

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – pregled populacije bolnikov v Sloveniji

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – the characteristics of the patient population in Slovenia

Jasmina Hauptman,¹ Darja Žontar,² Irena Preložnik Zupan²

Izvleček

Izhodišča: Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je redka bolezen, ki vključuje hemolitično anemijo, odpoved kostnega mozga, tromboze in pogosto slabo kakovost življenja. Nastane zaradi pridobljene napake v membrani krvnih celic, kjer pride do pomanjkanja beljakovin, ki zavirajo aktiviranje komplemента. Zanimalo nas je, kakšna je prepoznavnost bolezni v Sloveniji in incidenca. Pripravili smo priporočila za odkrivanje bolezni.

Bolniki in metode: S prospektivno analizo enoletnega obdobja od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 smo zbrali podatke 68 bolnikov, katerih kri je bila poslana na preiskave zaradi suma na PNH. Analizo periferne krvi so opravili z večparametrično visoko specifično pretočno citometrijo v specializiranem laboratoriju KO za hematologijo UKC Ljubljana.

Rezultati: Klon PNH so dokazali pri 13/68 (19 %) bolnikov, 55/68 (81 %) bolnikov ga ni imelo. Največ pozitivnih vzorcev je bilo poslanih iz UKC Ljubljana (7/13, 54 %). Od bolnikov s pozitivnim klonom PNH so bili 4/13 novo odkriti. Incidenca skozi 10 let je bila v povprečju 1,3 bolnike na 1.000.000 prebivalcev/leto. Najpogostejši vzrok napotitve bolnikov s PNH k hematologu je bila nepojasnjena citopenija – 12/13 (92,3 %), najpogostejša simptoma utrujenost in dispneja (100 %), pri 2/13 bolnikov je bil prisoten temen urin s hemoglobinurijo, 2/13 sta imela prehodno ledvično insuficienco. Ob prisotnem klonu PNH je imelo 11/13 bolnikov pridruženo motnjo v delovanju kostnega mozga (aplastična anemija ali mielodisplastični sindrom). Velikost klona PNH je bila različna.

Zaključki: Zgodnje prepoznavanje PNH je ključno za učinkovito zdravljenje in preživetje bolnikov. Svetujemo določitev klona PNH ob pridobitvi po Coombsu negativni hemolitični anemiji, hemoglobinuriji, nepojasnjeni citopeniji, aplastični anemiji, mielodisplastičnem sindromu z laboratorijskimi znaki hemolize in nepojasnjeni trombozi.

Abstract:

Background: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare disorder associated with hemolytic anemia, bone marrow failure, thrombosis, and, frequently, poor quality of life. It is caused by acquired defect in the blood cell membrane, with the lack of complement activation inhibition protein. We wanted to find out what was the detection and the incidence rate of the disease in Slovenia. The recommendations for diagnosis of the disease were prepared.

Patients and methods: Data of 68 patients whose blood was sent to the laboratory of immunology and cytology for suspected PNH were collected with a prospective analysis of one – year period from 1 October 2013 to 30 September 2014. Peripheral blood analysis was performed with multiparametric high specific flow cytometry in a specialized laboratory of the Haematology Department, University Medical Centre Ljubljana.

¹ Univerzitetni klinični center Maribor

² Univerzitetni Klinični center Ljubljana. Oddelek za hematologijo in hematološko onkologijo

Korespondenca/ Correspondence:

Jasmina Hauptman,
e: jasminamed@gmail.com

Ključne besede:

paroksizmalna nočna hemoglobinurija; pretočna citometrija; PNH klon

Key words:

paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; flow cytometry; PNH clone

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn. 2016;
85: 383–92

Prispelo: 10. sept. 2015,
Sprejeto: 8. avg. 2016

Results: PNH clone was positive in 13/68 (19 %) patients and negative in 55/68 (81 %). Positive samples were mostly sent from the University Medical Centre Ljubljana (7/13, 54 %); 4/13 positive patients were newly diagnosed. On average, the incidence through 10-year period was 1.3 / 1,000,000 population/year. Unexplained cytopenia was the most common cause of the patient's referral to a hematologist—12/13 (92.3 %), fatigue and dyspnea were the most common symptoms (100 %), dark urine with haemoglobinuria was present in two of 13 patients, two of 13 patients had transient renal insufficiency; 11/13 patients with positive PNH clone had an associated bone marrow failure (aplastic anemia or myelodysplastic syndrome). PNH clone size varied from patient to patient.

Conclusions: Early identification of PNH is a key factor for effective treatment and prolonged patients' survival. PNH clone determination is recommended in Coombs negative hemolytic anemia, hemoglobinuria, unexplained cytopenia, aplastic anemia, myelodysplastic syndrome with laboratory evidence of haemolysis and in unexplained thrombosis.

