blood*. 2015; 25(5): 775–83. DOI: 10.1182/blood-2014-03-560540.
17. Hidalgo S.M., Merinero M.H., López A. Extravascular hemolysis and complement consumption in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria patients

References

1. Takeda J., Miyata T., Kawagoe K., et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell*. 1993; 73(4): 703–11. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90250-T.
2. Davitz M.A., Low M.G., Nussenzweig V. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. *J Exp Med*. 1986; 163(5): 1150–61. DOI: 10.1084/jem.163.5.1150.
3. Rosse W.F. The life-span of complement-sensitive and -insensitive red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1971; 37(5): 556–62. DOI: 10.1182/blood.V37.5.556.556.
4. Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293(13): 1653–62. DOI: 10.1001/jama.293.13.1653.
5. Hillmen P., Lewis S.M., Bessler M., et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333(19): 1253–8. DOI: 10.1056/NEJM199511093331904.
6. de Latour R.P., Mary J.Y., Salanoubat C., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112(8): 3099–106. DOI: 10.1182/blood-2008-01-133918.
7. Parker C., Omine M., Richards S., et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106(12): 3699–709. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1717.
8. Kulagin A.D., Klimova O.U., Dobronravov A.V., et al. Clinical Manifestation and Errors in the Diagnosis of Classical Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A case series of 150 patients. *Klinicheskaya oncohematologiya*. 2017; 10(3): 333–41. DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-3-333-341. (In Russian).
9. Kulagin A.D., Klimova O.U., Dobronravov A.V., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in children and adults: comparative clinical profile and long-term prognosis. *Voprosi Gematologii/oncologii i immunologii v pediatrii*. 2018; 17(3): 11–21. DOI: 10.24287/1726-1708-2018-17-3-11-21. (In Russian).
10. Hillmen P., Hall C., Marsh J.C., et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2004; 350(6): 552–9. DOI: 10.1056/NEJMoa031688.
11. Hillmen P., Muus P., Roth A., et al. Long-term safety and efficacy of sustained eculizumab treatment in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2013; 162(1): 62–73. DOI: 10.1111/bjh.12347.
12. Loschi M., Porcher R., Barraco F., et al. Impact of eculizumab treatment on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a treatment versus no-treatment study. *Am J Hematol*. 2016; 91(4): 366–70. DOI: 10.1002/ajh.24278.
13. Kulagin A.D. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Current View on a Rare Disease. *Klinicheskaya oncogematologiya*. 2019; 12(1): 4–20 (In Russian).
14. Kulagin A., Klimova O., Rudakova T., et al. Benefits and limitations of long-term eculizumab treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Real-world data from large cohort study in Russia. *Blood*. 2018; 132(Supplement 1): 2589. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-120139>.
15. Risitano A.M., Marotta S., Ricci P., et al. Anti-complement treatment for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: time for proximal complement inhibition? A position paper from the SAAWP of the EBMT. *Frontiers in immunology*. 2019; 10: 1157. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01157.
16. de Latour P.R., Fremeaux-Bacchi V., Porcher R., et al. Assessing complement blockade in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Blood*. 2015; 25(5): 775–83. DOI: 10.1182/blood-2014-03-560540.
17. Hidalgo S.M., Merinero M.H., López A. Extravascular hemolysis and complement consumption in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria patients undergoing

