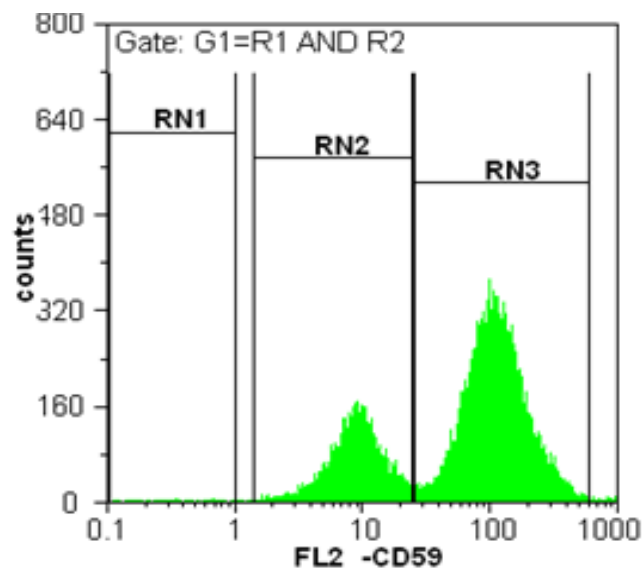


**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Εκτίμηση συχνότητας της θρομβοεμβολικής νόσου,  
που μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία/ανάπτυξη PNH κλώνων**

**ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΙΩΑΝΝΑ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**



**ΑΘΗΝΑ 2023**



**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ**

(Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, επιβλέπων)

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

(Ομοτ. Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΜΙΧΑΗΛ ΒΟΥΛΓΑΡΕΛΗΣ**

(Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ**

(Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ, επιβλέπων)

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ**

(Ομοτ. Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΜΙΧΑΗΛ ΒΟΥΛΓΑΡΕΛΗΣ**

(Καθηγητής Παθολογίας Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΜΑΡΙΑ ΑΓΓΕΛΟΠΟΥΛΟΥ**

(Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΑΡΓΥΡΗ ΓΙΑΛΕΡΑΚΗ**

(Αναπλ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΚΟΚΟΡΗ**

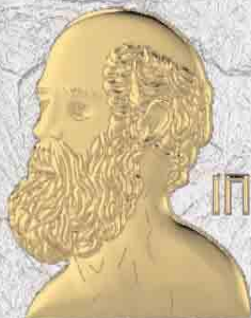
(Αναπλ. Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ)

**ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΩΤΣΗ**

(Επικ. Καθηγήτρια Αιματολογίας, Ιατρική Σχολή, Παν/μιο Θεσσαλίας)

(6494/9-4-12 / Τομέας: Παθολογίας)





## ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ ΟΡΚΟΣ



Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιῶν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἵστορας ποιεύμενος, ἐπιτελεᾶ ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ζυγγραφήν τήνδε. ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρῆζοντι μετὰδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ οὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρροσι, καὶ διδάσειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρῆζωσι μαθηάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ζυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἄκροῆσις καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσις μετὰδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμῆ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγραμμένοισί τε καὶ ὠρκειμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσμαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρειν. Οὐ δῶσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσμαι συμβουλίην τοιήνδε. ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσσὸν φθορίον δῶσω. Ἄγνων δὲ καὶ ὀσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμῶ δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήσιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ὣν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκούσιης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφορδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ὦν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴω, ἢ ἄκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπήης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἢ μὴ κρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔσω, σιγήσομαι, ἄρροητα ἠγεγμένος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελεᾶ ποιέοντι, καὶ μὴ ζυγχεόντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον. παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπισρκούντι, τάναντία τουτέων.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αιμόστασης της ΝΥ Αιμοδοσίας του ΓΝΑ Λαϊκό.

Ξεκίνησε από τη συνεργασία του Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ κ. Κωνσταντίνο Κωνσταντόπουλο (και επιβλέποντα καθηγητή της διδακτορικής μου διατριβής) με την κ. Παρασκευή Κώτση, πρώην συνάδελφο στο Τμήμα Αιμόστασης του ΓΝΑ Λαϊκό και νυν Επίκουρη Καθηγήτρια στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ευχαριστώ θερμά και τους δύο για την εμπιστοσύνη τους προς το πρόσωπό μου.

Θα ήθελα ωστόσο να επισημάνω ότι τον ‘πρώτο σπόρο’ για την εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής τον ‘φύτεψε’ στο μυαλό μου η κ. Αναστασία Καραφουλίδου, ιατρός Αιματολόγος, τέως Διευθύντρια της ΝΥ Αιμοδοσίας και του Τμήματος Αιμόστασης του Λαϊκού Νοσοκομείου και την ευχαριστώ ιδιαίτερα γι’ αυτό.

Τον Καθηγητή κ. Κωνσταντόπουλο τον ευχαριστώ για την υποστήριξη του σε οτιδήποτε και αν χρειάστηκα όλο αυτό το χρονικό διάστημα και ιδιαίτερα για την επιμονή και την συνεχή προτροπή του για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας· οφείλω να ομολογήσω ότι χωρίς τις συνεχείς ‘οχλήσεις’ του, η διατριβή αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί.

Την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Παρασκευή Κώτση την ευχαριστώ για τη στήριξη της, τις εποικοδομητικές της συμβουλές, τις πολύτιμες υποδείξεις της τόσο σε κλινικά όσο και σε εργαστηριακά θέματα, όπως επίσης και για την διάθεση μεγάλου μέρους του αρχείου των ασθενών της. Ήταν πάντα ‘εκεί’ όποτε την χρειάστηκα.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα άλλα δύο μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μελέτη Ιωάννη και τον Καθηγητή κ. Βουλγαρέλη Μιχαήλ, για την επίβλεψη της πορείας της διδακτορικής μου διατριβής και την συμπαράστασή τους όποτε αυτή ήταν απαραίτητη.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Αργυρή Γιαλεράκη και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Στυλιανή Κοκόρη, για την φιλία τους, τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις τους και τη συνεχή τους ενθάρρυνση.

Η Διευθύντρια της ΝΥ Αιμοδοσίας και του Τμήματος Αιμόστασης κ. Κατσαρού Όλγα, πέρα από την συνεχή της συμπαράσταση, μου στάθηκε και σαν πραγματική

φίλη. Εκτός από το να δίνει λύσεις σε διάφορα προβλήματα, είχε πάντα και έναν καλό λόγο να πει. Την ευχαριστώ.

Σημαντική υπήρξε η βοήθεια του κ. Γεωργίου Λαλλά, όσον αφορά στις τεχνικές της κυτταρομετρίας ροής και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και, ειλικρινά, τον ευχαριστώ πολύ γι' αυτήν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες ανήκουν στους φίλους και συναδέλφους από το Εργαστήριο Αιμόστασης για την υπομονή τους, τη βοήθεια και την υποστήριξή τους όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Δεν θα έπρεπε να παραλείψω να ευχαριστήσω ξεχωριστά την κ. Γκότση Σοφία για τη βοήθειά της στη συλλογή των δειγμάτων, την ενημέρωση των ασθενών και τη συνεχή παρακίνησή της 'να τελειώνω', που τελικά απεδείχθη ιδιαίτερα αποτελεσματική.

Μεγάλο μέρος της ευγνωμοσύνης μου ανήκει στην οικογένειά μου για την αγάπη τους, την υπομονή τους, την πίστη τους σε μένα και τη συνεχή τους στήριξη σε ό,τι και αν αποφασίσω να κάνω. Είμαι πραγματικά τυχερή που τους έχω δίπλα μου.



*Στη μνήμη της μητέρας μου*

*And I think of you walking along a headland  
Of green oats in June,  
So full of repose, so rich with life  
And I see us meeting at the end of the town*

*Patrick Kavanagh (1904-1967)*

*Σε συλλογίζομαι να βηματίζεις κατά μήκος ενός αγρού  
Με χλωρή βρώμη τον Ιούνιο,  
Τόσο γαλήνια, τόσο ζωντανή  
Και βλέπω να συναντιόμαστε στην άκρη της πόλης*

*(Μτφ: Τάκης Π. Πιερράκος)*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κατάλογος εικόνων.....	17
Κατάλογος πινάκων .....	21
Κατάλογος γραφημάτων .....	23
Κατάλογος συντομογραφιών .....	25
<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>31</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (PNH) .....</b>	<b>33</b>
1.1 Εισαγωγικά στοιχεία .....	33
1.2 Επιδημιολογία της PNH .....	37
1.3 Αιτιολογία της PNH .....	41
1.3.1 GPI-άγκυρα.....	41
1.3.2 Γονίδιο PIG-A.....	43
1.3.3 Μοριακή βλάβη στην PNH.....	44
1.3.4 Μοντέλα κλωνικής επέκτασης.....	50
1.3.5 Ανθεκτικότητα στην απόπτωση.....	52
1.3.6 PIG-A μεταλλάξεις σε φυσιολογικά άτομα .....	52
1.4 Το σύστημα του Συμπληρώματος .....	54
1.4.1 Κλασσική οδός.....	55
1.4.2 Εναλλακτική οδός .....	56
1.4.3 Οδός της λεκτίνης .....	57
1.4.4 Λυτική οδός .....	58
1.4.5 Ρυθμιστικές πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος .....	59
1.8.5.1 CD55/DAF (Decay Accelerating Factor).....	61
1.8.5.2 CD59/MIRL (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) .....	62
1.5 Διαταραχές στην βιολογική δράση των εμπλεκόμενων κυττάρων .....	64
1.5.1 Ερυθροκύτταρα.....	64
1.5.2 Πολυμορφοπύρρηνα .....	65
1.5.3 Μονοκύτταρα.....	65
1.5.4 Λεμφοκύτταρα .....	66

1.5.5 Αιμοπετάλια .....	66
1.6 PNH και ανεπάρκεια του μυελού των οστών .....	68
1.6.1 Απλαστική αναιμία και PNH .....	69
1.6.2 Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και PNH .....	70
1.6.3 Οξεία λευχαιμία και λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα στην PNH.....	71
1.7 Η PNH ως ‘Νόσος Μωσαϊκό’ .....	73
1.8 Κατηγοριοποίηση της PNH.....	75
1.9 Κλινικές εκδηλώσεις .....	77
1.9.1 Ενδαγγειακή αιμόλυση και κατανάλωση NO .....	77
1.9.2 Θρομβωτικές επιπλοκές.....	80
1.9.3 Ανεπάρκεια μυελού των οστών .....	81
1.9.4 Διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας.....	82
1.9.5 Λοιμώξεις στην PNH .....	83
1.10 Κύηση και PNH.....	84
1.11 PNH στην παιδική/εφηβική ηλικία .....	85
1.12 Διαγνωστική προσέγγιση .....	89
1.12.1 Κλινικές ενδείξεις δηλωτικές ελέγχου για PNH.....	89
1.12.2 Παλαιότερες διαγνωστικές μέθοδοι.....	91
1.12.2.1 Δοκιμασία Ham ή δοκιμασία του οξινισθέντος ορού .....	91
1.12.2.2 Δοκιμασία λύσης με σακχαρόζη .....	91
1.12.2.3 Δοκιμασία ευαισθησίας λύσης συμπληρώματος .....	92
1.12.2.4 Έλεγχος σε μικροσωληνάρια γέλης sephacryl.....	92
1.12.3 Κυτταρομετρία ροής.....	93
1.12.4 Έλεγχος μεταλλάξεων PIG-A.....	93
1.13 Πρόγνωση.....	94
1.14 Θεραπευτική αντιμετώπιση .....	95
1.14.1 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων .....	96
1.14.2 Μεταγγίσεις ερυθρών, χορήγηση σιδήρου και ερυθροποιητίνης.....	97
1.14.3 Κορτικοστεροειδή .....	98
1.14.4 Ανδρογόνα .....	98
1.14.5 Ανοσοκατασταλτική αγωγή.....	99
1.14.6 Σπληνεκτομή.....	99
1.14.7 Αντιπηκτική αγωγή-θρομβόλυση .....	99
1.14.8 Αναστολείς του συμπληρώματος .....	100

1.14.8.1	Eculizumab (ECU).....	100
1.14.8.1.1	Διακοπή της θεραπείας με Eculizumab.....	105
1.14.8.2	Ravulizumab.....	105
1.14.8.3	Ανάπτυξη νέων αναστολέων του συμπληρώματος.....	107
1.14.9	Γονιδιακή θεραπεία.....	108
1.15	Παρακολούθηση PNH ασθενών.....	109
1.15.1	Παρακολούθηση PNH ασθενών χωρίς θεραπευτική αγωγή.....	109
1.15.2	Παρακολούθηση ασθενών υπό eculizumab.....	110
<b>Κεφάλαιο 2: Θρομβοεμβολική νόσος.....</b>		<b>111</b>
2.1	Εισαγωγικά στοιχεία.....	111
2.2	Επιδημιολογία.....	112
2.3	Μηχανισμός αιμόστασης.....	115
2.4	Συγγενής θρομβοφιλία.....	116
2.4.1	Έλλειψη Αντιθρομβίνης III (ATIII).....	116
2.4.2	Έλλειψη Protein C και Protein S.....	118
2.4.3	APC-R και FV Leiden.....	119
2.4.4	Μετάλλαξη προθρομβίνης FII20210GA.....	122
2.4.5	Σπανιότεροι θρομβοφιλικοί παράγοντες.....	122
2.5	Επίκτητη θρομβοφιλία.....	124
2.6	Υποτροπιάζουσα VTE.....	124
2.7	Θεραπευτική αντιμετώπιση.....	127
2.8	Θρόμβωση στην PNH.....	131
2.8.1	Πνευμονική εμβολή και DVT κάτω άκρων στην PNH.....	133
2.8.2	Φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις.....	133
2.8.2.1	Θρόμβωση άνω άκρων (Upper extremity Deep vein Thrombosis/UEDVT).....	134
2.8.2.2	Σπλαχνική φλεβική θρόμβωση (Splanchnic vein thrombosis/SVT).....	134
2.8.2.2.1	Σύνδρομο Budd-Chiari (BCS).....	136
2.8.2.2.2	Θρόμβωση πυλαίας φλέβας (Portal Vein Thrombosis/PVT).....	136
2.8.2.2.3	Θρόμβωση μεσεντερίου φλέβας (Mesenteric Venous Thrombosis /MVT).....	137

2.8.2.2.4	Θρόμβωση σπληνικής φλέβας (Splenic Splanchnic Vein Thrombosis/spSVT).....	138
2.8.2.3	Θρόμβωση κάτω κοίλης φλέβας (Inferior Vena Cava Thrombosis /IVCT).....	138
2.8.2.4	Θρόμβωση νεφρικής φλέβας (Renal Vein Thrombosis/RVT)...	138
2.8.2.5	Θρόμβωση φλεβωδών κόλπων του εγκεφάλου (Cerebral Venous Sinus Thrombosis/ CVST).....	139
2.8.2.6	Οφθαλμική θρόμβωση (Retinal Vein Occlusion/RVO).....	140
2.8.2.7	Θρόμβωση δερματικών φλεβών.....	142
2.8.3	Αρτηριακή θρόμβωση στην PNH.....	142
2.9	Αντιπηκτική αγωγή στην PNH.....	143
2.10	Μηχανισμοί θρόμβωσης στην PNH.....	146
2.10.1	Ο ρόλος του ενδοθηλίου.....	147
2.10.1.1	Εξωκυτταρικά σωματίδια (EVs).....	149
2.10.2	Ο ρόλος της έλλειψης των TFPI, θειϊκής ηπαράνης, PR3.....	150
2.10.3	Ο ρόλος της επίδρασης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και της εξάντλησης των επιπέδων του NO.....	151
2.10.4	Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.....	153
2.10.5	Δημιουργία μικροσωματιδίων (MPs).....	154
2.10.6	Διαταραχή της Ινωδόλυσης (ρόλος του u-PAR).....	157
2.10.7	Προθρομβωτικοί ανατροφοδοτικοί (feedback) μηχανισμοί.....	158
2.10.8	Λοιποί προπηκτικοί μηχανισμοί επαγόμενοι από το συμπλήρωμα (ανεξάρτητοι από την αιμόλυση).....	159
2.11	Animals models.....	160
<b>Κεφάλαιο 3: Κυτταρομετρία ροής</b> .....		161
3.1	Γενικές αρχές.....	161
3.2	Η κυτταρομετρία ροής στην διάγνωση της PNH.....	162
3.3	Οδηγίες για ορθή ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.....	171
3.4	Έλεγχος στα ερυθροκύτταρα.....	172
3.5	Έλεγχος στα λευκά αιμοσφαίρια (Ουδετερόφιλα / Μονοκύτταρα).....	175
3.5.1	CD157.....	179
3.6	Ελάσσονες PNH κλώνοι (Minor PNH clones).....	180
3.7	Αναφορά αποτελεσμάτων.....	181

<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>183</b>
<b>Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή – Γενικές πληροφορίες .....</b>	<b>185</b>
<b>Κεφάλαιο 2: Σκοπός της μελέτης .....</b>	<b>191</b>
<b>Κεφάλαιο 3: Υλικά &amp; Μέθοδοι .....</b>	<b>193</b>
3.1 Ασθενείς - Μέθοδοι.....	193
3.1.1 Ασθενείς.....	193
3.1.2 Μέθοδοι.....	195
3.1.3 Δείγματα - Εξοπλισμός .....	196
3.1.4 Προετοιμασία ανάλυσης των δειγμάτων .....	197
3.1.4.1 Ανάλυση WBCs.....	197
3.1.4.2 Ανάλυση RBCs.....	198
3.1.4.3 Αρνητικοί μάρτυρες.....	200
3.1.5 Ανάκτηση, οριοθέτηση (gating) και ανάλυση των δειγμάτων.....	200
3.2 Στατιστική ανάλυση .....	208
<b>Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα .....</b>	<b>209</b>
4.1 Αξιολόγηση των μικρού μεγέθους κλώνων ανά παράμετρο και ανά πληθυσμό.....	213
4.2 Συγκρίσεις μεταξύ των τιμών των μεταβλητών βάσει των clinical cut-off ...	220
4.2.1 Σύγκριση των τιμών των MONO FLAER (μονοκύτταρα) βάσει των clinical cut-off, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.....	220
4.2.2 Σύγκριση των τιμών των NEUTRO FLAER (ουδετερόφιλα) βάσει των clinical cut-off, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.....	221
4.2.3 Σύγκριση των τιμών έκφρασης του CD59 (ερυθροκύτταρα) βάσει των clinical cut-off, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.....	222
4.3 Συσχετίσεις μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, ανά πληθυσμό .....	223
4.4 Συσχέτιση της εμφάνισης υποτροπής με τα δημογραφικά και λοιπά στοιχεία των ασθενών .....	226

4.5	Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής 4 (logistic regression analysis) .....	229
<b>Κεφάλαιο 5: Συζήτηση .....</b>		<b>231</b>
5.1	Περιορισμοί της μελέτης .....	243
5.2	Συμπεράσματα.....	244
<b>Περίληψη .....</b>		<b>245</b>
<b>Summary.....</b>		<b>247</b>
<b>Βιβλιογραφία .....</b>		<b>249</b>



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> Επιφανειακές πρωτεΐνες αγκυρωμένες με GPI σε ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα.....	34
<b>Εικόνα 2.</b> Σχηματική απεικόνιση της δομής της GPI .....	42
<b>Εικόνα 3.</b> Βιοσύνθεση της GPI άγκυρας.....	43
<b>Εικόνα 4.</b> Δομή του γονιδίου PIG-A.....	44
<b>Εικόνα 5.</b> Μεταλλάξεις του γονιδίου PIGA στην PNH .....	48
<b>Εικόνα 6.</b> Συνοπτικά η κατανομή και η συχνότητα των μεταλλάξεων στην PNH.....	49
<b>Εικόνα 7.</b> Προτεινόμενα μοντέλα κλωνικής εξέλιξης στην PNH.....	51
<b>Εικόνα 8.</b> Απεικόνιση του δικτύου των χημικών αντιδράσεων της οδού του συμπληρώματος.....	55
<b>Εικόνα 9.</b> Κλασσική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος.....	56
<b>Εικόνα 10.</b> Εναλλακτική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος.....	57
<b>Εικόνα 11.</b> Οδός της λεκτίνης.....	58
<b>Εικόνα 12.</b> Σχηματισμός του συμπλέγματος MAC (Membrane Attack Complex) .....	59
<b>Εικόνα 13.</b> Δράση του συμπληρώματος σε υγιή άτομα και ασθενείς με PNH.....	60
<b>Εικόνα 14.</b> Ο ρόλος των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της οδού του συμπληρώματος.....	60
<b>Εικόνα 15.</b> Το γονίδιο του CD55/DAF .....	61
<b>Εικόνα 16.</b> Ο ρόλος του CD59 στη λύση των ερυθροκυττάρων στην PNH.....	63
<b>Εικόνα 17.</b> Περιπτώσεις συνδυασμού απλαστικής αναιμίας και PNH.....	72
<b>Εικόνα 18.</b> Συσχέτιση μεταξύ AA, MDS, PNH και οξείας λευχαιμίας.....	72
<b>Εικόνα 19.</b> Φαινοτυπικό μωσαϊκό στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.....	73
<b>Εικόνα 20.</b> Γονοτυπικός μωσαϊκισμός σε PNH ερυθροκύτταρα .....	74
<b>Εικόνα 21.</b> Αποχρώσεις ούρων ασθενούς με PNH κατά τη διάρκεια της ημέρας .....	79
<b>Εικόνα 22.</b> Συσχέτιση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων με το μέγεθος του PNH κλώνου σε συνάρτηση με τον χρόνο .....	81

<b>Εικόνα 23.</b> Κατανομή χαρακτηριστικών σε παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς με PNH από το <i>International PNH Registry</i> .....	87
<b>Εικόνα 24.</b> Δοκιμασία ανίχνευσης PNH σε γέλη sephacryl .....	93
<b>Εικόνα 25.</b> Δομή του Eculizumab .....	101
<b>Εικόνα 26.</b> Μηχανισμός εξωαγγειακής αιμόλυσης σε ασθενή υπό eculizumab.....	102
<b>Εικόνα 27.</b> Ποικίλη αιματολογική απόκριση στη θεραπεία με ECU.....	103
<b>Εικόνα 28.</b> Επίδραση τη ηλικίας στην επίπτωση της εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολής .....	113
<b>Εικόνα 29.</b> Τάσεις στη συχνότητα εμφάνισης της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης και πνευμονικής εμβολής ανά ηλικία και φύλο .....	114
<b>Εικόνα 30.</b> Τάσεις στη συχνότητα επίπτωσης των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στη διάρκεια του χρόνου.....	114
<b>Εικόνα 31.</b> Μηχανισμός αιμόστασης .....	115
<b>Εικόνα 32.</b> Ενεργοποιημένη Protein C (APC) .....	119
<b>Εικόνα 33.</b> Δομή του FV Leiden.....	120
<b>Εικόνα 34.</b> Η αντίσταση APC ως σύνθετος φαινότυπος.....	121
<b>Εικόνα 35.</b> Η μετάλλαξη 20210GA στο γονίδιο της προθρομβίνης (FII) στη θέση 20210.....	122
<b>Εικόνα 36. Α)</b> Μαγνητική αγγειογραφία σε PNH ασθενή με θρόμβωση ανώτερου οβελιαίου κόλπου και σχηματισμό παράπλευρων αγγείων	
<b>Β)</b> Θρόμβωση αμφιβληστροειδικής φλέβας .....	141
<b>Εικόνα 37.</b> Θρόμβωση δερματικών φλεβών σε ασθενή με PNH.....	142
<b>Εικόνα 38.</b> Η ισορροπία της αιμόστασης στην PNH τείνει προς την πλευρά της θρόμβωσης εξαιτίας των πολλαπλών παραγόντων που συνεισφέρουν στην δημιουργία των θρόμβων .....	146
<b>Εικόνα 39.</b> Διαγραμματική απεικόνιση υποθετικών μηχανισμών εκδήλωσης θρόμβωσης σε ασθενείς με PNH .....	147
<b>Εικόνα 40. Α)</b> Σχηματική αναπαράσταση της βασικής μονάδας ενός κυτταρομέτρου και νηματικής ροής κυττάρων/σωματιδίων.	
<b>Β)</b> Ακτίνα laser/forward scatter - μελέτη μεγέθους κυττάρων/σωματιδίων,	
<b>Γ-Δ)</b> Ακτίνα laser/side scatter- μελέτη δομής/κοκκίωσης.....	162
<b>Εικόνα 41.</b> Επίπεδα έκφρασης των CD55 και CD59 σε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες στο περιφερικό αίμα .....	164

<b>Εικόνα 42.</b> Τα βασικά GPI-εξαρτώμενα μόρια που μπορούν να μελετηθούν με την κυτταρομετρία ροής για τη διάγνωση της PNH .....	165
<b>Εικόνα 43.</b> Εντοπισμός PNH λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής .....	165
<b>Εικόνα 44.</b> Κατανομή μεγέθους κλώνου με έλλειψη σε GPI, σε έλεγχο μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων με χρήση διαφορετικών δεικτών .....	166
<b>Εικόνα 45.</b> Μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης των CD14 και CD16 σε PNH μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα.....	167
<b>Εικόνα 46.</b> Εντοπισμός PNH μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων του μυελού των οστών με χρήση του συνδυασμού CD16/CD55/CD45/CD14 .....	168
<b>Εικόνα 47.</b> Χαρακτηριστικά ασθενών με εντοπισμό διευρυμένου PNH κλώνου .....	169
<b>Εικόνα 48.</b> Πιθανότητα εξέλιξης και εξάλειψης κλώνων με έλλειψη σε GPI-AP ασθενών με AA .....	170
<b>Εικόνα 49. Α)</b> Σαφής διαχωρισμός τύπων κλώνων PNH με CD59 στα ερυθροκύτταρα, <b>Β)</b> διαχωρισμός τύπων κλώνων PNH με CD55 στα ερυθροκύτταρα.....	172
<b>Εικόνα 50.</b> Παράδειγμα ανάλυσης ερυθροκυττάρων στην PNH με χρήση anti-CD235a και CD59-PE .....	174
<b>Εικόνα 51.</b> Παράδειγμα ελέγχου ασθενούς χωρίς κλώνους PNH στα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Φαίνεται η στρατηγική οριοθέτησης (gating).....	178
<b>Εικόνα 52.</b> Παράδειγμα ελέγχου ασθενούς με μεγάλους PNH κλώνους στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα. Φαίνεται η στρατηγική οριοθέτησης (gating).....	178
<b>Εικόνα 53.</b> Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων σε δείγμα εξεταζομένου .....	201
<b>Εικόνα 54.</b> Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER σε δείγμα εξεταζομένου.....	202
<b>Εικόνα 55.</b> Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER σε δείγμα εξεταζομένου.....	203
<b>Εικόνα 56.</b> Ανάλυση της έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα σε δείγμα εξεταζομένου .....	203
<b>Εικόνα 57.</b> Ανάλυση της έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα σε δείγμα εξεταζομένου .....	204
<b>Εικόνα 58.</b> Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων σε ασθενή με νόσο PNH .....	205

<b>Εικόνα 59.</b> Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER σε ασθενή με νόσο PNH.....	206
<b>Εικόνα 60.</b> Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER σε ασθενή με νόσο PNH.....	206
<b>Εικόνα 61.</b> Ανάλυση έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα σε ασθενή με νόσο PNH.....	207
<b>Εικόνα 62.</b> Ανάλυση έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα σε ασθενή με νόσο PNH.....	207

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b> Τύποι PNH, αιματολογικά ευρήματα και μέγεθος κλώνου.....	76
<b>Πίνακας 2.</b> Κλινικές εκδηλώσεις στην PNH.....	78
<b>Πίνακας 3.</b> Ομάδες υψηλού κινδύνου που χρήζουν ελέγχου για PNH.....	89
<b>Πίνακας 4.</b> Ενδείξεις και δεδομένα αλλογενούς μεταμόσχευσης σε ασθενείς με PNH.....	97
<b>Πίνακας 5.</b> Παράγοντες κινδύνου για υποτροπιάζον θρομβοεμβολικό επεισόδιο (Relative risk).....	126
<b>Πίνακας 6.</b> Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση αιμορραγικού επεισοδίου σε ασθενείς υπό αντιπηκτική αγωγή.....	127
<b>Πίνακας 7.</b> Αντιπηκτική αγωγή σε ασθενείς με VTE ανάλογα με τη φάση της θεραπείας.....	129
<b>Πίνακας 8.</b> Παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση SVT.....	135
<b>Πίνακας 9.</b> Γενικές οδηγίες χειρισμού και ανάλυσης δειγμάτων στην κυτταρομετρία ροής.....	171
<b>Πίνακας 10.</b> Τιμές των μεταβλητών για τους ασθενείς με νόσο PNH.....	210
<b>Πίνακας 11.</b> Ασθενείς με νόσο PNH / αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε ασθενή.....	210
<b>Πίνακας 12.</b> Δημογραφικά στοιχεία και τα κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων.....	211
<b>Πίνακας 13.</b> Τιμές των clinical cut-off για την αξιολόγηση των μικρού μεγέθους PNH κλώνων.....	213
<b>Πίνακας 14.</b> Σύγκριση των τιμών των μεταβλητών μεταξύ των πληθυσμών της Ομάδας-1.....	214
<b>Πίνακας 15.</b> Ποσοστά παρουσίας μικρών κλώνων ανά ομάδα και ανά μεταβλητή σύμφωνα με τα clinical cut-off.....	215
<b>Πίνακας 16.</b> Κατανομή της παρουσίας μικρών κλώνων στις εξετασθείσες μεταβλητές ανά υποπληθυσμό και για το σύνολο των ασθενών.....	217
<b>Πίνακας 17.</b> Ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με MONO FLAER $\geq 0,099\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.....	220
<b>Πίνακας 18.</b> Ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με NEUTRO FLAER $\geq 0,073\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.....	221

<b>Πίνακας 19.</b> Ποσοστά των συμμετεχόντων με RED CD59 $\geq 0,095\%$ (ερυθροκύτταρα), ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό .....	222
<b>Πίνακας 20.</b> Συντελεστές συσχέτισης του Spearman μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59 για τους ασθενείς .....	223
<b>Πίνακας 21.</b> Συντελεστές συσχέτισης του Spearman μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, για τους υγιείς δότες ....	224
<b>Πίνακας 22.</b> Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με τα δημογραφικά τους στοιχεία, το οικογενειακό ιστορικό τους και το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου .....	226
<b>Πίνακας 23.</b> Τιμές των μεταβλητών που εξετάστηκαν (MONO FLAER, NEUTRO FLAER, RED CD59), για τους ασθενείς σε σχέση με την εμφάνιση υποτροπής ή όχι.....	228
<b>Πίνακας 24.</b> Αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης.....	229

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<b>Γράφημα 1.</b> Διαφορές στις τιμές των συμμετεχόντων στα MONO FLAER, ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό στην Ομάδα-1 .....	214
<b>Γράφημα 2.</b> Συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER για τον πληθυσμό των ασθενών.....	224
<b>Γράφημα 3.</b> Συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER για τους υγιείς δότες .....	225
<b>Γράφημα 4.</b> Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου .....	227
<b>Γράφημα 5.</b> Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού .....	227





## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

### **A**

AA: Aplastic anaemia

ACHE: Ακετυλοχολινεστεράση

ADP: Adenosine Diphosphate

ADP-RT: Mono ADP-ριβσοσυλ-τρανσφεράση

APC: Activated Protein C

APC-R: Activated Protein C Resistance

APS: Anti-Phospholipid Syndrome

aPTT: Activated Partial Thromboplastin Time

ATIII: Antithrombin-III

### **B**

BCS: Budd-Chiari syndrome

BM: Bone marrow

BMF: Bone marrow failure syndrome

BMI: Body mass index

BRVO: Branch Retinal Vein Occlusion

bp: Base pairs

### **C**

CHIP: Clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CFC(s): Colony-Forming Cell(s)

CI: Confidence intervals

CrCL: Creatinine clearance

CRP: C Reactive Protein

CRVO: Central Retinal Vein Occlusion

CVST: Cerebral Venous Sinus Thrombosis

CVT: Cerebral Venous Thrombosis

### **D**

DAF: Decay Accelerating Factor

DNT: Deep Vein Thrombosis

DOACs: Direct Oral Anticoagulants

## **E**

EDTA: Ethylene diamine tetra-acetic acid

EC: Endothelial cells

ECFCs: Endothelial colony-forming cells

ECU: Eculizumab

e-GFR: Estimated glomerular filtration rate

EPCR: Endothelial Protein C Receptor

ER: Endoplasmic reticulum

EVs: Extracellular vesicles

## **F**

FC: Flow Cytometry

FDA: Food and Drug Administration

FII: Factor II

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FLAER: Fluorescent-Labeled inactive toxin pro-Aerolysin

FSC: Forward scatter

FIX: Factor IX

FL: Fluorescence

FV: Factor V

FVIII: Factor VIII

FVL: Factor V Leiden

FXI: Factor XI

## **G**

GlcNAc: N-acetyl-glucosamine

GlcN: N-glucosamine

GlcNAc-PI: N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη-φωσφατιδύλ-ινοσιτόλη

GPI: Glycosyl-phosphatidylinositol

GPI-APs: GPI-anchored proteins

GVHD: Graft-versus host disease

## **H**

HC-II: Heparin cofactor-II

HRVO: Hemiretinal Venous Occlusion

HR: Hazard Ratio

HS: Heparan sulfate

HSCT: Hematopoietic allogeneic stem cell transplant

## **I-K**

ICCS: International Clinical Cytometry Society

IPIG: International PNH interest group

IL: Interleukin

INR: International Normalized Ratio

IQR: Interquartile range

IVCT: Inferior Vena Cava Thrombosis

JAK2: Janus kinase 2

kDa: kiloDalton

## **L**

LAP: Leucocyte alkaline phosphatase

LDH: Lactate dehydrogenase

LMWH: Low molecular weight heparin

Lp(a): Lipoprotein (a)

## **M**

MAC: Membrane Attack Complex

Man: Mannose

MASP-1: Mannose Associated Serine Protease-1

MASP-2: Mannose Associated Serine Protease-2

MBL: Mannose Binding Lectin

MDS: Myelodysplastic syndrome

mHSC: Multipotent haematopoietic stem cell

MIRL: Membrane Inhibitor of Reactive Lysis

MPs: Microparticles

MPN: Myeloproliferative neoplasm

MRI: Magnetic Resonance Imaging

mRNA: Messenger RNA

MVT: Mesenteric Venous Thrombosis

## **N**

NGS: Next generation sequencing

NK: Natural killer cells

NO: Nitric Oxide

NT-proBNP: N-terminal pro-brain natriuretic peptide

## **O**

OC: Oral contraceptives

OR: Odds ratio

ORF: Open reading frame

## **P**

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1

PAF: Platelet Activating Factor

PAP: Plasmin anti-Plasmin complex

PC: Protein C

PE: Pulmonary Embolism

PECAM: Platelet Endothelium Adhesion Molecule

PEtN: Phosphoethanolamine

PI: Phosphatidyl-inositol

PIG-A: Phosphatidylinositol glycan class-A

PIG-C: Phosphatidylinositol glycan class-C

PIG-H: Phosphatidylinositol glycan class-H

PIG-T: Phosphatidylinositol glycan class-T

PMT: Photomultiplier

PMPs: Platelet-derived microparticles

PNH: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

PNH-sc: PNH subclinical

PrPc: Prion protein

Pr S: Protein S

PR3: Proteinase 3

PS: Phosphatidyl-serine

PSM: Probability state model

PT: Prothrombin

PVT: Portal Vein Thrombosis

## **Q-R**

RBCs: Red Blood Cells

RVO: Retinal Vein Occlusion

RVT: Renal Vein Thrombosis

## **S**

SSC: Side scatter

SD: Standard deviation

SCR: Short consensus repeats

SPS: Sticky Platelet Syndrome

spSVT: Splenic splanchnic vein thrombosis

sVCAM-1: Soluble vascular cell adhesion molecule-1

SVT: Splanchnic vein thrombosis

## **T**

TAFI: Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$

TF: Tissue Factor

TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor

TM: Thrombomodulin

tPA: Tissue Plasminogen Activator

## **U**

UDP-GlcNAc: Ουριδινο-5' -διφωσφορική-N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη

UEDVT: Upper extremity Deep vein Thrombosis

UFH: Unfractionated Heparin

u-PA: Urokinase Plasminogen Activator

u-PAR: Urokinase Plasminogen Activator Receptor

## **V-Z**

VCAM-1: Vascular Cell Adhesion Molecule-1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VKA: Vitamin K antagonists

VTE: Venous Thromboembolism

VWF: Von Willebrand factor

WBCs: White Blood Cells

WPBs: Weibel Palade bodies

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

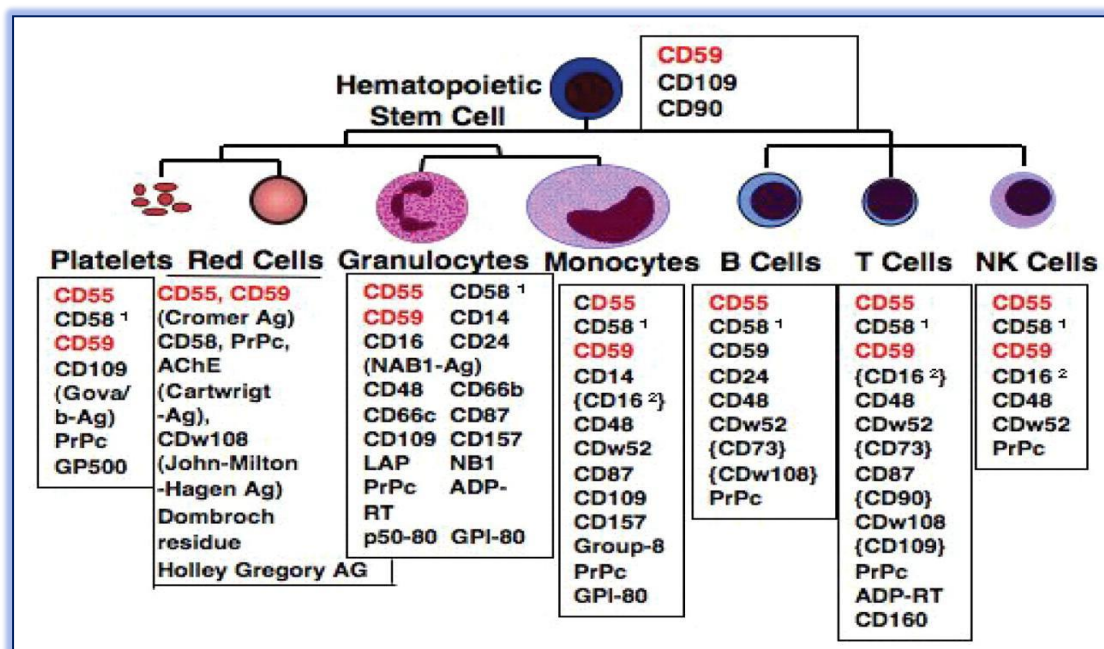




# Κεφάλαιο 1: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

## 1.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/PNH) αποτελεί είδος σπάνιου νοσήματος, το οποίο εμφανίζεται σε όλες ανεξαιρέτως τις ηλικιακές ομάδες, απαντάται συχνότερα σε άτομα ηλικιακού εύρους 20-50 ετών, ενώ είναι εξαιρετικά σπάνια σε ηλικίες μικρότερες των 10 ετών (Socie et al. 1996; Hillmen et al. 1995; Ware et al. 1991). Προσβάλλει με την ίδια ευκολία και τα δύο φύλα, με τη συχνότητα επιπολασμού να εκτιμάται σε 1-10 ανθρώπους ανά 1.000.000 πληθυσμού, γεγονός που καθιστά το εν λόγω νόσημα ως εξαιρετικά σπάνιο (Rosse et al. 1997). Θεωρείται επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, εξαιτίας της οποίας προκύπτουν κύτταρα με έλλειψη ή ανεπάρκεια μεμβρανικών πρωτεϊνών λόγω μη δυνατότητας πρόσδεσης στην άγκυρα GPI (glycosyl-phosphatidylinositol) (Rosse 1997; Μελέτης και συν. 2009). Η ανεπάρκεια αυτή προκαλεί ενδαγγειακή αιμόλυση, κυτταροπενία περιορισμένου ή εκτεταμένου βαθμού και/ή εμφάνιση θρόμβωσης. Βασική εστία θνησιμότητας στην PNH αποτελούν οι αγγειακές θρομβώσεις που επισυμβαίνουν στις ηπατικές και ενδοκοιλιακές φλέβες (Mathieu et al. 1995; Ware et al. 1991). Η αρχική εκτίμηση για το μέσο προσδόκιμο επιβίωσης μετά τη διάγνωση ήταν τα δέκα έτη. Ως αποτέλεσμα του εκτεταμένου εύρους συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια εξέλιξης της νόσου, έχει αποδοθεί στην PNH το προσωνύμιο 'ο μεγάλος υποδύμενος' ('the great imitator'). Το γεγονός της ταυτόχρονης συνύπαρξης της τριάδας της αιμολυτικής αναιμίας, πανκυτταροπενίας και θρόμβωσης, καθιστά την PNH ως μοναδικό από κλινικής άποψης σύνδρομο. Η συγκεκριμένη ιδιαιτερότητα συνέβαλε στον επαναπροσδιορισμό της PNH από αμιγώς επίκτητη αιμολυτική αναιμία σε δυσλειτουργία (ως απόρροια μετάλλαξης) του αιμοποιητικού προγονικού κυττάρου. Σε αρκετούς ασθενείς (~15%) καταγράφονται αιφνίδια επεισόδια υποτροπής, τα οποία χαρακτηρίζονται ως εμμένοντα, με μεγάλη χρονική διάρκεια εκδήλωσης (Hillmen et al. 1995). PNH κλώνοι εμφανίζονται συχνά σε περιπτώσεις μυελικής ανεπάρκειας (κυρίως απλαστική αναιμία και MDS). Έχουν βρεθεί τουλάχιστον 27 διαφορετικές GPI εξαρτώμενες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην PNH· η έλλειψη τουλάχιστον δύο εξ' αυτών απαιτείται για την διάγνωση της νόσου (Εικόνα 1) (Bessler et al. 2001).



**Εικόνα 1.** Επιφανειακές πρωτεΐνες αγκυρωμένες με GPI σε ανθρώπινα αιμοποιητικά κύτταρα. (Συνομογραφίες: PrPc:prion protein; AChE:ακετυλοχολινεστεράση; LAP:αλκαλική φωσφατάση λευκοκυττάρων; ADP-RT:mono ADP-ριβουσυλ-τρανσφεράση; GPI-80:συνδεδεμένη και σε διαμεμβρανική μορφή διαμεμβρανικά αγκυρωμένη ισομορφή) (Bessler 2001).

Οι GPI-αγκυρωμένες πρωτεΐνες στα αιμοποιητικά κύτταρα εκτελούν ένα πλήθος λειτουργιών. Λειτουργούν ως βοηθητικά μόρια για διάφορους υποδοχείς, ως ενεργοποιητές της μεταγραφικής διαδικασίας, ως αναστολείς του συμπληρώματος ή ως μόρια προσκόλλησης. Για παράδειγμα, οι CD55 και CD59 είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που αναστέλλουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην κυτταρική επιφάνεια. Η έλλειψη αυτών των δύο πρωτεϊνών στα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ευαισθησία των ερυθροκυττάρων έναντι του συμπληρώματος και ως εκ τούτου και για την ενδαγγειακή αιμόλυση και την αιμοσφαιρινουρία στους ασθενείς με PNH (Bessler et al. 2001; Brodsky 2014).

Η πρώτη κλινική αναφορά στην PNH καταγράφηκε το 1678 από τον γερμανό Schmidt, ωστόσο η πρώτη τεκμηριωμένη περιγραφή πραγματοποιήθηκε το 1882 από τον γερμανό Paul Strubing, ο οποίος περιέγραψε την συγκεκριμένη νόσο ως κλινικό σύνδρομο (Crosby 1951). Μόλις το 1911 αποδείχθηκε από τον Hijmans van derBerg ότι η PNH αποτελεί μια μορφή αιμολυτικής αναιμίας, η οποία οφείλεται σε ‘δυσλειτουργία των ερυθρών’, ενώ το 1937 οι Ham και συνεργάτες επεσήμαναν τον ρόλο του συμπληρώματος σχετικά με την λύση των παθολογικών ερυθροκυττάρων. Η

κλωνικότητα της νόσου προσδιορίστηκε το 1970. Ο όρος ‘νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία’ απευθύνεται στη περιγραφή της καταστροφής των ερυθροκυττάρων, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αιμοσφαιρίνης στα ούρα. Η παρουσία της αιμοσφαιρίνης γίνεται αντιληπτή στη θέα ούρων με απόχρωση καφέ-κόκκινη τις πρώτες πρωϊνές ώρες. Ο όρος ‘νυκτερινή’ σχετίζεται με την αρχική θεώρηση πως η αιμόλυση οφείλονταν σε οξέωση που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια του ύπνου, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και την μετέπειτα καταστροφή ερυθροκυττάρων που στερούνται μεμβρανικής προστασίας (*Ham & Dingle 1939; Crosby 1953; Boccuni et al. 2000*). Είναι πλέον γνωστό πως η αιμόλυση λαμβάνει χώρα καθ’ όλη τη διάρκεια της ημέρας, ενώ η αιμοσφαιρινουρία εκδηλώνεται το πρωί ως αποτέλεσμα της αύξησης της συγκέντρωσης των ούρων την νύχτα. Τα ευρήματα αναιμίας είναι αιμολυτικού τύπου, με άμεση Coombs αρνητική, αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, ελάττωση των αιμοσφαιρινών, αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης και σημαντική αύξηση των επιπέδων της γαλακτικής δεϋδρογενάσης (LDH) (*Brodsky 2009*). Η αύξηση της LDH μπορεί να φτάσει και πάνω από 3000 U/L ανάλογα με το βαθμό της αιμόλυσης. Ο μυελός των οστών ενδέχεται να παρουσιάζει υπερπλασία της ερυθράς σειράς. Σε ένα μεγάλο ποσοστό (~70%) παρατηρείται λευκοπενία και ήπια ουδετεροπενία, λόγω μειωμένης παραγωγής (*Nishimura et al. 2004*). Η επιβίωση των πολυμορφοπύρηνων, απουσία σπληνομεγαλίας, είναι φυσιολογική. Συχνά παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης των πολυμορφοπύρηνων. Στο 50-70% των περιπτώσεων παρουσιάζεται θρομβοπενία με αριθμό αιμοπεταλίων  $<150 \times 10^9/L$ . Σε ασθενείς με PNH έχουν βρεθεί και σπάνιες κυτταρογενετικές ανωμαλίες (π.χ. έλλειψη του χρωμοσώματος Y, τρισωμία του χρωμοσώματος 9). Βέβαια καμία από αυτές τις κυτταρογενετικές ανωμαλίες δεν χρησιμοποιείται για διάγνωση ή επιβεβαίωση της νόσου (*Lee 1993*).



## 1.2 Επιδημιολογία της PNH

Τα συλλεχθέντα επιδημιολογικά στοιχεία αναφορικά με την συχνότητα εκδήλωσης της PNH είναι περιορισμένα, γεγονός που αποδίδεται στη σπάνια φύση του συγκεκριμένου νοσήματος, σε συνδυασμό με τον μεγάλο βαθμό διαγνωστικής δυσκολίας. Η ελάχιστη συχνότητα εκδήλωσης εκτιμάται σε 1-1,5 περιστατικά ανά εκατομμύριο πληθυσμού (μπορεί να είναι υψηλότερη σε ορισμένες περιοχές), ενώ εμφανίζει παρόμοια επιδημιολογική εικόνα με αυτή της απλαστικής αναιμίας (*Issaragrisil et al. 1999; Hill et al. 2017*). Τα δύο νοσήματα εμφανίζονται περισσότερο συχνά σε ενήλικες νεαρής ηλικίας και δευτερευόντως σε ανθρώπους με συμπληρωμένη την έβδομη δεκαετία (*Nishimura et al. 2004*). Υπάρχουν αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία, σύμφωνα με τις οποίες η PNH προσβάλλει περισσότερο συχνά το γυναικείο φύλο στην Ευρώπη και αντίστοιχα το ανδρικό φύλο στην Ασία (*Socie et al. 1996; Hillmen et al. 1995; Ware et al. 1991*).

Η νόσος εμφανίζεται πιο συχνά σε χώρες της Ασίας (Ιαπωνία, Κορέα, Κίνα) απ' ότι στις δυτικές χώρες (Ηνωμένες Πολιτείες, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο). Σε μελέτη των *Nishimura et al. (2004)* σχετικά με τις διαφορετικές κλινικές εκδηλώσεις της PNH μεταξύ της λευκής<sup>1</sup> και της ασιατικής φυλής καταδείχθηκε ότι η λευκή φυλή παρουσιάζει περισσότερα θρομβοεμβολικά επεισόδια στην PNH σε σχέση με τους Ασιάτες, όπου η PNH εκδηλώνεται κατά κύριο λόγο ως απλαστική αναιμία. Η υπόθεση που αρχικά έγινε, ήταν ότι οι εν λόγω διαφορές συσχετιζόνταν με το μέγεθος του μεταλλαγμένου PIG-A κλώνου. Στη συγκεκριμένη μελέτη βρέθηκε ότι οι PNH ασθενείς της λευκής φυλής, οι οποίοι και εμφανίστηκαν κατά 76% με επεισόδια θρόμβωσης, είχαν μεγαλύτερους πληθυσμούς CD59(-) ερυθροκυττάρων και πολυμορφοπύρηνων σε σχέση με τους Ασιάτες. Θεωρήθηκε ότι εφόσον η παρουσία θρόμβωσης συσχετίζεται με υψηλότερο αριθμό κυττάρων με ανεπάρκεια GPI, τότε οι Ασιάτες ασθενείς ίσως προστατεύονται από τα θρομβοεμβολικά επεισόδια λόγω της απλασίας και του σημαντικά μικρότερου μεγέθους κλώνου. Πιθανά οι γενετικές διαφορές μεταξύ λευκής και της ασιατικής φυλής να επηρεάζουν την εκδήλωση θρομβωτικού επεισοδίου στην PNH, ενώ τα συνήθη κληρονομικά αίτια (συγγενής

<sup>1</sup> Στην εν λόγω μελέτη, ο πληθυσμός που αναφέρεται ως 'λευκή φυλή' αφορά 176 ασθενείς που ελέγχθηκαν από το Duke University και ζούσαν στις ΗΠΑ και περιελάμβανε: 153 (86,9%) άτομα από τη λευκή φυλή, 12 (6,8%) από τη μαύρη, 6 (3,4%) ισπανικής καταγωγής, 3 (1,7%) αραβικής και από 1 άτομο (0,6%) αμερικανικής (ιθαγενής) και ασιατικής καταγωγής.

θρομβοφιλία) δεν φαίνεται να παίζουν σημαντικότα ρόλο. Η βάση των εν λόγω φαινοτυπικών διαφορών παραμένει άγνωστη, ωστόσο αποτελεί σημαντική παράμετρο που θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν ενόψει της διαμόρφωσης ενός θεραπευτικού σχεδίου αντιμετώπισης (*Nishimura et al. 2004; Parker et al. 2005*).

Όπως έχει αναφερθεί, μπορούν να νοσήσουν άνθρωποι όλων ανεξαιρέτως των ηλικιακών ομάδων, ωστόσο ο έλεγχος και η διάγνωση αφορά κυρίως ανθρώπους ηλικίας 40-50 ετών (*Socie et al. 1996*). Τα παιδιά και οι έφηβοι αντιστοιχούν στο 10% επί του συνόλου των περιστατικών και συνήθως εκδηλώνουν δικτυοπενία ή πανκυτταροπενία, ενώ η εκδήλωση θρόμβωσης επισυμβαίνει με την ίδια συχνότητα σε όλες ανεξαιρέτως τις ηλικιακές ομάδες (*Besa 2007; Parker et al. 2005*). Δεν έχει καταγραφεί κάποια οικογενειακή προδιάθεση.

Το Διεθνές Μητρώο PNH (*International PNH Registry*) ιδρύθηκε το 2003 για τη συλλογή ολοκληρωμένων δεδομένων σχετικά με την ιστορία της PNH και μπορεί να παρέχει επιδημιολογικά δεδομένα. Σε αυτό συμπεριλαμβάνονται ασθενείς οποιασδήποτε ηλικίας με κλινική διάγνωση PNH (με οποιαδήποτε αποδεκτή διαγνωστική μέθοδο) ή κλώνο PNH  $\geq 0,1\%$  όλων των κυττάρων του αίματος. Τον Ιούνιο του 2012, είχαν εγγραφεί 1610 ασθενείς από 273 κέντρα σε 25 χώρες. Από αυτούς τους ασθενείς, το 92,5% ήταν από την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική, με το 87,5% να ανήκει στη λευκή φυλή. Δεν υπάρχουν καθορισμένα βιολογικά δεδομένα που να εξηγούν πλήρως αυτή την κατανομή. Οι υπόλοιποι ασθενείς ήταν ασιατικής καταγωγής ή από τα νησιά του Ειρηνικού ωκεανού (5%), αφρικανικής καταγωγής (3,5%), ιθαγενείς Αβορίγινες (0,2%) ή άλλης άγνωστης εθνότητας (3,9%). Το ηλικιακό εύρος κυμαίνεται κυρίως μεταξύ 30-59 ετών (για το 54,6% του πληθυσμού του μητρώου). Η PNH είναι σπάνια στα παιδιά, ωστόσο τείνει να εκδηλώνεται στην εφηβεία. Σε μετανάλυση παρατηρήθηκε μία ελαφρά επικράτηση του γυναικείου πληθυσμού (54,4%), αν και το ποσοστό των γυναικών με PNH, φαίνεται σημαντικά χαμηλότερο στις ασιατικές χώρες (44,9%) από ό,τι στις δυτικές (54,9%). Το εύρημα αυτό πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι σε ορισμένες χώρες της Ασίας, οι άνδρες έχουν μεγαλύτερη πρόσβαση στην ιατρική περίθαλψη από τις γυναίκες.

Ένας περιορισμός των δεδομένων από το Διεθνές Μητρώο PNH είναι ότι οι πληροφορίες για την PNH δεν είναι διαθέσιμες από όλες τις χώρες. Επιπλέον, πολλοί ασθενείς που είναι εγγεγραμμένοι έχουν απλαστική αναιμία ως κύρια διάγνωση, καθώς το μητρώο επιτρέπει να συμπεριλαμβάνονται ασθενείς με  $>0,1\%$  PNH

κοκκιοκύτταρα. Ως εκ τούτου, τα ποσοστά επιπολασμού δεν βασίζονται μόνο σε ασθενείς με αμιγώς αιμολυτική PNH.

Οι ειδικές κλινικές εκδηλώσεις της PNH μπορεί να διαφέρουν σε διαφορετικές εθνότητες. Όπως αναφέρθηκε θρομβωτικά επεισόδια που σχετίζονται με την PNH συμβαίνουν σε έως και 30% των ασθενών στις δυτικές χώρες σε σύγκριση με ένα ποσοστό <15% σε ασθενείς από ασιατικές χώρες. Ωστόσο, λόγω του αυξημένου επιπολασμού της απλαστικής αναιμίας στις ασιατικές χώρες σε σύγκριση με τη δυτική Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η σχετιζόμενη με την PNH ανεπάρκεια μυελού των οστών είναι πιο συχνή σε Ασιάτες ασθενείς από ό,τι η θρόμβωση που σχετίζεται με την PNH (Hill et al. 2017).

Λόγω της σπανιότητας της PNH, η επίπτωση και τα ποσοστά επιπολασμού που έχουν αναφερθεί είναι πιθανό να έχουν υποεκτιμηθεί (Socie et al. 2016). Προκειμένου να εκτιμηθεί καλύτερα η επίπτωση και ο επιπολασμός της νόσου, στο Ηνωμένο Βασίλειο και στις ΗΠΑ διενεργήθηκαν 2 επιδημιολογικές μελέτες. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, σε μελέτη εξελικτικής δυναμικής, εκτιμήθηκε ο επιπολασμός των κλινικών περιπτώσεων, τόσο των μονοκλωνικών όσο και των πολυκλωνικών (πολλαπλοί κλώνοι που προκύπτουν ανεξάρτητα, μέσα από τη δεξαμενή των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων). Χρησιμοποιώντας το μοντέλο του Markov, όπως επίσης και την ηλικιακή κατανομή του πληθυσμού, λήφθηκαν δεδομένα από το Γραφείο Απογραφής των ΗΠΑ (U.S. Census Bureau), και υπολογίστηκε ότι ο επιπολασμός της κλινικής PNH ήταν 1,76 περιπτώσεις ανά 100.000 άτομα (Mon Pere et al. 2018). Στο Ηνωμένο Βασίλειο, για τον καλύτερο προσδιορισμό της επίπτωσης και του επιπολασμού της PNH, οι ερευνητές συνέλεξαν τα δεδομένα για ασθενείς με PNH, στις περιοχές North and East Yorkshire, Northern Lincolnshire και West Yorkshire, στο χρονικό διάστημα από Ιανουάριο 1991 έως Ιούλιο 2006. Κατά τη διάρκεια αυτής της χρονικής περιόδου, διαγνώστηκαν 76 ασθενείς με PNH, κάτι που αντιστοιχεί σε μία επίπτωση 0,13 άτομα ανά 100.000. Βάσει των ανωτέρω δεδομένων και των ποσοστών επιβίωσης, ο εκτιμώμενος 15ετής επιπολασμός της νόσου ήταν 1,59 ανά 100.000 άτομα (Hill et al. 2006).

Η διάμεση επιβίωση των ασθενών με PNH ήταν διάρκειας περίπου 10 χρόνων τη δεκαετία του 1990, αλλά αυξήθηκε σε >20 έτη στις αρχές της δεκαετίας του 2000. Από την εισαγωγή της θεραπείας με eculizumab, οι ασθενείς με PNH μπορούν να ζήσουν μια σχετικά φυσιολογική ζωή και σε ποιότητα και σε διάρκεια. Οι ασθενείς με αιμολυτική PNH που λαμβάνουν eculizumab έχουν πιο ευνοϊκή πρόγνωση από

τους ασθενείς με ανεπάρκεια μυελού των οστών, όπως η απλαστική αναιμία. Ο λόγος αυτής της διαφοράς είναι ότι το eculizumab δεν αντιμετωπίζει την υποκείμενη ανεπάρκεια του μυελού των οστών. Από τα δεδομένα του Διεθνούς Μητρώου PNH (*International PNH Registry*), φαίνεται ότι η πιο συχνή αιτία θανάτου (11,7%) ήταν η ανεπάρκεια μυελού των οστών σε ασθενείς που πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια για PNH και απλαστική αναιμία (122 θανόντες). Δεδομένα από το μητρώο δείχνουν ότι περίπου το 75% των ασθενών με PNH λαμβάνουν θεραπεία με eculizumab (*Hill et al. 2017*).



## 1.3 Αιτιολογία της PNH

### 1.3.1 GPI-άγκυρα

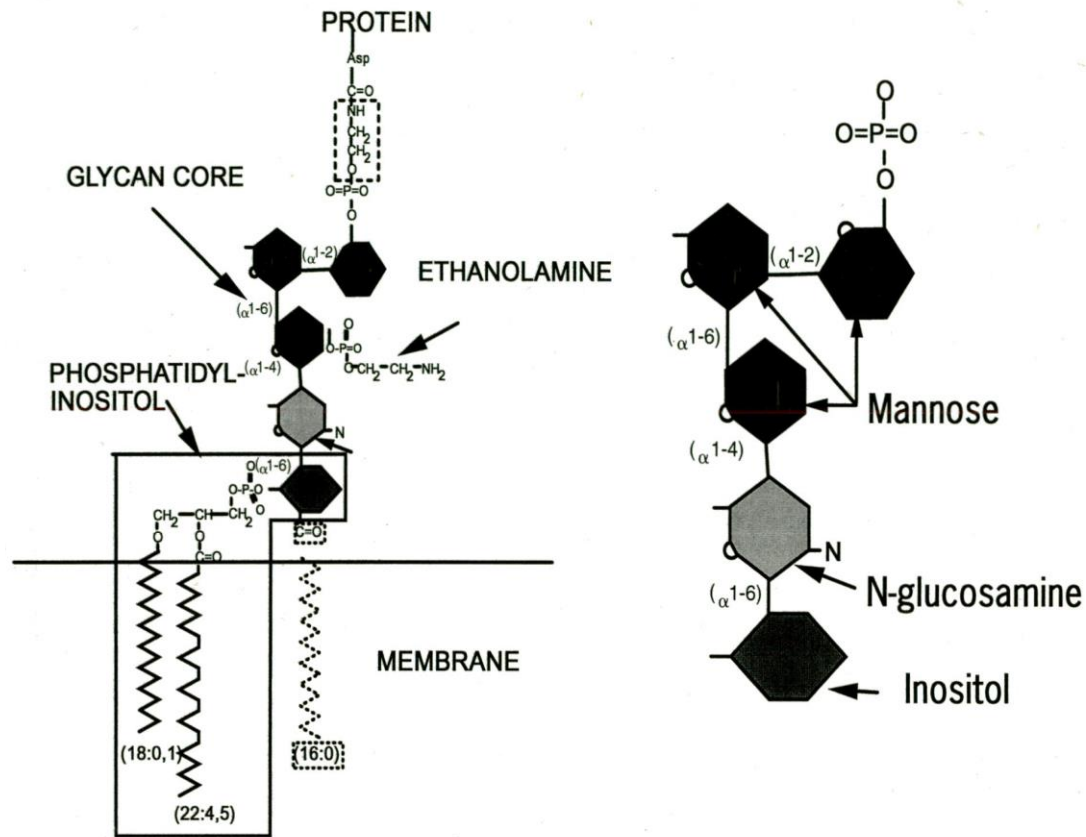
Πρόκειται για το προϊόν του γονιδίου PIG-A (*phosphatidyl-inositol glycan class-A*). Είναι μία ιδιαίτερη γλυκολιπιδική δομή, παρόμοια στους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και στα θηλαστικά. Αποτελείται από τρία βασικά τμήματα:

- α) ένα μόριο φωσφατιδύλ-ινοσιτόλης (PI) που μπορεί να συνδέεται με ένα μόριο λιπαρού οξέος, μέσω του οποίου και επιτυγχάνεται η μεμβρανική πρόσδεση της GPI,
- β) ένα πυρήνα γλυκάνης αποτελούμενο από ένα μόριο N-γλυκοζαμίνης (GlcN) και από τρία κατάλοιπα μαννόζης (Man), και
- γ) ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (PEtN) που προστίθεται στην τελική μαννόζη (Εικόνα 2).

Στην κυτταρική επιφάνεια, το άκρο της PI εισάγεται στη λιπιδική διπλοστοιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, ενώ η αμινομάδα της PEtN συνδέεται με αμιδικό δεσμό στο καρβοξυλικό άκρο ενός μορίου πρωτεΐνης. Με αυτόν τον τρόπο, η πρωτεΐνη δένεται στην επιφάνεια της μεμβράνης (*Rosse et al. 1997, Boccuni et al. 2000*). Η βιοσύνθεση της GPI είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που συμβαίνει στη κυτταροπλασματική πλευρά του ενδοπλασματικού δικτύου (ER) και ουσιαστικά συνίσταται στη διαδοχική μεταφορά μορίων σακχάρου στην PI.

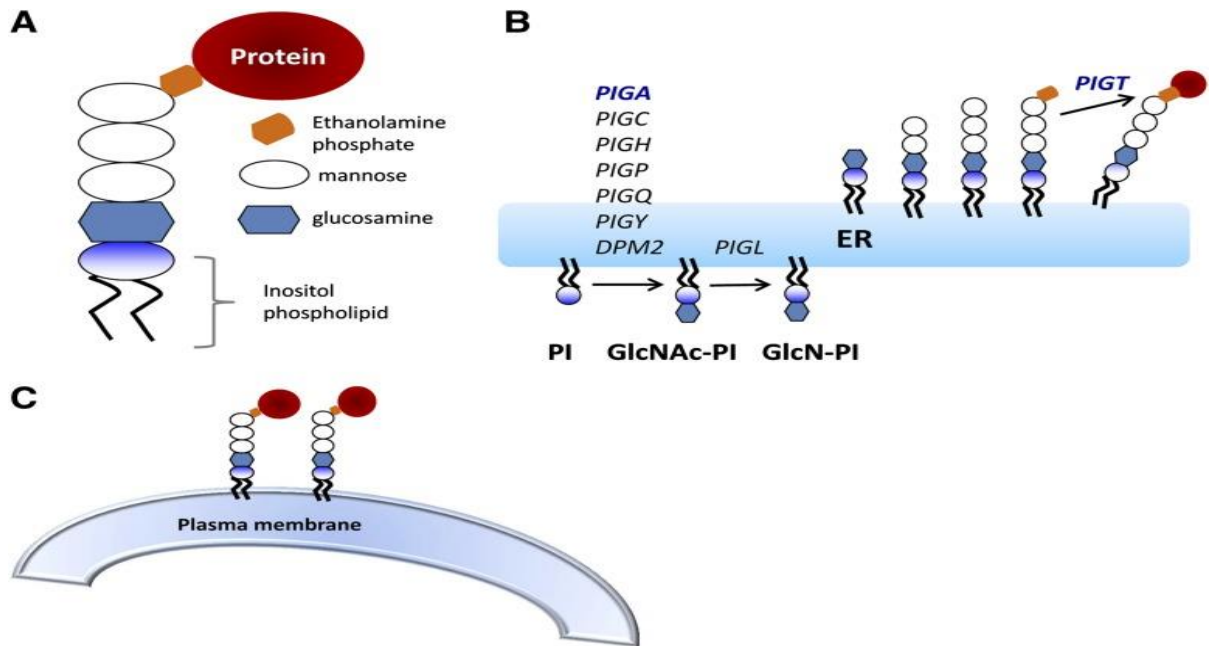
Το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης είναι η μεταφορά της N-ακετυλο-γλυκοζαμίνης στην φωσφατιδύλ-ινοσιτόλη (PI) από την ουριδινο-5'-διφωσφορική-N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc), έτσι ώστε να σχηματιστεί η N-ακετυλ-γλυκοζαμίνη-φωσφατιδύλ-ινοσιτόλη (GlcNAc-PI), η οποία στη συνέχεια αποακετυλιώνεται σχηματίζοντας την ενδιάμεση μορφή GlcN-PI. Μετά από την προσθήκη μορίων μαννόζης δημιουργείται το μόριο της γλυκοζυλ-φωσφατιδύλ-ινοσιτόλης (GPI). Η πεπτιδική αλυσίδα μεταφέρεται μέσα στον αυλό του ER, όπου η αμινομάδα της PEtN συνδέεται με το καρβοξυλικό άκρο ενός μορίου πρωτεΐνης.

Το σύμπλεγμα της GPI-πρωτεΐνης, που έχει ήδη δημιουργηθεί, μεταφέρεται μέσω της συσκευής *Golgi* στην εξωτερική κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 3). Οποιαδήποτε βλάβη σε κάποιο από αυτά τα στάδια της βιοσύνθεσης της GPI, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή έκφραση των GPI-εξαρτώμενων πρωτεϊνών και στην εμφάνιση νόσου (*Rosse 1997; Boccuni et al. 2000; Brodsky 2014*).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση της δομής της GPI (Δεξιά: λεπτομέρειες του πυρήνα γλυκάνης) (Rosse 1997).

Η GPI άγκυρα αποτελεί μία μοναδική περίπτωση γλυκολιπιδίου, το οποίο αποκτά ιδιαίτερες χαρακτηριστικές ιδιότητες, έπειτα από πρόσδεση σε μόρια πρωτεϊνών. Μία πρώτη ιδιότητα σχετίζεται με την μεταφορά και παρουσίαση της πρωτεΐνης στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης. Μία δεύτερη ιδιότητα σχετίζεται με την ευέλικτη διάταξη των υδατανθράκων στο μόριο της GPI, η οποία και επιτρέπει στην πρωτεΐνη να διαμορφώσει ένα τρισδιάστατο και περιστρεφόμενο σύστημα πρόσδεσης (τριτοταγής δομή). Το συγκεκριμένο σύστημα επιτρέπει μόνο σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες να επιλεγούν ως υποδοχείς μεταγωγής σημάτων και μόρια αναγνώρισης του ξενιστή. Μία τρίτη ιδιότητα επιτρέπει σε αγκυρωμένες στην GPI πρωτεΐνες (*GPI-anchored proteins*) τη δυνατότητα να μπορούν να ελευθερωθούν από την κυτταρική μεμβράνη με την βοήθεια των φωσφολιπασών.



Εικόνα 3. Βιοσύνθεση της GPI άγκυρας (Brodsky 2014).

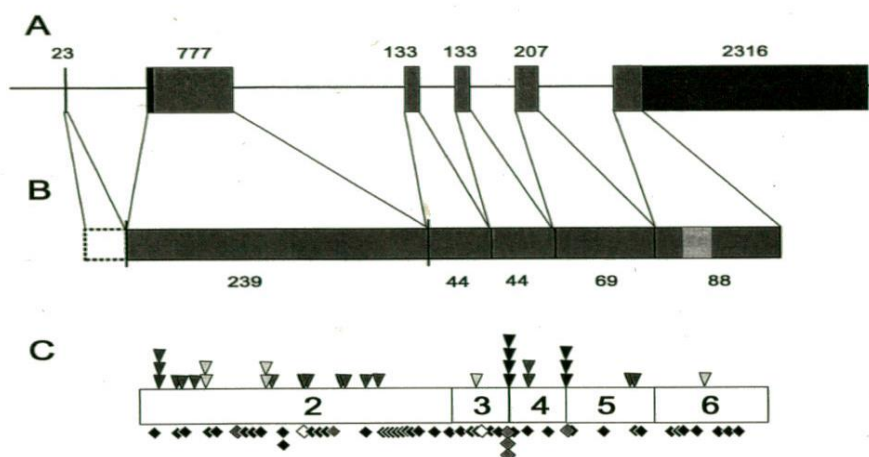
Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία διαλυτών πρωτεϊνών που μπορούν να λειτουργήσουν στο εξωκυττάριο τοίχωμα. Οι GPI-Aps μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικούς δεσμούς στο κυτταρικό τοίχωμα, συμμετέχοντας στη διατήρηση της ακεραιότητας και της αναδόμησης του, όποτε κριθεί απαραίτητο από το κύτταρο. Ταυτόχρονα, επιτρέπουν την επικοινωνία του κυττάρου με το εξωτερικό περιβάλλον (Brodsky 2014).

### 1.3.2 Γονίδιο PIG-A

Η PNH προκαλείται από εκδήλωση μη κακοήθων σωματικών μεταλλάξεων, οι οποίες επισυμβαίνουν στο γονίδιο PIG-A (phosphatidyl-inositolglycan class-A) γονιδίου, το προϊόν του οποίου είναι απαραίτητο για το αρχικό βήμα βιοσύνθεσης της GPI άγκυρας. Το παθολογικό γονίδιο δεν συναντάται στα γενετικά κύτταρα, γεγονός δηλωτικό της επίκτητης φύσης της νόσου.

Το γονίδιο PIG-A εδρεύει στο βραχύ σκέλος του X χρωμοσώματος (Xp22.1) και αποτελείται από 6 εξώνια. Το πρώτο εξ αυτών είναι πολύ μικρό και δεν μεταφράζεται. Το δεύτερο εξώνιο (που ακολουθείται από τρία μικρότερα), περιέχει περίπου τη μισή από την κωδικοποιούσα περιοχή και είναι εκείνο στο οποίο συμβαίνουν οι περισσότερες μεταλλάξεις. Το τελευταίο εξώνιο (που φέρει και μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία) κωδικοποιεί την υπόλοιπη πρωτεΐνη (Εικόνα 4) (Rosse 1997). Έχει βρεθεί και ένα ψευδογονίδιο χωρίς εσώνια στο χρωμόσωμα 12q21.2.

Το γονίδιο PIG-A κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 484 αμινοξέων (60kDa). Έχουν περιγραφεί περισσότερες από 175 σωματικές μεταλλάξεις για το γονίδιο PIG-A (Young & Maciejewski 2000). Οι περισσότερες είναι μικρές ελλείψεις ή προσθήκες ή ελλείψεις-προσθήκες (συνήθως 1 ή 2 bp), οι οποίες προκαλούν τροποποίηση του πλαισίου ανάγνωσης (frame shift) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μη λειτουργικής πρωτεΐνης. Περίπου το 1/3 των μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A είναι σημειακές.



**Εικόνα 4.** **A)** Δομή του γονιδίου PIG-A (φαίνεται ο αριθμός των base pairs σε κάθε εξώνιο). **B)** Η ανοιχτόχρωμη περιοχή στο εξώνιο 6 αναπαριστά την υδρόφοβη περιοχή που θεωρείται ότι βρίσκεται μεταξύ της μεμβράνης και του ενδοπλασματικού δικτύου. **C)** Μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A που συνδέονται με εμφάνιση PNH; οι σημειακές μεταλλάξεις παριστάνονται με βέλη (σκούρο γκρι: missense υποκαταστάσεις, ανοιχτό γκρι: άμεσος τερματισμός, μαύρο: αλλαγή στο μάτισμα), οι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου παριστάνονται με ρόμβους (μαύρο: αλλαγή σε κωδικόνιο τερματισμού, γκρι: αλλαγή στο μάτισμα, άσπρο: άμεσος τερματισμός) (Rosse 1997).

Άλλοι τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου PIG-A είναι μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνιο τερματισμού (nonsense), σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεϊνική αλληλουχία (missence) ή μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη σταθερότητα και το μέγεθος του mRNA (splite site) (Luzzato et al. 2000; Μελέτης και συν. 2009).

### 1.3.3 Μοριακή βλάβη στην PNH

Η πραγματική αιτιολογία των επίκτητων μεταλλαγών του PIG-A δεν είναι διευκρινισμένη. Τις περισσότερες φορές οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις ακυρώνουν πλήρως την παραγωγή του μορίου της GPI άγκυρας, με αποτέλεσμα την παραγωγή κυττάρων με πλήρη έλλειψη GPI πρωτεϊνών (PNH type-III). Υπάρχουν ορισμένες περιπτώσεις, στις οποίες παράγονται μικρές ποσότητες της GPI άγκυρας (ελλείψεις στον υποκινητή του γονιδίου), με αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση των GPI

πρωτεϊνών (PNH type-II). Επειδή οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε όλα τα κυκλοφορούντα αιμοποιητικά κύτταρα, θεωρούνται ότι επισυμβαίνουν στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο και ως εκ τούτου τα παθολογικά κύτταρα ανήκουν όλα στον ίδιο κλώνο (*Takeda et al. 1993; Rachidi et al. 2010; Brodsky 2014*).

Η πλειοψηφία των διαθέσιμων γονιδίων που εμπλέκονται στο περίπλοκο μονοπάτι βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας έχουν κλωνοποιηθεί (*Kamitani et al. 1993; Takahashi et al. 1993; Nakamura et al. 1997; Inoue et al. 1996*). Το πρώτο βήμα βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας, που περιλαμβάνει την μεταφορά της N-acetylglucosamine στην phosphatidyl-inositol, απαιτεί την δράση ενός συμπλόκου τεσσάρων διαφορετικών πρωτεϊνών. Τα εμπλεκόμενα μέλη περιλαμβάνουν τις PIG-A, PIG-C, PIG-H (που λαμβάνουν την ονομασία τους από τις αντίστοιχες τάξεις του συμπληρώματος με τις ονομασίες A, C και H, αντίστοιχα) και την GPI<sub>1</sub> και κωδικοποιούνται από τα αντίστοιχα γονίδια. Εκδήλωση μετάλλαξης σε ένα εκ των τριών πρωτοαναφερθέντων γονιδίων οδηγεί σε πλήρη αναστολή της διαδικασίας σύνθεσης της άγκυρας. Ο ακριβής ρόλος της GPI<sub>1</sub> παραμένει αδιευκρίνιστος, καθώς δεν έχει βρεθεί κάποια συγκεκριμένη κυτταρική σειρά με πλήρη έλλειψη. Πιθανά σταθεροποιεί το συνθετικό σύμπλοκο GlcNAc-PI αλλά δεν συμμετέχει στη διαδικασία μεταφοράς της GlcNAc (*Watanabe et al. 1998*). Αδιευκρίνιστο επίσης παραμένει το γιατί απαιτούνται τέσσερις διαφορετικές πρωτεΐνες για την προσθήκη ενός μεμονωμένου μορίου σακχάρου. Η PIG-A φέρει μία μεμονωμένη τρανσμεμβρανική περιοχή και μία μεγάλη σε μέγεθος αμινοτελική περιοχή, στραμμένη προς το κυτταρόπλασμα, η οποία επιδεικνύει ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με την βακτηριακή GlcNAc τρανσφεράση (*Vidugiriene et al. 1993; Kawagoe et al. 1994; Vossen et al. 1995*). Η PIG-H στερείται υδρόφοβης περιοχής, η οποία μπορεί να δράσει διαμεμβρανικά και δεν έχει κάποια καταγεγραμμένη λειτουργική ικανότητα (*Watanabe et al. 1996*). Η PIG-C φέρει έξι ή επτά διαφορετικές τρανσμεμβρανικές περιοχές και διαδραματίζει ρόλο στην αναγνώριση των πλευρικών αλυσίδων των ακυλίων των λιπαρών οξέων στο μόριο της PI (*Leidich et al. 1995; Watanabe et al. 1998*). Αρχικά όλες οι πρωτεΐνες, που εμπλέκονται στην διαδικασία βιοσύνθεσης της GPI άγκυρας, φέρουν στο καρβοξυλικό τους άκρο ειδική αλληλουχία σηματοδότησης. Η εν λόγω αλληλουχία αποτελείται από 20-30 αμινοξέα και απομακρύνεται πριν την προσθήκη της νεοσυντιθέμενης GPI άγκυρας στο μόριο της πρωτεΐνης (*Nuoffer et al. 1991; Kinoshita et al. 1995*). Η διαδικασία της μεταφοράς της πεπτιδικής αλυσίδας λαμβάνει χώρα στον αυλό του ενδοπλασματικού

δικτύου, όπου ένα μόριο τρανσαμιδάσης συνδέει την GPI άγκυρα στη νέα καρβοξυτελική άκρη του πεπτιδίου (Gerber *et al.* 1992). Ακολούθως, τα συμπλέγματα GPI-APs μέσω του συστήματος Golgi μεταφέρονται στην εξωκυττάρια πλευρά της μεμβράνης (Brown & Rose 1992).

Καθώς μόνο το ένα X χρωμόσωμα είναι ενεργό στα αιμοποιητικά κύτταρα (λόγω απενεργοποίησης του ετέρου X χρωμοσώματος) απαιτείται μία μονή μετάλλαξη προκειμένου να απενεργοποιηθεί η δράση της κωδικοποιούμενης πρωτεΐνης. Αξίζει να αναφερθεί πως έχουν δημοσιευθεί βιβλιογραφικά μεμονωμένες περιπτώσεις PNH ασθενών, στις οποίες η υποκείμενη μοριακή ανωμαλία εντοπίζεται σε διαφορετική θέση από την αντίστοιχη εντός του PIG-A γονιδίου. Μία τέτοια περίπτωση αναφέρει πως ανωμαλία στην επιφάνεια του CD59 μορίου οδήγησε στην εκδήλωση αιμολυτικής PNH, συμπεριλαμβανομένης και της θρομβωτικής προδιάθεσης, ενός κλινικού περιστατικού στην Ιαπωνία (Yamashina *et al.* 1990). Έτερη περίπτωση ασθενούς αναφέρει πως η υποκείμενη μοριακή ανωμαλία οφείλεται σε επίκτητη μετάλλαξη εντός του PIG-T γονιδίου, το οποίο και εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της GPI άγκυρας (Krawitz *et al.* 2013).

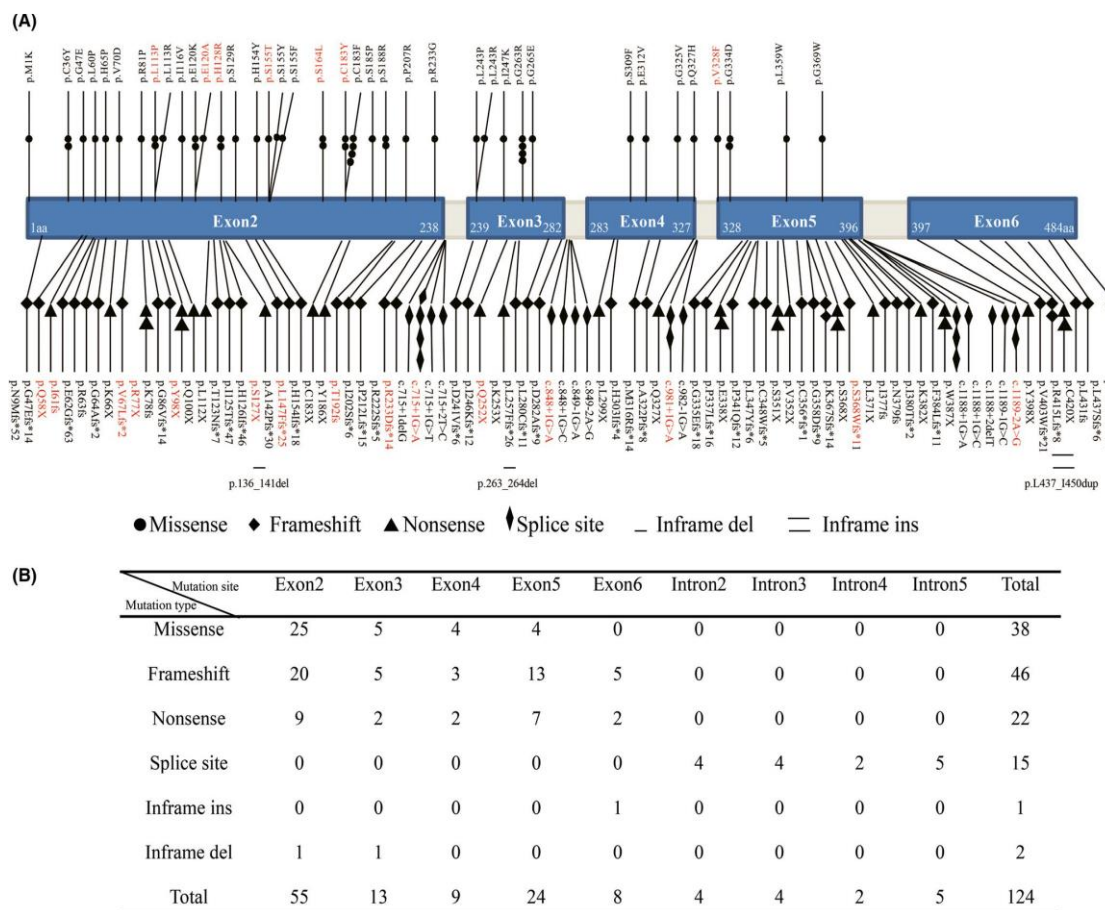
Ο Rosse (1997) αναφέρει διάφορα μοτίβα που ενδέχεται να οδηγήσουν σε ανάπτυξη ενός PNH κλώνου και κατ' επέκτασιν σε εκδήλωση νόσου:

- 1) Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ενέχεται η προσθήκη ή η έλλειψη 1 ή 2 (ή πολύ μικρού αριθμού νουκλεοτιδίων, σε κάθε περίπτωση μη πολλαπλάσιου του 3), η οποία οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και καταλήγει σε πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού. Το mRNA που παράγεται από ένα τέτοιο γονίδιο δεν μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή πρωτεΐνης και ως εκ τούτου παρατηρείται παντελής έλλειψη των GPI εξαρτώμενων πρωτεϊνών.
- 2) Οι μεταλλάξεις υποκατάστασης (όταν μία βάση αντικαθίσταται από κάποια άλλη οδηγώντας σε αλλαγή του κωδικοποιούμενου αμινοξέος) εμφανίζονται συνήθως στο εξώνιο 2 (το οποίο κωδικοποιεί ένα μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης), σε δύο περιοχές που έχουν διατηρηθεί μέσω της εξέλιξης (είναι ομόλογες και στις ζύμες και στα πρωτόζωα). Αυτού του είδους οι μεταλλαγές οδηγούν στην βιοσύνθεση λιγότερο λειτουργικών πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα μία ενδιάμεση έκφραση των GPI-αγκυρωμένων πρωτεϊνών. Μεταλλάξεις υποκατάστασης πιθανά υπάρχουν και σε άλλες περιοχές του γονιδίου, ωστόσο δεν έχει ξεκαθαριστεί η κλινική τους σημασία και μάλλον δεν οδηγούν σε παραγωγή 'ελαττωματικού προϊόντος'.