Uvod

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija (PNH) je redka, pridobljena hemolitična anemija zaradi pridobljene napake hematopoetične matične celice.^{1,2} Nemaligni klon ene ali več spremenjenih hematopoetičnih matičnih celic se pomnoži. Zato so okvarjene vse celične vrste, ki izvirajo iz prizadete matične celice (eritrociti, granulociti, monociti, trombociti, limfociti). V osnovi gre za somatsko mutacijo gena PIG-A na kromosomu X, potrebnega za sintezo glikozilfosfatidilinozitolnih (GPI) sidrišč za vezavo beljakovin na površini celic. GPI vezane beljakovine, še posebej CD59 in CD55, zavirajo aktiviranje komplemента.¹⁻⁴ Če jih ni, prihaja do lize celic rdeče vrste. Za bolezen je značilna triada kliničnih znakov: intravaskularna hemoliza s hemoglobinurijo, venske tromboze ter odpoved kostnega mozga s citopenijo.^{1,4,5} Gre za življenje ogrožajočo bolezen, ki lahko vodi v kronično okvaro organov ter prezgodnjo smrt, najpogosteje zaradi tromboz ali odpovedi ledvic. Zaradi raznolikosti simptomov ter znakov, s katerimi se bolezen kaže, zdravniki še vedno preredko ter prepozno ali nikoli ne pomislimo nanjo.

Zlati standard za dokazovanje celičnega klona PNH je postala visoko občutljiva pretočna citometrija, ki poteka s testiranjem periferne krvi samo v spe-

cializiranih laboratorijih.⁶ V Sloveniji se testiranje izvaja centralno v Specializiranem hematološkem laboratoriju Kliničnega oddelka za hematologijo (KOH) UKC Ljubljana.

V prispevku prikazujemo (1) prepoznavnost bolezni v Sloveniji v enoletnem obdobju ter splošne in laboratorijske značilnosti novoodkritih bolnikov s PNH. Zanimalo nas je, kateri zdravniki po specialnosti in kdaj pomislijo na to redko bolezen; (2) incidenca oz. pojavnost bolnikov s PNH klonom v Sloveniji (3). Dodali smo priporočilo, kdaj pomisliti na bolezen in opraviti diagnostični postopek pri bolniku.

Bolniki in metode dela

Bolniki in zdravniki

V enoletnem obdobju od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 smo ob sodelovanju različnih zdravstvenih centrov, zdravnikov različnih specialnosti ter Specializiranega hematološkega laboratorija KO za hematologijo UKC Ljubljana zbrali podatke o bolnikih, katerih krvni vzorci so bili poslani v laboratorij zaradi suma na PNH ali spremljanja velikosti PNH klona. V prispelih vzorcih smo določili prisotnost/odsotnost in velikost klona PNH. Glede na rezultate pretočne cito-

Tabela 1: Število sprejetih vzorcev za ugotavljanje PNH v Specializiranem hematološkem laboratoriju KOH UKC Ljubljana v enoletnem obdobju po posameznih bolnišnicah v Sloveniji.

Bolnišnica	Število poslanih vzorcev	Število dokazanih PNH
UKC Ljubljana	40	8
UKC Maribor	4	2
SB Celje	12	1
SB Novo mesto	6	2
SB Murska Sobota	2	0
SB Slovenj Gradec	2	0
SB Izola	1	0

UKC – univerzitetni klinični center, SB – splošna bolnišnica.

metrije smo bolnike razdelili na skupino s prisotnim klonom PNH (novoodkriti in že znani) ter skupino z odsotnim klonom PNH. Za bolnike z dokazanim klonom PNH smo s pomočjo zabeleženih podatkov ob sprejemu vzorcev v laboratorij, računalniškega programa Hipokrat (List d.o.o.) ter s kontaktiranjem napotnih/lečečih zdravnikov pridobili podatke o spolu, starosti bolnikov, laboratorijske parametre ob datumu določitve PNH klona (koncentracija hemoglobina, število levkocitov, retikulocitov, trombocitov, celokupni ter direktni bilirubin, vrednost laktat dehidrogenaze, BNP, haptoglobin v serumu), parametre ledvične funkcije (kreatinin, GFR)). Velikost klona PNH smo ocenjevali na celicah granulocitne vrste, monocitih ter

Tabela 2: Zdravniki po specializaciji, ki so poslali vzorce za diagnosticiranje PNH.

Specialnosti napotnih zdravnikov	Število poslanih vzorcev	Število pozitivnih vzorcev
Hematolog	61	13
Nefrolog	3	0
Kardiolog ter angiolog	2	0
Gastroenterolog	1	0

eritrocitih. Zbrali smo glavne simptome ter znake bolezni ob pregledu. Spremljali smo nadaljnjo diagnostiko ter zdravljenja bolnikov. Pri skupini bolnikov brez klona PNH smo zbrali podatke o spolu, starosti in vzrokih napotitve v specialistične ambulante oziroma določitve klona PNH.