- undergoing eculizumab treatment. *Immunobiology*. 2017; 222(2): 363–71. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.09.002.
18. Mayer M.M. Complement and complement fixation. In: Kabat E.A., Mayer M.M., editors. *Experimental immunochemistry*. Springfield, Ill: Charles C. Thomas; 1961: 133–240.
19. Tönder O., Larsen B., Aarskog D., Haneberg B. Natural and immune antibodies to rabbit erythrocyte antigens. *Scand J Immunol*. 1978; 7(3): 245–49. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1978.tb00451.x.
20. Galili U., Rachmilewitz E.A., Peleg A., Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med*. 1984; 160(5): 1519–31. DOI: 10.1084/jem.160.5.1519.
21. Галебская Л.В., Рюмина Е.В., Тарасова Ю.В., Леонтьева Н.В. Анализ динамики комплементзависимого гемолиза. *Клин. и лаб. диагн.* 2001; 3: 47–49.
22. 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(1): 31–8. DOI: 10.1179/1607845414Y.0000000162.
23. Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Птушкин В.В. и др. Национальные клинические рекомендации по диагностике и лечению пароксизмальной ночной гемоглобинурии. *Онкогематология*. 2014; 9(2): 20–8. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-20-28.
24. Ferreira V.P., Pangburn M.K. Factor H-mediated cell surface protection from complement is critical for the survival of PNH erythrocytes. *Blood*. 2007; 110(6): 2190–2. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083170.
25. Basiglio C.L., Arriaga S.M., Pelusa H.F., et al. Protective role of unconjugated bilirubin on complement-mediated hepatocytolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2007; 1770(7): 1003–10. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.03.005.
26. Harder M.J., Kuhn N., Schrezenmeier H., et al. Incomplete inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood*. 2017; 129(8): 970–80. DOI: 10.1182/blood-2016-08-732800.
27. Kulagin A., Klimova O., Rudakova T., et al. Eculizumab followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/severe aplastic anemia (hPNH/SAA). *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51(1): S90. DOI: 10.1038/bmt.2016.46.
28. de Latour R.P., Brodsky R.A., Ortiz S., et al. Ravulizumab (ALXN1210) Versus Eculizumab in Adults with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Observed in Two Phase 3 Randomized, Multicenter Studies. *Blood*. 2018; 132 (Supplement 1): 626. DOI: 10.1182/blood-2018-99-110858.
29. Hill A., Piatek C.I., de Latour R.P., et al. Breakthrough Hemolysis in Adult Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Treated with Ravulizumab: Results of a 52-Week Extension from Two Phase 3 Studies. *Blood*. 2019; 134(Supplement 1): 952. DOI: 10.1182/blood-2019-128929.
30. Halstensen T.S., Hvatum M., Scott H., Fausa O., Brandtzaeg P. Association of subepithelial deposition of activated complement and immunoglobulin G and M response to gluten in celiac disease. *Gastroenterology*. 1992; 102(3): 751–9. DOI: 10.1016/0016-5085(92)90155-R.
31. Wong R.S., Pullon H.W., Deschatelets P., et al. Inhibition of C3 with APL-2 Results in Normalisation of Markers of Intravascular and Extravascular Hemolysis in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2018; 132 (Supplement 1): 2314. DOI: 10.1182/blood-2018-99-110827.
- eculizumab treatment. *Immunobiology*. 2017; 222(2): 363–71. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.09.002.
18. Mayer M.M. Complement and complement fixation. In: Kabat E.A., Mayer M.M., editors. *Experimental immunochemistry*. Springfield, Ill: Charles C. Thomas; 1961: 133–240.
19. Tönder O., Larsen B., Aarskog D., Haneberg B. Natural and immune antibodies to rabbit erythrocyte antigens. *Scand J Immunol*. 1978; 7(3): 245–49. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1978.tb00451.x.
20. Galili U., Rachmilewitz E.A., Peleg A., Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti-alpha-galactosyl specificity. *J Exp Med*. 1984; 160(5): 1519–31. DOI: 10.1084/jem.160.5.1519.
21. Galebskaya L.V., Ryumina E.V., Tarasova YU.V., Leont'eva N.V. Analysis of the dynamics of complement-dependent hemolysis. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2001; 3: 47–49 (In Russian).
22. 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(1): 31–8. DOI: 10.1179/1607845414Y.0000000162.
23. Kulagin A.D., Lisukov I.A., Ptushkin V.V., et al. National clinical guidelines for the diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Oncogematologiya*. 2014; 9(2): 20–8. DOI: 10.17650/1818-8346-2014-9-2-20-28. (In Russian).
24. Ferreira V.P., Pangburn M.K. Factor H-mediated cell surface protection from complement is critical for the survival of PNH erythrocytes. *Blood*. 2007; 110(6): 2190–2. DOI: 10.1182/blood-2007-04-083170.
25. Basiglio C.L., Arriaga S.M., Pelusa H.F., et al. Protective role of unconjugated bilirubin on complement-mediated hepatocytolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2007; 1770(7): 1003–10. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.03.005.
26. Harder M.J., Kuhn N., Schrezenmeier H., et al. Incomplete inhibition by eculizumab: mechanistic evidence for residual C5 activity during strong complement activation. *Blood*. 2017; 129(8): 970–80. DOI: 10.1182/blood-2016-08-732800.
27. Kulagin A., Klimova O., Rudakova T., et al. Eculizumab followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) for hemolytic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/severe aplastic anemia (hPNH/SAA). *Bone Marrow Transplant*. 2016; 51(1): S90. DOI: 10.1038/bmt.2016.46.
28. de Latour R.P., Brodsky R.A., Ortiz S., et al. Ravulizumab (ALXN1210) Versus Eculizumab in Adults with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Observed in Two Phase 3 Randomized, Multicenter Studies. *Blood*. 2018; 132 (Supplement 1): 626. DOI: 10.1182/blood-2018-99-110858.
29. Hill A., Piatek C.I., de Latour R.P., et al. Breakthrough Hemolysis in Adult Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Treated with Ravulizumab: Results of a 52-Week Extension from Two Phase 3 Studies. *Blood*. 2019; 134(Supplement 1): 952. DOI: 10.1182/blood-2019-128929.
30. Halstensen T.S., Hvatum M., Scott H., Fausa O., Brandtzaeg P. Association of subepithelial deposition of activated complement and immunoglobulin G and M response to gluten in celiac disease. *Gastroenterology*. 1992; 102(3): 751–9. DOI: 10.1016/0016-5085(92)90155-R.
31. Wong R.S., Pullon H.W., Deschatelets P., et al. Inhibition of C3 with APL-2 Results in Normalisation of Markers of Intravascular and Extravascular Hemolysis in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2018; 132(Supplement 1): 2314. DOI: 10.1182/blood-2018-99-110827.