- 3) Εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, οι μεταλλάξεις είναι μοναδικές για κάθε ασθενή, μόνο 7 από τις μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί έχουν βρεθεί σε περισσότερα από ένα άτομα. Αυτό υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ένα συγκεκριμένο σημείο μετάλλαξης μέσα στο γονίδιο.
- 4) Διαφορετικού τύπου κλώνοι έχουν βρεθεί σε αρκετούς ασθενείς. Συνήθως συνυπάρχουν ένας κλώνος που δεν παράγει καθόλου προϊόν και ένας που παράγει ελαττωματικό προϊόν, που οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή της GPI-άγκυρας, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται 2 πληθυσμοί κυττάρων, οι οποίοι διαφέρουν ως προς την έκφραση των GPI-συνδεδεμένων πρωτεϊνών (ιδιαίτερα του CD59) και την ευαισθησία τους στο συμπλήρωμα.
- 5) Ιδιαίτερα σημαντικές μεταλλάξεις στον υποκινητή του γονιδίου δεν έχουν βρεθεί, έχει ωστόσο περιγραφεί μία έλλειψη σε αυτήν την περιοχή, που πιθανολογείται ότι οδηγεί σε μειωμένη έκφραση.
- 6) Έχει βρεθεί και ένας πολυμορφισμός, που συνίσταται σε υποκατάσταση μιας C από T στη θέση 55, που στο πρωτεϊνικό μόριο οδηγεί σε αντικατάσταση μίας αργινίνης από τρυπτοφάνη στο κατάλοιπο 19.
- 7) Σε μία μόνο περίπτωση βρέθηκε ότι δύο μεταλλάξεις εμφανίστηκαν στο ίδιο αλληλόμορφο.
- 8) Το είδος των ανωμαλιών, που εμφανίζονται στην PNH η οποία προκύπτει από απλαστική αναιμία, είναι παρόμοιο με εκείνες στις οποίες δεν έχει ήδη γίνει η διάγνωση της απλαστικής αναιμίας.
- 9) Δεν έχει βρεθεί κάποιος ιδιαίτερος τύπος ανωμαλιών σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή του κόσμου. Κάποιες περισσότερες διαγραφές/προσθήκες βάσης έχουν ανευρεθεί στον πληθυσμό της Ταϊλάνδης σε σχέση με τον πληθυσμό της Ιαπωνίας, αλλά αυτό δεν θεωρείται αξιολογήσιμο, παρότι είναι στατιστικά σημαντικό.

Οι *Jing et al. (2020)* χρησιμοποιώντας την τεχνική NGS (*next generation sequencing*), προσπάθησαν να εντοπίσουν νέες σωματικές μεταλλάξεις σε όλες τις περιοχές κωδικοποίησης του γονιδίου PIG-A σε 78 κινέζους ασθενείς με PNH. Υπήρχαν κάποιες περιπτώσεις (μη ταυτοποιημένες) που θεωρήθηκε ότι μπορεί να φέρουν μεγάλα θραύσματα τα οποία δεν είναι ανιχνεύσιμα με την τεχνική NGS. Ανιχνεύθηκαν 124 μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A, εκ των οποίων οι 22 είχαν ήδη αναφερθεί, ενώ οι υπόλοιπες 102 αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά. Οι μορφές μετάλλαξης και οι περιοχές του γονιδίου PIG-A στις οποίες εμφανίζονται ποικίλλουν.

Η συχνότητα αυτών των νέων μεταλλάξεων ήταν χαμηλή ενώ οι περισσότερες από αυτές ανιχνεύθηκαν μόνο μία φορά. Η πλειονότητα (44%) των μεταλλάξεων του γονιδίου PIG-A ανιχνεύθηκε στο εξόνιο 2.

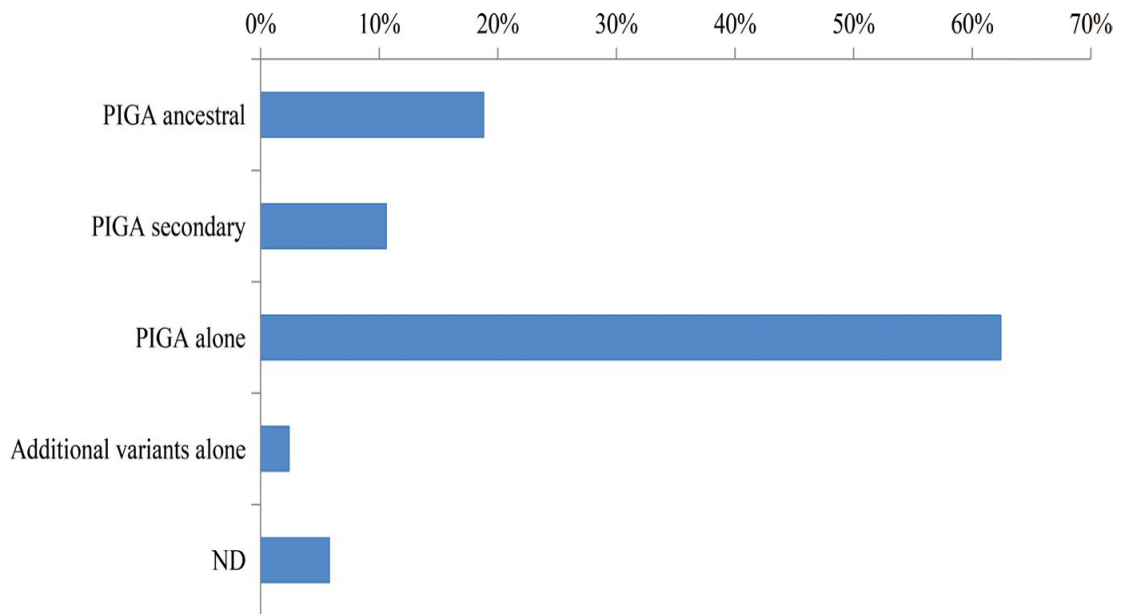


**Εικόνα 5.** Μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A στην PNH. **A)** Ο αριθμός των συμβόλων αντιπροσωπεύει τον αριθμό των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν, τα διαφορετικά σύμβολα υποδεικνύουν τους διαφορετικούς τύπους μετάλλαξης. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει τις μεταλλάξεις που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες βιβλιογραφίες (Η αρίθμηση των νουκλεοτιδίων έγινε σύμφωνα με την Gen bank Accession No. NM\_002641). **B)** Συνοπτική κατανομή και τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου PIGA (Jing 2020).

Φαίνεται ότι οι μικρές διαγραφές ή εισδοχές (*deletions or insertions*) είναι οι πιο συχνές, με αποτέλεσμα την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στην κωδικοποιούσα περιοχή (όπως έχει φανεί και σε άλλες μελέτες), ενώ ανιχνεύθηκαν και *nonsense* και *splice site* μεταλλάξεις που ανενεργοποιούν την λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης (Εικόνα 5).

Στην εικόνα 6 φαίνεται συνοπτικά η κατανομή των μεταλλάξεων στην PNH και η συχνότητά τους, βάσει των δεδομένων από την μελέτη των Jing *et al.* (2020).





**Εικόνα 6.** Συνοπτικά η κατανομή και η συχνότητα των μεταλλάξεων στην PNH (5 μοτίβα μεταλλάξεων που βασίζονται στα δεδομένα του NGS, ND: notdetected) (Jing 2020).

Η παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A αποτελεί αναγκαία συνθήκη αλλά όχι ικανή από μόνη της να προκαλέσει νόσο. Για την πρόκληση PNH απαιτούνται:

α) μετάλλαξη του γονιδίου PIG-A στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, και

β) το τελικό ‘έναυσμα’ (δηλαδή μια αυτοάνοση ανοσολογικού τύπου διαδικασία) που θα δώσει το πλεονέκτημα επιβίωσης και επικράτησης στον παθολογικό PNH κλώνο είτε λόγω τυχαίας επιλογής (παραγωγή πολλών GPI-αρνητικών κυττάρων από ένα μεταλλαγμένο αρχέγονο πολυδύναμο αιμοποιητικό κύτταρο) είτε λόγω συμμετοχής επιπρόσθετων μεταλλάξεων σε μια ήδη υπάρχουσα κατάσταση παρουσίας μεταλλαγμένων PNH κυττάρων είτε εξαιτίας του μικροπεριβάλλοντος του μυελού των οστών, το οποίο δίνει στον παθολογικό κλώνο το πλεονέκτημα της επέκτασης μέσω ανοσολογικών διεργασιών (Luzzato 2016).

Ασθενείς με επιπρόσθετο συμβάν μετάλλαξης (εκτός των PIG-A μεταλλάξεων) φαίνεται ότι φέρουν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό κλωνικών κυττάρων με έλλειψη GPI, σε σύγκριση με εκείνους στους οποίους δεν έχουν βρεθεί τέτοιες πρόσθετες μεταλλάξεις.

### 1.3.4 Μοντέλα κλωνικής επέκτασης

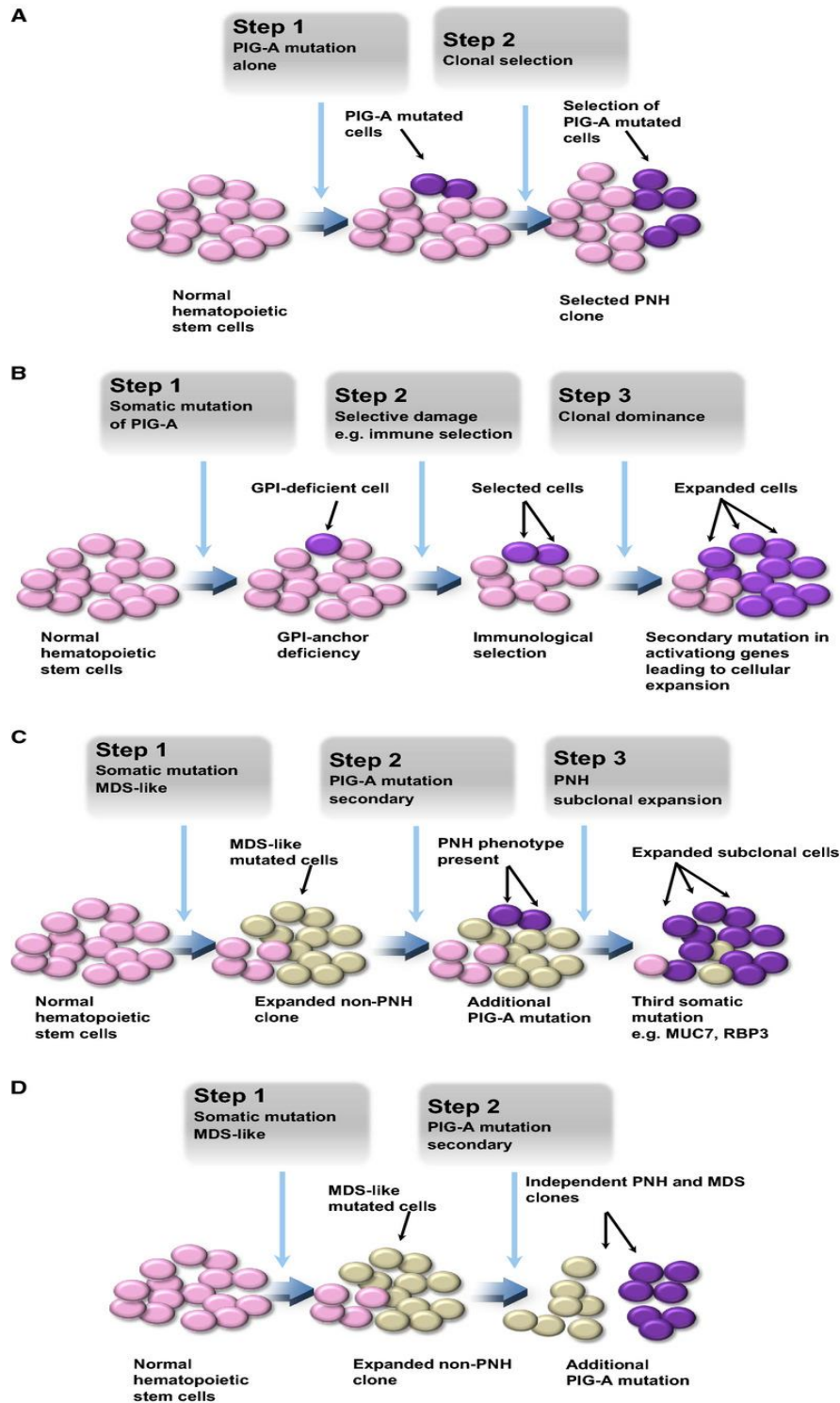
Δεν έχει ξεκαθαριστεί ποιος ακριβώς είναι εκείνος ο παράγοντας που διέπει την κλωνική επέκταση, ειδικά στο πλαίσιο των συνδρόμων αιμοποιητικής ανεπάρκειας. Πιθανολογείται ότι τα κύτταρα με ανεπάρκεια GPI επιλέγονται λόγω ενός μηχανισμού διαφυγής έναντι αυτοαντιδραστικών T-κυττάρων. Επιπρόσθετα συμβάντα μετάλλαξης συμβάλλουν στο πλεονέκτημα ανάπτυξης με αποτέλεσμα την επικράτηση και την περαιτέρω επέκταση των GPI μεταλλαγμένων κυττάρων.

Έχουν προταθεί τέσσερα διαφορετικά μοντέλα που περιγράφουν την αλληλουχία των γεγονότων αναφορικά με την κλωνική εξέλιξη στη περίπτωση της PNH (Εικόνα 7). Υπάρχει μία μειοψηφία κλινικών περιστατικών με PNH, στις οποίες εντοπίζεται αποκλειστικά η PIG-A μετάλλαξη. Για αυτές τις περιπτώσεις, το ποσοστό των κλωνικών PNH κυττάρων καταγράφεται σημαντικά μειωμένο συγκριτικά με εκείνο των περιπτώσεων ασθενών με αναγνωρισμένη επιπρόσθετη μετάλλαξη. Οι εν λόγω περιπτώσεις αντιπροσωπεύονται πληρέστερα από το μοντέλο εξωτερικών παραγόντων επιλογής, συμπεριλαμβανομένης της ανοσολογικής προσβολής (Εικόνα 7A).

Η ανάλυση αλληλουχιών κατά *Sanger* σε εντοπισμένες αποικίες κυττάρων οδήγησε στην καταγραφή επιπρόσθετων γενετικών συμβάντων, τα οποία λαμβάνουν χώρα σε υποκλώνους του ήδη μεταλλαγμένου PIG-A κλώνου. Το αποτέλεσμα είναι η κλωνική επικράτηση του PNH παθολογικού κλώνου, με τον συγκεκριμένο κλώνο να εκδηλώνει και σχετικό πλεονέκτημα ανάπτυξης (Εικόνα 7B).

Στο τρίτο προτεινόμενο μοντέλο, το οποίο και αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο ποσοστό των περιστατικών, μία επιπρόσθετη (εκτός της PIG-A) μετάλλαξη λαμβάνει χώρα, δημιουργώντας προϋποθέσεις περιβάλλοντος προσομοιαστικές για μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (*MDS-like*). Στις περιπτώσεις αυτές, η μετάλλαξη PIG-A είναι δευτερεύουσα, ενώ έχει επίσης καταγραφεί (σπανιότερα) και εμπλοκή τρίτης μετάλλαξης εντός των κλωνικών κυττάρων, η οποία οδηγεί στη δημιουργία ενός επικρατούς υποκλώνου (Εικόνα 7C).

Το τέταρτο και τελευταίο προτεινόμενο μοντέλο προτείνει την συνύπαρξη του MDS προσομοιάζοντος κλώνου και του PIG-A μεταλλαγμένου κλώνου, οι οποίοι προκύπτουν ανεξάρτητα (Εικόνα 7D) (*Schubert & Roth 2015*).



**Εικόνα 7.** Προτεινόμενα μοντέλα κλωνικής εξέλιξης στην PNH. (A) Το PIG-A γονίδιο αποτελεί το μοναδικό γονίδιο που μεταλλάσσεται σε κλωνικό επίπεδο, έχοντας το σχετικό πλεονέκτημα ανάπτυξης. (B) Επιπρόσθετες μεταλλάξεις, πέραν αυτών του γονιδίου PIG-A, επισυμβαίνουν σε υποκλωνικό επίπεδο, οδηγώντας σε αναπτυξιακό πλεονέκτημα και περαιτέρω επέκταση του GPI-ανεπαρκούς κλώνου. (C) Ανάπτυξη PIG-A μεταλλαγμένου κλώνου εντός κλώνου που ήδη μεταφέρει και την MDS-like μετάλλαξη. (D) Συνύπαρξη MDS-like και PIG-A κλώνου, οι οποίοι αναπτύσσονται ανεξάρτητα (Schubert & Roth 2015).

### 1.3.5 Ανθεκτικότητα στην απόπτωση

Αρκετές μελέτες έχουν αναδείξει πως τα GPI(-) μυελικά κύτταρα στους PNH ασθενείς είναι μάλλον ανθεκτικά στην απόπτωση (*Brodsky et al. 1997; Horikawa et al. 1997; Ware et al. 1998*). Σε δύο από αυτές τις μελέτες καταδείχθηκε ότι ο βαθμός της ανθεκτικότητας δεν ήταν ανάλογος του μεγέθους του κλώνου, ως εκ τούτου πιθανολογείται ότι η ανθεκτικότητα στην απόπτωση είναι ανεξάρτητη από τη μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A και πως το πλεονέκτημα επιβίωσης των GPI(-) κυττάρων στην PNH προκύπτει μάλλον από μειωμένη επιβίωση των φυσιολογικών αρχέγονων κυττάρων σε ένα 'εχθρικό' μυελικό μικροπεριβάλλον. Για να διερευνηθεί η εμπλοκή του γονιδίου PIG-A στην απόπτωση, μελετήθηκε η απόπτωση πριν και μετά την εισαγωγή του γονιδίου PIG-A στην GPI αρνητική JY5 κυτταρική σειρά. Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην απόπτωση μεταξύ των δύο φάσεων, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο PIG-A δεν ενέχεται στους μηχανισμούς απόπτωσης στην PNH, οι οποίοι επηρεάζονται από άλλους παράγοντες όπως τα επίπεδα των κυτταροκινών και λοιπών διαλυτών παραγόντων ή έκφραση μορίων της ομάδας bcl-2 ή λοιπές αλλαγές στην γονιδιακή ή πρωτεϊνική έκφραση (*Ware et al. 1998; Μελέτης και συν. 2009*). Ωστόσο, δεν αποκλείεται τα GPI(-) προγονικά κύτταρα να έχουν μία 'εσωτερική δυνατότητα' επιβίωσης και ανθεκτικότητας στην απόπτωση, η οποία αναδύεται σε καταστάσεις ανοσολογικής διέγερσης. Η ανθεκτικότητα στην απόπτωση λειτουργεί μάλλον συνεργικά, ως παράγοντας επιλογής και κλωνικής επικράτησης στα πρώιμα στάδια της μυελικής βλάβης (*Horikawa et al. 1997; Ware et al. 1998; Chen et al. 2002; Ismail et al. 2003*).

### 1.3.6 PIG-A μεταλλάξεις σε φυσιολογικά άτομα

Μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A ανιχνεύονται και σε κύτταρα του περιφερικού αίματος φυσιολογικών ατόμων. Έχει αναφερθεί η περίπτωση υγιούς ατόμου, στον οποίο ταυτοποιήθηκαν 15 διαφορετικές μεταλλάξεις του PIG-A στα CFCs (*Colony-Forming Cell(s)*)/προγονικά κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες) (*Araten et al. 1999; Ware et al. 2001; Hu et al. 2005; Brodsky 2008B*). Οι *Hu et al* αφού μελέτησαν την παρουσία PIG-A μεταλλάξεων σε CD34(+) προγονικά κύτταρα σε φυσιολογικά άτομα και ασθενείς με PNH, κατέληξαν στο συμπέρασμα πως, σε αντίθεση με την PNH, τα φυσιολογικά άτομα παρουσιάζουν πολυκλωνικές PIG-A μεταλλάξεις στα CFCs. Οι μεταλλάξεις αυτές εμφανίζονται σε διαφοροποιημένα προγονικά κύτταρα και όχι στα mHSCs, ενώ το πιο πρώιμο κύτταρο που πιθανά εμπλέκεται θεωρείται ότι

είναι το CFU-GEMM (*Colony Forming Units-Granulocyte, Erythrocyte, Monocyte, Megakaryocyte*) (Hu et al. 2005). Σε αντίθεση με τα mHSCs, τα CFCs έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται, αλλά όχι να αυτο-ανανεώνονται και ως εκ τούτου η προκληθείσα βλάβη δεν μπορεί να εδραιωθεί. Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι μεταλλάξεις του PIG-A στα υγιή άτομα συμβαίνουν σε περισσότερο διαφοροποιημένα κύτταρα και πιθανά αποτελούν συνέπεια της διαδικασίας της φυσιολογικής διαφοροποίησης, δεν οδηγούν ωστόσο σε κλινική εκδήλωση της νόσου (Burman et al. 1999). Αυτά τα ευρήματα έχουν σημαντική εφαρμογή στην ανίχνευση μικρών PNH κλώνων στο περιφερικό αίμα με κυτταρομετρία ροής. Στα φυσιολογικά άτομα εμφανίζεται ένα μικρό ποσοστό (0,002%) μη κλωνικών PNH κυττάρων, τα οποία δεν θεωρούνται κλινικά σημαντικά (Ware et al. 2001; Brodsky 2006).

## 1.4 Το σύστημα του Συμπληρώματος

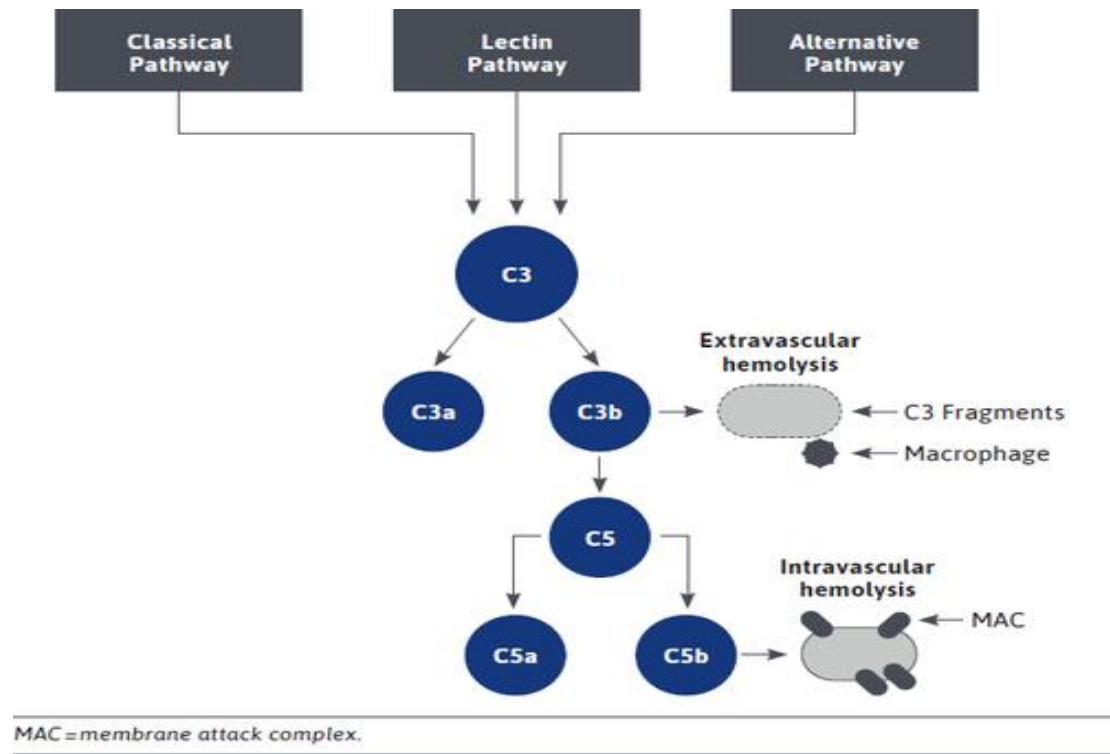
Το σύστημα του συμπληρώματος παίζει σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση της αιμόλυσης που χαρακτηρίζει την PNH. Αποτελεί μέρος της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού και περιλαμβάνει περισσότερες από 30 διακριτές ορολογικές πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν σε ενζυματικές αντιδράσεις ενεργοποίησης υψηλού βαθμού ακρίβειας, για την οψωνινοποίηση<sup>2</sup> των παθογόνων και την επαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης. Πηγές των πρωτεϊνών του συμπληρώματος αποτελούν τα ηπατοκύτταρα, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα και τα ιστικά μακροφάγα.

Υπάρχουν τρία διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια ενεργοποίησης, που επάγονται από διαφορετικά αίτια και περιλαμβάνουν: την κλασσική οδό, την οδό της λεκτίνης και την εναλλακτική οδό. Κοινό σημείο και των τριών αυτών μονοπατιών είναι η παραγωγή συμπλεγμάτων της C3 κονβερτάσης, η δράση της οποίας επάγει τη διάσπαση της C3 σε C3a και C3b (Εικόνα 9) (Bektas et al. 2020). Οι τρεις αυτές οδοί καταλήγουν στην κοινή λυτική οδό, η οποία μέσω του σχηματισμού του *Membrane Attack Complex* (MAC) οδηγεί στη λύση των κυττάρων (Εικόνα 12). Το σύστημα του συμπληρώματος, εκτός από τη συμμετοχή του στην φλεγμονώδη αντίδραση, σχετίζεται και με αναπτυξιακές διαδικασίες, όπως η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων και η αναγέννηση ιστών και οργάνων.

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην ουσία αποτελεί έναν ενζυμικό καταρράκτη, τα συστατικά του οποίου (οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος) χαρακτηρίζονται από μία ονομασία με έναν αύξοντα αριθμό (C1-9). Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται σε αδρανή μορφή και ενεργοποιούνται όταν παραστεί ανάγκη. Κατά την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος, το προϊόν διάσπασης ενός προενζύμου αποτελεί το ένζυμο-καταλύτη της κάθε αντίδρασης. Τα PNH κύτταρα εκφράζουν ευαισθησία στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος και με τα τρία προαναφερθέντα κυτταρικά μονοπάτια. Το γεγονός πως η εναλλακτική οδός διατηρεί μία συνεχή κατάσταση μειωμένου βαθμού ενεργοποίησης, δικαιολογεί τον λόγο που ασθενείς με PNH εκδηλώνουν συνεχή χρόνια αιμόλυση.

---

<sup>2</sup>Οψωνινοποίηση είναι η διαδικασία σήμανσης παθογόνων προς καταστροφή, μέσω της αναγνώρισης και της στόχευσης των σωματιδίων εισβολής και της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης.

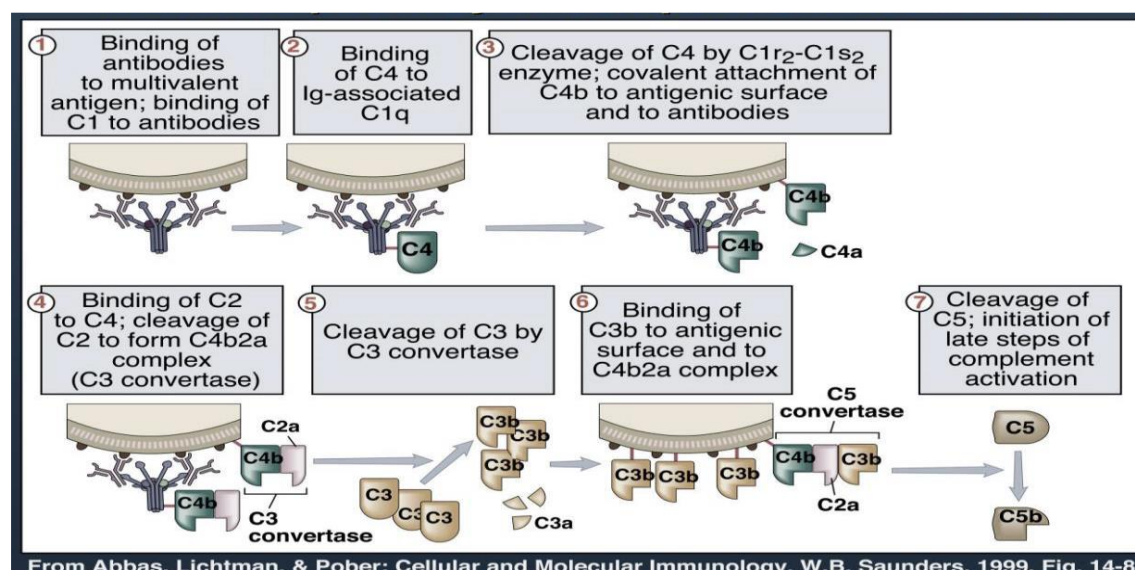


**Εικόνα 8.** Απεικόνιση του δικτύου των χημικών αντιδράσεων της οδού του συμπληρώματος (Bektas 2020).

### 1.4.1 Κλασική οδός

Η σύνδεση ενός αντισώματος σε μια βακτηριακή επιφάνεια και ο σχηματισμός διαλυτών συμπλεγμάτων αντιγόνου-αντισώματος αποτελούν βασικούς επαγωγείς της ενεργοποίησης της κλασικής οδού. Η κλασική οδός μπορεί να ενεργοποιηθεί από αντισώματα τάξης IgM, IgG1, IgG2, IgG3. Δεν ενεργοποιείται από τα IgA, IgE και IgG4. Ενεργοποιείται απευθείας από ιούς, βακτήρια ή και κύτταρα μολυσμένα ήδη από κάποιον ιό. Η CRP (*C-Reactive Protein*), τα λιπосώματα, η θειϊκή δεξτράνη και τα μιτοχόνδρια των καρδιακών μυών αποτελούν επίσης επαγωγείς της ενεργοποίησης αυτής της οδού. Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος που έχουν ρόλο στην κλασική οδό είναι οι: C1 (σύμπλεγμα τριών κλασμάτων C1q, C1r, C1s), C3, C2 και C4. Η δέσμευση του C1 σε κάποιο αντίσωμα προκαλεί στερεοδιατακτικές αλλαγές στο μόριό του και του προσδίδει ενζυμική ικανότητα (η πρόσδεση του C1q ενεργοποιεί το C1r, που με τη σειρά του ενεργοποιεί το C1s). Το ενεργοποιημένο C1s διασπά την C4 σε C4b και C4a. Η γλυκοπρωτεΐνη C2 συνδέεται με το κλάσμα C4b και στη συνέχεια διασπάται από το C1s σε μία μεγαλομοριακή μορφή που έχει ενζυμική δράση (C2a) και σε μια μικρομοριακή την C4b.2a, η οποία αποτελεί την κονβερτάση του C3 για την κλασική οδό και διασπά με τη σειρά της τη C3 σε δύο θραύσματα: το

μικρομοριακό C3a και το μεγαλομοριακό C3b. Τα C4b και C3b δεσμεύονται στην επιφάνεια των κυττάρων. Το C3b δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειας των φαγοκυττάρων και προωθεί την φαγοκυττάρωση, ενώ όταν ενωθεί με το σύμπλοκο C4b.2a δημιουργεί την κονβερτάση του C5. Η κονβερτάση του C5 καταλύει την διάσπαση του C5 στα θραύσματα C5a και C5b. Το μικρότερο θραύσμα C5a, που είναι μια αναφυλατοξίνη προσελκύει τα φαγοκύτταρα στο σημείο της φλεγμονής, ενώ το μεγαλύτερο C5b αφού ενωθεί με το ήδη δεσμευμένο στην επιφάνεια των μικροοργανισμών C3b, οδηγεί (με διαδοχική δέσμευση των C6, C7, C8 και C9) στην έναρξη της συγκρότησης του MAC (Εικόνα 13). Ο σχηματισμός του MAC έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό καναλιών και/ή λυτικών πόρων στην επιφάνεια των κυττάρων και την τελική τους λύση (Fujita 2002).



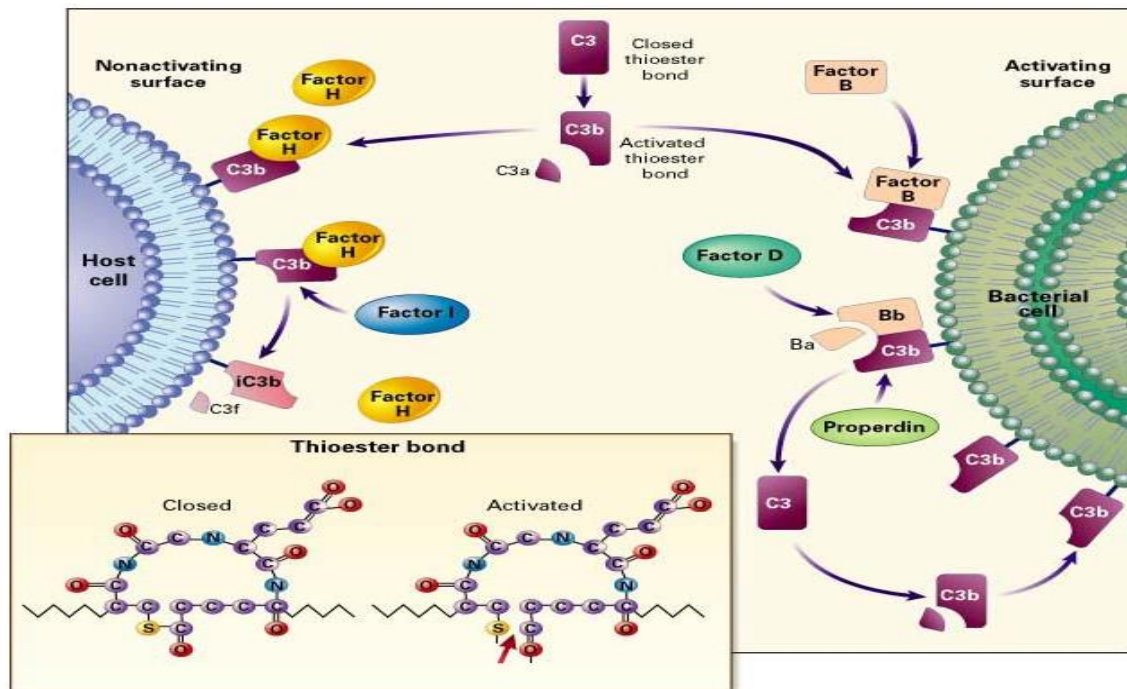
Εικόνα 9. Κλασική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Fujita 2002)

### 1.4.2 Εναλλακτική οδός

Η εναλλακτική οδός ενεργοποιείται από ιούς, βακτήρια, μύκητες, αλλά όχι από αντισώματα. Στην εναλλακτική οδό συμμετέχουν οι πρωτεΐνες: D, C3, B. Το θραύσμα C3b δεσμεύεται όπως προαναφέρθηκε στην μικροβιακή επιφάνεια, ενώ ο παράγοντας B δεσμεύεται με τη σειρά του στο ήδη προσκολλημένο C3b. Η έτερη πρωτεΐνη της οδού αυτής, ο παράγοντας D καταλύει τη διάσπαση του ήδη προσκολλημένου παράγοντα B σε Bb και Ba. Προκύπτει το σύμπλοκο C3bBb, το οποίο αποτελεί την κονβερτάση του C3 για την εναλλακτική οδό, καταλύει τη



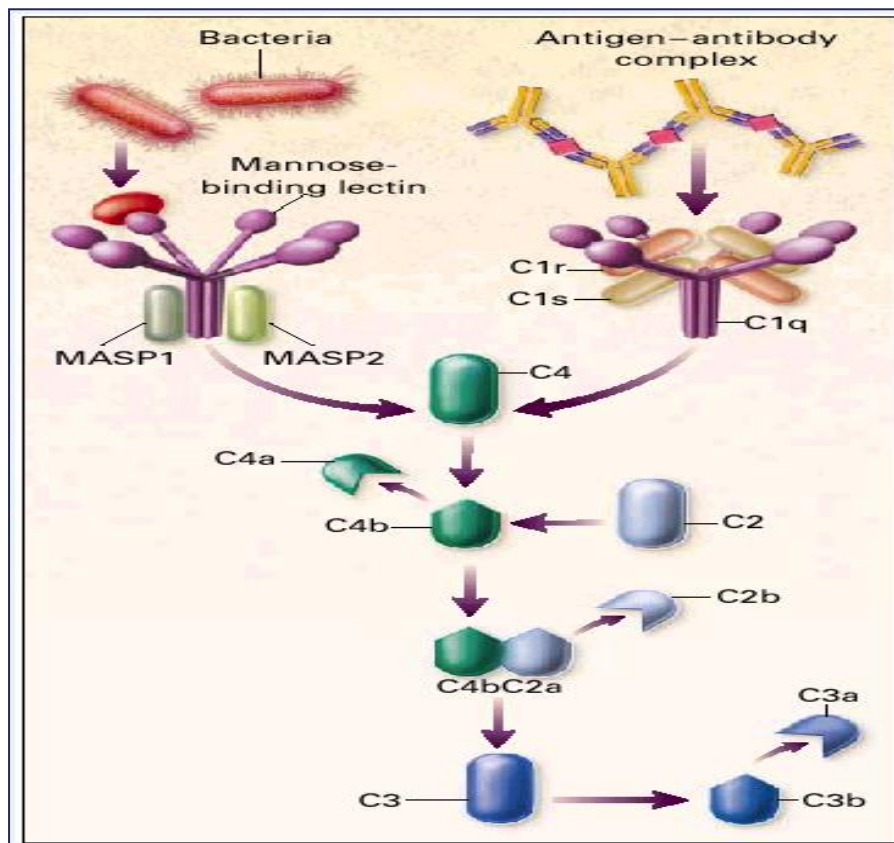
διάσπαση πολλών μορίων C3 και το σχηματισμό της C5 κονβερτάσης (C3bBbC3b) με τη δέσμευση ενός ακόμη C3b. Η διάσπαση του C5 έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του MAC και την κυτταρική λύση (Εικόνα 14) (Walport 2001; Fujita 2002).



Εικόνα 10. Εναλλακτική οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος (Walport 2001).

### 1.4.3 Οδός της λεκτίνης

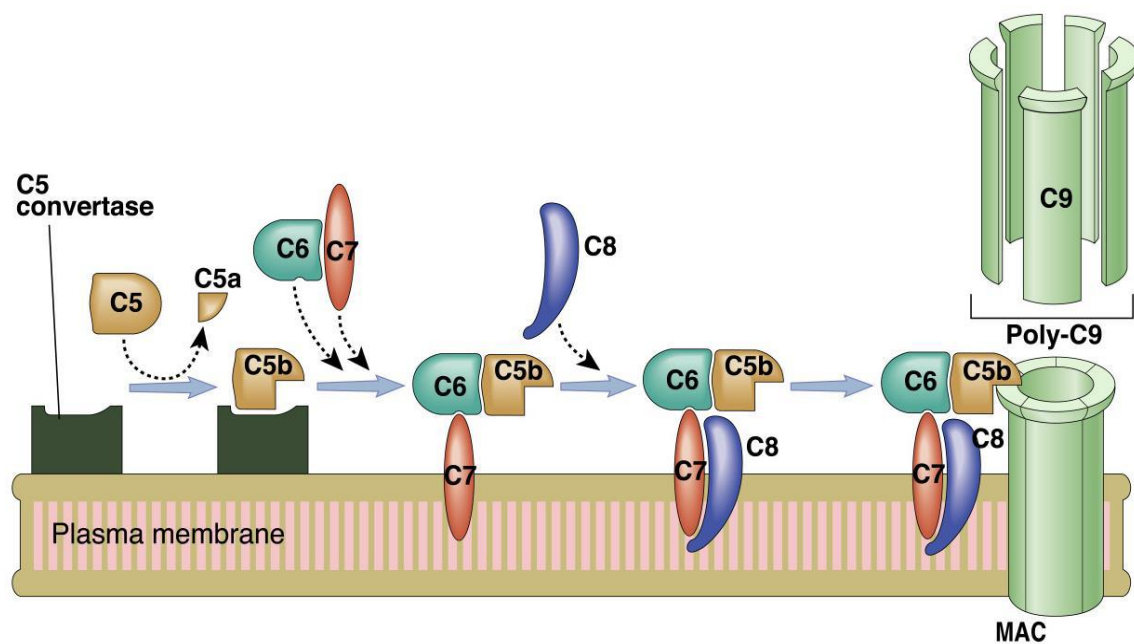
Οι πρωτεΐνες του συμπληρώματος που συμμετέχουν στην οδό της λεκτίνης είναι οι: C1q, C1r, C1s, C4, C2, C3, MBL, MASP-1, MASP-2. Η οδός αυτή μοιάζει με την κλασσική, ωστόσο διαφέρει στον τρόπο ενεργοποίησής της. Η ενεργοποίηση της οδού της λεκτίνης γίνεται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, μέσω του σχηματισμού και της δέσμευσης πρωτεϊνικών συμπλόκων στην βακτηριακή επιφάνεια, με τη συμμετοχή των MBL (*Mannose Binding Lectin*) και MASP-1, MASP-2 (*Mannose Associated Serine Protease 1-2*) (Εικόνα 15). Η δέσμευση της MBL στην βακτηριακή επιφάνεια ενεργοποιεί τις MASP-1 και MASP-2, που καταλύουν τη διάσπαση των C2 και C4. Τα θραύσματα C2a και C4b καταλύουν το σχηματισμό της κονβερτάσης του C3 και την διάσπασή του σε C3a και C3b, με επακόλουθο τον σχηματισμό της κονβερτάσης του C5, την περαιτέρω διάσπασή του, τον σχηματισμό του MAC και την κυτταρική λύση (Fujita 2002).



Εικόνα 11. Οδός της λεκτίνης

#### 1.4.4 Λυτική οδός

Οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην λυτική οδό για την συγκρότηση του συμπλόκου MAC είναι οι: C5, C6, C7, C8, C9 (Fujita 2002). Η λυτική οδός ξεκινάει με τη διάσπαση του C5 από την C5 κομβερτάση των τριών οδών που ήδη αναφέρθηκαν. Η διάσπαση του C5 είναι το τελευταίο ενζυμικό στάδιο στον καταρράκτη ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Στη συνέχεια ακολουθεί δέσμευση και πολυμερισμός ακέραιων πρωτεϊνών (Εικόνα 12).



Εικόνα 12. Σχηματισμός του συμπλέγματος Membrane Attack Complex (MAC) (Fujita 2002).

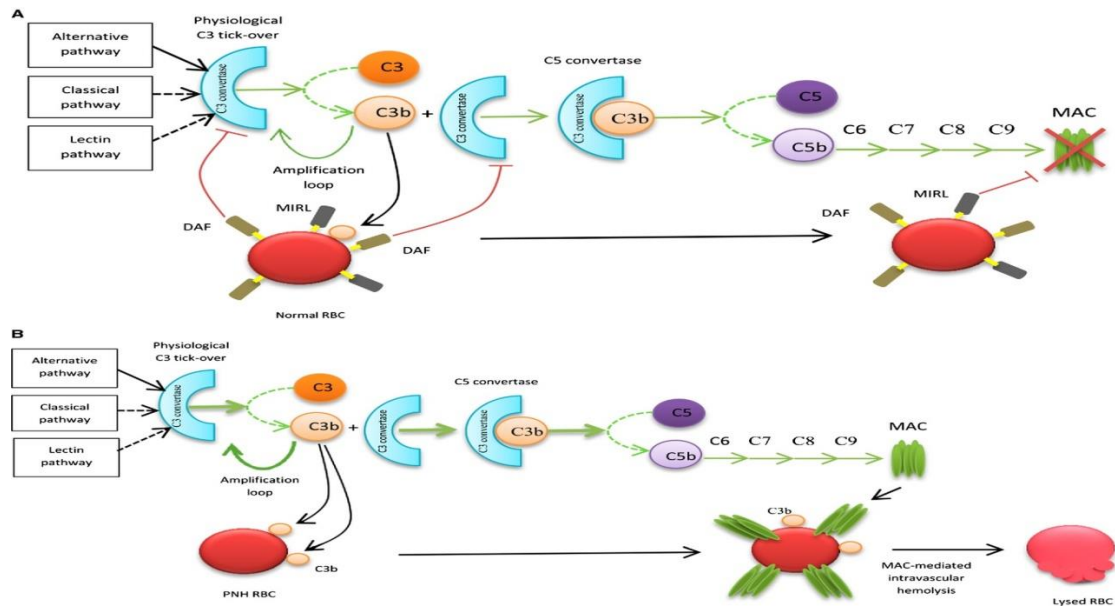
#### 1.4.5 Ρυθμιστικές πρωτεΐνες που παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος

Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των κυττάρων-ξενιστών παρεμποδίζουν την ενεργοποίηση του καταρράκτη του συμπληρώματος. Τέτοιο ρόλο έχουν οι GPI εξαρτώμενες πρωτεΐνες CD55 και CD59.

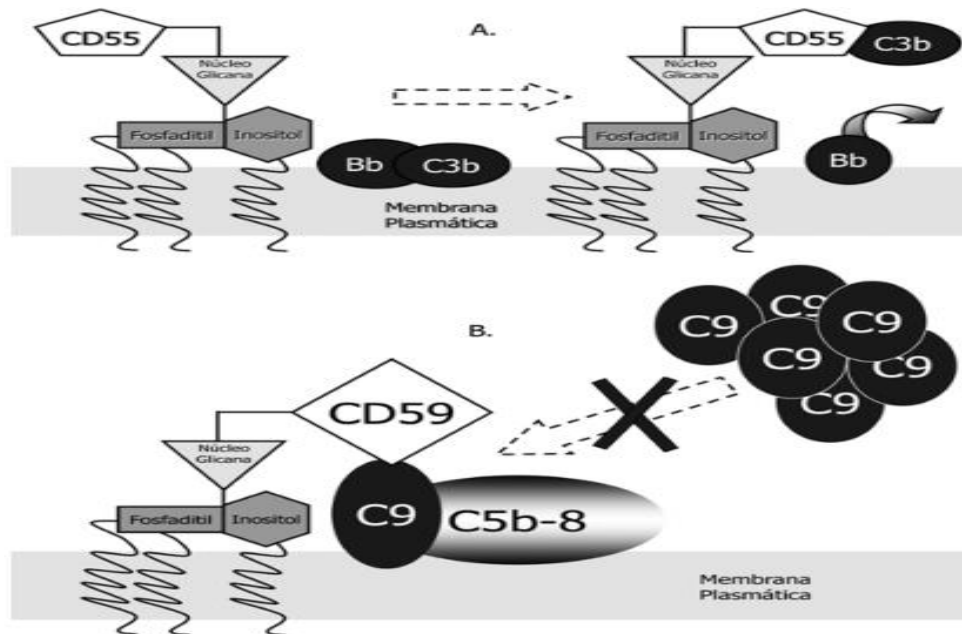
Η CD55, γνωστή και με την επωνυμία DAF (*Decay Accelerating Factor*) αναστέλλει την λειτουργία του συμπληρώματος, επιταχύνοντας το ρυθμό αποδόμησης της C3 κονβερτάσης και ταυτόχρονα μειώνοντας την ποσότητα της C3 που διασπάται σε C3a και C3b, αντίστοιχα.

Η CD59, γνωστή και με την επωνυμία MIRL (*Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*), αποτελεί παράδειγμα γλυκοπρωτεΐνης που αλληλεπιδρά απευθείας με το MAC, καθότι παρεμποδίζει τη συσσώρευση του C9 στο τέλος του καταρράκτη και ως εκ τούτου αποτρέπει τον σχηματισμό του MAC και την κυτταρική λύση (Εικόνες 17, 18) (Brodsky 2008A; Arruda et al. 2010; Devalet et al. 2015).

Τα ερυθροκύτταρα είναι δυνητικά ευαίσθητα στη λύση επειδή δεν έχουν πυρήνα. Στα ερυθρά αιμοσφαίρια, οι CD59 και CD55 είναι πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας που αποτελούν μέρος του μηχανισμού αναγνώρισης του ξενιστή.



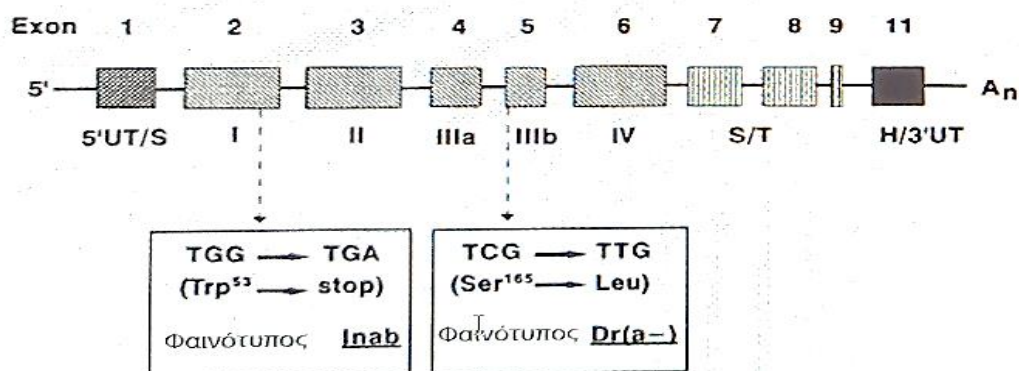
**Εικόνα 13.** Δράση του συμπληρώματος σε υγιή άτομα και ασθενείς με PNH. **A)** Λόγω της παρουσίας των μεμβρανικών πρωτεϊνών MIRL και DAF, ένα φυσιολογικό ερυθροκύτταρο προστατεύεται από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. **B)** Η ανεπάρκεια των MIRL και DAF καθιστά τα RBC ευαίσθητα στην προσβολή του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αιμόλυσης (Devalet 2015).



**Εικόνα 14.** Ο ρόλος των ρυθμιστικών πρωτεϊνών της οδού του συμπληρώματος. **(A)** Αλληλεπίδραση του CD55 με το σύμπλοκο C3bBb. **(B)** Αλληλεπίδραση του CD59 με το σύμπλοκο C5b-C9 (Arruda 2010).

### 1.4.5.1 CD55/DAF (*Decay Accelerating Factor*)

Πρόκειται για γλυκοπρωτεΐνη (MB:70kDa), η οποία συνδέεται στην επιφάνεια των κυττάρων με GPI-άγκυρα. Ο ρόλος του CD55 έγκειται στην αποδόμηση του συμπλέγματος της κονβερτάσης C3 της κλασικής (μέσω C4b2a) και της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (μέσω C3bBb). Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η εναπόθεση των C3 κλασμάτων στην επιφάνεια του κυττάρου και ελαχιστοποιείται η καταστροφή του, μέσω του ομόλογου συμπληρώματος. Η απουσία του από τα ερυθροκύτταρα προκαλεί αυξημένη ευαισθησία στη δράση του συμπληρώματος και εμφάνιση της αιμόλυσης, η οποία παρατηρείται στην PNH. Από μελέτες που έγιναν σε τρανσγονιδιακά ποντίκια με έλλειψη του CD55, καταδείχθηκε ότι από μόνη της η έλλειψη του CD55 δεν είναι επαρκής για την πρόκληση αιμόλυσης. Εκτός από τη λειτουργία του ως ρυθμιστική πρωτεΐνη του συμπληρώματος, το CD55 λειτουργεί και ως υποδοχέας για παθογόνα, ενώ φαίνεται ότι συμμετέχει στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και στον έλεγχο της T-κυτταρικής ανοσίας (Liu *et al.* 2005). Το cDNA του CD55 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 381 αμινοξέων, που συμπεριλαμβάνει ένα πεπτίδιο-οδηγό 34 βάσεων. Το αμινοτελικό άκρο της ώριμης πρωτεΐνης περιέχει 4 βραχείες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες (*short consensus repeats*, SCR) 60 αμινοξέων, η καθεμία από τις οποίες περιέχει 4 μόρια κυστεΐνης, ενώ υπάρχουν περιοχές ομόλογες και με αυτές λοιπών ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Οι SCR ακολουθίες συνδέονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς. Τα 17 τελικά αμινοξέα είναι τα απαραίτητα για τον σχηματισμό της 'άγκυρας', που συνδέει το πρωτεϊνικό μόριο στη μεμβράνη. Το γονίδιο του CD55 βρίσκεται στο χρωμόσωμα-1 (1q32) και αποτελείται από 11 εξώνια. Τα εξώνια 2-6 κωδικοποιούν τις 4 SCR περιοχές του αμινοτελικού άκρου (Εικόνα 19) (Post *et al.* 1990).



Εικόνα 15. Το γονίδιο του CD55/DAF (Post 1990).

Οι *Daniels et al* (1982) περιέγραψαν έναν σπάνιο φαινότυπο ομάδας αίματος (φαινότυπος Inab), στον οποίο απουσιάζουν όλα τα αντιγόνα του συστήματος των ομάδων αίματος από τα ερυθρά του ασθενούς (αντιγόνα *Cromer*). Τα αντιγόνα *Cromer* βρέθηκαν σε μια Ο-γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη των ερυθρών που απουσίαζε από τα ερυθροκύτταρα του ασθενούς. Μελέτες που έγιναν κατέδειξαν ότι η εν λόγω γλυκοπρωτεΐνη ήταν το CD55 και ως εκ τούτου ερυθρά με φαινότυπο Inab εμφανίζουν ανεπάρκεια του CD55 (*Telen et al. 1990*). Τα άτομα με φαινότυπο Inab δεν εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία, φαίνεται ότι η ανεπάρκεια του CD55 δεν ευθύνεται από μόνη της για την ευαισθησία των PNH κυττάρων στην δράση του συμπληρώματος.

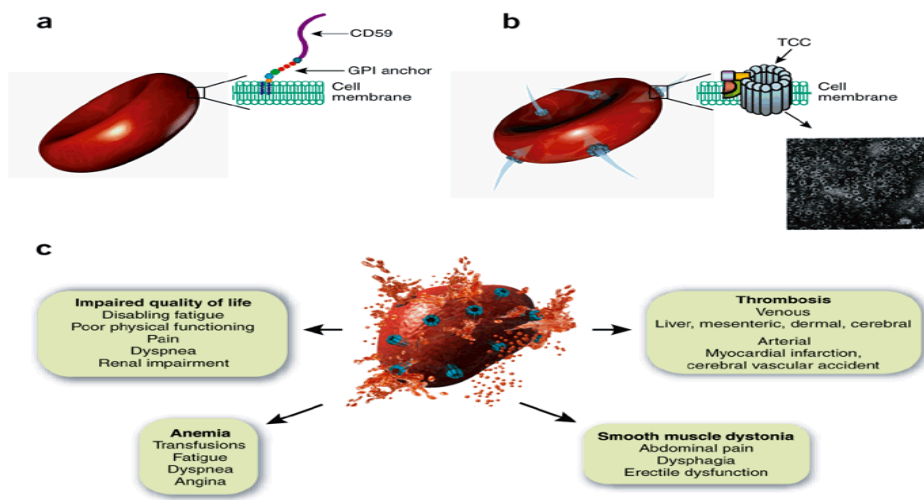
#### **1.4.5.2 CD59/MIRL (*Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*)**

Το CD59 είναι γλυκοπρωτεΐνη (MB:18-20kDa) που συνδέεται μέσω GPI-άγκυρας στην κυτταρική μεμβράνη. Το cDNA του CD59 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 128 αμινοξέων, πλούσια σε κυστεΐνη, της οποίας η διαμόρφωση καθορίζεται από στέρεους δισουλφιδικούς δεσμούς. Κατά τη σύνδεσή της με την GPI-άγκυρα αποκόπτονται οι 25 τελευταίες βάσεις της πρωτεΐνης. Το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11 (11p13:14) και αποτελείται από 4 εξόνια, από τα οποία το τέταρτο είναι εκείνο που κωδικοποιεί το τμήμα του πολυπεπτιδίου που συνδέεται στην άγκυρα GPI (*Forsberg et al. 1989*). Το CD59 συνδέεται στο C8 κλάσμα στον καταρράκτη του συμπληρώματος, παρεμποδίζοντας την είσοδο του κλάσματος C9 στην κυτταρική μεμβράνη μέσω της αποτροπής της σύνδεσης του C9 με το C5b-8. Κατά συνέπεια παρεμποδίζεται ο σχηματισμός του MAC και αναστέλλεται η κυτταρική λύση (Εικόνα 20) (*Podack 1986*). Η απουσία CD59 καθιστά τα ερυθροκύτταρα επιρρεπή στη λύση, παρέχοντας εξήγηση για την παρουσία χρόνιας ενδαγγειακής αιμόλυσης ως κλινική εκδήλωση της PNH (συχνά ακολουθούμενη και από επεισόδια υποτροπών) (*Dacie 1967*).

Μεταξύ των δύο ρυθμιστικών πρωτεϊνών που αναφέρθηκαν, το CD59 κατέχει περισσότερο σημαντικό ρόλο στη προστασία έναντι της κυτταρικής λύσης, η οποία επάγεται με την δράση του συμπληρώματος. Η απουσία του CD59 θεωρείται η κυρίως υπεύθυνη για την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων στους PNH ασθενείς. Σε *in vitro* μελέτες έχει φανεί ότι ενώ τα ερυθροκύτταρα με ανεπάρκεια CD55 εμφανίζονται ανθεκτικά στη λύση του συμπληρώματος, αυτά με έλλειψη CD59

(τύπος-III) είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα και ευθύνονται για την εμφάνιση αιμολυτικής αναιμίας στην PNH (*Rother et al. 1994*).

Το CD59 φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην επίκτητη ανοσία, δεδομένου ότι επηρεάζει την ικανότητα παραγωγής των κυτταροκινών των T-λεμφοκυττάρων μέσω της διέγερσης τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (*Smith et al. 2004; Longhi et al. 2006*).



**Εικόνα 16.** Ο ρόλος του CD59 στη λύση των ερυθροκυττάρων στην PNH. **α)** Φυσιολογικό ερυθροκύτταρο, **β)** PNH ερυθροκύτταρο με έλλειψη άγκυρας GPI, **γ)** αιμόλυση σε PNH ερυθροκύτταρο (*Podack 1986*).

## 1.5 Διαταραχές στην βιολογική δράση των εμπλεκόμενων κυττάρων

Οι GPI-APs επιτελούν πολλαπλές λειτουργίες, δρουν υπό την μορφή υποδοχέων, ενζύμων, ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος και μορίων πρόσδεσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, μεταξύ των πρωτεϊνών που προσδένονται στην GPI, σημαντικό ρόλο κατέχουν οι CD55 (*Sugarman et al. 1986*) και CD59 (*Shichishima et al. 1991*), σε επίπεδο ελέγχου ενεργοποίησης της οδού του συμπληρώματος. Η εκδήλωση αιμόλυσης στην PNH αποτελεί το αποτέλεσμα της αύξησης και επικράτησης παθολογικών κλώνων σε διάφορες κυτταρικές σειρές, λόγω μειωμένου αριθμού ή πλήρους απουσίας ρυθμιστικών πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια (*Smith et al. 2004*).

### 1.5.1 Ερυθροκύτταρα

Οι GPI-αγκυρωμένες πρωτεΐνες δεν διαπερνούν ολόκληρο το τοίχωμα της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά προσδένονται σε αυτήν μέσω της άγκυρας GPI και ως εκ τούτου διαθέτουν μεγαλύτερη κινητικότητα, αλλά υπόκεινται και σε ευκολότερη ενζυματική λύση. Εμφανέστερη είναι η ανεπάρκειά τους στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων, αφού η απουσία των CD55 και CD59, καθιστά τα ερυθροκύτταρα ευαίσθητα στα τελικά ενεργοποιημένα κλάσματα του συμπληρώματος, με συνέπεια την αιμόλυσή τους, που είναι και το βασικό χαρακτηριστικό της νόσου. Στην PNH διακρίνονται τρεις πληθυσμοί ερυθροκυττάρων, τα εντελώς ανεπαρκή σε GPI, ένας πληθυσμός που εμφανίζει μια ενδιάμεση διαταραχή και ο φυσιολογικός πληθυσμός. Η συχνότητα διακύμανσης ποικίλει (*Rosse 1971*), ενώ η κλινική έκφραση της νόσου εξαρτάται από τον συνδυασμό των ανωτέρω κυτταρικών πληθυσμών. Η βαρύτητα της νόσου είναι άμεση συνάρτηση του ποσοστού των εντελώς ανεπαρκών κυττάρων (τύπος-III). Τα κύτταρα τύπου-III είναι 15-25 φορές περισσότερο ευαίσθητα σε λύση και τα τύπου-II (ενδιάμεσος πληθυσμός) είναι 3-5 φορές πιο ευαίσθητα σε λύση από τα φυσιολογικά κύτταρα τύπου-I.

Οι κλινικές εκδηλώσεις, όπως αναφέρθηκε, είναι συνάρτηση του ποσοστού των ανεπαρκών κυττάρων τύπου-III. Αν η αναλογία είναι <20% η αιμόλυση είναι ασθενής, σε αναλογία μεταξύ 20% και 50% η αιμόλυση είναι ενδιάμεσης βαρύτητας, ενώ σε αναλογία κυττάρων τύπου-III >50% παρατηρείται έντονη αιμόλυση. Ο *Rosse (1971)* αναφέρει ότι οι συχνότητες των συνδυασμών των PNH κυτταρικών τύπων (οι



οποίες αντανακλούν και στην κλινική έκφραση της νόσου), έχουν ως εξής: I/III=77%, I/II & I/II/III=9% II/III=3%, II=1%. Οι μορφές με ερυθρά «τύπου-II» είναι υποκλινικές και σε αυτές συχνά απουσιάζει η εκδήλωση αιμοσφαιρινουρίας, ενώ φαίνεται να έχουν και καλύτερη κλινική πορεία. Η αιμόλυση αφορά κυρίως τα νεαρά ερυθρά, ενώ τα φυσιολογικά ερυθρά των πασχόντων έχουν φυσιολογικό χρόνο επιβίωσης (*Rosse 1971*).

Έχουν περιγραφεί έως τώρα περισσότερα από 20 διαφορετικά GPI εξαρτώμενα μόρια, τα οποία εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια των ανθρώπινων ερυθροκυττάρων (*Kishimoto et al. 1997*). Εκφράζονται σε ποικίλα αιματολογικά κύτταρα, με ορισμένα εξ' αυτών (π.χ. CD55, CD59) να κατανέμονται τυχαιοποιημένα κατά τη διάρκεια της αιμοποίησης, άλλα να είναι παρόντα σε συγκεκριμένες κυτταρικές υποομάδες και άλλα να εμφανίζονται κατά τη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης.

### **1.5.2 Πολυμορφοπύρρηνα**

Τα πολυμορφοπύρρηνα ασθενών με PNH εμφανίζουν, όπως και τα ερυθρά αιμοσφαίρια, απουσία πρωτεϊνών που συνδέονται μέσω GPI με την κυτταρική μεμβράνη. Έχει παρατηρηθεί ανεπάρκεια του υποδοχέα CD16 (ή FcγIII λειτουργική πρωτεΐνη των πολυμορφοπύρρηνων), του CD55 και του CD59, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στη λυτική δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος (*Rosse 1990; Van Der Schoot et al. 1990*). Συνέπεια της διαταραχής αυτής είναι η μείωση της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης των πολυμορφοπύρρηνων παρουσία ενεργοποιημένου συμπληρώματος, κάτι που ενδεχομένως εξηγεί την αυξημένη ευαισθησία των PNH ασθενών στις λοιμώξεις, ενώ δεν εμφανίζουν ουδετεροπενία (*Dacie & Lewis 1972*). Τα κύτταρα παρουσιάζουν διαταραχή της διενδοθηλιακής μετανάστευσης στους ιστούς, ανάλογη της ανεπάρκειας των GPI-APs από την επιφάνειά τους. Κάποιες από αυτές τις GPI-εξαρτώμενες πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού (CD66b, CD66c και CD87). Ο χρόνος επιβίωσης των πολυμορφοπύρρηνων με έλλειψη CD59 είναι σχεδόν φυσιολογικός (*Pedersen et al. 1996; Tomita 1999*).

### **1.5.3 Μονοκύτταρα**

Τα παθολογικά μονοκύτταρα στην PNH χαρακτηρίζονται από την ανεπάρκεια του υποδοχέα της *lipopolysaccharide-binding protein* (υποδοχέας CD14). Τα εν λόγω

κύτταρα διεγείρονται δυσκολότερα από τους λιποπολυσακχαρίτες των παθογόνων μικροοργανισμών σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα (Kwong *et al.* 1994). Έχει περιγραφεί απουσία και άλλων GPI-εξαρτώμενων πρωτεϊνών στην κυτταρική επιφάνεια των μονοκυττάρων (CD55, CD59 και CD87/u-PAR). Η απουσία του u-PAR από την επιφάνεια των μονοκυττάρων, συνδέεται με την θρομβοφιλική διάθεση στους ασθενείς με PNH (Kawakami *et al.* 1990; Ploug *et al.* 1992).

#### 1.5.4 Λεμφοκύτταρα

GPI(-) λεμφοκύτταρα είναι παρόντα σε όλους τους ασθενείς με PNH. Αφού η PNH είναι κλωνική νόσος του mHSC, ένα ποσοστό των λεμφοκυττάρων είναι ευαίσθητο στη δράση του συμπληρώματος. Η έκφραση του CD55 και CD59, όπως και άλλων GPI-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, είναι σημαντικά μειωμένα στα B και T λεμφοκύτταρα και στα NK κύτταρα (Schubert *et al.* 1993; Tseng *et al.* 1995). Μια GPI-εξαρτώμενη πρωτεΐνη είναι και το CD58 (LFA-3/*lymphocyte function antigen-3*), πρωτεΐνη σημαντική για την προσκόλληση των λεμφοκυττάρων και τη διακυτταρική επικοινωνία. Στα παθολογικά T-λεμφοκύτταρα το CD58 απουσιάζει ή είναι σημαντικά μειωμένο (Koyasu *et al.* 1990). Στους περισσότερους ασθενείς, ο αριθμός των GPI(-) NK κυττάρων είναι σημαντικά μεγαλύτερος από αυτών των B και T λεμφοκυττάρων, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός των παθολογικών B κυττάρων είναι μεγαλύτερος από εκείνον των T (Tseng *et al.* 1995; Richards *et al.* 1998). Σε ασθενείς με αυτόματη υποστροφή της PNH, GPI(-) T-λεμφοκύτταρα είναι δυνατόν να ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα, αρκετές μέρες αφότου οι υπόλοιπες GPI(-) κυτταρικές σειρές έχουν εξαφανισθεί, υποδηλώνοντας ότι T-λεμφοκύτταρα μακράς διάρκειας παραμένουν στην κυκλοφορία (Nakakuma *et al.* 1994; Hillmen *et al.* 1995).

#### 1.5.5 Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια ασθενών με PNH, παρουσία οξυινισθέντος ορού ή σε περιβάλλον χαμηλής ιοντικής ισχύος, λύνονται *in vitro* 10-30 φορές περισσότερο σε σχέση με τα φυσιολογικά αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια με ανεπάρκεια του CD59 ενεργοποιούνται ευκολότερα από το συμπλήρωμα σε σχέση με τα φυσιολογικά, με αποτέλεσμα αυξημένη προπηκτική δραστηριότητα και ως εκ τούτου μεγαλύτερη πιθανότητα δημιουργίας θρόμβου (Sims *et al.* 1989). *In vitro* μελέτες από τους Wiedmer *et al.* (1993) έδειξαν ότι τα παθολογικά αιμοπετάλια εμφανίζουν στην επιφάνειά τους περισσότερες περιοχές υποδοχής για τον ενεργοποιημένο FV (FVa) με δυνατότητα

αυξημένης παραγωγής θρομβίνης μετά από διέγερση από το MAC (*membrane attack complex*), σε σχέση με τα φυσιολογικά αιμοπετάλια (*Wiedmer et al. 1993; Sims & Wiedmer 1995*).

Η απελευθέρωση προπηκτικών παραγόντων, από τα αιμοπετάλια και τα αιμολυμένα ερυθροκύτταρα, καθώς και διαφόρων πρωτεασών από τα λευκά αιμοσφαίρια, ενέχονται για την εμφάνιση των φλεβικών (κυρίως) θρομβώσεων στην πορεία της νόσου (*Dacie & Lewis 1972; Brodsky 2005*). Η εμφάνιση των θρομβώσεων προκαλείται από παράγοντες που μπορούν να κινητοποιήσουν τον μηχανισμό της αιμόλυσης, όπως κύηση, χειρουργικές επεμβάσεις, μετάγγιση, λοίμωξη κ.ά. (*Hartmann & Kolhouse 1972*).

Η διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων οφείλεται στην ανεπάρκεια ή απουσία των πρωτεϊνών που συνδέονται με αυτή μέσω GPI, όπως ο υποδοχέας της φιβρονεκτίνης (*fibronectin receptor*), ο υποδοχέας u-PAR, τα CD59 και CD55 κ.α. (*Devine et al. 1987B; Rosse 1997*). Η διαταραχή της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, ωστόσο, δεν επαρκεί για να εξηγήσει την εμφανιζόμενη θρομβοπενία στους PNH ασθενείς, που φαίνεται να σχετίζεται με τη μη αποδοτική θρομβοποίηση ή υποπλασία των κυττάρων της μεγακαρυωτικής σειράς.

Η επιβίωση των αιμοπεταλίων στους ασθενείς με PNH είναι φυσιολογική (*Cohen et al. 1961*). Πιθανά αυτό οφείλεται σε παρουσία αναστολέα του συμπληρώματος στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων, ο οποίος προστατεύει τα αιμοπετάλια από τη λύση (*Μελέτης και συν. 2009*).

## 1.6 PNH και ανεπάρκεια του μυελού των οστών

Στην PNH τα GPI (-) κύτταρα αναφέρονται ως κλώνοι και ποικίλλουν από 1-2% έως και 100% του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού. Ως εκ τούτου, τα ερυθροκύτταρα που αντιστοιχούν σε ένα μεμονωμένο PNH κλώνο ποικίλλουν αναφορικά με το βαθμό ανεπάρκειας των GPI πρωτεϊνών. Το αποτέλεσμα (όπως έχει ήδη αναφερθεί) είναι ότι ορισμένοι ασθενείς εκδηλώνουν μερική ανεπάρκεια (περίπου 10% της φυσιολογικής έκφρασης, PNH κύτταρα τύπου-II), ενώ άλλοι ολική ανεπάρκεια (πλήρης απουσία έκφρασης, PNH κύτταρα τύπου-III) (Hillmen *et al.* 2006). Παραμένει αδιευκρίνιστο το γιατί ένας κλώνος διευρύνεται στον μυελό των οστών, εκτιμάται ωστόσο πως πιθανότατα σχετίζεται με τυχαία ανοσοποιητική καταστολή του ίδιου του μυελού. Οι περισσότεροι ασθενείς με PNH εκδηλώνουν εργαστηριακά ή κλινικά ευρήματα, δηλωτικά υποπλασίας του μυελού. Η συγκεκριμένη αδυναμία εκδηλώνεται ανεξάρτητα από το εάν ο μυελός των οστών χαρακτηρίζεται ως υποκυτταρικός ή υπερκυτταρικός, εάν υπάρχει συνοδός θρομβοκυτταροπενία ή κοκκιοπενία, καθώς επίσης και ιστορικό απλαστικής αναιμίας (Rosse 1997).

Υπάρχουν ορισμένα μεμονωμένα ευρήματα στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας, μέσω των οποίων επιχειρείται να δοθούν απαντήσεις, αναφορικά με τον ρόλο του ανοσοποιητικού μηχανισμού σε ασθενείς με PNH (Sugimori *et al.* 2012). Ένα τέτοιο μεμονωμένο περιστατικό περιγράφει την περίπτωση ενός ασθενούς που ανέπτυξε μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS), όντας σε φάση ανάρρωσης από αιμολυτική PNH και έχοντας αναπτύξει μία νέα χρωμοσωμική ανωμαλία (πιο συγκεκριμένα τρισωμία στο χρωμόσωμα 8) (Longo *et al.* 1994). Η συγκεκριμένη έρευνα καταδεικνύει ότι η επικράτηση διαφορετικών κλώνων στο μυελό των οστών εξαρτάται και από λοιπούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, πέραν της εμπλοκής του ανοσοποιητικού συστήματος. Ο λόγος έγκειται στο ότι ο εναπομείναν επικρατής κλώνος δεν συνδυάστηκε με ανεπάρκεια σε GPI συνδεδεμένες επιφανειακές πρωτεΐνες και ως εκ τούτου θα έπρεπε να είχε απορριφθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα επιλογής.

Σε μία άλλη περίπτωση ασθενούς, καταγράφηκε αμοιβαία μετατόπιση του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 12, με την συγκεκριμένη κυτταρογενετική ανωμαλία να καταγράφεται μόνο σε κλωνικά GPI ανεπαρκή κύτταρα και όχι στα αντίστοιχα φυσιολογικά. Το εν λόγω εύρημα είναι δηλωτικό της ύπαρξης πρόσθετων

μεταλλαξιόγων γεγονότων που επισυμβαίνουν σε κλωνικά κύτταρα, μέσω των οποίων διασφαλίζεται η επικράτηση της κλωνικότητας (*Inoue et al. 2006*).

Οι *Shen et al. (2014)* δημοσίευσαν σχετική μελέτη όπου παρέχουν νεότερες πληροφορίες αναφορικά με τον παθογενετικό μηχανισμό κλωνικής διεύρυνσης που καταγράφεται στην πλειοψηφία ασθενών με PNH. Περιπτώσεις ασθενών στους οποίους παρατηρείται επιπρόσθετο γεγονός μετάλλαξης πέραν του PIG-A γονιδίου, συσχετίζονται με σημαντική αυξημένη αναλογία μεταφοράς GPI ανεπαρκών κλωνικών κυττάρων, έναντι αντίστοιχων ασθενών με απουσία πρόσθετων μεταλλάξεων. Έπειτα από ανάλυση αλληλουχιών του πλήρους εύρους των εξονίων, αποκαλύφθηκαν οι εν λόγω πρόσθετες μεταλλάξεις στο μυελό των οστών ασθενών με PNH. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις κατανέμονται με ετερογενή τρόπο σε γονίδια που εμπλέκονται σε αιμοποιητικές κακοήθειες, όπως το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή οι μυελουπερπλαστικές διαταραχές (π.χ. TET2, MAGEC1, BRPF1, KDM3B, STAC3, SUZ12, U2AF1, JAK2).

Τα εν λόγω δεδομένα συνάδουν με προηγούμενη παρατήρηση μελέτης, σύμφωνα με την οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο JAK-2 σε κοόρτη ασθενών με PNH (*Sugimori et al. 2012*). Από την μελέτη των ευρημάτων των *Shen et al. (2014)*, η ανάλυση αλληλουχίας PNH φυσιολογικών και παθολογικών αποικιών στο μυελό των οστών έδειξε πως η εκδήλωση πρόσθετων μεταλλάξεων αποδίδεται είτε στο ότι αποτελούν υποκλώνο του PIG-A μεταλλαξιόγону πληθυσμού, είτε στο ότι αποτελούν αρχικό γεγονός που προηγείται της εκδήλωσης PIG-A μετάλλαξης. Επομένως, είναι πιθανό η κλωνική εξέλιξη να εξελίσσεται με σταδιακό τρόπο, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μίας σύνθετης κλωνικής ιεραρχίας.

Αυτά τα γεγονότα μετάλλαξης επισυμβαίνουν και καταγράφονται σε αιμοποιητικά κύτταρα ομάδων ασθενών με απλαστική αναιμία, είτε κατά την στιγμή της διάγνωσης είτε αμέσως μετά. Εντοπίζονται σε διαφορετικά γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των ASXL1, DNMT3A, BCOR, TET2 και MPL. Επιπρόσθετα, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις σωματικών μεταλλάξεων σε ασθενείς με αμυλοείδωση (με διάρκεια νόσου >6 μήνες), με τον σχετικό κίνδυνο εκτροπής σε μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο να προσεγγίζει τα επίπεδα του 40% (*Shen et al. 2014; Kulasekararaj et al. 2014*).

### **1.6.1 Απλαστική αναιμία (AA) και PNH**

Η σχέση μεταξύ απλαστικής αναιμίας (AA) και PNH θεωρείται πολύ στενή. Συνήθως η AA στην εξέλιξή της δεν χαρακτηρίζεται από την επικράτηση κάποιου

συγκεκριμένου κλωνικού πληθυσμού, ωστόσο φαίνεται ότι εμπλέκεται σε νοσήματα που έχουν κλωνικό χαρακτήρα, όπως η PNH, το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS) και η οξεία λευχαιμία (ΟΜΛ). Η PNH μπορεί να εκδηλωθεί είτε κατά την αρχική περίοδο της αποκατάστασης της ερυθροποίησης είτε μετά από αρκετό διάστημα ύφεσης μετά από θεραπεία. PNH κύτταρα σε ΑΑ ασθενείς μπορούν να ανιχνευθούν με κυτταρομετρία ροής σε ποσοστό έως και 57%, ιδιαίτερα μετά από την χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η PNH που αναπτύσσεται σε ασθενείς με ΑΑ μετά από αγωγή με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη ή κυκλοσπορίνη δεν είναι της ‘κλασικής’ μορφής’, ενώ στους ασθενείς οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A συνήθως δεν υπάρχουν κατά την αρχική διάγνωση της ΑΑ.

Σε *in vitro* καλλιέργειες βρέθηκε ότι ο μυελός στην PNH συμπεριφέρεται με τον ίδιο τρόπο όπως στην ΑΑ ακόμη και όταν δεν είναι υποκυτταρικός (και τα GPI(-) και τα GPI(+)) αρχέγονα κύτταρα εμφανίζουν φτωχή ανάπτυξη). Βρέθηκε επίσης, ότι τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και των δύο νοσημάτων εμφανίζουν παρόμοια αντοχή στην απόπτωση. Δεδομένου ότι τα GPI ανεπαρκή κύτταρα δεν εμφανίζουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στο περιβάλλον του φυσιολογικού μυελού, θεωρείται ότι τους το παρέχει ο υποκυτταρικός μυελός στην ΑΑ. Πιθανά διαφεύγουν της δράσης των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων ή εκμεταλλεύονται τη μειωμένη δράση των κυτταροκινών (Luzzatto 2006; Μελέτης και συν. 2009). Στην Εικόνα 8 φαίνονται οι περιπτώσεις συνδυασμού ΑΑ και PNH ανάλογα με την επικράτηση των φυσιολογικών και των PNH κλώνων.

### **1.6.2. Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο και PNH**

Το MDS αποτελεί επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και χαρακτηρίζεται από περιορισμένη αιμοποίηση με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κυτταροπενιών (διαφόρου βαθμού) στο περιφερικό αίμα και μορφολογικές ανωμαλίες σε μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές. Ένα 30% των ασθενών με MDS οδηγούνται σε οξεία λευχαιμία. Οι διαταραχές που εκδηλώνονται υποδηλώνουν γενετική έλλειψη σταθερότητας στον παθολογικό κλώνο. Η παρουσία PNH κλώνου ενισχύει αυτή την άποψη. Η PNH μπορεί να προηγείται ή να ακολουθεί την εμφάνιση του συνδρόμου. Σε μελέτες σε ασθενείς με MDS έχουν βρεθεί ερυθροκύτταρα και πολυμορφοπύρρηνα με φαινότυπο PNH και με μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A, χωρίς ωστόσο να υπάρχει σχέση μεταξύ της παρουσίας του PNH κλώνου και του χρόνου διάγνωσης του συνδρόμου ή προηγηθείσας αγωγής. Οι ασθενείς δεν εμφανίζουν *in*

*in vivo* ή *in vitro* αιμόλυση δεδομένου ότι η ανάπτυξη του PNH κλώνου μάλλον δεν ευνοείται στο μικροπεριβάλλον του MDS μυελού (Μελέτης και συν. 2009).

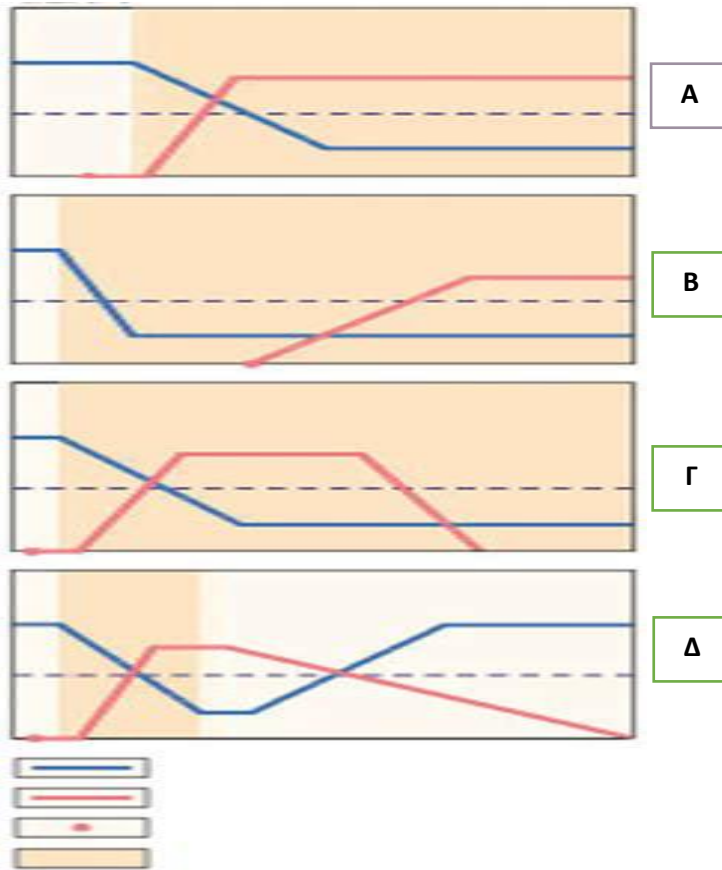
### 1.6.3 Οξεία λευχαιμία και λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα στην PNH

Σπάνια η PNH κατά την φυσική της πορεία εκτρέπεται σε οξεία λευχαιμία. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, αυτή εμφανίζεται με φαινότυπο μυελογενούς λευχαιμίας (οι βλάστες της OML συνήθως έχουν φαινότυπο CD55<sup>-</sup>).

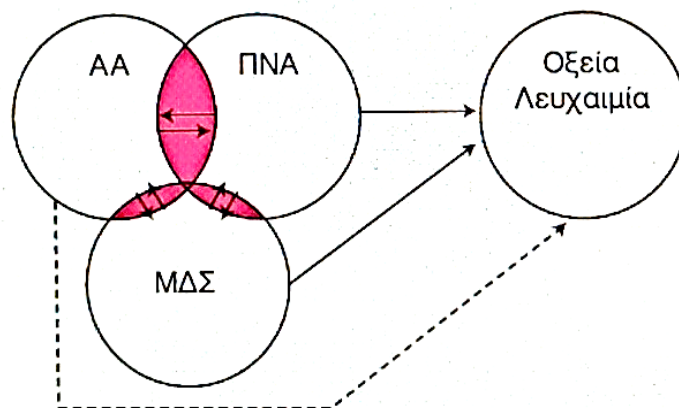
Η εκτροπή φαίνεται ότι εμφανίζεται συνήθως στα αρνητικά για PNH κύτταρα, ενώ σε περισσότερες από τις μισές περιπτώσεις η εκτροπή αυτή θα γίνει στα πρώτα 2 έτη από τη διάγνωση (De Latour et al. 2008B). Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, βρέθηκαν λευχαιμικά κύτταρα με έλλειψη των CD55 και CD59 σε PNH ασθενείς που εξετράπηκαν σε OML· τα δεδομένα αυτά δείχνουν προς την κατεύθυνση της προέλευσης των λευχαιμικών κυττάρων από τον PNH κλώνο για τους ασθενείς αυτούς.