Prikazujemo še porazdelitev bolnikov v Sloveniji po bolnišnicah. Z namenom preveriti diferencialnodiagnostično razmišljanje zdravnikov po Sloveniji smo zabeležili, kdo od zdravnikov v Sloveniji (po specialnosti) in ob katerih simptomih in/ali znakih pomisli na PNH in pošlje vzorec krvi v specializirani laboratorij za diagnosticiranje PNH. Incidenco bolezni smo izračunali za 10-letno obdobje.

Določanje klona PNH s pretočno citometrijo

V Sloveniji določamo klon PNH s pomočjo visoko specifične večparametrične pretočne citometrije v specializiranem laboratoriju na KO za hematologijo UKC Ljubljana. Za dokaz PNH klona odvzamemo vensko kri s heparinom ali EDTA v epruveto Vacutainer. Vzorec mora biti dostavljen v laboratorij najkasneje 24 ur po odvzemu pri sobni temperaturi. Pred začetkom preiskave napravimo krvno sliko in diferencialno krvno sliko (DKS). Klon PNH določamo izključno na zrelih celicah, zato v primeru pomika v levo (mlajše oblike levkocitov v krvi) ali hude nevtropenije (manj kot $1,5 \times 10^9/L$ nevtrofilnih granulocitov) preiskave ne izvedemo. Odsotnost antigenov, značilnih za PNH, ugotavljamo na granulocitih, monocitih in eritrocitih periferne krvi. Limfociti za opredelitev velikosti klona PNH niso primerni. Kot najprimernejše se je izkazalo določanje na granulocitih. Pri določanju protiteles na eritrocitni membrani vedno obstaja

Tabela 3: Značilnosti novoodkritih bolnikov s PNH v obdobju od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 v laboratoriju KO za hematologijo.

	Bolnik 1	Bolnik 2	Bolnik 3	Bolnik 4
Spol	Ž	M	M	Ž
Starost (leta)	66	74	46	72
Simptomi in znaki	utrujenost	utrujenost, dispneja	utrujenost, dispneja	utrujenost
Laboratorij				
• Konc. Hb (g/L)	106	75	46	126
• Število Tr ($\times 10^9$)	11	14	6	234
• Število L ($\times 10^9$)	5,1	1,6	1,3	7,9
• Retikulociti ($\times 10^9$)	60	0,35	1,88	44,3
• Bilir. cel. (mg/dl)	12	24	11	8
• Bilir. dir. (mg/dl)	4	6	3	3
• LDH (IU/l)	5,22	2,92	4,52	3,51
Klon PNH (%)				
• Granulociti	19,2	2,6	1,2	21,2
• Monociti	17,0	3,8	2,70	22,5
• Eritrociti - tip II+III	3,0	0,2	0,40	3,5
Pridružena bolezen kostnega mozga	MDS	MDS	AA	MDS
Odvisnost od transfuzij	ne	da	da	ne
Zdravljenje	IST	/	IST	IST

Hb – hemoglobin, Tr – trombociti, L – levkociti, bilir. cel. – celokupni bilirubin, bilir. dir. – direktni bilirubin, MDS – mielodisplastični sindrom, AA – aplastična anemija, IST – imunosupresivno zdravljenje.

nevarnost, da bi zaradi hemolize določili monoklonska protitelesa le na normalnih eritrocitih. Uporabljamo monoklonska protitelesa proti beljakovinam, katerih odsotnost na celični membrani je značilna za PNH. Za ugotavljanje klona PNH na levkocitih uporabimo kombinacijo protiteles: CD45 (vsi levkociti), CD24 (vsi granulociti), CD15 (nevtrofilci), CD14 (monociti) in inaktivnega bakterijskega toksina aerolizina FLAER-Aleksa 488. Receptorji zanj so prisotni na vseh normalnih levkocitih v periferni krvi, odsotni pa so na klonu PNH. Za oceno velikosti klona PNH na eritrocitih

uporabimo monoklonska protitelesa CD59 v kombinaciji s CD235a (glikoforin A). Rezultate podamo v deležu (%) FLAER-negativnih nevtrofilnih granulocitov (CD15+) in monocitov (CD14+). Glede na intenziteto fluorescence odčitamo delež eritrocitov, ki so povsem negativni na CD59 (tip III), delež šibko pozitivnih na CD59 (tip II) in delež z normalno izraženo fluorescenco CD59 (tip I). Vsota deležev eritrocitov tipa II in tip III predstavlja celotni klon PNH. Praviloma je klon PNH nevtrofilcev večji od klona eritrocitov zaradi predhodne hemolize ali po transfuziji krvi. Kadar na nevtrofilcih in

Tabela 4: Značilnosti znanih bolnikov s PNH, ki so bili v opazovanem obdobju opremljeni v laboratoriju KO za hematologijo.