Информация об авторах

Тарасова Юлия Викторовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: ulyataras@rambler.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3251-0481>

Климова Олеся Усмановна, врач-гематолог поликлинического отделения НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: lesya-shakyeva@mail.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7238-729X>

Андреева Лариса Алексеевна, ассистент кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: loban.valer@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7532-6070>

Васина Любовь Васильевна, доктор медицинских наук, заведующая кафедрой биологической химии, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: lubov.vasina@gmail.com.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2647-6336>

Галебская Людвиг Вячеславовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологической химии, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: galebskaya@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6688-5257>

Бабенко Елена Витальевна, заведующая отделением криоконсервирования с лабораторией оценки качества трансплантата НИИ детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: ele2133@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3367-4936>

Кулагин Александр Дмитриевич*, доктор медицинских наук, профессор кафедры гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
e-mail: kulagingem@rambler.ru; тел.: +7(812) 338 62 84; 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6–8.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>

* Автор, ответственный за переписку

Поступила: 20.01.2020

Принята к печати: 17.03.2020

Information about the authors

Yuliya V. Tarasova, Cand. Sci. (Biol.), Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: ulyataras@rambler.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3251-0481>

Olesya U. Klimova, Hematologist, outpatient department, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: lesya-shakyeva@mail.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7238-729X>

Larisa A. Andreeva, Assistant of the Department of Biological Chemistry, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: loban.valer@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7532-6070>

Lyubov V. Vasina, Dr. Sci. (Med.), Head of the Department of Biological Chemistry, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: lubov.vasina@gmail.com.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2647-6336>

Ljudviga V. Galebskaya, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Biological Chemistry, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: galebskaya@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6688-5257>

Elena V. Babenko, Head of Department of cryopreservation with laboratory of graft quality control, Raisa Gorbacheva Memorial Research Institute of Pediatric Oncology, Hematology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: ele2133@yandex.ru.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3367-4936>

Alexander D. Kulagin*, Dr. Sci. (Med.), Professor of the Department of Hematology, Transfusiology and Transplantation, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
e-mail: kulagingem@rambler.ru; tel.: +7(812) 338 62 84; 197022, St. Petersburg, 6–8 Lev Tolstoy str.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9589-4136>

* Corresponding author

Received 20 Jan 2020

Accepted 17 Mar 2020