Καρυοτυπικές ανωμαλίες που να συσχετίζονται με την εκτροπή της PNH σε οξεία λευχαιμία δεν έχουν βρεθεί. Οι βλάστες εμφανίζουν πολλαπλές μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A, σε αντίθεση με τους βλάστες της *de novo* OML. Μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί η παρουσία βλαστικών κυττάρων με έλλειψη CD55 και/ή CD59 τόσο σε ασθενείς με OML που δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό με PNH. Πιθανά η εν λόγω έλλειψη οφείλεται είτε σε μειωμένη παραγωγή του αντίστοιχου mRNA είτε σε διαταραχή της βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας λόγω βλάβης του PIG-A γονιδίου. Οι PNH ασθενείς εμφανίζουν οξεία λευχαιμία σε ποσοστό που κυμαίνεται από 0–4% (Devine et al. 1987A; Μελέτης και συν. 2009).

Η εξέλιξη της PNH σε λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα αποτελεί επίσης σπάνιο γεγονός. Έχει αναφερθεί έλλειψη του CD55 σε ασθενείς με *non Hodgkin* λέμφωμα (χωρίς ιστορικό PNH), ενώ έχει εντοπιστεί και απουσία ή ανεπάρκεια των CD55 και CD59 σε ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με λεμφοϋπερπλαστικό σύνδρομο (Μελέτης και συν. 2009).



**Εικόνα 17.** Περιπτώσεις συνδυασμού απλαστικής αναιμίας και PNH (μπλε:φυσιολογικά κύτταρα, κόκκινο:PNH κλώνος, \*:σωματική μετάλλαξη PIG-A, πορτοκαλί σκίαση: διάρκεια διαταραχής αιμοποίησης). **A)** PNH: η σωματική μετάλλαξη του PIG-A προκαλεί μυελική ανεπάρκεια, με πλεονέκτημα ανάπτυξης για τον PNH κλώνο. **B)** Απλαστική αναιμία εξελισσόμενη σε PNH: η μετάλλαξη του PIG-A ακολουθεί τη μυελική ανεπάρκεια και έχει άμεσο πλεονέκτημα. **Γ)** PNH εξελισσόμενη σε απλαστική αναιμία: εξέλιξη της περίπτωσης A, όπου αρχικά ο PNH κλώνος είναι αρκετά μεγάλος ώστε να καλύπτει τη μυελική ανεπάρκεια, τελικά ο κλώνος αυξάνεται ενώ παραμένει η μυελική ανεπάρκεια. **Δ)** Αποκατάσταση από PNH: ο μυελός αποκαθίσταται ενώ μειώνεται ο PNH κλώνος (Μελέτης και συν. 2009).



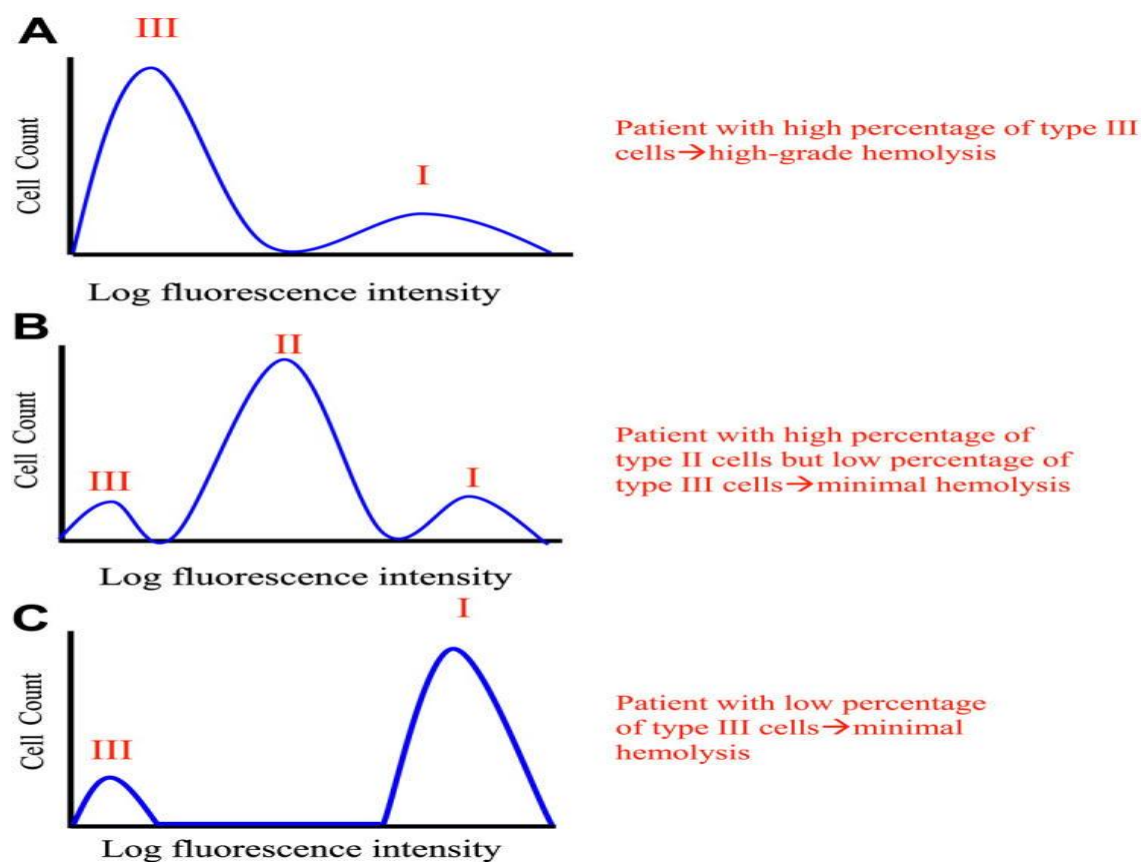
**Εικόνα18.** Συσχέτιση μεταξύ AA, MDS, PNH και οξείας λευχαιμίας (Μελέτης 2009).



## 1.7 Η PNH ως ‘Νόσος Μωσαϊκό’

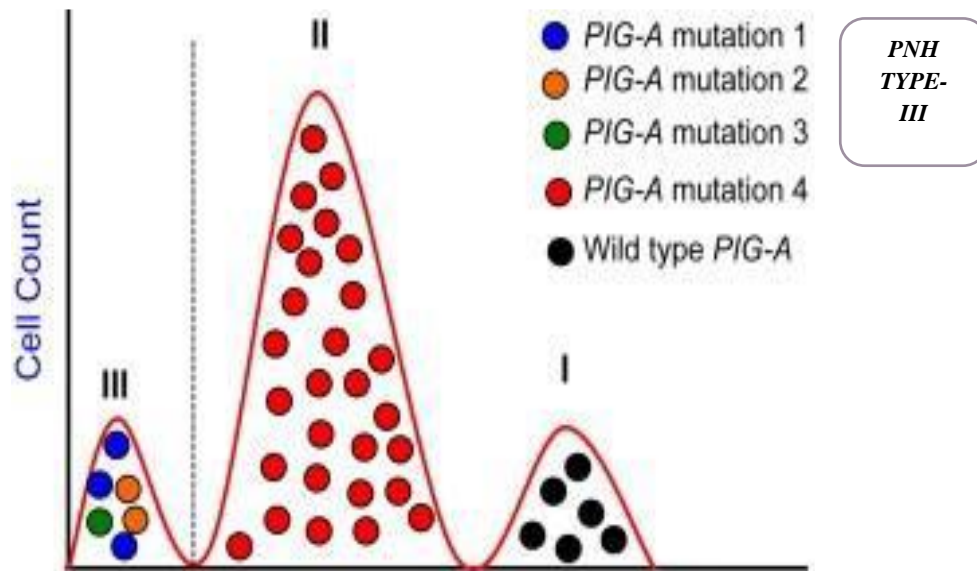
Η PNH χαρακτηρίζεται ως ‘Νόσος-Μωσαϊκό’. Η αναλογία και ο τύπος των ερυθροκυττάρων ανάλογα με την ανεπάρκειά τους σε GPI-APs ποικίλλουν σημαντικά και επηρεάζουν ανάλογα τις κλινικές εκδηλώσεις. Ασθενείς με μεγάλη ή πλήρη έλλειψη CD55 και CD59 εμφανίζουν μεγάλους κλώνους PNH (type-III) και κλινικά εμφανή αιμόλυση. Μερική ανεπάρκεια των GPI-Aps συσχετίζεται με παρουσία ενδιάμεσων κλώνων (PNH dim, type-II), που στα ιστογράμματα της κυτταρομετρίας ροής εντοπίζονται στην περιοχή μεταξύ των type-III και των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων (type-I) (Εικόνα 10).

Οι κλώνοι τύπου-II προκαλούν μέτρια ή καθόλου αιμόλυση ακόμη και εάν το ποσοστό των παθολογικών κυττάρων είναι υψηλό. Η διάγνωση της PNH μπορεί να τεθεί ακόμη και με χαμηλή αναλογία ερυθρών τύπου-III σε σχέση με τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα, αλλά η αιμόλυση διαπιστώνεται μόνο βιοχημικά (*Holguin et al. 1989A/B; Parker et al. 2005*).



Εικόνα 19. Φαινοτυπικό μωσαϊκό στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (*Parker 2005*).

Οι *Endo et al. (1996)* έδειξαν ότι ο φαινοτυπικός μωσαϊκισμός είναι συνέπεια του αντίστοιχου γονοτυπικού, αναδεικνύοντας και το χαρακτηριστικό της ‘κλωνικής επικράτησης’ στην PNH. Περιέγραψαν την περίπτωση ασθενούς με παρουσία τεσσάρων κλώνων με διαφορετικές PIG-A μεταλλάξεις. Στον ασθενή αυτό, τα τύπου-II PNH ερυθροκύτταρα (75%) προέρχονταν από ένα mHSC με ‘τύπου *missense*’ μετάλλαξη, ενώ τα τύπου-III (11%) από τρεις διαφορετικούς κλώνους, με διαφορετικές μεταλλάξεις. Το υπόλοιπο 14% των φυσιολογικών ερυθροκυττάρων (τύπος-I) προέρχονταν από φυσιολογικό mHSC χωρίς PIG-A μετάλλαξη (Εικόνα 11) (*Endo et al. 1996; Parker 2007*).



Εικόνα 20. Γονοτυπικός μωσαϊκισμός σε PNH ερυθροκύτταρα (*Parker 2007*).

## 1.8 Κατηγοριοποίηση της PNH

Η ισχύουσα κατηγοριοποίηση της PNH από την *IPIG (International PNH Interest Group)* αποσκοπεί στη διαμόρφωση ενός κοινού πλαισίου ενδοσυνηνότητας μεταξύ κλινικών ιατρών και ερευνητών, σε επίπεδο διάγνωσης και ποσοτικοποίησης των PNH κλώνων. Ως εκ τούτου, έχουν προταθεί οι ακόλουθες τρεις υποομάδες (*Richards et al. 2007; Rachidi et al. 2010*):

**A)** Η κλασσική PNH που χαρακτηρίζεται από κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα χρόνιας ενδαγγειακής αιμόλυσης με αξιοσημείωτη αύξηση της LDH (έως και 10 φορές πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα), χωρίς παρουσία διαταραχής του μυελού των οστών, αλλά με παρουσία κλώνου μεγάλου μεγέθους στα πολυμορφοπύρρηνα και παρουσία ερυθροκυττάρων τύπου-III (πλήρης ανεπάρκεια παραγωγής GPI εξαρτώμενων πρωτεϊνών). Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται και οι ασθενείς με θρομβωτικά επεισόδια.

**B)** Η εκδήλωση της PNH που συνοδεύεται από (συνήθως) ήπια ενδαγγειακή αιμόλυση και επισυμβαίνει επί εδάφους διαταραχών του μυελού των οστών, όπως απλαστική αναιμία και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Ο βαθμός αύξησης της LDH ποικίλλει και εξαρτάται από το μέγεθος του παθολογικού κλώνου, ενώ γενικότερα οι βιοχημικοί δείκτες της αιμόλυσης είναι ήπια διαταραγμένοι. Το μέγεθος των κλώνων στην περίπτωση αυτή συνήθως είναι <10%, ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό (~10%) εμφανίζεται με μεγάλο μέγεθος κλώνου. Όσον αφορά στην φυσική εξέλιξη αυτών των κλώνων, φαίνεται πως στο 15-50% των περιπτώσεων οι κλώνοι θα εξαπλωθούν, σε ένα 10-25% θα εξαφανισθούν, ενώ σε κάποιους ασθενείς θα παραμείνουν σταθεροί (*Puet al. 2011*).

**Γ)** Η υποκλινική PNH (PNH-sc), στην οποία δεν υφίσταται καμία κλινική ή εργαστηριακή ένδειξη αιμόλυσης και παρατηρείται σε σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας. Χαρακτηρίζεται από πληθυσμούς μικρού μεγέθους κλώνων στα ερυθροκύτταρα και/ή λευκοκύτταρα, η δε διάγνωσή της απαιτεί κυτταρομετρητή ροής υψηλού βαθμού ακριβείας λόγω ύπαρξης κλώνων μικρού μεγέθους <1%. Η μυελική ανεπάρκεια στους ασθενείς αυτούς χρήζει άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης, που συνήθως απαιτεί διαφορετικούς χειρισμούς σε σχέση με την κλασσική PNH. Επεισόδια θρόμβωσης σε αυτούς τους ασθενείς, αν και σπάνια, έχουν ωστόσο αναφερθεί (*Brodsky 2009 & 2021*).

Στον Πίνακα 1 φαίνονται οι επικρατούσες εκδηλώσεις της νόσου και τα χαρακτηριστικά αιματολογικά ευρήματα σε συνδυασμό με το μέγεθος του κλώνου στην κάθε περίπτωση.

<b>Επικρατούσες εκδηλώσεις</b>	<b>Αιματολογικά ευρήματα</b>	<b>Μέγεθος PNH κλώνου</b>	<b>Ονοματολογία</b>
Αιμόλυση θρόμβωση	Αναιμία και ελάχιστη ή καμιά άλλη κυτταροπενία	Μεγάλος	Κλασική PNH
Αιμόλυση θρόμβωση	Αναιμία και ήπια ή μέσου βαθμού άλλη κυτταροπενία	Μεγάλος	Υποπλαστική PNH
Πορφύρα ή και λοίμωξη	Μέτρια προς βαριά πανκυτταροπενία	Μεγάλος	AA/ PNH
Πορφύρα ή και λοίμωξη	Βαριά πανκυτταροπενία	Μικρός	AA με κλώνο PNH
Θρόμβωση	Μέτρια/(ες) κυτταροπενία/(ες)	Μικρός	'mini' PNH

**Πίνακας 1.** Τύποι PNH, αιματολογικά ευρήματα και μέγεθος κλώνου (Μελέτης και συν. 2009).

## 1.9 Κλινικές εκδηλώσεις

Η εκδήλωση χρόνιας αιμόλυσης σε ασθενείς με PNH συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα θνητότητας (*Brodsky 2008A*). Οι ασθενείς διαμαρτύρονται για λήθαργο, κακουχία, διάχυτη μυαλγία και απώλεια αίσθησης, με αποτέλεσμα να υφίστανται σημαντικές επιπτώσεις σε επίπεδο ποιότητας ζωής (*Rosse 2000*). Κατά την διάρκεια των οξέων ενδαγγειακών αιμολυτικών διαταραχών (παροξυστικά επεισόδια) εκδηλώνεται αιμοσφαιρινουρία, η οποία και γίνεται εμφανής από την χαρακτηριστική σκούρα καφέ απόχρωση των ούρων. Πρόσθετες κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν γαστρεντερικά συμπτώματα, ναυτία, ίκτερο, κοιλιακό άλγος, δυσφαγία, οισοφαγικό σπασμό, στυτική δυσλειτουργία στους άνδρες, με επιδείνωση των συμπτωμάτων (*Rother et al. 2005*). Πνευμονική υπέρταση αναφέρεται σε αρκετά μεγάλο ποσοστό των ασθενών (~40%) και συνδέεται με αυξημένα επίπεδα του *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (NTproBNP), με συνοδό καρδιακή δυσλειτουργία και συχνά συνοδό υποκλινική πνευμονική εμβολή. Πολλοί ασθενείς αναφέρουν δύσπνοια, που πιθανά αποτελεί πρώιμο κλινικό χαρακτηριστικό πνευμονικής υπέρτασης και καρδιακής δυσλειτουργίας. Οι *Schrezenmeier et al.* το 2014 μελέτησαν τις κλινικές εκδηλώσεις σε 1610 ασθενείς και τα ποσοστά των συμπτωμάτων ήταν ως εξής: κόπωση (80%), δύσπνοια (64%), αιμοσφαιρινουρία (62%), κοιλιακό άλγος (44%), πόνος στο στήθος (33%), διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας (14%), ενώ μόνο το 16% των ασθενών παρουσίασαν θρομβοεμβολικά επεισόδια. Ωστόσο οι *Hill et al.* (2015) ισχυρίζονται ότι η παρουσία της υποκλινικής θρόμβωσης σε αυτούς τους ασθενείς είναι σαφώς υποεκτιμημένη. Κατά τους *Hillmen et al.* (2006) η συνοδός συμπτωματολογία της PNH δεν συμβαδίζει πάντα με τον εκάστοτε βαθμό αναιμίας. Η διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας αποδίδεται στην εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στο νεφρικό παρέγχυμα (Πίνακας 3) (*Kumpers et al. 2006*). Λιγότερο συχνές επιπλοκές περιλαμβάνουν αιμοχρωμάτωση σε ασθενείς που χρήζουν συχνής μετάγγισης, λοιμώξεις και αυξημένη συχνότητα εκδήλωσης συμπαγών όγκων έναντι του γενικού πληθυσμού (*Socie et al. 1996*).

### 1.9.1 Ενδαγγειακή αιμόλυση και κατανάλωση NO

Η χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση αποτελεί την χαρακτηριστική κλινική εκδήλωση στην PNH και συνοδεύεται από παροξυστικά επεισόδια οξείας αιμόλυσης και

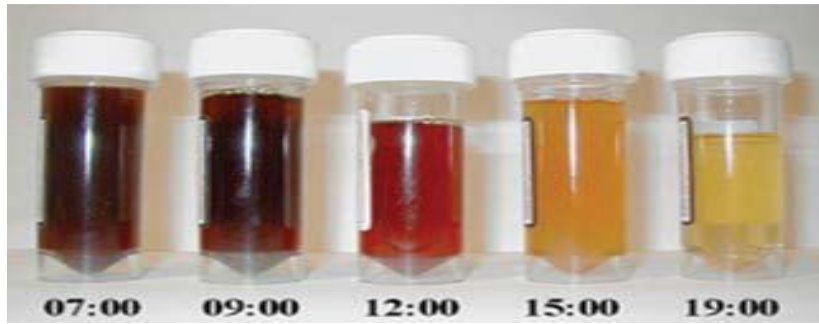
αιμοσφαιρινουρία. Θεωρείται η βασική αιτία πρόκλησης των περισσότερων συμβαμάτων στην PNH λόγω της συσσώρευσης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα και της επακόλουθης εξάντλησης του NO, με αποτέλεσμα αγγειοσυστολή, μειωμένη περιφερειακή ροή αίματος και μυϊκή σύσπαση. Η βαρύτητα των συμπτωμάτων εξαρτάται από το ποσοστό της έλλειψης των GPI εξαρτώμενων πρωτεϊνών, ως εκ επακόλουθο της ενεργοποίησης του συμπληρώματος.

Κλινικές εκδηλώσεις PNH	Συχνότητα εμφάνισης (%)
Θρόμβωση	40
Δύσπνοια	66
Πνευμονική υπέρταση	47
Χρόνια νεφρική νόσος	64
Κοιλιακό άλγος	57
Αναιμία	88
Κακουχία, μειωμένη ποιότητα ζωής	96
Αιμοσφαιρινουρία	26
Δυσφαγία	41
Στυτική δυσλειτουργία	47

*Πίνακας 2. Κλινικές εκδηλώσεις στην PNH (Schubert & Roth 2015).*

Γίνεται ιδιαίτερα αντιληπτή από την αιμοσφαιρινουρία που παρατηρείται συνήθως στα πρώτα πρωινά ούρα, τα οποία και έχουν σκούρα καφέ απόχρωση (Εικόνα 21). Οι ασθενείς παραπονούνται για κακουχία, αδυναμία, καρδιοαναπνευστικές διαταραχές, και μεγάλη κόπωση, ο βαθμός της οποίας εξαρτάται από τη σοβαρότητα της αναιμίας και κατά συνέπεια της αιμόλυσης. Παρατεταμένο χρονικό διάστημα αιμόλυσης με σκοτεινόχροα ούρα ενέχει τον κίνδυνο εμφάνισης οξείας νεφρικής ανεπάρκειας.

Η διερεύνηση της αιμόλυσης επιτυγχάνεται με έλεγχο των επιπέδων του ενζύμου της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) στον ορό, η οποία απελευθερώνεται σε περιπτώσεις καταστροφής του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού. Το συγκεκριμένο ένζυμο καταγράφεται σε υψηλά επίπεδα σε ασθενείς με PNH και μπορεί να εμφανιστεί έως και 20 φορές πιο αυξημένο, σε περίπτωση εκδήλωσης παροξυντικών επεισοδίων (Hill et al. 2005).



**Εικόνα 21.** Αποχρώσεις ούρων ασθενούς με PNH κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η σκοτεινόχρη απόχρωση διαπιστώνεται κατά τις πρωινές ώρες (Μελέτης 2009).

Το νιτρικό οξύ (ή μονοξείδιο του αζώτου, NO) αποτελεί τον σημαντικότερο ρυθμιστή της αγγειακής φυσιολογίας, με την πλειοψηφία των κλινικών εκδηλώσεων της PNH να αποδίδονται σε εξάντληση των επιπέδων του κυτταρικού αυτού ρυθμιστή. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η συνθάση του νιτρικού οξέος του ενδοθηλίου χρησιμοποιεί οξυγόνο και αργινίνη για να συνθέσει νιτρικό οξύ. Το τελευταίο δρα στο αγγειακό τοίχωμα για να διατηρήσει τον αγγειακό τόνο και να περιορίσει το βαθμό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη εκδηλώνει αυξημένου βαθμού χημική σύνδεση με το NO. Η εκτεταμένη ενδαγγειακή αιμόλυση που εκδηλώνεται έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και ερυθροκυτταρικής αργινάσης του πλάσματος, οι οποίες εξαντλούν τα διαθέσιμα αποθέματα σε NO και αργινίνη (Rother *et al.* 2005). Η εξάντληση των επιπέδων του NO στους ιστούς εκδηλώνεται με τη μορφή γενικής κακουχίας, κοιλιακού πόνου, σπασμών του οισοφάγου, δυσφαγία, στυτική δυσλειτουργία και θρόμβωση. Οι προαναφερθείσες κλινικές εκδηλώσεις επισυμβαίνουν συχνότερα σε ασθενείς με μεγάλους πληθυσμούς PNH κλώνων (Parker *et al.* 2005).

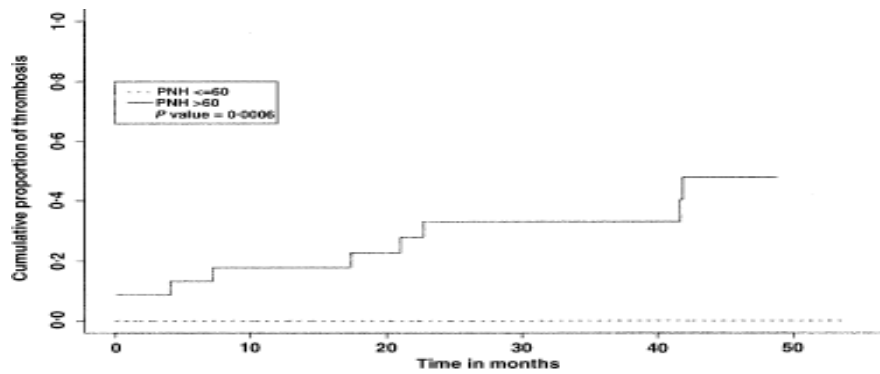
Η αναιμία αποτελεί το κλινικό εύρημα που καταγράφεται σχεδόν σε όλους τους ασθενείς με PNH, κατά την στιγμή της αρχικής διάγνωσης. Ως αποτέλεσμα της χρόνιας απώλειας σιδήρου λόγω ενδαγγειακής αιμόλυσης, συχνά η αρχική διάγνωση της PNH μπορεί εσφαλμένα να αποδοθεί σε κλινική εικόνα δηλωτική έλλειψης σιδήρου, με την τελευταία να επισκιάζει ουσιαστικά το κλασικό αιμολυτικό προφίλ της νόσου. Θα πρέπει να αναφερθεί πως συμπτώματα όπως η κακουχία και η δύσπνοια, τα οποία αναφέρονται εντόνως από ασθενείς με PNH, δεν συσχετίζονται πάντα με τα εκάστοτε επίπεδα αναιμίας.

### 1.9.2 Θρομβωτικές επιπλοκές

Οι *Hill et al. (2013)* αναφέρουν ότι σε περίπτωση ανεξήγητης θρόμβωσης, συνιστάται έλεγχος του ασθενούς για PNH, ιδιαίτερα εάν συνοδεύεται με ένα από τα παρακάτω κριτήρια: α) νεαρή ηλικία (κάτω των 50 ετών), β) θρόμβωση σε ασυνήθη θέση (ενδοκοιλιακές φλέβες, εγκεφαλικές φλέβες, δερματικές φλέβες, κ.ά.), γ) ενδείξεις αιμόλυσης και δ) συνοδό κυτταροπενία. Πράγματι η εκδήλωση θρομβωτικών επιπλοκών στην PNH είναι συνήθης και επισυμβαίνει σε ένα μεγάλο μέρος των ασθενών, με περισσότερο αυξημένη συχνότητα σε πληθυσμούς Λατινικής και Αφροαμερικανικής προέλευσης έναντι της αντίστοιχης Ασιατικής (*Araten et al. 2005*). Εκτιμάται ότι περίπου το 40% των ασθενών θα εκδηλώσουν κάποιας μορφής θρομβωτικό επεισόδιο κατά τη διάρκεια της ζωής τους (*Bessler & Hiken 2008*). Τα θρομβωτικά συμβάντα θεωρούνται κατά 85% φλεβικής προέλευσης (με συχνή την εμφάνιση θρόμβωσης σε ασυνήθεις θέσεις, όπως στα ηπατικά και εγκεφαλικά αγγεία, σύνδρομο Budd-Chiari, κ.ά.) και κατά 15% αρτηριακής, ενώ το 20,5% των περιπτώσεων εμφανίζεται με επεισόδια πολλαπλής εντόπισης. Από πολλές μελέτες έχει υποστηριχθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του κλώνου τόσο αυξάνεται και ο κίνδυνος εκδήλωσης θρομβοεμβολικού επεισοδίου (Εικόνα 22) (*Hall et al. 2003; Nishimura et al. 2004; Moyo et al. 2004; Ziakas et al. 2007; Hill et al. 2013; Devalet et al. 2015; Peacock-Young et al. 2018*).

Ένα σημαντικό κλινικό εύρημα που καταγράφεται σχεδόν στο 40% ασθενών με PNH είναι η εκδήλωση θρομβοεμβολικών επεισοδίων κατά την στιγμή της αρχικής διάγνωσης. Οι θρομβώσεις μπορούν να επισυμβούν τόσο σε συνήθεις όσο και σε ασυνήθεις φλεβικές και αρτηριακές εστίες (*Hill et al. 2013; Araten et al. 2005*). Ειδικότερα, επεισόδια που λαμβάνουν χώρα σε ασυνήθεις θέσεις όπως οι ηπατικές ή εγκεφαλικές φλέβες, καθώς και αυτές των στεφανιαίων αρτηριών, συνήθως συσχετίζονται με περιστατικά που χρήζουν επείγουσας θεραπευτικής αντιμετώπισης. Ακόμα όμως και αυτά τα περιστατικά δεν συνεπάγεται πάντα πως θα συνδυασθούν με έγκαιρη διάγνωση (*Araten et al. 2005; Hill et al. 2013; Devalet et al. 2015*).





**Εικόνα 22.** Συσχέτιση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων με το μέγεθος του PNH κλώνου σε συνάρτηση με τον χρόνο (Moyo 2004).

### 1.9.3 Ανεπάρκεια μυελού των οστών

Η PNH έχει καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία συνδυαστικά με υποπλαστική ή απλαστική αναιμία, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, μυελοϋπερπλαστικές διαταραχές και οξεία λευχαιμία (Rotoli & Luzatto 1989). Έχουν επίσης καταγραφεί και περιστατικά ολικής εκτροπής σε MDS ή οξεία λευχαιμία (Graham & Gastineau 1992; Cowall et al. 1979; Zittoun et al. 1975; Carmel et al. 1970).

Ο συσχετισμός μεταξύ PNH και απλαστικής αναιμίας αρχικά βεβαιώθηκε από τους Dacie και Lewis (Dacie & Lewis 1961; Lewis & Dacie 1967) και είναι πλέον σαφές πως οι περισσότεροι ασθενείς εκδηλώνουν κάποιας μορφής ανεπάρκεια του μυελού των οστών. Η μελέτη της νόσου έχει καταγράψει και εντοπίσει PNH κλώνους σε ασθενείς με απλαστική αναιμία σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 23-38% (De Latour et al. 2008B; Nishimura et al. 2004). Η AA θεωρείται ως παράδειγμα ανοσοδιαταραχής και περιλαμβάνει ενεργή καταστροφή αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων από αυτοαντιδρώντα T-λεμφοκύτταρα (Young et al. 2008). Πειραματικά ευρήματα δηλώνουν πως κύτταρα με ανεπάρκεια παραγωγής GPI εξαρτώμενων πρωτεϊνών εκφράζουν ευαισθησία σε πιθανές κυτταρικές επιθέσεις από NK (Natural Killers) κύτταρα και T-λεμφοκύτταρα (Meletis & Terpos 2003). Σε μία παλαιότερη γαλλική μελέτη, στο 65% των μελετηθέντων Γάλλων ασθενών με PNH, βρέθηκε θρομβοκυττοπενία και ουδετεροπενία σε συνδυασμό με αναιμία, ενώ είναι σημαντικό ότι ένα ποσοστό της τάξεως του 15-20% εκδήλωσε και πανκυτταροπενία σε χρονικό ορίζοντα οκταετίας (Socie et al. 1996).

Η εκδήλωση μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου και οξείας λευχαιμίας αποτελούν επίσης πρόσθετες επιπλοκές που συχνά καταγράφονται σε ασθενείς με PNH. Η συχνότητα εκδήλωσης λευχαιμίας κυμαίνεται μεταξύ 1-3% (Socie et al. 1996),

ωστόσο έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις της τάξεως του 7,5% στη διεθνή βιβλιογραφία (Fujioka & Asai 1989). Από την άλλη πλευρά, η συχνότητα εκδήλωσης MDS εκτιμάται στα όρια του 5%, ωστόσο η εφαρμογή κυτταρομέτρων υψηλού βαθμού ακρίβειας έχει πλέον δείξει πως εντοπίζονται PNH κλώνοι σε ποσοστά έως και 20% των ασθενών με MDS μειωμένου κινδύνου (Wang et al. 2009).

Εκδηλώσεις ανεπάρκειας του μυελού των οστών (π.χ. απλαστική αναιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο), θεωρούνται ως παθογενετικός συνδετικός κρίκος μεταξύ των διαφορετικών διαταραχών που εκδηλώνονται σε ασθενείς με PNH (Pu et al. 2011). Ως εκ τούτου, σε ασθενείς με AA επιβάλλεται ο έλεγχος για τον εντοπισμό κυττάρων με ανεπάρκεια GPI και κλωνική επέκταση, τόσο πριν όσο και μετά από την ένταξη του ασθενούς σε ανοσοκατασταλτική θεραπευτική αγωγή (Dunn et al. 1999). Ο εντοπισμός ενός κλώνου με ανεπάρκεια GPI σε ασθενή με AA κατά την στιγμή της διάγνωσης, φαίνεται να συσχετίζεται με περισσότερο ευνοϊκή απόκριση αναφορικά με την έναρξη χορήγησης ανοσοκατασταλτικής θεραπευτικής αγωγής (Kulagin et al. 2014; Maciejewski et al. 2001).

#### **1.9.4 Διαταραχή της νεφρικής λειτουργίας**

Η νεφρική δυσλειτουργία έχει μελετηθεί αρκετά στην PNH. Οι ασθενείς με PNH έχουν εξαπλάσιο κίνδυνο εκδήλωσης χρόνιας νεφρικής νόσου (XNA) σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, κάτι που μάλλον έχει υποεκτιμηθεί. Η νεφρική βλάβη στην PNH ποικίλλει από αναστρέψιμη οξεία δυσλειτουργία έως και χρόνια μη αναστρέψιμη βλάβη, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις (αρχικά τουλάχιστον) δεν είναι κλινικά εμφανής. Η XNA συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο πρόωρης θνησιμότητας, με ποσοστό συμβολής στους σχετιζόμενους θανάτους από PNH (8-18%). Η νεφρική δυσλειτουργία στην PNH είναι πολυπαραγοντική· ιδιαίτερα σημαντική είναι η εμπλοκή της εξάντλησης του NO που προκαλείται από τη δράση της ελεύθερης Hb στον πειραματικό ρυθμό διήθησης. Το NO, όπως έχει ήδη αναφερθεί, ρυθμίζει τον τόνο των αγγείων και γενικά την ομοιόσταση των ζωτικών οργάνων. Η εξάντληση του NO έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της ρύθμισης του τόνου των αγγείων. Ένα οξύ αιμολυτικό επεισόδιο συνδυαζόμενο με μαζική αιμοσφαιρινουρία μπορεί να προκαλέσει οξεία νεφρική ανεπάρκεια λόγω υποογκαιμίας και νεφρική ισχαιμίας, άμεσης τοξικότητας της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στα σωληναριακά κύτταρα, απόφραξης των νεφρικών σωληναρίων από κρυστάλλους ουρικού οξέος και πειραματικής εναπόθεσης ινώδους. Η προοδευτική χρόνια νεφρική ανεπάρκεια

αποτελεί όψιμη επιπλοκή, ύστερα από χρόνια αιμοσφαιρινουρία, και συσχετίζεται με πειραματική νέκρωση, σωληναριακή ατροφία και διάμεση νεφρίτιδα. Η συνεχής έκθεση στην αίμη (λόγω χρόνιας αιμόλυσης) οδηγεί σε εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στα εγγύς εσπειραμένα νεφρικά σωληνάκια. Επιπλέον, οι υποτροπιάζουσες μικροαγγειακές θρομβώσεις που συμβαίνουν εξαιτίας της νόσου επιφέρουν νέκρωση της φλοιώδους μοίρας και μείωση της κάθαρσης της κρεατινίνης, ενώ έχουν αναφερθεί και θρομβώσεις στη νεφρική αρτηρία ή φλέβα. Η νεφρική νόσος στην PNH πολλές φορές παραβλέπεται, αλλά αποτελεί την αιτία θανάτου σε σημαντικό ποσοστό των ασθενών (8-18%) (Nishimura *et al.* 2004). Η επίπτωση της νεφρικής ανεπάρκειας υπολογίζεται ~7 φορές συχνότερη στους PNH ασθενείς σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό (Nishimura *et al.* 2004; Hillmen *et al.* 2007 & 2010; Rachidi *et al.* 2010).

### **1.9.5 Λοιμώξεις στην PNH**

Οι λοιμώξεις αποτελούν μία από τις κύριες επιπλοκές της PNH, που επηρεάζει σημαντικά την πρόγνωση των ασθενών. Η παρουσία ακόμα και κοινών λοιμώξεων μπορεί να προκαλέσει επίταση ή έκλυση της και αρκετές φορές εμφάνιση μυελικής ανεπάρκειας τύπου απλασίας ή δυσπλασίας. Η εμφάνιση λοιμώξεων φαίνεται να συνδέεται με τις διαταραχές στα πολυμορφοπύρηνα που εμφανίζονται στην PNH, η συχνότητά τους δε είναι παρόμοια μεταξύ των κατηγοριών των ασθενών. Στο 15% των ασθενών, η εμφάνιση λοίμωξης φαίνεται ότι έχει συμβάλει στη διάγνωση της νόσου. Ένα μεγάλο ποσοστό των ασθενών (20- 40%) εμφανίζει τουλάχιστον ένα σοβαρό επεισόδιο βακτηριακής λοίμωξης κατά την εξέλιξη της νόσου· τα επεισόδια αυτά ευθύνονται περίπου για το 10% των θανάτων. Σε ασθενείς υπό θεραπεία με αναστολείς του συμπληρώματος (eculizumab, ravulizumab), εμφανίζεται αυξημένος κίνδυνος λοίμωξης από *Neisseria meningitidis*, η οποία και αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική επιπλοκή της θεραπείας και για το λόγο αυτό απαιτείται εμβολιασμός των ασθενών (De Latour *et al.* 2008B; Rachidi *et al.* 2010; Brodsky 2008 & 2021).

## 1.10 Κύηση και PNH

Τα θρομβωτικά επεισόδια που έχουν καταγραφεί στην κύηση και στη λοχεία δεν είναι πολλά, αφορούν δε θρομβώσεις σε ηπατικές φλέβες, αγγεία του ΚΝΣ, εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, πνευμονική εμβολή, θρόμβωση σε εγκεφαλικό κόλπο, και θρομβώσεις της πυλαίας και της κάτω κοίλης φλέβας. Σε λίγες περιπτώσεις τα θρομβοεμβολικά επεισόδια έχουν αποβεί θανατηφόρα, ενώ η ηπατική φλεβική θρόμβωση αποτελεί και πάλι την πιο κοινή εκδήλωση. Η κύηση σε PNH ασθενείς συνιστάται να αποφεύγεται, δεδομένου ότι υπάρχουν κίνδυνοι τόσο για το έμβρυο όσο και για τη μητέρα. Η υποστηρικτική θεραπεία με μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων και αιμοπεταλίων είναι απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις. Θρομβωτικές επιπλοκές παρουσιάζονται σε ποσοστό ~12%. Η μητρική θνησιμότητα λόγω θρομβοεμβολής στην PNH μπορεί να αυξηθεί έως και 20% και η περιγεννητική έως και 10%. Άλλες επιπλοκές αποτελούν ο αυξημένος κίνδυνος για λοιμώξεις, η αιμορραγία, ο αυξημένος κίνδυνος ενδομήτριου θανάτου και αυτόματων αποβολών, καθώς και ο πρόωρος τοκετός. Πάνω από το 45% των περιπτώσεων κύησης (στις PNH ασθενείς) καταλήγει είτε σε αυτόματη αποβολή είτε σε πρόωρο τερματισμό, ενώ μετά το δεύτερο τρίμηνο πάνω από το 50% των νεογνών θα γεννηθούν πρόωρα, με αυξημένη νεογνική θνησιμότητα. Επιτείνονται σημαντικά η αιμόλυση και η μυελική ανεπάρκεια, με αποτέλεσμα την αυξημένη ανάγκη για μεταγγίσεις ερυθρών (και αιμοπεταλίων) στην πλειονότητα των κυήσεων. Ιδιαίτερα αυξημένες είναι και οι ανάγκες σε φυλλικό οξύ και σίδηρο (*Ray et al. 2000; Fieni et al. 2006*). Σε ασθενείς με AA η επιτυχής έκβαση φτάνει έως και το 50%, ο κίνδυνος βέβαια φαίνεται να αυξάνει για ασθενείς με χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων. Οι επιπλοκές που εμφανίζονται στην κύηση στις ασθενείς με PNH υποδηλώνουν τη χρησιμότητα της προφυλακτικής αντιπηκτικής αγωγής τόσο κατά τη διάρκεια της κύησης όσο και κατά τη λοχεία (*Ziakas et al. 2008*).

Η διαχείριση της κύησης στην PNH αποτελεί πρόκληση δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, ειδικά μετά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα. Ωστόσο η αντιμετώπιση με αναστολείς του συμπληρώματος καθιστά την κύηση λιγότερο επικίνδυνη για τις συγκεκριμένες ασθενείς. Το eculizumab είναι επί του παρόντος το φάρμακο εκλογής για εγκύους ασθενείς με PNH, αφού δεν διαπερνά τον πλακούντα και δεν απεκκρίνεται στο μητρικό γάλα. Το *International PNH Registry* ανέφερε δεδομένα από 75 εγκυμοσύνες

σε 61 γυναίκες με PNH υπό eculizumab. Δεν υπήρξαν μητρικοί θάνατοι, ενώ καταγράφηκαν μόνο και 3 θάνατοι εμβρύων (4%). Συνολικά 25 μωρά θήλασαν κανονικά και σε 10 περιπτώσεις το μητρικό γάλα εξετάστηκε για την παρουσία του φαρμάκου, χωρίς τελικά αυτό να ανιχνευθεί. Δεδομένων των δομικών ομοιοτήτων με το eculizumab, το ravulizumab είναι επίσης πιθανά ασφαλές στην κύηση, υπάρχει όμως μικρή κλινική εμπειρία (*Brodsky 2021*).

## 1.11 PNH στην παιδική/εφηβική ηλικία

Η κλινική εικόνα των παιδιατρικών ασθενών διαφέρει από αυτήν των ενηλίκων, δεδομένου ότι η αιμοσφαιρινουρία εμφανίζεται μόνο στο 15% (ή και λιγότερο) των περιπτώσεων. Στους παιδιατρικούς ασθενείς με PNH συνιστάται έλεγχος για τη νόσο, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που συνοδεύονται από ανεξήγητο θρομβωτικό επεισόδιο και επεισόδια αιμόλυσης με άμεση Coombs αρνητική.

Θρομβώσεις σε ασυνήθεις θέσεις δεν εμφανίζονται τόσο συχνά σε αυτή την κοόρτη των ασθενών, συγκριτικά με τους ενήλικες ασθενείς. Ωστόσο δεν έχουν διερευνηθεί όλα τα θρομβωτικά επεισόδια σε παιδιατρικούς ασθενείς. Η μεταμόσχευση μυελού των οστών θεωρείται η θεραπεία εκλογής (*Parker 2009; Curran et al. 2012; Brodsky 2021*).

Η σύγκριση των δημογραφικών στοιχείων και των κλινικών χαρακτηριστικών παιδιατρικών ασθενών και ενηλίκων από το *International PNH Registry* έδειξε ότι συγκριτικά με τους ενήλικες PNH ασθενείς, τα παιδιά εμφανίζουν μικρότερους κλώνους και υψηλή συχνότητα κυτταροπενίας ή υποκείμενης μυελικής ανεπάρκειας (>50%). Η αιμόλυση ωστόσο ήταν παρούσα σε παρόμοιες αναλογίες, ενώ τα θρομβοεμβολικά επεισόδια (αν και δεν έλειπαν από τον παιδιατρικό πληθυσμό) ήταν περισσότερα στους ενήλικες (*Urbano-Ispizua et al. 2017*)<sup>3</sup>.

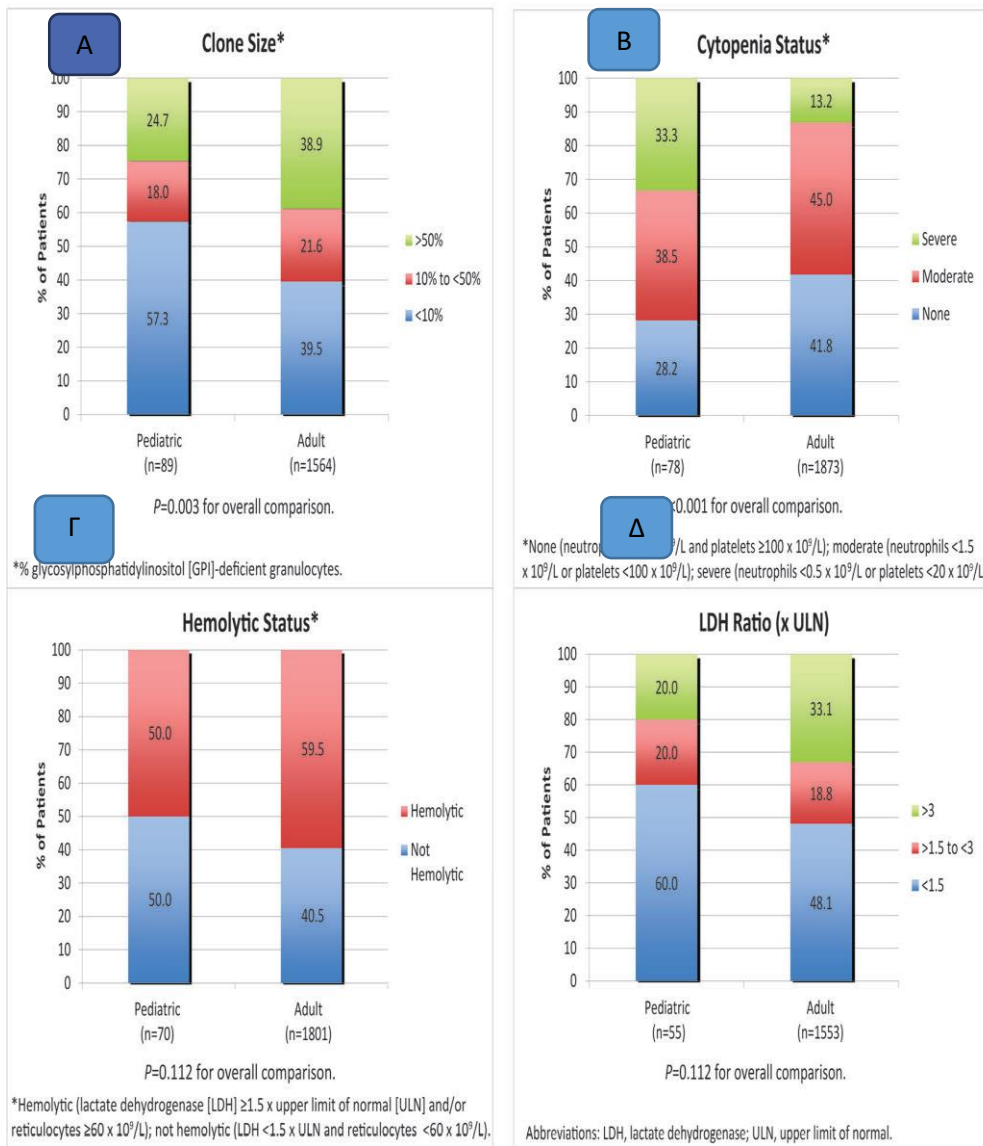
Τα παιδιά είχαν μικρότερο μέσο χρόνο εκδήλωσης κατά περίπου 16,8 μήνες σε σύγκριση με τους ενήλικες. Οι περισσότεροι ασθενείς και στις δύο ηλικιακές ομάδες

---

<sup>3</sup>Αυτή η αναδρομική ανάλυση περιελάμβανε ασθενείς που είχαν εγγραφεί πριν από τον Ιούνιο του 2015. Επειδή ο στόχος αυτής της ανάλυσης ήταν να μελετήσει την εμφάνιση της PNH, οι ασθενείς που λάμβαναν θεραπεία με eculizumab κατά τη στιγμή της εγγραφής αποκλείστηκαν. Τα παιδιά ήταν <18 ετών κατά την έναρξη και την περίοδο εγγραφής στη μελέτη, ενώ οι ενήλικες ήταν ηλικίας ≥18 ετών κατά την έναρξη και την εγγραφή. Ασθενείς που ήταν <18 ετών στην έναρξη της νόσου αλλά άνω των 18 ετών κατά την εγγραφή αποκλείστηκαν (*Urbano-Ispizua et al. 2017*).

ήταν Λευκοί/Καυκάσιοι, ωστόσο σε ασθενείς με ασιατική καταγωγή εμφανίστηκε μικρότερο ποσοστό περιστατικών στον παιδιατρικό πληθυσμό από ό,τι στους ενήλικες (7,1% vs 17,7%,  $P=0,017$ ). Το ποσοστό των πολυμορφοπύρηνων με έλλειψη GPI διέφερε μεταξύ των δύο πληθυσμών, με τα περισσότερα παιδιά να έχουν μικρότερους PNH κλώνους (κατά την είσοδο στη μελέτη) σε σύγκριση με τους ενήλικες (PNH κλώνος 50%: 24,7% vs 38,9%, αντίστοιχα:  $P=0,003$ ) (Εικόνα 23Α). Τα περισσότερα παιδιά εμφανίστηκαν με σοβαρότερη κυτταροπενία κατά την εγγραφή τους σε σύγκριση με τους ενήλικες (33,3% vs 13,2%,  $P<0,001$ ) (Εικόνα 23Β). Τα ποσοστά επεισοδίων αιμόλυσης ήταν παρόμοια κατά την εγγραφή (50,0% vs 59,5%,  $P=0,112$ ) (Εικόνα 23Γ), αν και τα επίπεδα LDH και ο αριθμός των δικτυοερυθροκυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερα στους ενήλικες (Εικόνα 23Γ/Δ).

Ιστορικό ΑΑ κατά ή πριν από την είσοδο στη μελέτη εμφανιζόταν συχνότερα στα παιδιά παρά στους ενήλικες (77,8% vs 54,4%,  $P<0,001$ ). Αντίθετα, ιστορικό MDS ήταν συχνότερο στους ενήλικες παρά στα παιδιά (10,2% vs 2,0%,  $P=0,007$ ). Το ιστορικό των θρομβοεμβολών ήταν λιγότερο συχνό στα παιδιά από ότι στους ενήλικες (2,0% vs 8,6%,  $P=0,020$ ). Δεν υπήρχαν διαφορές στη συχνότητα της διαταραχής της νεφρικής λειτουργίας ή της διαγνωσμένης πνευμονικής υπέρτασης μεταξύ των δύο πληθυσμών (*Urbano-Ispizua et al. 2017*).



**Εικόνα 23.** Κατανομή χαρακτηριστικών σε παιδιατρικούς και ενήλικες ασθενείς με PNH, από το International PNH Registry. **A)** Μέγεθος κλώνου, **B)** κυτταροπενία, **Γ)** αιμολυτικό status, **Δ)** επίπεδα LDH (Urbano-Ispizua 2017).





## 1.12 Διαγνωστική προσέγγιση

### 1.12.1 Κλινικές ενδείξεις δηλωτικές ελέγχου για PNH

Η εκδήλωση ενός PNH κλώνου μπορεί να συνοδεύεται από ένα εύρος διαφορετικών κλινικών ευρημάτων και συνοδών συμπτωμάτων (*Schrezenmeier et al. 2014*). Ωστόσο, θα πρέπει να αναφερθεί πως μόνο συγκεκριμένες ομάδες υψηλού κινδύνου χρήζουν περαιτέρω ελέγχου για PNH, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3 που ακολουθεί.

Η πρώτη ομάδα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνει ασθενείς με μη αιτιολογημένη αιμόλυση (*Borowitz et al. 2010; Parker et al. 2005*). Ασθενείς με αρνητική άμηση Coombs και έλλειψη ερυθροκυτταρικών ανωμαλιών σε επίχρισμα αίματος, καθώς και ασθενείς με μη αιτιολογημένη αιμοσφαιρινουρία εντάσσονται στο προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C. Καθώς χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση μπορεί να οδηγήσει σε αντίστοιχη νεφρική νόσο, ευρήματα δηλωτικά νεφρικής ανεπάρκειας και μη αιτιολογημένης αιμόλυσης αποτελούν ενδείξεις για έλεγχο για PNH (*Hillmen et al. 2010; Hussain et al. 2013; Schrezenmeier et al. 2014; Devos et al. 2018*). Θα πρέπει να αναφερθεί πως δεν είναι πάντα εφικτός ο εντοπισμός αιμόλυσης, ιδίως σε περιπτώσεις υποκλινικής PNH.

Ασθενείς με αιμόλυση χωρίς προφανή αιτία	Ασθενείς με ανεπάρκεια μυελού των οστών	Ασθενείς με ανεξήγητα θρομβοεμβολικά επεισόδια
Αιμολυτική αναιμία με Coombs αρνητική	Ασθενείς με AA	Και ένδειξη αιμόλυσης χωρίς προφανή αιτία
Αιμοσφαιρινουρία/ αιμοσιδηρινουρία	Ασθενείς με MDS κάθε τύπου με ενδείξεις αιμόλυσης	Φλεβική και/ή αρτηριακή θρόμβωση <b>α)</b> σε ασυνήθεις θέσεις (πχ. ενδοκοιλιακές, εγκεφαλικές ή δερματικές φλέβες) <b>β)</b> και κυτταροπενία <b>γ)</b> και μη ανταπόκριση στην αντιπηκτική αγωγή <b>δ)</b> θρόμβωση σε νεαρή ηλικία
Κυτταροπενία λόγω ανεπάρκειας μυελού των οστών	MDS με <b>α)</b> υποπλαστικό μυελό <b>β)</b> ανθεκτική κυτταροπενία	
Αιμόλυση με ενδείξεις νεφρικής δυσλειτουργίας	Ασθενείς με ανεξήγητη κυτταροπενία	

Πίνακας 3. Ομάδες υψηλού κινδύνου που χρήζουν ελέγχου για PNH (*Devos 2018*).

Η δεύτερη ομάδα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνει ασθενείς με ευρήματα δυσλειτουργίας του μυελού των οστών, συμπεριλαμβανομένων των AA και MDS (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου A-B) (Parker et al. 2005). Η ύπαρξη κυτταροπενίας, απόρροια της ανεπάρκειας του μυελού των οστών, καταγράφεται ως υποκλινική PNH. Παρομοίως, ασθενείς με κυτταροπενία και μη αιτιολογημένη αιμολυτική αναιμία, θρόμβωση ή ανεπάρκεια σιδήρου, χρήζουν πρόσθετου ελέγχου για PNH (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C).

Η τρίτη και τελευταία ομάδα υψηλού κινδύνου περιλαμβάνει ασθενείς με μη αιτιολογημένη ή ασυνήθη θρόμβωση, πιθανώς συνδυαστικά με ευρήματα δηλωτικά ενδαγγειακής αιμόλυσης ή κυτταροπενίας (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C) (Parker et al. 2005; Hill et al. 2013; Schrezenmeier et al. 2014). Η παρουσία θρομβοεμβολικών επεισοδίων ως αρχικό γεγονός της νόσου καταγράφεται μόλις στο 5% επί του συνόλου και επομένως δεν προτείνεται ο προληπτικός έλεγχος όλων των ασθενών με θρόμβωση. Ωστόσο, χρήζουν αξιολόγησης περιστατικά ασθενών με θρόμβωση αδιευκρίνιστου αιτιολογίας και σε ασυνήθη μέρη εντόπισης, όπως επίσης και περιστατικά που σχετίζονται με κυτταροπενία και/ή αιμόλυση (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C) (Ziakas et al. 2007; Schrezenmeier et al. 2014). Ασθενείς που αναπτύσσουν θρόμβωση υπό αντιπηκτική αγωγή, θα πρέπει επίσης να ελέγχονται για PNH (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C) (Hillmen et al. 2010).

Ένα συχνό ερώτημα είναι εάν τα φυσιολογικά επίπεδα της LDH θα μπορούσαν να αποκλείσουν την πιθανότητα PNH. Υπάρχουν κάποιες σπάνιες περιπτώσεις στις οποίες τα επίπεδα της LDH μπορεί να μην εμφανίζονται αυξημένα, όπως στις περιπτώσεις ασθενών με κυρίαρχο τον τύπο-II στα GPI ανεπαρκή κύτταρα στους οποίους η αιμόλυση μπορεί να μην είναι εμφανής, σε ασθενείς εξαρτώμενους από μεταγγίσεις αίματος και σε κάποιες από τις περιπτώσεις που έχει ήδη εμφανιστεί θρόμβωση σε ασθενή με μικρό ποσοστό PNH κυττάρων. Αν και η PNH αναλογεί ως αίτιο μόλις στο 1-2% των περιστατικών με μη αιτιολογημένη θρόμβωση, είναι σημαντικό να εντοπίζεται, καθότι αποτελεί σύνηθες αίτιο θνησιμότητας στη συγκεκριμένη ομάδα ασθενών (Keage 2011; Hill et al. 2013; Lee et al. 2013; Schrezenmeier et al. 2014).

## 1.12.2 Παλαιότερες διαγνωστικές μέθοδοι

### 1.12.2.1 Δοκιμασία Ham ή δοκιμασία του οξινισθέντος ορού

Οι αρχικά εφαρμοσθείσες διαγνωστικές δοκιμασίες περιλάμβαναν αξιολόγηση της αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων, σε συνθήκες που φυσιολογικά δεν αναμένεται να εκδηλωθεί αιμόλυση. Η δοκιμασία κατά Ham (*Ham's test*) αποτελεί μία εύκολη δοκιμασία, η οποία αξιολογεί την αιμόλυση των ερυθροκυττάρων σε συνθήκες ελαφρώς όξινης (pH:6,5) (*Ham & Dingle 1939*). Τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ασθενούς επωάζονται στους 37°C x 30 min με ορό συμβατού φυσιολογικού δότη σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον και εκτιμάται η επισυμβαίνουσα αιμόλυση. Η οξεοποίηση του πλάσματος ενεργοποιεί το συμπλήρωμα, με αποτέλεσμα την αιμόλυση των ευαίσθητων κυττάρων. Η αιμόλυση καταργείται όταν ο ορός υποβληθεί σε επεξεργασία με αμμωνία ή θερμανθεί στους 56°C x 30 min, διαδικασίες που καταστρέφουν τα συστατικά του συμπληρώματος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το συμπλήρωμα είναι σημαντικό για την επίτευξη λύσης (*Rosse & Dacie 1966*). Η βαρύτητα της αιμόλυσης αντικατοπτρίζει την αναλογία των 'παθολογικών' ερυθρών αιμοσφαιρίων. Εν αντιθέσει με τα υψηλά επίπεδα ειδικότητας (100%), η ευαισθησία στη μέθοδο αυτή καταγράφεται χαμηλή και ως εκ τούτου δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την ανίχνευση των PNH κλώνων.

### 1.12.2.2 Δοκιμασία λύσης με σακχαρόζη

Μία άλλη εναλλακτική δοκιμασία περιλαμβάνει τη δοκιμασία λύσης με σακχαρόζη, σύμφωνα με την οποία ερυθρά του ασθενούς και μικρή ποσότητα φυσιολογικού ορού επωάζονται σε διάλυμα σακχαρόζης χαμηλής ιοντικής ισχύος, με αποτέλεσμα να συμβαίνει καθήλωση του συμπληρώματος στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και αιμόλυση των ευαίσθητων ερυθροκυττάρων εξαιτίας της ενεργοποίησης της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (*Hartmann & Jenkins 1966*). Η δοκιμασία έχει διαγνωστική αξία μόνο όταν η αιμόλυση είναι >5%. Πρόκειται για απλή και ευαίσθητη δοκιμασία, τα επίπεδα ευαισθησίας της οποίας είναι ελαφρώς καλύτερα έναντι της δοκιμασίας κατά Ham, ωστόσο τα επίπεδα ειδικότητας υπολείπονται της δοκιμασίας κατά Ham. Αρνητικό αποτέλεσμα αποκλείει την διάγνωση PNH, εκτός αν πρόκειται για πρόσφατα μεταγγισμένο ασθενή ή έχει χρησιμοποιηθεί ηπαρίνη ή EDTA σαν αντιπηκτικό στο δείγμα του ασθενούς (*Jenkins 1972*). Ωστόσο, η δοκιμασία μπορεί να είναι θετική και σε άλλες καταστάσεις όπως η

μεγαλοβλαστική αναιμία και η αυτοάνοση αιμολυτική αναιμία (*Madkaikar et al. 2009*). Κοινός τόπος στις δύο προαναφερθείσες δοκιμασίες είναι η εύρεση ψευδώς αρνητικών ευρημάτων σε ασθενείς με κλώνους μικρού μεγέθους που έχουν πρόσφατα υποστεί αιμόλυση ή μετά από μετάγγιση (*Brodsky 2008A*).

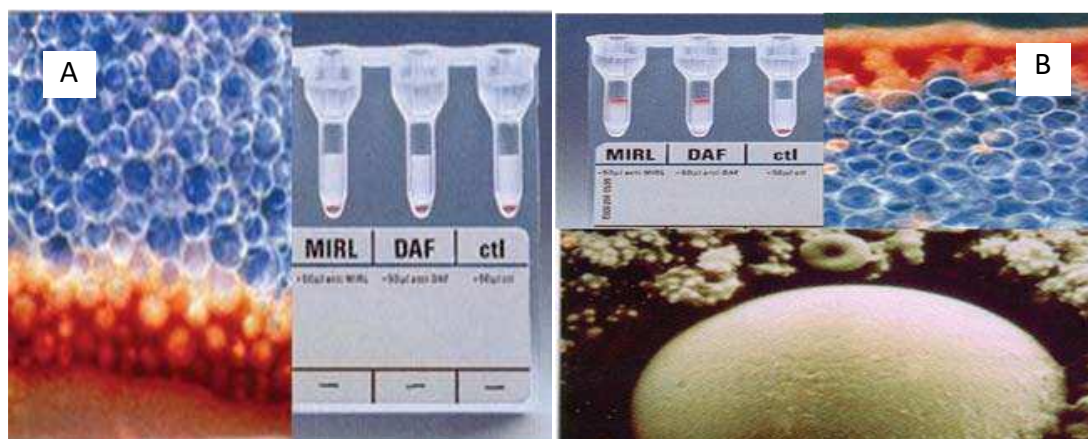
#### **1.12.2.3 Δοκιμασία ευαισθησίας λύσης συμπληρώματος**

Η δοκιμασία ευαισθησίας λύσης συμπληρώματος χρησιμοποιεί ένα συγκεκριμένο αριθμό ερυθροκυττάρων και συγκεκριμένες συγκεντρώσεις συμπληρώματος. Σε κάθε συγκέντρωση μετράται ο βαθμός αιμόλυσης. Έχει παρατηρηθεί ότι τα PNH κύτταρα αιμολύονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συμπληρώματος απ' ό,τι τα φυσιολογικά. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης ποσοτικοποίησης της ευαισθητοποίησης μέσω του συμπληρώματος, που αντιστοιχεί στο 50% της λύσης των ερυθροκυττάρων (*Rosse & Dacie 1966*). Η αξιοποίηση της συγκεκριμένης δοκιμασίας έχει επιτρέψει τον εντοπισμό δύο διαφορετικών πληθυσμών κλώνων σε ασθενείς με PNH. Ο πρώτος πληθυσμός είναι ο PNH type-III κλώνος (αυξημένος βαθμός λύσης του συμπληρώματος) και ο έτερος ο PNH type-II (dim) κλώνος, με ελαφρά αυξημένο βαθμό ευαισθησίας έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Αν και η συγκεκριμένη δοκιμασία είχε κριθεί ως άκρως υποσχόμενη, εντούτοις υπάρχουν αυξημένες τεχνικές δυσκολίες, καθότι είναι δύσκολο να τυποποιηθεί και ενδέχεται να μην μπορεί να ανιχνεύσει κάποιους μικρούς πληθυσμούς μη φυσιολογικών κυττάρων, ως εκ τούτου δεν ενδείκνυται σαν διαγνωστικό test ρουτίνας (*Madkaikar et al. 2009; Borowitz et al. 2010*).

#### **1.12.2.4 Έλεγχος σε μικροσωληνάρια γέλης sephacryl**

Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος. Διενεργείται σε κάρτες (ID microtyping cards) που περιέχουν γέλη sephacryl με anti-mouse αντίσωμα εντός του gel. Τα παθολογικά κύτταρα με έλλειψη επιτόπων CD55 και CD59 δεν συγκολλούνται και σχηματίζουν στιβάδα (*pellet*) στο κάτω μέρος του μικροσωληναρίου, ενώ τα κύτταρα που εκφράζουν τα CD55 και CD59 συγκεντρώνονται στο πάνω μέρος του gel (Εικόνα 24). Οι διπλοί πληθυσμοί υποδηλώνουν την ύπαρξη κάποιου ποσοστού κυττάρων με έλλειψη των ανωτέρω πρωτεϊνών. Το βασικό πλεονέκτημα είναι η ευαισθησία της μεθόδου (δεν έχουν αναφερθεί συχνά ψευδώς θετικά αποτελέσματα) που κυμαίνεται μεταξύ 2% και 10%, και είναι συγκρίσιμη με τη δοκιμασία που βασίζεται στη λύση του συμπληρώματος.

Είναι απλό και φθινό τεστ και εύκολο στην ερμηνεία του. Τα βασικά μειονεκτήματά του είναι ότι δεν είναι ποσοτικό, δεν είναι ευαίσθητο στην ανίχνευση μικρότερων κλώνων και δεν μπορεί επίσης να ανιχνεύσει πολυμορφοπύρηννα και μονοκύτταρα με έλλειψη GPI σε PNH ασθενείς. Επιπλέον, δεν είναι δυνατή η ανίχνευση PNH κυττάρων σε ασθενείς με πρόσφατη μετάγγιση αίματος ούτε και κατά τη διάρκεια αιμολυτικών επεισοδίων (Μελέτης και συν. 2009; Madkaikar et al. 2009).



**Εικόνα 24.** Δοκιμασία ανίχνευσης PNH σε γέλη spheracryl. **A)** Τα ερυθρά αιμοσφαίρια που εμφανίζουν απουσία των αντιγόνων CD55 και CD59 δεν παρουσιάζουν συγκόλληση με τα σωματίδια της γέλης και καθιζάνουν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων. **B)** Οι φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί που φέρουν στην επιφάνειά τους τα CD55 και CD59 συνδέονται με τα σωματίδια της γέλης και παραμένουν στην κορυφή των μικροσωληναρίων (Μελέτης 2009).

### 1.12.3 Κυτταρομετρία ροής

Αποτελεί τη μέθοδο αναφοράς (*gold standard*) για την διάγνωση της νόσου, καθόσον μπορεί να ανιχνεύσει με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα την έλλειψη πρωτεϊνών που συνδέονται με την GPI και είναι και εύκολο να εκτελεστεί. Αναφέρεται εκτενώς στο Κεφάλαιο 3.

### 1.12.4 Έλεγχος μεταλλάξεων PIG-A

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ανεπάρκεια των πρωτεϊνών GPI στους ασθενείς με PNH οφείλεται σε κάποια επίκτητη σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A. Η εργαστηριακή διάγνωση της PNH είναι γνωστό ότι κατά κανόνα γίνεται με την βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής. Ο μοριακός έλεγχος διενεργείται μόνο για την αναζήτηση και την επιβεβαίωση των σχετικών μεταλλάξεων, ενώ λόγω των τεχνικών δυσκολιών ο έλεγχος διενεργείται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς (Μελέτης και συν. 2009).

### 1.13 Πρόγνωση

Η εξέλιξη της νόσου εξαρτάται από τη συχνότητα των επεισοδίων οξείας αιμόλυσης, τη βαρύτητα της αναιμίας που τα συνοδεύει, το βαθμό της μυελικής ανεπάρκειας και την εμφάνιση και βαρύτητα των θρομβωτικών επεισοδίων (*Μελέτης και συν. 2009*).

Τα συνήθη αίτια θανάτου ασθενών με PNH περιλαμβάνουν θρόμβωση, λοίμωξη και κακοήθεις νόσους, καθώς και τη πιθανότητα εκδήλωσης αιμορραγίας σε ασθενείς με θρομβοπενία. Παλαιότερα (πριν την ανακάλυψη των αναστολέων του συμπληρώματος) η μέση επιβίωση είχε καταγραφεί στα 10-15 έτη, ενώ είχαν καταγραφεί και κάποιες περιπτώσεις μακροχρόνιας επιβίωσης >20 έτη. Το εκτιμώμενο προσδόκιμο επιβίωσης σε βάθος δεκαετίας είχε καταγραφεί στα επίπεδα του 66% στην Γαλλία (*Socie et al. 1996*), στο 50% στην Αγγλία (*Hillmen et al. 1995*) και στο 71% στην Ιαπωνία (*Fujioka & Asai 1989*).

Πολυπαραγοντικές αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν αναδείξει επτά ανεξάρτητους προγνωστικούς παράγοντες κινδύνου, οι οποίοι περιλαμβάνουν θρομβωτικές επιπλοκές (ανεξαρτήτου εντόπισης), πανκυτταροπενία, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή οξεία λευχαιμία, ηλικία μεγαλύτερη των 55 ετών, ανάγκη για πρόσθετη θεραπευτική αγωγή και θρομβοκυττοπενία την στιγμή της διάγνωσης (*Socie et al. 1996*). Ήπιες μορφές της νόσου συνήθως δεν απαιτούν μετάγγιση, ενώ κάποιιοι ασθενείς εμφανίζουν μακροχρόνια ύφεση διατηρώντας ωστόσο τις βιολογικές διαταραχές της νόσου (κάποιοι εξ αυτών εν καιρώ υποτροπιάζουν).

Η κλασική PNH εξελίσσεται σε πανκυτταροπενία, ενώ ένα 15-25% εξελίσσεται σε δευτεροπαθή απλαστική αναιμία. Ένα πολύ μικρό ποσοστό (<4%) καταλήγει σε οξεία λευχαιμία, αφού προηγηθεί μια φάση μυελοδυσπλασίας. Υπάρχουν και μεμονωμένα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία έχει καταγραφεί πλήρης ύφεση, χωρίς ωστόσο αυτή να έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένους παράγοντες. Στις περιπτώσεις αυτές θεωρείται ότι ο κλώνος PNH, για κάποιο λόγο χάνει το πλεονέκτημα ανάπτυξης, όπως συμβαίνει στο φυσιολογικό μυελικό περιβάλλον (*Dacie 1972*).

Η χρήση των αναστολέων του συμπληρώματος έχει αλλάξει τα δεδομένα στην αντιμετώπιση την PNH ασθενών (γίνεται εκτενέστερη αναφορά παρακάτω).

## 1.14 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Ιστορικά, από τη στιγμή που διαγνώστηκε η PNH, οι θεραπευτικές επιλογές ήταν περιορισμένες. Μέχρι πρότινος, η ενδεδειγμένη θεραπευτική αγωγή ήταν η μεταμόσχευση του μυελού των οστών. Οι πρόσθετες θεραπείες ήταν υποστηρικτικές και μη τυποποιημένες ως αποτέλεσμα της απουσίας δεδομένων από μελέτες, περιορισμένης αποτελεσματικότητας και αυξημένης τοξικότητας. Οι θεραπευτικές επιλογές περιελάμβαναν χορήγηση κορτικοστεροειδών για την διαχείριση των εξάρσεων αιμόλυσης, θεραπεία με ανδρογόνα, υποστηρικτική χορήγηση σιδήρου, ερυθροποιητίνης και μεταγγίσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων για την αντιμετώπιση της αναιμίας (*Hartmann et al. 1966; Rosse et al. 1982; Μελέτης et al. 2009; Stern et al. 2019*). Σε ασθενείς με κλώνους μεγάλου μεγέθους και λοιπών παραγόντων κινδύνου εκδήλωσης θρομβωτικών επιπλοκών θεωρείται αναγκαία η χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής. Οι PNH ασθενείς με υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια συστήνεται να λαμβάνουν αντιπηκτική αγωγή εφ' όρου ζωής ή έστω για όλο το χρονικό διάστημα που επιμένει η παρουσία PNH κλώνων >10% (*Parker et al. 2005; Hall et al. 2003*).

Ασθενείς με απλαστική αναιμία σοβαρού επιπέδου και συμπτωματολογία που προσομοιάζει περισσότερο στο συγκεκριμένο νόσημα, υποβάλλονται σε αλλογενή μεταμόσχευση βλαστοκυττάρων ως θεραπεία πρώτης γραμμής (*hematopoietic allogeneic stem cell transplant/HSCT*). Αν και η κλινική αποτελεσματικότητα της χορήγησης κορτικοστεροειδών και ανδρογόνων σε ασθενείς με απλαστική αναιμία δεν έχει επιβεβαιωθεί σε επίπεδο αποτελεσματικής αντιμετώπισης των υποκείμενων κινδύνων, ωστόσο χρησιμοποιούνταν και αυτά στην κλινική πράξη (*Parker et al. 2005*). Ως εξαιρετικά ενδιαφέροντα κρίνονται τα ευρήματα των *Hochsmann et al. (2019)*, σύμφωνα με τα οποία περιγράφεται ένα μοναδικό αλληλόμορφο με πλήρη απώλεια PIG-T. Θεωρείται ότι τα εν λόγω κύτταρα φέρουν συνδυασμό βλαστικής μετάλλαξης στο ένα αλληλόμορφο και σωματικής χρωμοσωμικής απαλοιφής στη θέση 20q στο άλλο. Ο υπότυπος PIG-T αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% επί του συνόλου των ασθενών με PNH. Σε ασθενείς με αιμολυτικά επεισόδια και μεγάλου μεγέθους κλώνους, η ενδεδειγμένη πλέον θεραπευτική αγωγή περιλαμβάνει χορήγηση eculizumab ή ravulizumab.

### 1.14.1 Μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων

Εφόσον η PNH είναι κλωνική νόσος του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου, η αλλογονιδιακή μεταμόσχευση (*hematopoietic stem cell transplantation/HSCT*) αποτελούσε μέχρι πρότινος τη μόνη θεραπευτική επιλογή, ωστόσο συσχετιζόταν με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Η απόφαση για μεταμόσχευση μυελού εξαρτάται από την κλινική ετερογένεια της νόσου, τη φυσική της ιστορία και τον συνδυασμό της με σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας (Πίνακας 4) (*Μελέτης και συν. 2009; Brodsky 2009*). Ομάδα ασθενών που υποβλήθηκε σε αλλογενή HSCT, την χρονική περίοδο 1975-1995, κατέγραψε προσδόκιμο επιβίωσης σε ορίζοντα διετίας της τάξεως του 56% (*Saso et al. 1999*). Δεν καταγράφηκαν επιπλοκές σχετιζόμενες με PNH, ενώ καταγράφηκε απόρριψη μοσχεύματος στο 6%, οξεία νόσος μοσχεύματος έναντι του ξενιστή (*graft-versus-host disease/GVHD*) σε ποσοστό μεταξύ 15-30% και αντίστοιχα χρόνια GVHD στο 20-35% (*Parker et al. 2009; De Latour et al. 2008A*). Έχουν καταγραφεί αποτελέσματα από επιτυχημένες μεταμοσχεύσεις, τόσο από συγγενικούς όσο και μη, δωρητές (*Woodard et al. 2001*). Το γεγονός πως ο ρυθμός αποθεραπείας καταγράφεται αυξημένος σε αλλογενή έναντι των συγγενικών μοσχευμάτων, αφήνει να εννοηθεί πως είναι σημαντικός ο ρόλος της GVHD, για την επιτυχή έκβαση της συγκεκριμένης θεραπευτικής προσέγγισης (*Endo et al. 1996*). Η χρήση μοσχευμάτων ενδείκνυται μόνο για περιπτώσεις ασθενών με προδιαθεσικούς παράγοντες κινδύνου εξέλιξης της PNH, με έμφαση σε περιπτώσεις συνδρόμων ανεπάρκειας μυελού των οστών και κυτταροπενιών σοβαρής μορφής.

Ο ρόλος της μεταμόσχευσης μυελού των οστών είναι ακόμη υπό συζήτηση για ασθενείς με 'κλασική PNH'. Η έκβαση ασθενών με κλασική αιμολυτική PNH που είχαν υποβληθεί σε αλλογενή μεταμόσχευση του μυελού των οστών ήταν πολύ καλή, με μακροχρόνια επιβίωση κατά 80–90%. Η HSCT παραμένει η καλύτερη επιλογή θεραπείας για την αιμολυτική PNH για ασθενείς που δεν έχουν πρόσβαση στη θεραπεία με eculizumab, κάτι που συμβαίνει σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, δεδομένου ότι η πολύ υψηλή τιμή του eculizumab αποτελεί σημαντικό περιορισμό (*Risitano et al. 2019*).

Η HSCT θεωρούνταν θεραπεία πρώτης γραμμής για παιδιά και εφήβους με PNH και απλαστική αναιμία, ωστόσο σε ασθενείς νεαρής ηλικίας έχει καταγραφεί μειωμένο προσδόκιμο επιβίωσης λόγω συχνών υποτροπών, παρ' όλο που η γενική ανταπόκριση σε ανοσοκατασταλτικές θεραπευτικές αγωγές ήταν ικανοποιητική (*Parker 2009*). Κατά τον *Brodsky (2009)* η αλλογενής HSCT θα έπρεπε να



προτείνεται μόνο σε PNH ασθενείς με απειλητικές για τη ζωή κυτταροπενίες ή σε αυτούς με εκτεταμένη αιμόλυση ή θρόμβωση, μη ελεγχόμενη από το eculizumab.

Μυελική ανεπάρκεια – σύνδρομο PNH/AA (μειωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας)
Μείζονες επιπλοκές σχετιζόμενες με τη PNH
Υποτροπιάζουσες, απειλητικές για τη ζωή θρομβοεμβολικές εκδηλώσεις
Ανθεκτική αιμολυτική αναιμία – εξάρτηση από μεταγγίσεις (συμβατικό σχήμα προετοιμασίας)
Ζητήματα της μεταμόσχευσης που σχετίζονται με την υποκείμενη νόσο
Σε ομοιογονιδιακή αλλογενή μεταμόσχευση, συμβατικό σχήμα προετοιμασίας
Δεν υπάρχουν ειδικές για τη PNH ανεπιθύμητες ενέργειες μετά από τη μεταμόσχευση
Συχνότητα σοβαρής οξείας GvHD ~35–40%
Συχνότητα χρόνιας GvHD ~35%
Συνολική διάμεση επιβίωση σε μεταμόσχευση από HLA-συμβατό συγγενή δότη 50–60%

**Πίνακας 4.** Ενδείξεις και δεδομένα αλλογενούς μεταμόσχευσης σε ασθενείς με PNH (AA: Απλαστική αναιμία, GvHD: Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή) (Μελέτης 2009).

#### 1.14.2 Μεταγγίσεις ερυθρών, χορήγηση σιδήρου και ερυθροποιητίνης

Οι απαιτήσεις για μετάγγιση ποικίλουν κατά περίπτωση, ανάλογα με την κλινική εικόνα του ασθενούς και τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης (μη ανεκτά επίπεδα <9 g/dl), ποικίλουν δε ακόμη και στον ίδιο ασθενή κατά την πορεία της νόσου. Χρησιμοποιούνται λευκαφαιρεμένα συμπυκνωμένα ερυθρά (λόγω του κινδύνου αλλοσοανοσοποίησης), ενώ η ακτινοβόληση των χρησιμοποιούμενων παραγώγων συνιστάται κυρίως στις περιπτώσεις που ο ασθενής πάσχει από σοβαρή AA ή όταν λαμβάνει ανοσοκατασταλτική θεραπεία. Ανθεκτικότητα στη μετάγγιση, όταν εμφανιστεί, θα πρέπει να θεωρηθεί σοβαρή επιπλοκή και θέτει το θέμα της μεταμόσχευσης μυελού των οστών (Parker et al. 2005; Risitano & Rotoli 2008).

Η σιδηροπενία που συνήθως εμφανίζεται αντιμετωπίζεται με χορήγηση σιδήρου· η έλλειψη σιδήρου (αλλά σε κάποιες περιπτώσεις και η χορήγησή του, ιδιαίτερα η παρεντερική) ενδέχεται να επιδεινώσουν την αιμόλυση. Αν και η από του στόματος χορήγηση συσχετίζεται με λιγότερο σοβαρά αιμολυτικά επεισόδια, η οδός αυτή

φαίνεται αναποτελεσματική στην αντιρρόπηση της απώλειας σιδήρου από τα ούρα. Ασθενείς υπό eculizumab συνήθως δεν αναπτύσσουν ένδεια σιδήρου, αφού το eculizumab αναστέλλει την ενδαγγειακή αιμόλυση. Η χορήγηση βιταμίνης B12 και φυλλικού οξέος ενδείκνυνται για την υποστήριξη της αυξημένης ερυθροποίησης (Rosse 1982; Parker et al. 2005).

Η διέγερση της ερυθροποίησης μπορεί να συνοδεύεται από έξαρση της αιμόλυσης λόγω της διέγερσης του κλωνικού πληθυσμού των ερυθροβλαστών. Αν και η χορήγηση ερυθροποιητίνης έχει εφαρμοστεί σε λίγους ασθενείς με PNH και μυελική ανεπάρκεια, θεωρείται ασφαλής (Parker et al. 2005). Η ερυθροποιητίνη μπορεί να αυξήσει την τιμή της αιμοσφαιρίνης, ανεξαρτήτως των επιπέδων της στον ορό των ασθενών. Συνήθως χορηγείται σε ασθενείς στους οποίους υπολείπεται. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν υψηλές δόσεις ερυθροποιητίνης ακόμη και σε ασθενείς υπό eculizumab που είναι αναιμικοί και εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα (Parker et al. 2005).

### **1.14.3 Κορτικοστεροειδή**

Η χορήγησή τους έχει κυρίως να κάνει με την αντιμετώπιση της οξείας αιμολυτικής κρίσης και της χρόνιας αιμόλυσης μέσω της αναστολής της δράσης του συμπληρώματος. Η αξία της χρήσης τους φαίνεται στον περιορισμό των οξέων παροξυσμικών αιμολυτικών επεισοδίων. Δεν συστήνεται η συνεχής και χρόνια χορήγησή τους λόγω παρενεργειών και τοξικότητας. Ο υποκείμενος μηχανισμός της δράσης τους μάλλον αφορά την αναστολή του ενεργοποιημένου συμπληρώματος είτε άμεσα μέσω επίδρασης σε κάποιο συστατικό του καταρράκτη είτε έμμεσα μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης τους. Εφόσον αποφασισθεί η χρήση τους, συνιστάται και η χορήγηση προφυλακτικής θεραπείας για βακτηριακές λοιμώξεις και την επαγόμενη από τα κορτικοστεροειδή οστεοπενία (Parker et al. 2005).

### **1.14.4 Ανδρογόνα**

Τα ανδρογόνα χρησιμοποιούνται μόνα ή σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή. Η μακροχρόνια χορήγηση ανδρογόνων από μόνα τους ή σε συνδυασμό με κορτικοστεροειδή στην PNH, φαίνεται να βελτιώνει όλες (ή κάποιες από) τις μυελικές σειρές. Ο μηχανισμός δράσης τους δεν έχει ξεκαθαριστεί. Θεωρείται ότι, λόγω της δυνατότητάς τους να επάγουν την ερυθροποίηση και τη μεγακαρυοποίηση, τα αποτελέσματα είναι καλύτερα στις μορφές της νόσου που συνοδεύονται από μυελική ανεπάρκεια, με εμφάνιση πανκυτταροπενίας, είτε σε υπερπλαστικό είτε σε

υποπλαστικό μυελό. Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις ότι η χορήγησή τους συχνά συνοδεύεται από αύξηση της αιμόλυσης και εμφάνιση κοιλιακών αλγών, λόγω πιθανής αύξησης των GPI ανεπαρκών ερυθροκυττάρων με συνέπεια και την αύξηση της εμφάνισης αιμολυτικών επεισοδίων. Άλλες ανεπιθύμητες ενέργειες αποτελούν η ηπατοτοξικότητα, η υπερτρίχωση και η υπερτροφία προστάτη (Rosse 1982; Parker et al 2005; Risitano & Rotoli 2008).

#### **1.14.5 Ανοσοκατασταλτική αγωγή**

Η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη, κυκλοσπορίνη ή συνδυασμό τους, έχει επιχειρηθεί σε ασθενείς με PNH και μυελική απλασία, με ικανοποιητικά αποτελέσματα. Συνήθως επιλέγονταν ασθενείς των οποίων η κατάσταση δεν επέτρεπε μεταμόσχευση μυελού ή αυτοί χωρίς συμβατό συγγενή δότη (Μελέτης και συν. 2009).