Bolniki s PNH	
Število vseh, spol (M/Ž)	9 (6/3)
Povprečna starost (leta)	41,5
Laboratorij (povprečne vrednosti)	
Koncentracija Hb (g/L)	110,3
Število Tr ($\times 10^9$)	95,2
Število L ($\times 10^9$)	3,65
Število retikulocitov ($\times 10^9$)	108,7
Bilirubin celokupni (mg/dl)	29,3
Bilirubin direktni (mg/dl)	9,8
LDH (IU/l)	6,55
Povprečna vrednost klona PNH (%)	
Granulociti	51,6
Monociti	44
Eritrociti (tip II+III)	25,4
Klasična PNH	1
Pridružena bolezen kostnega mozga (MDS/AA)	3 / 4
ITP	1
Simptomi in znaki ob diagnozi:	
utrujenost	9
hemoglobinurija	2
dispneja	2
ledvična odpoved	2
bolečine v trebuhu	0
tromboza	0
Odvisnost od transfuzij (Da/Ne)	4/5
Zdravljenje:	
imunosupresivno	2
ekulizumab	4
pKMC	1
antikoagulantno	3

Hb – hemoglobin, Tr – trombociti, L – levkociti, MDS – mielodisplastični sindrom, AA – aplastična anemija, ITP – imunska trombocitopenija, PKMC – presaditev krvotvornih matičnih celic.

monocitih ne dokažemo FLAER-negativnih celic, nadaljnja analiza eritrocitov ni potrebna.

Statistična analiza

Opisno statistično obdelavo smo izvedli s programom MS Excel 2007.

Rezultati

V Specializiranem hematološkem laboratoriju KOH UKC Ljubljana so v enoletnem obdobju od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 sprejeli 68 vzorcev periferne krvi bolnikov za določitev klona PNH. Klon PNH so dokazali pri 13/68 (19 %) bolnikov, 55/68 (81 %) bolnikov pa ni imelo klona PNH. V opazovanem obdobju so bili 4/13 (30 %) bolniki odkriti na novo, pri 9 bolnikih z že znanim klonom PNH so preverjali velikost klona v sklopu rednega spremljanja. Največ vzorcev je bilo poslanih iz UKC Ljubljana (40), nadalje iz SB Celje (12), SB Novo mesto (6), UKC Maribor (4), posamezni iz SB Murska Sobota (2), SB Slovenj Gradec (2) ter SB Izola (1). Iz SB Nova Gorica, Jesenice in Brežice v opazovanem obdobju niso prejeli vzorcev za diagnosticiranje. V Tabelah 1 in 2 prikazujemo število napotnih vzorcev glede na bolnišnico in specializacijo napotnega zdravnika ter število dokazanih klonov PNH. Najpogostejši vzrok napotitve bolnikov, katerim so dokazali klon PNH, je bila nepojasnjena citopenija – 12/13 (92,3 %), en bolnik je bil napoten zaradi hematurije ter znakov intravaskularne hemolize. Najpogostejši klinični simptom ob diagnozi je bila utrujenost (100 %) ter dispneja, pri 2/13 (15,4 %) bolnikov je bil prisoten temen urin zaradi hemoglobinurije, ki je bila večinoma občasna, dva bolnika sta imela

Tabela 5: Značilnosti bolnikov brez klona PNH, ki so bili v obdobju od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 v laboratoriju KO za hematologijo preiskani zaradi suma na PNH.

	Klon PNH odsoten
Število	55
Spol (M/Ž)	34/21
Starost	52,4
Vzrok napotitve:	
citopenija	34
znaki hemolize	13
nepojasnjena tromboza	4
hemoglobinurija	1
avtoimuno dogajanje	1

ob diagnozi ugotovljeno prehodno blago ledvično insuficienco. Pri bolnikih, pri katerih niso dokazali PNH klona, so zdravniki pomislili na PNH najpogostejše zaradi citopenije, znakov hemolize in nepojasnjene tromboze.

Bolniki s prisotnim klonom PNH

Mediana starosti skupine bolnikov z dokazanim klonom PNH (13) je bila 46,6 let. Med njimi je bilo 9 oseb (69 %) ženskega ter 4 osebe (31 %) moškega spola. Značilnosti novo ugotovljenih bolnikov v opazovanem obdobju in znanih bolnikov s PNH so prikazane v Tabelah 3 in 4.