#### **1.14.6 Σπληνεκτομή**

Δεδομένου ότι ενέχεται για την εμφάνιση λοιμώξεων και θρομβωτικών επεισοδίων, η συμβολή της σπληνεκτομής στη βελτίωση της αιμόλυσης και των κυτταροπενιών δεν έχει τεκμηριωθεί. Συστήνεται μόνο σε περιπτώσεις με μεγάλη και συμπτωματική διόγκωση του σπληνός (Parker et al 2005).

#### **1.14.7 Αντιπηκτική αγωγή -θρομβόλυση**

Η οξεία θρόμβωση στους PNH ασθενείς αντιμετωπίζεται όπως και η φλεβική θρόμβωση σε άλλες κλινικές οντότητες, αρχικά με χορήγηση ηπαρίνης και κατόπιν με χορήγηση ανταγωνιστών της βιταμίνης K (Ray et al 2000, Brodsky 2009, van Bijnen et al 2012). Η δια βίου χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με ιστορικό θρομβοεμβολικού/ων επεισοδίου/ων ενδείκνυται απόλυτα, ειδικά σε αυτούς με υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια (επιθυμητό INR/*International Normalized Ratio*: 2,0-3,0). Σε ορισμένες περιπτώσεις, για την αντιμετώπιση οξέος θρομβοεμβολικού επεισοδίου μπορεί να χρειαστεί χορήγηση ινωδολυτικών ουσιών (π.χ. tPA) (Parker et al 2005, van Bijnen et al 2012; Malato et al. 2012). Εκτενέστερη αναφορά γίνεται στο Κεφάλαιο 2.

### 1.14.8 Αναστολείς του συμπληρώματος

Οι αναστολείς του συμπληρώματος παρεμβαίνουν στον καταρράκτη του συμπληρώματος και μπορούν να ομαδοποιηθούν βάσει των στόχων τους οποίους μπλοκάρουν στον καταρράκτη του συμπληρώματος. Εντοπίζονται δύο κύριες κατηγορίες αναστολέων συμπληρώματος:

A) αναστολείς της τελικής οδού συμπληρώματος που στοχεύουν το C5 και  
B) αναστολείς των πρώιμων φάσεων του καταρράκτη του συμπληρώματος που στοχεύουν είτε στο βασικό συμβάν του καταρράκτη (διάσπαση C3) είτε σε συγκεκριμένα σημεία της έναρξης (για την PNH περιλαμβάνουν τις πρωτεΐνες της εναλλακτικής οδού όπως ο παράγοντας συμπληρώματος D και ο παράγοντας B) (Risitano et al. 2019).

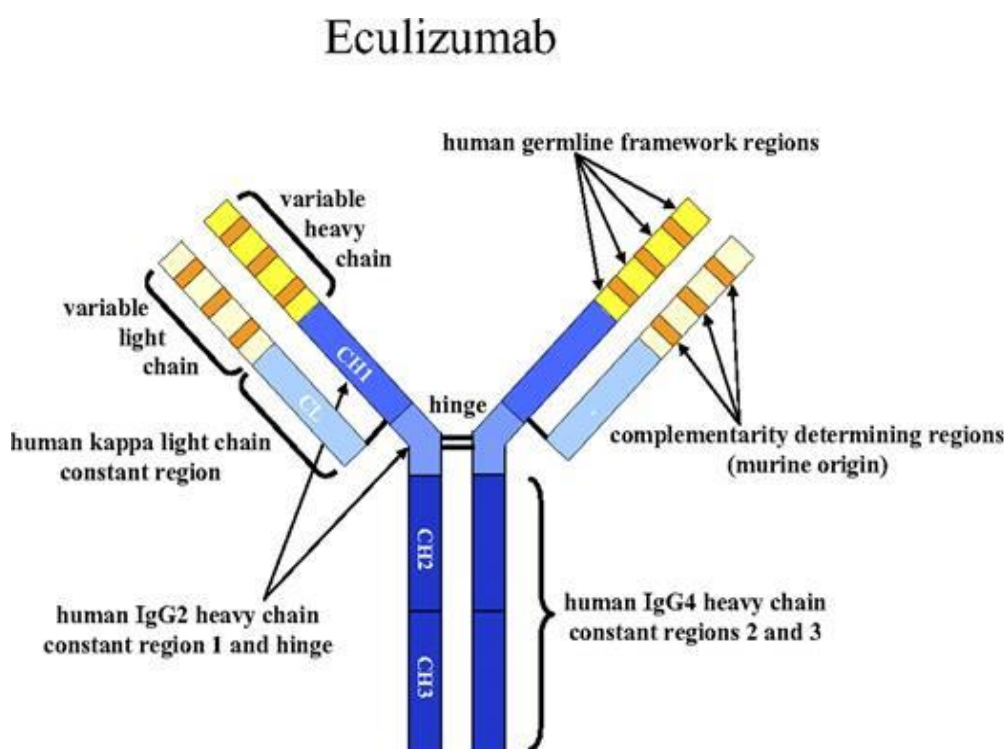
#### 1.14.8.1 Eculizumab (ECU)

Το 2002 δημοσιεύτηκαν οι πρώτες κλινικές μελέτες του φαρμακευτικού αυτού σκευάσματος (Kaplan 2002; Hillmen et al. 2004). Πρόκειται για εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα που κατευθύνεται έναντι του σχηματισμού του τερματικού συμπλόκου στον καταρράκτη του συμπληρώματος (αναστολή στη θέση C5), δηλαδή μπλοκάρει τον σχηματισμό του MAC (C5b-9), προστατεύοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια από την ενδαγγειακή αιμόλυση (Εικόνα 25). Αποτέλεσε το πρώτο σκεύασμα με μεγάλη αποτελεσματικότητα στην θεραπεία της PNH, με αποτέλεσμα να λάβει τη σχετική έγκριση το 2007 (Rother et al. 2007; Brodsky 2008A; Risitano et al. 2019).

Σε ασθενείς υπό ECU, αρχικά παρατηρείται μία αύξηση στην αναλογία των PNH ερυθροκυττάρων. Έχει περιγραφεί ανάπτυξη εξωαγγειακής αιμόλυσης λόγω της δράσης του ECU. Το ECU προκαλεί εξουδετέρωση του μειονεκτήματος που προκαλείται από την ανεπάρκεια του CD59 στα ερυθροκύτταρα, αλλά επειδή πιθανά συνυπάρχει ανεπάρκεια και στο CD55, παρατηρείται μια σταδιακή συσσώρευση θραυσμάτων C3 στην επιφάνειά τους, καθίστανται ευαίσθητα σε φαγοκυττάρωση από τα μακροφάγα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος με αποτέλεσμα την εξωαγγειακή αιμόλυση (Εικόνα 26).

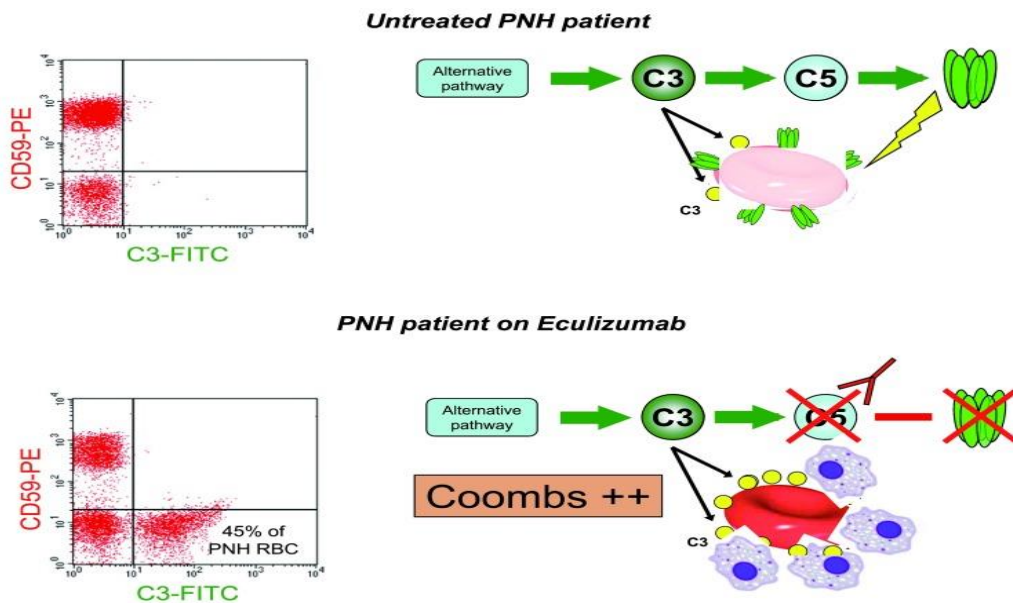
Ο μηχανισμός εξωαγγειακής αιμόλυσης μπορεί να συνοδεύεται από θετική άμεση Coombs (ενώ σε PNH ασθενείς χωρίς θεραπεία η άμεση Coombs είναι αρνητική). Το σημαντικό βέβαια είναι η βελτίωση της αναιμίας λόγω περιορισμού της ενδαγγειακής αιμόλυσης (Risitano et al. 2009 & 2019; Hill et al. 2010). Η διαδι-

κασία ανάπτυξης της εξωαγγειακής αιμόλυσης φαίνεται να έχει μικρή κλινική σημασία. Αναζητούνται, ωστόσο, τρόποι ελέγχου του φαινομένου, ενώ για επεισόδια σοβαρής εξωαγγειακής αιμόλυσης έχει προταθεί ο εκλεκτικός εμβολισμός της σπληνικής αρτηρίας ως εναλλακτική της σπληνεκτομής. Ο εκλεκτικός εμβολισμός της σπληνικής αρτηρίας έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του μεγέθους του σπλήνα και ανακούφιση των κυτταροπενιών σε PNH ασθενείς με υπερσπληνισμό (Luzzatto 2016).



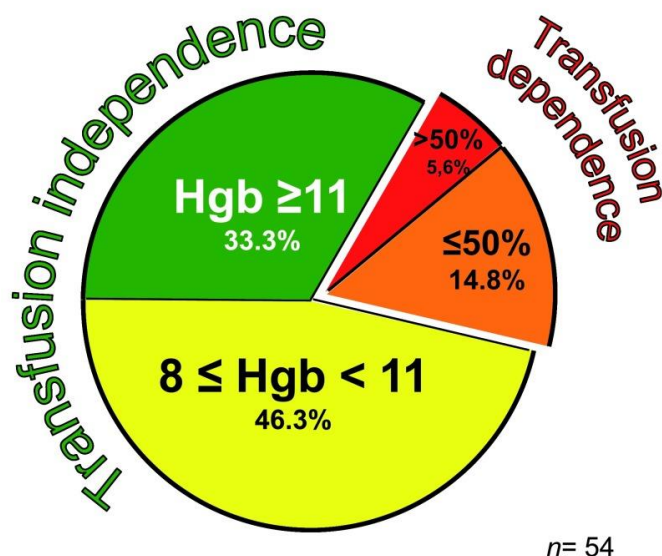
**Εικόνα 25.** Δομή του *eculizumab*. Αλληλουχίες βαριάς αλυσίδας ανθρώπων *IgG<sub>2</sub>* και *IgG<sub>4</sub>* συνδύαστηκαν για να σχηματίσουν μια υβριδική σταθερή περιοχή που δεν είναι σε θέση να δεσμεύσει τους υποδοχείς *Fc* ή να ενεργοποιήσει τον καταρράκτη του συμπληρώματος. Το *eculizumab* εμφανίζει υψηλή συγγένεια με την πρωτεΐνη *C5* του συμπληρώματος, εμποδίζοντας αποτελεσματικά τη κάθαρσή της (Brodsky 2009).

Είναι γνωστό ότι η ενδαγγειακή αιμόλυση συχνά συνεπάγεται δυσάρεστα και (κάποιες φορές) σοβαρά συμπτώματα για τους ασθενείς, όπως κοιλιακό άλγος, δυσφαγία και στυτική δυσλειτουργία, κ.ά. Το *eculizumab* (ECU) καταστέλλει την ενδαγγειακή αιμόλυση στους περισσότερους ασθενείς, τα συμπτώματα καταργούνται και η κόπωση από την αναιμία περιορίζεται.



**Εικόνα 26.** Μηχανισμός εξωαγγειακής αιμόλυσης σε ασθενή υπό eculizumab. Σε ασθενείς χωρίς θεραπεία, όταν το C3 (κίτρινοι κύκλοι) συνδεθεί σε ένα GPI αρνητικό ερυθροκύτταρο, ενεργοποιείται το C5 και σχηματίζεται το σύμπλοκο MAC, που προκαλεί τη λύση του κυττάρου (στην εικόνα της κυτταρομετρίας ροής δεν εμφανίζονται ερυθροκύτταρα δεσμευμένα με το MAC). Σε ασθενείς υπό eculizumab, το C5 μπλοκάρεται, δεν ενεργοποιείται ο σχηματισμός του MAC και συσσωρεύεται μεγάλος αριθμός θραυσμάτων C3 που είναι ευαίσθητα στην φαγοκυττάρωση (Luzzatto 2016).

Με τη χρήση του ECU, περίπου δύο τρίτα των ασθενών που πριν ήταν εξαρτώμενοι από μεταγγίσεις πλέον ανεξαρτητοποιούνται. Οι περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει απόκριση στη θεραπεία είναι πολύ σπάνιες, έχουν αναφερθεί ασθενείς από την Ιαπωνία που έχουν μια συγκεκριμένη μετάλλαξη στο γονίδιο C5, η οποία προκαλεί αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην πρωτεΐνη C5 (Arg885His), το οποίο εμποδίζει τη δέσμευση του ECU. Αυτή η μετάλλαξη είναι πολυμορφική στην Ιαπωνία (συχνότητα ετεροζυγωτών ~3,5%) και στην Κίνα, αλλά δεν παρατηρείται αλλού. Στους ασθενείς που ανεξαρτητοποιούνται από τις μεταγγίσεις συνήθως τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης αυξάνονται, ενώ υπάρχουν και κάποιοι που παραμένουν στα ίδια επίπεδα που διατηρούσαν και πριν. Περίπου 25% των ασθενών εξακολουθούν να χρειάζονται επαναλαμβανόμενες μεταγγίσεις, λιγότερο συχνές όμως από πριν. Ακόμη και αυτοί οι ασθενείς, ωστόσο, αναφέρουν βελτίωση στην ποιότητα ζωής. Αυτή η ποικιλοπλοκότητα στην απόκριση (Εικόνα 27) δεν έχει εξηγηθεί πλήρως ακόμη. Σε κάποιους ασθενείς, μια κακή απόκριση μπορεί να υποδηλώνει ότι ο βαθμός στον οποίο συνέβαλε η ανεπάρκεια του μυελού των οστών στην αναιμία είχε υποτιμηθεί. Σε άλλους, μια μη βέλτιστη απόκριση πιθανά συσχετίζεται με αλλαγή στην παθοφυσιολογία που λαμβάνει χώρα σε ασθενείς υπό ECU (Luzzatto 2016).



Εικόνα 27. Ποικίλη αιματολογική απόκριση στη θεραπεία με ECU (Luzzatto 2016).

Η αποτελεσματικότητα του eculizumab έχει αξιολογηθεί σε δύο μελέτες, φάσης III, με τις ονομασίες *TRIUMPH* και *SHEPHERD*, αντίστοιχα. Η διπλή τυφλή μελέτη *TRIUMPH* αποτέλεσε παράδειγμα πολυκεντρικής, διεθνούς, τυχαιοποιημένης έρευνας, στην οποία αναδείχθηκε η αξία του eculizumab σε επίπεδο σταθεροποίησης των επιπέδων αιμοσφαιρίνης και μείωσης των απαιτήσεων μετάγγισης ασθενών με PNH (Hillmen *et al.* 2006). Έλαβαν μέρος 87 ασθενείς με ελάχιστες απαιτήσεις μετάγγισης (τέσσερις μονάδες αίματος ετησίως) τον προηγούμενο χρόνο από τη διεξαγωγή της μελέτης, επίπεδα LDH 1,5 φορές περισσότερο αυξημένα των φυσιολογικών και αριθμό αιμοπεταλίων μεγαλύτερο από  $100 \times 10^9/L$ . Οι ασθενείς διαχωρίστηκαν με τυχαιοποιημένα κριτήρια και έλαβαν εικονικό φάρμακο (*placebo*) ή ECU, ως ακολούθως: ενδοφλέβια έγχυση (διάρκειας ~35min) 600 mg εβδομαδιαίως για τέσσερις εβδομάδες, 900 mg την πέμπτη εβδομάδα και ακολούθως 900 mg κάθε 14 ημέρες για 6 μήνες. Καταγράφηκε σταθεροποίηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης στο 48,8% των ασθενών που έλαβαν eculizumab. Οι ασθενείς που έλαβαν eculizumab δεν χρειάστηκαν καθόλου μετάγγιση, ενώ καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα LDH και βελτιωμένος δείκτης ποιότητας ζωής. Οι πιο συνήθεις παρενέργειες περιελάμβαναν πονοκέφαλο, κακουχία, πόνο στην πλάτη και λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Η μελέτη *SHEPHERD* φάσης-III σχεδιάστηκε προκειμένου να αξιολογήσει την ασφάλεια και αποτελεσματικότητα του φαρμάκου σε έναν ευρύτερο και πιο ετερογενή πληθυσμό ασθενών με PNH, συμπεριλαμβανομένων και αυτών με

θρομβοκυττοπενία και μειωμένες απαιτήσεις μεταγγίσεων. Έλαβαν μέρος 97 ασθενείς από 30 διεθνή κέντρα, στους οποίους χορηγήθηκε eculizumab σε διάστημα 52 εβδομάδων, με την δοσολογία που προαναφέρθηκε. Καταγράφηκαν παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της μελέτης *TRIUMPH*, σε συνδυασμό ωστόσο με σημαντική μείωση της αιμόλυσης, αύξηση των επιπέδων της αιμοσφαιρίνης, μείωση της ανάγκης για μετάγγιση, λιγότερη κόπωση και βελτιωμένη ποιότητα ζωής. Αν και το ποσοστό των τύπου-III PNH ερυθροκυττάρων αυξήθηκε, η μέση αναλογία των PNH κοκκιοκυττάρων φαίνεται να παρέμεινε ίδια σε όλη τη διάρκεια της μελέτης (*Brodsky 2008; Rachidi et al. 2010*).

Η αναστολή της ενεργοποίησης του συμπληρώματος στη θέση C5 θεωρητικά προστατεύει τη δραστηριότητα των προηγούμενων συστατικών της οδού, τα οποία και είναι απαραίτητα για την οψωνινοποίηση μικροοργανισμών και την κάθαρση συμπλεγμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος. Καθώς η αναστολή της λειτουργίας του τελικού μονοπατιού του συμπληρώματος μπορεί να συνδέεται με αυξημένη εκδήλωση λοιμώξεων λόγω *Neisseria meningitidis*, όλοι οι ασθενείς εμβολιάστηκαν έναντι του συγκεκριμένου μικροοργανισμού. Μηνιγγιτιδοκοκκική σήψη αναπτύχθηκε σε 2 από τους 195 ασθενείς (1%) που εντάχθηκαν σε όλες τις μελέτες χορήγησης eculizumab. Και οι δύο ασθενείς είχαν εμβολιασθεί. Συστήνεται, οι ασθενείς να εμβολιάζονται κάθε τρία με πέντε χρόνια από την έναρξη της θεραπείας με eculizumab (*Brodsky 2008; Rachidi et al. 2010*).

Σχετικά με την εμφάνιση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων, στο πλαίσιο των δύο προαναφερθεισών μελετών (195 ασθενείς) και επιπρόσθετα μίας κλινικής δοκιμής φάσεως II έγινε προσπάθεια αξιολόγησης της συχνότητας θρόμβωσης σε ασθενείς πριν και μετά τη θεραπεία με eculizumab, για χρονική περίοδο δύο ετών (*Hill et al. 2005; Hillmen et al. 2007*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο ρυθμός εκδήλωσης θρομβοεμβολών σε ασθενείς που έλαβαν eculizumab ήταν της τάξεως των 1,07 επεισοδίων/100 ασθενείς σε ετήσια βάση, έναντι 7,37 επεισοδίων/100 ασθενείς ετησίως, πριν την θεραπεία. Τα εν λόγω ευρήματα αντιστοιχούν σε μία σημαντική μείωση του κινδύνου εκδήλωσης θρόμβωσης, της τάξεως του 85% (*Hillmen et al. 2007*). Εξίσου ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα και σε ασθενείς που ελάμβαναν ήδη αντιθρομβωτική αγωγή (κυρίως ασθενείς με προηγούμενα θρομβοεμβολικά επεισόδια, πληθυσμός με υψηλό κίνδυνο εμφάνισης και νέων θρομβοεμβολών), με το ποσοστό θρομβοεμβολής μειωμένο από 10,61 σε 0,62 συμβάντα/100 ασθενείς ανά έτος. Το γεγονός πως οι ασθενείς που έλαβαν eculizumab



παρουσίασαν σημαντική μείωση του κινδύνου θρόμβωσης, δικαιολογεί την επιλογή του συγκεκριμένου φαρμακευτικού σκευάσματος ως ενδεδειγμένη θεραπευτική αγωγή. Από την άλλη πλευρά δεν είναι ξεκάθαρος ο εντοπισμός των ατόμων που πραγματικά χρήζουν αντιπηκτικής αγωγής, όπως επίσης και η διακοπή της, σε ασθενείς με ιστορικό θρόμβωσης υπό ECU.

#### **1.14.8.1.1 Διακοπή της θεραπείας με Eculizumab**

Πριν από την έναρξη της θεραπείας με eculizumab, οι ασθενείς θα πρέπει να ενημερώνονται ότι μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις η θεραπεία μπορεί να διακοπεί. Διακοπή της θεραπείας συστήνεται στις εξής περιπτώσεις (σύσταση επιπέδου C):

- Όταν το μέγεθος του κλώνου PNH μειώνεται σταδιακά με την πάροδο του χρόνου και είναι σταθερά κάτω από 10%.
- Όταν υπάρχει πολυμορφισμός στο C5 που οδηγεί σε αντίσταση στη θεραπεία με ECU.
- Σε περίπτωση αλλογενούς μεταμόσχευσης βλαστοκυττάρων (*Devos et al.2018*).

#### **1.14.8.2 Ravulizumab**

Για περισσότερο από μια δεκαετία επικρατούσε η άποψη ότι το μπλοκάρισμα του συμπληρώματος στο C5 από το eculizumab είναι η καλύτερη αντιμετώπιση για τους ασθενείς, με εξαίρεση αυτούς που φέρουν τον πολυμορφισμό R885HC5. Η μακροπρόθεσμη κλινική έκβαση είναι εξαιρετική και ακόμη και η ήπια αυξημένη LDH, κλινικά δεν αξιολογείται ιδιαίτερα (για τους συγκεκριμένους ασθενείς). Ωστόσο, εξετάζοντας τα πρόσφατα δεδομένα που προέρχονται από νέους anti-C5 αναστολείς, είναι προφανές ότι ο θεραπευτικός αποκλεισμός του C5 μπορεί να βελτιωθεί και όχι μόνο από την άποψη της άνεσης του ασθενούς (μεσοδιάστημα μεταξύ των χορηγήσεων) (*Risitano et al. 2019*).

Το ravulizumab (ALXN1210) αποτελεί παράδειγμα C5 αναστολέα του συμπληρώματος, με μεγαλύτερη ημίσεια ζωή από την αντίστοιχη του ECU. Σχεδιάστηκε για να αντιμετωπίζει τους περιορισμούς στη θεραπεία με eculizumab, ιδιαίτερα τον σύντομο χρόνο ημίσειας ζωής και το συχνό πρόγραμμα δοσολογίας. Το κύριο πλεονέκτημα είναι ότι ο τελικός χρόνος ημίσειας ζωής του ravulizumab είναι 4πλάσιος αυτού του eculizumab και μπορεί να χορηγηθεί ενδοφλεβίως κάθε 8 εβδομάδες, μετά από τη φάση επαγωγής 2 εβδομάδων (*Lee et al.2016; Brodsky 2021*). Για να αυξηθεί ο χρόνος ημίσειας ζωής, έγιναν δύο αλλαγές στο αντίσωμα:

**α)** δύο κατάλοιπα αμινοξέων στο eculizumab αντικαταστάθηκαν με κατάλοιπα ιστιδίνης προκειμένου να διευκολυνθεί η διάσπαση του συμπλέγματος eculizumab-C5 στο ενδόσωμα. Οι δύο αυτές αντικαταστάσεις αλλάζουν την κινητική δέσμευσης του αντισώματος στο C5, έτσι ώστε το αντίσωμα να μπορεί να δεσμεύεται στο C5 σε pH 7,4 (pH του ενδαγγειακού χώρου), αλλά να διαχωρίζεται από αυτό σε pH 6,0 (pH του ενδοσώματος).

**β)** έγιναν δύο υποκαταστάσεις αμινοξέων Fc τμήμα δέσμευσης του αντισώματος προκειμένου να ενισχυθεί η συγγένεια του αντισώματος για τον νεογνικό Fc υποδοχέα.

Αυτή η αλλαγή σε τέσσερα μόλις κατάλοιπα αμινοξέων δημιουργεί ένα νέο αντίσωμα (ravulizumab), με χρόνο ημιζωής έως τέσσερις φορές μεγαλύτερο από αυτό του ECU (*Stern et al.2019*). Από τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών φάνηκε ότι η θεραπεία με ravulizumab δεν είναι κατώτερη αυτής με ECU, τόσο για τους ασθενείς που δεν έχουν λάβει καθόλου θεραπεία με αναστολείς όσο και για εκείνους που είχαν λάβει προηγούμενη θεραπεία με eculizumab.

Τα δύο σκευάσματα φαίνεται να έχουν παρόμοια προφίλ ασφάλειας, και τα δύο φαίνεται ότι προκαλούν πονοκεφάλους έως και στο ένα τρίτο των ασθενών και θέτουν ένα μικρό αλλά κλινικά σημαντικό κίνδυνο μηνιγγιτιδοκοκκικής λοίμωξης. Με συχνότητα δοσολογίας κάθε 8 εβδομάδες, το ravulizumab θεωρείται λιγότερο επιβαρυντική θεραπεία για ασθενείς με PNH και μάλλον συσχετίζεται με μειωμένο ρυθμό αιμόλυσης (*Stern et al.2019*).

Τα eculizumab και ravulizumab είναι εγκεκριμένα από τον FDA φάρμακα για τη θεραπεία της PNH, δεδομένου ότι έχει αποδειχθεί ότι προλαμβάνουν με ασφάλεια την ενδαγγειακή αιμόλυση και αποτρέπουν τη θρόμβωση. Υπάρχουν, ωστόσο, περιθώρια βελτίωσης. Θρόμβωση, σοβαρή αναιμία ή λοιπά συμπτώματα χαρακτηριστικά της PNH (χρόνια κόπωση, πόνος, δύσπνοια) είναι ισχυρές ενδείξεις για την έναρξη της θεραπείας. Η αναστολή του συμπληρώματος αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης από *Neisseria*, ως εκ τούτου, συνιστάται ο εμβολιασμός. Ωστόσο ακόμη και με τον εμβολιασμό, ο κίνδυνος απόκτησης λοίμωξης από *Neisseria* είναι μεγαλύτερος από αυτόν των υγιών μαρτύρων, με απόλυτο κίνδυνο έως και 0,5% ετησίως. Για το λόγο αυτό, εκτός από τον εμβολιασμό, προτείνεται προφύλαξη με πενικιλίνη (500 mg δύο φορές την ημέρα) για όλους τους ασθενείς κάτω των 45 ετών. Το ravulizumab θεωρείται κατά τον *Brodsky* η θεραπεία της επιλογής για ασθενείς με PNH, που απαιτούν θεραπεία μακράς διάρκειας, δεδομένης της πιο βολικής δοσολογίας, του

χαμηλότερου κόστους και της περισσότερο αξιόπιστης αναστολής του C5 (*Brodsky 2021*).

#### **1.14.8.3 Ανάπτυξη νέων αναστολέων του συμπληρώματος**

Αρκετές προσπάθειες γίνονται για την ανάπτυξη και άλλων αναστολέων του συμπληρώματος για τη θεραπεία της PNH· αρκετοί ενδέχεται να εγκριθούν από τον FDA τα επόμενα χρόνια. Υπάρχουν τουλάχιστον επτά νέοι C5 αναστολείς που έχουν επίσης ανακοινωθεί, οι περισσότεροι βρίσκονται υπό κλινικές δοκιμές. Οι περισσότεροι από αυτούς είναι μονοκλωνικά αντισώματα όπως το eculizumab, αλλά ο κατάλογος περιλαμβάνει επίσης μικρούς αναστολείς πεπτιδίων με ‘μικρό παρεμβαλλόμενο RNA’ (*small interfering RNA/siRNA*). Όλοι αυτοί οι παράγοντες στοχεύουν να αναπαράγουν τα εξαιρετικά δεδομένα που επιτυγχάνονται με το eculizumab, προσπαθώντας να αντιμετωπίσουν κάποιες άλλες κλινικές ανάγκες που αφορούν κυρίως την ευκολία του ασθενούς· ενώ η τρέχουσα θεραπεία με το eculizumab απαιτεί ενδοφλέβιες εγχύσεις κάθε 14 ημέρες, οι νεώτεροι αναστολείς έχουν σχεδιαστεί προσπαθώντας να αυξήσουν το μεσοδιάστημα μεταξύ των χορηγήσεων και/ή τη μετάβαση από την ενδοφλέβια χορήγηση σε υποδόρια ή ακόμα και σε χορήγηση από του στόματος (*Risitano et al. 2019*).

Το Pegcetacoplan είναι ένα πεγκυλιωμένο πεπτίδιο που δρα σαν αναστολέας του C3, χορηγείται υποδορίως, δύο φορές την εβδομάδα και δυνητικά αναστέλλει τόσο την ενδαγγειακή όσο και την εξωαγγειακή αιμόλυση (*Brodsky 2021*). Έλαβε έγκριση από τον FDA και τον EMA το 2021.

Το Danicopan (ACH-4471) είναι ένα άλλο πολλά υποσχόμενο φάρμακο που δρα στην εναλλακτική οδό του συμπληρώματος αναστέλλοντας τον παράγοντα D. Το Danicopan είναι ένας πρώτος στην κατηγορία των από του στόματος χορηγούμενων αναστολέων του συμπληρώματος της εναλλακτικής οδού. Θεωρείται ότι μπλοκάρει την επαγόμενη από το C3 εξωαγγειακή αιμόλυση, αυξάνει τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και εξαλείφει την ανάγκη για μεταγγίσεις αίματος σε εξαρτώμενους από μεταγγίσεις ασθενείς (*Ellis-Pegler et al. 2016; Risitano et al. 2019; Brodsky 2021*).

Έχουν παρουσιαστεί και δεδομένα από μελέτη σταδίου I, αναφορικά με την δράση ενός έτερου C5 αναστολέα με την ονομασία RA101495 (Zilucoplan), ο οποίος φέρει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να χορηγηθεί υποδόρια (*Johnston et al. 2016A & 2016B*). Υποσχόμενα είναι και τα ευρήματα της μελέτης για τον C5-αναστολέα ALN-CC5, ο

οποίος χορηγείται υποδορίως σε εβδομαδιαία βάση και σε μελέτη φάσης I-II φάνηκε ότι γενικά ήταν καλά ανεκτός, ενώ εμφάνισε περιορισμένη αναστολή της δραστηριότητας του C5 σε υγιείς εθελοντές (Hill et al. 2016; Risitano et al. 2019).

Αναμένεται με μεγάλο ενδιαφέρον η ανάπτυξη φαρμακευτικών σκευασμάτων, τα οποία θα έχουν την ικανότητα αλληλεπίδρασης με προερχόμενα από κλωνική επέκταση κλωνικά κύτταρα (π.χ. αναστολή της ενεργοποίησης μεταλλάξεων των υπό επέκταση κλωνικών κυττάρων). Ωστόσο, εξαιτίας των διαφόρων μηχανισμών της κλωνικής επέκτασης, καλό θα ήταν να λαμβάνεται υπόψιν ότι οποιοδήποτε τέτοιου είδους φαρμακευτικό σκεύασμα πιθανά να μην είναι εφαρμόσιμο σε κάποια συγκεκριμένη υποομάδα PNH ασθενών. Εξαιτίας του ότι οι σχετικοί μηχανισμοί εκδήλωσης παραμένουν από λειτουργικής άποψης αδιευκρίνιστοι, η παρασκευή των προαναφερθέντων σκευασμάτων ενδέχεται να καθυστερήσει σε χρονικό επίπεδο. Αν και η αποτελεσματικότητα αυτών των θεραπευτικών παρεμβάσεων μέχρι τώρα είναι συζητήσιμη, υπάρχει έδαφος αισιοδοξίας αναφορικά με την μελλοντική εφαρμογή τέτοιων θεραπειών, εφόσον βελτιωθεί παράλληλα και η κατανόηση του παθοφυσιολογικού μηχανισμού στην PNH.

#### 1.14.9 Γονιδιακή θεραπεία

Καθώς η PNH είναι μια επίκτητη γονιδιακή διαταραχή, φαίνεται και σαν ελκυστική οντότητα σε επίπεδο γονιδιακής θεραπείας. Ωστόσο προκειμένου να επιχειρηθεί μία τέτοια καινοτόμος και δυνητικά επικίνδυνη θεραπευτική επιλογή, θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν δύο ζωτικής σημασίας θέματα:

- α) σε ποιους από τους ασθενείς με PNH θα πρέπει να εφαρμοστεί, και
- β) ποιος είναι ο μηχανισμός σχετικά με το αναπτυξιακό πλεονέκτημα των PNH κλώνων.

Ένα PNH κύτταρο που ‘διορθώνεται’ σε φυσιολογικό με την εισαγωγή ενός φυσιολογικού γονιδίου PIGA θα εκφράσει όλες τις ελλείπουσες πρωτεΐνες που συνδέονται με την άγκυρα GPI και στη συνέχεια πιθανά θα αποβεί ευάλωτο στην απλαστική διαδικασία.

Η PNH μπορεί να θεωρηθεί ως μια ‘φυσική μορφή’ γονιδιακής θεραπείας (Jonson & Hillmen 2002), καθώς τα PNH κύτταρα διαφεύγουν από την απλαστική διαδικασία, λόγω του μεταλλαγμένου PIG-A γονιδίου και επομένως η διόρθωση της γενετικής ανωμαλίας μπορεί να αντιστρέψει το ‘όφελος’ που αποκομίζει ο ασθενής από την εμφάνιση κλώνων PNH όσον αφορά την αιμοποίηση (Hill et al. 2007B).

## 1.15 Παρακολούθηση PNH ασθενών

### 1.15.1 Παρακολούθηση PNH ασθενών χωρίς θεραπευτική αγωγή

Η PNH μπορεί να επηρεάσει οποιαδήποτε ηλικιακή ομάδα, με διάμεση ηλικία διάγνωσης τα 30 έτη και εκτιμάται ότι επηρεάζει εξίσου άνδρες και γυναίκες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η απλαστική αναιμία είναι γνωστός παράγοντας κινδύνου για PNH. Σε ασθενείς με απλαστική αναιμία, ο κίνδυνος ανάπτυξης κλινικής PNH είναι περίπου 15-25%. Έχουν αναφερθεί ποσοστά θνησιμότητας ~29% εντός 10ετίας, σε ασθενείς που δεν αντιμετωπίστηκαν θεραπευτικά (*Fu et al. 2020*).

Σύμφωνα με τις ισχύουσες κατευθυντήριες οδηγίες (*ICCS Guidelines 2010*), περιπτώσεις ασθενών με PNH κλώνο χρήζουν τακτικής παρακολούθησης αναλόγως των εκάστοτε κλινικών ευρημάτων και του μεγέθους του κλώνου. Η PNH είναι επίκτητη νόσος και ως εκ τούτου, το μέγεθος του κλώνου μπορεί να ποικίλει στη διάρκεια του χρόνου. Σε ένα 20-50% των περιπτώσεων θεωρείται ότι το μέγεθος του κλώνου παραμένει σταθερό για τουλάχιστον μία πενταετία, ενώ σε ένα 10-15% των περιπτώσεων είτε αυξάνει είτε μειώνεται ή εξαφανίζεται στη διάρκεια του χρόνου. Ασθενείς με απουσία κλινικών εκδηλώσεων και μέγεθος κλώνου <1% θα πρέπει να εξετάζονται σε ετήσια βάση, καθότι οι ασθενείς δεν αντιμετωπίζονται θεραπευτικά. Ασθενείς με μέγεθος κλώνου >1% θα πρέπει να εξετάζονται τουλάχιστον μία φορά το εξάμηνο (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C). Θα πρέπει να αναφερθεί πως σπανίως καταγράφονται περιπτώσεις με αιφνίδια εξαφάνιση του υποκείμενου PNH κλώνου (*Hillmen et al. 1995*). Εκτιμάται ωστόσο πως αύξηση του μεγέθους ενός PNH κλώνου είναι δηλωτική πρόσθετης ενεργοποίησης της νόσου. Περιπτώσεις κατά τις οποίες καταγράφεται επιδείνωση των κλινικών συμπτωμάτων ή αυξημένη αιμόλυση συνεπάγονται άμεσο έλεγχο (*Sahin et al. 2016; Borowitz et al. 2010; Madkaikar et al. 2009; Parker et al. 2005*).

### 1.15.2 Παρακολούθηση ασθενών υπό eculizumab

Στους ασθενείς με PNH που υποβάλλονται σε θεραπευτική αγωγή με eculizumab συνιστάται να γίνεται έλεγχος γενικής αίματος, αιμολυτικών παραμέτρων και βιοχημικού προφίλ, κατά την διάρκεια του αρχικού κύκλου των τεσσάρων εβδομάδων της θεραπευτικής αγωγής. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει τη σύσταση μηνιαίας αξιολόγησης του ασθενούς (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C). Θα πρέπει να

αναφερθεί, ότι το συγκεκριμένο θεραπευτικό σκεύασμα δεν επηρεάζει το μέγεθος PNH κλώνου στα πολυμορφοπύρρηνα. Από την άλλη πλευρά και αναλόγως του επιπέδου της δοσολογίας, ενδέχεται να αυξηθεί το μέγεθος του κλώνου των ερυθροκυττάρων. Στην περίπτωση αυτή μπορεί να προκληθεί σοβαρό αιμολυτικό επεισόδιο, με αποτέλεσμα την άμεση διακοπή της θεραπευτικής αγωγής (*Hillmen et al. 2006*). Προτείνεται εξάμηνη παρακολούθηση, λόγω των διακυμάνσεων του μεγέθους του κλώνου σε βάθος χρόνου (προτεινόμενο επίπεδο ελέγχου C). Περιπτώσεις κατά τις οποίες καταγράφεται εμμένουσα αιμόλυση, συνεπάγονται έλεγχο άμεσης Coombs, με σκοπό την αξιολόγηση πιθανής εξωαγγειακής αιμόλυσης (*Parker et al. 2005; Borowitz et al. 2010; Manivannan et al. 2017*).

Η συνοδός συμπτωματολογία της PNH έχει άμεσο αντίκτυπο στο επίπεδο της ποιότητας ζωής των ασθενών. Είναι πολύ σημαντική λοιπόν η καταγραφή του εύρους επίδρασης των εν λόγω συμπτωμάτων, ακόμα και σε περιπτώσεις ασθενών με εντοπισμένο κλώνο μικρού μεγέθους.

## Κεφάλαιο 2: Θρομβοεμβολική νόσος

### 2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η φλεβική θρομβοεμβολή είναι ένα σημαντικό ιατρικό πρόβλημα, δυνητικά θανατηφόρο, που επηρεάζει 1 στα 1000 άτομα ετησίως, με τον κίνδυνο εμφάνισης να μεγαλώνει όσο αυξάνεται η ηλικία. Πρόκειται για πολυπαραγοντική νόσο, η παθογένεση της οποίας περιλαμβάνει τόσο περιστασιακούς όσο και γενετικούς μηχανισμούς.

Συνήθως χρησιμοποιείται ο όρος ‘θρομβοφιλία’, για την περιγραφή της αυξημένης τάσης εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων και των υποτροπών τους. Ήδη από το 1856, ο *Virchow* καθόρισε τρεις μεγάλες κατηγορίες που συμβάλλουν στην εμφάνιση φλεβικής θρόμβωσης και πνευμονικής εμβολής και αφορούν σε διαταραχή στη ροή του αίματος, βλάβη στα τοιχώματα των αγγείων και αλλαγή στη σύσταση του αίματος (υπερπηκτικότητα). Πρόκειται για τη γνωστή ‘*τριάδα του Virchow*’, που εξακολουθεί ακόμη και σήμερα να αποτελεί το βασικό εργαλείο πάνω στο οποίο στηρίζεται η απεικόνιση της παθογένειας της θρόμβωσης.

Σήμερα είναι γνωστοί πολλοί συγγενείς και περιστασιακοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση θρόμβωσης, που αφορούν μία ή και περισσότερες από τις 3 κατηγορίες της τριάδας του *Virchow*. Οι επίκτητοι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης περιλαμβάνουν την αύξηση της ηλικίας, την ακινητοποίηση, την χειρουργική επέμβαση, την κύηση, τη λήψη από του στόματος αντισυλληπτικών και την ορμονική υποκατάσταση για τις γυναίκες, φλεγμονώδεις καταστάσεις κ.ά. Δεδομένης της πολυπλοκότητας του φλεβικού δικτύου όλες οι φλέβες είναι ευάλωτες στην εμφάνιση θρόμβωσης, ωστόσο η πιο κοινή είναι η θρόμβωση στα κάτω άκρα. Αυτό οφείλεται στην υψηλή υδροστατική πίεση και στο χαμηλό ρυθμό ροής που επηρεάζουν το φλεβικό σύστημα στα πόδια, ιδιαίτερα όταν η ελαστικότητα του αγγειακού τοιχώματος μειώνεται (αύξηση ηλικίας, ανεπάρκεια φλεβικών βαλβίδων). Η αναγνώριση των παραγόντων κινδύνου για την εκδήλωση της θρομβοεμβολικής νόσου έχει μεγάλη σημασία τόσο για τη θεραπευτική αντιμετώπιση του ασθενούς και την προφύλαξή του σε περιπτώσεις έκθεσής σε πρόσθετο θρομβογόνο κίνδυνο όσο και για την εκτίμηση του κινδύνου υποτροπής.

Η μοριακή βάση των αιμοστατικών μηχανισμών είναι γνωστή για πάνω από πέντε δεκαετίες, ως εκ τούτου, αρκετοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου που επηρεάζουν τους φυσικούς αντιπηκτικούς μηχανισμούς και δημιουργούν υπερπηκτικότητα έχουν αναγνωρισθεί. Σε κάποιες από τις περιπτώσεις ο αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης είναι δια βίου, ενώ αυξάνεται ακόμη περισσότερο όταν και κάποιος/οι από τους περιστασιακούς παράγοντες επισυμβαίνουν (*Dahlback 2008*).

Η θρομβοφιλία αυξάνει με τον κίνδυνο εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολής. Πρόκειται για πολυπαραγοντική νόσο εξαιτίας αλληλεπιδράσεων μεταξύ διαφόρων γονιδίων και αλληλεπιδράσεων γονιδίων-περιβάλλοντος. Συνηθέστερες εκδηλώσεις είναι η εν τω βάθει θρόμβωση κάτω άκρων και η πνευμονική εμβολή. Μερικές φορές ωστόσο η θρόμβωση εμφανίζεται σε ασυνήθη σημεία, όπως οι σπλαχνικές φλέβες, οι εγκεφαλικές φλέβες, η φλέβα του αμφιβληστροειδούς κ.ά.

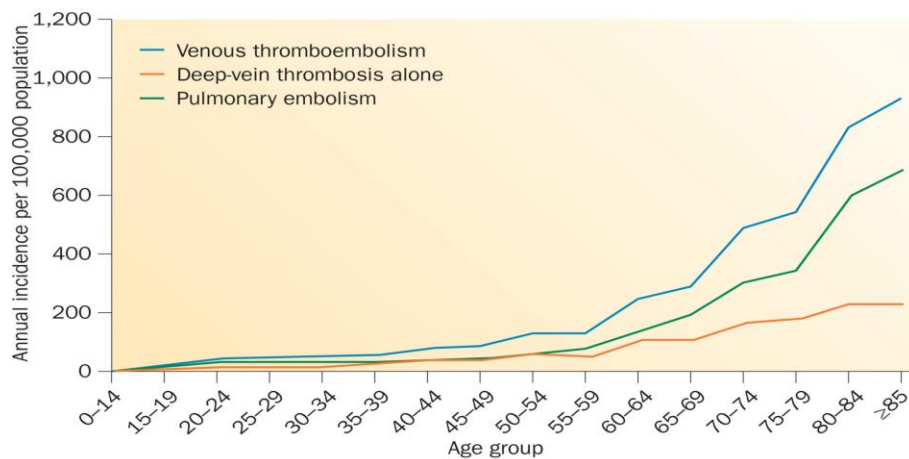
Η κλινική έκφραση της κληρονομικής θρομβοφιλίας είναι δεν είναι ίδια σε όλους τους ανθρώπους. Μερικά άτομα δεν αναπτύσσουν ποτέ θρόμβωση, άλλα μπορεί να παραμείνουν ασυμπτωματικά μέχρι την ενηλικίωση ή και αργότερα, ενώ άλλοι εμφανίζουν υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια ακόμη και πριν από την ηλικία των 30 ετών.

## **2.2. Επιδημιολογία**

Τα εκτιμώμενα ετήσια ποσοστά εμφάνισης VTE μεταξύ των ανθρώπων ευρωπαϊκής καταγωγής κυμαίνονται από 104-183 ανά 100000 άτομα, ποσοστά παρόμοια με αυτά του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου. Η συνολική επίπτωση είναι υψηλότερη σε πληθυσμούς Αφροαμερικανών (ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική θέση) και χαμηλότερη στους πληθυσμούς των Ασιατών, Ασιατών-Αμερικανών και ιθαγενών Αμερικανών. Τα ποσοστά για τα περιστατικά πνευμονικής εμβολής κυμαίνονται από 29-78/100.000 άτομα και για την εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση/DVT (χωρίς PE) από 45-117/100000 άτομα (*Heit 2015*).

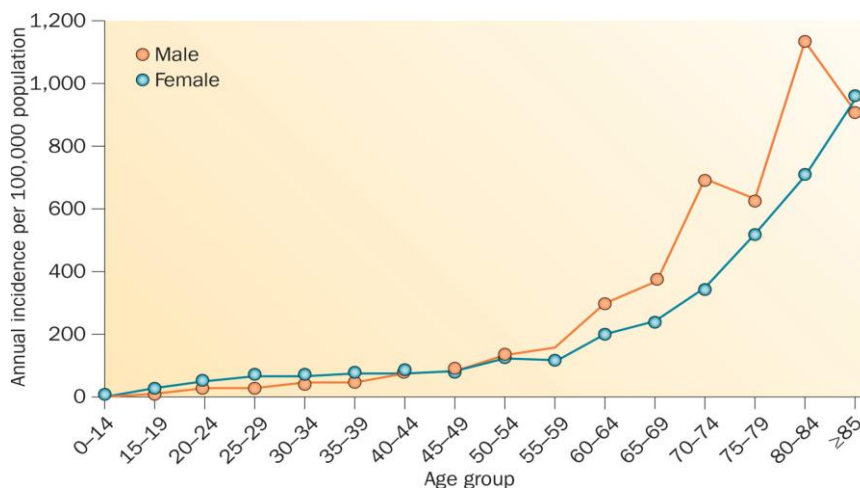
Η φλεβική θρομβοεμβολή είναι ασθένεια κυρίως της μεγαλύτερης ηλικίας· σπάνια εμφανίζεται πριν από την όψιμη εφηβεία. Τα ποσοστά επίπτωσης αυξάνονται σημαντικά με την ηλικία και για τα δύο φύλα τόσο για την εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση (DVT) όσο και για την PE (Εικόνα 28).





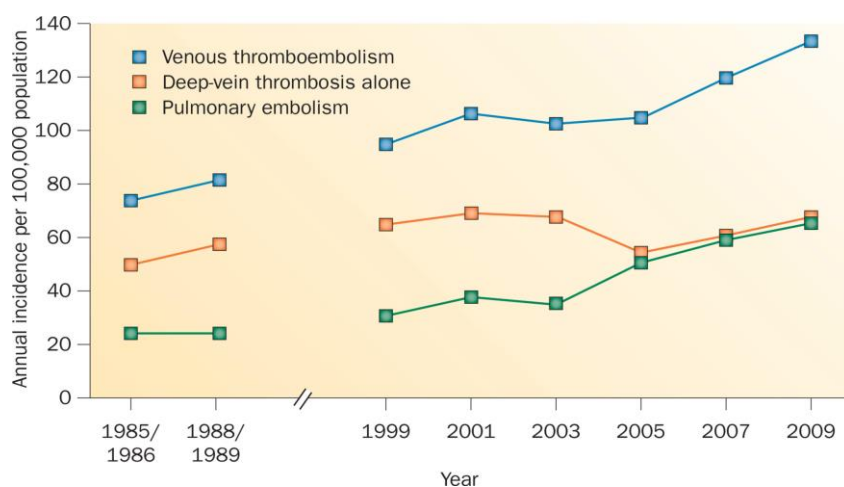
**Εικόνα 28.** Επίδραση τη ηλικίας στην επίπτωση της εμφάνισης φλεβικής θρομβοεμβολής (εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και πνευμονική εμβολή). Δείχνεται η συνολική συχνότητα φλεβικής θρομβοεμβολής, μαζί με τη συχνότητα της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης μόνο, και της πνευμονικής εμβολής (με ή χωρίς εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση). Μια 25ετής πληθυσμιακή μελέτη (Arch. Intern. Med. 1998;158:585–593, από Heit 2015).

Το συνολικό ετήσιο ποσοστό επίπτωσης είναι υψηλότερο στους άνδρες (130/100000) από ότι στις γυναίκες (110/100000). Στις γυναίκες τα ποσοστά φαίνεται να αυξάνουν ελαφρά κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών χρόνων (16-44 έτη), σε άτομα όμως μεγαλύτερης ηλικίας (>45 έτη) είναι υψηλότερα στους άνδρες (Εικόνα 29). Στις γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας οι παράγοντες κινδύνου περιλαμβάνουν την από του στόματος αντισύλληψη, την ορμονοθεραπεία, όπως επίσης και την περίοδο της κύησης και της λοχείας. Τα πρώτης και δεύτερης γενιάς αντισυλληπτικά χάπια ενέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικού επεισοδίου από αυτά της τρίτης γενιάς (συσχετίζονται με διπλάσιο έως τετραπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης VTE). Η συνολική συχνότητα εμφάνισης VTE που σχετίζεται με την εγκυμοσύνη είναι περίπου 200 συμβάντα ανά 100000 γυναίκες, ένας τετραπλάσιος σχετικός κίνδυνος σε σύγκριση με τις μη έγκυες γυναίκες σε αναπαραγωγική ηλικία, ενώ κατά την περίοδο της λοχείας αυξάνει ακόμη περισσότερο (είναι περίπου πενταπλάσιος από αυτόν κατά τη διάρκεια της κύησης). Ένα προηγούμενο επεισόδιο επιφανειακής φλεβικής θρόμβωσης αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για VTE κατά τη διάρκεια της κύησης ή της λοχείας, ενώ επιπρόσθετους παράγοντες κινδύνου συνιστούν ο προϋπάρχων σακχαρώδης διαβήτης, η εμφάνιση κιρσών, η παχυσαρκία, πιθανή μαιευτική αιμορραγία, ο πρόωρος τοκετός και η καισαρική τομή (Heit 2015).



**Εικόνα 29.** Τάσεις στη συχνότητα εμφάνισης της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης και πνευμονικής εμβολής ανά ηλικία και φύλο: μια 25ετής πληθυσμιακή μελέτη (*Arch. Intern. Med.* 1998;158:585–593, από Heit 2015).

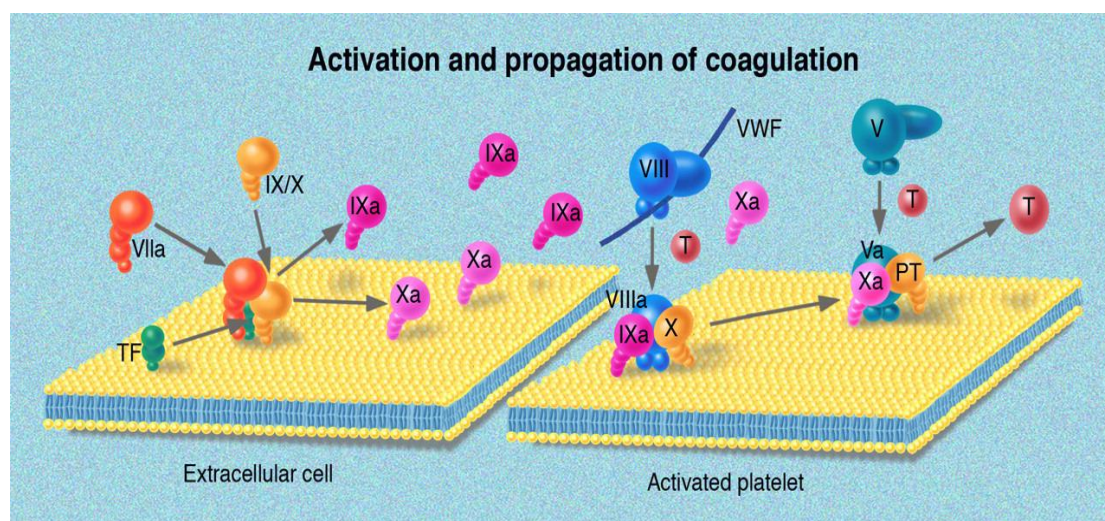
Με την αύξηση της ηλικίας, η θρομβοεμβολή εκδηλώνεται περισσότερο ως εμφάνιση PE και στα δύο φύλα. Σε μελέτη σε πληθυσμούς ευρωπαϊκής και αφρικανικής καταγωγής, το ποσοστό περιστατικών της ιδιοπαθούς VTE κυμαίνεται από 25%-40%, ενώ σε μια μελέτη με πληθυσμό από την Ασία και τα νησιά του Ειρηνικού βρέθηκε ότι ήταν ιδιοπαθής στο 19% των περιστατικών. Τα ποσοστά επίπτωσης για την VTE είτε παρέμειναν σταθερά είτε είχαν μία μικρή αύξηση από το 1981 έως το 2000, ωστόσο από το 2000 και μετά παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του ποσοστού εμφάνισης VTE, κυρίως λόγω της αυξανόμενης εκδήλωσης PE (Εικόνα 30). Οι παρατηρούμενες αυξήσεις πιθανά αντανακλούν και στις βελτιωμένες τεχνικές απεικόνισης (πνευμονική αγγειογραφία/MRI) (Heit 2015).



**Εικόνα 30.** Τάσεις στη συχνότητα επίπτωσης των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στη διάρκεια του χρόνου (*the Worcester VTE study. Am. J. Med.* 2014; 127:829–839, από Heit 2015).

## 2.3 Μηχανισμός αιμόστασης

Στα σημεία της αγγειακής βλάβης, η ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία υψηλών συγκεντρώσεων θρομβίνης που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και συμβάλλουν στον σχηματισμό του θρόμβου. Το σύστημα ελέγχεται από αρκετούς αντιπηκτικούς μηχανισμούς, διασφαλίζοντας έτσι τον περιορισμό της διαδικασίας στην συγκεκριμένη περιοχή και την μη επέκταση του σχηματιζόμενου θρόμβου. Η ενεργοποίηση του συστήματος πήξης ξεκινά με την έκθεση του ιστικού παράγοντα (TF), την επακόλουθη σύνδεσή του με τον παράγοντα VII (FVII) και την ενεργοποίησή του σε FVIIa. Το σύμπλοκο TF-FVIIa ενεργοποιεί τον παράγοντα IX (FIX) και τον παράγοντα X (FX). Οι αντιδράσεις που ακολουθούν λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδικών μεμβρανών, που εκτίθενται στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, στα οποία και συνδέονται οι πρωτεΐνες της πήξης σχηματίζοντας ενεργά σύμπλοκα. Ο FIXa συνδέεται με τον συμπαράγοντά του FVIIIa σχηματίζοντας το σύμπλεγμα τενάσης (FIXa-FVIIIa), το οποίο προκαλεί περαιτέρω ενεργοποίηση του FX. Τελικά ο FXa μαζί με τον FVa σχηματίζουν το σύμπλεγμα της προθρομβινάσης (FXa-FVa), που μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη (Εικόνα 31). Στην όλη διαδικασία σημαντικό ρόλο παίζουν οι ενεργοποιημένοι παράγοντες FVIIIa και FVa, οι οποίοι δρουν ως συμπαράγοντες για τους FIXa και FXa, αντίστοιχα.



**Εικόνα 31.** Μηχανισμός αιμόστασης. Οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα στην επιφάνεια κυτταρικών μεμβρανών, όπου τα ένζυμα και οι συμπαράγοντες σχηματίζουν σύμπλοκα, που μετατρέπουν αποτελεσματικά τα αντίστοιχα προενζυμικά υποστρώματα τους σε ενεργά ένζυμα (Dahlback 2008).

Χωρίς τους συμπαράγοντες αυτούς και την αρνητικά φορτισμένη φωσφολιπιδική επιφάνεια τα δύο ένζυμα FIXa και FXa έχουν μικρή αποτελεσματικότητα δράσης. Η αρχική παραγόμενη ποσότητα θρομβίνης ενεργοποιεί εκ νέου το σύστημα πήξης, προκαλώντας την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων FVIIIa και FVa, με επακόλουθο την ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή θρομβίνης. Ολόκληρο το σύστημα έχει σχεδιαστεί για να παρέχει μαζική ενίσχυση στο αρχικό ερέθισμα και εάν δεν ελεγχθεί κατάλληλα, θα επεκτείνει τον σχηματισμό θρομβίνης σε όλο το αγγειακό σύστημα (Dahlback 2008).

Ο απαραίτητος έλεγχος επιτυγχάνεται με αρκετούς αντιπηκτικούς μηχανισμούς και σε όλα τα επίπεδα του συστήματος. Ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI) ρυθμίζει την ίδια την έναρξη της πήξης. Δεσμεύει και αναστέλλει τον νεοσχηματισμένο FXa που απελευθερώνεται από το σύμπλεγμα TF-FVIIa. Όλα τα ενεργοποιημένα ένζυμα αναστέλλονται από την Αντιθρομβίνη III (ATIII), ειδικά όταν δεν συμπλέκονται με τους αντίστοιχους συμπαράγοντές τους. Ένας άλλος μηχανισμός ελέγχου είναι το σύστημα πρωτεΐνης C (PC), υπεύθυνο για τον αποτελεσματικό έλεγχο των FVIIIa και FVa. Τα περισσότερα γενετικά ελαττώματα που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν το σύστημα αυτό.

## **2.4 Συγγενής θρομβοφιλία**

Ο όρος συγγενής θρομβοφιλία καλύπτει μια σειρά από κληροδοτούμενες καταστάσεις. Η παρουσία του Factor V Leiden και η μετάλλαξη της προθρομβίνης στη θέση 20210 είναι οι πιο κοινές θρομβοφιλικές καταστάσεις στην Καυκάσια φυλή. Οι άλλες βασικές συγγενείς θρομβοφιλίες περιλαμβάνουν την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, την ανεπάρκεια της πρωτεΐνης S (PrS) και την ανεπάρκεια της Αντιθρομβίνης III.

### **2.4.1 Έλλειψη Αντιθρομβίνης III (ATIII)**

Ήδη από το 1905, ο Morawitz πρότεινε την έννοια της Αντιθρομβίνης III (ATIII), ως ενζύμου που μπλοκάρει την δραστηριότητα της θρομβίνης μετά τον σχηματισμό του θρόμβου, ωστόσο μόλις το 1963 έγινε εφικτή η δυνατότητα ελέγχου της έλλειψης της

ΑΤΙΙΙ στο πλάσμα. Το 1965 ο *Egeberg* ανέφερε την παρουσία ανεπάρκειας ΑΤΙΙΙ σε μια οικογένεια με πολλά μέλη που έπασχαν από φλεβική θρόμβωση.

Η ΑΤΙΙΙ είναι μια πολυλειτουργική σερπίνη, που αναστέλλει ουσιαστικά όλα τα ενεργά ένζυμα του μηχανισμού πήξης. Το γονίδιο της ΑΤ-ΙΙΙ έχει εντοπισθεί στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 1. Κληρονομείται με επικρατή αυτοσωμικό τρόπο. Από μόνη της, η ΑΤΙΙΙ είναι αργός αναστολέας, αλλά η οικογένεια των γλυκοζαμινογλυκανών της θεικής ηπαρίνης (HS) που υπάρχει στο ανέπαφο ενδοθήλιο διεγείρει την ανασταλτική της ιδιότητα. Η ηπαρίνη είναι ένας ιδιαίτερα αποτελεσματικός διεγέρτης της δραστηριότητας της ΑΤΙΙΙ και χρησιμοποιείται ως αντιπηκτικό για περισσότερα από 70 χρόνια. Η περιοχή δέσμευσης ΑΤΙΙΙ στην ηπαρίνη έχει εντοπιστεί σε μια αλληλουχία πεντασακχαρίτη. Αυτή η γνώση αποτέλεσε τη βάση για την ανάπτυξη νέων συνθετικών πεντασακχαριδικών φαρμάκων που περιέχουν αυτήν την αλληλουχία που διεγείρουν την αντιπηκτική δράση της ΑΤΙΙΙ (*Petitou et al. 2003; Dahlback 2008*). Ένας μεγάλος αριθμός από διαφορετικές μεταλλάξεις (*missense, nonsense* και ελλείψεις) έχουν περιγραφεί στο γονίδιο της ΑΤΙΙΙ, θεωρούνται υπεύθυνες είτε για λειτουργικά ελαττώματα είτε για εμφάνιση χαμηλών επιπέδων της πρωτεΐνης στο πλάσμα.

Υπάρχουν δύο τύποι έλλειψης της ΑΤΙΙΙ: α) ο τύπος-Ι, που αντανάκλα σε ποσοτική διαταραχή και β) ο τύπος-ΙΙ, στον οποίο ανήκουν οι ποιοτικές διαταραχές που οφείλονται σε μεταβολές στην αλληλουχία των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο τύπος-ΙΙ περιλαμβάνει τρεις υποκατηγορίες ανάλογα με τη θέση της μετάλλαξης στο πρωτεϊνικό μόριο: i) τον τύπο Ια, με διαταραχή στο υπεύθυνο για την αντιθρομβινική δράση τμήμα του μορίου, ii) τον τύπο Ιβ, με διαταραχή στο υπεύθυνο για την σύνδεση με την ηπαρίνη τμήμα του μορίου, και iii) τον τύπο Ιγ, που αποτελεί συνδυασμό ποσοτικής και ποιοτικής διαταραχής. Δεν έχει περιγραφεί περίπτωση ομοζυγωτίας τύπου-Ι για την ΑΤΙΙΙ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πλήρης ανεπάρκεια ΑΤΙΙΙ δεν είναι συμβατή με τη ζωή. Αυτό υποστηρίζεται και από πειράματα που έγιναν σε *knock out* ποντίκια. Έχουν ωστόσο περιγραφεί περιστατικά ομοζυγωτίας τύπου-ΙΙ με μεταλλάξεις στην περιοχή δέσμευσης της ηπαρίνης στην ΑΤΙΙΙ. Η ετερόζυγη ανεπάρκεια ΑΤΙΙΙ τύπου-Ι είναι σχετικά σπάνια (περίπου 1/2000), αλλά συσχετίζεται με περίπου 10 φορές περισσότερο αυξημένο κίνδυνο θρόμβωσης. Συναντάται στο 1-2% των ασθενών με θρόμβωση (*Dahlback 2008*).

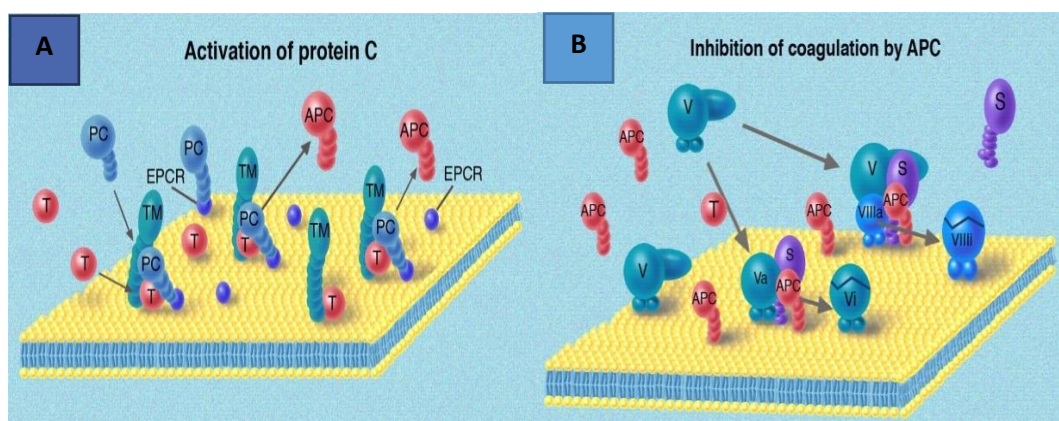
## 2.4.2 Έλλειψη Protein C και Protein S

Η πρωτεΐνη C (PC) απομονώθηκε και αναγνωρίστηκε ως βιταμίνο-K εξαρτώμενη πρωτεΐνη από τον *Stenflo* το 1976, ενώ σύντομα αποδείχθηκαν οι αντιπηκτικές της ιδιότητες, μετά από την ενεργοποίησή της από τη θρομβίνη. Η θρομβίνη ωστόσο δεν είναι ισχυρός ενεργοποιητής της πρωτεΐνης C, και μόνο η ανακάλυψη της θρομβομοντουλίνης (TM) (*Owen & Esmon 1981*) οδήγησε στην κατανόηση του όλου συστήματος. Η TM βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και η θρομβίνη συνδέεται μαζί της με υψηλή συγγένεια. Η σύνδεση αυτή προκαλεί απώλεια της προπηκτικής δράσης της θρομβίνης, ενώ την βοηθά στην ενεργοποίηση της PC (Εικόνα 32A). Η ταυτοποίηση του ενδοθηλιακού υποδοχέα της PC (EPCR) αποκάλυψε τη σημαντική του δράση στην ενεργοποίησή της, καθότι συνδέεται με την περιοχή Gla της πρωτεΐνης και προωθεί τη σύνδεσή της με το σύμπλεγμα θρομβίνης-θρομβομοντουλίνης προς σχηματισμό της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης C (APC) (Εικόνα 32B). Η παραγόμενη APC έχει σχετικά μεγάλο χρόνος ημιζωής και αναστέλλεται αργά είτε από τον αναστολέα της πρωτεΐνης C (PCI) είτε από την αντιθρυψίνη. Η APC αναστέλλει την πήξη του αίματος μέσω της διάσπασης ενός αριθμού πεπτιδικών δεσμών στους FVIIIa και FVa, οι οποίοι είναι από τους σημαντικούς συμπαράγοντες του μηχανισμού πήξης. Στους FVIIIa και FVa υπάρχουν θέσεις ευαίσθητες στη δράση της APC (FVIIIa:R336/R562 και FVa:R306/R506/R679), έτσι ώστε η δράση της APC να οδηγεί σε απώλεια θέσεων δέσμευσης για τα ένζυμα FIXa και FXa, αντίστοιχα, με επακόλουθη διάσπαση των FVIIIa και FVa (*Dahlback 2008*).

Το 1981, οι *Griffin et al.* ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν την ετερόζυγη ανεπάρκεια της πρωτεΐνης C, σε οικογένεια με ιστορικό υποτροπιάζουσας θρόμβωσης. Λίγα χρόνια αργότερα, η ανεπάρκεια πρωτεΐνης C (σε ομοζυγωτία) βρέθηκε ότι συσχετίζεται με την σοβαρή νεογνική κεραυνοβόλο πορφύρα. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός ελλείψεων πρωτεΐνης C (τύπου-I ή τύπου-II) έχουν περιγραφεί και το γενετικό τους υπόβαθρο έχει διευκρινιστεί. Η ανεπάρκεια τύπου-I αναφέρεται σε περιπτώσεις με μειωμένη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ενώ στις περιπτώσεις με ανεπάρκεια τύπου-II η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι φυσιολογική αλλά η δραστηριότητα χαμηλή.

Η πρωτεΐνη S (PrS) δρα σαν συμπαράγοντας της APC. Κυκλοφορεί στο πλάσμα σε δύο μορφές, σαν ελεύθερη PrS (συμπαράγοντας της APC) και σαν μέρος ενός συμπλόκου, το οποίο σχηματίζει με την *C4b-binding protein* (C4BP) που αποτελεί ρυθμιστή του συμπληρώματος (*Dahlback 2008*). Η ανεπάρκειά της πρωτεΐνης-S είναι

αυτοσωμικού χαρακτήρα. Έχουν περιγραφεί τρεις τύποι ανεπάρκειας. Ο τύπος-I όπου τα επίπεδα τόσο της ελεύθερης όσο και της ολικής πρωτεΐνης S είναι μειωμένα, ο τύπος-II που συνδέεται με λειτουργική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης (έχει περιγραφεί σε λίγες περιπτώσεις) και ο τύπος-III στον οποίο η ελεύθερη μορφή της πρωτεΐνης S εμφανίζεται με χαμηλά επίπεδα ενώ η συνδεδεμένη με την C4BP (και η ολική πρωτεΐνη S) είναι φυσιολογική. Ο έλεγχος των επιπέδων της ελεύθερης πρωτεΐνης S θεωρείται υψηλότερης διαγνωστικής αξίας από αυτόν της ολικής (Dahlback 2008; Segers & Castoldi 2009).

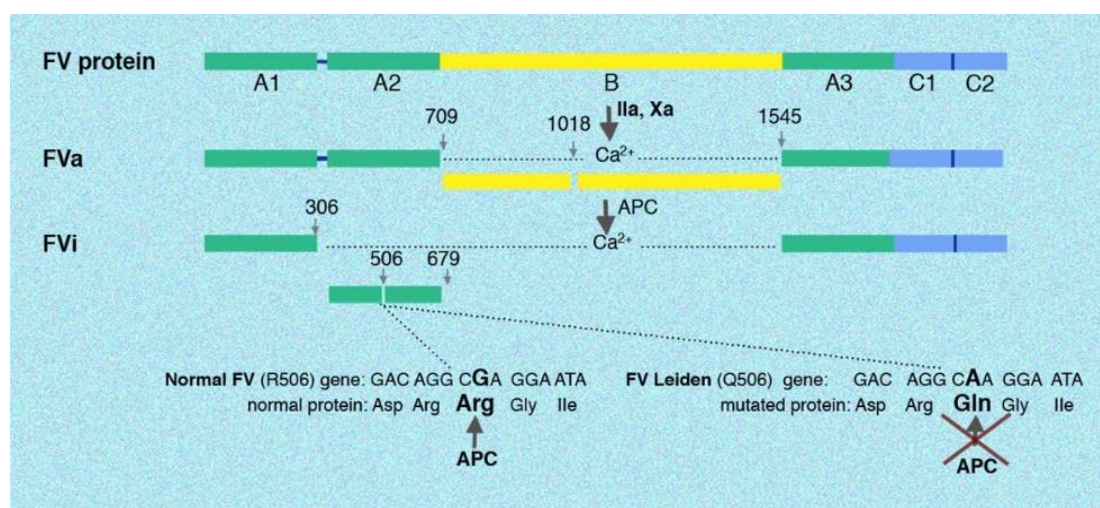


**Εικόνα 32.** Ενεργοποιημένη Protein C (APC). **A)** Μηχανισμός ενεργοποίησης της Protein C (PC) από την θρομβομοντουλίνη (TM). Η TM είναι παρούσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και δρα ως συμπαράγοντας της θρομβίνης στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης C. Το ενδοθήλιο φέρει τον ενδοθηλιακό υποδοχέα της PC (Endothelial Protein C Receptor/EPCR), ο οποίος δεσμεύει την PC στην περιοχή Gla και βοηθά στην πρόσδεσή της στο σύμπλοκο T/TM. **B)** Αναστολή της πήξης από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC). Αποδόμηση των FVa and FVIIIa. Οι ενεργοποιημένοι FVa και FVIIIa διασπώνται και αναστέλλονται από την APC με αντιδράσεις που περιλαμβάνουν και συμπαράγοντες της APC. Η πρωτεΐνη S (PS) και η APC αλληλεπιδρούν στην επιφάνεια της μεμβράνης για την αναστολή του FVa, ενώ η ρύθμιση του FVIIIa συμπεριλαμβάνει και τη δράση του FV, ο οποίος χρησιμεύει ως συμπαράγοντας στην APC (Dahlback 2008).

#### 2.4.3 APC-R και FV Leiden

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η δράση των FVa και FVIIIa έχει βασικό ρόλο στον μηχανισμό πήξης. Ως εκ τούτου, η δραστηριότητά τους πρέπει να ρυθμιστεί αυστηρά. Αυτό επιτυγχάνεται από το σύστημα της πρωτεΐνης C· η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C (APC) με τους συμπαράγοντες πρωτεΐνη S και FV, καταλύει την πρωτεολυτική αδρανοποίηση των FVa και FVIIIa. Το 1993 οι Dahlback *et al.* περιέγραψαν την περίπτωση ενός ασθενούς του οποίου το πλάσμα δεν έδειξε την αναμενόμενη παράταση του χρόνου πήξης (όπως προσδιορίστηκε σε δοκιμασία βασισμένη στο aPTT) μετά την προσθήκη κεκαθαρμένης APC. Αυτό το *in vitro* φαινόμενο, που χαρακτηρίζεται από κακή αντιπηκτική απόκριση στο πλάσμα μετά την προσθήκη

εξωγενούς APC, ονομάστηκε ‘αντίσταση στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C’ (*APC Resistance/APC-R*). Ενδιαφέρον προκάλεσε το γεγονός του οικογενειακού ιστορικού φλεβικών θρομβώσεων με την εμφάνιση του ίδιου φαινοτύπου σε αρκετούς συγγενείς του ασθενούς, γεγονός που υποδήλωνε τη γενετική βάση του φαινομένου και ένα κυρίαρχο αυτοσωμικό πρότυπο κληρονομικότητας. Εξαιτίας της διόρθωσης που παρατηρήθηκε μετά την προσθήκη φυσιολογικού πλάσματος στο πλάσμα του ασθενούς, θεωρήθηκε ότι η αντίσταση στην APC προκλήθηκε από την ανεπάρκεια ενός συμπαράγοντα της APC που δεν είχε αναγνωριστεί στο παρελθόν. Τελικά αναγνωρίστηκε η μετάλλαξη στο εξόνιο 10 του FV στη θέση 1691 (FV Leiden), που οφείλεται σε αντικατάσταση της Arg506 από μία Gln (Εικόνα 33). Αυτή η αλλαγή επιβραδύνει την αδρανοποίηση του παράγοντα Va από την APC, δηλαδή ο παράγοντας V ‘ανθίσταται’ στην αποικοδόμησή του από την APC, δημιουργώντας έτσι έναν γενετικό παράγοντα κινδύνου, που σε συνδυασμό και με περιβαλλοντικούς παράγοντες κινδύνου ενέχει αυξημένο κίνδυνο για φλεβική θρόμβωση. Η μετάλλαξη είναι παρούσα στο 95% των οικογενειών με APC-R, γεγονός που την καθιστά ως την κύρια αιτία της κληρονομικής αντίστασης στην APC (*Dahlback 2008; Castoldi & Rosing 2010; Van Cottetal. 2016*).



**Εικόνα 33.** Δομή του FV Leiden. Ο FV κυκλοφορεί ως πρωτεΐνη υψηλού μοριακού βάρους μονής αλυσού. Η θρομβίνη (FXa) διασπά έναν αριθμό πεπτιδικών δεσμών στην αλυσίδα, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της περιοχής B και τη δημιουργία του FVa. Τρεις πεπτιδικοί δεσμοί στον FVa διασπώνται από την APC (Arg306, Arg506 και Arg679) με αποτέλεσμα την αναστολή της δραστηριότητας του FVa (*Dahlback 2008*).

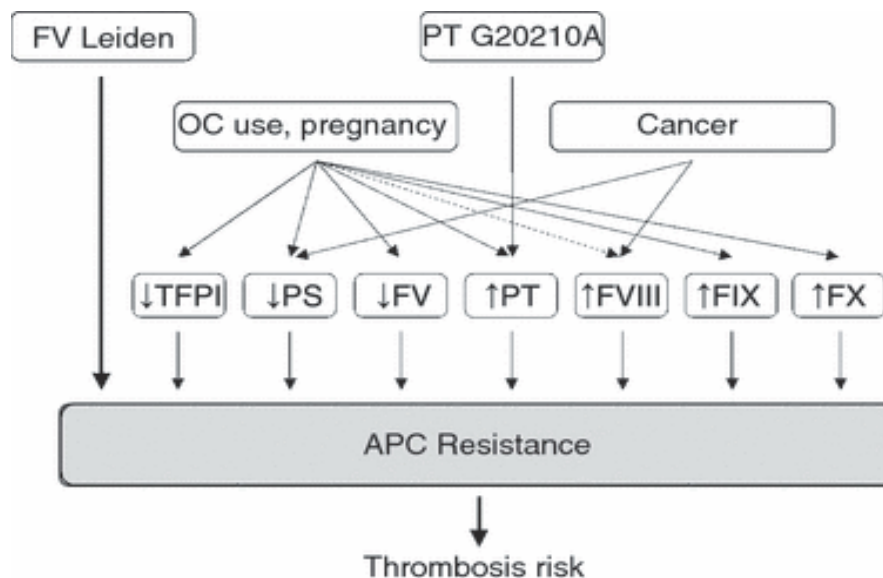
Η μετάλλαξη FVG1691A (FV Leiden) είναι αρκετά συχνή στον γενικό πληθυσμό (Καυκάσια φυλή) ενώ εμφανίζεται σπανιότερα στους εντόπιους πληθυσμούς της



Ασίας, της Αφρικής, της Αυστραλίας και της Λατινικής Αμερικής. Περίπου το 5% των Ευρωπαίων φέρει αυτή τη μετάλλαξη, η οποία μεταφράζεται σε περίπου 26 εκατομμύρια φορείς μόνο στην Ευρώπη.

Ο FV Leiden βρέθηκε στο 20% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση και έως και στο 50% όλων των θρομβοφιλικών οικογενειών. Ο κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης αυξάνεται 7 φορές στους ετερόζυγους φορείς και 80 φορές στους ομόζυγους φορείς της μετάλλαξης. Ωστόσο, οι περισσότεροι φορείς του FVL δεν αναπτύσσουν ποτέ φλεβική θρόμβωση, κάτι που δεν ισχύει για αυτούς που φέρουν επιπλέον επιβαρυντικούς παράγοντες, κληρονομικούς ή επίκτητους (ανεπάρκεια πρωτεϊνών C/S, μετάλλαξη προθρομβίνης G20210A, χρήση αντισυλληπτικών, ακινητοποίηση κ.ά.), οι οποίοι επιτείνουν τη δράση του FVL (Dahlback 2008; Segers & Castoldi 2009; Lijfering et al. 2009; Van Cott et al. 2016).

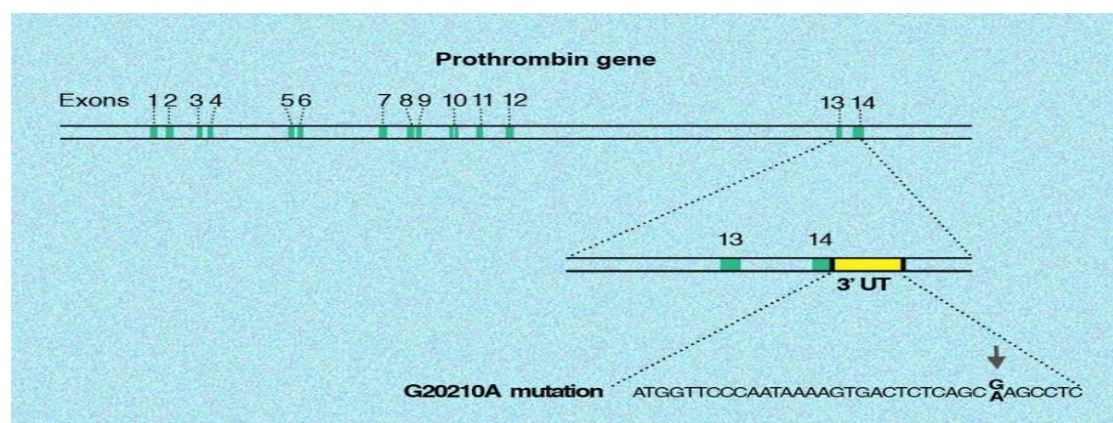
Δεν φέρουν όλα τα άτομα με APC-R τη μετάλλαξη FVL, έχουν περιγραφεί και άλλα αίτια αντίστασης στην ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Οι υποκείμενες αιτίες μπορεί να είναι γενετικές ή επίκτητες, όπως τα αυξημένα επίπεδα του FVIII, η παρουσία αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων, η από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών, η κύηση κ.ά. (Εικόνα 34) (Castoldi & Rosing 2010; Van Cott et al. 2016).



**Εικόνα 34.** Η αντίσταση APC ως σύνθετος φαινότυπος. Εκτός από τον FV Leiden, αρκετοί άλλοι γενετικοί και επίκτητοι παράγοντες συμβάλλουν στην εμφάνιση της APC-R στο πλάσμα. Οι περισσότεροι επηρεάζουν τα επίπεδα των παραγόντων και των αναστολέων του μηχανισμού πήξης (OC: από του στόματος αντισυλληπτικά; TFPI: αναστολέας του ιστικού παράγοντα; PS: πρωτεΐνη S; PT: προθρομβίνη) (Castoldi & Rosing 2010).

#### 2.4.4 Μετάλλαξη προθρομβίνης FII20210GA

Λίγα χρόνια μετά την ανακάλυψη της αντίστασης στην APC και του FVL, οι *Poort et al. (1996)* στο *Leiden* εντόπισαν μια ακόμη σημειακή μετάλλαξη, ως παράγοντα κινδύνου για τη φλεβική θρόμβωση. Εντοπίστηκε στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου της προθρομβίνης στη θέση 20210 (G>A), χωρίς να αλλάζει τη δομή του μορίου (Εικόνα 35). Συσχετίστηκε με ελαφρώς αυξημένα επίπεδα προθρομβίνης στο πλάσμα, μπορεί ωστόσο να οδηγήσει σε καταστάσεις υπερπηκτικότητας, με 2-4 φορές πιο αυξημένο κίνδυνο φλεβικής θρόμβωσης δια βίου, δεν φαίνεται όμως να συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο υποτροπών. Και αυτός ο πολυμορφισμός φαίνεται να είναι σημαντικός όταν συσχετίζεται με άλλους συγγενείς (FV Leiden) ή επίκτητους παράγοντες θρομβωτικού κινδύνου (από του στόματος αντισυλληπτική θεραπεία, ακινητοποίηση, χειρουργική επέμβαση, κ.ά.). Η πλειονότητα των φορέων της μετάλλαξης της προθρομβίνης είναι ετεροζυγώτες, η ομόζυγη κατάσταση σπάνια παρατηρείται. Ο επιπολασμός της μετάλλαξης ποικίλλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή· εντοπίζεται στο 2% έως 4% των υγιών ατόμων στη νότια Ευρώπη, ποσοστό διπλάσιο από αυτό της βόρειας Ευρώπης. Όπως και ο FVL, είναι σπάνια στους πληθυσμούς της Ανατολικής Ασίας, της Αφρικής και στους αυτόχθονες πληθυσμούς της Αυστραλίας και της Αμερικής. Στις δυτικές κοινωνίες εντοπίζεται στο 6-8% των ασθενών με φλεβική θρόμβωση (*Bertina 1998; Dahlback 2008*).



Εικόνα 35. Η μετάλλαξη 20210GA στο γονίδιο της προθρομβίνης (FII) στη θέση 20210 (*Bertina 1998*).

#### 2.4.5 Σπανιότεροι θρομβοφιλικόι παράγοντες

Όσον αφορά τους σπανιότερους θρομβοφιλικούς παράγοντες, όπως η παρουσία δυσινωδογοναιμίας, τα αυξημένα επίπεδα TAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) και PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1), και η έκπτωση των t-PA

(tissue Plasminogen Activator) και TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), ελάχιστα στοιχεία είναι διαθέσιμα (κυρίως ως case reports). Δεν αποτελούν μέρος του συνήθους θρομβοφιλικού ελέγχου και εξαιτίας του χαμηλού επιπολασμού τους δεν είναι δυνατό να διενεργηθούν μεγάλες μελέτες, ενώ η επιροή τους στην εμφάνιση σοβαρού επεισοδίου και στον κίνδυνο υποτροπής είναι υπό συζήτηση.

Τα υψηλά επίπεδα των FIX, FXI και TAFI δεν συνιστούν ανεξάρτητους παράγοντες κινδύνου από μόνα τους, παρά μόνο όταν συσχετίζονται και με αυξημένα επίπεδα του FVIII. Η εμμένουσα αύξηση των επιπέδων του FVIII συνιστά αυξημένο κίνδυνο υποτροπιάζουσας θρομβοεμβολής (σε αρκετές μελέτες έχει συσχετιστεί ο κίνδυνος θρόμβωσης με την αυξημένη συγκέντρωση του FVIII (*Lijfering et al. 2009; Makris 2009*)).

Η έκπτωση του HC-II (*Heparin co-factorII* / αναστολέας της θρομβίνης αλλά όχι και των λοιπών πρωτεϊνών του μηχανισμού πήξης), επίσης δεν έχει συσχετιστεί με εμφάνιση ή υποτροπή θρομβοεμβολικού επεισοδίου, εκτός εάν συνδυάζεται με διαταραχή της ATIII ή με κάποιον από τους βασικούς κληρονομούμενους παράγοντες κινδύνου.

Ο ρόλος της έκπτωσης της TM (*Thrombomodulin*) δεν έχει αποσαφηνιστεί. Είναι γνωστό ότι σχηματίζει σύμπλοκο με την παραγόμενη θρομβίνη εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση αυτής με το Ινωδογόνο. Είναι επίσης γνωστές οι αντιπηκτικές και προινωδολυτικές ιδιότητες του συστήματος θρομβίνης-TM-PC στην πρόληψη των θρομβοεμβολικών επεισοδίων. Ωστόσο τα πειστικότερα στοιχεία για την σχέση των χαμηλών επιπέδων TM και θρόμβωσης προέρχονται μόνο από μελέτες σε ζώα.

Η Lp(a) (*Lipoprotein a*), λόγω της υψηλής δομικής της ομολογίας με το πλασμινογόνο, έχει βρεθεί ότι αναστέλλει την ινωδόλυση, καθότι ανταγωνίζεται το πλασμινογόνο στην διαδικασία της σταθεροποίησης του ινώδους. Ωστόσο, ο κίνδυνος θρομβωτικού επεισοδίου που αποδίδεται σε αυξημένες τιμές Lp(a) είναι μέτριος (19,8%) και ως εκ τούτου ο ρόλος της ως παράγοντα κινδύνου για εκδήλωση VTE αμφισβητείται.

Το *Sticky Platelet Syndrome* (SPS) είναι μια αυτοσωμική επικρατούσα διαταραχή των αιμοπεταλίων που συσχετίζεται τόσο με αρτηριακή όσο και με φλεβική θρόμβωση. Χαρακτηρίζεται από εκτενή συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων σε πλούσιο σε αιμοπετάλια πλάσμα μετά τη προσθήκη αιμοπεταλιακών διεγερτών. Πρόκειται για συγγενή θρομβοκυττοπάθεια, που συχνά είναι υποδιαγνωσμένη. Οι ασθενείς παρουσιάζουν φλεβικά και αρτηριακά θρομβωτικά επεισόδια και πιθανά και θρόμ-

βωση σε ασυνήθεις θέσεις (εγκεφαλικοί κόλποι, αμφιβληστροειδής κ.ά.). Αν και πολλές μελέτες για το SPS έχουν δημοσιευτεί, τα επιδημιολογικά δεδομένα παραμένουν περιορισμένα και ο πραγματικός επιπολασμός του στον γενικό πληθυσμό είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστος. Ο επιπολασμός του SPS στην εκδήλωση VTE δεν έχει ξεκαθαριστεί, δεδομένου ότι οι διαθέσιμες μελέτες διενεργήθηκαν σε επιλεγμένους πληθυσμούς (π.χ. ασθενείς με ανεξήγητα επεισόδια θρόμβωσης) (*Salvagno et al. 2018*).

## 2.5 Επίκτητη θρομβοφιλία

Ο όρος θρομβοφιλία περιλαμβάνει επίσης και τις καταστάσεις υπερπηκτικότητας που προκαλούνται από επίκτητες διαταραχές της αιμόστασης. Οι επίκτητες διαταραχές μπορούν να προάγουν μια προθρομβωτική κατάσταση διαφόρων μηχανισμών που προκαλούν διαταραχές στην ομοιοστατική ρύθμιση της πήξης του αίματος.

Επίκτητες διαταραχές που σχετίζονται με τη θρομβοφιλία είναι το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (APS), τα παροδικά ή μόνιμα αυξημένα επίπεδα των προπηκτικών παραγόντων, η επίκτητη διαταραχή των φυσικών αντιπηκτικών μηχανισμών (π.χ. επίκτητη APC-R), η ακινητοποίηση, οι χειρουργικές επεμβάσεις, η διάχυτη ενδαγγειακή πήξη και διάφοροι προφλεγμονώδεις και αυτοάνοσοι μηχανισμοί. Νοσήματα, όπως ο καρκίνος, η ηπατική νόσος, τα μυελοϋπερπλαστικά νέοπλάσματα, η αυτοάνοση θρομβοπενία, η δρεπανοκυτταρική νόσος, η υπερομοκυστεϊναιμία, η θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος, η χρόνια νεφρική νόσος, η PNH, κ.ά., αυξάνουν τον κίνδυνο θρόμβωσης.

Σχετικά με την φαρμακευτική αγωγή, σημαντικούς παράγοντες κινδύνου αποτελούν η χημειοθεραπεία, και η ορμονοθεραπεία, η από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών και η θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης για τις γυναίκες. Το κάπνισμα, η παχυσαρκία, η αύξηση της ηλικίας, η κύηση και η λοχεία αυξάνουν επίσης τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικού επεισοδίου (*Armstrong et al. 2014; Heit 2015; Stevens et al. 2016*).

## 2.6 Υποτροπιάζουσα VTE

Ο κίνδυνος υποτροπής μετά από ένα πρώτο επεισόδιο VTE κυμαίνεται στο 5–7% ετησίως και είναι ~50 φορές υψηλότερος από ό,τι σε ασθενείς χωρίς προηγούμενο επεισόδιο VTE. Οι ασθενείς που έχουν ήδη εκδηλώσει VTE διατρέχουν πάντα τον

κίνδυνο υποτροπής, ανεξάρτητα από τον χρόνο που έχει παρέλθει από την εκδήλωση του πρώτου επεισοδίου. Ωστόσο, ο κίνδυνος υποτροπής μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Είναι σημαντικό να γίνει διάκριση μεταξύ θρομβοεμβολικού επεισοδίου που εκδηλώθηκε παρουσία κάποιου επίκτητου παράγοντα κινδύνου παροδικού (πρόσφατη χειρουργική επέμβαση, κύηση, κακοήθεια κ.ά.) ή όχι (ιδιοπαθής VTE), καθώς ο κίνδυνος υποτροπής διαφέρει.

Δεν εμφανίζουν όλοι οι ασθενείς τον ίδιο κίνδυνο υποτροπής. Ακόμη και οι ασθενείς με κακοήθεια φαίνεται να διαφέρουν ως προς τον κίνδυνο υποτροπής ανάλογα με την βαρύτητα της νόσου. Καθένας από τους επιμέρους παράγοντες κινδύνου, είναι σημαντικός για την αξιολόγηση του κινδύνου υποτροπιάζουσας VTE, αλλά από μόνος του κανένας από αυτούς δεν δικαιολογεί μια γενική σύσταση όσον αφορά τη διάρκεια της θεραπείας με αντιπηκτική αγωγή (Πίνακας 7). Ο κίνδυνος υποτροπιάζουσας θρομβοεμβολής είναι διπλάσιος έως και τετραπλάσιος σε ασθενείς με ενεργό καρκίνο και 4,2 φορές πιο αυξημένος σε ασθενείς υπό χημειοθεραπεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, για την ακριβέστερη πρόβλεψη του κινδύνου υποτροπής λαμβάνεται υπόψιν ο συνδυασμός των παραγόντων κινδύνου και όχι η παρουσία ενός μεμονωμένου παράγοντα κινδύνου (*Eichinger et al. 2010; Fahrni et al. 2015*).

Η συνέχιση της αντιπηκτικής αγωγής μετά την αρχική εκδήλωση VTE θα μειώσει τον κίνδυνο υποτροπής, αλλά και αυτή πρέπει να σταθμίζεται προσεκτικά λόγω του κινδύνου αιμορραγίας. Είναι σημαντικό να αξιολογηθεί ο κίνδυνος υποτροπής για κάθε ασθενή ξεχωριστά, προκειμένου να εκτιμηθεί επαρκώς ο εν λόγω κίνδυνος έναντι αυτού από τη μακροχρόνια λήψη αντιπηκτικής αγωγής.

Για παράδειγμα, για έναν άνδρα ασθενή 59 ετών, που έχει ήδη λάβει αντιπηκτική αγωγή για ένα τρίμηνο λόγω ιδιοπαθούς VTE και χωρίς συν-νοσηρότητες, η απόφαση βασίζεται στην πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής και στον κίνδυνο αιμορραγικών επιπλοκών. Εάν υπολογισθεί ότι ο απόλυτος κίνδυνος υποτροπής είναι 2-4% και ληφθεί υπόψιν και ο σχετικός κίνδυνος (x2,8) λόγω του ανδρικού φύλου, τότε ο κίνδυνος αυξάνει σε 6%-11% ετησίως. Σε περίπτωση που συνυπάρχουν και άλλοι παράγοντες κινδύνου (Πίνακας 5), ο βασικός κίνδυνος θα πρέπει να πολλαπλασιαστεί και με αυτούς (HR), προκειμένου να εκτιμηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο κίνδυνος υποτροπής. Στο παράδειγμα, ένας εκτιμώμενος κίνδυνος υποτροπής 6%-11% ετησίως μπορεί να είναι λόγος να συνεχιστεί η αντιπηκτική αγωγή, εάν ο κίνδυνος μείζονος

αιμορραγίας είναι χαμηλός. Σε γενικές γραμμές κίνδυνος υποτροπής <3% μπορεί να θεωρηθεί ασφαλής για τη διακοπή της αντιπηκτικής αγωγής.

<b>Παράγοντας κινδύνου</b>	<b>Relative risk/ HR (95% CI)</b>
Απρόκλητη εγγύς DVT (Unprovoked proximal DVT)	2.3 (1.8–2.9)
Παχυσαρκία	1.6 (1.1–2.4)
Φύλο (άνδρες)	2.8 (1.4–5.7)
Αυξημένα D-Dimer	2.6 (1.9–3.5)
Υπολειμματική θρόμβωση	1.5 (1.1–2.0)
Συγγενής θρομβοφιλία	1.5 (1.1–1.9)
Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	2.5 (1.4–4.2)
Αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα	2.4 (1.3–4.1)
Καταγωγή από Ασία και νησιά του Ειρηνικού	0.7 (0.5–0.9)

**Πίνακας 5.** Παράγοντες κινδύνου για υποτροπιάζον θρομβοεμβολικό επεισόδιο/Relative risk (Fahrni 2015) (τροποποιημένο).

Σε περίπτωση παράτασης της αντιπηκτικής αγωγής ο κίνδυνος υποτροπής μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, ενώ ο κίνδυνος αιμορραγικού επεισοδίου σχετιζόμενου με τα αντιπηκτικά αυξάνεται. Η ανάγκη για δευτερογενή προφύλαξη πρέπει να επανεκτιμάται τακτικά, με βάση τους μεμονωμένους παράγοντες κινδύνου και τον εκτιμώμενο κίνδυνο υποτροπής. Η εξατομικευμένη εκτίμηση κινδύνου και η προσαρμοσμένη αντιπηκτική θεραπεία είναι ουσιαστικής σημασίας για την πρόληψη της υποτροπιάζουσας VTE (Fahrni et al. 2015).

## 2.7 Θεραπευτική αντιμετώπιση

Εφόσον υπάρχει υποψία VTE, η αντιπηκτική αγωγή θα πρέπει να ξεκινήσει αμέσως, εκτός εάν υπάρχει αντένδειξη. Εκτίμηση του κινδύνου συνιστάται να γίνεται σε όλους τους ασθενείς και πριν και κατά τη διάρκεια της αντιπηκτικής θεραπείας. Η απουσία παραγόντων κινδύνου θεωρείται ως χαμηλού κινδύνου για αιμορραγία, η παρουσία ενός παράγοντα θεωρείται ενδιάμεσου κινδύνου, και δύο ή περισσότερων ως υψηλού κινδύνου. Σε σύγκριση με τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου, οι ασθενείς μετρίου κινδύνου έχουν διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης μείζονος αιμορραγίας, ενώ οι ασθενείς υψηλού κινδύνου έχουν οκταπλάσιο κίνδυνο. Αυτό ισοδυναμεί με ετήσιο κίνδυνο μείζονος αιμορραγίας 0,8% για ασθενείς χαμηλού κινδύνου, 1,6% για ασθενείς μέτριου κινδύνου και μεγαλύτερο από 6,5% για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου.

Εκτός από χορήγηση αντιπηκτικών, μπορεί να απαιτούνται και άλλες πιο επιθετικές θεραπείες ανάλογα με την περίπτωση (πχ θρομβόλυση σε περίπτωση PE, χειρουργική επέμβαση/πνευμονική εμβολεκτομή, τοποθέτηση φίλτρου κάτω κοίλης φλέβας) (Bartholomew 2017). Η αντιπηκτική αγωγή ξεκινά στην οξεία φάση (πρώτες 7 ημέρες), και μπορεί να είναι μακροχρόνια (7 ημέρες-3 μήνες) ή παρατεταμένη (3 μήνες-επ' αόριστον). Συνήθης είναι η χρήση μη κλασματοποιημένης ηπαρίνης (UFH), ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους (LMWH), Fondaparinux, ανταγωνιστών της βιταμίνης K (βαρφαρίνη) και των νεώτερων αντιπηκτικών/DOACs (Direct Oral Anticoagulants).

Ηλικία >65 ετών	Ηπατική ανεπάρκεια
Αναιμία	Συχνές πτώσεις
Αντιαιμοπεταλιακή αγωγή	Χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών
Ιστορικό αιμορραγιών	Νεφρική ανεπάρκεια
Κατανάλωση αλκοόλ	Πρόσφατο χειρουργείο
Καρκίνος	Εγκεφαλικό επεισόδιο
Διαβήτης	Θρομβοκυττοπενία

**Πίνακας 6.** Παράγοντες κινδύνου για εμφάνιση αιμορραγικού επεισοδίου σε ασθενείς υπό αντιπηκτική αγωγή (Bartholomew 2017).

Η απόφαση για την επιλογή του αντιπηκτικού εξαρτάται από τις κλινικές ενδείξεις, την υποκείμενη κατάσταση του ασθενούς, την εκτίμηση του κινδύνου αιμορραγίας και κάποιες φορές (για μακροχρόνια χρήση) και από την προτίμηση του ίδιου του ασθενούς. Η μη κλασματοποιημένη ηπαρίνη, η LMWH, το Fondaparinux και τα DOACs (Rivaroxaban/Apixaban) έχουν εγκριθεί από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) για την οξεία φάση θεραπείας, ενώ τα DOACs και η βαρφαρίνη συνιστούν και αντιπηκτικές επιλογές για μακροχρόνια αγωγή. Σε ασθενείς με καρκίνο και κατά τη διάρκεια της κύησης συνιστάται η χρήση LMWH.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η διάρκεια της θεραπείας μετά τη διάγνωση εξαρτάται από τον κίνδυνο υποτροπής για τον κάθε ασθενή. Οι ασθενείς με ιδιοπαθή VTE έχουν κίνδυνο υποτροπής μεταξύ 25% και 30% για 5-10 χρόνια μετά το πρώτο επεισόδιο. Άλλοι παράγοντες κινδύνου για υποτροπή είναι υποκείμενες υπερπηκτικές καταστάσεις (πχ αντιφωσφολιπικό σύνδρομο και υποκείμενη ενεργός κακοήθεια), η τοποθέτηση φίλτρου IVC, τα αυξημένα επίπεδα D-Dimers (μετά τη διακοπή της αντιπηκτικής αγωγής), η προχωρημένη ηλικία, το ανδρικό φύλο, το αυξημένο BMI και η υπολειπόμενη θρόμβωση. Ασθενείς με αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, ομόζυγοι για τον παράγοντα V Leiden ή διπλά ετερόζυγοι για μετάλλαξη του παράγοντα V Leiden και του γονιδίου της προθρομβίνης συνιστάται να παίρνουν αντιπηκτική αγωγή για μεγάλο διάστημα. Η μεγάλης διάρκειας αντιπηκτική αγωγή συνιστάται επίσης σε ασθενείς με ενεργό καρκίνο και σε αυτούς που εμφανίζουν ανεξήγητη υποτροπιάζουσα VTE. Αν και ο κίνδυνος υποτροπής μειώνεται όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της αντιπηκτικής αγωγής, πρέπει να σταθμίζεται ο κίνδυνος αιμορραγίας έναντι του κινδύνου εμφάνισης νέου θρομβωτικού επεισοδίου (*Bartholomew 2017*).

Σχετικά με τον χρόνο διακοπής της αντιπηκτικής αγωγής, οι *Palereti et al. (2003)* πρότειναν ότι ο έλεγχος των D-Dimers μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για την εκτίμηση της διάρκειας της από του στόματος αντιπηκτικής αγωγής όσο και για τη πρόληψη της υποτροπιάζουσας φλεβικής θρομβοεμβολής. Σε μελέτη τους, αξιολόγησαν 599 ασθενείς με προηγούμενη VTE, στους οποίους έγινε επανειλημμένα έλεγχος των επιπέδων D-Dimers μετά τη διακοπή της από του στόματος αντιπηκτικής αγωγής (είχαν επίσης ελεγχθεί και για τις βασικές θρομβοφιλικές διαταραχές).



<b>Ασθενής</b>	<b>Οξεία φάση</b> (πρώτες 7 ημέρες)	<b>Μακροχρόνια αγωγή</b> (7 ημέρες - 3 μήνες)	<b>Παρατεταμένη αγωγή</b> (3 μήνες - επ' αόριστον)
Για τους περισσότερους ασθενείς	UFH, LMWH, Fondaparinux ή DOACs (Rivaroxaban ή Apixaban)	DOACs (Rivaroxaban, Apixaban, Dabigatran, ή Edoxaban) ή VKA (Warfarin)	Συνέχιση του ίδιου αντιπηκτικού, σε περίπτωση που το πρώτο ή το δεύτερο επεισόδιο ήταν απρόκλητη εγγύς VTE κάτω άκρου ή PE με χαμηλό ή ενδιάμεσο κίνδυνο εμφάνισης αιμορραγίας
Νεφρική ανεπάρκεια (CrCL < 30 mL/min) ή ηπατική ανεπάρκεια με διαταραχές πήξης	UFH	VKA (Warfarin)	Warfarin
Αιμοδυναμικά ασταθής ασθενής με PE	UFH ή LMWH	N/A	N/A
Κύηση, ασθενείς με καρκίνο	UFH ή LMWH	LMWH	LMWH
Δοσολογία: μία φορά την ημέρα	Fondaparinux ή LMWH (1.5 mg/kg/day)	VKA (Warfarin), Rivaroxaban (after 21 days) ή Edoxaban	VKA (Warfarin), Edoxaban, Rivaroxaban
Υποτροπιάζουσα VTE	N/A	Αν δεν χρησιμοποιείται LMWH, μετατροπή σε LMWH. Αν ήδη χρησιμοποιείται LMWH, αύξηση δόσης	Αν δεν χρησιμοποιείται LMWH, μετατροπή σε LMWH. Αν ήδη χρησιμοποιείται LMWH, αύξηση δόσης
Δυνατότητα αναστροφής	UFH LMWH (μερικώς αναστρέψιμη)	VKA (Warfarin) Dabigatran	Warfarin Dabigatran

**Πίνακας 7.** Αντιπηκτική αγωγή σε ασθενείς με VTE ανάλογα με τη φάση της θεραπείας. (CrCL: creatinine clearance; DOAC: direct oral anticoagulant; LMWH: low-molecular-weight heparin; UFH: unfractionated heparin; VKA: vitamin K antagonist; N/A: not applicable; VTE: venous thromboembolism; DVT: deep vein thrombosis; PE: pulmonary embolism) (Bartholomew 2017).

Κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι τα φυσιολογικά επίπεδα D-Dimers που μετρήθηκαν ένα μήνα μετά τη διακοπή της από του στόματος αντιπηκτικής αγωγής, έχουν υψηλή αρνητική προγνωστική αξία (92,9%) για υποτροπή, σε ασθενείς με ιδιοπαθή VTE και σε φορείς κληρονομικής θρομβοφιλίας. Τα αυξημένα επίπεδα D-Dimer συσχετίστηκαν με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο υποτροπής VTE (*Palereti et al. 2003*).

## 2.8 Θρόμβωση στην PNH

Η συχνότητα θρόμβωσης σε ασθενείς με PNH είναι 10,61/1000 άτομα ετησίως, ποσοστό πολύ υψηλότερο από αυτό στον γενικό πληθυσμό (0,75~2,69/1000 άτομα ετησίως). Ένα μεγάλο ποσοστό των θανάτων από PNH (40-67%) σχετίζεται με την ανάπτυξη θρόμβωσης, δηλωτικό της μεγάλης επίδρασης αυτής της επιπλοκής στην ζωή των ασθενών. Ένα μεγάλο ποσοστό (29-44%) των PNH ασθενών έχουν αναφέρει ότι παρουσίασαν τουλάχιστον ένα θρομβοεμβολικό γεγονός κατά τη διάρκεια της νόσου. Από ανάλυση δεδομένων έχει βρεθεί ότι στο 19% των ασθενών, η σπλαχνική θρόμβωση (ηπατική, μεσεντέριος, πυλαία, σπληνική) προηγήθηκε της διάγνωσης της PNH. Στους υπόλοιπους ασθενείς, η σπλαχνική θρόμβωση εμφανίστηκε κατά μέσο όρο εντός πέντε ετών (0-24) από τη στιγμή της διάγνωσης. Η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επιπλοκών συσχετίζεται με κακή πρόγνωση (σχετικός κίνδυνος: 8 έτη). Οι ασθενείς με θρόμβωση κατά την εμφάνιση της νόσου έχουν πιθανότητα επιβίωσης μόνο 40% στα επόμενα τέσσερα χρόνια, δεδομένου ότι ο σχετικός κίνδυνος θανάτου είναι αυξημένος 5 έως 15,4 φορές. Αυτό το ποσοστό θρόμβωσης στην PNH είναι πιθανό να υποτιμηθεί· σε μελέτη εντοπίστηκαν (με ευαίσθητες τεχνικές απεικόνισης) ενδείξεις ύπαρξης προηγούμενων υποκλινικών πνευμονικών θρομβώσεων στους 6 από τους 10 ασθενείς με PNH, ακόμη και σε ασθενείς με πρόσφατη έναρξη της νόσου. Υπήρχαν επίσης ενδείξεις υποκλινικής μυοκαρδιοπάθειας σε 2 από τους 10 ασθενείς. Οι υποκλινικές αυτές καταστάσεις ενδέχεται να οδηγήσουν σε μακροπρόθεσμη οργανική βλάβη (*Hill et al. 2012 & 2013*).

Ο μηχανισμός και τα αίτια της υψηλής συχνότητας θρόμβωσης στην PNH δεν είναι πλήρως κατανοητά. Οι *Dragoni et al. (2010)* στη διενέργεια ελέγχου θρομβοφιλίας σε PNH ασθενείς βρήκαν υψηλό ποσοστό αντιφωσfolιπιδικών αντισωμάτων στους ασθενείς με PNH, σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές και ασθενείς με απλαστική αναιμία, υποστηρίζοντας ότι θα μπορούσε να είναι ένας παράγοντας που συμβάλλει στην εμφάνιση θρόμβωσης στην PNH. Μελέτες έχουν δείξει ότι το μέγεθος των PNH κλώνων συσχετίζεται με τον κίνδυνο θρόμβωσης. Αύξηση 10% στους κλώνους PNH μπορεί να επιφέρει αύξηση 1,64 φορές του κινδύνου θρόμβωσης (*Moyo et al. 2004*). Οι ασθενείς με μεγάλο ποσοστό PNH κυττάρων (>50% στα πολυμορφοπύρρηνα) έχουν τον μεγαλύτερο κίνδυνο. Η έναρξη θεραπείας με eculizumab και αντιπηκτικής αγωγής συνιστώνται για τα οξέα θρομβωτικά συμβάντα,

ωστόσο η προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή δεν έχει αποδειχθεί χρήσιμη στην PNH. Δεν είναι επίσης σαφές εάν η δια βίου αντιπηκτική αγωγή είναι απαραίτητη για τη δευτερογενή προφύλαξη σε PNH ασθενείς που ανταποκρίνονται στη θεραπεία με eculizumab. Θρόμβωση έχει εμφανιστεί ακόμη και σε ασθενείς με μικρό μέγεθος PNH κλώνου γεγονός που υποδηλώνει ότι το μέγεθος του κλώνου δεν είναι ο μόνος παράγοντας που καθορίζει την εμφάνιση θρόμβωσης (Brodsky 2014; Huang 2019). Έχει επίσης βρεθεί ότι οι ασθενείς με τις μεταλλάξεις rs495828 και rs2519093 στο γονίδιο ABO είναι επιρρεπείς στην ανάπτυξη θρόμβωσης· οι μεταλλάξεις αυτές αποτελούν ανεξάρτητο από τον PNH κλώνο παράγοντα κινδύνου (Huang et al. 2019).

Η θρομβοφιλία στην PNH είναι πολυπαραγοντική. Η απουσία των GPI-εξαρτώμενων ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος (CD55 και CD59) στα αιμοπετάλια οδηγεί στον σχηματισμό προθρομβωτικών μικροσωματιδίων. Πιστεύεται ότι τόσο η υπερβολική κατανάλωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) όσο και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, που προκαλούνται από την επαναλαμβανόμενη αιμόλυση και τα υψηλά επίπεδα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, είναι βασικές αιτίες θρόμβωσης στους PNH ασθενείς. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι αυτή που κατά κύριο λόγο συμβάλλει στην θρομβωτική τάση ασθενών με PNH. Πιο συγκεκριμένα, ο σχηματισμός του C5a στην διαδικασία ενεργοποίησης του συμπληρώματος μπορεί να οδηγήσει σε προφλεγμονώδη κατάσταση και προθρομβωτικές διεργασίες με την δημιουργία φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως η ιντερλευκίνη-6, η ιντερλευκίνη-8 και ο *tumor necrosis factor-α*. Τέλος, διαταραχές στην ινωδόλυση που προκύπτουν από ανεπάρκεια των GPI-εξαρτώμενων πρωτεϊνών, όπως ο uPA-r (*urokinase-type plasminogen activator receptor*), η θειϊκή ηπαράνη και ένας GPI-εξαρτώμενος υποδοχέας του TFPI, εικάζεται ότι επίσης συμβάλλουν στην δημιουργία θρομβοφιλικής κατάστασης στους PNH ασθενείς. Δεν έχει καταστεί σαφές ποιος από αυτούς τους μηχανισμούς συμβάλλει περισσότερο στην ανάπτυξη θρόμβωσης, ωστόσο, η αναστολή του συμπληρώματος θεωρείται η πιο αποτελεσματική στρατηγική για την αντιμετώπιση της θρόμβωσης (Brodsky 2014).

Η θρόμβωση στην PNH μπορεί να εμφανιστεί σε οποιοδήποτε σημείο. Εμφάνιση ανεξήγητων θρομβοεμβολικών επεισοδίων ή θρομβώσεων με ασυνήθη εντόπιση, ιδιαίτερα σε νέους ασθενείς ή ασθενείς με ανεπάρκεια του μυελού των οστών, εγείρουν την υποψία ανάπτυξης PNH. Η φλεβική θρόμβωση στην PNH είναι πιο συχνή από την αρτηριακή. Οι συχνότερες εντοπίσεις περιλαμβάνουν τα ενδοκοιλιακά αγγεία (ηπατική, πυλαία, μεσεντέριος φλέβα κá.) και εγκεφαλικές φλέβες (οβελιαίος

και σπυραγγώδης κόλπος), με πιο κοινή εκδήλωση την ηπατική φλεβική θρόμβωση (σύνδρομο Budd-Chiari). Η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, η πνευμονική εμβολή και η δερματική θρόμβωση είναι επίσης σχετικά συχνές.

### **2.8.1 Πνευμονική εμβολή και DVT κάτω άκρων στην PNH**

Η πνευμονική εμβολή εμφανίζεται ως εκδήλωση υψηλού κινδύνου στην PNH και έχει τεκμηριωθεί σε αρκετές περιπτώσεις PNH ασθενών, σε κάποιες από τις οποίες ήταν θανατηφόρα. Δεν συσχετίστηκε με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, ενώ σε αρκετά άτομα εντοπίστηκε τυχαία. Ως εκ τούτου, είναι εύλογο να εγείρεται η υποψία της *in situ* δημιουργίας θρόμβων στο πνευμονικό αγγείο και όχι εξαιτίας της μετανάστευσης θρόμβων από άλλες τοποθεσίες, υπόθεση η οποία δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί. Η πνευμονική εμβολή στην PNH μπορεί να είναι υποκλινική και ενδέχεται να οδηγήσει σε ανάπτυξη πνευμονικής υπέρτασης. Σε μελέτη ανάλυσης της πνευμονικής υπέρτασης ασθενών με PNH, το 60% των ασθενών βρέθηκε με ενδείξεις υποκλινικής πνευμονικής εμβολής σε MRI υψηλής ευκρίνειας, υποδηλώνοντας ότι η αδιάγνωστη θρόμβωση συμβάλει στην ανάπτυξη της πνευμονικής υπέρτασης. Η εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση των κάτω άκρων εμφανίζεται πιο συχνά σε ασθενείς με PNH σε σχέση με τον γενικό πληθυσμό και έχει αναφερθεί σε περίπου στο ένα τρίτο των ασθενών (Rosse et al. 2003; Ziakas et al. 2008; Weitz 2011; Hill et al. 2007A & 2013).

### **2.8.2 Φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις**

Ο όρος ‘φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις’ αναφέρεται σε θρομβώσεις που εμφανίζονται σε περιοχές εκτός των φλεβών των κάτω άκρων και των πνευμόνων και περιλαμβάνει τη θρόμβωση των σπλαχνικών φλεβών (η πιο συχνή εντόπιση), τη θρόμβωση της σπληνικής φλέβας, της άνω και κάτω κοίλης φλέβας, της νεφρικής, της λαγόνιας, των σπερματικών φλεβών, της ραχιαίας φλέβας του πέους, των εγκεφαλικών φλεβών, της οφθαλμικής, της έσω σφαγίτιδας, των εν τω βάθει φλεβών των άνω άκρων κ.ά. Δεδομένης της πολυπλοκότητας του φλεβικού δικτύου, οποιαδήποτε θέση μπορεί να αποτελεί σημείο ανάπτυξης θρόμβωσης. Η αιτιολογία και η προσέγγιση των εν λόγω θρομβώσεων σε πολλά σημεία αποτελεί κοινό τόπο με αυτές της συνήθους θρόμβωσης, ωστόσο σημαντικό παίζει και η ιδιαιτερότητα του φλεβικού δικτύου του κάθε οργάνου. Οι θρομβώσεις σε ασυνήθεις θέσεις αποτελούν διαγνωστική και θεραπευτική πρόκληση λόγω της ετερογένειας που παρουσιάζουν

στις κλινικές εκδηλώσεις, των περιορισμένων βιβλιογραφικών δεδομένων για την άμεση και τη μακροπρόθεσμη πρόγνωση, και της έλλειψης τυχαιοποιημένων μελετών για την αξιολόγηση των θεραπευτικών επιλογών (Riva & Ageno 2017).

#### **2.8.2.1 Θρόμβωση άνω άκρων (Upper extremity Deep vein Thrombosis/UEDVT)**

Αφορά θρομβώσεις στην υποκλείδιο, μασχालιαία ή βραχιόνιο φλέβα και αποτελεί το 10% των εν τω βάθει φλεβικών θρομβώσεων. Μπορεί να είναι πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής. Η πρώτη περίπτωση (~30% των περιστατικών) μπορεί να είναι ιδιοπαθής, να συνδυάζεται με το σύνδρομο θωρακικής εξόδου (πίεση των αγγείων και των νεύρων του άνω άκρου στην περιοχή του τραχήλου, παραλλαγές των ανατομικών μορίων της περιοχής, όγκοι) ή να προέρχεται από επίπονη και υπερβολική δραστηριότητα (σύνδρομο *Paget-Schroetter*). Στα δευτεροπαθή αίτια αναφέρονται η είσοδος φλεβικού καθετήρα (κυρίως μεγάλης διαμέτρου), η τοποθέτηση βηματοδότη και κακοήθη νοσήματα που αναπτύσσονται στην περιοχή. Χειρουργικές επεμβάσεις άνω άκρου και ακινητοποίηση με γύψο επίσης συσχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο, ενώ οι διαταραχές στον μηχανισμό πήξης συνδέονται με πενταπλάσιο ή εξαπλάσιο κίνδυνο. Οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν οίδημα, δυσφορία, ερυθρότητα του σκέλους, άλγος και σπανιότερα πυρετό. Η διάγνωση γίνεται με υπερηχογράφημα ή φλεβογραφία και η πιθανότητα υποτροπής υπολογίζεται στο 2% εντός πενταετίας (Martinelli et al. 2008; Romualti & Ageno 2011; Kucher et al. 2011; Μπούχλα και συν. 2017).

#### **2.8.2.2 Σπλαχνική φλεβική θρόμβωση (Splanchnic vein thrombosis/SVT)**

Η σπλαχνική φλεβική θρόμβωση (SVT) είναι δυνητικά απειλητική για τη ζωή κατάσταση. Ο λόγος που οι σπλαχνικές και οι ηπατικές φλέβες είναι ο πιο συχνός στόχος της θρόμβωσης στην PNH είναι ασαφής. Εικάζεται ότι η ελάττωση του ρυθμού ροής ενδέχεται να επιτρέπει τον σχηματισμό συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων. Η επιβράδυνση της κυκλοφορίας μπορεί επίσης να επιτρέπει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα την έκφραση του ιστικού παράγοντα στα γειτονικά ενδοθηλιακά κύτταρα και την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης (Rosse et al. 2003).

Η μετάλλαξη 1849G>T (V617F) στο εξόνιο 14 του γονιδίου JAK2 (Janus kinase-2) συσχετίζεται κυρίως με την εκδήλωση σπλαχνικής θρόμβωσης (SVT). Ο επιπολασμός της μετάλλαξης είναι υψηλότερος στην SVT (32,7%) σε σύγκριση με

την εμφάνιση θρόμβωσης σε συνήθεις θέσεις (0,88%), τη θρόμβωση εγκεφαλικής φλέβας (2,57%) ή την απόφραξη φλέβας αμφιβληστροειδούς (0,99%). Η μετάλλαξη βρέθηκε στο 94,7% των ασθενών με θρόμβωση σε ασυνήθη θέση (εγκεφαλική και SVT) και μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα (MPN). Από παθοφυσιολογική άποψη, η μετάλλαξη JAK2V617F φαίνεται να προάγει τη θρόμβωση μέσω της υπερέκφρασης της P-σελεκτίνης που οδηγεί σε ενεργοποίηση και συσσώρευση αιμοπεταλίων και εναπόθεση ινώδους (Valeriani et al. 2019).

Επίκτητοι παράγοντες κινδύνου	Παροδικοί επίκτητοι παράγοντες κινδύνου	Συγγενείς παράγοντες κινδύνου
Κίρρωση ήπατος	Ενδοκοιλιακές φλεγμονές/λοιμώξεις	Μετάλλαξη Factor V Leiden
Καρκίνος	X/o κοιλίας	Μετάλλαξη Prothrombin G20210A
Μυελοϋπερπλαστικά νεοπλάσματα	Ορμονική θεραπεία	JAK2V617F mutation
Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου	Κύηση ή περίοδος λοχείας	Ανεπάρκεια Πρωτεΐνης C
Αντοξωσφολιπιδικό σύνδρομο		Ανεπάρκεια Πρωτεΐνης S
Λοιπά αιματολογικά νοσήματα (π.χ. PNH)		Ανεπάρκεια Αντιθρομβίνης III
Αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. νόσος Behçet)		

**Πίνακας 8.** Παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση SVT (Valeriani 2019).

Η θρόμβωση της ηπατικής φλέβας (σύνδρομο Budd-Chiari/BCS) είναι η συχνότερη θρομβωτική επιπλοκή στην PNH (40,7%), και αίτιο μεγάλης θνησιμότητας. Η θρόμβωση της μεσεντερίου φλέβας (MVT), της πυλαίας φλέβας και το σύνδρομο Budd-Chiari (BCS) αποτελούν τρεις αυτόνομες οντότητες με αρκετά κοινά χαρακτηριστικά.

Η αυξημένη τάση εκδήλωσης ενδοκοιλιακής θρόμβωσης στην PNH δεν έχει εξηγηθεί. Μια θεωρία προτείνει ότι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα εγκαθίστανται πιο εύκολα στα ηπατικά μικροαγγεία και ότι τα CD59(-) ουδετερόφιλα που εντοπίζονται εκεί αλληλεπιδρούν με τα αιμοπετάλια (που είναι επίσης

ενεργοποιημένα) και απελευθερώνουν πρωτεάσες σερίνης αυξάνοντας την προπηκτική δράση σε αυτή την περιοχή (Ziakas *et al.* 2008; Hill *et al.* 2013; Μπούχλα και συν. 2017).

#### **2.8.2.2.1. Σύνδρομο Budd-Chiari (BCS)**

Η ηπατική φλεβική θρόμβωση (σύνδρομο Budd-Chiari) αναγνωρίζεται ως ένα από τα πιο κοινά σημεία θρόμβωσης, που εμφανίζεται σε ένα σημαντικό ποσοστό (7,5-25%) των PNH ασθενών και μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ανεπάρκεια, αποτελεί δηλαδή βασική αιτία θνησιμότητας. Μπορεί να εκδηλωθεί με οξύ ή χρόνια κοιλιακό άλγος, ωστόσο έχει παρατηρηθεί και σιωπηλή θρόμβωση. Η ηπατική λειτουργία μπορεί να επιδεινωθεί γρήγορα οδηγώντας σε αιμορραγία, ηπατική εγκεφαλοπάθεια και ηπατική ανεπάρκεια. Το χρόνια BCS εμφανίζεται με συμπτώματα πυλαίας υπέρτασης. Είναι ενδιαφέρον, ότι σε ασθενείς με σύνδρομο Budd-Chiari, η συχνότητα της θρόμβωσης της ηπατικής φλέβας είναι σημαντικά υψηλότερη σε PNH ασθενείς (47%) σε σύγκριση με τους ασθενείς που δεν νοσούν από PNH (10%). Ως εκ τούτου, η εκδήλωση συνδρόμου Budd-Chiari καθοδηγεί προς την κατεύθυνση της αναζήτησης μιας υποκείμενης αιτίας, με ισχυρή σύσταση για έλεγχο παρουσίας κλώνων PNH (Hill *et al.* 2013). Η αγγειακή ανατομία μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο δεδομένου ότι η απόφραξη της κάτω κοίλης φλέβας μπορεί να εμφανιστεί ως χρόνια BCS. Στο υπερηχογράφημα Doppler, εμφανίζεται μείωση ή απουσία της ηπατικής φλεβικής ροής, θρόμβωση της ηπατικής φλέβας και υπερτροφία της κάτω κοίλης φλέβας ή του κερκοφόρου λοβού. Τα ευρήματα αυτά έχουν ευαισθησία 85-100% και ειδικότητα 85%. Στην ηπατική φλεβογραφία που είναι θεωρείται ως το *gold standard* για τη διάγνωση του BCS, οι κύριες ηπατικές φλέβες συνήθως δεν μπορούν να απεικονιστούν, ενώ εμφανίζεται το χαρακτηριστικό μοτίβο ιστού αράχνης από παράπλευρα και επανασηραγγοποιημένα αγγεία. Χαρακτηριστικά παθολογικά ευρήματα είναι η έντονη συμφόρηση (πιο έντονη γύρω από τα τερματικά ηπατικά φλεβίδια) και η κυτταρική νέκρωση με ελάχιστη φλεγμονώδη αντίδραση. Εγκατεστημένη κίρρωση εντοπίζεται στην πλειοψηφία των ασθενών με χρόνια μορφή BCS (Ziakas *et al.* 2008; Μπούχλα και συν. 2017).

#### **2.8.2.2.2 Θρόμβωση πυλαίας φλέβας (PVT)**

Η θρόμβωση της πυλαίας φλέβας αναφέρεται στην ανάπτυξη θρόμβωσης εντός του εξωηπατικού πυλαίου φλεβικού συστήματος. Κάποιες φορές μπορεί να επεκταθεί



στην άνω μεσεντέριο φλέβα ή στην σπληνική φλέβα, όπως επίσης και στις ενδοηπατικές φλέβες. Η αιτιολογία της πυλαίας φλεβοθρόμβωσης ποικίλει. Τόσο τοπικοί όσο και συστημικοί παράγοντες έχουν βρεθεί ότι παίζουν ρόλο στη δημιουργία θρόμβου στην πυλαία φλέβα. Και οι τρεις μεταβλητές της τριάδας του *Virchow* (ενδοθηλιακό τραύμα, διαταραχή στη ροή του αίματος και υπερπηκτικότητα) παίζουν ρόλο στην εκδήλωση θρόμβωσης στην πυλαία φλέβα. Οι πιο συχνές αιτίες θρόμβωσης της πυλαίας φλέβας περιλαμβάνουν κίρρωση του ήπατος, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και μυελοϋπερπλασία. Φαίνεται να είναι η δεύτερη πιο κοινή εκδήλωση ενδοκοιλιακής θρόμβωσης, ωστόσο η συσχέτιση της επιπλοκής αυτής με αυξημένη θνησιμότητα είναι αδύναμη. Μεμονωμένη θρόμβωση της πυλαίας φλέβας συναντάται στη μειοψηφία των ασθενών. Στην κλινική εικόνα κυριαρχεί κοιλιακό άλγος, πόνος, ασκίτης και γαστροοισοφαγικοί κίρσοι. Συνυπάρχουσα φλεβική θρόμβωση των ηπατικών φλεβών, της κάτω κοίλης φλέβας, των μεσεντερικών φλεβών και τα σπληνικών αγγείων μπορεί να περιπλέξει την κλινική εικόνα. Επειδή οι κλινικές εκδηλώσεις στη θρόμβωση της πυλαίας φλέβας μοιάζουν με αυτές της θρόμβωσης της ηπατικής φλέβας, η διαφοροδιάγνωση θεωρείται κριτικής σημασίας, δεδομένου ότι η δεύτερη περίπτωση αποτελεί καθοριστικό παράγοντα νοσηρότητας και πιθανής θνητότητας (*Ziakas et al. 2008*).

#### **2.8.2.2.3 Θρόμβωση μεσεντερίου φλέβας (MVT)**

Η θρόμβωση της μεσεντερίου φλέβας εκδηλώνεται με συμπτώματα εντερικής απόφραξης. Οι πιο συχνές αιτίες για την εκδήλωση MVT, είναι ο καρκίνος, ενδοκοιλιακές φλεγμονώδεις καταστάσεις (παγκρεατίτιδα, φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, εγκολπωματίτιδα), η μετεγχειρητική περίοδος, η κίρρωση του ήπατος και η πυλαία υπέρταση. Η θρόμβωση της μεσεντερίου φλέβας προκαλεί έντονο κοιλιακό πόνο και μπορεί να συνοδεύεται από απόφραξη, πυρετό και αιμορραγία από το ορθό. Η θρόμβωση μπορεί να επηρεάζει και τις μικρές περιφερικές μεσεντέριες φλέβες και να προκαλείται παροδική ισχαιμία. Η ισχαιμία προκαλεί έλκος και ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό στο προσβεβλημένο τμήμα του εντέρου. Η θρόμβωση του δωδεκαδακτύλου συνδυάζεται με θηλώδη ενδοθηλιακή υπερπλασία, εξέλκωση και ανάπτυξη περιφερικής μάζας συνήθως στο τρίτο τμήμα του δωδεκαδακτύλου. Έχει παρατηρηθεί ότι αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν στενώσεις στο έντερο που πιθανά είναι ισχαιμικής φύσης (*Ziakas et al. 2008; Hill et al 2013*).

#### **2.8.2.2.4 Θρόμβωση σπληνικής φλέβας (*Splenic Splanchnic Vein Thrombosis /spSVT*)**

Η μονήρης θρόμβωση της σπληνικής φλέβας οφείλεται συνήθως σε νοσήματα του παγκρέατος (ποσοστό ~50% των περιπτώσεων), κακοήθεια και σπληνεκτομή. Συνήθως προκαλεί δεξιά πυλαία υπέρταση, κίρσους οισοφάγου και σπληνομεγαλία. Οξύ κοιλιακό άλγος και συνυπάρχουσα ψηλαφητή σπληνομεγαλία χαρακτηρίζουν την απόφραξη της σπληνικής φλέβας. Δεν υπάρχουν σαφή δεδομένα για τη συχνότητά της στον γενικό πληθυσμό, αφορά ωστόσο το 10% των περιπτώσεων της SVT. Υπερηχογράφημα, αξονική τομογραφία ή αγγειογραφία επιβεβαιώνουν τη διάγνωση. Ρήξη σπληνός με αιμοπεριτόναιο αποτελεί απειλή και απαιτεί άμεση χειρουργική αντιμετώπιση και σπληνεκτομή (*Ziakas et al. 2008*).

#### **2.8.2.3 Θρόμβωση κάτω κοίλης φλέβας (*Inferior Vena Cava Thrombosis/IVCT*)**

Πρόκειται για σπάνια κατάσταση που αφορά περίπου το 1,5% των περιπτώσεων με φλεβική θρόμβωση. Εκδηλώνεται επώδυνα με άλγος στην οσφύ, οιδηματώδη κάτω άκρα, επίφλεβο στην κοιλιακή χώρα, πυρετό και αύξηση των δεικτών φλεγμονής. Σε ένα μεγάλο μέρος των ασθενών εντοπίζονται τοπικοί παράγοντες κινδύνου, όπως εξωτερική πίεση από κακοήθη νεοπλάσματα, ανεύρυσμα κοιλιακής αορτής, υδρονέφρωση, μεγάλες ηπατικές ή νεφρικές κύστες, ενώ σε ένα (μικρότερο) ποσοστό παρατηρήθηκε και αμφοτερόπλευρη επέκταση της θρόμβωσης στις λαγόνιες φλέβες ή στις εν τω βάθει φλέβες των κάτω άκρων (μελέτη *MAISHTRO*). Η συχνότητα εμφάνισης πνευμονικής εμβολής είναι διπλάσια σε σχέση με αυτήν της εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης σε αυτούς τους ασθενείς. Δεν εμφανίζεται ιδιαίτερη διαφορά ως προς την συχνότητα των παραμέτρων της κληρονομικής θρομβοφιλίας, στους ασθενείς αυτούς, ωστόσο ανιχνεύεται συχνότερα θετικό αντιπηκτικό του λύκου και υποκείμενη νεοπλασία (*McAree et al. 2013; Linnemann et al. 2008; Μπούχλα και συν. 2017*).

#### **2.8.2.4 Θρόμβωση νεφρικής φλέβας (*RVT*)**

Η θρόμβωση νεφρικής φλέβας (ή αρτηρίας) είναι ασυνήθιστη στην PNH, ωστόσο εμφανίζεται και ενδέχεται να οδηγήσει σε νεφρική δυσλειτουργία. Η ετήσια επίπτωση της RVT στο γενικό πληθυσμό (ενήλικες) είναι <1 περιστατικό ανά εκατομμύριο (πιο συχνή στους άρρενες), ενώ είναι συχνότερη στα παιδιά. Είναι συνήθως ασυμπτωματική. Η κλινική εικόνα περιλαμβάνει αιματοουρία (μικροσκοπική ή

μακροσκοπική), πλευριτικό άλγος, νεφρική δυσλειτουργία, πρωτεϊνουρία, εικόνα πνευμονικής εμβολής και/ή ναυτία, πυρετό και ανορεξία. Μελέτη της *Mayo Clinic* σε 218 ασθενείς με RVT ανέδειξε ενεργό καρκίνο στο 66,2% των ασθενών (το 55% με καρκίνο νεφρού), στο 19,7% νεφρωσικό σύνδρομο, στο 14,4% λοίμωξη, ενώ στο 11,9% το αίτιο θεωρήθηκε ιδιοπαθές. Στο νεφρωσικό σύνδρομο, η θρομβωτική προδιάθεση συσχετίζεται με απώλεια των φυσικών ανασταλτών (κυρίως ATIII), αυξημένη σύνθεση προπηκτικών παραγόντων (Ινωδογόνο, FV, FVIII), μειωμένη ινωδολυτική δραστηριότητα ή τοπική ενεργοποίηση της αιμόστασης στο σπείραμα. Η RVT έχει συσχετισθεί επίσης με την παρουσία APS, συστηματικού ερυθρηματώδους λύκου, ενώ αναφέρεται και μετά από μεταμόσχευση νεφρού (*Girolami et al. 2014*).

#### **2.8.2.5 Θρόμβωση φλεβωδών κόλπων του εγκεφάλου/εγκεφαλικών φλεβών (Cerebral Venous Sinus Thrombosis/CVST).**

Η θρόμβωση των εγκεφαλικών φλεβών/κόλπων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη φλεβική κυκλοφορία με συνοδό αύξηση της φλεβικής και τριχοειδικής πίεσης, με επακόλουθο την τοπική ισχαιμία. Το αποτέλεσμα είναι διαταραχή της μικροκυκλοφορίας, βλάβη στην αντλία  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  και επακόλουθο εγκεφαλικό οίδημα και φλεβικό έμφρακτο. Η ρήξη του τριχοειδικού δικτύου μπορεί να καταλήξει σε ενδοκρανιακή αιμορραγία ενώ η απόφραξη των φλεβωδών κόλπων οδηγεί σε ενδοκράνια υπέρταση, εξαιτίας της αδυναμίας παροχέτευσης του ENY. Το εύρος των κλινικών εκδηλώσεων είναι πλατύ και η πρόγνωση της νόσου ποικίλει, η διάγνωση στο μεγαλύτερο μέρος των ασθενών ωστόσο ενδέχεται να καθυστερήσει δεδομένης της βραδύτητας έναρξης των συμπτωμάτων. Η θρόμβωση του ανώτερου οβελιαίου κόλπου (Εικόνα 36Α) είναι η πιο συχνή νευρολογική επιπλοκή και οδηγεί σε θάνατο περισσότερο από το ένα τρίτο των περιπτώσεων. Θρομβώσεις στον οβελιαίο κόλπο, στον πλάγιο, τον σφραγγώδη και σιγμοειδή κόλπο μπορεί να εμφανιστούν με νευρολογικά συμπτώματα όπως σοβαρή κεφαλαλγία (90% των ασθενών), έμετος, επιληπτικές κρίσεις (~40% των ασθενών), αλλοιωμένο επίπεδο συνείδησης, πάρεση κρανιακών νεύρων, οίδημα οπτικής θηλής (30% των ασθενών) συνοδευόμενο από απώλεια όρασης και διπλωπία σε περίπτωση πίεσης του 6<sup>ου</sup> κρανιακού νεύρου, κά. Συμπτώματα όπως η δυσαρθρία και η αφασία εκπομπής είναι σπάνια.

Οι κλινικές εκδηλώσεις μοιάζουν με αυτές του αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, αλλά με βραδύτερη ανάπτυξη, ενώ η εμφάνιση ενδοκράνιας υπέρτασης και επιληπτικών κρίσεων αποτελούν σημαντικές διαφορές. Επειδή το ποσοστό

θνησιμότητας από τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια παραμένει υψηλό, είναι ιδιαίτερα σημαντική η έγκαιρη διάγνωση (που συχνά απαιτεί εξελιγμένες τεχνικές απεικόνισης όπως μαγνητική τομογραφία, μαγνητική αγγειογραφία ή φλεβογραφία μαγνητικού συντονισμού). Οι τεχνικές απεικόνισης μαγνητικού συντονισμού προτιμώνται επειδή τα σκιαγραφικά που χρησιμοποιούνται στην κλασική αγγειογραφία θα μπορούσαν να προκαλέσουν επιδείνωση της αιμόλυσης ή νεφροτοξικότητα (Ziakas *et al.* 2008; Dentali *et al.* 2012; Hill *et al.* 2013). Ωστόσο, τα δεδομένα σχετικά με την CVT στην PNH είναι πολύ σπάνια. Μόνο 32 περιστατικά έχουν αναφερθεί από το 1938, κυρίως ως *case reports* (με το μεγαλύτερο ποσοστό να είναι νεαρές γυναίκες). Ένα σημαντικό σημείο, για τους PNH ασθενείς, είναι η μεγάλη συχνότητα (30%) και άλλων φλεβικών θρομβοεμβολικών επεισοδίων είτε στο παρελθόν ή ταυτόχρονα με την CVST, η συχνότητα αυτή είναι πολύ υψηλότερη από αυτήν που παρατηρήθηκε στη CVST λόγω άλλων αιτιών (4%, *International Study on Cerebral Veins and Dural Sinus Thrombosis*). Ένα άλλο σημαντικό σημείο είναι ότι η CVST μπορεί να εμφανιστεί οποιαδήποτε στιγμή κατά τη διάρκεια της νόσησης από PNH, μπορεί να είναι η αιτία ‘αποκάλυψης’ της νόσου ή να εμφανιστεί αρκετά αργότερα μετά τη διάγνωση. Ένα 30% των δημοσιευμένων περιστατικών ανήκει στην πρώτη περίπτωση. Η πρόγνωση της σχετιζόμενης με PNH CVST θεωρείται χειρότερη από ό,τι η CVST που προκαλείται από άλλες αιτίες (Meppiel *et al.* 2015).

#### **2.8.2.6 Οφθαλμική θρόμβωση (Retinal Vein Occlusion/RVO)**

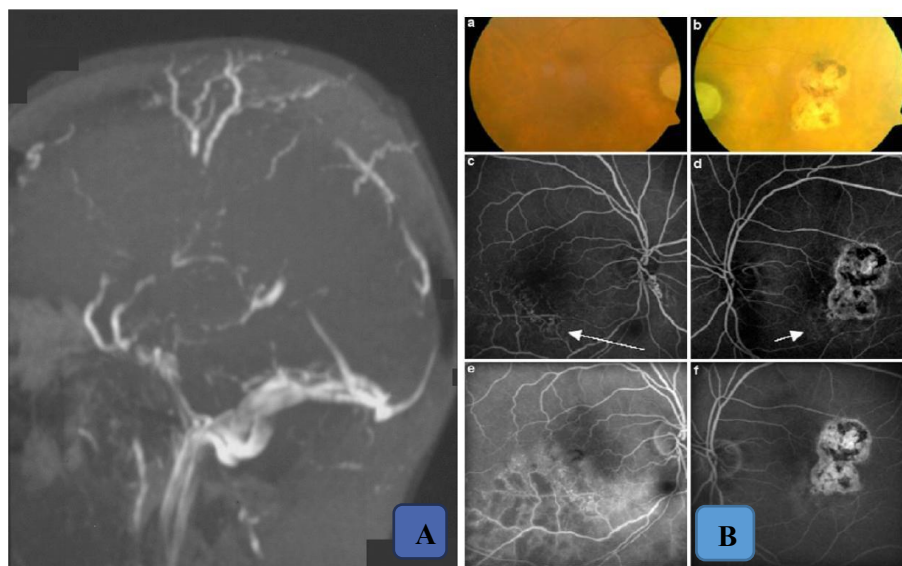
Η απόφραξη της φλέβας του αμφιβληστροειδούς (RVO) είναι ένα παράδειγμα πολυπλοκότητας της VTE που προκύπτει από πολλαπλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των τοπικών παραγόντων και συστηματικών ασθενειών. Είναι η πιο κοινή αγγειακή νόσος του ματιού και η κύρια αιτία απώλειας όρασης μετά τον διαβήτη. Η θρόμβωση της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς (*retinal vein occlusion/RVO*) εκδηλώνεται ως απόφραξη της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς (*central retinal vein occlusion/CRVO*, Εικόνα 36B), ως απόφραξη που προκαλεί ισχαιμία στο ήμισυ του αμφιβληστροειδούς (*hemiretinal venous occlusion/HRVO*) και ως απόφραξη κλάδου της κεντρικής φλέβας του αμφιβληστροειδούς (*branch retinal vein occlusion/BRVO*).

Η κλινική εικόνα χαρακτηρίζεται από σκοτώματα έως και οξεία τύφλωση, ανάλογα με την εντόπιση της βλάβης. Τα ευρήματα από την κλινική εξέταση και τη βυθοσκόπηση δεν προδικάζουν τον βαθμό ισχαιμίας, ενώ μπορεί να ανευρίσκονται

και σε άλλες παθήσεις του αμφιβληστροειδούς. Το ποσοστό επίπτωσης του RVO είναι 0,5%/1000 άτομα (άνω των 40 ετών) και αυξάνεται σημαντικά με την ηλικία (50% των ασθενών άνω των 65 ετών). Ο ρόλος της θρομβοφιλίας στην ανάπτυξη RVO είναι ασαφής, με αντικρουόμενα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία: φαίνεται ωστόσο να είναι σημαντικός.

Κύριες αιτίες εκδήλωσης RVO εκτός από τον διαβήτη θεωρούνται η υπέρταση, το κάπνισμα, η δυσλιπιδαιμία, το γλαύκωμα, μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, η PNH, η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και συστηματικά νοσήματα (νόσος *Behçet*, αγγειίτιδα, σαρκοείδωση). Συσχετίζεται επίσης με το αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο και την υπερομοκυστεϊναιμία. Σε αντίθεση με άλλους τύπους φλεβικής θρόμβωσης η αντιπηκτική αγωγή δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στην RVO.

Σε μετανάλυση δεν βρέθηκε προφανές όφελος από τη χρήση αντιπηκτικής, αντιαιμοπεταλιακής ή θρομβολυτικής αγωγής. Η θεραπεία γενικά περιλαμβάνει αντιμετώπιση του παράγοντα κινδύνου, με τη χρήση τοπικών θεραπειών, συμπεριλαμβανομένων αναστολέων VEGF, τοπικών στεροειδών κ.ά. (*Lussana et al. 2007; Μπούχλα και συν. 2017; Shatzei et al. 2018*).



**Εικόνα 36.** A) Μαγνητική αγγειογραφία σε PNH ασθενή με θρόμβωση ανώτερου οβελιαίου κόλπου και σχηματισμό παράπλευρων αγγείων (*Hill 2013*). B) Θρόμβωση αμφιβληστροειδικής φλέβας.

### 2.8.2.7 Θρόμβωση δερματικών φλεβών

Θρόμβωση μπορεί να εμφανιστεί και στις δερματικές φλέβες και να οδηγήσει σε νέκρωση του δέρματος σε ορισμένες περιπτώσεις. Αυτή η επιπλοκή είναι πιο πιθανό να συμβεί εάν υπάρχει τραύμα στην περιοχή ή εάν στην περιοχή έχει εμφανιστεί αλλεργική αντίδραση (έχει αναφερθεί περίπτωση ασθενούς με δερματική αντίδραση στην πενικιλίνη, εμφάνιση θρόμβωσης και δερματική νέκρωση στα σημεία της αντίδρασης) (Rosse *et al.* 2003). Στην PNH οι πληγείσες δερματικές περιοχές εμφανίζονται αποχρωματισμένες, οι δερματικές βλάβες σπάνια προκαλούν έλκη, η εικόνα μοιάζει με κεραυνοβόλο πορφύρα εξαιτίας των θρόμβων ινώδους στα τριχοειδή αγγεία, ενώ η βλάβη μπορεί να επεκταθεί προκαλώντας εκτεταμένη νέκρωση του δέρματος. Οι θρομβώσεις είναι πολύ πιθανό να είναι υποτροπιάζουσες (Hill *et al.* 2013).



Εικόνα 37. Θρόμβωση δερματικών φλεβών σε ασθενή με PNH (Hill 2013).

### 2.8.3 Αρτηριακή θρόμβωση στην PNH

Οι αρτηριακές θρομβώσεις είναι λιγότερο συχνές στην PNH σε σχέση με τις φλεβικές και συνήθως περιλαμβάνουν επεισόδια στις εγκεφαλικές και στεφανιαίες αρτηρίες. Η πιο συχνή κλινική εκδήλωση εγκεφαλικής αρτηριακής θρόμβωσης είναι αυτή του ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου, ενώ η συνυπάρχουσα PNH μπορεί να παραμείνει μη ανιχνεύσιμη. Μία επίσης συχνή εκδήλωση της αρτηριακής θρόμβωσης είναι στη στεφανιαία αρτηρία με όλα τα συμπτώματα του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Και οι δύο συσχετίζονται με αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας.

Σπανιότερη είναι η θρόμβωση στις μεσεντέριες αρτηρίες· οι κλινικές εκδηλώσεις εδώ είναι παρόμοιες με αυτές της ισχαιμικής νόσου του εντέρου (π.χ. όπως στην θρόμβωση της μεσεντερίου φλέβας). Θρόμβωση έχει επίσης παρατηρηθεί στην αορτή

με επέκταση στις νεφρικές αρτηρίες και κλινική εικόνα νεφρικής δυσλειτουργίας, ενώ είναι σπάνια στις αρτηρίες των άκρων.

Παρά τον σχετικά χαμηλό επιπολασμό των αρτηριακών επεισοδίων στην PNH, το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο έχουν υψηλό κίνδυνο θνησιμότητας. Εμφανίζονται συνήθως σε νεαρούς ασθενείς (μ.ό. ηλικίας τα 35 έτη): για το έμφραγμα του μυοκαρδίου ο μέσος όρος ηλικίας είναι τα 41 έτη (εύρος 22-47), ενώ το εύρος μεγαλώνει όσον αφορά στην εκδήλωση αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (11-76 έτη), κάτι που υποδηλώνει ότι η αρτηριακή θρόμβωση στην PNH μπορεί να εμφανιστεί *de novo* στις αρτηρίες, χωρίς προηγούμενη ύπαρξη αθηρωματικής νόσου (Ziakas *et al.* 2008).

## 2.9 Αντιπηκτική αγωγή στην PNH

Η θρόμβωση σε ασθενή με PNH είναι προϋπόθεση για επείγουσα παρέμβαση λόγω της μεγάλης πιθανότητας θνησιμότητας και της ταχεία επιδείνωσης. Πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στην ισορροπία μεταξύ της πιθανής αιμορραγίας (λόγω της υποκείμενης ανεπάρκειας του μυελού των οστών) και των υψηλών θρομβωτικών τάσεων. Δεν υπάρχουν πολλές τυχαιοποιημένες μελέτες, τα μεγάλα PNH κέντρα λειτουργούν βάσει εμπειρίας. Στα οξέα θρομβωτικά επεισόδια στην PNH (εκτός της έναρξης θεραπείας με ECU), για την αντιμετώπιση της θρόμβωσης χορηγείται ηπαρίνη, η οποία εμποδίζει μεν την επέκταση και την εξέλιξη της θρόμβωσης αλλά δεν αναστρέφει την ήδη εγκατεστημένη (στόχος: επίπεδα anti-Xa μεταξύ 0,5-1,0) (Hill *et al.* 2013).

Όλοι οι PNH ασθενείς που εμφανίζουν θρομβωτική επιπλοκή είναι υποψήφιοι για επ' αόριστον χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής με βαρφαρίνη, με εξαίρεση την κύηση όπου η βαρφαρίνη δεν συνιστάται και αντικαθίσταται από την LMWH. Δεν υπάρχουν ενδείξεις για αποδεδειγμένο όφελος όσον αφορά την προφυλακτική θεραπεία, με εξαίρεση την κύηση. Πρωτοπαθής προφύλαξη θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε ασθενείς με μεγάλους κλώνους (>50%), σταθερό αριθμό αιμοπεταλίων >100000/μl και καμία γνωστή αντένδειξη για χορήγηση αντιπηκτικής αγωγής, αφού η προσέγγιση αυτή ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο θρόμβωσης. Είναι αμφιλεγόμενο εάν οι ασθενείς με PNH που δεν λαμβάνουν eculizumab πρέπει να λαμβάνουν

προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή, όπως επίσης και εάν οι ασθενείς υπό eculizumab, οι οποίοι εμφάνισαν προηγούμενο θρομβοεμβολικό επεισόδιο, θα πρέπει να παραμείνουν σε αντιπηκτική αγωγή. Η προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή δεν έχει αποδειχθεί ότι αποτρέπει τη θρόμβωση σε ασθενείς με PNH και μπορεί ακόμη και να είναι επικίνδυνη καθώς συχνά παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα αιμοπεταλίων. Έτσι, για ασθενείς που δεν είναι υποψήφιοι για θεραπεία με eculizumab, συνήθως δεν συνιστάται η έναρξη προφυλακτικής αντιπηκτικής αγωγής. Πιθανές εξαιρέσεις περιλαμβάνουν ασθενείς με επίμονα αυξημένα επίπεδα D-Dimer, έγκυες ασθενείς και PNH ασθενείς σε περιεγχειρητική περίοδο.

Η διακοπή της αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς που λαμβάνουν eculizumab με ιστορικό προηγούμενης θρόμβωσης είναι ακόμη πιο αμφιλεγόμενη ενώ δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για να γίνουν συστάσεις. Η κατάσταση υπερπηκτικότητας δεν αναστρέφεται με τη χορήγηση αντιπηκτικών και διακοπή της δευτερογενούς προφύλαξης θα μπορούσε να οδηγήσει σε έξαρση των θρομβωτικών φαινομένων. Ανάλογα με το σημείο της θρόμβωσης, μια πιο επιθετική αντιμετώπιση πιθανά να προσφέρει πλεονέκτημα επιβίωσης. Παλαιότερα ένα μεγάλο μέρος των ασθενών αντιμετωπίζονταν με θρομβολυτικά, αγγειοπλαστική και μεταμόσχευση μυελού των οστών. Αυτές οι προσεγγίσεις οδήγησαν σε μείωση του κινδύνου θανάτου κατά 25% (13-37%). Συνολικά, η έκβαση της θρόμβωσης (κίνδυνος θανάτου) έχει βελτιωθεί κατά τις δεκαετίες 1986-1995 (RR:0,64, 95% CI) και 1996-2006 (RR:0,42, 95% CI) σε σύγκριση με τα προηγούμενα χρόνια (Ziakas *et al.* 2008; Malato *et al.* 2012).

Αποτελέσματα ερευνών υποδηλώνουν ότι η χρόνια χορήγηση eculizumab μπορεί να μειώσει σημαντικά το συνολικό ποσοστό θρομβοεμβολικών συμβάντων. Πρόσφατες μελέτες φάσης III σε ασθενείς με PNH καταδεικνύουν ότι η χορήγηση του ECU μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο θρόμβωσης και ότι η προφυλακτική αντιπηκτική αγωγή ελάχιστα μειώνει τον κίνδυνο θρόμβωσης σε ασθενείς με PNH που δεν λαμβάνουν eculizumab. Συγκεκριμένα, το ποσοστό συμβάντων θρομβοεμβολής ανά 100 ασθενείς/έτος μετά τη χορήγηση eculizumab μειώθηκε από 7,4 επεισόδια θρόμβωσης σε 1,1 επεισόδια (RR 85%). Σε ασθενείς που έλαβαν αντιθρομβωτική θεραπεία, το ποσοστό των επεισοδίων θρομβοεμβολής μειώθηκε με τη χορήγηση eculizumab (από 10,6 επεισόδια ανά 100 ασθενείς/έτος σε 0 επεισόδια ανά 100 ασθενείς/έτος) (Rosse *et al.* 2003; Malato *et al.* 2012).

Είναι ενδιαφέρον ότι η χρήση αντιπηκτικής αγωγής πριν από την χορήγηση eculizumab δεν φάνηκε να επηρεάζει τον κίνδυνο θρόμβωσης (7,4 συμβάντα ανά 100

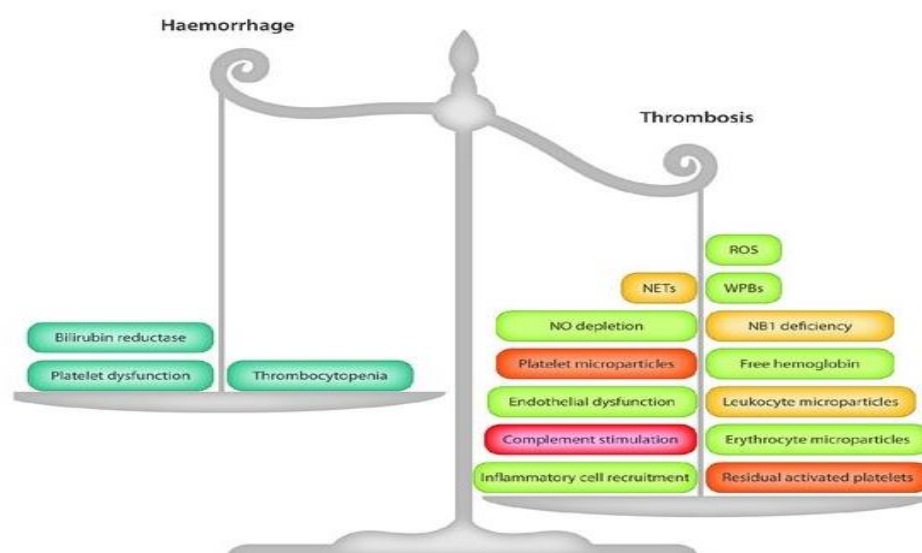


ασθενείς/έτος έναντι 10,6 συμβάντων ανά 100 ασθενείς/έτος). Η αντιμετώπιση με eculizumab φάνηκε ότι μείωσε σημαντικά τον κίνδυνο θρόμβωσης ανεξάρτητα από το εάν οι ασθενείς λάμβαναν ή όχι αντιπηκτική αγωγή. Επομένως, ένα ερώτημα μείζονος κλινικής σημασίας είναι εάν η δια βίου αντιπηκτική αγωγή είναι απαραίτητη για ασθενείς με PNH που ελέγχονται καλά υπό eculizumab. Οι *Emadi et al.* ήδη από το 2009 πρότειναν ότι η διακοπή της αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με PNH υπό eculizumab μπορεί να γίνει με ασφάλεια. Η απόφαση για το εάν είναι ασφαλής ή όχι διακοπή της αντιπηκτικής αγωγής σε ασθενείς με PNH που λαμβάνουν ECU θα πρέπει στην πραγματικότητα να καθοριστεί από τα αποτελέσματα τυχαιοποιημένης ελεγχόμενης κλινικής δοκιμής, αλλά δεδομένης της σπανιότητας της νόσου, είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί μια τέτοια μελέτη (*Malato et al. 2012*).

Η θρομβόλυση με tPa μπορεί να αποβεί σωτήρια σε ορισμένες περιπτώσεις. Πράγματι, έχουν υπάρξει διάφορες αναφορές για την αποτελεσματικότητα της χορήγησης tPA για την αντιμετώπιση μιας από τις πιο σοβαρές επιπλοκές της PNH, το σύνδρομο Budd-Chiari. Οι *Araten et al.*(2012) αναφέρουν εννέα ασθενείς στους οποίους η θρομβολυτική θεραπεία είχε επιτυχή έκβαση με αποτέλεσμα τη λύση του θρόμβου. Ωστόσο, σε έναν από τους ασθενείς στον οποίο εμφανίστηκε αιμορραγία, πιθανά συνέβαλε στον θάνατο του ασθενούς. Η αξία της χρήσης της θρομβολυτικής αγωγής είναι αμφιλεγόμενη εξαιτίας των αιμορραγικών επιπλοκών, οι οποίες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνες. Θεωρείται λιγότερο πιθανό να χρειαστεί θρομβολυτική θεραπεία μετά την έναρξη αγωγής με eculizumab (*McMullin et al. 1994; Hauser et al. 2003; Rosse et al. 2003; Araten et al. 2012; Hill et al. 2017*).

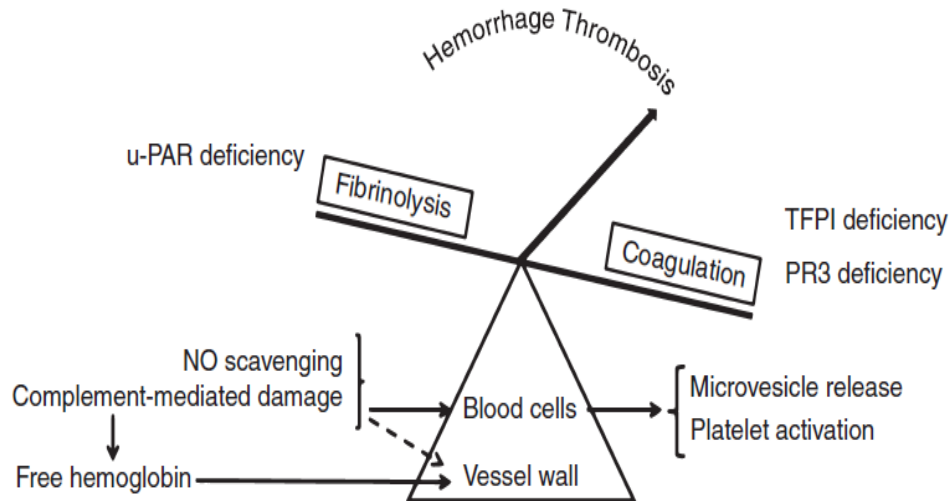
## 2.10 Μηχανισμοί θρόμβωσης στην PNH

Ο αυξημένος κίνδυνος εκδήλωσης θρόμβωσης σε ασθενείς με PNH έχει μελετηθεί επισταμένα στο χώρο της διεθνούς βιβλιογραφίας. Οι μηχανισμοί πίσω από το σχηματισμό θρόμβων στην PNH είναι πολύπλοκοι και υπό συνεχή έρευνα. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του συστήματος του συμπληρώματος, των αιμοπεταλίων και της διαδικασίας της πήξης πιθανά εξηγούν μέρος του αυξημένου κινδύνου θρόμβωσης. Λόγω της πολυπαραγοντικής φύσης της νόσου, συνδυασμός πολλών παραγόντων ενδέχεται να είναι υπεύθυνος για την αυξημένη συχνότητα σχηματισμού θρόμβων και της σχετιζόμενης θνησιμότητας (Εικόνα 38).



**Εικόνα 38.** Η ισορροπία της αιμόστασης στην PNH τείνει προς την πλευρά της θρόμβωσης εξαιτίας των πολλαπλών παραγόντων που συνεισφέρουν στην δημιουργία των θρόμβων. ((Συνοτομογραφίες: NET: neutrophil extracellular traps; WPB: Weibel-Palade bodies; ROS: reactive oxygen species; NO: nitric oxide) (Peacock-Young 2018).

Προκειμένου να εξηγηθεί η συχνή εκδήλωση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων στην PNH έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί. Ωστόσο, κανένας δεν έχει βρεθεί να ευθύνεται κατά κύριο λόγο, για τον εξαιρετικά αυξημένο θρομβωτικό κίνδυνο που συχνά καταγράφεται σε ασθενείς με τη συγκεκριμένη νόσο (Peacock-Young et al. 2018). Ακολούθως παρατίθενται οι εν λόγω μηχανισμοί και η σχετική συνεισφορά τους σε επίπεδο ευρημάτων σε ασθενείς με PNH (Εικόνα 39).



**Εικόνα 39.** Διαγραμματική απεικόνιση υποθετικών μηχανισμών εκδήλωσης θρόμβωσης σε ασθενείς με PNH. Η αιμοστατική ισορροπία διατηρείται μέσω των διαδικασιών της πήξης και ινωδόλυσης και επηρεάζεται από παράγοντες που προέρχονται από το αγγειακό τοίχωμα και τις κυτταρικές σειρές. Οι μηχανισμοί που αναφέρονται έχουν προταθεί πως καθορίζουν την κατεύθυνση της αιμοστατικής ισορροπίας προς την εκδήλωση προθρομβωτικής κατάστασης σε ασθενείς με PNH. (Συντομογραφίες: PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, NO: nitric oxide, GPI: glycosyl-phosphatidylinositol, u-PAR: urokinase plasminogen activator receptor, TFPI: tissue factor pathway inhibitor, PR: proteinase 3) (Van Bijnen 2012).

### 2.10.1 Ο ρόλος του ενδοθηλίου

Η εκδήλωση βλαβών στο ενδοθηλιακό κυτταρικό τοίχωμα αποτελεί σημαντικό παράγοντα που μπορεί να συμβάλλει στην εκδήλωση θρόμβωσης. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη που εκλύεται από ερυθροκύτταρα με PNH που έχουν υποστεί λύση έχει μεγάλη τοξικότητα για τα ενδοθηλιακά κύτταρα (Rother et al. 2005). Εναλλακτικά, η εκδήλωση βλάβης στο ενδοθηλιακό κυτταρικό τοίχωμα μπορεί να οφείλεται στη δράση μικροσωματιδίων που προέρχονται από μονοκύτταρα με έλλειψη σε GPI, ως απόρροια εκδήλωσης βλάβης του συμπληρώματος. Ο σχηματισμός του C5a μπορεί να οδηγήσει σε προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικές καταστάσεις μέσω της δράσης των φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η IL-6, η IL-8, και ο *tumor necrosis factor-α*. Όλα αυτά θα ενεργοποιήσουν περαιτέρω το ενδοθήλιο με επακόλουθο την παραγωγή μικροσωματιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων, διαιωνίζοντας έτσι το πρόβλημα (Hill et al. 2013). Τα μικροσωματίδια περιέχουν ιστικό παράγοντα (Tissue Factor/TF), και επάγουν την αυξημένη έκφρασή του στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Aharon et al. 2008). Μελέτες που έχουν διεξαχθεί έχουν δείξει πως ο αριθμός των μικροσωματιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων, που φέρουν προθρομβωτικό και

προφλεγμονώδη φαινότυπο (δηλωτικό της βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων) καταγράφηκε σημαντικά αυξημένος σε ασθενείς με PNH έναντι υγιών ατόμων (*Simak et al. 2004*). Επίσης αυξημένα καταγράφονται τα επίπεδα δεικτών ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον παράγοντα vWF (*von Willebrand factor*) και το διαλυτό VCAM-1 (*soluble vascular cell adhesion molecule-1/sVCAM-1*) (*Helley et al. 2010; Grunewald et al. 2003*). Τα προαναφερθέντα ευρήματα είναι δηλωτικά ενδοθηλιακών βλαβών σε ασθενείς με PNH, είτε έμμεσα μέσω της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης είτε άμεσα λόγω βλάβης του συμπληρώματος.

Δεν είναι ξεκάθαρο κατά πόσο τα ενδοθηλιακά κύτταρα ασθενών με PNH εμπεριέχουν την μετάλλαξη PIG-A και επομένως είναι περισσότερο ευάλωτα στην ενεργοποίηση του συμπληρώματος έναντι των αντίστοιχων φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, ακόμα και σε περιπτώσεις φυσιολογικών ενδοθηλιακών κυττάρων, το σύμπλεγμα MAC (*Membrane Attack Complex*) επάγει την αυξημένη έκφραση του TF και των μορίων πρόσδεσης (*Tedesco et al. 1997*). Στην περίπτωση του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου, υπάρχουν ευρήματα σύμφωνα με τα οποία τόσο τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα, όσο και τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα εκδηλώνουν πανομοιότυπες χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δηλωτικές της κοινής προέλευσης (*laPorta et al. 2008*). Πρόδρομα ευρήματα υποδεικνύουν πως ίσως επικρατεί μία παρόμοια κατάσταση και στην PNH. Οι *Helley et al. (2010)* καλλιέργησαν ECFCs (*endothelial colony-forming cells*) από μονοπύρηννα κύτταρα PNH ασθενών και ανακάλυψαν πως τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφάνιζαν έλλειψη σε CD55 και CD59. Απαιτείται πρόσθετη έρευνα προκειμένου να διευκρινιστεί κατά πόσο τα κυκλοφορούντα ενδοθηλιακά κύτταρα ή τα ECFCs ‘φιλοξενούν’ PIG-A μεταλλάξεις, καθώς επίσης κατά πόσο τα συγκεκριμένα κύτταρα ενσωματώνονται στο ενδοθήλιο. Σε μελέτη που αφορούσε την συχνότητα εντοπισμού ενδοθηλιακών κυττάρων σε δέκτες αλλογενούς μεταμόσχευσης βρέθηκε πως μια μειοψηφία των συγκεκριμένων κυττάρων προερχόταν από τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα των δοτών (*Mueller et al. 2011*). Επομένως, φαίνεται απίθανη η πιθανότητα αυξημένης συχνότητας εύρεσης GPI ανεπαρκών ενδοθηλιακών κυττάρων σε ασθενείς με PNH, κάτι που υποδηλώνει πως η ενδοθηλιακή ενεργοποίηση δεν εξαρτάται αμιγώς από τις όποιες βλάβες επισυμβαίνουν στο συμπλήρωμα.

### 2.10.1.1 Εξωκυτταρικά σωματίδια (EVs)

Τα εξωκυτταρικά σωματίδια (*extracellular vesicles*/EVs) είναι κυτταρικά οργανίδια που περιορίζονται από μία μεμβρανική διπλοστοιβάδα φωσφολιπιδίων, τα οποία και απελευθερώνονται από διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους μετά από ενεργοποίηση ή κατά την απόπτωση. Παρουσιάζουν ετερογένεια σε επίπεδο μεγέθους και δομής και εμπλέκονται στις διαδικασίες της κυτταρικής επικοινωνίας, της φλεγμονής, του αγγειακού τόνου, της αγγειογένεσης και της αιμόστασης (*Owens & Mackman 2011; Piccin et al. 2007*). Εμφανίζουν προπηκτικές ιδιότητες σε παθολογικές καταστάσεις, με έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης στη κυτταρική επιφάνεια, συμβάλλοντας έτσι στην συνάθροιση προπηκτικών ενζυμικών συμπλεγμάτων μέσω του ιστικού παράγοντα (*Owens & Mackman, 2011; Burnier et al. 2009*). Επιπρόσθετα, τα EVs έχουν και ινωδολυτικές ιδιότητες και θεωρείται ότι μπορεί ασκούν ρυθμιστικό ρόλο στην επίτευξη ισορροπίας μεταξύ πήξης και ινωδόλυσης (*Lacroix & Dignat 2013*).

Στην PNH ενεργοποιείται το συμπλήρωμα στην κυτταρική επιφάνεια των κυττάρων με έλλειψη GPI, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση προπηκτικών EVs. Σε PNH ασθενείς περιγράφονται αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων EVs, ως επί το πλείστον αιμοπεταλιακής προέλευσης. Ωστόσο, δεν έχει καταδειχθεί κάποια συσχέτιση ανάμεσα στον αριθμό των EVs και το μέγεθος του κλώνου (*Hugel et al. 1999*). Υπάρχουν ευρήματα μελετών που περιγράφουν αυξημένα επίπεδα ενδοθηλιακών EVs σε προφλεγμονώδεις και προθρομβωτικούς PNH φαινοτύπους. Επιπρόσθετα, ως απάντηση στην καταστροφή του συμπληρώματος, τα μονοκύτταρα δύνανται να απελευθερώσουν EVs που περιέχουν ιστικό παράγοντα. Τα εν λόγω EVs παγιδεύονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και αφού διαθέτουν ικανότητα αυξημένης έκφρασης του TF, πιθανά επάγουν τη θρόμβωση (*Collier et al. 2013*).