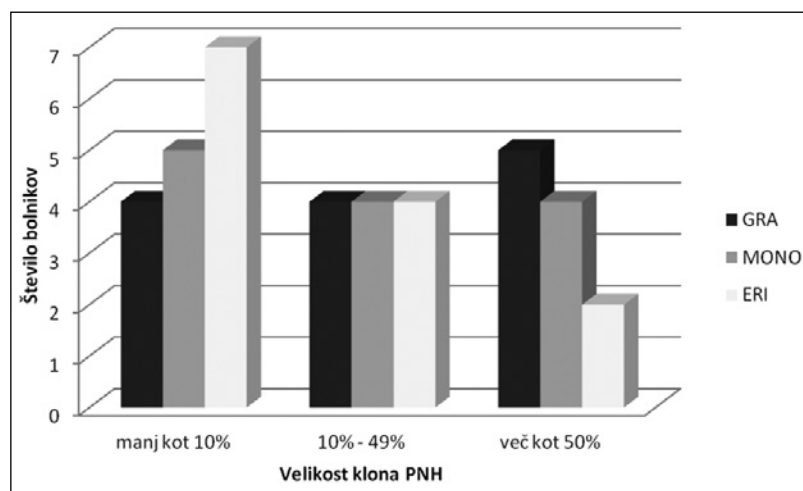
Povprečna velikost klona PNH na granulocitih pri novo odkritih bolnikih (4/13) s PNH je bila 11,05 % (1,2–21,2 %), na monocitih 11,5 % (2,7–22,5 %), na eritrocitih (tip II in tip III) 1,75 %. 5 bolnikov je imelo velikost klona PNH več kot 50 % na granulocitni vrsti, 4 več kot 50 % na monocitni vrsti. Razdelitev klona PNH glede na velikost in celično vrsto je prikazana na Sliki 1.

Ob določitvi klona PNH je imelo 10/13 (76,9 %) bolnikov trombocitope-

nijo (Tr manj kot $150 \times 10^9/L$) z mediano $92 \times 10^9/L$, od tega je imelo pet bolnikov trombocite manj kot $10 \times 10^9/L$. Pri 7/13 (53,8 %) bolnikih je bila prisotna levkopenija (L manj kot $4 \times 10^9/L$) z mediano $3,7 \times 10^9/L$. Anemija je bila prisotna pri 8/13 (61,5 %) bolnikov z mediano koncentracije hemoglobina 101,6 g/L. Spremljali smo kazalce hemolize s številom retikulocitov, koncentracijo bilirubina in LDH; 4 bolniki so imeli retikulocitozo, 7 bolnikov zvečano koncentracijo celokupnega ter 8 bolnikov direktnega bilirubina. Mediana koncentracije LDH je znašala 5,96 $\mu\text{kat/l}$. Vsi bolniki z velikostjo klona PNH več kot 50 % so imeli laboratorijske znake aktivne intravaskularne hemolize.

Pri bolnikih s citopenijo (12 bolnikov) so v sklopu nadaljnje diagnostike opravili dodatne laboratorijske preiskave, citološko ter histološko preiskavo kostnega mozga. Od teh je 5 bolnikov imelo klon PNH v sklopu aplastične anemije, 6 bolnikov v sklopu mielodisplastičnega sindroma, pri 1 bolniku so ugotavljali imunsko trombocitopenijo.

Osnovno bolezen krvi in krvotvornih organov so pri 11/13 (75 %) bolnikov zdravili z imunosupresivnimi zdravili (ciklosporin, antilimfocitni imunoglobulin, alemtuzumab, kortikosteroidi), 3/13 (23 %) bolnikov s klonom PNH, večjim od 50 % ter znaki intravaskularne hemolize prejemajo antikoagulantno zdravljenje, 3 bolniki prejemajo monoklonsko protitelo proti C5 komplementa, ekulizumab, 1 bolnik je imel presaditev krvotvornih matičnih celic, ki pa ni uspela. 6/13 (46 %) bolnikov je transfuzijsko odvisnih, povprečno potrebujejo 1 enoto krvi na mesec. Med spremljanjem je pri 1 bolniku ob visokem klonu PNH v sklopu aplastične anemije prišlo do dokazane venske tromboze, pri 1 bolniku z mielodisplastičnim sindromom je bolezen napredovala v akutno levkemijo, 1



Slika 1: Razdelitev vseh bolnikov s PNH klonom v Sloveniji glede na velikost klona PNH.

bolnik je zaradi okužbe ob levkopeniji v sklopu MDS umrl.

Bolniki brez klona PNH

Značilnosti bolnikov brez klona PNH, ki so bili v obdobju od 1. 10. 2012 do 30. 9. 2013 v laboratoriju KO za hematologijo preiskovani zaradi suma na PNH, so prikazane v Tabeli 5.

Tabela 6: Incidenca bolnikov s PNH klonom v desetletnem obdobju (2005–2014) na 1.000.000 prebivalcev.

Leto	Populacija v Sloveniji po letih	Št. novo odkritih bolnikov s PNH klonom/leto/	Incidenca / 1000.000
2005	2.003.358	1	0,5
2006	2.010.377	1	0,5
2007	2.019.406	0	0
2008	2.032.362	0	0
2009	2.046.976	5	2,5
2010	2.050.189	3	1,5
2011	2.054.741	5	2,5
2012	2.055.496	5	2,5
2013	2.058.821	5	2,5
2014	2.061.085	1	0,5
Povprečje 2005–2014		2,6	1,3

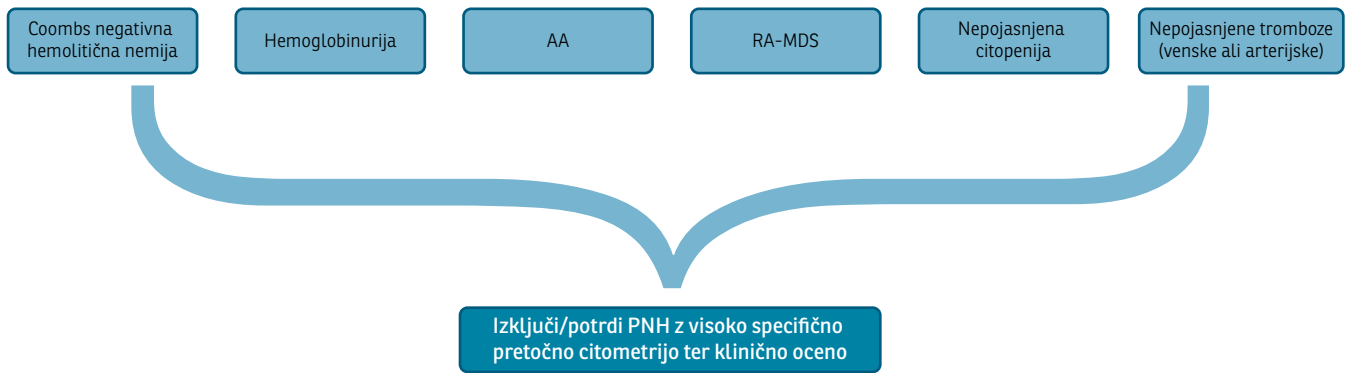
Incidenca bolnikov s PNH klonom v Sloveniji

Skozi 10-letno obdobje (2005–2014) prikazuje incidenco Tabela 6.

Razpravljanje

Paroksizmalna nočna hemoglobinurija je zelo redka, življenje ogrožajoča bolezen, ki se kaže z raznolikimi simptomi in znaki. Večina zdravnikov, tudi hematologov, le redko pride v stik s to boleznijo, zato lahko dolgo časa ostane neprepoznana. Zanimalo nas je, kateri zdravniki in kdaj na bolezen pomislijo ter kakšna je incidenca bolezni v Sloveniji. Opravili smo enoletno prospektivno preiskavo. Nekatero podatke o bolnikih smo pridobili tudi retrogradno.

Na PNH so po pričakovanju največkrat pomislili zdravniki hematologi v UKC Ljubljana (Tabela 1 in 2), najpogosteje zaradi nepojasnjene citopenije (34/53 bolnikov, 64 %), znakov hemolize (13/53, 24,5 %) in v redkih primerih zaradi nepojasnjenih tromboz (4/53, 7,5 %). Pričakovali bi več napotitev za diagnostiko PNH od angiologov ob nepojasnjenih trombozah, pulmologov ob dispnoičnih težavah in nepojasneni pljučni hipertenziji, gastroenterologov ob ponavljajočih se nepojasnjenih bolečinah v trebuhu z znaki hemolize v laboratorijskih izvidih in nefrologov ob nepojasneni okvari ledvičnega delovanja. V Sloveniji smo v tem letu odkrili 4 nove bolnike s klonom PNH, prav tako smo retrogradno za desetletno obdobje pregledali pojavnost bolezni in ugotovili incidenco 1,3 bolnikov / 1.000.000 prebivalcev na leto, kar ustreza podatkom iz literature, kjer navajajo incidenco 1–10/1.000.000.^{2,4} PNH srečujemo pri bolnikih vseh starosti, vrh je med 30-im in 40-im letom starosti, bolezen je redka v otroštvu.⁵ Ženske so v naši raziskavi zbolele pogo-



Slika 2: Algoritem diagnosticiranja bolnikov s PNH; RA-MDS – refraktarna anemija, mielodisplastični sindrom, AA – aplastična anemija.

steje, mediana starosti vseh bolnikov je bila 46,6 let, pri novo ugotovljenih 64,4 leta, kar je nekoliko višje, kot so podatki v literaturi.^{5,7}

Čeprav sodi temno obarvanje jutranjega urina med klasične znake bolezni, je po literaturi ob ugotovitvi bolezni prisotno le pri okrog 26 % bolnikov.² Omenjeni simptom smo ugotavljali pri 15,4 % naših bolnikov. Veliko bolnikov s PNH nima vidne hematurije oziroma se ta pojavlja občasno, pri nekaterih bolnikih z majhnim klonom PNH le med okužbo ali ob stresu. Utrujenost, izčrpanost ter dispneja so najpogostejši simptomi PNH, ki so bili prisotni tudi pri vseh naših bolnikih ob postavitvi diagnoze. Intenziteta utrujenosti ni vedno v povezavi s stopnjo anemije, temveč z velikostjo klona PNH ter stopnjo hemolize.^{2,3} Pri 2/3 bolnikov lahko pride do ledvične odpovedi različnih stopenj, pri 21 % so beležili končno ledvično odpoved zaradi nalaganja hemosiderina ter mikrovaskularnih tromboz.¹⁰ Po literaturi približno 40–60 % bolnikov s PNH med boleznijo razvije tromboze,² ki najpogosteje prizadenejo venski sistem, le redko zasledimo trombozo na začetku bolezni. Prav tako so trombembolični zapleti pri bolnikih s PNH glavni vzrok umrljivosti.^{2,9} Med našimi bolniki smo le pri enem s klonom PNH, večjim od 50 %, med boleznijo dokazali trombozo venskega sistema. Preostali naši bolniki z velikim klonom PNH,