Η μελέτη των *Devos et al. (2018)* έδειξε πως καταγράφηκαν παρόμοια επίπεδα EVs με ερυθροκυτταρική προέλευση, τόσο σε ασθενείς με PNH, όσο και σε φυσιολογικά άτομα. Η διαφορά ήταν πως τα ερυθροκύτταρα των ασθενών με PNH απελευθέρωναν αυξημένα επίπεδα προπηκτικών EVs, μετά από διέγερση του συμπληρώματος *in vitro* (*Kozuma et al. 2011*). Το γεγονός αυτό πιθανόν να αντικατοπτρίζει *in vivo* μία ταχείας μορφή κάθαρση των EVs με ερυθροκυτταρική προέλευση. Προς το παρόν υπάρχουν αρκετά κενά αναφορικά με τον πιθανό ρόλο των EVs στην εκδήλωση της σχετιζόμενης με την PNH θρόμβωσης, ως βιοδεικτών εκτίμησης θρομβωτικού κινδύνου.

### 2.10.2 Ο ρόλος της έλλειψης των TFPI, θειϊκής ηπαράνης, PR3

Ο αναστολέας TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*) περιορίζει την έναρξη της διαδικασίας της πήξης, μέσω της αναστολής του ιστικού παράγοντα (TF/tissue factor). Πιο συγκεκριμένα, ο TFPI δημιουργεί ένα τεταρτοταγές σύμπλοκο με τον TF, την ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα VII (FVIIa) και την ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα X (FXa). Το εν λόγω σύμπλοκο παράγεται κυρίως στο ενδοθήλιο (κατά 85%), ωστόσο συμμετέχουν και άλλες κυτταρικές ομάδες (π.χ. αιμοπετάλια, μονοκύτταρα). Ο TFPI εκφράζεται σε δύο ισομορφές τον TFPI-α και TFPI-β. Η ισομορφή TFPI-β είναι μια GPI εξαρτώμενη πρωτεΐνη και θεωρείται ότι ασκεί το 80% της αντιπηκτικής δράσης. Ανεπάρκεια της GPI άγκυρας στην εν λόγω ισομορφή μπορεί να μειώσει τις αντιπηκτικές ιδιότητες του ενδοθηλίου και να οδηγήσει σε εμφάνιση θρόμβωσης. Η ισομορφή TFPI-α είναι η επικρατούσα μορφή του συμπλόκου και η περισσότερο πολυπληθής. Προσδένεται είτε σε γλυκοζαμινογλυκάνες είτε στη κυτταρική μεμβράνη μέσω ενός GPI συμπαράγοντα, η πλήρης ταυτότητα του οποίου δεν είναι σαφώς διευκρινισμένη (*Zhang et al. 2003; Maroney et al. 2006 & 2007*).

Οι δύο προαναφερθείσες TFPI ισομορφές υπερεκφράζονται στα μονοκύτταρα, κατά την διαδικασία διέγερσης από λιποπολυσακχαρίτες. Αναστολή της λειτουργίας του TFPI συνεπάγεται εκδήλωση των προπηκτικών ιδιοτήτων των μονοκυττάρων (*Basavaraj et al. 2010*). Εφόσον ενδοθηλιακά κύτταρα με ανεπάρκεια σε GPI εντοπίζονται στην PNH, καθίσταται σαφές πως έλλειψη της λειτουργίας του TFPI δύναται να καταστήσει τα συγκεκριμένα ενδοθηλιακά κύτταρα προπηκτικά. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπ' όψιν πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα είναι σχετικά σπάνια, η πιθανή συνεισφορά του ανεπαρκούς σε TFPI ενδοθηλίου, στη σχετιζόμενη με PNH θρόμβωση, είναι εξίσου περιορισμένη. Θα πρέπει να αναφερθεί πως ο TFPI δεν εκφράζεται σε αιμοπετάλια που τελούν σε κατάσταση κυτταρικής αδράνειας. Απαιτείται η ταυτόχρονη διέγερση με κολλαγόνο και θρομβίνη, προκειμένου τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια να εκφράσουν την TFPIα ισομορφή και άλλες προπηκτικές πρωτεΐνες και εν τέλει να απελευθερωθεί η TFPIα στα μικροσωματίδια (*Maroney et al. 2007*). Αιμοπετάλια με έλλειψη GPI πιθανότατα στερούνται της ικανότητας έκφρασης της TFPIα στην επιφάνειά τους κατά την στιγμή της διέγερσης, γεγονός που διευρύνει τις προπηκτικές τους ιδιότητες.

Η σύνδεση της Αντιθρομβίνης III στα ενδοθηλιακά κύτταρα πιστεύεται ότι επιτυγχάνεται μέσω της θειϊκής ηπαράνης, που είναι επίσης μια πρωτεΐνη συνδεδεμένη

με την GPI άγκυρα. Τα επίπεδα της θειϊκής ηπαράνης μειώνονται από φλεγμονώδεις δείκτες όπως η ιντερλευκίνη-1 (IL-1) και ο TNF. Η έλλειψη της πιθανολογείται ότι εν μέρει συμβάλει στην υπερπηκτική κατάσταση που δημιουργείται στην PNH, αν και εκτεταμένες μελέτες δεν έχουν γίνει. Σε ποντίκια με έλλειψη θειϊκής ηπαράνης βρέθηκε η ίδια ποσότητα εναπόθεσης ινώδους με αυτά του αγρίου τύπου, κάτι που πιθανά υποδηλώνει ότι μπορεί να γίνεται υποκατάσταση του ρόλου της θειϊκής ηπαράνης από άλλες γλυκοζαμινογλυκάνες. Μόνο η πλήρης ανεπάρκεια της θειϊκής ηπαράνης φαίνεται να οδηγεί σε θρόμβωση (Hill et al. 2013).

Η PR3 (*proteinase 3*) αποτελεί μία ακόμα πρωτεΐνη που εκφράζεται στα ουδετερόφιλα και εμπλέκεται στη διαδικασία της αιμόστασης. Το συγκεκριμένο ένζυμο προσδένεται στη κυτταρική μεμβράνη χρησιμοποιώντας τον συμπαράγοντα NB-1 (CD177), που περιλαμβάνεται στην ομάδα των GPI αγκυρωμένων μορίων (von Vietinghoff et al. 2007). Οι Jankowska et al. (2011) σε μελέτη τους έδειξαν πως η PR3 είναι απύσα σε ουδετερόφιλα με έλλειψη GPI και ότι τα επίπεδα της PR3 στην κυκλοφορία είναι αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος του PNH κλώνου. Η PR3 φάνηκε να μειώσει την επαγόμενη από τη θρομβίνη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, υποδηλώνοντας πως η έλλειψη της σε αιμοπετάλια με κλώνο PNH μπορεί να επάγει την ενεργοποίησή τους. Η έλλειψη της PR3 ρυθμίζει την πήξη του αίματος με διαφορετικούς τρόπους, όπως για παράδειγμα μέσω διάσπασης του ενδοθηλιακού υποδοχέα της πρωτεΐνης C (EPCR), αποδόμησης του TFPI, υπερέκφρασης του TF του ενδοθηλίου, καθώς επίσης και της αυξημένης δράσης του VWF (Raife et al. 2009; Steppich et al. 2008; Villegas-Mendez et al. 2007; Renesto et al. 1997).

Σε γενικές γραμμές, η ακριβής συνεισφορά των κυττάρων με έλλειψη της άγκυρας GPI, στην επαγόμενη από την PNH θρόμβωση, παραμένει αδιευκρίνιστη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, κυρίως στα ερυθροκύτταρα, η συνεισφορά αυτή φαίνεται να παίζει τον βασικότερο ρόλο. Έχει βρεθεί ότι ασθενείς με συγγενή ανεπάρκεια του γονιδίου PIM, το οποίο είναι απαραίτητο για την διαδικασία σύνθεσης των GPI μορίων, συχνά εκδηλώνουν θρόμβωση χωρίς όμως να συνυπάρχει αιμόλυση (Almeida et al. 2006).

### **2.10.3 Ο ρόλος της επίδρασης της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και της εξάντλησης των επιπέδων του NO**

Η εκδήλωση ενδαγγειακής αιμόλυσης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης. Η περίσσεια ελεύθερης αιμοσφαιρίνης είναι

ένας επιπλέον μηχανισμός που πιθανά συμβάλλει στην προθρομβωτική κατάσταση που εμφανίζεται στην PNH. Υπόφυσιολογικές συνθήκες η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη απομακρύνεται από την κυκλοφορία με την βοήθεια ειδικών μηχανισμών. Όταν όμως εκδηλώνεται εκτεταμένη ενδαγγειακή αιμόλυση, επέρχεται κορεσμός στη λειτουργία των μηχανισμών αυτών, με αποτέλεσμα την κυκλοφορία της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα. Ακολούθως εκδηλώνεται μία σειρά από προφλεγμονώδεις, πολλαπλασιαστικές και προ-οξειδωτικές επιδράσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα (*Wagener et al. 2001*).

Κατά την ενδαγγειακή αιμόλυση η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη διμερίζεται και συνδέεται με την απτοσφαιρίνη του ορού, η οποία εκφράζεται στα μονοκύτταρα /μακροφάγα, σχηματίζει σύμπλοκο, ακολουθεί ενδοκύττωση και αποδόμηση από το CD163. Η οξείδωση της αίμης οδηγεί σε ταχεία σύνδεση με την αιμοπηξίνη, ώστε ο οργανισμός να προστατευθεί από την τοξική δράση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης και της αίμης. Ωστόσο σε έντονη αιμόλυση, η ανωτέρω δεσμευτική ικανότητα δεν φαίνεται να επαρκεί. Η αιμοσφαιρίνη και η αίμη φιλτράρονται από τους νεφρούς. Η συσσώρευση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης φαίνεται να έχει θρομβογόνο επίδραση στα αιμοπετάλια και στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η μελέτη των *Belcher et al. (2014)* κατέδειξε ότι η αίμη επάγει την απελευθέρωση των σωμάτων *Weibel-Palade/WPBs* από το αγγειακό ενδοθήλιο. Η αποκοκκίωση των WPBs απελευθερώνει VWF και P-σελεκτίνη στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, διεγείροντας την πήξη και τον καταρράκτη του συμπληρώματος. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη έχει παρατηρηθεί ότι συνδέεται άμεσα με τον VWF που εκτίθεται στο ενδοθήλιο και αυξάνει τη συγγενεία του με την γλυκοπρωτεΐνη-Ib (GPIb), που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων (*Jacquemin et al. 2015*).

Η προσθήκη ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε ανθρώπινο ορό φαίνεται ότι αναστέλλει τη δράση της ADAMTS-13, που είναι μια πρωτεάση που διασπά τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή του παράγοντα von Willebrand και αναστέλλει τον σχηματισμό των μικροθρόμβων (*Zhou et al. 2009*).

Το NO (νιτρικό οξύ) διατηρεί υπό φυσιολογικές συνθήκες την χαλάρωση των λείων μυϊκών ινών, αναστέλλει την ενεργοποίηση και συνάθροιση των αιμοπεταλίων, ενώ έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες για το ενδοθήλιο. Μειωμένα επίπεδα NO ενδέχεται να αυξήσουν την τάση εκδήλωσης θρόμβωσης στην PNH (*Rother et al. 2005*). Τα επίπεδα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης σε ασθενείς με PNH πράγματι συσχετίζονται με την κατανάλωση του NO. Η L-αργινίνη σε φυσιολογικές συνθήκες



αποτελεί το υπόστρωμα για τη σύνθεση του NO. Σε περιόδους ενδαγγειακής αιμόλυσης, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη αντιδρά με το NO με τρόπο μη αντιστρεπτό και δημιουργεί νιτρικό άλας και μεθαιμοσφαιρίνη. Τα ερυθροκύτταρα που έχουν υποστεί λύση εκκρίνουν αργινάση, η οποία καταλύει την μετατροπή της L-αργινίνης (υπόστρωμα για την σύνθεση NO) σε ορνιθίνη. Αποτέλεσμα και των δύο διαδικασιών είναι η μειωμένη διαθεσιμότητα σε NO. Η εξάντληση του NO προκαλεί αγγειακή συστολή που εκδηλώνεται με σύσπαση των λείων μυϊκών ινών και συμβάλλει στην προθρομβωτική κατάσταση. Οι ασθενείς παρουσιάζουν υποστερνικό άλγος, ιδιαίτερα νωρίς το πρωί. Με την κάθαρση της αιμοσφαιρινουρίας οι σπασμοί υποχωρούν. Κατά τη διάρκεια περιόδων αιμοσφαιρινουρίας, η εξάντληση του NO μπορεί να οδηγήσει σε στυτική δυσλειτουργία, κοιλιακό άλγος και πνευμονική υπέρταση (*Rachidi et al. 2010*). Ωστόσο, ο ρόλος της εξάντλησης των επιπέδων του NO παραμένει αμφίβολος στο επίπεδο της φλεβικής θρόμβωσης, απαιτούνται μελέτες σε μεγάλους πληθυσμούς PNH ασθενών, προκειμένου να αξιολογηθεί η συσχέτιση των θρομβωτικών επεισοδίων με τα χαμηλά επίπεδα του NO. Ο ρόλος του NO στην αρτηριακή θρόμβωση χρήζει επίσης διενέργειας περισσότερων μελετών.

#### **2.10.4 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων**

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχει προταθεί ότι εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην εκδήλωση της επαγόμενης από την PNH θρόμβωσης. Παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία μιας προθρομβωτικής κατάστασης και στην έναρξη του σχηματισμού του θρόμβου. Αν και υπό φυσιολογικές συνθήκες τα αιμοπετάλια εκφράζουν τους αναστολείς του συμπληρώματος CD55 και CD59, οι τελευταίοι απουσιάζουν σε αιμοπετάλια με κλώνους PNH, ως εκ τούτου θα περίμενε κανείς λύση των αιμοπεταλίων και εμφάνιση θρομβοπενίας εξαιτίας της ανεπάρκειας των CD55 και CD59 (*Maciejewski et al. 1996; Vu et al. 1996*). Παρ' όλο που το συμπλήρωμα στην PNH επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τα ερυθροκύτταρα, δεν φαίνεται να επιδρά το ίδιο άμεσα και στα αιμοπετάλια, πιθανά λόγω κάποιου μηχανισμού αντίστασης που ίσως συμβάλλει στην προθρομβωτική κατάσταση (*Sims & Wiedmer 1991*). Είναι γνωστό πως θρομβοπενία καταγράφεται συχνά στην PNH, αποδίδεται ωστόσο στη συνακόλουθη ανεπάρκεια μυελού των οστών και όχι στη στην εμπλοκή του συμπληρώματος. Τα ευρήματα δύο μελετών, με περιορισμένο αριθμό (16 συμμετέχοντες) ασθενών με PNH, έδειξαν πως η διάρκεια ζωής του συνολικού αριθμού αιμοπεταλίων ήταν φυσιολογική στην πλειοψηφία των

συμμετεχόντων (*Louwes et al. 2001; Devine et al. 1987*). Το γεγονός ότι κατά την διάρκεια της θεραπευτικής αντιμετώπισης με eculizumab, τόσο το μέγεθος του PNH κλώνου στα αιμοπετάλια όσο και ο αριθμός των αιμοπεταλίων παραμένουν σταθερά συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι τα αιμοπετάλια επιβιώνουν από την καταστροφική διαδικασία που υφίστανται, λόγω ενεργοποίησης του συμπληρώματος (*Kelly et al. 2011; Hill et al. 2005; Jin et al. 1997*).

Το συμπλήρωμα δεν φαίνεται να καταστρέφει άμεσα τα αιμοπετάλια, ωστόσο διαθέτει την ικανότητα να επάγει την ενεργοποίησή τους. Τα αιμοπετάλια έχουν δυνατότητα αυξημένης εναπόθεσης του συμπλόκου MAC στην μεμβράνη τους ακόμη και σε φυσιολογικές καταστάσεις. Η 'βλάβη' του συμπληρώματος πυροδοτεί μορφολογικές αλλαγές στην επιφάνεια τους (αλλαγή στον κυτταροσκελετό και στη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων, έκκριση των α-κοκκίων και του παράγοντα FV), με αποτέλεσμα την εξωκύτωση του συμπλόκου MAC και την παραγωγή των προθρομβωτικών αιμοπεταλιακών σωματιδίων (PMPs) (*Sims & Wiedmer 1995; Hugel et al. 1999; Peacock-Young et al. 2018*). Καθώς η αναστολή της λειτουργίας του CD59 στα φυσιολογικά αιμοπετάλια εντείνει τις ήδη υπάρχουσες προπηκτικές αποκρίσεις (*Sims et al. 1989*), θα ήταν αναμενόμενη μία παρόμοια απόκριση σε αιμοπετάλια με ανεπάρκεια GPI και κλώνους PNH ως απόρροια συνάθροισης του MAC. Οι *Wiedmer et al. (1993)* έδειξαν πως τα PNH αιμοπετάλια εκθέτουν περισσότερα σημεία πρόσδεσης για τον παράγοντα FVa (αυξάνοντας το χρονικό διάστημα της δράσης της θρομβίνης) από τα φυσιολογικά αιμοπετάλια. Μεμονωμένα ευρήματα αναφορικά με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων *in vivo* (*Gralnick et al. 1995*) δεν επιβεβαιώνονται από παρόμοιες μελέτες (*Grunewald et al. 2004; Maciejewski et al. 1996*). Οι *Grunewald et al. (2004)* αναφέρουν πως η διαταραγμένη λειτουργία αιμοπεταλίων με PNH κλώνο μπορεί να εξηγηθεί μέσω της μειωμένης ρυθμιστικής ικανότητας, η οποία είναι αποτέλεσμα της χρόνιας υπερδιέγερσής τους. Έχει επίσης αναφερθεί πως η έκκριση του συμπλόκου MAC από την μεμβράνη των αιμοπεταλίων μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια υποδοχέων προκαλώντας μειωμένη λειτουργικότητα.

### **2.10.5 Δημιουργία μικροσωματιδίων (MPs)**

Τα μικροσωματίδια αποτελούν μεμβρανικά οργανίδια μικρού μεγέθους, τα οποία εκκρίνονται κατά τις διαδικασίες της ενεργοποίησης του καταρράκτη της πήξης, της φλεγμονώδους απόκρισης ή της πρόκλησης κυτταρικής βλάβης. Υπό φυσιολογικές

συνθήκες η κυτταρική μεμβράνη αποτελείται από ανιονικά φωσφολιπίδια (π.χ. φωσφατιδυλσερίνη) στην εσωτερική επιφάνεια και φωσφολιπίδια που βασίζονται στη χολίνη (π.χ. σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλχολίνη) στην εξωτερική. Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διέγερσης, χάνεται η συμμετρία της μεμβράνης με αποτέλεσμα την έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης στην εξωτερική επιφάνεια, την αποδόμηση του κυτταροσκελετού και την απελευθέρωση μικροσωματιδίων. Η έκθεση της φωσφατιδυλσερίνης δημιουργεί την κατάλληλη επιφάνεια για τη συνάθροιση των προπηκτικών ενζυμικών συμπλόκων της προθρομβινάσης (FVa/FXa) και της τενάσης (FVIIIa/FIXa), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μηχανισμού της πήξης και της μετατροπής της προθρομβίνης σε θρομβίνη (*Hugel et al. 2005; Zwaal & Schroit 1997*).

Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος στην επιφάνεια κυττάρων με έλλειψη GPI θεωρείται ότι διεγείρει την έκκριση προπηκτικών μικροσωματιδίων, αυξάνοντας τον κίνδυνο εκδήλωσης θρόμβωσης. Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει την συγκεκριμένη υπόθεση. Μελέτη που χρησιμοποίησε εξαρτώμενη από την προθρομβινάση δοκιμασία έδειξε πως τα συνολικά επίπεδα μικροσωματιδίων ήταν αυξημένα σε ασθενείς με PNH έναντι των υγιών. Η προέλευση των συγκεκριμένων μικροσωματιδίων ήταν κυρίως αιμοπεταλιακή, ενώ δεν αναφέρθηκε κάποιος συσχετισμός αναφορικά με το μέγεθος του PNH κλώνου (*Hugel et al. 1999*). Έτερη μελέτη όπου χρησιμοποιήθηκε κυτταρομετρία ροής δεν επιβεβαίωσε την εύρεση αυξημένων επιπέδων μικροσωματιδίων σε ασθενείς με PNH. Στη μελέτη αυτή δεν καταδείχθηκε η μονοκυτταρική προέλευση των μικροσωματιδίων (*Simak et al. 2004*).

Ως ενδιαφέροντα κρίνονται τα *in vitro* ευρήματα των *Wiedmer et al. (1993)*, σύμφωνα με τα οποία αιμοπετάλια με κλώνο PNH εκκρίνουν σημαντικά αυξημένους αριθμούς μικροσωματιδίων έναντι των φυσιολογικών αιμοπεταλίων, κατά τη διέγερση του συμπλόκου MAC. Δεν καταγράφηκαν όμως παρόμοια ευρήματα και *in vivo*, καθότι δεν παρατηρήθηκαν αποκλίσεις στον αριθμό των μικροσωματιδίων, αν και στην ομάδα των ασθενών παρατηρήθηκε μια σταθερά αυξημένη διαφοροποίηση. Από τα ευρήματα αυτά υπονοείται ότι είναι πιθανό κάποιες υποομάδες των ασθενών να χαρακτηρίζονται από υψηλότερη συγκέντρωση μικροσωματιδίων (*Simak et al. 2004; Hugel et al. 1999*). Τρεις βασικές υποθέσεις για την προθρομβωτική φύση των PMPs έχουν εντοπιστεί: α) τα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων σχηματίζονται από τα αιμοπετάλια κατά την ενεργοποίηση, επομένως και οι μεμβράνες τους έχουν τις ίδιες προθρομβωτικές ιδιότητες με την ενεργοποιημένη μεμβράνη των αιμοπεταλίων,

β) τα PMPs μπορούν να δεσμεύουν πρωτεΐνες του καταρράκτη της πήξης, όπως π.χ. οι ενεργοποιημένοι παράγοντες V (FVa) και VIII (FVIIIa). φαίνεται ότι οι θέσεις δέσμευσης αυτών των πρωτεϊνών στα PMPs υπερβαίνουν σε αριθμό τις αντίστοιχες στις μεμβράνες των ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων, γ) όταν απομονωμένα PMPs προστίθενται σε πλάσμα ελεύθερο από αιμοπετάλια, χωρίς την προσθήκη ενεργοποιητών της αιμόστασης, πυροδοτούν τη δημιουργία θρομβίνης, αποδεικνύοντας ότι τα μικροσωματίδια που δημιουργούνται *in vivo* μπορούν να διεγείρουν την διαδικασία της πήξης.

Τα PMPs έχει αποδειχθεί ότι εκφράζουν πολλά από τα σύμπλοκα των γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων των αιμοπεταλίων που εκφράζονται και στα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, όπως η γλυκοπρωτεΐνη Ib (GPIb) που δεσμεύει τον παράγοντα von Willebrand (VWF), το σύμπλοκο IIb/IIIa (GpIIb-IIIa) που αποτελεί υποδοχέα του ινωδογόνου και παίζει βασικό ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, η P-σελεκτίνη (μόριο κυτταρικής προσκόλλησης) που είναι δείκτης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και το PECAM-1 (*Platelet Endothelium Adhesion Molecule*), μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών που εμπλέκεται στη μετανάστευση των λευκοκυττάρων και στην αγγειογένεση. Εκτιμάται ότι οι μεμβράνες των PMPs έχουν 50-100 φορές υψηλότερη προπηκτική δράση από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια (*Wiedmer et al. 1993; Peacock-Young et al. 2018*).

Σχετικά με τα MPs των ερυθροκυττάρων, ενδιαφέρον είναι ότι, σε μελέτες που έγιναν, βρέθηκε πως τα επίπεδα των ερυθροκυτταρικών μικροσωματιδίων ήταν παρόμοια και στους PNH ασθενείς και στην ομάδα ελέγχου (*Simak et al. 2004; Hugel et al. 1999*). Ωστόσο, πειράματα *in vitro* έδειξαν πως τα PNH ερυθροκύτταρα εκκρίνουν αυξημένα επίπεδα προπηκτικών μικροσωματιδίων (*Kozuma et al. 2011; Ninomiya et al. 1999*). Το γεγονός πως τα συγκεκριμένα μικροσωματίδια δεν ανιχνεύονται *in vivo* υποδηλώνει πως η κάθαρσή τους από την κυκλοφορία είναι ταχύτερη και η κλινική τους σημασία αμφίβολη.

Η προγνωστική αξία των επιπέδων των μικροσωματιδίων στην εκδήλωση θρόμβωσης στην PNH παραμένει άγνωστη. Μελέτες σε ασθενείς με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και πνευμονική εμβολή δεν ανέδειξαν αυξημένα επίπεδα μικροσωματιδίων που να περιέχουν TF (*Steppich et al. 2011; Garcia et al. 2010*). Ακριβώς το αντίθετο ισχύει για ασθενείς με κακοήθεια, οπότε και τα μικροσωματίδια που περιείχαν TF αποτέλεσαν προγνωστικούς δείκτες εκδήλωσης θρόμβωσης

(Thaler et al. 2011; Zwicker et al. 2009). Απαιτούνται πρόσθετες μελέτες προκειμένου να αξιολογηθούν περαιτέρω τα προαναφερθέντα ευρήματα.

### **2.10.6 Διαταραχή της Ινωδόλυσης (ρόλος του u-PAR)**

Η διαταραχή της ινωδόλυσης μπορεί να αυξήσει την τάση εκδήλωσης θρόμβωσης στην PNH. Συσχετίζεται κυρίως με συνθήκες, κατά τις οποίες καταγράφεται έλλειψη του υποδοχέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (uPA-R), ο οποίος ανήκει στην ομάδα των GPI εξαρτώμενων πρωτεϊνών και ως εκ τούτου απουσιάζει από τα PNH μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. Ο u-PAR παίζει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη η οποία και ενεργοποιεί τη διαδικασία της ινωδόλυσης. Η πρόσδεση του u-PA στον u-PAR ενισχύει τη δημιουργία πλασμίνης. Δεδομένου ότι ο u-PAR αποτελεί GPI εξαρτώμενη πρωτεΐνη, επόμενο είναι ότι θα είναι απών ή με μειωμένα επίπεδα στους ασθενείς με PNH. Ο u-PAR δεν ανιχνεύεται σε PNH λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια (Sloand et al. 2008; Ploug et al. 1992). Τα επίπεδα της διαλυτής μορφής του υποδοχέα (su-PAR) καταγράφονται αυξημένα σε PNH ασθενείς (ιδιαίτερα σε αυτούς που εκδηλώνουν θρομβοεμβολικά επεισόδια) και βρέθηκαν να συσχετίζονται με το μέγεθος του κλώνου στα κοκκιοκύτταρα (Sloand et al. 2008; Ronne et al. 1995; Ploug et al. 1992; Radichi et al. 2010), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο u-PAR άνευ της GPI άγκυρας αδυνατεί να προσδεθεί στη κυτταρική μεμβράνη. Μπορεί να απελευθερωθεί από κύτταρα με έλλειψη GPI και να 'ανταγωνισθεί' τα αντίστοιχα μόρια του υποδοχέα που είναι προσδεδεμένα στην μεμβράνη προκειμένου να προσδεθούν στο u-PA (Ninomiya et al. 1997). Η συνολική μείωση στη διαθεσιμότητα του u-PA αυξάνει τον κίνδυνο εκδήλωσης θρόμβωσης. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 78 ασθενείς έδειξε πως τα διαλυτά επίπεδα του u-PAR δεν συσχετίστηκαν με τον κίνδυνο εμφάνισης θρομβωτικού επεισοδίου (Sloand et al. 2008). Πειράματα που έγιναν σε ποντίκια με έλλειψη su-PAR έδειξαν πως η συγκεκριμένη έλλειψη συνδυάστηκε με απουσία εκδήλωσης θρόμβωσης (Bugge et al. 1996). Η προσθήκη ανασυνδυασμένου su-PAR θεωρείται ότι πιθανά έχει ως αποτέλεσμα μια δόσοεξαρτώμενη μείωση της δραστηριότητας της ουροκινάσης (Sloand et al. 2008).

Υπάρχουν μελέτες που έχουν καταγράψει δυσλειτουργία και σε λοιπές παραμέτρους της ινωδόλυσης στην PNH, ωστόσο τα εξαχθέντα ευρήματα κρίνονται αντιφατικά (Helley et al. 2010; Grunewald et al. 2003; Gralnick et al. 1995). Δύο

διαφορετικές μελέτες κατέγραψαν φυσιολογικά επίπεδα αναστολέων της ινωδόλυσης ( $\alpha_2$ -antiplasmin/ $\alpha_2$ AP, plasmin-antiplasmin complex/PAP), plasminogen activator inhibitor-1/PAI-1), καθώς και του ενεργοποιητή της ινωδόλυσης t-PA (Tissue Plasminogen Activator) (Helley et al. 2010; Gralnick et al. 1995). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν και ευρήματα σύμφωνα με τα οποία καταγράφηκαν μειωμένα επίπεδα πλασμινογόνου και αυξημένα επίπεδα D-Dimers και δεικτών ενεργοποίησης της ινωδόλυσης (PAP, tPA-PAI<sub>1</sub> complex), δηλωτικά ενεργούς ινωδόλυσης. Οι εν λόγω επισημάνσεις συσχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος του κλώνου, υποδηλώνοντας την προοδευτική επιδείνωση των συμπτωμάτων ανάλογα με την αύξηση του μεγέθους του κλώνου (Grunewald et al. 2003). Τα επίπεδα της θρομβομοντουλίνης/TM (αναστολέας ενεργοποίησης της θρομβίνης) και των φυσικών ανασταλτών της πήξης (Αντιθρομβίνη-III, Πρωτεΐνη-C και Πρωτεΐνη-S) καταγράφηκαν φυσιολογικά σε ασθενείς με PNH (Helley et al. 2010; Grunewald et al. 2003; Gralnick et al. 1995).

#### **2.10.7 Προθρομβωτικοί ανατροφοδοτικοί (feedback) μηχανισμοί**

Η θρομβίνη, η παραγωγή της οποίας εξαρτάται από τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω, θεωρείται ότι ενεργοποιεί ανεξάρτητα τις πρωτεΐνες του συμπληρώματος C3 και C5. Η πλασμίνη, ένα ένζυμο που εμπλέκεται στην αποδομή του θρόμβου του ινώδους και διεγείρεται από το ίδιο το ινώδες έχει επίσης βρεθεί να καθαίρει το C5. Τα ανωτέρω υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός ανατροφοδοτικού μηχανισμού, σύμφωνα με τον οποίο η παραγωγή θρομβίνης, η εναπόθεση ινώδους και η διαδικασία της ινωδόλυσης μπορούν με τη σειρά τους να ενεργοποιήσουν το σύστημα του συμπληρώματος, ενεργοποίηση η οποία συνεπακόλουθα οδηγεί και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και της διαδικασίας της πήξης.

Έχει βρεθεί ότι η πλασμίνη *in vitro* εκκινεί τη σύνθεση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ σε *in vivo* μελέτη υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης του τερματικού συμπλέγματος του συμπληρώματος (C5b-9) και του PAF. Με τη μελέτη αυτή πιθανά καταδεικνύεται ένας μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο το MAC (*membrane attack complex*) συνεισφέρει στην επαγόμενη από την πλασμίνη σύνθεση του PAF, ωστόσο δεν έχει αποδειχθεί ότι ο μηχανισμός αυτός ενέχεται για την εμφάνιση θρόμβωσης ή την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (Leung & Morser et al. 2016; Foley et al. 2016).

### 2.10.8 Λοιποί προπηκτικοί μηχανισμοί επαγόμενοι από το συμπλήρωμα (ανεξάρτητοι από την αιμόλυση)

Έχει αναφερθεί ότι η ενεργοποίηση του συμπληρώματος από τα αντιφωσφολιπιδικά αντισώματα και η σηματοδότηση των ουδετεροφίλων μέσω των C5a υποδοχέων οδηγούν στην επαγωγή του ιστικού παράγοντα (TF). Η IL-6 που προάγει τον σχηματισμό της θρομβίνης, μπορεί επίσης να απορυθμίσει το ανοσοποιητικό σύστημα και να αναστείλλει τη δράση της μεταλλοπρωτεάσης ADAMTS-13, η οποία διασπά τα υψηλού μοριακού βάρους πολυμερή του VWF.

Μεγάλο μέρος της πρωτεΐνης S, κυκλοφορεί σε σύμπλοκο με την *C4b-binding protein*, αναστέλλοντας την αντιπηκτική της λειτουργία. Μειωμένα επίπεδα των φυσικών ανασταλτών Protein C & S έχουν βρεθεί τόσο στη δρεπανοκυτταρική νόσο όσο και στη β-θαλασσαιμία· εν μέρει αποδίδονται στη χρόνια κατανάλωση λόγω αυξημένης έκφρασης του ιστικού παράγοντα, δημιουργίας θρομβίνης και/ή ηπατική δυσλειτουργία. Επειδή οι καταστάσεις αυτές παρατηρούνται και στην PNH, ενδέχεται να εμπλέκονται και στη διαδικασία θρόμβωσης. Ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικοί στη δράση της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης-C (APC), η οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα αύξησης του παράγοντα VIII και έκπτωσης της πρωτεΐνης S. Κίνδυνος θρόμβωσης στην PNH μπορεί να υφίσταται και λόγω των αυξημένων επιπέδων του παράγοντα VIII (και του vWF) εξαιτίας της ενδοθηλιακής ενεργοποίησης.

Η θρόμβωση στην PNH μπορεί να αποτελεί και επακόλουθο λοιμώξεων, οι οποίες ενδέχεται να προκαλέσουν επίταση ή έκλυση της αιμόλυσης και κάποιες φορές εμφάνιση μυελικής ανεπάρκειας του τύπου απλασίας ή δυσπλασίας.

Υπάρχουν πιθανώς και μηχανισμοί ανεξάρτητοι από την αιμόλυση. Τα εισβάλλοντα παθογόνα (ή τα κύτταρα ξενιστές) αναγνωρίζονται από αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα, ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια, με αποτέλεσμα περαιτέρω έκθεση του TF (*Hill et al. 2013*).

## 2.11 Animals models

Προκειμένου να γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί θρόμβωσης στην PNH έχουν χρησιμοποιηθεί ποντίκια σαν πειραματόζωα. Ωστόσο δεν ήταν εύκολο να αναπαράχθούν τα θρομβωτικά συμβάντα που παρατηρούνται στον ανθρώπινο πληθυσμό και προκύπτουν από την ανεπάρκεια των CD55 και CD59. Τα προβλήματα προκύπτουν εξαιτίας του γεγονότος ότι υπάρχουν δύο διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για τα CD55 και CD59, τα a και b και η απομόνωση των αντίστοιχων φαινοτύπων μετά το knock-out έχει αποδειχθεί πρόκληση.

Στα ποντίκια έχει βρεθεί μια μοναδική διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η Crry (*complement-receptor1-related gene protein*), η οποία είναι μία λειτουργική πρωτεΐνη (ομόλογη της ανθρώπινης *membrane co-factor protein*), που έχει σημαντικό ρόλο στην προστασία των εμβρύων των ποντικών από τη θανατηφόρα επίθεση του συμπληρώματος. Η παραγωγή Crry/C3 *double knock-out* ποντικών κατέστη δυνατή και κατέδειξε στοιχεία εξωαγγειακής αιμόλυσης, ωστόσο τα αιμοπετάλια και τα ερυθροκύτταρα των ποντικών που στερούνται την πρωτεΐνη Crry φαίνεται να είναι περισσότερο επιρρεπή στην αιμόλυση.

Η προσπάθεια δημιουργίας μεταλλάξεων PIG-A αποδείχθηκε δύσκολη, αφού η έλλειψη PIG-A στα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα είναι θανατηφόρα. Ως εκ τούτου δημιουργήθηκε ένα μωσαϊκό μοντέλο PIG-A με τη συνύπαρξη φυσιολογικών και μεταλλαγμένων κυττάρων, προκειμένου να μιμηθεί την PNH οντότητα στους ανθρώπους, όμως ο PNH κλώνος που παρήχθη δεν μπορούσε να επεκταθεί κλωνικά και να αναπαράγει τα συμπτώματα της νόσου. Υπήρξε μία επιτυχημένη προσπάθεια δημιουργίας ερυθροκυττάρων με έλλειψη GPI-AP 100%, ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν καθόλου κλινικές εκδηλώσεις PNH.

Η περιορισμένη γνώση των μηχανισμών κλωνικής επέκτασης καθιστά δύσκολη τη δημιουργία ζωικών μοντέλων, προκειμένου να μελετηθούν οι θρομβωτικοί μηχανισμοί στην PNH (*Peacock-Young et al. 2018*).



## Κεφάλαιο 3: Κυτταρομετρία ροής

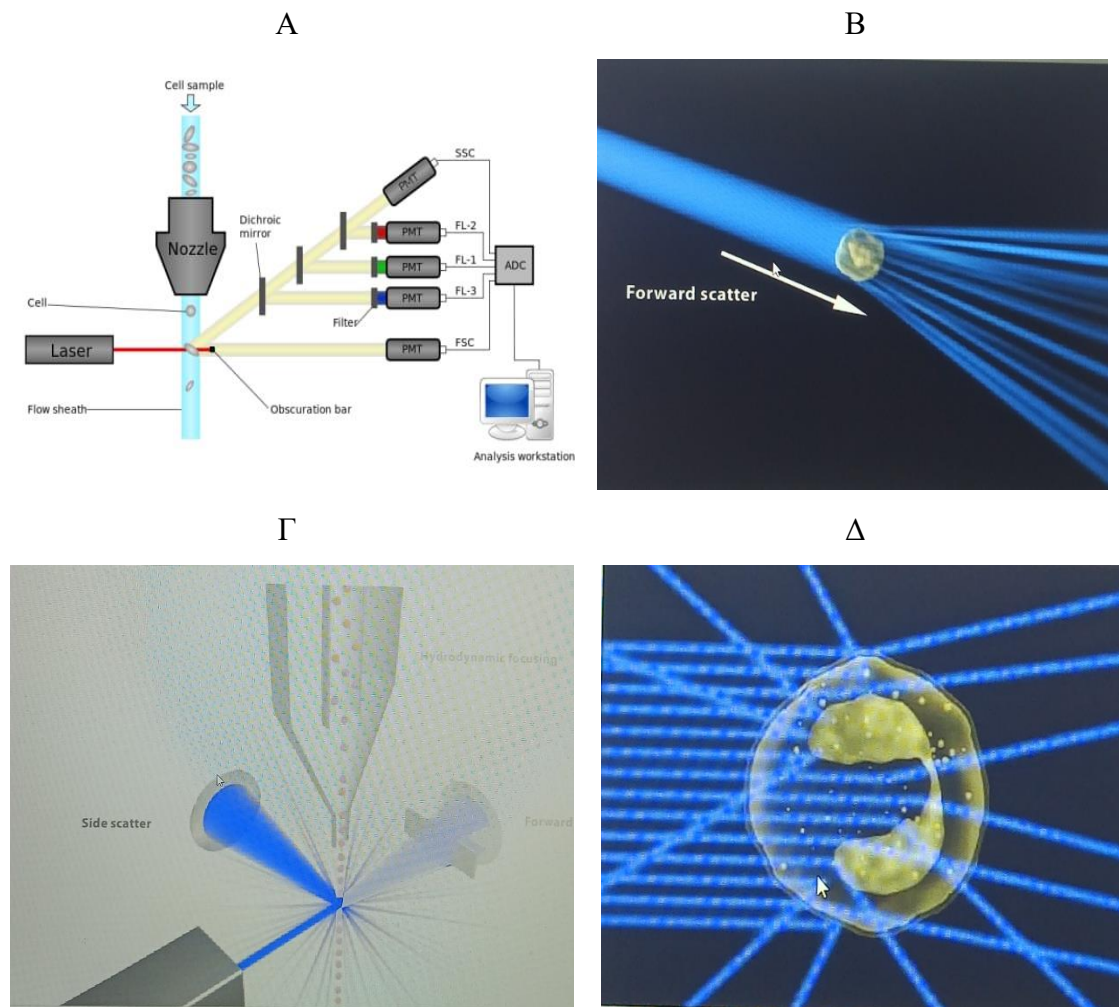
### 3.1 Γενικές αρχές

Πρόκειται για πολυπαραμετρική μέθοδο αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, βάσει της οποίας είναι δυνατή η ανίχνευση και μελέτη μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων κ.ά.). Τα σωματίδια που ελέγχονται συνδέονται με μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με κατάλληλες φθορίζουσες χρωστικές (φθοριοχρώματα) και αιωρούνται εντός υγρού που ρέει σε νηματική μορφή, το οποίο διέρχεται από σημείο που προσπίπτει μία ακτίνα laser. Η ακτινοβολία από την ακτίνα laser καθώς προσπίπτει στα διερχόμενα σωματίδια σκεδάζεται στον χώρο. Λόγω αυτής της σκέδασης παράγεται φθορίζουσα ακτινοβολία μέσω της οποίας γίνεται η συλλογή πολλαπλών πληροφοριών (για σωματίδια ή κύτταρα μεγέθους 0,5-40μm). Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα κύτταρα να διέρχονται ένα-ένα μέσα από την κυψελίδα ροής και κατά συνέπεια και από το σημείο που συναντώνται με την προσπίπτουσα ακτινοβολία.

Η σκέδαση εξαρτάται από φυσικά χαρακτηριστικά των σωματιδίων/κυττάρων και μπορεί να είναι ευθεία (γωνία 1-19°, forward scatter: μελέτη του μεγέθους) ή πλάγια (γωνία 90°, side scatter: μελέτη της δομής/κοκκίωσης) (Εικόνα 40). Ο προσδιορισμός των κυττάρων/σωματιδίων επιτυγχάνεται μέσω των σημάτων φθορισμού που παράγονται, από τα σημασμένα με φθοριοχρώματα (συνηθέστερα τα: φυκοερυθρίνη/PE και φλουορεσκεΐνη/FITC) μονοκλωνικά αντισώματα.

Καθώς τα κύτταρα συναντούν την πηγή φωτός τα φθοριοχρώματα διεγείρονται και εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος τα οποία είναι καθορισμένα για κάθε φθορίζουσα ουσία. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται μέτρηση του φθορισμού ανά κύτταρο. Το φως που παράγεται οδηγείται στον φωτοπολλαπλασιαστή, μετατρέπεται σε ηλεκτρικό σήμα και μεταφράζεται σε συγκεκριμένη παράμετρο μέσω λογισμικού.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συμπεριλαμβάνονται η δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού κυττάρων, ο μικρός χρόνος ανάλυσης, η ταυτόχρονη ανίχνευση έως και 12 παραμέτρων και η ανίχνευση ελάχιστου αριθμού κυττάρων.



**Εικόνα 40.** Α) Σχηματική αναπαράσταση της βασικής μονάδας ενός κυτταρομέτρου και νηματικής ροής κυττάρων/σωματιδίων. Β) Ακτίνα laser forward scatter-μελέτη μεγέθους κυττάρων/σωματιδίων. Γ-Δ) Ακτίνα laser side scatter-μελέτη δομής/κοκκίωσης.

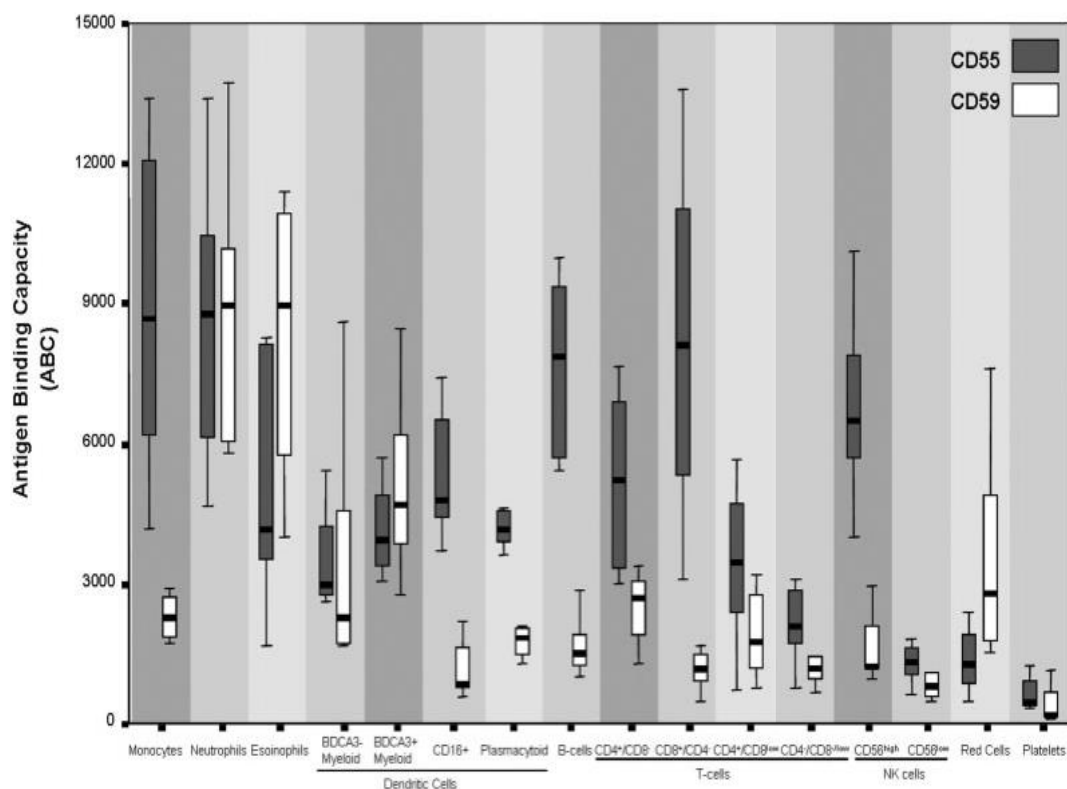
### 3.2 Η κυτταρομετρία ροής στη διάγνωση της PNH

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί την χρυσή επιλογή στη διερεύνηση της PNH, καθώς μπορεί να αξιολογήσει την έκφραση των GPI προσδεσμένων πρωτεϊνών με υψηλά επίπεδα ευαισθησίας και ειδικότητας. Συνιστάται η ποσοτικοποίηση της ανεπάρκειας τουλάχιστον δύο GPI ανεπαρκών πρωτεϊνών και σε διαφορετική κυτταρική σειρά (συνηθέστερα σε ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα), προκειμένου να οριστικοποιηθεί η διάγνωση της PNH και να αποκλεισθεί η πιθανότητα, οι κλινικές εκδηλώσεις να είναι συνέπεια μιας κληρονομικής μεμονωμένης ανεπάρκειας GPI-AP (Parker et al. 2005, Borowitz et al. 2010; Brando et al. 2019).

Η κυτταρομετρία ροής διαφοροποιείται στην PNH έναντι των λοιπών εφαρμογών, στο ότι η διάγνωση εξαρτάται από την ανάδειξη της απουσίας ή μειωμένης έκφρασης των σχετικών αντιγόνων έναντι των φυσιολογικών κυττάρων. Πραγματοποιείται σε περιφερικό αίμα (σπανιότερα στο μυελό των οστών) και δύναται να ανιχνεύσει ακόμα και πολύ μικρούς πληθυσμούς κυττάρων με ολική ή μερική έλλειψη του CD55 και (κυρίως) του CD59. Το έλλειμμα θεωρείται σημαντικό όταν τα κύτταρα με έλλειψη GPI (PNH κλώνοι) αποτελούν ποσοστό μεγαλύτερο του 5%.

Η κυτταρομετρία ροής παρέχει πληροφορίες και για το μέγεθος των κλώνων. Το πραγματικό μέγεθος του κλώνου αντανακλάται περισσότερο αξιόπιστα από το ποσοστό των GPI(-) πολυμορφοπύρηνων στο περιφερικό αίμα και ως εκ τούτου ο έλεγχος των πολυμορφοπύρηνων με ανεπάρκεια GPI-APs, θεωρείται ιδιαίτερα χρήσιμος για το *follow-up* των ασθενών με PNH (*Parker et al. 2005*). Η ερμηνεία των εξαχθέντων αποτελεσμάτων βασίζεται στη λεπτομερή γνώση της κανονικής κατανομής των GPI-προσδεσμένων αντιγόνων, σε συνδυασμό με την έκφρασή τους στα διαφορετικά στάδια της αιμοποιητικής κυτταρικής διαφοροποίησης (*Hernandez-Campo et al. 2006 & 2007*). Ως επί το πλείστον, η ανεπάρκεια GPI στα λευκά αιμοσφαίρια μελετάται στα πολυμορφοπύρηννα και τα μονοκύτταρα, ενώ στα ερυθροκύτταρα τελευταία μελετάται κυρίως η ανεπάρκεια του CD59. Η μελέτη της ανεπάρκειας του CD55 τείνει να καταργηθεί ή χρησιμοποιείται σαν συμπληρωματικός επιβεβαιωτικός δείκτης (*Tembhare et al. 2010; Borowitz et al. 2010; Manivannan et al. 2017; Devos et al. 2018*).

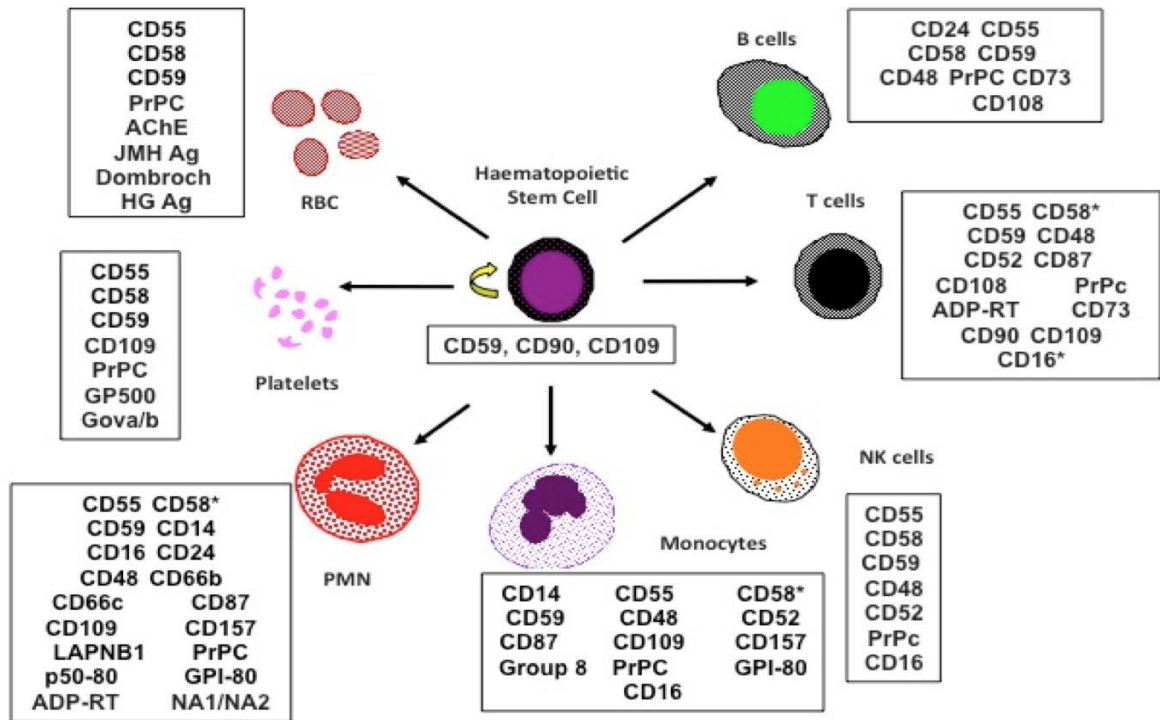
Οι *Hernandez-Campo et al. (2006)* ανέλυσαν τα επίπεδα έκφρασης διαφορετικών GPI-APs σε υποκατηγορίες αιμοποιητικών κυττάρων, τα οποία ευρίσκονται παρόντα στο περιφερικό αίμα. Σκοπός της εργασίας ήταν η δημιουργία ενός πλαισίου αναφοράς αναφορικά με τον βέλτιστο συνδυασμό των GPI-APs και των κυτταρικών πληθυσμών στο περιφερικό αίμα που και χρήζουν εφαρμογής σε επίπεδο διάγνωσης και καταγραφής της PNH. Τα ευρήματα της μελέτης ανέδειξαν πολλαπλά επίπεδα έκφρασης διαφορετικών GPI-APs σε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες. Ο βέλτιστος συνδυασμός που προκρίθηκε αρχικά ήταν των CD55 και CD59, ωστόσο η χρησιμότητά του παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα για τις υποκατηγορίες των λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων (Εικόνα 41).



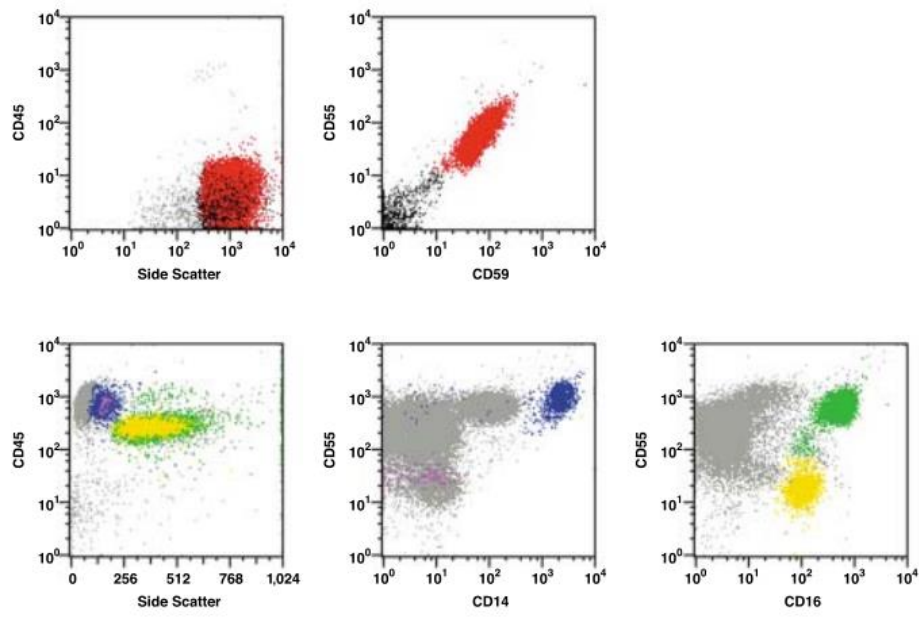
**Εικόνα 41.** Επίπεδα έκφρασης των CD55 και CD59 σε διαφορετικές κυτταρικές ομάδες στο περιφερικό αίμα (Hernandez-Campo 2006).

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι πως για ορισμένα κύτταρα, όπως για παράδειγμα τα ουδετερόφιλα, είναι δυνατή η επιλογή δεικτών από ένα ευρύ φάσμα επιλογών (συμπεριλαμβανομένων των CD16, CD24, CD55, CD59, CD66b και CD157) (Εικόνα 42).

Υπήρχαν περιπτώσεις κυτταρικών σειρών, στις οποίες καταγράφηκε περιορισμός στα υπάρχοντα αντιγόνα, καθώς επίσης και περιορισμός σε ένα μεμονωμένο δείκτη. Παραδείγματα του πρώτου σεναρίου καταγράφηκαν στα μονοκύτταρα (CD14, CD55, CD157), στα Β-κύτταρα (CD24, CD48, CD52, CD55), στα CD4<sup>+</sup> T-κύτταρα (CD48, CD52, CD55), στα ηωσινόφιλα (CD55, CD59), καθώς επίσης και στα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα (CD48, CD55), αντίστοιχα. Παραδείγματα του δεύτερου σεναρίου καταγράφηκαν στα NK κύτταρα με μειωμένα επίπεδα CD56 (περιορισμός του CD48), στα BDCA<sub>3</sub>-δενδριτικά και NK κύτταρα με αυξημένα επίπεδα CD56 (περιορισμός του CD55), καθώς επίσης και στα ερυθροκύτταρα (περιορισμός του CD59), αντίστοιχα (Brando et al. 2018).



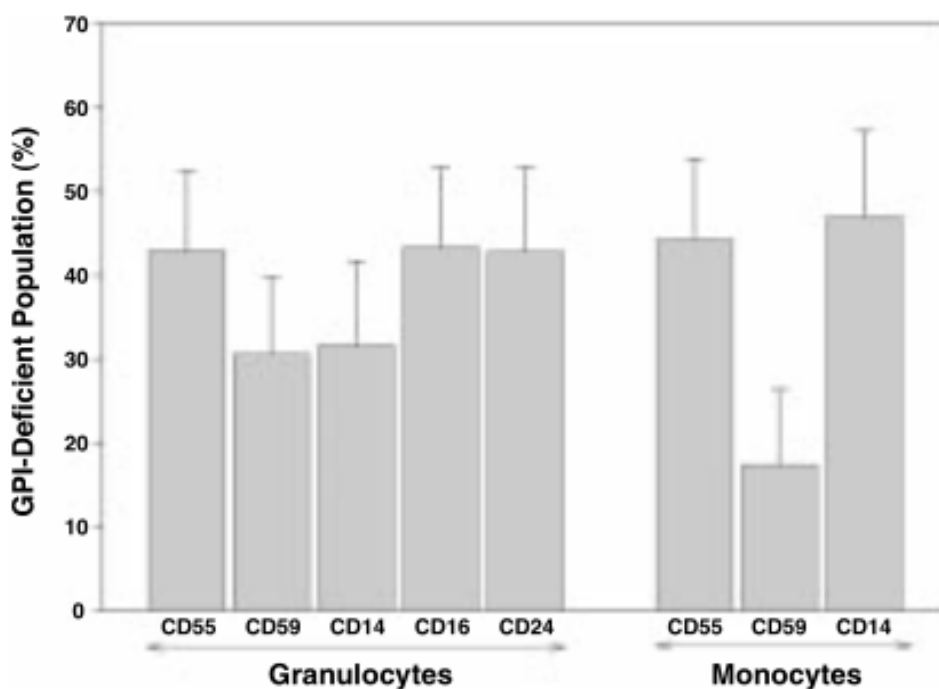
**Εικόνα 42.** Τα βασικά GPI-εξαρτώμενα μόρια που μπορούν να μελετηθούν με την κυτταρομετρία ροής για τη διάγνωση της PNH (Brando 2018).



**Εικόνα 43.** Εντοπισμός PNH λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής (φυσιολογικά ερυθροκύτταρα/κόκκινο χρώμα, μονοκύτταρα/μπλε χρώμα, κοκκιοκύτταρα/πράσινο χρώμα). Διακρίνονται υποπληθυσμοί CD55(-) και CD59(-) (μαύρο χρώμα), CD14(-)/CD55 (dim) μονοκύτταρα (μωβ χρώμα), CD16 (dim)/CD55 (dim) κοκκιοκύτταρα (κίτρινο χρώμα), που εντοπίζονται σε δείγμα αίματος ασθενούς που έχει διαγνωσθεί με PNH (Olteanu 2006).

Οι *Olteanu et al.* (2006) εξέτασαν το βαθμό αξιοπιστίας διαφορετικών δεικτών σε κυτταρικούς πληθυσμούς του αίματος ασθενών με PNH, ενώ εξετάστηκαν επίσης και δείγματα μυελού των οστών προκειμένου να αντληθούν πληροφορίες αναφορικά με τα επίπεδα της GPI. Το σύνολο των 15 ασθενών της μελέτης καταγράφηκε ως έχοντες υποπληθυσμούς κοκκιοκυττάρων με έλλειψη σε CD16 και CD55 και υποπληθυσμούς μονοκυττάρων με έλλειψη σε CD14 και CD55 (Εικόνα 43).

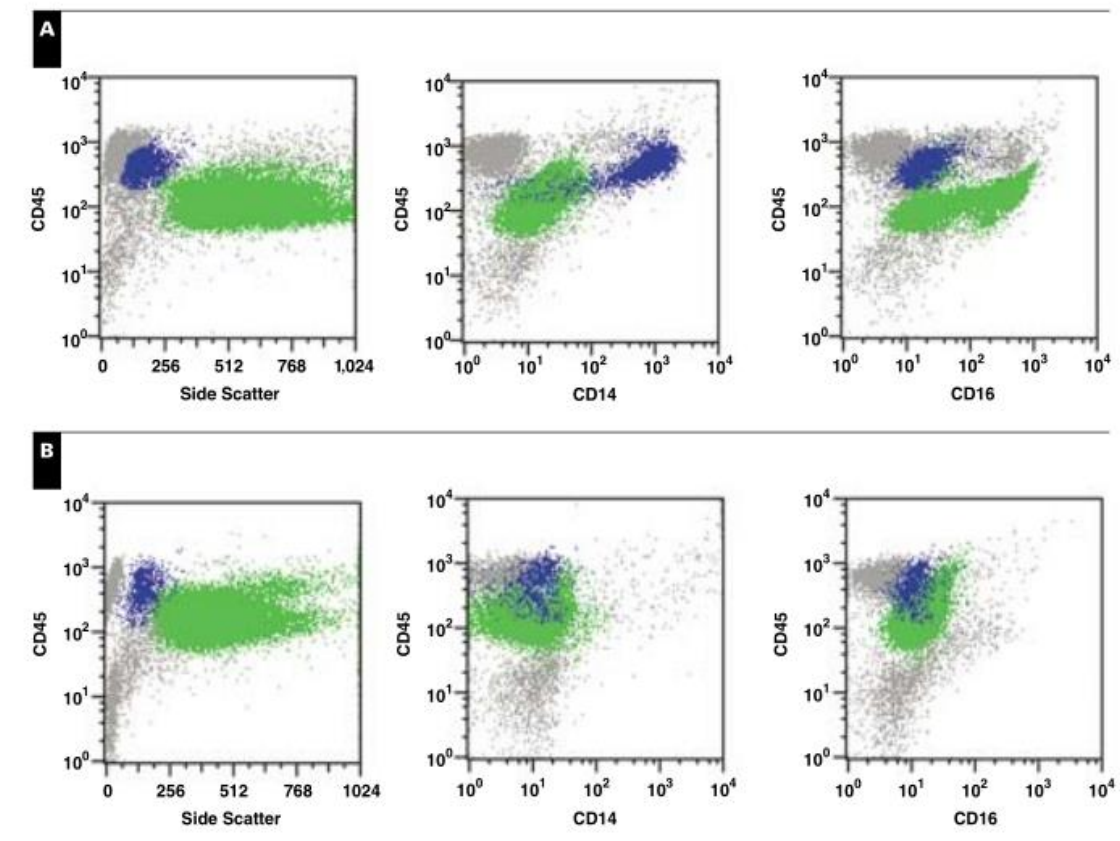
Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, το μέγεθος του PNH κλώνου ήταν μεγαλύτερο στα κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα έναντι των ερυθροκυττάρων ή λεμφοκυττάρων. Το CD59 φάνηκε να έχει περιορισμένη χρησιμότητα εντοπισμού κλώνων PNH στα μονοκύτταρα. Τα PNH μονοκύτταρα εξέφρασαν οριακά επίπεδα CD59, καθιστώντας το συγκεκριμένο δείκτη ως λιγότερο αξιόπιστο στην ανάδειξη PNH μονοκυττάρων, έναντι των CD14 ή CD55 (Εικόνα 44).



**Εικόνα 44.** Κατανομή μεγέθους κλώνου με έλλειψη σε GPI, σε έλεγχο μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων με χρήση διαφορετικών δεικτών (*Olteanu 2006*).

Η συγκεκριμένη μελέτη ανέδειξε την αδιαμφισβήτητη χρησιμότητα ενός συνδυασμού δεικτών (CD16, CD55, CD45, CD14) στον εντοπισμό μονοκυττάρων και κοκκιοκυττάρων με έλλειψη σε GPI, σε δείγμα μυελού των οστών, στον οποίο έγινε

έλεγχος με κυτταρομετρία ροής για την αξιολόγηση του βαθμού κυτταροπενίας (Εικόνα 45).

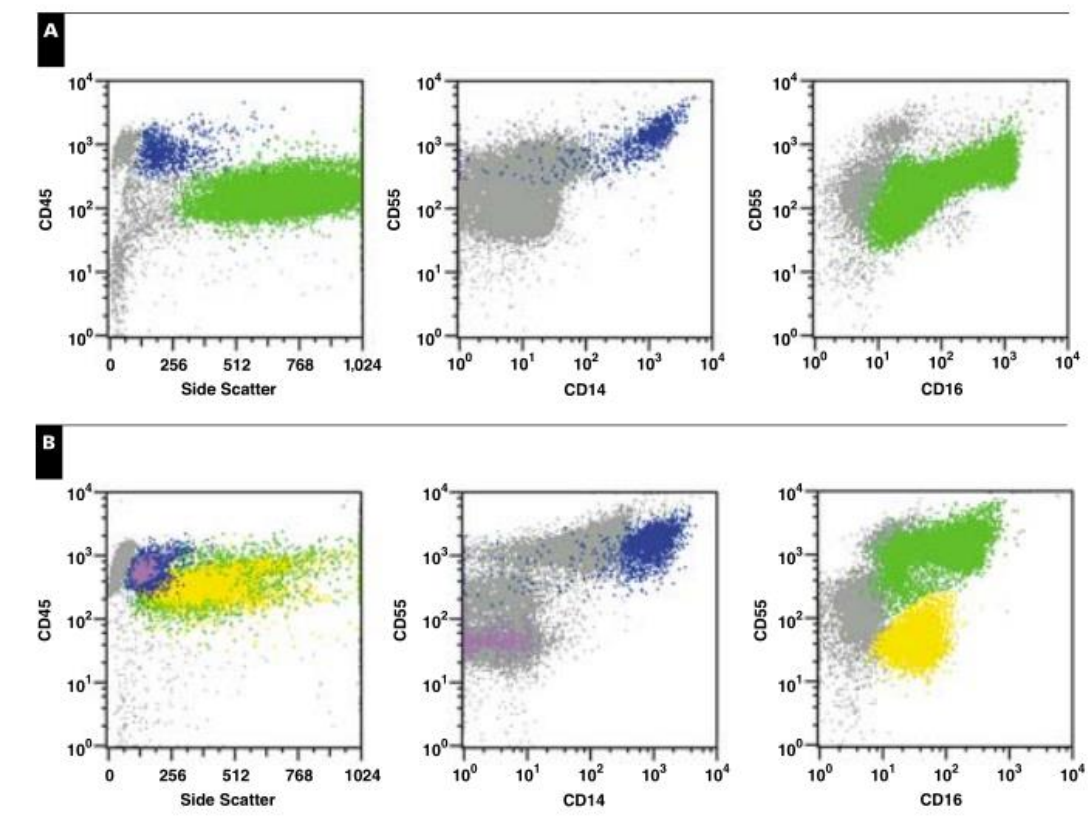


**Εικόνα 45.** Μη φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης των *CD14* και *CD16* σε *PNH* μονοκύτταρα και κοκκιοκύτταρα. (Α) Επίπεδα έκφρασης των *CD14*, *CD16* και *CD55* σε φυσιολογικά μονοκύτταρα (μπλε χρώμα) και κοκκιοκύτταρα (πράσινο χρώμα). (Β) Έλλειψη *CD14* των μονοκυττάρων και *CD16* των κοκκιοκυττάρων δείγματος ασθενούς με *PNH* (Olieanu 2006).

Οι *Maciejewski et al.* (2001) διερεύνησαν την παρουσία GPI-Aps σε κοκκιοκύτταρα ασθενών με απλαστική αναιμία (AA), μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS) και αιμολυτική *PNH*. Τα ευρήματα της μελέτης εντόπισαν την παρουσία κλώνου στο 32% των περιπτώσεων AA και αντίστοιχα στο 18% των ασθενών με MDS (Εικόνα 46).

Το γεγονός, ότι οι συγκεκριμένες αναλογίες δεν εμφάνισαν μεταβολή έπειτα από 15 χρόνια από την αρχική διάγνωση, καταδεικνύει πως η επέκταση των κυτταρικών εκτροπών αποτελεί ένα πρώιμο κυτταρικό γεγονός, το οποίο επισυμβαίνει πριν την

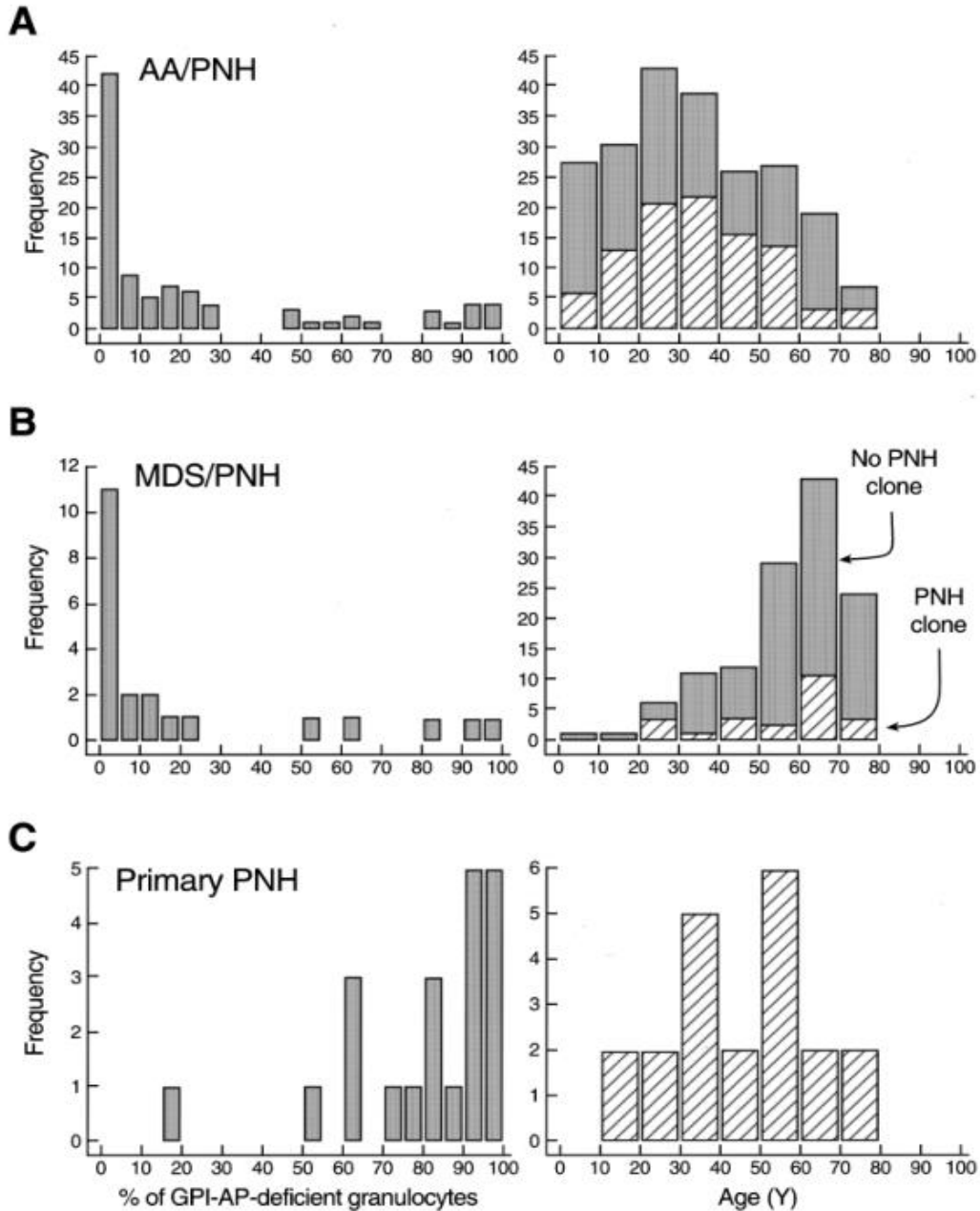
αρχική παρουσία των εμπλεκόμενων PNH κλώνων στις προαναφερθείσες κλινικές οντότητες.



**Εικόνα 46.** Εντοπισμός PNH μονοκυττάρων-κοκκιοκυττάρων του μυελού των οστών με χρήση του συνδυασμού CD16/CD55/CD45/CD14. (A) Συνέκφραση των CD14 και CD55 στα μονοκύτταρα (μπλε χρώμα) και των CD16 και CD55 στα κοκκιοκύτταρα (πράσινο χρώμα) κατά την διάρκεια της αιμοποιητικής κυτταρικής διαφοροποίησης. (B) Εντοπισμός υποπληθυσμών PNH, μονοκυττάρων (μωβ χρώμα) και κοκκιοκυττάρων (κίτρινο χρώμα) σε δείγμα μυελού των οστών ασθενούς με PNH (Olteanu 2006).

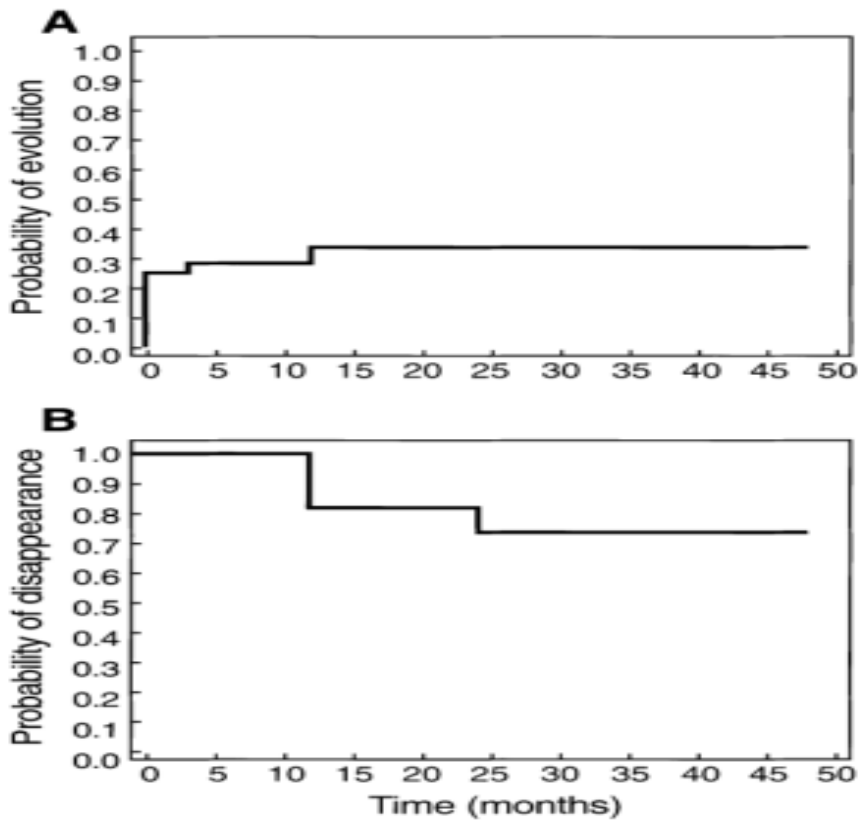
Περίπου το 14% των ασθενών με PNH κοκκιοκύτταρα εντοπίστηκε κατά την διάρκεια της αρχικής εμφάνισης της νόσου, ενώ ένα άλλο 37% σε ορίζοντα δεκαετίας. Σε ασθενείς με PNH αλλά χωρίς κυτταροπενία καταγράφηκαν περισσότερο αυξημένα ποσοστά κυττάρων με έλλειψη GPI-APs, σε σχέση με τους ασθενείς με σύνδρομο AA και PNH (Εικόνα 47).





**Εικόνα 47.** Χαρακτηριστικά ασθενών με εντοπισμό διευρυμένου PNH κλώνου. (A) AA/PNH. (B) MDS/PNH. (C) PNH. Τα διαγράμματα στην αριστερή πλευρά της φωτογραφίας αντιστοιχούν σε ασθενείς με AA/PNH έναντι του μεγέθους του PNH κλώνου. Τα διαγράμματα στη δεξιά πλευρά της φωτογραφίας αντιστοιχούν σε ασθενείς με AA/PNH έναντι της ηλικίας. (Συντομογραφίες: AA: aplastic anemia, MDS: myelodysplastic syndrome) (Maciejewski 2001).

Τα ευρήματα της συγκεκριμένης εργασίας έδειξαν ότι υφίστανται ποσοτικές διαφορές μεταξύ της κλασικής αιμολυτικής PNH και της PNH της συνδυαζόμενης με ανεπάρκεια του μυελού των οστών, με την τελευταία να εμφανίζεται με μειωμένο ρυθμό εξέλιξης (Εικόνα 48).



**Εικόνα 48.** Πιθανότητα εξέλιξης και εξάλειψης κλώνων με έλλειψη σε GPI-AP ασθενών με AA. (A) Πιθανότητα για εξέλιξη και (B) πιθανότητα για εξάλειψη. Το σύνολο των ασθενών παρακολούθηθηκε από τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης (Maciejewski 2001).

Τα ερυθροκύτταρα, πολυμορφοπύρρηνα και μονοκύτταρα θεωρούνται οι καταλληλότερες κυτταρικές σειρές σε διαγνωστικό επίπεδο. Εξαιτίας της μεγάλης διάρκειας ζωής των λεμφοκυττάρων, προτείνεται τα συγκεκριμένα κύτταρα να μην μελετώνται για διαγνωστικούς σκοπούς. Είναι χαρακτηριστικό πως σε ασθενείς που έχουν εκδηλώσει αιφνίδια υποτροπή της PNH, ανευρίσκονται λεμφοκύτταρα με έλλειψη σε GPI για πολλά χρόνια (Richards *et al.* 2000; Nakakuma *et al.* 1994; Manivannan *et al.* 2017). Προκειμένου να αποφευχθεί η εξαγωγή ψευδών ευρημάτων για τη διάγνωση των ασθενών με PNH, συστήνεται η χρήση τουλάχιστον δύο διαφορετικών μονοκλωνικών αντισωμάτων, που στρέφονται εναντίον δύο διαφορετικών GPI αγκυρωμένων πρωτεϊνών και έλεγχος σε τουλάχιστον δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Borovitz *et al.* 2010; Radichi *et al.* 2010; Illigworth *et al.* 2018). Το ποσοστό των κυττάρων που ανευρίσκεται με ανεπάρκεια GPI-APs αποτελεί άμεσο δείκτη του μεγέθους του PNH κλώνου και θεωρείται υψηλής κλινικής και προγνωστικής αξίας (Hall *et al.* 2003; Nishimura *et al.* 2004)

### 3.3 Οδηγίες για ορθή ανάλυση με κυτταρομετρία ροής

Στον πίνακα 9 αναφέρονται οι γενικές (προαναλυτικές) οδηγίες για τον χειρισμό των δειγμάτων και την ορθή ανάλυση με κυτταρομετρία ροής.

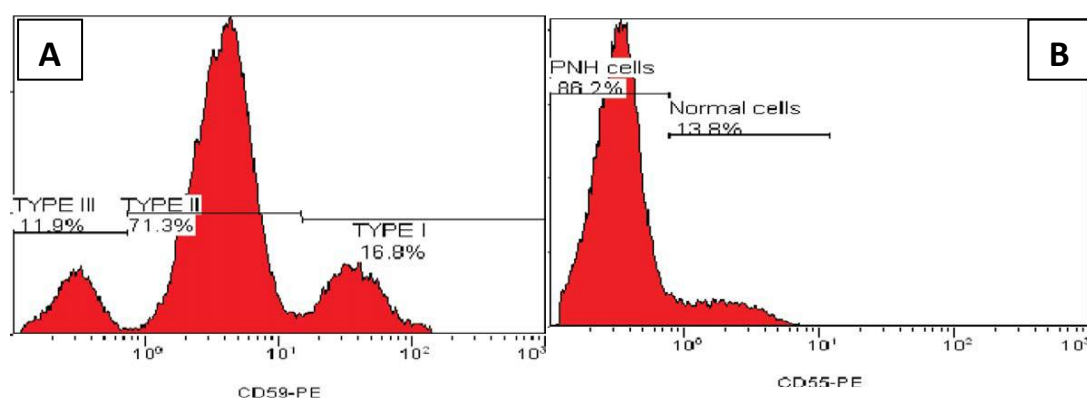
<b>ΠΡΟΑΝΑ- ΛΥΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ</b>	<i>Είδος δείγματος</i>	Περιφερικό αίμα (δείγμα μυελού των οστών δεν ενδείκνυται)
	<i>Αντιπηκτικό</i>	EDTA, Heparin, ACD
	<i>Όγκος δείγματος</i>	Ελάχιστος 1ml, συνήθως τα 3ml θεωρούνται επαρκή (μεγαλύτερος όγκος χρειάζεται εάν ο αριθμός των WBCs είναι χαμηλός)
	<i>Χρονικό διάστημα φύλαξης δείγματος μέχρι την ανάλυση</i>	Έως 7 ημέρες για τον έλεγχο RBCs; <48h για τον έλεγχο WBCs
	<i>Θερμοκρασία φύλαξης δείγματος</i>	4°C μετά το πρώτο 24ωρο
<b>ΑΝΑΛΥΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ</b>	<i>Αντιδραστήριο λύσης κυττάρων</i>	Χρειάζεται για τον έλεγχο των WBCs· δεν έχει βρεθεί κάποιο αντιδραστήριο του εμπορίου ως μη κατάλληλο, αν και δεν έχει γίνει εκτενής σχετική μελέτη, το χλωριούχο αμμώνιο θεωρείται ικανοποιητική εναλλακτική. Δεν απαιτείται για τον έλεγχο των ερυθροκυττάρων
	<i>Ανάλυση ρουτίνας: ευαισθησία/αριθμός events</i>	1% / ανάλυση τουλάχιστον 5000 events
	<i>Υψηλής ευαισθησίας ανάλυση: αριθμός events</i>	0,01% / ανάλυση τουλάχιστον 250000 events
	<i>Ενδεδειγμένοι κυτταρικοί πληθυσμοί σε ανάλυση ρουτίνας</i>	Οποσδήποτε έλεγχος στα κοκκιοκύτταρα. Επιπλέον έλεγχος μονοκυττάρων για επιβεβαιωτικούς λόγους. Έλεγχος ερυθροκυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις, ιδιαίτερα εάν έχει ανιχνευθεί PNH κλώνος στην ανάλυση των WBCs (εκτός από τον έλεγχο ρουτίνας που δεν θεωρείται απαραίτητος). Η ανάλυση των λεμφοκυττάρων δεν έχει διαγνωστική αξία

**Πίνακας 9.** Γενικές οδηγίες χειρισμού και ανάλυσης δειγμάτων στην κυτταρομετρία ροής (Borowitz 2010, τροποποιημένο).

### 3.4 Έλεγχος στα ερυθροκύτταρα

Τα GPI-προσδεσμένα αντιγόνα που έχουν μελετηθεί περισσότερο σε επίπεδο ερυθροκυτταρικής ανάλυσης είναι τα CD55 και CD59. Ο έλεγχος των ερυθροκυττάρων πρέπει να γίνεται τουλάχιστον ένα μήνα μακριά από μετάγγιση, ώστε να παρέχονται σαφείς πληροφορίες για το ποσοστό των PNH ερυθρών (τύπου II και III). Η εκτίμηση του μεγέθους του κλώνου επηρεάζεται τόσο από την έξαρση της αιμόλυσης όσο και από τις μεταγγίσεις (*Alfinito et al. 1996; Brodsky 2000; Borowitz et al. 2010*). Όπως σημειώθηκε παραπάνω, ο έλεγχος που αρχικά διενεργήθηκε, για την ανίχνευση PNH κλώνων με κυτταρομετρία ροής, ήταν στα ερυθροκύτταρα, δεδομένου ότι τα CD55 (DAF) και CD59 (MIRL) αναγνωρίστηκαν από νωρίς ως οι πρωτεΐνες των οποίων η ανεπάρκεια ήταν βασική στην παθοφυσιολογία της PNH. Ένα επίσης GPI αγκυρωμένο ερυθροκυτταρικό αντιγόνο είναι το CD58, ωστόσο επειδή εμφανίζεται τόσο σε διαμεμβρανική όσο και σε GPI-αγκυρωμένη μορφή, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων καθίσταται δύσκολη, ενώ δεν υπάρχουν και δεδομένα που να υποδεικνύουν ότι παρέχει κάποιο πλεονέκτημα έναντι των CD59/CD55.