ki sodijo v skupino z velikim tveganjem za tromboze, prejemajo antikoagulantno zdravljenje in/ali monoklonsko protitelo ekulizumab. Prisotni so lahko tudi drugi znaki bolezni, kot so zlatenica, disfgija, bolečina v trebuhu, erektilna disfunkcija, kar je navadno posledica porabe dušikovega oksida ob intravaskularni hemolizi.^{9,11} Teh simptomov/znakov ob diagnozi pri naših bolnikih nismo ugotovili oziroma niso bili zabeleženi. Redek zaplet PNH med boleznijo je prehod v akutno levkemijo, kar smo ugotavljali pri enem bolniku (7,7 %). Odziv takšnih bolnikov na standardno zdravljenje akutnih levkemij je navadno slabši.⁴

Ob sumu na PNH je priporočljivo opraviti naslednje laboratorijske preiskave: celotna krvna slika z diferencialno krvno sliko, število retikulocitov za oceno delovanja kostnega mozga, parametre hemolize (direktni ter indirektni bilirubin, LDH, haptoglobin v serumu), pomembne so tudi zaloge železa (Slika 3). Zlati standard za diagnostiko PNH pa je v zadnjih letih postala specifična večparametrična pretočna citometrija.^{6,8,9,11} Pri po Coombsu negativni hemolitični anemiji in s pretočno citometrijo potrjenem pomanjkanju antigenov, značilnih za PNH, na granulocitih v krvi potrdimo PNH. Ob sumu na dodatno motnjo v kostnem mozgu, zlasti ob citopenijah v krvi, je potrebno opraviti citološko ter histološko preiskavo kostnega mozga

s citogenetiko. Mednarodna interesna skupina za PNH je pripravila priporočila za delitev PNH bolnikov v tri podskupine: (1) *klasična PNH* – hemolitična oblika s klonom PNH, večjim kot 50 %, a brez druge spremembe v kostnem mozgu; (2) *PNH v sklopu druge bolezni* kostnega mozga (aplastična anemija, mielodisplastični sindrom, primarna mielofibroza) s kliničnimi simptomi/znaki hemolize; (3) *subklinična oblika PNH* z manjšo velikostjo klona PNH ter brez jasnih kliničnih ali laboratorijskih znakov hemolize.^{1,3,4,11} Glede na velikost klona PNH in odsotnost hemolize naše štiri bolnike z novo ugotovljenim klonom PNH uvrščamo v subklinično obliko. Značilno za to skupino je tesna povezava z drugimi motnjami v delovanju kostnega mozga, predvsem aplastično anemijo (1/4), ter v manjši meri z mielodisplastičnim sindromom (3/4); klon PNH je navadno majhen in ne povzroča kliničnih znakov intravaskularne hemolize.^{1,3,9,11} Po naših podatkih je pri dveh bolnikih znašal klon PNH pod 10 %, pri dveh pa okrog 20 %. Bolniki glede na majhen klon PNH ne potrebujejo posebnega zdravljenja PNH, potrebujejo pa zdravljenje motnje v delovanju kostnega mozga z imunosu-

presivnimi zdravili ter podporno zdravljenje s transfuzijami koncentriranih eritrocitov (2/4 bolnikov). Med bolniki z znanim klonom PNH smo pri 1/9 bolnikov ugotavljali klasično obliko PNH z znaki intravaskularne hemolize ter z velikostjo klona prek 50 %. Imel je klasične simptome PNH, vključno z intermitentno hemoglobinurijo. 5/9 (55,5 %) bolnikov smo uvrstili v skupino PNH v sklopu druge bolezni kostnega mozga. Pri 4/5 (80 %) smo ugotovili klon PNH v sklopu aplastične anemije, pri 1/5 (20 %) pa klon PNH v sklopu MDS. 4/5 bolnikov je imelo znake intravaskularne hemolize ob velikem klonu PNH (> 50 %). 3/9 bolnikov s klonom PNH je spadalo v skupino s subkliničnim PNH, 1/3 v sklopu MDS, 1/3 v sklopu AA, pri 1 bolniku smo ugotavljali prisotnost klona PNH ob ITP. Po literaturi naj bi imelo okrog 45 % bolnikov s PNH pridruženo motnjo v delovanju kostnega mozga.⁹ Pri nas se je 84,6 % bolnikov umestilo v to skupino, najverjetneje zaradi majhne skupine bolnikov ter preredko in prepozno prepoznane bolezni.