Ο στόχος της ανάλυσης των ερυθροκυττάρων είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός των κυττάρων που στερούνται έκφρασης GPI-APs (PNH κλώνοι τύπου-III) και η διάκρισή τους από τα φυσιολογικά RBCs (τύπος-I). Ένας επιπλέον στόχος της ανάλυσης είναι η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μερικώς ανεπαρκών κυττάρων (PNH κλώνοι τύπου-II), εφόσον αυτά υπάρχουν. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICCS ο διαχωρισμός των τύπων των PNH κλώνων είναι σαφέστερος με έλεγχο με CD59 παρά με CD55 (Εικόνα 49) (*Borowitz et al. 2010*).



**Εικόνα 49. Α)** Σαφής διαχωρισμός τύπων κλώνων PNH με CD59 στα ερυθροκύτταρα. **Β)** διαχωρισμός τύπων κλώνων PNH με CD55 στα ερυθροκύτταρα. Αν και το συνολικό ποσοστό των PNH κλώνων που ανιχνεύτηκε φαίνεται περίπου το ίδιο, ωστόσο ο διαχωρισμός των κυττάρων ανά τύπο (II-III) δεν είναι ξεκάθαρος (*Borowitz 2010*).

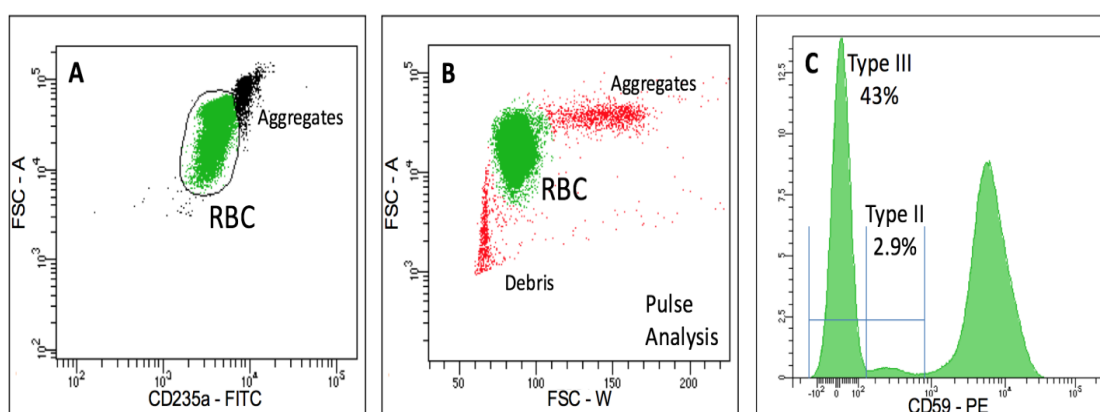
Ο έλεγχος μόνο των ερυθρών αιμοσφαιρίων δεν είναι επαρκής για την αξιολόγηση των ασθενών με PNH, επειδή λόγω της αιμόλυσης ή/και των μεταγγίσεων ενδέχεται το μέγεθος του κλώνου να υποεκτιμηθεί (τα μεταγγιζόμενα ερυθρά έχουν φυσιολογική έκφραση CD55 και CD59). Ως εκ τούτου, είναι αναγκαίος ο έλεγχος και στα λευκά αιμοσφαίρια προκειμένου να διασαφηνιστεί η ύπαρξη ή μη PNH κλώνου. Ο έλεγχος στα ερυθροκύτταρα εξακολουθεί να είναι σημαντικός, τόσο για την ανίχνευση των κυττάρων τύπου-II (είναι σαφέστερος ο διαχωρισμός με το CD59), όσο και επειδή η σύγκριση των σχετικών μεγεθών των κλώνων RBCs και WBCs μπορεί να παρέχει χρήσιμες κλινικές πληροφορίες (*Borowitz et al. 2010; Manivannan et al. 2017*).

Η διαδικασία ανάλυσης των ερυθροκυττάρων στον έλεγχο της PNH διαφέρει από αυτήν των λευκοκυττάρων, ως προς τα στάδια της λύσης των ερυθρών και την πρόληψη σχηματισμού συσσωματωμάτων. Πρόκειται για διαδικασία στην οποία η χρώση με τα αντισώματα ακολουθείται από το στάδιο του πλυσίματος (συνιστάται πλύσιμο τουλάχιστον δύο φορές) προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η μη ειδική δέσμευση των κυττάρων με το αντίσωμα ή την περίσσεια φθοριοχρώματος, που δυσκολεύουν την διάκριση των κλώνων τύπου III και II.

Όσον αφορά στην επιλογή των αντισωμάτων, στις περισσότερες των περιπτώσεων ύπαρξης σαφούς PNH κλώνου, αυτός μπορεί εύκολα να ανιχνευθεί με τη χρήση ενός μόνο δείκτη. Ο δείκτης επιλογής είναι το CD59, καθόσον εκφράζεται περισσότερο και μπορεί να συζευχθεί με ποικιλία φθοριοχρωμάτων. Θεωρείται δε ιδιαίτερα κατάλληλος για τον διαχωρισμό των τύπων των PNH κλώνων (ιδιαίτερα για την οριοθέτηση των κυττάρων τύπου-II). Το CD55 εκφράζεται λιγότερο στα ερυθροκύτταρα και δεν συνιστάται ως το μοναδικό αντιδραστήριο ελέγχου, δεδομένου ότι δεν διαχωρίζει επαρκώς τα κύτταρα τύπου-II (Εικόνα 49). Η χρήση του στην ανάλυση ρουτίνας είναι υπό συζήτηση, ωστόσο συνιστάται να χρησιμοποιείται σαν επιβεβαιωτικό αντιδραστήριο (πάντα σε συνδυασμό με το CD59) και συζευγμένο με φυκοερυθρίνη (PE). Η ταυτοποίηση των PNH κλώνων τύπου-II δεν έχει τυποποιηθεί. Η αναμενόμενη θέση των κυττάρων τύπου-II μπορεί να αναγνωριστεί ως η περιοχή μεταξύ του πληθυσμού τύπου-III και τύπου-I (φυσιολογικά κύτταρα). Ιδιαίτερα χρήσιμος είναι ο συνδυασμός των CD55 και CD59 με την γλυκοφορίνη-A (CD235a), η οποία είναι μια διαμεμβρανική, μη GPI-εξαρτώμενη πρωτεΐνη, που χρησιμοποιείται ειδικά για τα ώριμα ερυθροκύτταρα. Στον έλεγχο ανίχνευσης κλώνων PNH, η προσθήκη anti-CD235a επιτρέπει τη διάκριση

των ερυθροκυττάρων από κύτταρα άλλων κυτταρικών σειρών και διάφορα θραύσματα (debris), τα οποία μπορεί να παρερμηνευθούν ως κλώνοι PNH. Η επιφανειακή πυκνότητα της γλυκοφορίνης A στα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι τόσο υψηλή που η χρήση της anti-CD235a σε συγκεντρώσεις κορεσμού μπορεί να προκαλέσει σημαντική συσσώρευση (aggregation) των ερυθρών αιμοσφαιρίων (Εικόνα 50). Επομένως, συνιστάται τιτλοδότηση του αντιδραστηρίου προκειμένου το φαινόμενο αυτό να ελαχιστοποιηθεί.

Για τον έλεγχο των ερυθροκυτταρικών PNH κλώνων συστήνεται ο συνδυασμός anti-CD235a-FITC με CD59-PE (και/ή CD55-PE) (Sutherland et al. 2007; Borowitz et al. 2010; Agarwal et al. 2015; Illingworth et al. 2018; Brando et al. 2018).



**Εικόνα 50.** Παράδειγμα ανάλυσης ερυθροκυττάρων στην PNH με χρήση anti-CD235a και CD59-PE. Στα **A)** και **B)** η οριοθέτηση (gating) των ερυθροκυττάρων και η διάκρισή τους από τα debris και τα aggregates. Στο **C)** φαίνεται ο επαρκής διαχωρισμός των κυττάρων τύπου III-II-I (Brando 2018).

### 3.5 Έλεγχος στα λευκά αιμοσφαίρια (Ουδετερόφιλα<sup>4</sup>/Μονοκύτταρα)

Υπάρχουν αρκετοί κίνδυνοι αναφορικά με την χρήση της κυτταρομετρίας ροής στην προσπάθεια εντοπισμού των PNH κλώνων στα λευκοκύτταρα. Η παρουσία υποκοκκιωδών ουδετερόφιλων στο περιφερικό αίμα μπορεί να προκαλέσει δυσκολίες και ως εκ τούτου παραμένει διαρκής η ανάγκη εξέτασης της μορφολογίας του περιφερικού αίματος. Τα προαναφερθέντα κύτταρα απαντώνται σε ασθενείς με *de novo* MDS, ωστόσο δύνανται να εντοπισθούν και σε ασθενείς με PNH που αναπτύσσουν MDS. Τα αλλοιωμένα SSC χαρακτηριστικά των υποκοκκιωδών ουδετεροφίλων υπονοούν πως τα εν λόγω κύτταρα εναλλάσσονται με τα μονοκύτταρα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας του ελέγχου με κυτταρομετρία ροής. Υπό αυτή την έννοια απαιτούνται πλέον συνδυαστικές προσεγγίσεις σύμφωνα με τις οποίες απαιτείται η ταυτόχρονη χρήση εξειδικευμένων δεικτών και SSC προσεγγίσεων (π.χ. CD33/SSC και CD15/SSC) για κάθε τύπο, προκειμένου να επέλθει ο διαχωρισμός μεταξύ ουδετεροφίλων και μονοκυττάρων. Ένα άλλο πρόβλημα σχετίζεται με τον έλεγχο ουδετεροφίλων σε παλαιά δείγματα, οπότε και τα εκάστοτε FSC/SSC χαρακτηριστικά καταγράφονται αλλοιωμένα, αποτέλεσμα της μειωμένης κυτταρικής βιωσιμότητας. Σε αυτές τις περιπτώσεις το τελικό αποτέλεσμα μπορεί να περιλαμβάνει μη ειδική αυξημένη πρόσληψη αντισωμάτων. Πρέπει επίσης να αναφερθεί και το πρόβλημα της παρουσίας των μη ώριμων κυτταρικών μορφών στην περίπτωση ανάλυσης των ουδετεροφίλων που εκφράζουν ασθενώς το CD16.

Η μελέτη των πληθυσμών των κλώνων PNH στα λευκοκύτταρα με κυτταρομετρία ροής, θεωρείται η καλύτερη μέθοδος για την αξιολόγηση του πραγματικού μεγέθους ενός κλώνου. Τα λεμφοκύτταρα δεν είναι κατάλληλος στόχος, λόγω της μεγάλης διάρκειας ζωής τους και της έκφρασης πολλών GPI-αγκυρωμένων πρωτεϊνών. Καταλληλότεροι στόχοι θεωρούνται τόσο τα μονοκύτταρα όσο και τα ουδετερόφιλα. Σε γενικές γραμμές το μέγεθος των κλώνων και στους δύο πληθυσμούς είναι παρόμοιο, ο έλεγχος στα περισσότερα panels, που πλέον χρησιμοποιούνται, είναι σχετικά απλός και παρόλο που η ανεξάρτητη αξιολόγηση και των δύο τύπων κυττάρων δεν είναι απολύτως απαραίτητη, ενισχύει την αξιοπιστία της διάγνωσης. Από πρακτικής άποψης, το πρωτόκολλο του ελέγχου στα

---

<sup>4</sup>Σύμφωνα με τις οδηγίες της ICCS (Borowitz 2010; Illingworth 2018), θεωρείται πιο δόκιμος ο όρος 'ουδετερόφιλα' αντί για τον παλαιότερα χρησιμοποιούμενο 'κοκκιοκύτταρα'. Πολλοί από τους ερευνητές ωστόσο χρησιμοποιούν τον παλαιότερο όρο.

λευκοκύτταρα περιλαμβάνει πρώτα το στάδιο της χρώσης των κυττάρων και ακολουθείται από το στάδιο της λύσης, επειδή τα χαρακτηριστικά σκέδασης για την οριοθέτηση (gating) είναι καλύτερα από αυτά του πρωτοκόλλου στο οποίο προηγείται η λύση των κυττάρων (*Borowitz et al. 2010*).

Όσον αφορά την επιλογή των δεικτών και των αντισωμάτων, τα CD55 και CD59 ήταν οι πρώτοι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση κλώνων PNH σε ουδετερόφιλα. Ωστόσο, οι δείκτες αυτοί δεν δίνουν σαφή διαχωρισμό μεταξύ θετικών και αρνητικών πληθυσμών σε σχέση με άλλα αντιγόνα συνδεδεμένα με GPI. Σε μελέτες EQA (*external quality assessment*), τα CD55 και CD59 είχαν σημαντικά υψηλότερους συντελεστές διακύμανσης και ανίχνευσαν χαμηλότερα μεγέθη κλώνων, από ότι άλλοι δείκτες όπως οι CD16 και CD66b. Μια μεγάλη ποικιλία αντιγόνων που συνδέονται με GPI έχουν περιγραφεί στα ουδετερόφιλα. Η μεγαλύτερη εμπειρία υπάρχει με την χρήση των CD16, CD24 και CD66b. Ωστόσο, το CD16 απουσιάζει από τα ηωσινόφιλα και μπορεί να χαθεί από τα ουδετερόφιλα σε περιπτώσεις μυελοδυσπλασίας, ενώ έχουν περιγραφεί και πολυμορφικές παραλλαγές του, που δεν αναγνωρίζονται από ορισμένα anti-CD16 αντισώματα· ως εκ τούτου το CD16 προτιμάται να συνδυάζεται και με κάποιον άλλο δείκτη.

Σχετικά με τον έλεγχο των μονοκυττάρων, ο δείκτης που κατ' εξοχήν χρησιμοποιείται είναι το CD14, αν και απουσιάζει από τα ανώριμα μονοκύτταρα και τα δενδριτικά κύτταρα και η χρησιμότητά του στην ανίχνευση μικρών κλώνων στα μονοκύτταρα θεωρείται περιορισμένη. Το CD55 (αλλά όχι τόσο το CD59) εκφράζεται αρκετά στα μονοκύτταρα και έχει αποδειχθεί χρήσιμο για την αναγνώριση των PNH μονοκυττάρων, για το λόγο αυτό από κάποιους ερευνητές συστήνεται να ελέγχεται η έκφρασή του, ως συμπληρωματική όμως δοκιμασία (*Borowitz et al. 2010*).

Ιδιαίτερα χρήσιμο αντιδραστήριο έχει αποδειχτεί το αντιδραστήριο FLAER (*Fluorescent Labeled Inactive toxin Aerolysin*). Πρόκειται για βακτηριακή τοξίνη, παράγοντα της λοιμογόνου δράσης του βακτηρίου *Aeromonas hydrophila*, που παράγεται ως ανενεργής προ-αερολυσίνη και μετατρέπεται σε ενεργή μορφή από την δράση των πρωτεασών στην επιφάνεια των κυττάρων. Έχει την ικανότητα να συνδέεται με την GPI άγκυρα στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων. Τα κύτταρα που επηρεάζονται από την PNH στερούνται πρωτεϊνών αγκύρωσης GPI και επομένως δεν δεσμεύονται από την προ-αερολυσίνη. Για την ανίχνευση των κλώνων PNH χρησιμοποιείται μία μεταλλαγμένη μη λυτική μορφή της (σημασμένη με FITC), που



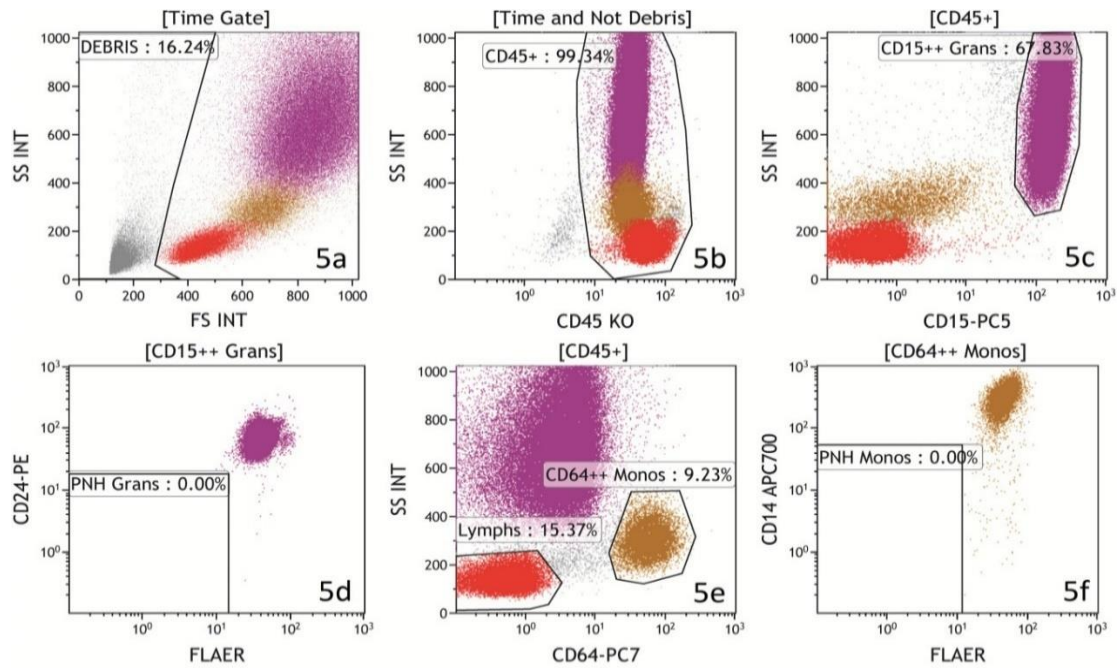
συνδέεται με το φθοριόχρωμα *Alexa 488*, έτσι ώστε να διατηρείται η ειδικότητα σύνδεσης με την GPI-άγκυρα. Η χρήση του FLAER επιτρέπει την ανίχνευση ακόμη και μικρών PNH κλώνων με μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία. Το αντιδραστήριο FLAER δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της παρουσίας PNH κλώνων στην ερυθροκυτταρική σειρά, καθότι τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν τα προσδεδεμένα στην κυτταρική επιφάνεια πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη δράση της προ-αερολυσίνης και επιπλέον εκφράζουν και υψηλά ποσοστά γλυκοφορίνης, η οποία συνδέεται ασθενώς με την αερολυσίνη (*Parker et al. 2005; Sutherland et al. 2007; Brodsky 2008A; Radichi et al. 2010; Manivannan et al. 2017*).

Προκειμένου να βελτιωθεί η ανίχνευση της PNH στα WBC, οι οδηγίες της ICCS συνέστησαν τη χρήση τουλάχιστον ενός αντισώματος μαζί με δύο GPI εξαρτώμενους δείκτες, ένας εκ των οποίων θα πρέπει κατά προτίμηση να είναι το FLAER. Για τον έλεγχο των λευκοκυττάρων συστήνεται η χρήση του CD45 (πανλευκοκυττατικός δείκτης) προκειμένου να γίνει σωστή οριοθέτηση των λευκών αιμοσφαιρίων, ενώ εκτός από το FLAER, ως δείκτες συστήνονται οι:

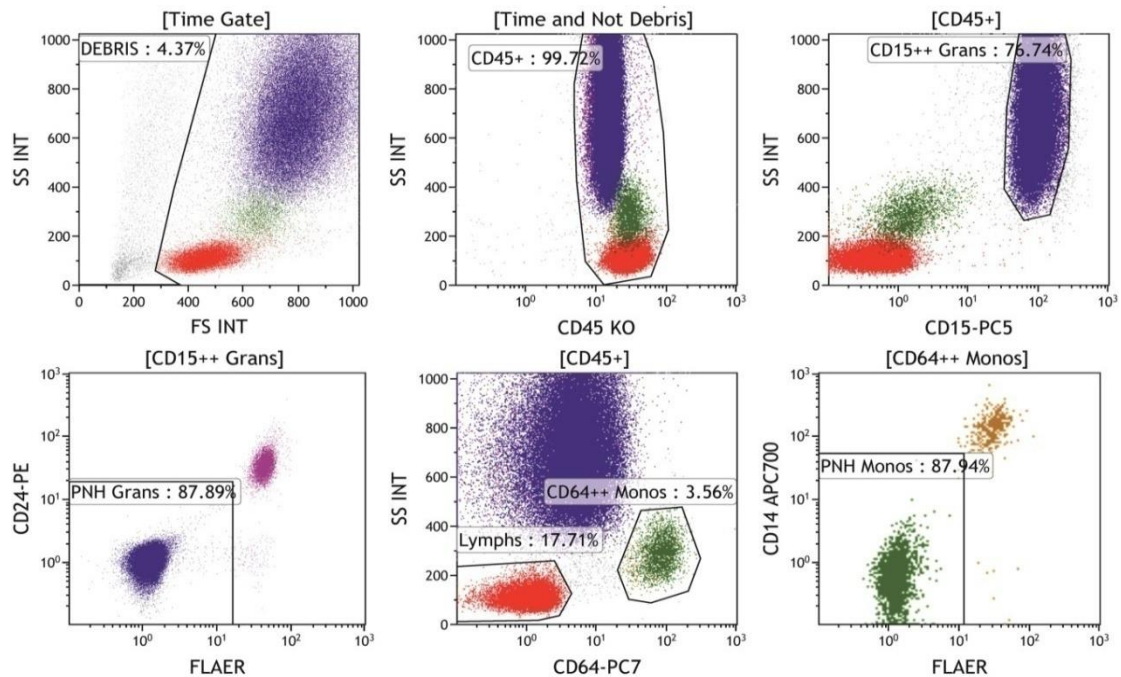
για τα ουδετερόφιλα: το CD15 για την οριοθέτηση του συγκεκριμένου πληθυσμού και το CD24 για την ανίχνευση των PNH κλώνων [CD24(-) κύτταρα θεωρούνται ως PNH κλώνοι] και

για τα μονοκύτταρα: το CD64 (ή το CD33) για την οριοθέτηση του πληθυσμού, σε συνδυασμό με τη μη έκφραση του CD14 [CD14(-)] για την ανίχνευση των παθολογικών κλώνων (*Borowitz et al. 2010; Illingworth et al. 2018*).

Για εργαστήρια εξοπλισμένα με σύγχρονα κυτταρόμετρα (*Canto, Canto II* και *Navios*), είναι δυνατή η διαμόρφωση κοκτέιλ έξι χρωμάτων με βάση τα FLAER, CD24 και CD14. Η ανάλυση ξεκινά βάσει της οριοθέτησης με CD45 ή του *side scatter* προκειμένου να αποκλεισθούν μη συνδεδεμένα συμβάντα (*ungated events*) και ακολουθεί η οριοθέτηση των επιμέρους κυτταρικών πληθυσμών και η ανίχνευση ή μη των κλώνων PNH (Εικόνες 51 και 52) (*Illingworth et al. 2018; Brando et al. 2018*).



**Εικόνα 51.** Παράδειγμα ελέγχου ασθενούς χωρίς κλώνους PNH στα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Φαίνεται η στρατηγική οριοθέτησης (gating). **5a/5b** οριοθέτηση (CD45) των λευκοκυττάρων και αποκλεισμός των debris, **5c/5d** οριοθέτηση των κοκκιοκυττάρων (ουδετεροφίλων) βάσει των CD45/CD24, **5e/5f** οριοθέτηση των μονοκυττάρων βάσει των CD64/CD14 (Illingworth 2018, τροποποιημένο).



**Εικόνα 52.** Παράδειγμα ελέγχου ασθενούς με μεγάλους PNH κλώνους στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα. Φαίνεται η στρατηγική οριοθέτησης (gating) κατ' αναλογία με την Εικόνα 45 (Illingworth 2018, τροποποιημένο).

### 3.5.1 CD157

Η περιορισμένη διαθεσιμότητα και το υψηλό κόστος του FLAER και των δεικτών που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των PNH κλώνων, οδήγησαν στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούν το CD157, ως αντικαταστάτη των CD24 και CD14 για τον προσδιορισμό των κλώνων σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα, αντίστοιχα. Πρόκειται για πρωτεΐνη που συνδέεται μέσω της GPI-άγκυρας με την μεμβράνη των κυττάρων και αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή για την προσκόλληση και τη μετανάστευση των ουδετεροφίλων. Το CD157 (*ADP-ribosylcyclase-2*), ως ένζυμο επιφανείας των λευκοκυττάρων προσδεμένο στην GPI-άγκυρα, εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο στα ώριμα ουδετερόφιλα όσο και στα μονοκύτταρα. Τα ανωτέρω οδήγησαν στη σκέψη ότι το CD157 θα μπορούσε να αντικαταστήσει τα CD24 και CD14, επιτρέποντας την υψηλής ευαισθησίας ανάλυση (σε ένα μόνο σωληνάριο), την ταυτόχρονη αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των PNH ουδετεροφίλων και PNH μονοκυττάρων, σε κυτταρόμετρα με πέντε ή περισσότερους PMT. Η δυνατότητα ταυτόχρονης αξιολόγησης τόσο των PNH ουδετεροφίλων όσο και των PNH μονοκυττάρων είναι ιδιαίτερα ελκυστική για τα εργαστήρια, λόγω του σημαντικά μειωμένου κόστους και του χρόνου που συνεπάγεται η εκτέλεση των δύο ξεχωριστών αναλύσεων (*Illigworth et al. 2018; Manivannan et al. 2017; Brando et al. 2018*).

Οι *Rahman et al.* το 2018 αναφέρουν ότι το CD157 βρέθηκε να έχει πολύ καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ των φυσιολογικών κυττάρων και των κλώνων PNH σε σύγκριση με τον διαχωρισμό βάσει των CD24/CD14. Κλώνοι τύπου-II σημειώθηκαν σε δύο από τις τριάντα περιπτώσεις που μελετήθηκαν με τη χρήση του CD157. Στην μία από αυτές τις περιπτώσεις, οι τύπου-II κλώνοι αναγνωρίστηκαν και από το συνδυασμό που χρησιμοποιούσε τα CD24/CD14, ωστόσο η τελευταία διάκριση δεν ήταν ιδιαίτερα σαφής. Αν και δεν αναφέρουν μείωση στον χρόνο ελέγχου, αναφέρουν μείωση στο κόστος των αντισωμάτων κατά 10-15%.

Οι *Brando et al.* το 2018 επισύρουν την προσοχή στο σημείο της μειωμένης έκφρασης του CD157 στα ηωσινόφιλα, η οποία ενδέχεται να προκαλέσει *artifacts* στην περίπτωση που η οριοθέτηση των CD15(+) ουδετεροφίλων δεν έχει γίνει με ακρίβεια. Επιπρόσθετα, αναφέρουν ότι έχουν περιγραφεί και κάποιες γενετικές ή εθνοτικές παραλλαγές του CD157, οι οποίες σε ορισμένα άτομα μπορεί να ευθύνονται για την ανίχνευση ψευδών PNH κλώνων.

### 3.6 Ελάχιστονες PNH κλώνοι (Minor PNH clones)

Ανεξάρτητα από την κυτταρική σειρά που ελέγχεται, όταν ένα ποσοστό <1% του πληθυσμού-στόχου βρίσκεται με έλλειψη GPI, οι κλώνοι χαρακτηρίζονται ως ελάχιστονες (minors). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τέτοιοι μικροί PNH κλώνοι μπορούν να ανιχνευθούν σε πολλούς ασθενείς με απλαστική αναιμία και MDS, αν και η προγνωστική αξία της εύρεσης των μικρού μεγέθους PNH κλώνων σε αυτές τις διαταραχές παραμένει αμφιλεγόμενη.

Κλινικά, οι ασθενείς αυτοί δεν εμφανίζουν συμπτώματα αιμόλυσης, ωστόσο, ορισμένες αλλά όχι όλες οι μελέτες έχουν δείξει ότι σε αυτές τις περιπτώσεις η παρουσία PNH κλώνων συσχετίζεται με ευνοϊκή απόκριση στην ανοσοκατασταλτική αγωγή. Αν και οι ασθενείς με αυτούς τους μικρούς υποκλινικούς κλώνους θα πρέπει να παρακολουθούνται λόγω του κινδύνου ανάπτυξης αιμολυτικής PNH, είναι σαφές ότι δεν είναι υποψήφιοι για θεραπεία με αναστολείς του συμπληρώματος, επειδή η εμφάνιση αιμόλυσης παρουσία ελάχιστων κλώνων είναι ιδιαίτερα σπάνια. Σε ασθενείς με αιμολυτική αναιμία, η ανίχνευση ενός μικρού κλώνου στα ουδετερόφιλα δεν θα πρέπει να θεωρείται διαγνωστική της κλασικής αιμολυτικής PNH, αλλά θα πρέπει να κατευθύνει σε άλλες αιτίες αιμόλυσης.

Από τεχνικής άποψης, τα ίδια (προαναφερόμενα) panels αντιδραστηρίων RBCs και WBCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των δειγμάτων των ασθενών. Ωστόσο, στις περιπτώσεις με μικρό αριθμό PNH φαινοτύπων, ο αριθμός των συμβάντων (*events*) προς μελέτη, χρειάζεται να αυξηθεί ανάλογα με την ευαισθησία της ανάλυσης (*Borowitz et al. 2010; Illingworth et al. 2018*).

### 3.7 Αναφορά αποτελεσμάτων

Σύμφωνα με τις οδηγίες της *ICCS (Illingworth et al. 2018)*, η αναφορά των αποτελεσμάτων θα πρέπει να γίνεται με συγκεκριμένο τρόπο, προκειμένου να αποφεύγονται οι παρανοήσεις. Για παράδειγμα, μια αναφορά που δηλώνει ότι ο έλεγχος με CD59 είναι αρνητικός, είναι δυσνόητη, δεδομένου ότι για κάποιους μπορεί να ερμηνευθεί ότι ο πληθυσμός-στόχος είναι αρνητικός για τον συγκεκριμένο δείκτη (δηλ. παρουσία PNH κλώνου) και για κάποιους άλλους ότι δεν εμφανίζεται απουσία CD59 (δηλ. απουσία κλώνου).

Για τα ερυθροκύτταρα συνιστάται να αναφέρεται το συνολικό μέγεθος του κλώνου, όπως επίσης και τα ποσοστά των πληθυσμών τύπου-II και τύπου-III, λόγω της κλινικής σημασίας αυτών των τύπων. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια τύπου-I είναι τα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα με διάρκεια ζωής ~120 ημέρες. Τα ερυθροκύτταρα τύπου-III είναι αυτά με την πλήρη ανεπάρκεια σε CD59 και, λόγω της προκαλούμενης από το συμπλήρωμα λύσης, έχουν βραχεία διάρκεια ζωής (~10-15 ημέρες). Η έκφραση του τύπου-II (μερική ανεπάρκεια) ποικίλει σημαντικά από ασθενή σε ασθενή, με μια διάρκεια ζωής μεταξύ αυτής των φυσιολογικών και των τελείως ανεπαρκών κυττάρων. Για τα ουδετερόφιλα/μονοκύτταρα, η σύσταση είναι να γίνεται αναφορά μόνο του συνολικού μεγέθους του κλώνου (*Borowitz et al. 2010*).

Σχετικά με τον έλεγχο στα λευκά αιμοσφαίρια (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα), είναι γνωστό ότι ο PNH κλώνος στα μονοκύτταρα συχνά είναι μεγαλύτερος από τον κλώνο των ουδετεροφίλων, ως εκ τούτου η αναφορά μόνο του PNH κλώνου των ουδετεροφίλων μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση του μεγέθους του PNH κλώνου στα λευκοκύτταρα.

Γενικότερα συνιστάται η εξής ορολογία για την αναφορά των αποτελεσμάτων:

- α) πληθυσμός PNH >1%: 'κλώνος PNH'.
- β) πληθυσμός PNH 0,1%-1%: 'μικρός πληθυσμός PNH κυττάρων' ή 'ελάσσων PNH κλώνος'.
- γ) πληθυσμός PNH <0,1%: 'σπάνια εμφάνιση κυττάρων με έλλειψη GPI' ή 'σπάνια εμφάνιση κυττάρων με φαινότυπο PNH' (*Illingworth et al. 2018*).



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





## Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή - Γενικές πληροφορίες

Η θρομβοεμβολική νόσος αποτελεί σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας, με ετήσια συχνότητα 1:1000 άτομα. Πρόκειται για πολυπαραγοντικό νόσημα, στη παθογένεια του οποίου, εμπλέκονται και περιστασιακοί και γενετικοί μηχανισμοί. Μέχρι σήμερα, έχει αναγνωριστεί ένας μεγάλος αριθμός παραγόντων (κληρονομικών ή/και επίκτητων), αναστρέψιμων ή μη, που τεκμηριωμένα αυξάνουν τον κίνδυνο εκδήλωσης φλεβικής θρομβοεμβολικής νόσου. Τα τελευταία 30 έτη, η μοριακή βάση των μηχανισμών της πήξης του αίματος και των αντιπηκτικών μηχανισμών έχει διευκρινιστεί και αρκετοί γενετικοί παράγοντες κινδύνου έχουν εντοπισθεί. Αυτοί οι γενετικοί παράγοντες κινδύνου επηρεάζουν τους φυσικούς αντιπηκτικούς μηχανισμούς και καταλήγουν σε μια κατάσταση υπερπηκτικότητας, οφειλόμενη στην ανισορροπία μεταξύ των προπηκτικών και αντιπηκτικών μηχανισμών. Ο αυξημένος κίνδυνος για εμφάνιση θρόμβωσης υπάρχει δια βίου, ενώ θρομβωτικά επεισόδια ενδέχεται να εμφανιστούν και εξαιτίας της παρουσίας ενός ή και περισσότερων μη γενετικών παραγόντων κινδύνου. Θρομβοφιλία εντοπίζεται περίπου στο μισό των ασθενών που εμφανίζουν φλεβική θρόμβωση, έτσι δίδεται η δυνατότητα εξήγησης για τη παρουσία μιας προδιάθεσης που παλαιότερα ήταν δύσκολο να εξηγηθεί (*Dahlbäck 2008*). Στο υπόλοιπο 50% των ασθενών η συγγενής θρομβοφιλία είναι απύσα. Επίκτητη θρομβοφιλία εντοπίζεται σε διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο/APS, καρκίνος, χημειοθεραπεία, μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα, δρεπανοκυτταρική αναιμία, μείζων ή ενδιάμεση θαλασσαιμία, λήψη αντισυλληπτικών, οιστρογόνων, παρουσία PNH. Υπάρχει ανάγκη για την διερεύνηση και άλλων υποθετικών παραγόντων που πιθανά ενέχονται για την εμφάνιση θρομβωτικών καταστάσεων, δεδομένου ότι η επίκτητη θρομβοφιλία συνδέεται συχνά με υποτροπιάζοντα θρομβοεμβολικά επεισόδια και ως εκ τούτου η μελέτη των παραγόντων κινδύνου είναι σημαίνουσα για την πρωτογενή και δευτερογενή πρόληψη της θρόμβωσης (*Heit 2007; Qari et al. 2003; Shatzei et al. 2019*).

Η παρουσία των PNH κλώνων υποδηλώνει έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση. Είναι γνωστό ότι η PNH αποτελεί επίκτητη κλωνική διαταραχή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, βασικά χαρακτηριστικά της οποίας είναι η ‘ήμι-τελής’ αιμοποίηση, η ενδαγγειακή αιμόλυση (συχνά συσχετιζόμενη με πανκυτταροπενία), η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων (σε ασυνήθεις κυρίως θέσεις),

επεισόδια λοιμώξεων κ.ά. Οι κλώνοι PNH χαρακτηρίζονται από πλήρη απουσία ή μερική ανεπάρκεια βασικών πρωτεϊνών για την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, οι οποίες είναι επιφανειακές πρωτεΐνες αγκυρωμένες με την GPI. Η διαταραχή αυτή που οφείλεται, όπως είναι ήδη γνωστό, σε παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A επηρεάζει όλες τις κυτταρικές σειρές, περιλαμβανομένης και αυτής των μεγακαρυοκυττάρων-αιμοπεταλίων. Το γονίδιο PIG-A κωδικοποιεί μία απαραίτητη - για τη βιοσύνθεση της άγκυρας GPI - πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα στις περιπτώσεις διαταραχής (παρουσία μεταλλάξεων) την απουσία (ή την ελάττωση) των πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω της GPI. Ως αποτέλεσμα της μετάλλαξης εμφανίζονται PNH κλώνοι με διαταραχή στην πρόσδεση των πρωτεϊνών αυτών στην κυτταρική μεμβράνη. Οι μεταλλάξεις, των οποίων η πραγματική αιτιολογία παραμένει άγνωστη, πιθανά είναι περισσότερες από μία, ως εκ τούτου ενδέχεται να συνυπάρχει εμφάνιση διαφορετικών PNH κλώνων στο ίδιο άτομο (*Takeda et al. 1993; Bessler et al. 1994; Nishimura et al. 1999; Meletis et al. 2001; Rachidi et al. 2010; Peacock-Young et al. 2018*).

Δύο κλινικά σημαντικές πρωτεΐνες που απουσιάζουν από τα κύτταρα PNH είναι οι επιφανειακές πρωτεΐνες (ρυθμιστές του συμπληρώματος): CD55 (*DAF/Decay Accelerating Factor*) και CD59 (*MIRL /Membrane Inhibitor of Reactive Lysis*). Εφόσον οι ρυθμιστές του συμπληρώματος CD55 και CD59 συνδέονται με GPI πρωτεΐνες, τα ερυθροκύτταρα που φέρουν τον κλώνο PNH είναι εξαιρετικά ευαίσθητα στο συμπλήρωμα και θα αιμολυθούν όταν το συμπλήρωμα είναι ενεργοποιημένο. Πράγματι, στις περισσότερες περιπτώσεις η ενδαγγειακή αιμόλυση, η αιμοσφαιρινουρία και η αναιμία (λόγω έλλειψης σιδήρου) είναι κυρίαρχα παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά στην PNH. Το συμπλήρωμα ως γνωστόν, αποτελείται από περισσότερες από 20 διαφορετικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν σε πολύ καθορισμένες ενζυματικές αντιδράσεις, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα τη σύνδεση πολλών ανοσορρυθμιστικών πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη (*Sugarman et al. 1986; Shichishima et al. 1991; Parker et al. 2005; Brodsky 2008A; Luzzatto 2016; Hill et al. 2017; Bektas et al. 2020*).

Στους ασθενείς με PNH (περίπου στο 40% των περιπτώσεων) η φλεβική θρόμβωση (ιδιαίτερα στις κοιλιακές και ενδοκρανιακές φλέβες), αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές επιπλοκές της νόσου, προκαλώντας συχνά το θάνατο των ασθενών. Περισσότερο από το 20% των περιπτώσεων εμφανίζουν υποτροπή ή έχουν βρεθεί ότι εκδηλώνουν θρόμβωση πολλαπλών εντοπίσεων. Οι θρομβοεμβολικές επιπλοκές στην

PNH συσχετίζονται με κακή πρόγνωση (σχετικός κίνδυνος σε περίοδο 8 ετών: 10,2). Ο σχετικός κίνδυνος θανάτου αυξάνεται (5 έως 15,4 φορές) σε ασθενείς με θρόμβωση στην αρχική φάση της νόσου, στις περιπτώσεις αυτές το ποσοστό επιβίωσης φτάνει το ~40%, σε μια περίοδο 4 ετών (Hill et al. 2013). Πάνω από το 1/5 των περιπτώσεων PNH εμφανίζονται με θρόμβωση σε περισσότερες από μία θέσεις. Το σύνδρομο Budd-Chiari θεωρείται η πιο συχνή θρομβωτική επιπλοκή σε ασθενείς με PNH και μπορεί να οδηγήσει σε ηπατική ανεπάρκεια με υψηλό κίνδυνο θνησιμότητας, ενώ θρομβώσεις της πυλαίας φλέβας, της εγκεφαλικής φλέβας και των κόλπων του εγκεφάλου φαίνεται να είναι αρκετά συχνές σε αυτούς τους ασθενείς (αποτελούν περίπου το 1/3 των θρομβωτικών επεισοδίων, με τη θρόμβωση της εγκεφαλικής φλέβας να είναι η πιο καταστροφική). Παρόλο που τα αρτηριακά θρομβωτικά συμβάντα εμφανίζονται στη μειοψηφία των ασθενών με PNH, δεν ενέχουν μικρότερο κίνδυνο θνησιμότητας (Socie et al. 1996; Hall et al. 2003; Ziakas et al. 2007 & 2008; Hill et al. 2013; Peacock-Young et al. 2018; Bektas et al. 2020).

Η PNH, που οφείλεται όπως προαναφέρθηκε σε παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A, επηρεάζει όλες τις κυτταρικές σειρές, συμπεριλαμβανομένης και αυτής των μεγακαρυοκυττάρων-αιμοπεταλίων. Η διαταραχή της αιμοπεταλιακής λειτουργίας που οδηγεί στην θρόμβωση είναι καλά μελετημένη στην PNH, ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ξεκαθαρίσει πλήρως ακόμη, αν και το θέμα βιβλιογραφικά έχει μελετηθεί εκτενώς. Φαίνεται να συσχετίζεται με την επαγόμενη από το συμπλήρωμα επίθεση κατά των αιμοπεταλίων με συνέπεια την δημιουργία ενός περιβάλλοντος πλούσιου σε φωσφολιπίδια, το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί το προθρομβινικό σύμπλεγμα. Η προθρομβωτική κατάσταση στην PNH είναι εξαιρετικά περίπλοκη, με πολλούς διαφορετικούς παράγοντες να εμπλέκονται (ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, ενδαγγειακή αιμόλυση, κ.ά.). Περαιτέρω ταυτοποίηση των GPI-APs που εμπλέκονται στη δομή του θρόμβου και την ανεπαρκή ινωδόλυση είναι απαραίτητη για την κατανόηση του πολύπλοκου μηχανισμού της θρόμβωσης σε PNH ασθενείς. *In vivo* μελέτες δείχνουν ότι σε ασθενείς με PNH, η ενεργοποίηση του συμπληρώματος και η επαναλαμβανόμενη αιμόλυση προκαλούν ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, ενώ παράλληλα η αύξηση των επιπέδων του ιστικού παράγοντα (TF) στο πλάσμα, η υπερβολική κατανάλωση νιτρικού οξέος (NO) και η τοξικότητα της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης λόγω εκτεταμένης αιμόλυσης αποτελούν βασικές αιτίες θρόμβωσης. Η μειωμένη ινωδόλυση θα μπορούσε να είναι μια επιπλέον αιτία του αυξημένου αριθμού θρομβοεμβολικών επεισοδίων σε περιπτώσεις PNH, λόγω της

έλλειψης του ενεργοποιητή του u-PA, που είναι GPI εξαρτώμενη πρωτεΐνη (*Hall et al. 2002; Nishimura et al. 2004, Hillmen et al. 2007; Van Bijnen et al. 2012; Hill et al. 2013; Manivannan et al. 2017; Peacock-Young et al. 2018; Huang et al. 2019*). Έχει επίσης υποστηριχθεί ότι οι αλλαγές στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων λόγω της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, οδηγούν σε σχηματισμό μικροσωματιδίων και συνεπώς σε θρομβογένεση. Ωστόσο, δεν έχει αποδειχθεί σαφής συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των μικροσωματιδίων και του μεγέθους του κλώνου (*Meletis & Terpos 2003; Hugel et al. 1999*).

Ο εντοπισμός των παραγόντων που συμβάλλουν στο σχηματισμό θρόμβων στην PNH θα επέτρεπε την εφαρμογή περισσότερο στοχευμένων θεραπειών, ελαχιστοποιώντας τη βαρύτητα της νόσου και βελτιώνοντας την κλινική εικόνα των ασθενών. Τα τελευταία χρόνια έχει επέλθει σημαντική αλλαγή σε αυτόν τον τομέα, με τη χρήση του *eculizumab* (ECU). Από μελέτες έχει αποδειχθεί ότι οι ασθενείς υπό ECU παρουσιάζουν βελτιωμένες εργαστηριακές παραμέτρους όσον αφορά την αιμόσταση και εμφανίζουν μείωση των θρομβωτικών επεισοδίων, γεγονός μεγάλης κλινικής σημασίας. Φαίνεται ότι το μπλοκάρισμα της ενεργοποίησης του συμπληρώματος προστατεύει από τη θρόμβωση, αν και όχι πλήρως, δεδομένου ότι έχουν παρατηρηθεί επεισόδια θρόμβωσης και σε ασθενείς υπό ECU (*Hillmen et al. 2007; De Latour et al. 2008; Helley et al. 2010; Kelly et al. 2011; Hill et al. 2013*).

Παρόλο που η παρουσία PNH ευθύνεται μόνο για το 1-2% των ανεξήγητων επεισοδίων θρόμβωσης, πολλοί ερευνητές προτείνουν ότι οι ασθενείς με ανεξήγητα θρομβωτικά συμβάντα ή θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις, με ευρήματα ενδεικτικά ενδαγγειακής αιμόλυσης και/ή κυτταροπενίας ή εκείνοι που εμφανίζουν θρομβωτικό επεισόδιο υπό αντιπηκτική αγωγή θα πρέπει να υποβάλλονται σε έλεγχο για παρουσία κλώνων PNH (*Parker et al. 2005; Ziakas et al. 2007; Keage 2011; Hill et al. 2013; Lee et al. 2013; Schrezenmeier et al. 2014; Shatzei et al. 2019*). Αν και το μέγεθος του κλώνου συσχετίζεται με τον κίνδυνο θρόμβωσης (παρουσία μεγάλων κλώνων φαίνεται να αυξάνει τον θρομβωτικό κίνδυνο) δεν έχει ακόμη αποδειχθεί ότι το μέγεθος του κλώνου είναι ο μόνος καθοριστικός παράγοντας για την εμφάνιση θρόμβωσης ή/και την υποτροπή της. Μελέτες έχουν δείξει ότι, η πιθανότητα εμφάνισης θρομβοεμβολικού επεισοδίου σε ασθενείς με νόσο PNH συσχετίζεται ευθέως με το μέγεθος του PNH κλώνου (*Hall et al. 2003; Nishimura et al. 2004; Rachidi et al. 2010; Van Bijnen et al. 2012; Malato et al. 2012; Schrezenmeier et al. 2014; Huang et al. 2019*). Οι *Moyo et al. (2004)*, υποστήριξαν ότι μία αύξηση 10%

στους PNH κλώνους αντιστοιχεί σε 1,64 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικού επεισοδίου. Ωστόσο, θρόμβωση παρουσίασαν και κάποιοι ασθενείς με μικρό μέγεθος κλώνων, κάτι που υποδεικνύει ότι το μέγεθος του κλώνου δεν αποτελεί τον μοναδικό παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση, ωστόσο πιθανά ενέχεται για την πρώτη εμφάνιση επεισοδίου.

Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει την παρουσία μικρών πληθυσμών GPI(-) κυττάρων και σε δείγματα υγιών ατόμων· τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η παρουσία της μεταλλάξης PIG-A από μόνη της δεν είναι επαρκής για να επιτρέψει στον PNH κλώνο να κυριαρχήσει (*Araten et al. 1999; Asimakopoulos et al. 2014; Hill et al. 2017*). Η διαδικασία της κλωνικής επέκτασης των μεταλλαγμένων PIG-A στελεχών στους PNH ασθενείς ακόμη δεν είναι πλήρως κατανοητή. Δύο είναι οι υποθέσεις που προσπαθούν να εξηγήσουν την κλωνική επέκταση των PNH κυττάρων, η μία θεωρείται ανοσολογικής αιτιολογίας, η οποία μάλλον προσφέρει πολλαπλασιαστικό πλεονέκτημα στους PNH κλώνους έναντι των φυσιολογικών κυττάρων· στη δεύτερη υποτίθεται ότι ο κυρίαρχος PNH κλώνος αποκτά κατά κάποιο τρόπο πλεονέκτημα ανάπτυξης, λόγω προϋπάρχουσας συνθήκης που πιθανά αναστέλλει την φυσιολογική αιμοποίηση αλλά επηρεάζει σε μικρό βαθμό (ή καθόλου) τους PNH κλώνους (*Bessler et al. 1994; Nakakuma et al. 2003; Peacock-Young et al. 2018*).

Η κυτταρομετρία ροής θεωρείται το *gold standard* για τον έλεγχο της PNH, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα την έλλειψη πρωτεϊνών που συνδέονται με την άγκυρα GPI, και είναι εύκολη στην εκτέλεσή της (*Hall & Rosse 1996; Parker et al. 2005; Borowitz et al. 2010; Sutherland et al. 2012*). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η πολυπαραμετρική κυτταρομετρία ροής με την χρήση FLAER σε συνδυασμό με συγκεκριμένα φθορίζοντα μονοκλωνικά αντισώματα (για τα λευκοκύτταρα) και ο συνδυασμός της γλυκοφορίνης-A (anti-CD235a) με CD59 και/ή CD55 (για τα ερυθροκύτταρα), βελτιώνει την ακρίβεια της διάγνωσης και επιτρέπει την καλύτερη ανίχνευση PNH κλώνων (*Sutherland et al. 2007, 2009 & 2012*). Οι *Agarwal et al. (2015)* υποστήριξαν ότι η ανίχνευση κλώνων PNH στα λευκά αιμοσφαίρια (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα) με τη χρήση του FLAER είναι πιο ακριβής από τις δοκιμασίες που βασίζονται στα ερυθροκύτταρα (λόγω των επιπλοκών που προκαλούνται από τις μεταγγίσεις αίματος στα ερυθρά). Ωστόσο, οι οδηγίες της *International Clinical Cytometry Society (ICCS)* και η πλειονότητα των ερευνητών προτείνουν την ανίχνευση των PNH κλώνων, σε τουλάχιστον δύο ξεχωριστές κυτταρικές σειρές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία τους και να

ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων (*Borowitz et al. 2010; Rachidi et al. 2010; Devos et al. 2018; Illingworth et al. 2018*).

## Κεφάλαιο 2: Σκοπός της μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης συνίσταται στην αξιολόγηση της εμπλοκής των μικρού μεγέθους PNH κλώνων ως παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης θρομβοεμβολικού επεισοδίου, σε άτομα που έχουν ήδη εμφανίσει ανεξήγητης αιτιολογίας (αρνητικός έλεγχος για συγγενή ή επίκτητη θρομβοφιλία) θρομβοεμβολικό επεισόδιο, κυρίως σε ασυνήθεις θέσεις και σε νεαρή σχετικά ηλικία.

Τα ερωτήματα που ανέκυψαν ήταν τα εξής: εφόσον διαπιστωθεί η παρουσία τέτοιων κλώνων, αν μπορεί αυτή να θεωρηθεί κριτικής σημασίας για την εκδήλωση θρομβωτικού επεισοδίου, αν ναι, από ποιο μέγεθος κλώνου και πάνω θα πρέπει να αξιολογείται αυτός ως παράγοντας κινδύνου, εάν το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου συσχετίζεται με την εμφάνιση ελάσσονων PNH κλώνων και εάν η (πιθανή) παρουσία αυτών των κλώνων συσχετίζεται με την εμφάνιση υποτροπής στους ασθενείς αυτούς.

Στην παρούσα μελέτη, ελέγχθησαν 181 ασθενείς και 100 υγιείς δότες. Τα άτομα που συμμετείχαν ελέγχθηκαν για την παρουσία κλώνων PNH με υψηλής ευαισθησίας κυτταρομετρία ροής.

Ο έλεγχος διενεργήθηκε στα λευκά αιμοσφαίρια (ουδετερόφιλα/μονοκύτταρα) και στα ερυθροκύτταρα. Δεδομένου ότι η παρουσία μεγάλων PNH κλώνων ήταν μη αναμενόμενη στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, η μελέτη επικεντρώθηκε στην πιθανή παρουσία ελάσσονων κλώνων και τη συμμετοχή τους στην εμφάνιση των θρομβοεμβολικών επεισοδίων.





## Κεφάλαιο 3: Υλικά & Μέθοδοι

### 3.1 Ασθενείς – Μέθοδοι

#### 3.1.1 Ασθενείς

Συνολικά ελέγχθηκαν

**α)** 181 ασθενείς, χωρίς αποδεδειγμένη αιτία θρόμβωσης. Πρόκειται για ασθενείς αρνητικούς ως προς τον βασικό έλεγχο θρομβοφιλίας, οι οποίοι διαχωρίστηκαν στις εξής υποκατηγορίες:

- 1) ασθενείς με επεισόδιο/α πνευμονικής εμβολής (PE),
- 2) ασθενείς με επεισόδιο/α σπλαχνικής θρόμβωσης (SVT),
- 3) ασθενείς με επεισόδιο/α φλεβικής θρόμβωσης (Other VT - εκτός από τα περιστατικά με εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση κάτω άκρων, στην υποομάδα αυτή συμπεριλαμβάνεται και ένα ποσοστό ασθενών με θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις εκτός της σπλαχνικής) και
- 4) ασθενείς με επεισόδιο/α αρτηριακής θρόμβωσης (AT).

Αναλυτικότερα όσον αφορά στους ασθενείς η κατανομή ήταν ως εξής:

- Επεισόδιο/α πνευμονικής εμβολής (PE): N=65
- Επεισόδιο/α σπλαχνικής θρόμβωσης (SVT): N=31 (θρόμβωση μεσεντερίου φλέβας=8, θρόμβωση πυλαίας φλέβας=15, σ. Budd-Chiari=2, θρόμβωση σπληνικής φλέβας=6).
- Επεισόδιο/α φλεβικής θρόμβωσης (Other VT): N=49 (κάτω άκρων=30, οφθαλμικής φλέβας=4, λαγονομηριαίας φλέβας=7, κ. κοίλης φλέβας=3, σφαγίτιδας=1, υποκλείδιου φλέβας=1, άνω άκρων=3)
- Επεισόδιο/α αρτηριακής θρόμβωσης (AT): N=36 (στεφανιαία νόσος/MI=12, θρόμβωση κοιλιακής αορτής=1, αποφρακτική αρτηριοπάθεια=3, θρόμβωση νεφρικής αρτηρίας=2, σπονδυλικής αρτηρίας=2, οφθαλμικής αρτηρίας=4, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο/AEE=12),

και

**β)** 100 υγιείς δότες (healthy controls).

#### Κριτήρια ένταξης ασθενών:

- Όλοι οι ασθενείς ηλικίας 18-55 ετών που ελέγχθηκαν στο Ιατρείο Αιμόστασης του Λαϊκού Νοσοκομείου σε χρονικό διάστημα 36 μηνών (11/2016- 11/2019), οι οποίοι εμφάνισαν το πρώτο θρομβοεμβολικό επεισόδιο σε ηλικία <45 ετών και στους οποίους δεν βρέθηκε κάποιος προφανής λόγος για ανάπτυξη θρόμβωσης (π.χ. συγγενής ή επίκτητη θρομβοφιλία). Ένα μεγάλο ποσοστό από τους ασθενείς αυτούς βρίσκεται σε μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή και παρακολουθείται στο Ιατρείο Αντιπηκτικής αγωγής του τμήματος Αιμόστασης.

#### Κριτήρια αποκλεισμού ασθενών:

- Ασθενείς άνω των 55 ετών και κάτω των 18 ετών.
- Έγκυες γυναίκες.
- Γυναίκες υπό αντισύλληψη ή θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης.
- Περιπτώσεις με ήδη γνωστή συγγενή ή επίκτητη θρομβωτική προδιάθεση.

- Ασθενείς με συστηματική νόσο που είναι γνωστό ότι προδιαθέτει σε εμφάνιση θρόμβωσης, όπως κακοήθεια, αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο, μυελούπερπλαστική νόσος, νοσήματα κολλαγόνου, δρεπανοκυτταρική νόσος, θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα, μείζων ή ενδιάμεση θαλασσαιμία, HIV λοίμωξη, ηπατική νόσος, κ.ά.

- Ασθενείς που είχαν ήδη διαγνωσθεί με νόσο PNH.

Οι εναπομείναντες ασθενείς (και οι υγιείς δότες), αφού υπέγραψαν ενημερωμένη συγκατάθεση, υποβλήθηκαν σε κλινική εξέταση, λήψη ατομικού και οικογενειακού ιστορικού (και στοιχείων επικοινωνίας) και αδρό απεικονιστικό έλεγχο, ενώ η εργαστηριακή διερεύνηση περιλάμβανε αιματολογικό έλεγχο, έλεγχο ηπατικής και νεφρικής λειτουργίας, έλεγχο για τη μετάλλαξη JAK2V617F (για την πλειονότητα των περιπτώσεων με σπλαχνική θρόμβωση), αδρό (screening) έλεγχο αιμόστασης (PT, APTT, Fibrinogen), έλεγχο για θρομβοφιλία (Antithrombin III, Protein C & S, APC-R, FV Leiden και FII20210GA) και αντιφωσφολιπιδικό σύνδρομο (αντιπηκτικά του Λύκου/LA, anti-cardiolipin and anti-b2GPI IgG/IgM Abs), για τα άτομα που δεν είχαν ήδη υποβληθεί στον συγκεκριμένο έλεγχο (τα εν λόγω δεδομένα δεν παρουσιάζονται), καθώς και έλεγχο για την παρουσία κλώνων PNH με κυτταρομετρία ροής.

Όλα τα άτομα ελέγχθηκαν για την παρουσία PNH κλώνων με υψηλής ευαισθησίας κυτταρομετρία ροής. Ο έλεγχος διενεργήθηκε στα λευκά αιμοσφαίρια

(μονοκύτταρα/ουδετερόφιλα) με τη χρήση FLAER και μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των GPI συνδεδεμένων πρωτεϊνών (αναφέρονται ως MONO FLAER και NEUTRO FLAER, αντίστοιχα) και στα ερυθροκύτταρα (ανάλυση έκφρασης CD59 με τη χρήση γλυκοφορίνης-A, αναφέρεται ως RED CD59). Δεδομένου ότι δεν αναμενόταν παρουσία μεγάλου μεγέθους κλώνων, η ανάλυση επικεντρώθηκε στην αξιολόγηση της παρουσίας ελάσσονων κλώνων που πιθανά ευθύνονται για την εμφάνιση των θρομβωτικών επεισοδίων, βάσει των τιμών των *clinical cut-off*, που υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των υγιών δοτών.

Στον έλεγχο συμπεριλήφθηκαν και 4 ασθενείς που είχαν ήδη εμφανίσει νόσο PNH (PNH POS), σαν θετικά controls, προκειμένου να καταδειχθεί η αξιοπιστία των μετρήσεων ως προς την ταυτοποίηση και την οριοθέτηση των PNH θετικών κλώνων σε όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς και να επιβεβαιωθεί η οριοθέτηση για το ποσοστό των CD59-PE αρνητικών ερυθροκυττάρων (PNH type-III), των ερυθροκυττάρων ενδιάμεσης έκφρασης (dim PNH, type-II) και των φυσιολογικών (type-I). Οι μετρήσεις των εν λόγω ασθενών δεν συμπεριελήφθησαν στην στατιστική ανάλυση. Για τις αναλύσεις έκφρασης του CD59 στους 4 αυτούς ασθενείς, ως PNH κλώνος ελήφθη το σύνολο των PNH κλώνων τύπου-III και τύπου-II.

Η μελέτη εγκρίθηκε από την Επιτροπή Δεοντολογίας του Νοσοκομείου, ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί, όλα τα υπό μελέτη άτομα υπέγραψαν ενημερωμένη συγκατάθεση.

### 3.1.2 Μέθοδοι

Ο έλεγχος διεξήχθη με υψηλής ευαισθησίας αναλυτή κυτταρομετρίας ροής σε λευκοκύτταρα (μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα) και ερυθροκύτταρα, με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων έναντι των GPI συνδεδεμένων πρωτεϊνών. Αρχικά είχε διενεργηθεί και ένας αρχικός διερευνητικός έλεγχος (screening) για παρουσία PNH κλώνων στα λευκοκύτταρα (αναφέρεται ως *Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων*), ωστόσο δεν συμπεριελήφθη στην στατιστική ανάλυση, δεδομένου ότι σύμφωνα με τα νεώτερα δεδομένα δεν προσφέρει κάτι ιδιαίτερο σε διαγνωστικό επίπεδο. Ακολούθησε ο επιβεβαιωτικός έλεγχος στα λευκοκύτταρα με τη χρήση FLAER (*fluorescent-labeled inactive toxin pro-aerolysin*), προκειμένου να προσδιοριστεί η (πιθανή) αναλογία μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων με ανεπάρκεια GPI-APs. Αντίστοιχος έλεγχος με χρήση των σχετικών μονοκλωνικών αντισωμάτων και γλυκοφορίνης-A, εφαρμόστηκε για τη διερεύνηση των κλώνων PNH στα

ερυθροκύτταρα (ανάλυση έκφρασης CD59) και τον προσδιορισμό της αναλογίας των κλώνων PNH type III-II. Αρχικά συμπεριελήφθηκε στον έλεγχο και η ανάλυση έκφρασης του CD55 στα ερυθροκύτταρα, ωστόσο σύμφωνα με τα νεώτερα βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν αποτελεί επιπλέον διαγνωστικό βοήθημα και η χρήση του έχει εγκαταλειφθεί ως εκ τούτου τα δεδομένα της ανάλυσης των ερυθροκυττάρων με το CD55 δεν αναλύθηκαν στατιστικά και δεν παρουσιάζονται. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι το CD59 εκφράζεται περισσότερο από το CD55 και είναι αυτό που κατ' εξοχήν ευθύνεται για τα αιμολυτικά επεισόδια, γι' αυτό και η ανάλυση των ερυθροκυττάρων με CD59 θεωρείται περισσότερο ακριβής, ιδιαίτερα όσον αφορά στον διαχωρισμό των τύπων των PNH ερυθροκυττάρων (type III-II-I) (Fletcher et al. 1992; Parker et al. 2005; Sutherland et al. 2007; Borowitz et al. 2010; Illingworth et al. 2018).

### 3.1.3 Δείγματα –Εξοπλισμός

**Δείγματα:** Χρησιμοποιήθηκε περιφερικό ολικό αίμα, το οποίο ελήφθη σε σωληνάριο με αντιπηκτικό EDTA. Χρειάστηκε διατήρηση κάποιων δειγμάτων έως 24h στους 4°C (σε περιπτώσεις αδυναμίας πραγματοποίησης του ελέγχου την ημέρα της αιμοληψίας).

**Υλικά:** Για την χρώση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν έτοιμα προς χρήση μονοκλωνικά αντισώματα σημασμένα με τα αντίστοιχα φθοριοχρώματα.

Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι:

**Για τη διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων:** Anti-human CD45-PeCy5 (κλώνος H130, οίκος Biolegend), anti-human CD14-FITC (κλώνος MEM15, οίκος Cytognos), anti-human CD16-FITC (κλώνος 3G8, οίκος Cytognos), anti-human CD64-PE(κλώνος 22 - isotype IgG<sub>1</sub>, οίκος Cytognos), λυτικό διάλυμα ερυθροκυττάρων Quicklysis (οίκος Cytognos).

**Για την ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER:** Anti-human CD45-APC (κλώνος H130, οίκος Biolegend), anti-human CD14-PE (κλώνος 63D3, οίκος Biolegend), anti-human CD33-PeCy5 (κλώνος WM53, οίκος Biolegend), αντιδραστήριο FLAER-ALEXA Fluor 488 Pro-aerolysin reagent (FL2S-C 50μg, οίκος Cedarlane), λυτικό διάλυμα ερυθροκυττάρων Quicklysis (οίκος Cytognos).

Για την ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER: Anti-human CD45-APC (κλώνος H130, οίκος Biolegend), anti-human CD24-PE (κλώνος ML5, οίκος Biolegend), anti-human CD15-PerCp5 (κλώνος W6D3, οίκος Biolegend), αντιδραστήριο FLAER-ALEXA Fluor 488 pro-aerolysin reagent (FL2S-C 50μg, οίκος Cedarlane), λυτικό διάλυμα ερυθροκυττάρων Quicklysis (οίκος Cytognos).

Για την ανάλυση της έκφρασης του CD59 στα ερυθροκύτταρα: Anti-human CD235ab-FITC (γλυκοφορίνη-A, κλώνος HIR2, isotype: mouse IgG2b, οίκος Biolegend), anti-human CD59-PE (κλώνος p282-H19, οίκος Biolegend).

Για την ανάλυση της έκφρασης του CD55 στα ερυθροκύτταρα: Anti-human CD235ab-FITC (γλυκοφορίνη-A, κλώνος HIR2, isotype: mouse IgG2b, οίκος Biolegend), anti-human CD55-PE (κλώνος JS11, οίκος Biolegend).

**Εξοπλισμός:** Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σε κυτταρομετρητή ροής 6 παραμέτρων CyFlow SPACE του οίκου Sysmex (λογισμικό Flow-max 2.8) και τα αποτελέσματα αποθηκεύτηκαν σε μορφή αρχείων κυτταρομετρίας ροής (FCS 3).

### **3.1.4 Προετοιμασία ανάλυσης των δειγμάτων**

Αρχικά για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν 5 συνδυασμοί ανά ασθενή [3 για την ανάλυση των λευκοκυττάρων-WBCs (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα) και 2 για την ανάλυση των ερυθροκυττάρων] σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή οίκου για έκαστο αντιδραστήριο. Στην πορεία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αναλύθηκαν μόνο οι τρεις συνδυασμοί (MONO FLAER, NEUTRO FLAER, RED CD59)

#### **3.1.4.1 Ανάλυση WBCs**

**Συνδυασμός 1- Διερευνητική ανάλυση (screening) ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων** (δεν έγινε στατιστική ανάλυση)

1. Χρώση: προσθήκη 5μl CD45-PerCp5, 5μl CD16-FITC, 5μl CD14-FITC και 10μl CD64-PE σε 100μl ολικό αίμα από σωληνάριο με EDTA.
2. Επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι.
3. Λύση ερυθροκυττάρων: προσθήκη 2ml λυτικού διαλύματος Quicklysis.
4. Επώαση 10min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

### **Συνδυασμός 2 - Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER /MONO FLAER**

1. Χρώση: προσθήκη 5μl CD45-APC, 5μl CD14-PE, 5μl CD33-PerCy5 και 5μl FLAER σε 100μl ολικό αίμα από σωληνάριο με EDTA.
2. Επώαση 15min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) στο σκοτάδι.
3. Λύση ερυθροκυττάρων: προσθήκη 2ml λυτικού διαλύματος Quicklysis.
4. Επώαση 10min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

### **Συνδυασμός 3 - Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER /NEUTRO FLAER**

1. Χρώση: προσθήκη 5μl CD45-APC, 5μl CD24-PE, 5μl CD15-PerCy5 και 5μl FLAER σε 100μl ολικό αίμα από σωληνάριο με EDTA.
2. Επώαση 15min σε RT στο σκοτάδι.
3. Λύση ερυθροκυττάρων: προσθήκη 2ml λυτικού διαλύματος Quicklysis.
4. Επώαση 10min στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου και ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

#### **3.1.4.2 Ανάλυση RBCs**

Η ανάλυση για την ανίχνευση PNH κλώνων στα ερυθροκύτταρα με κυτταρομετρία ροής διαφέρει από εκείνη του ανοσοφαινοτυπικού προσδιορισμού των λευκοκυττάρων, ως προς την απουσία του βήματος της λύσης των ερυθρών και ως προς την πρόληψη της συσσωμάτωσης (*aggregation*) των ερυθροκυττάρων. Ως εκ τούτου χρησιμοποιείται η διαδικασία διπλής έκπλυσης των κυττάρων μετά την σήμανσή τους με τα μονοκλωνικά αντισώματα. Η γλυκοφορίνη-A (CD235a) θεωρείται αντιδραστήριο ειδικό για την οριοθέτηση των ώριμων ερυθροκυττάρων. Η προσθήκη αντισωμάτων έναντι της γλυκοφορίνης-A (CD235a) επιτρέπει τη διάκριση των ερυθροκυττάρων από τις άλλες κυτταρικές σειρές και τα κυτταρικά θραύσματα, που μπορεί λανθασμένα να θεωρηθούν ως παθολογικά<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup>Η πυκνότητα της γλυκοφορίνης-A στην επιφάνεια των ερυθροκυττάρων είναι μεγάλη και ως εκ τούτου χρήση anti-CD235a υψηλής συγκέντρωσης, πιθανά να επιφέρει συσσωμάτωση (*aggregation*) των κυττάρων. Για την αποφυγή του φαινομένου συστήνεται αραίωση του αντιδραστηρίου (της οποίας ο βαθμός καθορίζεται μετά από προσεκτική τιτροδότηση). Η συσσωμάτωση είναι γενικά μεγαλύτερη με αντισώματα έναντι της γλυκοφορίνης-A συνδεδεμένα με PE παρά με FITC (*Borowitz et al. 2010; Richards et al. 2000*).

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο διάλυμα εργασίας για την γλυκοφορίνη-A, σε αραιώση 1/40 (1μl CD235ab-FITC σε 39μl διάλυμα NaCl 0,9%). Ως εκ τούτου, η προετοιμασία ανάλυσης των δειγμάτων για τον συνδυασμό 4 έχει ως εξής:

**Συνδυασμός 4 - Ανάλυση έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα /RED CD59**

1. Αραίωση του αρχικού δείγματος (ολικό αίμα από σωληνάριο με EDTA) 200x (προσθήκη 10μl δείγματος σε 2ml διαλύματος NaCl 0,9%).
2. Διάλυμα εργασίας CD235ab-FITC: 1μl CD235a-FITC σε 39μl διαλύματος NaCl 0,9% (καλή ανακίνηση).
3. Χρώση: 2μl CD235ab-FITC (από το διάλυμα εργασίας) και 10μl CD59-PE σε 20μl αραιωμένου δείγματος.
4. Επώαση 15min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
5. Έκπλυση (δύο φορές) με διάλυμα NaCl 0,9%.
6. Προσθήκη 1ml διαλύματος NaCl 0,9% και ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

**Συνδυασμός 5 - Ανάλυση έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα /RED CD55**

(δεν έγινε στατιστική ανάλυση)

1. Αραίωση του αρχικού δείγματος (ολικό αίμα από σωληνάριο με EDTA) 200x (προσθήκη 10μl δείγματος σε 2ml διαλύματος NaCl 0,9%).
2. Διάλυμα εργασίας CD235ab-FITC: 1μl CD235a-FITC σε 39μl διαλύματος NaCl 0,9% (καλή ανακίνηση).
3. Χρώση: 2μl CD235ab-FITC (από το διάλυμα εργασίας) και 10μl CD55-PE σε 20μl αραιωμένου δείγματος.
4. Επώαση 15min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι.
5. Έκπλυση (δύο φορές) με διάλυμα NaCl 0,9%.
6. Προσθήκη 1ml διαλύματος NaCl 0,9% και ανάλυση του δείγματος στον κυτταρομετρητή ροής.

### 3.1.4.3 Αρνητικοί μάρτυρες

Για την ρύθμιση της οριοθέτησης των πληθυσμών ανάλυσης [στους συνδυασμούς 2, 3, 4 (και αρχικά και στον 5)] και των *compensation settings*, χρησιμοποιήθηκαν αρνητικοί μάρτυρες (αρνητικά controls, αποτελούμενα από μη σημασμένα κύτταρα).

Πιο συγκεκριμένα:

Αρνητικοί μάρτυρες ανάλυσης μονοκυττάρων/ουδετερόφιλων: προετοιμασία δύο σωληναρίων στα οποία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των συνδυασμών 2 και 3 χωρίς προσθήκη FLAER.

Αρνητικοί μάρτυρες ανάλυσης ερυθροκυττάρων: προετοιμασία δύο σωληναρίων στα οποία ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των συνδυασμών 4 (και 5) χωρίς προσθήκη CD59-PE (και CD55-PE).

Δεδομένου ότι η ταυτοποίηση των PNH κλώνων τύπου II στα ερυθροκύτταρα δεν έχει ακόμη επαρκώς τυποποιηθεί (*Borowitz et al. 2010*), η αναμενόμενη θέση των PNH κλώνων περιορισμένης έκφρασης (dim/type-II) θεωρείται ότι βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ του αρνητικού παθολογικού (type-III) και του φυσιολογικού πληθυσμού κυττάρων (type-I).

### 3.1.5 Ανάκτηση, Οριοθέτηση (Gating) και ανάλυση των δειγμάτων

Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του λογισμικού Flowmax 2.8.

Τα δεδομένα της κυτταρομετρικής ανάλυσης παρουσιάστηκαν σε ιστογράμματα μιας παραμέτρου και/ή σε διαγράμματα πυκνότητας (*density plots*) ή στικτογράμματα (*dot plots*) δύο παραμέτρων. Σε κάθε συνδυασμό ακολουθήθηκε διαφορετική στρατηγική οριοθέτησης (*gating*) σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες. Η οριοθέτηση (*gating*) έγινε βάσει των αποτελεσμάτων των αρνητικών *controls* και επιβεβαιώθηκε από τα αποτελέσματα των τεσσάρων δειγμάτων των ασθενών με επιβεβαιωμένη PNH.

Πιο συγκεκριμένα:

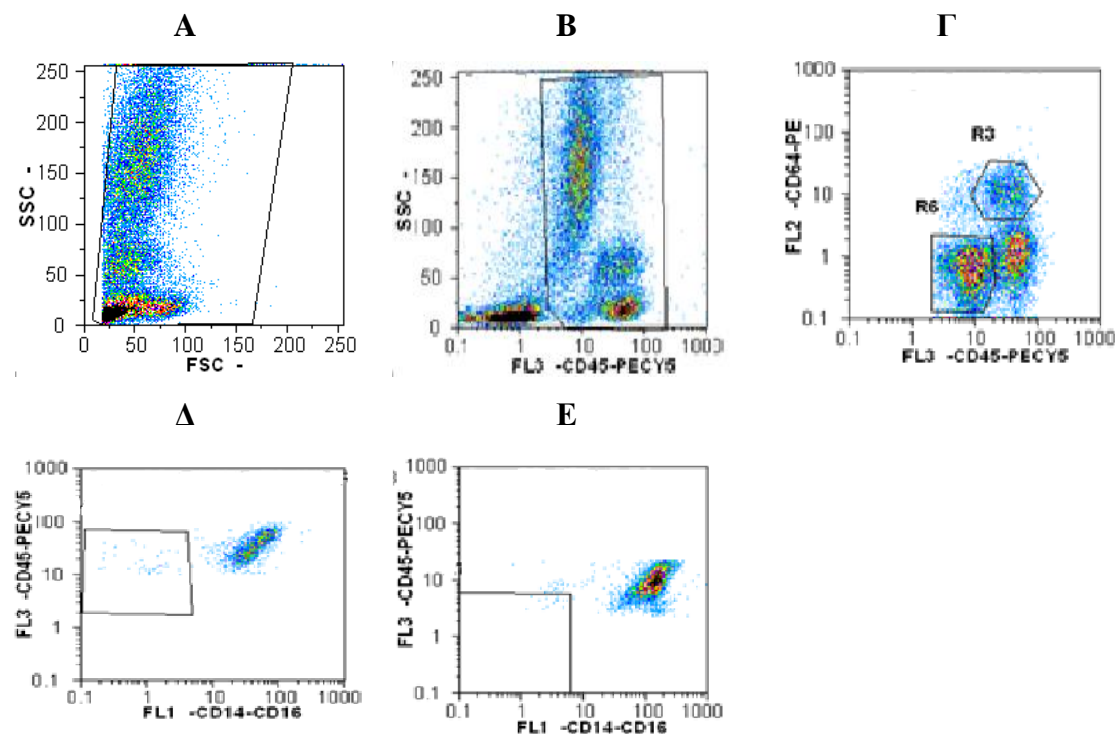
Συνδυασμός 1- Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων  
(δεν έγινε στατιστική ανάλυση)

1. Ανάλυση 100000 κυττάρων.
2. Οριοθέτηση των λευκοκυττάρων.



3. Οριοθέτηση των μονοκυττάρων ως CD45–PeCy5 θετικά/CD64-PE θετικά /ενδιάμεσο SSC.
4. Οριοθέτηση των ουδετερόφιλων ως CD45–PeCy5 θετικά/CD64-PE αρνητικά /υψηλό SSC.
5. Ποσοτικοποίηση των μονοκυττάρων τα οποία είναι CD14–FITC αρνητικά (PNH κλώνος).
6. Ποσοτικοποίηση των ουδετερόφιλων τα οποία είναι CD16-FITC αρνητικά (PNH κλώνος).

Ως ύποπτο δείγμα για κλώνο PNH ορίζεται αυτό στο οποίο παρατηρείται ταυτόχρονη ανίχνευση κλώνου PNH στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα σε ποσοστό >3% (Εικόνα 53).



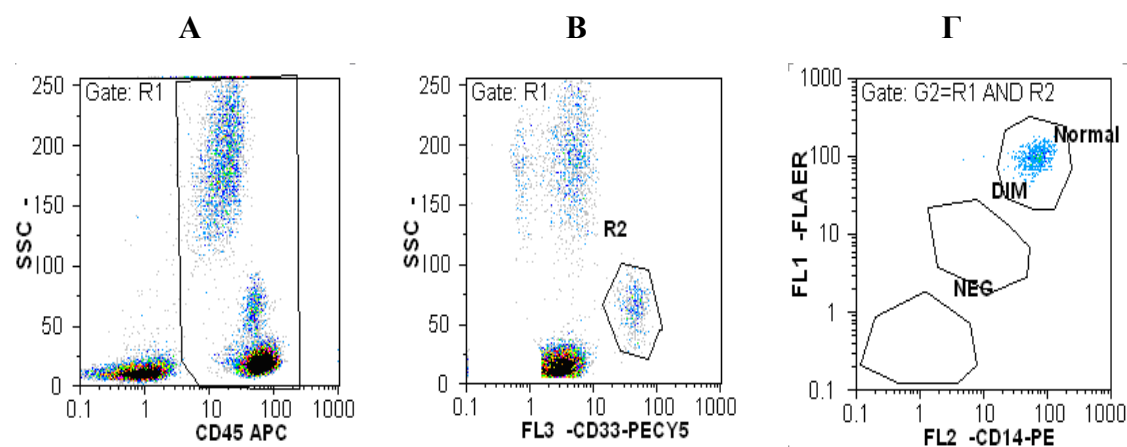
**Εικόνα 53.** Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων σε δείγμα εξεταζομένου. **A)** Οριοθέτηση των κυττάρων που αναλύθηκαν. **B)** Οριοθέτηση των λευκοκυττάρων. **Γ)** Οριοθέτηση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων. **Δ)** Ποσοτικοποίηση μονοκυττάρων. **Ε)** Ποσοτικοποίηση ουδετερόφιλων.

Οι πιθανοί υποκλινικοί PNH κλώνοι σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα ταυτοποιήθηκαν βάσει *side scatter* (CD15 για τα ουδετερόφιλα και CD33 για τα μονο-

κύτταρα), καθώς και με τη μη έκφραση ενός δείκτη λευκοκυττάρων σε συνδυασμό με τα FLAER αρνητικά κύτταρα [CD24(-) για τα ουδετερόφιλα και CD14(-) για τα μονοκύτταρα].

### **Συνδυασμός 2- Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER /MONO FLAER**

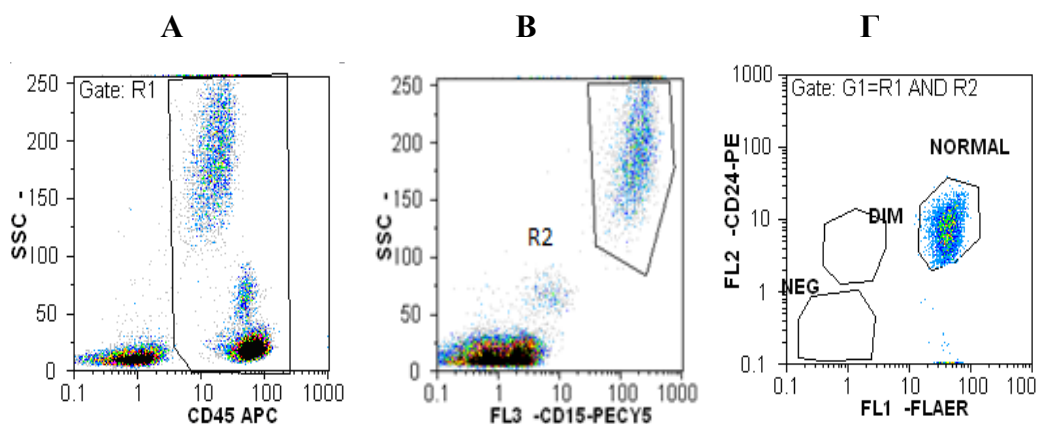
1. Ανάλυση 100000 κυττάρων.
2. Οριοθέτηση των μονοκυττάρων ως CD33-PerCp5 θετικά/ενδιάμεσο SSC.
3. Ποσοτικοποίηση των μονοκυττάρων τα οποία είναι CD14/FLAER αρνητικά (PNH κλώνος) (Εικόνα 54).



**Εικόνα 54.** Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER σε δείγμα εξεταζομένου. **A)** Οριοθέτηση λευκοκυττάρων. **B)** Οριοθέτηση μονοκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος εξεταζομένου όσον αφορά την έκφραση του PNH κλώνου στα μονοκύτταρα.

### **Συνδυασμός 3 - Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER /NEUTRO FLAER**

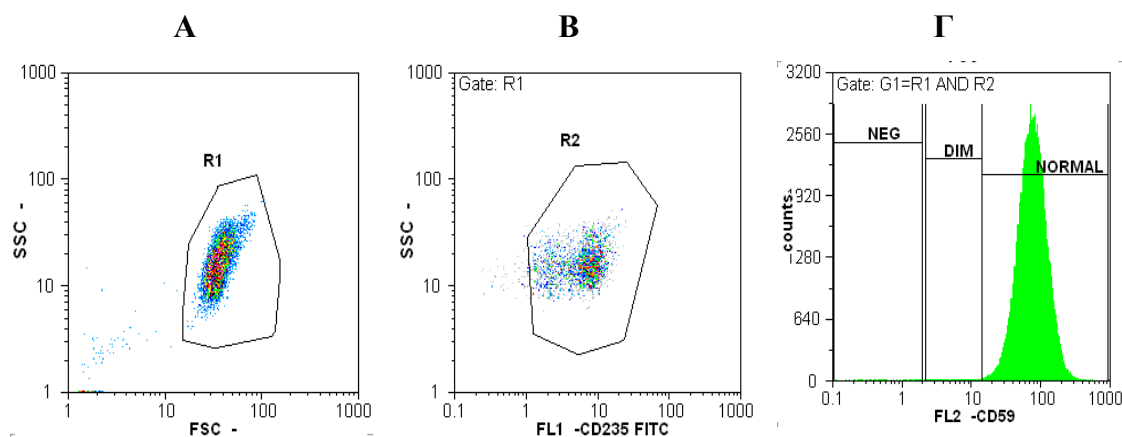
1. Ανάλυση 100000 κυττάρων.
2. Οριοθέτηση των ουδετερόφιλων ως CD15-PerCp5 θετικά/υψηλό SSC.
3. Ποσοτικοποίηση των ουδετερόφιλων τα οποία είναι CD24/FLAER αρνητικά (PNH κλώνος) (Εικόνα 55).



**Εικόνα 55.** Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER σε δείγμα εξεταζόμενο. **A)** Οριοθέτηση λευκοκυττάρων. **B)** Οριοθέτηση ουδετερόφιλων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος εξεταζόμενου όσον αφορά την έκφραση του PNH κλώνου στα ουδετερόφιλα.