Do nedavnega sta bili edini možnosti zdravljenja PNH bolnikov presaditev krvotvornih matičnih celic ter simptomat-

Kdaj pomisliti na PNH?

- Pridobljena hemolitična anemija in znaki hemolize (Coombsovi testi negativni).
- Laboratorijski znaki intravaskularne hemolize (hemoglobinemija, hemoglobinurija, hemosiderinurija, zvečana raven LDH, zmanjšana vrednost plazemskega haptoglobina).
- Citopenije (granulocitopenija in/ali trombocitopenija in/ali anemija) ob zvečanem številu retikulocitov ali znakov hemolize.
- Nepojasnjene venske tromboze (predvsem abdominalnih ali cerebralnih ven).
- Aplastična anemija, mielodisplastični sindrom, predvsem ob kliničnih ali laboratorijskih znakih hemolize.
- Občasna disfagija ali abdominalna bolečina z znaki hemolize.



Izključi/potrdi PNH klon z visoko specifično pretočno citometrijo

Specialistični hematološki laboratorij KOH UKC Ljubljana
Odvzem venske krvi, epruveto z EDTA (5 ml) pošiljaj pri sobni temperaturi v času do 24 ur od odvzema.

Slika 3: Kdaj pomisliti na PNH.

sko zdravljenje, ki je vključevalo transfuzije krvnih pripravkov, glukokortikoide in rastne dejavnike.^{4,5} Napredek v zdravljenju pomeni odkritje monoklonskega protitelesa ekulizumaba, ki se veže na enoto C5 komplementa, prepreči njegovo aktivacijo in s tem hemolizo celic.¹²⁻¹⁵ Pri nas 4/13 bolnikov (30,8 %) zdravimo z ekulizumabom. Zdravljenje je zmanjšalo potrebe po transfuzijah koncentriranih eritrocitov, popravilo anemijo, predvsem pa se je izboljšala kakovost življenja, saj zdravilo prispeva k zmanjšanju simptomov in znakov, ki so posledica kronične intravaskularne hemolize.^{10,15-18}

Zaključek

Zgodnja ugotovitev PNH je ključna za učinkovito zdravljenje in večje preživetje bolnikov. Z našim prispevkom opozarjamo na veliko raznolikost simptomov in znakov, s katerimi se bolezen kaže, kar je glavni vzrok za zamudo v ugotavljanju ter zdravljenju bolezni. V algoritmu svetujemo, kdaj je priporočljivo opraviti specifično diagnosticiranje s pretočno citometrijo.^{2,11-14}

Literatura

- Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Were R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2005; 106 (12): 3699–709.
- Schubert J, Röth A, Bettelheim P, Stüssi G, Brümendorf TH, Schrezenmeier H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Oncopedia guidelines* 2012. Dosegljivo s spletne strani: <http://www.onkopedia-guidelines.info/en/onkopedia/guidelines/paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria-pnh>.
- Parker CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Socie Hematol Educ Program*. 2011; 2011: 21–9.
- Risitano A, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics*. 2008; 2: 205–22.
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 1995; 333: 1253–8.
- Borowitz M, Craig F, DiGiuseppe J, Illingworth A, Rosse W, Sutherland R, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010; 78: 211–30.
- Socie G, Mary J, Gramont A, Rio B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long term follow up and prognostic factors. *The Lancet*. 1996; 348: 573–7.
- Sutherland DR, Keeney M, Illinyworth A. Practical guidelines for the high sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2012; 82: 195–208.
- Sharma VR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathogenesis, testing and diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2013; 11 Suppl 13(9): 2–8.
- Hillmen P, Elebute M, Kelly R, Urbano-Isizua A, Hill A, Rother RP, et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 2010; 85: 553–9.
- Brodsky RA, Schrier SL, Tirnauer JS. Clinical manifestations and diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *UpToDate* 2016. Dosegljivo s spletne strani: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria>.
- Brodsky RA, Schrier SL, Tirnauer JS. Treatment and prognosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *UpToDate* 2016. Dosegljivo s spletne strani: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-and-prognosis-of-paroxysmal-nocturnal-hemoglobinuria/>.
- Luzzatto L, Gianfaldoni G, Notaro R. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a personal view. *Br J Haematol*. 2011; 153: 709–72.
- Schrezenmeier H, Muus P, Socie G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, et al. Baseline characteristics and disease burden in patients in the international paroxysmal nocturnal hemoglobinuria registry. *Haematologica*. 2014; 99: 922–9.
- Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, et al. Long term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011; 117: 6786–92.
- Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007; 110: 4123–8.
- Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socie G, Muus P, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355: 1233–43.
- Preložnik Zupan I. Paroksizmalna nočna hemoglobinurija – prve izkušnje zdravljenja z ekulizumabom pri slovenskih bolnikih. *Zdrav Vestn*. 2012; 81 supl 2: II-113–9.