**Συνδυασμός 4 - Ανάλυση έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα /RED CD59**

1. Ανάλυση 100000 κυττάρων.
2. Οριοθέτηση των ερυθροκυττάρων που είναι θετικά στην γλυκοφορίνη A (CD235a-FITC).
3. Ποσοτικοποίηση των ερυθροκυττάρων τα οποία είναι CD59 αρνητικά (ερυθροκύτταρα, type III/II) (Εικόνα 56).

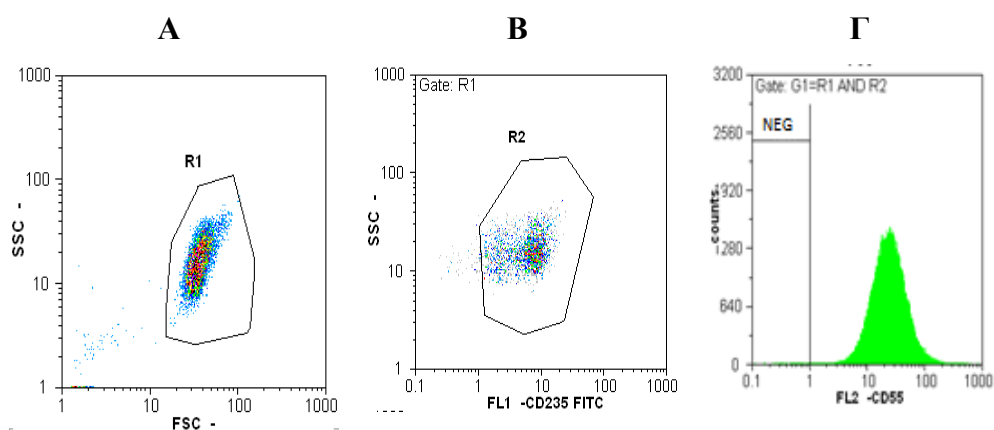


**Εικόνα 56.** Ανάλυση της έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα σε δείγμα εξεταζόμενο. **A)** Οριοθέτηση κυττάρων που αναλύθηκαν. **B)** Οριοθέτηση ερυθροκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος εξεταζόμενου όσον αφορά την έκφραση του CD59 στα ερυθροκύτταρα.

### Συνδυασμός 5 - Ανάλυση έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα /RED CD55

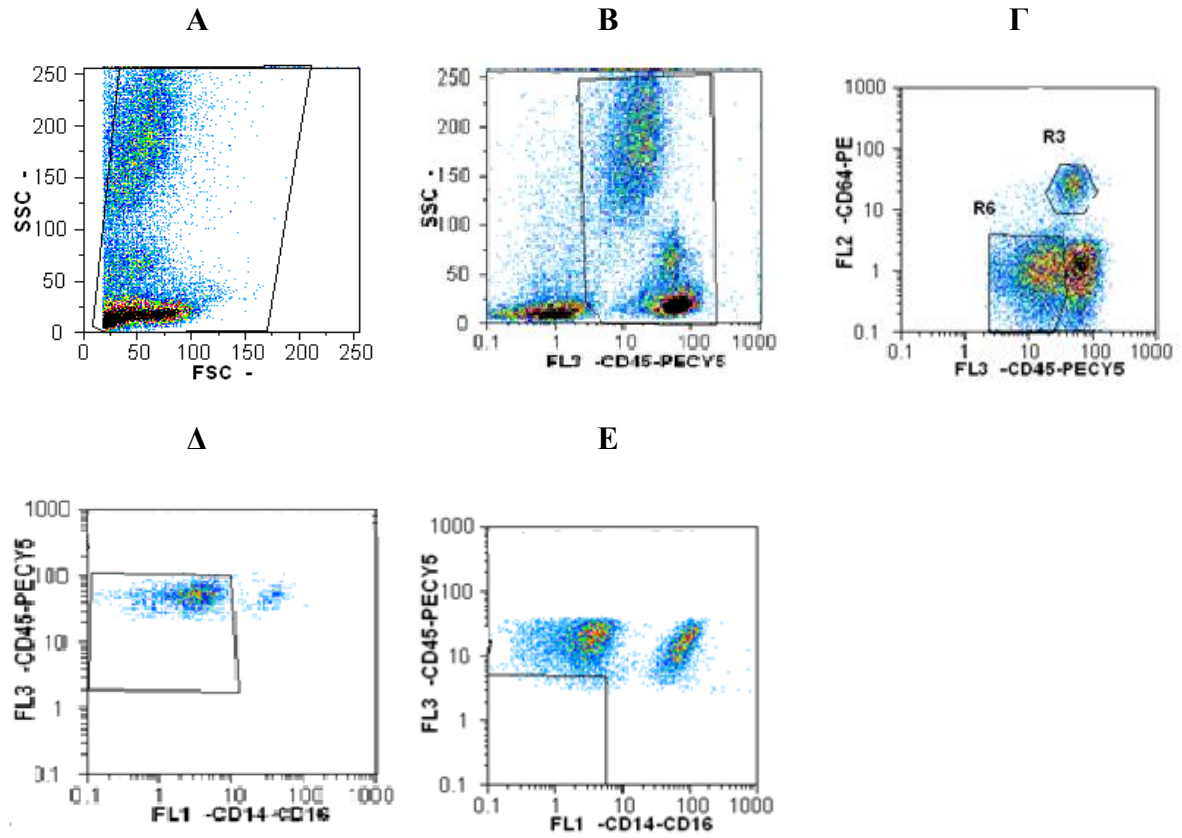
(δεν έγινε στατιστική ανάλυση)

1. Ανάλυση 100000 κυττάρων.
2. Οριοθέτηση των ερυθροκυττάρων που είναι θετικά στην γλυκοφορίνη-A (CD235ab-FITC).
3. Ποσοτικοποίηση των ερυθροκυττάρων τα οποία είναι CD55 αρνητικά (ερυθροκύτταρα, type III/II) (Εικόνα 57).

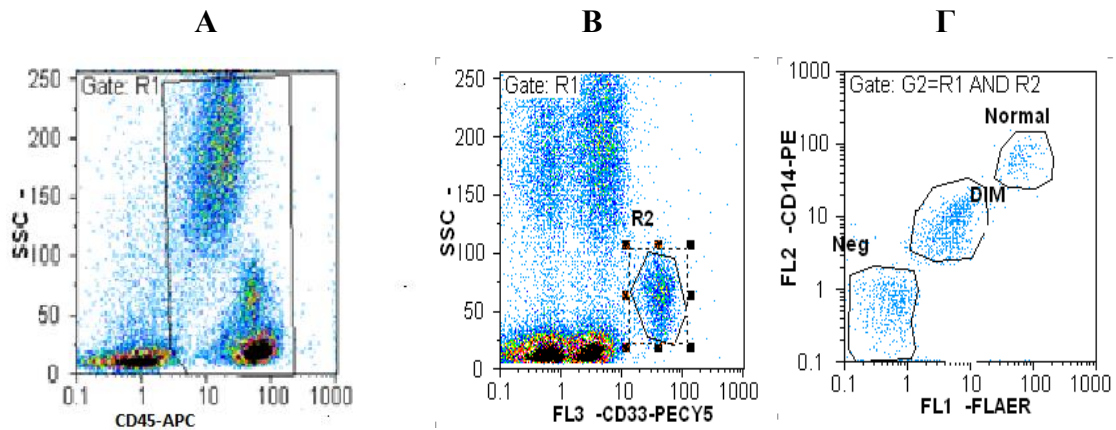


**Εικόνα 57.** Ανάλυση της έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα σε δείγμα εξεταζομένου. **A)** Οριοθέτηση κυττάρων που αναλύθηκαν. **B)** Οριοθέτηση ερυθροκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος εξεταζομένου όσον αφορά την έκφραση του CD55 στα ερυθροκύτταρα.

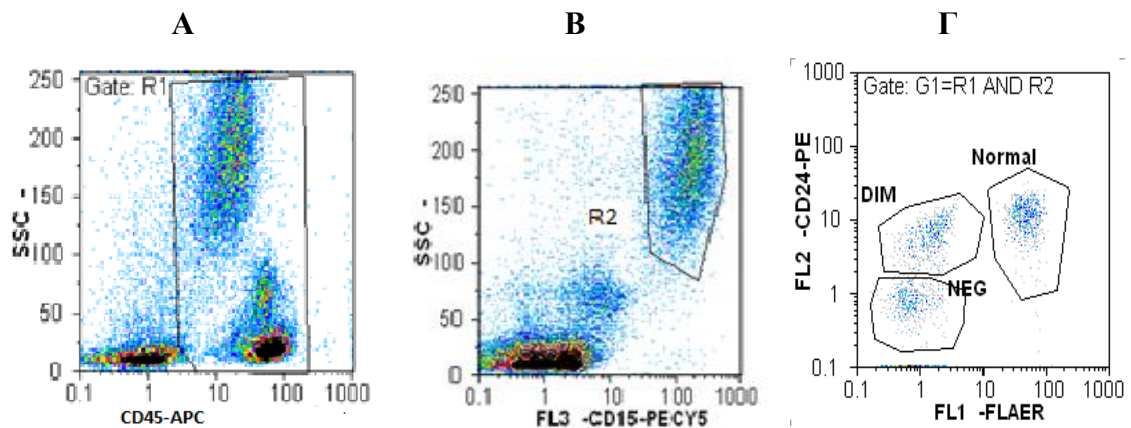
Η οριοθέτηση (*gating*) των PNH κλώνων σε ασθενή με νόσο PNH δίνεται στις Εικόνες 58, 59, 60, 61 και 62.



**Εικόνα 58.** Διερευνητική ανάλυση ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων σε ασθενή με νόσο PNH. **Α)** Οριοθέτηση των κυττάρων που αναλύθηκαν. **Β)** Οριοθέτηση των λευκοκυττάρων. **Γ)** Οριοθέτηση μονοκυττάρων και ουδετερόφιλων. **Δ)** Ποσοτικοποίηση μονοκυττάρων. **Ε)** Ποσοτικοποίηση ουδετερόφιλων.

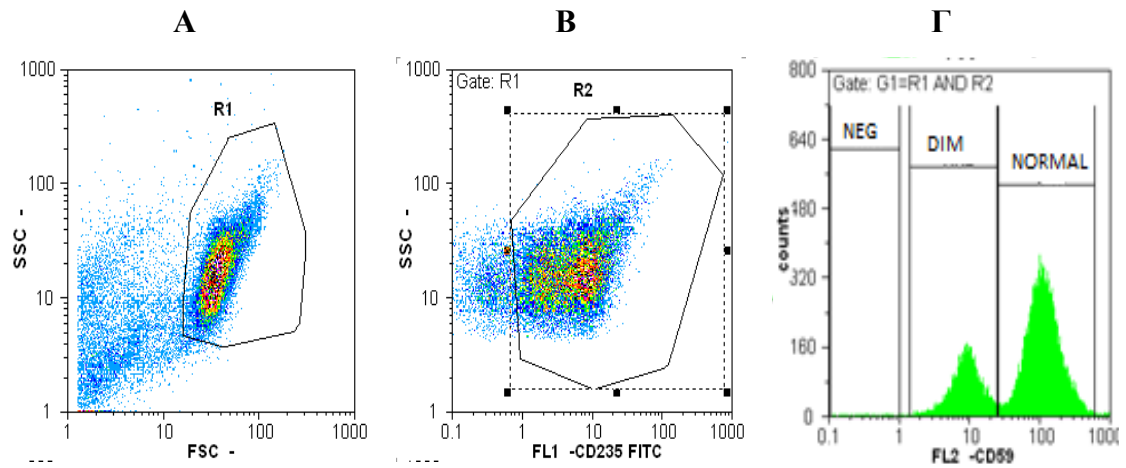


**Εικόνα 59.** Ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER σε ασθενή με νόσο PNH. **A)** Οριοθέτηση λευκοκυττάρων. **B)** Οριοθέτηση μονοκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος ασθενούς με PNH, όσον αφορά την έκφραση του κλώνου στα μονοκύτταρα.

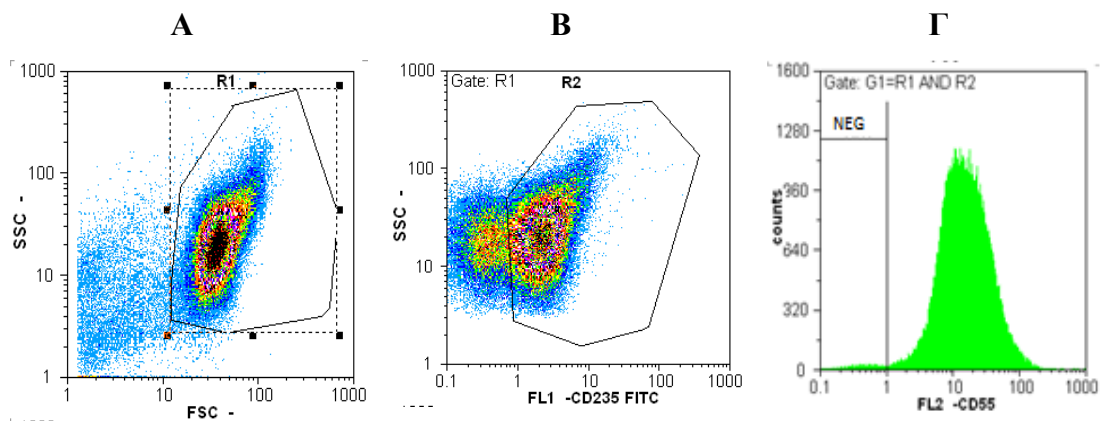


**Εικόνα 60.** Ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER σε ασθενή με νόσο PNH. **A)** Οριοθέτηση λευκοκυττάρων. **B)** Οριοθέτηση ουδετερόφιλων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος ασθενούς με PNH, όσον αφορά την έκφραση του κλώνου στα ουδετερόφιλα.

Στην ανάλυση έκφρασης του RED CD59 για τους ασθενείς με PNH, ως κλώνος ελήφθη το σύνολο των κλώνων τύπου-II (dim) και τύπου-III. Στην ανάλυση έκφρασης του RED CD55 (Εικόνα 62) φαίνεται καθαρά ότι δεν είναι δυνατός ο διαχωρισμός των τύπων II και I.



**Εικόνα 61.** Ανάλυση έκφρασης CD59 στα ερυθροκύτταρα σε ασθενή με νόσο PNH. **Α)** Οριοθέτηση κυττάρων που αναλύθηκαν. **Β)** Οριοθέτηση ερυθροκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος ασθενούς με PNH, όσον αφορά την έκφραση του CD59 στα ερυθροκύτταρα. Σαφής διαχωρισμός των τριών τύπων κυττάρων.



**Εικόνα 62.** Ανάλυση έκφρασης CD55 στα ερυθροκύτταρα σε ασθενή με νόσο PNH. **Α)** Οριοθέτηση κυττάρων που αναλύθηκαν. **Β)** Οριοθέτηση ερυθροκυττάρων. **Γ)** Αποτέλεσμα δείγματος ασθενούς με PNH, όσον αφορά την έκφραση του CD55 στα ερυθροκύτταρα. Μη σαφής διαχωρισμός μεταξύ των κυττάρων τύπου-I και τύπου-II.

## 3.2 Στατιστική ανάλυση

Δεδομένου ότι μεγάλου μεγέθους PNH κλώνοι δεν αναμένονταν [εκτός από τον πληθυσμό των 4 PNH ασθενών (*positive controls*), που δεν συμπεριλήφθηκε στην ανάλυση], η στατιστική ανάλυση επικεντρώθηκε στην παρουσία των μικρού μεγέθους κλώνων στους 3 από τους 5 συνδυασμούς (2-3-4) που αναφέρονται παραπάνω. Η αξιολόγηση των μικρού μεγέθους PNH κλώνων έγινε σύμφωνα με τις τιμές των *clinical cut-off*, που προσδιορίστηκαν από τα αποτελέσματα των 100 φυσιολογικών ατόμων που ελέγχθηκαν παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών. Οι μέσες τιμές (*mean*), οι τυπικές αποκλίσεις (*SD*), οι διάμεσοι (*median*) και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη (*interquartile range/IQR*) χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποσοτικών μεταβλητών. Οι απόλυτες (*N*) και οι σχετικές (%) συχνότητες χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ποιοτικών μεταβλητών.

Για τη σύγκριση των αναλογιών χρησιμοποιήθηκε το *Chi-square test* ή το *Fisher's exact test*, όπου ήταν απαραίτητο. Για τη σύγκριση των κανονικών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το *Student's t-test*, ενώ το μη παραμετρικό κριτήριο *Mann-Whitney* χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση των μη κανονικών μεταβλητών μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ασθενών.

Για τον έλεγχο της συσχέτισης δυο ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης του *Spearman* ( $r$ ). Η συσχέτιση θεωρείται χαμηλή όταν ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ) κυμαίνεται από 0,1 έως 0,3· μέτρια όταν ο συντελεστής συσχέτισης κυμαίνεται από 0,31 έως 0,5 και υψηλή όταν ο συντελεστής συσχέτισης είναι μεγαλύτερος από 0,5.

Για την εύρεση των ανεξάρτητων παραγόντων, που σχετίζονται με την υποτροπή, έγινε ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (*logistic regression analysis*) και προέκυψαν οι σχετικοί λόγοι (*Odds ratio*) με τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% *CI*).

Τα επίπεδα σημαντικότητας (*p-values*) είναι αμφίπλευρα, ενώ η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο 0,05. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 22.0.



## Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν 41,0 έτη (SD=10,4) και των υγιών ατόμων 41,2 έτη (SD=10,1). τα δεδομένα αυτά φαίνονται στον Πίνακα 12.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η στατιστική ανάλυση επικεντρώθηκε στα αποτελέσματα των αναλύσεων των συνδυασμών 2, 3, 4 (ανάλυση μονοκυττάρων με FLAER: *MONO FLAER*, ανάλυση ουδετερόφιλων με FLAER: *NEUTRO FLAER* και ανάλυση της έκφρασης του CD59 στα ερυθροκύτταρα: *RED CD59*).

Προκειμένου να μελετηθούν οι συσχετίσεις μεταξύ των πληθυσμών, οι συμμετέχοντες διαχωρίστηκαν σε δύο ομάδες:

### Ομάδα-1 (2 πληθυσμοί):

Οι ασθενείς στο σύνολό τους σε σχέση με τους υγιείς δότες (*healthy controls*)

### Ομάδα-2 (5 πληθυσμοί):

Οι τέσσερις υποομάδες των ασθενών ανάλογα με το αρχικό θρομβωτικό επεισόδιο που εμφάνισαν, όπως έχουν ήδη αναφερθεί (πνευμονική εμβολή/PE, σπλαχνική θρόμβωση/SVT, φλεβική θρόμβωση/OtherVT, αρτηριακή θρόμβωση/AT) σε σχέση με τους υγιείς δότες.

Τα αποτελέσματα των 4 ασθενών με νόσο PNH, δίνονται συνοπτικά στους Πίνακες 10, 11. Όπως αναφέρθηκε τα αποτελέσματα των ασθενών με νόσο PNH (N=4) δεν συμπεριλήφθηκαν στην στατιστική ανάλυση.

Στον Πίνακα 10 δίνονται οι μέσες τιμές των μεταβλητών που ελέγχθηκαν για τους 4 PNH ασθενείς, ενώ τα αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε έναν από τους ασθενείς αυτούς δίνονται στον Πίνακα 11.

<b>PNH Ασθενείς /POSITIVE CONTROLS</b>			
	<b>N</b>	<b>Μέση τιμή</b>	<b>(SD)</b>
<b>SCR MONO</b>	4	84,31	10,66
<b>SCR NEUTRO</b>	4	67,13	44,62
<b>MONO FLAER</b>	4	48,54	30,03
<b>NEUTRO FLAER</b>	4	50,01	29,57
<b>RED CD59</b>	4	24,72	13,88
<b>RED CD55</b>	4	20,79	16,04

*Πίνακας 10. Τιμές των μεταβλητών για τους ασθενείς με νόσο PNH.*

<b>PNH PATIENTS</b>		<b>SCR MONO</b>	<b>SCR NEUTRO</b>	<b>MONO FLAER</b>	<b>NEUTRO FLAER</b>	<b>RED CD59</b>	<b>RED CD55</b>
<b>D 43</b>	♂	71,28	92,09	88,87	93,3	III:7,36 II:21,49 Total:28,85	36,4
<b>D112</b>	♂	94,31	76,91	46,87	44,49	III:23,48 II:14,83 Total:38,31	31,34
<b>D117</b>	♂	80,04	97,97	16,4	32,88	III:1,51	13,82
<b>D328</b>	♂	91,59	1,54	42,03	29,4	III:1,23 II:28,97 Total:30,20	3,61

*Πίνακας 11. Ασθενείς με νόσο PNH: αποτελέσματα των μετρήσεων για κάθε ασθενή (III=Negative, II=Dim).*

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα δημογραφικά στοιχεία και τα κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων, για κάθε έναν από τους εξεταζόμενους πληθυσμούς (Πίνακας 12).

	Ασθενείς (N=181)	Υγιείς δότες (N=100)	P
	N (%)	N (%)	
<b>Φύλο</b>			
♂	103 (56,9)	66 (66,0)	0,136 <sup>+</sup>
♀	78 (43,1)	34 (34,0)	
<b>Ηλικία κατά τον έλεγχο (mean/SD)</b>	41,0 (10,4)	41,2 (10,1)	0,876 <sup>++</sup>
<b>Τύπος θρομβωτικού επεισοδίου</b>			
<i>PE</i>	65 (35,9)	-	-
<i>SVT</i>	31 (17,1)	-	-
<i>OTHER VT</i>	49 (27,1)	-	-
<i>AT</i>	36 (19,9)	-	-
<b>Ηλικία κατά το α' επεισόδιο (mean/SD)</b>	37 (9,9)	-	-
<b>Υποτροπές</b>	91 (50,3)	-	-
<b>Οικογενειακό ιστορικό</b>	56 (31,3)	-	-
<b>Συν-νοσηρότητες</b>			
<i>Παχυσαρκία</i>	5 (2,8)	-	-
<i>Δυσλιπιδαιμία</i>	6 (3,3)	-	-
<i>Διαβήτης</i>	2 (1,1)	-	-
<i>Υπέρταση</i>	10 (5,5)	-	-
<i>Κιρσοί</i>	8 (4,4)	-	-
<i>Ανεπάρκεια βαλβίδων κ. άκρων</i>	2 (1,1)	-	-
<i>Συνδρομο Sjögren</i>	3 (1,7)	-	-
<i>Ρευματοειδής αρθρίτιδα</i>	1 (0,6)	-	-
<i>Αγγειίτιδα</i>	1 (0,6)	-	-
<b>Είδος θρομβωτικού επεισοδίου ανά υποομάδα</b>			
<i>PE (N=65)</i>	65 (100,0)	-	-
<i>SVT (N=31)</i>	<i>Μεσεντερίου φλέβας</i>	8 (25,8)	-
	<i>Πυλαίας φλέβας</i>	15 (48,4)	-

	<i>σ. Budd-Chiari</i>	2 (6,5)	-	-
	<i>Σπληνικής φλέβας</i>	6 (19,4)	-	-
<i>Other VT</i> (n=49)	<i>Κάτω άκρων</i>	30 (61,2)	-	-
	<i>Άνω άκρων</i>	3 (6,1)	-	-
	<i>Οφθαλμικής φλέβας</i>	4 (8,2)	-	-
	<i>Λαγονομηριαίας φλέβας</i>	7 (14,3)	-	-
	<i>Κ. κοίλης φλέβας</i>	3 (6,1)	-	-
	<i>Σφαγίτιδας φλέβας</i>	1 (2,0)	-	-
	<i>Υποκλείδιου φλέβας</i>	1 (2,0)	-	-
<i>AT (N=36)</i>	<i>Στεφανιαία νόσος/MI</i>	12 (33,3)	-	-
	<i>Κοιλιακής αορτής</i>	1 (2,8)	-	-
	<i>Αποφρ. αρτηριοπάθεια</i>	3 (8,3)	-	-
	<i>ΑΕΕ</i>	12 (33,3)	-	-
	<i>Νεφρικής αρτηρίας</i>	2 (5,6)	-	-
	<i>Σπονδυλικής αρτηρίας</i>	2 (5,6)	-	-
	<i>Οφθαλμικής αρτηρίας</i>	4 (11,1)	-	-

<sup>+</sup>Pearson's chi-square test; <sup>++</sup>Student's t-test.

**Πίνακας 12.** Δημογραφικά στοιχεία και κλινικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων.

Μεταξύ των πληθυσμών που εξετάστηκαν δεν διέφερε σημαντικά η ηλικία (η μέση ηλικία ήταν κοντά στα 41 έτη και στους δύο πληθυσμούς), ενώ όσον αφορά στο φύλο η πλειοψηφία ήταν άντρες. Η μέση ηλικία των ασθενών κατά το πρώτο θρομβοεμβολικό επεισόδιο ήταν τα 37 έτη και ήταν παρόμοια μεταξύ των διαφόρων τύπων επεισοδίων. Το 35,9% των ασθενών εμφάνισε πνευμονική εμβολή, το 27,1% φλεβική θρόμβωση κάτω άκρων ή σε ασυνήθη θέση (εκτός της σπλαχνικής θρόμβωσης), το 17,1% σπλαχνική θρόμβωση και το 19,9% αρτηριακή θρόμβωση.

#### 4.1 Αξιολόγηση των μικρού μεγέθους κλώνων ανά παράμετρο και ανά πληθυσμό

Η αξιολόγηση των μικρού μεγέθους PNH κλώνων (για τη μεθοδολογία που ακολουθήσαμε) έγινε σύμφωνα με τα *clinical cut-off* (mean+2SD) που προσδιορίστηκε από τις τιμές των φυσιολογικών ατόμων που ελέγχθηκαν (N=100) παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών (Πίνακας 13).

	<b>MONO FLAER</b>	<b>NEUTRO FLAER</b>	<b>RED CD59</b>
<b>N</b>	100	100	100
<b>MEAN (SD)</b>	0,029 (0,035)	0,025 (0,024)	0,037 (0,029)
<b>CUT-OFF VALUES</b>	<b>0,099</b>	<b>0,073</b>	<b>0,095</b>

*Πίνακας 13.* Τιμές των *clinical cut-off* για την αξιολόγηση των μικρού μεγέθους PNH κλώνων.

Αν και είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα *clinical cut-off* για την ανίχνευση των PNH κλώνων με κυτταρομετρία ροής έχουν οριστεί την τελευταία δεκαετία στο 0,01% για τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα ουδετερόφιλα στο 0,02-0,05% (*Manivannan et al. 2017; Illingworth et al. 2018 & 2019; Sutherland et al. 2018; Brando et al. 2019*), στην παρούσα μελέτη οι τιμές των *clinical cut-off* από τους 100 υγιείς δότες δεν έφτασαν σε τόσο χαμηλά επίπεδα.

Ωστόσο, όσον αφορά στα μονοκύτταρα, οι τιμές των *clinical cut-off* συμφωνούν με τα διεθνή βιβλιογραφικά δεδομένα, στα οποία αναφέρεται ότι λόγω του μικρού πληθυσμού των μονοκυττάρων, δεν μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη ευαισθησία, ως εκ τούτου οι τιμές κυμαίνονται περίπου στο 0,1% (*Sutherland et al. 2018; Brando et al. 2019*).

Κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν εμφάνισε πληθυσμό με καθαρό κλώνο PNH στα WBC ή στα RBC (όπως άλλωστε αναμενόταν), εκτός από τους θετικούς μάρτυρες των οποίων τα αποτελέσματα δεν περιλαμβάνονται στη στατιστική ανάλυση.

Στον Πίνακα 14 φαίνεται η σύγκριση των τιμών των μεταβλητών (MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59) μεταξύ των πληθυσμών της Ομάδας-1 (ασθενείς στο σύνολό τους έναντι των υγιών δοτών).

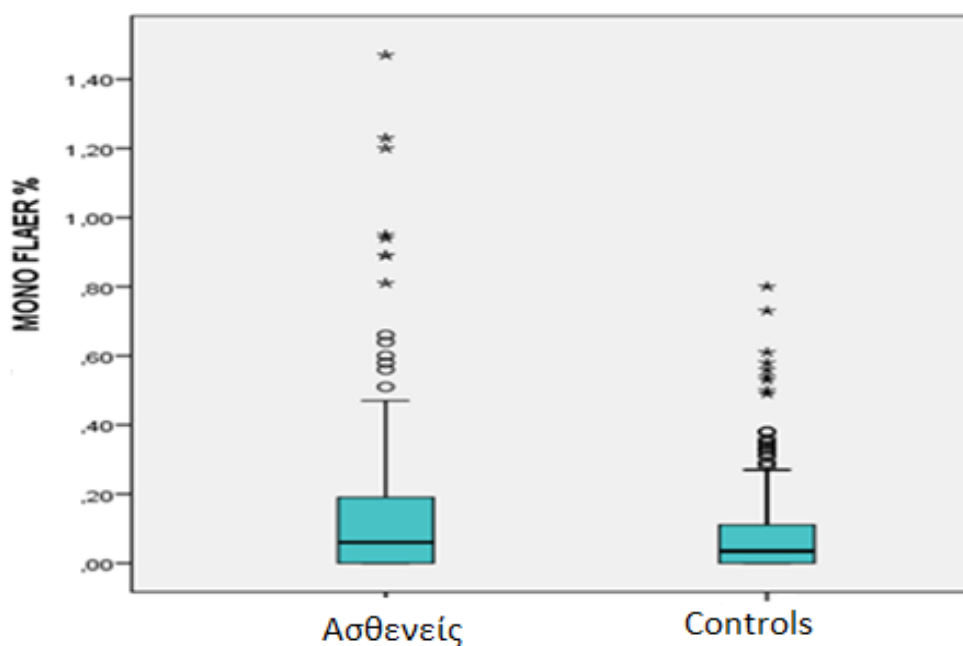
	<i>Ομάδα-1</i>	<i>Mean (SD)</i>	<i>Median (Range)</i>	<i>P+</i>
<b>MONO FLAER</b>	<i>Ασθενείς</i>	0,08 (0,14)	0 (0-0,09)	<b>0,015</b>
	<i>Υγιείς δότες</i>	0,03 (0,04)	0 (0-0,06)	
<b>NEUTRO FLAER</b>	<i>Ασθενείς</i>	0,04 (0,06)	0,03 (0,01-0,06)	<b>0,008</b>
	<i>Υγιείς δότες</i>	0,02 (0,02)	0,02 (0,01-0,04)	
<b>RED CD59</b>	<i>Ασθενείς</i>	0,11 (0,21)	0,04 (0,02-0,13)	<b>0,002</b>
	<i>Υγιείς δότες</i>	0,04 (0,03)	0,03 (0,02-0,05)	

+ Mann-Whitney test

**Πίνακας 14.** Σύγκριση των τιμών των μεταβλητών μεταξύ των πληθυσμών της Ομάδας-1

Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές χαμηλότερες τιμές των υγιών δοτών σε σχέση με τους ασθενείς με θρόμβωση και για τις τρεις μετρηθείσες μεταβλητές (MONO FLAER: 0,015, NEUTRO FLAER: 0,008 και RED CD59: 0,002).

Ενδεικτικά, στο γράφημα που ακολουθεί φαίνονται οι διαφορές στις τιμές των συμμετεχόντων στα MONO FLAER, ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό της Ομάδας-1 (Γράφημα 1).



**Γράφημα 1.** Διαφορές στις τιμές των συμμετεχόντων στα MONO FLAER, ξεχωριστά για κάθε πληθυσμό στην Ομάδα-1.

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται η κατανομή και τα ποσοστά παρουσίας των υψηλών τιμών ανά μεταβλητή και ανά ομάδα (περιλαμβάνονται και οι υποπληθυσμοί της Ομάδας-2), σύμφωνα με τα *clinical cut off*. Το 24,9% των ασθενών βρέθηκε με τιμές στα MONO FLAER  $\geq 0,099$ , το 13,8% με τιμές NEUTRO FLAER  $\geq 0,073$  και το 28,7% με τιμές RED CD59  $\geq 0,095$ .

Οι υψηλότερες τιμές στα MONO FLAER παρατηρήθηκαν στις περιπτώσεις της σπλαχνικής θρόμβωσης (38,7%), ενώ η υποομάδα 'Αρτηριακή θρόμβωση/ΑΤ' εμφάνισε υψηλά ποσοστά τόσο στα MONO FLAER όσο και στα RED CD59 (30,6% και 33,3%, αντίστοιχα).

Στα NEUTRO FLAER η συγκεκριμένη υποομάδα (ΑΤ) είχε επίσης τα υψηλότερα ποσοστά σε σχέση με τις λοιπές υποομάδες (22,2%). Στην υποομάδα 'Other VT' το υψηλότερο ποσοστό τιμών εμφανίστηκε στην ανάλυση έκφρασης του CD59 (RED CD59) στα ερυθροκύτταρα (36,7%) (Πίνακας 15).

	<b>MONO FLAER</b>		<b>NEUTRO FLAER</b>		<b>RED CD59</b>	
	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%	<i>N</i>	%
<b>PE</b> ( <i>N</i> =65)	13	20,0	8	12,3	15	23,1
<b>SVT</b> ( <i>N</i> =31)	12	<b>38,7</b>	4	12,9	7	22,6
<b>Other VT</b> ( <i>N</i> =49)	9	18,4	5	10,2	18	<b>36,7</b>
<b>ΑΤ</b> ( <i>N</i> =36)	11	<b>30,6</b>	8	<b>22,2</b>	12	<b>33,3</b>
<b>Σύνολο ασθενών</b> ( <i>N</i> =181)	45	24,9	25	13,8	52	28,7

**Πίνακας 15.** Ποσοστά παρουσίας υψηλών τιμών ανά μεταβλητή, στο σύνολο των ασθενών και ανά υποομάδα, σύμφωνα με τα *clinical cut-off*.

Στον επόμενο πίνακα αναγράφονται, για κάθε πληθυσμό, πόσες από τις μετρηθείσες μεταβλητές εμφάνισαν υψηλότερες των *clinical cut-off* τιμές και ανά υποομάδα και στο σύνολο των ασθενών. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, τα ποσοστά που λαμβάνονται υπόψιν στον παρακάτω πίνακα, είναι εκείνα των τριών τελευταίων στηλών, όπου εμφανίζονται κύτταρα με φαινότυπο PNH σε παραπάνω από μία μεταβλητές (η τελευταία στήλη δείχνει συνολικά το ποσοστό των ελάχιστων κλώνων σε όλες τις μεταβλητές) ανά υποομάδα και στο σύνολο των ασθενών. Παρατηρήθηκε

ότι τα άτομα με σπλαχνική και αρτηριακή θρόμβωση εμφάνισαν τα μεγαλύτερα ποσοστά παρουσίας υψηλότερων τιμών σε δύο κυτταρικές σειρές (9,7% και 11,1%, αντίστοιχα) (Πίνακας 16).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά της μελέτης, 10 άτομα (6 ♂ και 4 ♀) εμφάνισαν ελάχισονα PNH κλώνο στο σύνολο των ασθενών (5,53%). Από αυτά τα 3 άτομα (1,66%) εμφάνισαν μικρό κλώνο και στις τρεις μεταβλητές (MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59), ενώ τα υπόλοιπα 7 (3,87%) εμφάνισαν μικρό κλώνο σε δύο μεταβλητές αλλά σε διαφορετική κυτταρική σειρά [5 (2,77%) στα MONO FLAER και RED CD59, που αποτελούν και την πλειονότητα των δειγμάτων με ελάχισονα PNH κλώνο, και 2 (1,1%) στα NEUTRO FLAER και RED CD59].



	<b>1 ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ ΜΕ ΤΙΜΕΣ &gt;clinical cut-off</b>		<b>2 ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΜΕ ΤΙΜΕΣ &gt;clinical cut-off )</b>		<b>3 ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ ΜΕ ΤΙΜΕΣ &gt;clinical cut-off</b>		<b>ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΛΑΣΣΟΝΟΣ ΡΝΗ ΚΛΩΝΟΥ</b>
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>PE</b> (N=65)	31 MONO=12 (18,5%) NEUTRO=5 (7,7%) CD59=14 (21,5%)	<b>47,7</b>	1 MONO/CD59	<b>1,5</b>	0	<b>0,0</b>	<b>1,50</b>
<b>SVT</b> (N=31)	11 MONO=7 (22,58 %) NEUTRO=1 (3,22%) CD59=3 (9,68%)	<b>35,48</b>	2 MONO/CD59	<b>6,45</b>	1	<b>3,23</b>	<b>9,70</b>
<b>Other VT</b> (N=49)	25 MONO=7 (14,3%) NEUTRO=3 (6,1%) CD59=15 (30,6%)	<b>51,0</b>	1 MONO/CD59	<b>2,04</b>	1	<b>2,04</b>	<b>4,08</b>
<b>AT</b> (N=36)	21 MONO=9 (25%) NEUTRO=4 (11,1%) CD59=8 (22,2%)	<b>58,3</b>	3 MONO/CD59=1 (2,78%) NEUTRO/CD59=2 (5,56)	<b>8,34</b>	1	<b>2,78</b>	<b>11,10</b>
<b>Σύνολο ασθενών</b> (N=181)	88 MONO=35 (19,34%) NEUTRO=13 (7,18%) CD59=40 (22,1%)	<b>48,62</b>	7 MONO/CD59=5 (2,77%) NEUTRO/CD59=2 (1,1%)	<b>3,87</b>	3	<b>1,66</b>	<b>5,53</b>

**Πίνακας 16.** Κατανομή της παρουσίας των μικρών κλώνων στις εξετασθείσες μεταβλητές ανά υποπληθυσμό και για το σύνολο των ασθενών.

Στο σύνολο των ασθενών, σε μία μεταβλητή υψηλότερες των *cut-off* τιμές εμφανίστηκαν σε 88 άτομα (48,62%).

Όσον αφορά τα δείγματα με υψηλές τιμές σε παραπάνω από μία μεταβλητές ανά υποομάδα, τα αποτελέσματα έχουν ως εξής:

**Για τον πληθυσμό PE (Πνευμονική εμβολή, N=65):** μόνο 1 ασθενής (1,5%) εμφάνισε ελάσσονα κλώνο και στις δύο κυτταρικές σειρές στα WBCs/MONO και RBCs/CD59. Πρόκειται για άρρενα ασθενή 41 ετών (α΄ επεισόδιο στα 32 έτη), υπό μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή με ιστορικό πνευμονικής εμβολής, DVT κάτω άκρου (2010), έμφραγματος μυοκαρδίου το 2011, ΑΕΕ το 2014, υπέρταση και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό.

Κανένας από τον πληθυσμό αυτό δεν εμφάνισε υψηλές τιμές και στις τρεις μεταβλητές, ενώ σε 1 μεταβλητή εμφανίστηκαν υψηλότερες των *cut-off* τιμές σε 31 άτομα (47,7% / 17 στην λευκή σειρά και 14 στην ερυθρά).

**Για τον πληθυσμό SVT (Σπλαγχνική θρόμβωση, N=31):** 3 ασθενείς (9,7%), εμφάνισαν κλώνο σε παραπάνω από μία μεταβλητές, εκ των οποίων οι 2 (6,45%) στα WBCs/MONO και RBCs/CD59 και 1 (3,23%) και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59.

Πιο συγκεκριμένα, σε δύο μεταβλητές WBCs/MONO και RBCs/CD59 εμφάνισαν κλώνο οι ασθενείς:

**D258:** ♂ 50 ετών (α΄ επεισόδιο στα 44 έτη) με θρόμβωση πυλαίας, υπό αντιπηκτική αγωγή, αρνητικό ιστορικό υποτροπών και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό, και

**D296:** ♂ 49 ετών (α΄ επεισόδιο στα 44 έτη) με θρόμβωση μεσεντερίου, εντερεκτομή, υπό αντιπηκτική αγωγή, αρνητικό ιστορικό υποτροπών, αρνητικό έλεγχο για τη μετάλλαξη JAK2V617F και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό ως προς την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων (πατέρας του ασθενούς: Ca πνεύμονα).

Και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59 εμφάνισε ελάσσονα κλώνο ο ασθενής **D297:** ♂ 55 ετών (α΄ επεισόδιο στα 45 έτη) με έμφρακτο σπληνικής αρτηρίας και τμήματος της ηπατικής φλέβας, ΑΕΕ, υπό αντιπηκτική αγωγή, αρνητικό οικογενειακό ιστορικό και αρνητικό έλεγχο για τη μετάλλαξη JAK2V617F.

Σε 1 μεταβλητή υψηλότερες των *cut-off* τιμές εμφανίστηκαν σε 11 άτομα (35,48% / 8 στην λευκή σειρά και 3 στην ερυθρά).

**Για τον πληθυσμό Other VT (Φλεβική θρόμβωση N=49):** 2 ασθενείς (4,08%), εμφάνισαν κλώνο σε παραπάνω από μία μεταβλητές, εκ των οποίων, 1 (2,04%) στα WBCs/MONO και RBCs/CD59 και 1 (2,04%) και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59.

Πιο συγκεκριμένα:

Σε δύο μεταβλητές WBCs/MONO και RBCs/CD59 εμφάνισε κλώνο ο ασθενής D259: ♂ 50 ετών (α' επεισόδιο στα 38 έτη), με επαναλαμβανόμενα επεισόδια εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης κάτω άκρων, εμφάνιση κιρσών αριστερού κάτω άκρου, υπό μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή, και θετικό οικογενειακό ιστορικό (από τον πατέρα).

Και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59 εμφάνισε ελάχισονα κλώνο η ασθενής D344: ♀ 40 ετών (α' επεισόδιο στα 18 έτη), με 2 επεισόδια εν τω βάθει φλεβικής θρόμβωσης δεξιού κάτω άκρου, εμφάνιση μεταφλεβιτιδικού συνδρόμου ΔΕ ιγνυακής φλέβας (10 έτη μετά την εμφάνιση του τελευταίου θρομβωτικού επεισοδίου), υπό μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή πλέον (είχε διακοπεί πριν το 2<sup>ο</sup> επεισόδιο) και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό.

Σε 1 μεταβλητή υψηλότερες των *cut-off* τιμές εμφανίστηκαν σε 25 άτομα (51,0% / 10 στην λευκή σειρά και 15 στην ερυθρά).

**Για τον πληθυσμό AT (Αρτηριακή θρόμβωση, N=36):** 4 ασθενείς (1,11%), εμφάνισαν ελάχισονα PNH κλώνο, εκ των οποίων ο ένας (2,78%) στα WBCs/MONO και RBCs/CD59, 2 ασθενείς (5,56%) στα WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59 και 1 άτομο (2,78%) και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59.

Πιο συγκεκριμένα:

Στα WBCs/MONO και RBCs/CD59, εμφάνισε κλώνο η ασθενής D262: ♀ 55 ετών (α' επεισόδιο στα 46 έτη), με 2 επεισόδια αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου (ΑΕΕ), υπό αντιπηκτική αγωγή και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό.

Στα WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59 εμφάνισαν κλώνο οι ασθενείς:

D252: ♀ 46 ετών (α' επεισόδιο στα 43 έτη), με στεφανιαία νόσο, υπό αντιπηκτική αγωγή και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό,

και

D253: ♂ 43 ετών (α' επεισόδιο στα 40 έτη), με ΑΕΕ, θρόμβωση ΔΕ κόλπου, υπό αντιπηκτική αγωγή και αρνητικό οικογενειακό ιστορικό.

Και στις τρεις μεταβλητές WBCs/MONO & WBCs/NEUTRO και RBCs/CD59 εμφάνισε κλώνο η ασθενής D466: ♀ 45 ετών (α΄ επεισόδιο στα 36 έτη), με έμφραγμα μυοκαρδίου, υπό αντιαιμοπεταλιακή αγωγή και οικογενειακό ιστορικό αρτηριακής υπέρτασης για την μητέρα.

Σε 1 μεταβλητή υψηλότερες των *cut-off* τιμές εμφανίστηκαν σε 21 άτομα (58,3%/ 13 στην λευκή σειρά και 8 στην ερυθρά).

#### 4.2 Συγκρίσεις των τιμών των μεταβλητών βάσει των *clinical cut-off*

Οι συγκρίσεις μεταξύ των πληθυσμών για την εμπλοκή των ‘ελάσσονων’ κλώνων, έγιναν βάσει των τιμών των *clinical cut-off*, που υπολογίστηκαν για τις εξετασθείσες παραμέτρους από τον πληθυσμό των 100 υγιών δοτών, οι οποίοι συμμετείχαν στη μελέτη (ο διαχωρισμός των Ομάδων/πληθυσμών παραμένει ο ίδιος).

##### 4.2.1 Σύγκριση των τιμών των MONO FLAER (μονοκύτταρα) βάσει των *clinical cut-off*, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με MONO FLAER  $\geq 0,099\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό (Πίνακας 17).

		MONO FLAER				P Pearson's x2 test
		<0,099		$\geq 0,099$		
		N	%	N	%	
<b>Ομάδα-1</b>	<i>Ασθενείς (σύνολο)</i>	136	75,1	45	24,9	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Υγιείς δότες</i>	95	95,0	5	5,0	
<b>Ομάδα-2</b>	<i>PE</i>	52	80,0	13	20,0	<b>&lt;0,001</b>
	<i>SVT</i>	19	61,3	12	<b>38,7</b>	
	<i>Other VT</i>	40	81,6	9	18,4	
	<i>AT</i>	25	69,4	11	<b>30,6</b>	
	<i>Υγιείς δότες</i>	95	95,0	5	5,0	

**Πίνακας 17.** Ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με MONO FLAER  $\geq 0,099\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.

Τα ποσοστά των εξετασθέντων με τιμές μεγαλύτερες των *clinical cut-off* στα μονοκύτταρα (MONO FLAER  $\geq 0,099\%$ ), διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 2 πληθυσμών της Ομάδας-1, με τα υψηλότερα να σημειώνονται στην ομάδα των ασθενών ( $p < 0,001$ ). Μεταξύ των 5 πληθυσμών της Ομάδας-2, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,001$ ), με τα υψηλότερα ποσοστά να σημειώνονται στους ασθενείς των υποομάδων SVT και AT (38,7% και 30,6%, αντίστοιχα).

#### 4.2.2 Σύγκριση των τιμών των NEUTRO FLAER (ουδετερόφιλα) βάσει των *clinical cut-off*, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με NEUTRO FLAER  $\geq 0,073\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό (Πίνακας 18).

		NEUTRO FLAER				P Pearson's x2 test
		<0,073		$\geq 0,073$		
		N	%	N	%	
<b>Ομάδα-1</b>	Ασθενείς (σύνολο)	156	86,2	25	13,8	<b>0,01</b>
	Υγιείς δότες	96	96,0	4	4,0	
<b>Ομάδα-2</b>	PE	57	87,7	8	12,3	<b>0,026<sup>+</sup></b>
	SVT	27	87,1	4	12,9	
	Other VT	44	89,8	5	10,2	
	AT	28	77,8	8	<b>22,2</b>	
	Υγιείς δότες	96	96,0	4	4,0	

<sup>+</sup>Fisher's exact test

**Πίνακας 18.** Ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με NEUTRO FLAER  $\geq 0,073\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.

Τα ποσοστά των εξετασθέντων με τιμές μεγαλύτερες των *clinical cut-off* στα ουδετερόφιλα (NEUTRO FLAER  $\geq 0,073\%$ ), διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 2 πληθυσμών της Ομάδας-1, με τα υψηλότερα να σημειώνονται στην ομάδα των ασθενών

( $p=0,01$ ). Μεταξύ των 5 πληθυσμών της Ομάδας-2, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p=0,026$ ), με τα υψηλότερα ποσοστά να σημειώνονται στους ασθενείς της υποομάδας *AT* (22,2%).

#### 4.2.3 Σύγκριση των τιμών έκφρασης του CD59 (ερυθροκύτταρα) βάσει των *clinical cut-off*, για κάθε Ομάδα/πληθυσμό

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα ποσοστά των συμμετεχόντων που εμφανίστηκαν με RED CD59  $\geq 0,095\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό (Πίνακας 19).

Τα ποσοστά των εξετασθέντων με τιμές μεγαλύτερες των *clinical cut-off* στα ερυθροκύτταρα μέσω της έκφρασης του CD59 (RED CD59  $\geq 0,095\%$ ), διέφεραν σημαντικά μεταξύ των 2 πληθυσμών της Ομάδας-1, με τα υψηλότερα να σημειώνονται στην ομάδα των ασθενών ( $p<0,001$ ). Μεταξύ των 5 πληθυσμών της Ομάδας-2, παρατηρήθηκε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p<0,001$ ), με τα υψηλότερα ποσοστά να σημειώνονται στους ασθενείς των υποομάδων *Other VT* και *AT* (36,7% και 33,3%, αντίστοιχα).

		RED CD59				P Pearson's x2 test
		<0,095		$\geq 0,095$		
		N	%	N	%	
<b>Ομάδα-1</b>	<i>Ασθενείς (σύνολο)</i>	129	71,3	52	28,7	<b>&lt;0,001</b>
	<i>Υγιείς δότες</i>	99	99,0	1	1,0	
<b>Ομάδα-2</b>	<i>PE</i>	50	76,9	15	23,1	<b>&lt;0,001</b>
	<i>SVT</i>	24	77,4	7	22,6	
	<i>Other VT</i>	31	63,3	18	<b>36,7</b>	
	<i>AT</i>	24	66,7	12	<b>33,3</b>	
	<i>Υγιείς δότες</i>	99	99,0	1	1,0	

**Πίνακας 19.** Ποσοστά των συμμετεχόντων με RED CD59  $\geq 0,095\%$ , ξεχωριστά για κάθε Ομάδα/πληθυσμό.

### 4.3 Συσχετίσεις μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, ανά πληθυσμό

Οι πληθυσμοί που εξετάζονται εδώ ακολουθούν τον διαχωρισμό της Ομάδας-1 (2 πληθυσμοί), ήτοι:

- Ασθενείς (με θρομβωτικό επεισόδιο και αρνητικό έλεγχο θρομβοφιλίας) στο σύνολό τους
- Υγιείς δότες (*healthy controls*)

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι συντελεστές συσχέτισης του *Spearman* μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59 για τους ασθενείς (Πίνακας 20).

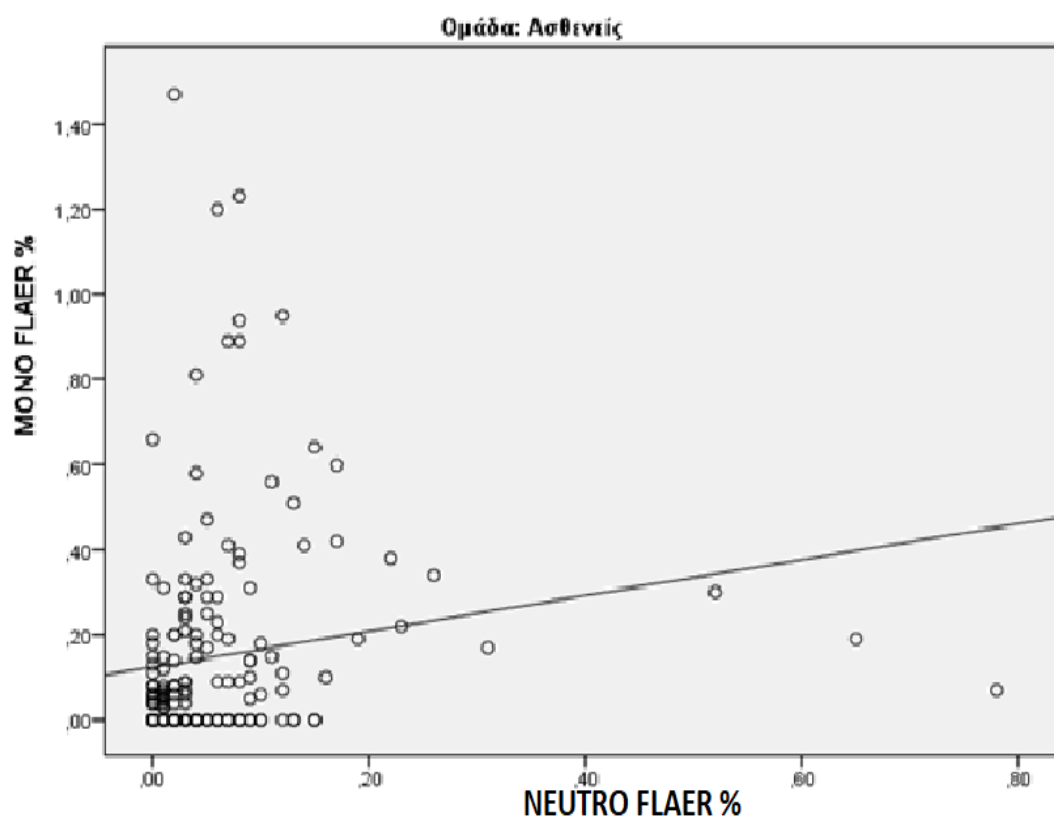
		NEUTRO FLAER	RED CD59
MONO FLAER	r	<b>0,34</b>	-0,02
	P	<0,001	0,755
NEUTRO FLAER	r	1,00	0,06
	P		0,387

**Πίνακας 20.** Συντελεστές συσχέτισης του *Spearman* μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59 για τους ασθενείς.

Υπήρξε συσχέτιση (μετρίου βαθμού  $r=0,34$ ) μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER. Φαίνεται ότι η εμφάνιση των κυττάρων με φαινότυπο PNH στα MONO FLAER συσχετίζεται (σε μικρό βαθμό) με εκείνη στα NEUTRO FLAER, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών της λευκής σειράς έναντι της ερυθράς (MONO FLAER vs RED CD59 και NEUTRO FLAER vs RED CD59).

Σημειώνεται ότι, η συσχέτιση θεωρείται χαμηλή όταν ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ) κυμαίνεται από 0,1 έως 0,3· μέτρια όταν ο συντελεστής συσχέτισης κυμαίνεται από 0,31 έως 0,5 και υψηλή όταν ο συντελεστής συσχέτισης είναι μεγαλύτερος από 0,5.

Η συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER, για τον πληθυσμό των ασθενών, δίνεται στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 2).



**Γράφημα 2.** Συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER για τον πληθυσμό των ασθενών ( $r=0,34$ ).

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι συντελεστές συσχέτισης του *Spearman* μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, για τον πληθυσμό των υγιών δοτών (Πίνακας 21).

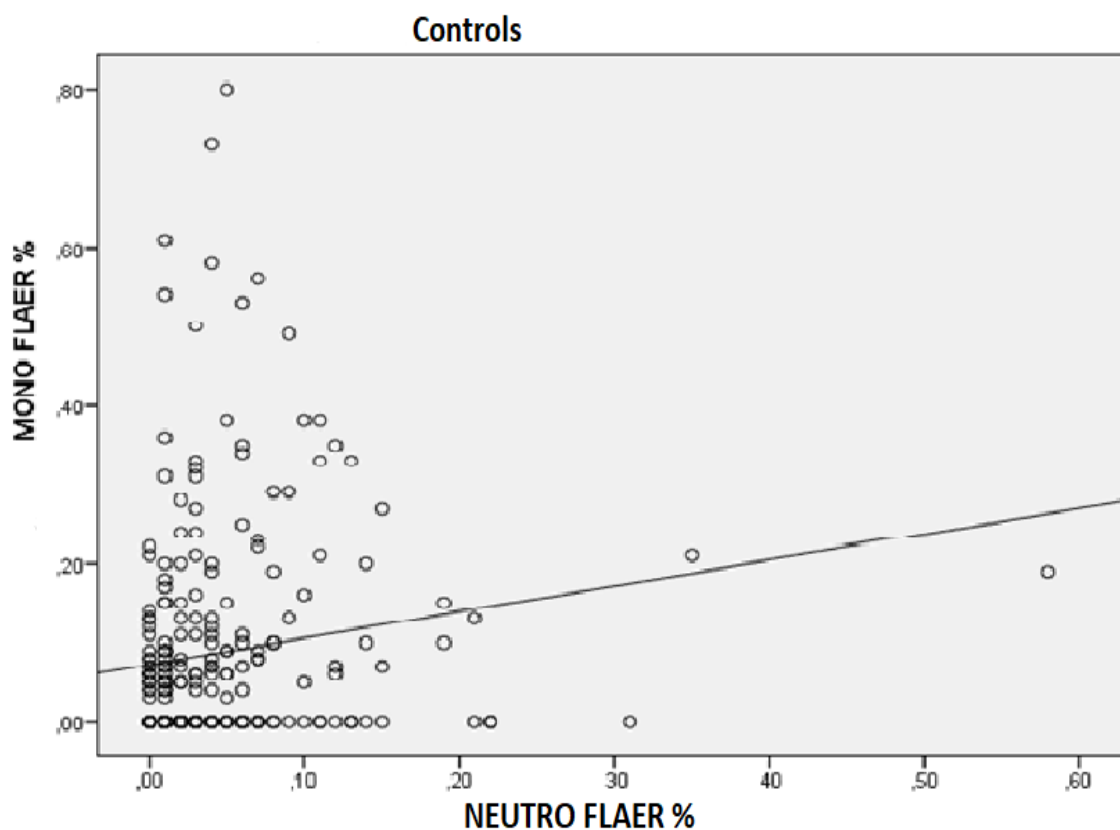
		NEUTRO FLAER	RED CD59
<b>MONO FLAER</b>	r	0,22	0,23
	P	<0,001	<0,001
<b>NEUTRO FLAER</b>	r	1,00	-0,02
	P		0,776

**Πίνακας 21.** Συντελεστές συσχέτισης του *Spearman* μεταξύ των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, για τους υγιείς δότες.



Βρέθηκε χαμηλή ( $r=0,22$ ) συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Παρόμοια αντιστοιχία (χαμηλή συσχέτιση/ $r=0,23$ ) εμφανίζεται και μεταξύ των MONO FLAER και RED CD59, ενώ δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των NEUTRO FLAER και RED CD59 ( $r=0,02$ ).

Η συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER, για τον πληθυσμό των υγιών δοτών, δίνεται στο ακόλουθο γράφημα (Γράφημα 3).



*Γράφημα 3. Συσχέτιση μεταξύ MONO FLAER και NEUTRO FLAER για τους υγιείς δότες ( $r=0,22$ ).*

Καμία από τις συγκρίσεις που έγιναν δεν έδειξε υψηλή συσχέτιση με  $r>0,5$ .

#### 4.4 Συσχέτιση της εμφάνισης υποτροπής με τα δημογραφικά και λοιπά στοιχεία των ασθενών

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με δημογραφικά τους στοιχεία, με στοιχεία από το ιστορικό τους και στοιχεία του είδους του θρομβωτικού επεισοδίου που εμφάνισαν (Πίνακας 22).

		Υποτροπή				P Pearson's $\chi^2$ test
		Όχι		Ναι		
		N	%	N	%	
<b>Είδος θρομβωτικού επεισοδίου</b>	<i>PE</i>	20	30,8	45	69,2	<b>&lt;0,001</b>
	<i>SVT</i>	23	74,2	8	25,8	
	<i>Other VT</i>	26	53,1	23	46,9	
	<i>AT</i>	21	58,3	15	41,7	
<b>Φύλο</b>	♂	50	49,5	51	50,5	0,947
	♀	40	50,0	40	50,0	
<b>Ηλικία κατά την εξέταση, μέση τιμή (SD)</b>		42,5 (11,0)		45,4 (9,6)		0,061 <sup>++</sup>
<b>Ηλικία κατά το 1ο συμβάν, μέση τιμή (SD)</b>		37,6 (10,2)		36,4 (9,7)		0,412 <sup>++</sup>
<b>Οικογενειακό ιστορικό</b>	Όχι	68	55,3	55	44,7	<b>0,027</b>
	Ναι	21	37,5	35	62,5	

<sup>++</sup>Student's t-test

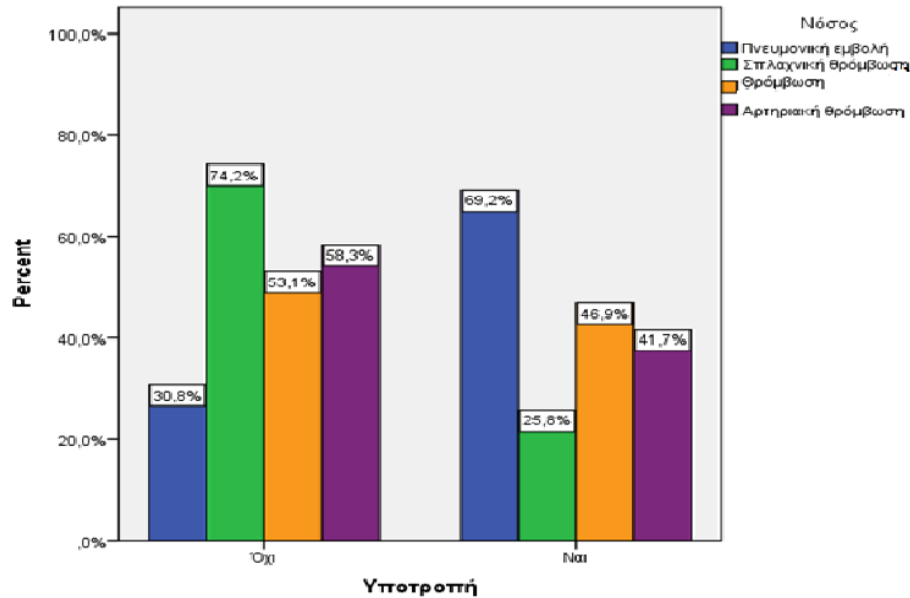
*Πίνακας 22. Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με τα δημογραφικά τους στοιχεία, το οικογενειακό ιστορικό τους και το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου.*

Τα ποσοστά υποτροπής διέφεραν σημαντικά ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου των ασθενών ( $p < 0,001$ ) και το θετικό ή μη οικογενειακό ιστορικό.

Συγκεκριμένα, το ποσοστό υποτροπής ήταν υψηλότερο στους ασθενείς με πνευμονική εμβολή (69,2%) και χαμηλότερο στους ασθενείς με σπλαχνική θρόμβωση (25,8%).

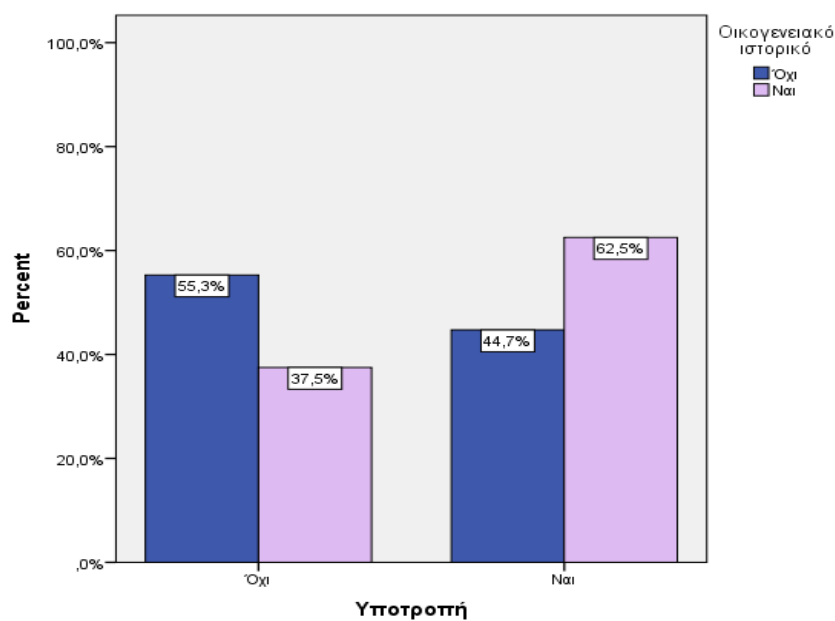
Το ποσοστό υποτροπής ήταν σημαντικά υψηλότερο στους ασθενείς με θετικό οικογενειακό ιστορικό ( $p = 0,027$ ).

Τα ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με το είδος του θρομβωτικού επεισοδίου δίνονται στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 4).



**Γράφημα 4.** Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου.

Τα ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού δίνονται στο γράφημα που ακολουθεί (Γράφημα 5).



**Γράφημα 5.** Ποσοστά υποτροπής των ασθενών ανάλογα με την ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι τιμές των μεταβλητών που εξετάστηκαν (MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59) για τους ασθενείς, σε σχέση με την εμφάνιση υποτροπής ή όχι (Πίνακας 23).

	Υποτροπή				P- Mann- Whitney test
	Όχι		Ναι		
	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	Μέση τιμή (SD)	Διάμεσος (ενδ. εύρος)	
<b>MONO FLAER</b>	0,13 (0,23)	0,02 (0 – 0,19)	0,17 (0,26)	0,08 (0 – 0,2)	0,074
<b>NEUTRO FLAER</b>	0,05 (0,1)	0,03 (0,01 – 0,06)	0,06 (0,09)	0,04 (0,01 – 0,08)	0,228
<b>RED CD59</b>	0,2 (0,23)	0,1 (0,03 – 0,28)	0,16 (0,18)	0,09 (0,03 – 0,24)	0,934

*Πίνακας 23. Τιμές των μεταβλητών που εξετάστηκαν (MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59) για τους ασθενείς, σε σχέση με την εμφάνιση υποτροπής ή όχι.*

Δεν εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις τιμές των MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59, τόσο στους ασθενείς με επεισόδια υποτροπής όσο και σε εκείνους χωρίς επεισόδια υποτροπής.

Δεν φαίνεται να συσχετίζονται οι τιμές των παραμέτρων που μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής με την εμφάνιση υποτροπής.

#### 4.5 Αποτελέσματα πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (logistic regression analysis)

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται τα αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την ύπαρξη υποτροπής και ανεξάρτητες τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, στοιχεία που αφορούν στη νόσο και στο ιστορικό τους, τις παραμέτρους που ελέγχθησαν με κυτταρομετρία ροής (MONO FLAER, NEUTRO FLAER και RED CD59) καθώς και την παρουσία ελάσσονων PNH κλώνων (Πίνακας 24).

		OR (95% CI)+	P
Τύπος αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου	<i>SVT (reference)</i>		
	<i>PE</i>	2,24 (0,56 – 8,98)	0,255
	<i>Other VT</i>	7,27 (1,98 – 26,74)	<b>0,003</b>
	<i>AT</i>	3,11 (0,75 – 12,88)	0,117
Φύλο	♂ (reference)		
	♀	0,94 (0,41 – 2,14)	0,876
Ηλικία κατά το 1 <sup>ο</sup> επεισόδιο		1 (0,96 – 1,04)	0,989
Οικογενειακό ιστορικό	Όχι (reference)		
	Ναι	2,49 (1,02 – 6,05)	<b>0,044</b>
Παρουσία ελάσσονων PNH κλώνων	Όχι (reference)		
	Ναι	1,38 (0,5 – 3,81)	0,531
Παράμετροι που ελεγχθηκαν	MONO FLAER	1,12 (0,05 – 25,41)	0,941
	NEUTRO FLAER	4,52 (0,04 – 506,71)	0,414
	RED CD59	0,72 (0,07 – 7,08)	0,778

+Odds Ratio (95% Confidence Interval)

**Πίνακας 24.** Αποτελέσματα της πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της πολυπαραγοντικής λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (με εξαρτημένη μεταβλητή την εμφάνιση ή όχι υποτροπής) στην ομάδα των ασθενών έδειξαν ότι οι περιπτώσεις με φλεβική θρόμβωση (Other VT) είχαν 7,27 φορές περισσότερες πιθανότητες να εμφανίσουν υποτροπή σε σύγκριση με τις περιπτώσεις των σπλαχνικών θρομβώσεων (*reference*).

Το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου (Other VT/ $p=0,003$ ) και η ύπαρξη θετικού οικογενειακού ιστορικού ( $p=0,044$ ) βρέθηκαν να συσχετίζονται με την εμφάνιση υποτροπής.

Οι μεταβλητές που ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής καθώς και η παρουσία των ελάσσονων PNH κλώνων δεν φάνηκε να αποτελούν προγνωστικούς παράγοντες για την εμφάνιση υποτροπής.

## Κεφάλαιο 5: Συζήτηση

Στο Τμήμα Αιμόστασης του Λαϊκού Νοσοκομείου, μελετούνται ασθενείς με ιστορικό θρομβοεμβολικών επεισοδίων (φλεβικών και αρτηριακών), ενώ παράλληλα λειτουργεί και Ιατρείο παρακολούθησης και ρύθμισης αντιπηκτικής αγωγής ασθενών υπό μακροχρόνια αντιπηκτική αγωγή. Κάθε χρόνο πραγματοποιούνται ~500 έλεγχοι διερεύνησης συγγενούς (κυρίως) θρομβοφιλίας σε ασθενείς, συγγενείς αυτών, όπως επίσης και σε γυναίκες με διαταραχές κύησης. Σε όλους τους ασθενείς που έχουν ελεγχθεί ή που πρόκειται να υποβληθούν στον έλεγχο λαμβάνεται λεπτομερές ιατρικό ιστορικό και τα απαραίτητα στοιχεία επικοινωνίας.

Στον πληθυσμό που συμμετείχε στην μελέτη, δηλαδή άτομα που επιλέχθηκαν βάσει συγκεκριμένων κριτηρίων [πρώτο θρομβοεμβολικό επεισόδιο σε νεαρή ηλικία (<45 έτη), θετικό οικογενειακό ιστορικό θρομβοεμβολικών επεισοδίων (κυρίως πρώτου βαθμού συγγενείς με θρόμβωση σε νεαρή ηλικία), φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθη περιοχή (π.χ. εγκεφαλική, ηπατική, μεσεντέριος φλέβα, νεφρική φλεβική θρόμβωση)] το ποσοστό των ανεξήγητων επεισοδίων κυμαίνεται από 30-50%, μεγαλώνει δε περισσότερο εάν τα ανωτέρω κριτήρια επιλογής δεν ακολουθούνται.

Η PNH αποτελεί επίκτητη κλωνική διαταραχή των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, βασικά χαρακτηριστικά της οποίας αποτελούν η ενδαγγειακή αιμόλυση (συχνά συσχετιζόμενη με πανκυτταροπενία), η αιμοσφαιρινουρία, η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων (σε ασυνήθεις κυρίως θέσεις), επεισόδια λοιμώξεων κ.ά. Η προθρομβωτική κατάσταση στην PNH είναι εξαιρετικά περίπλοκη, δεδομένης της εμπλοκής πολλών και διαφορετικών παραγόντων (ενεργοποίηση αιμοπεταλίων και ενδοθηλιακών κυττάρων, ενδαγγειακή λύση κ.λπ.)· οι ασθενείς παρουσιάζουν ενεργοποιημένο σύστημα πήξης ακόμη και απουσία εμφανούς θρόμβωσης. Η νόσος οφείλεται σε παρουσία μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A και επηρεάζει όλες τις κυτταρικές σειρές, περιλαμβανομένης και αυτής των μεγακαρυοκυττάρων-αιμοπεταλίων. Η παρουσία των PNH κλώνων υποδηλώνει έναν ισχυρό παράγοντα κινδύνου για θρόμβωση (*Takeda et al. 1993; Bessler et al. 1994; Nishimura et al. 1999; Meletis et al. 2001*). Σε αρκετές μελέτες έχει καταδειχτεί ότι η πιθανότητα θρομβοεμβολικού συμβάντος σε ασθενείς με νόσο PNH συσχετίζεται με το μέγεθος του κλώνου PNH: αύξηση 10% στον PNH κλώνο αντιστοιχεί σε 1,64 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης θρομβοεμβολικού συμβάντος (*Moyo et al. 2004*).

Ωστόσο, θρόμβωση εμφανίζεται και σε κάποιους ασθενείς με μικρό μέγεθος κλώνου, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μέγεθος κλώνου δεν είναι ο μόνος παράγοντας κινδύνου για θρόμβωση, ενδέχεται ωστόσο να εμπλέκεται στην έναρξη του θρομβοεμβολικού επεισοδίου (*Moyo et al. 2004; Hall et al. 2003; Nishimura et al. 2004; Parker et al. 2005; De Latour et al. 2008; Rachidi et al. 2010; Van Bijnen et al. 2012; Schrezenmeier et al. 2014; Huang et al. 2019*).

Στην παρούσα μελέτη, η ηλικία δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των πληθυσμών που εξετάστηκαν (με την πλειοψηφία να είναι άνδρες), ενώ η μέση ηλικία ήταν περίπου στα 40 έτη και στους δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν (ασθενείς και υγείς δότες). Η μέση ηλικία των ασθενών στο πρώτο θρομβοεμβολικό επεισόδιο ήταν στα 37 έτη και ήταν παρόμοια μεταξύ των διαφόρων τύπων θρομβωτικών επεισοδίων (πνευμονική εμβολή, σπλαχνική θρόμβωση, φλεβική θρόμβωση κάτω άκρων ή σε ασυνήθη θέση -εκτός της σπλαχνικής- και αρτηριακή θρόμβωση). Όσον αφορά στις υποτροπές, περίπου οι μισοί (50,3%) από τους ασθενείς παρουσίασαν υποτροπή. Το ποσοστό των ασθενών με υποτροπή ποικίλλει ανάλογα με τον τύπο του αρχικού θρομβωτικού συμβάντος. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθενείς με πνευμονική εμβολή εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό υποτροπής (69,2%) από τους ασθενείς με σπλαχνική θρόμβωση (25,8%), ενώ υψηλό ποσοστό εμφάνισαν και οι υποομάδες Other VT /46,9% και AT /41,7%).

Η κυτταρομετρία ροής θεωρείται σήμερα η μέθοδος επιλογής για την ανίχνευση των PNH κλώνων, καθότι φαίνεται να έχει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα και δίνει την δυνατότητα ανάλυσης σε διαφορετικές σειρές κυττάρων (ερυθροκύτταρα, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια)· είναι δε δυνατή η ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ακόμη και μικρών πληθυσμών PNH κυττάρων, καθώς και η διάκριση των PNH υποπληθυσμών κυρίως στα ερυθροκύτταρα (τύποι III και II) (*Nishimura et al. 2004; Parker et al. 2005; Borowitz et al. 2010; Camargos et al. 2014; Illingworth et al. 2018*). Ωστόσο, υπάρχει ακόμη μεγάλη συζήτηση σχετικά με την επιλογή των μονοκλωνικών αντισωμάτων, τις στρατηγικές ανάλυσης και οριοθέτησης και τον ορισμό των κριτηρίων θετικότητας των PNH κλώνων. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της ICCS (*Borowitz et al. 2010; Illingworth et al. 2018; Sutherland et al. 2018*), προτείνεται η ανίχνευση της έλλειψης έκφρασης τουλάχιστον δύο GPI πρωτεϊνών και έλεγχος σε δύο ξεχωριστές κυτταρικές σειρές, προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία PNH κλώνου και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα



ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, προτάσεις που αναφέρονται και από άλλους ερευνητές (*Rachidi et al. 2010; Devos et al. 2018*).

Έως τώρα, για τα άτομα χωρίς θρομβοφιλία (συγγενή ή επίκτητη) που έχουν ήδη εμφανίσει ανεξήγητο θρομβοεμβολικό επεισόδιο - κυρίως σε ασυνήθεις θέσεις - σε νεαρή σχετικά ηλικία, δεν έχουν γίνει ιδιαίτερες μελέτες αξιολόγησης της εμπλοκής των μικρού μεγέθους PNH κλώνων, ως παράγοντα κινδύνου εκδήλωσης θρομβοεμβολικού επεισοδίου ή και υποτροπών.

Το 2014 δημοσιεύτηκε μία μελέτη από τους *Agno et al.*, που αφορούσε σε έλεγχο παρουσίας PNH κλώνων σε 202 ασθενείς (μέση ηλικία=54,6 έτη) με επιβεβαιωμένη σπλαχνική θρόμβωση (συμπεριλαμβάνονταν και ασθενείς με γνωστούς παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση θρομβωτικού επεισοδίου). Ο έλεγχος παρουσίας μικρών κλώνων έγινε μόνο στα ουδετερόφιλα, βάσει των *clinical cut-off* που αναφέρονται στην βιβλιογραφία. Δεν εμφανίστηκε κανένας από τους ασθενείς με κλώνο >1%, ενώ 9 ασθενείς εμφάνισαν ελάχισονα PNH κλώνο (έλεγχος μόνο στα ουδετερόφιλα) με μέγεθος 0,01-0,16%. Η επαναξιολόγηση έγινε σε 8 ασθενείς (1 απεβίωσε πριν τον 2ο έλεγχο από κίρρωση ήπατος), εκ των οποίων μόνο δύο εμφάνισαν πολύ μικρούς κλώνους, ο πρώτος με θρόμβωση πυλαίας φλεβας απουσία λοιπών παραγόντων κινδύνου (0,014%) και ο δεύτερος με θρόμβωση μεσεντερίου και φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (0,16%). Οι συγγραφείς αναφέρουν ότι πολύ μικροί PNH κλώνοι ενδέχεται να εμφανιστούν σε ασθενείς με SVT, χωρίς κλινική σημασία για εμφάνιση νόσου, ενώ πιθανολογούν ότι τα αποτελέσματα μπορεί και να ήταν διαφορετικά εάν ο αριθμός των ασθενών με σ. Budd-Chiari ήταν μεγαλύτερος (άτομα με σ. Budd-Chiari στην μελέτη: N=10).

Το 2015 δημοσιεύτηκε επίσης μια μελέτη από τους *Lazo-Langer et al.*, η οποία αφορούσε στον έλεγχο της παρουσίας ελάχιστων PNH κλώνων σε άτομα με επιβεβαιωμένα θρομβοεμβολικά επεισόδια (εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση και πνευμονική εμβολή). Στην μελέτη συμμετείχε ένας αρκετά μεγάλος αριθμός ασθενών (N=388, μέση ηλικία=57 έτη) με τουλάχιστον ένα επεισόδιο αποδεδειγμένης DVT ή πνευμονικής εμβολής, ενώ συμπεριλαμβάνονταν και ασθενείς με γνωστούς παράγοντες κινδύνου για εκδήλωση θρομβωτικού επεισοδίου, όπως θρομβοφιλία, από του στόματος λήψη αντισυλληπτικών και θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, κ.ά., ενώ συμμετείχαν και 30 υγιείς δότες για standardization (*Lazo-Langer et al. 2015*). Στην εν λόγω μελέτη, αξιολογήθηκε η παρουσία των μικρών κλώνων PNH σε ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα, βάσει των καθορισμένων από τη βιβλιογραφία

τιμών των *clinical cut-off*. Στον έναν από τους δύο ασθενείς που ανιχνεύθηκε ελάσσων PNH κλώνος, ήταν μόνο στα ουδετερόφιλα (0,02%) με μη ανιχνεύσιμο κλώνο στα ερυθροκύτταρα, ενώ ο δεύτερος εμφάνισε ενδείξεις κλώνου στα ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα, αλλά με τιμές κάτω από το όριο ανίχνευσης (<0,01%).

Οι διαφορές της παρούσας μελέτης από τη προαναφερθείσα έγκειται στα εξής:

- στην παρούσα μελέτη ο έλεγχος αφορά μόνο ασθενείς με αρνητικό έλεγχο συγγενούς ή επίκτητης θρομβοφιλίας, οι οποίοι εκδήλωσαν ανεξήγητο/α θρομβοεμβολικό/α επεισόδιο/α,
- η μέση ηλικία ήταν κατά τι μικρότερη (περίπου 40 έτη), ενώ λήφθηκε υπ' όψιν και η μέση ηλικία εκδήλωσης του πρώτου θρομβοεμβολικού επεισοδίου, που ήταν τα 37 έτη,
- οι ασθενείς διαχωρίστηκαν σε τέσσερις υποομάδες, ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου (PE, SVT, Other VT και AT),
- ο έλεγχος διενεργήθηκε στα λευκοκύτταρα (και μονοκύτταρα και ουδετερόφιλα) και στα ερυθροκύτταρα (ανάλυση έκφρασης CD59)
- τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με βάση τις τιμές των *clinical cut-off*, που υπολογίστηκαν από τον έλεγχο των 100 υγιών δοτών που συμμετείχαν στην μελέτη.

Στην παρούσα μελέτη (όπως και στις δύο προαναφερθείσες), ο έλεγχος των δειγμάτων έγινε με κυτταρομετρία ροής υψηλής ευαισθησίας, ενώ η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε στηρίχτηκε σε βιβλιογραφικά δεδομένα και στις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες, τόσο για την επιλογή των αντιδραστηρίων και τη στρατηγική ανάλυσης και οριοθέτησης, όσο και για τον καθορισμό των κριτηρίων θετικότητας για τους PNH κλώνους.

Το ερώτημα που ανέκυψε ήταν, ότι εφόσον διαπιστωθεί παρουσία ελάσσωνων κλώνων στον εν λόγω πληθυσμό, αν μπορεί αυτή να θεωρηθεί κριτικής σημασίας για την εκδήλωση θρομβωτικού επεισοδίου, και αν ναι, σε ποια από τις παραπάνω υποομάδες εμφανίζεται συχνότερα και από ποιο μέγεθος και πάνω θα πρέπει να αξιολογείται ο κλώνος αυτός ως παράγοντας κινδύνου.

Ο έλεγχος των λευκοκυττάρων (μονοκύτταρα/ουδετερόφιλα) έγινε με τη χρήση του αντιδραστηρίου FLAER, το οποίο έχει μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία, καθόσον έχει την ιδιότητα να συνδέεται με την ίδια την GPI άγκυρα, οπότε

προσδένεται στα φυσιολογικά κύτταρα και όχι στα PNH κύτταρα. Με τη χρήση του FLAER δίδεται η δυνατότητα ανίχνευσης πολύ μικρών PNH κλώνων στα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα.

Για την αντιμετώπιση των ζητημάτων ακρίβειας και αξιοπιστίας, η *International Clinical Cytometry Society (ICCS)* (Borowitz et al. 2010; Sutherland et al. 2012; Illingworth et al. 2018; Sutherland et al. 2018) δημοσίευσε οδηγίες για τη διάγνωση και παρακολούθηση της PNH και των συναφών διαταραχών με κυτταρομετρία ροής. Προκειμένου να βελτιωθεί η ανίχνευση της PNH στα WBC, οι οδηγίες της ICCS συνέστησαν τη χρήση τουλάχιστον ενός αντισώματος μαζί με δύο GPI εξαρτώμενους δείκτες, ένας εκ των οποίων θα πρέπει να είναι το FLAER. Στην παρούσα μελέτη, η παρουσία PNH κλώνων στα ουδετερόφιλα και στα μονοκύτταρα (μετά την οριοθέτησή τους με το CD45), ταυτοποιήθηκε με βάση την πλάγια σκέδαση (*side scatter*) στο CD15 για τα ουδετερόφιλα και στο CD33 για τα μονοκύτταρα και παράλληλα την μη έκφραση ενός δείκτη λευκοκυττάρων σε συνδυασμό με το FLAER [CD24(-) για τα ουδετερόφιλα και CD14(-) για τα μονοκύτταρα]. Το αντιδραστήριο FLAER δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της παρουσίας PNH κλώνων στην ερυθροκυτταρική σειρά, καθότι τα ερυθροκύτταρα δεν έχουν τα προσδεδεμένα στην κυτταρική τους επιφάνεια πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της προ-αερολυσίνης. Επιπρόσθετα, η γλυκοφορίνη (βασικό αντιδραστήριο οριοθέτησης για τα ερυθροκύτταρα) έχει βρεθεί ότι συνδέεται ασθενώς με την προ-αερολυσίνη, παρ' ότι δεν είναι GPI εξαρτώμενη πρωτεΐνη (Sutherland et al. 2007). Ως εκ τούτου, στα ερυθροκύτταρα ο έλεγχος διενεργήθηκε με τη βοήθεια της γλυκοφορίνης-A (anti-CD235a-FITC), που χρησιμοποιείται ειδικά για την οριθέτηση των ώριμων ερυθροκυττάρων (Agarwal et al. 2015; Illingworth et al. 2018). Η στρατηγική οριοθέτησης (*gating*) για τον προσδιορισμό των GPI αρνητικών ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων και των CD59 αρνητικών ερυθροκυττάρων, βασίστηκε σε φυσιολογικά δείγματα, που αναλύθηκαν για τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών.

Αν και οι βιβλιογραφικά καθορισμένες τιμές των *clinical cut-off* για τα ερυθροκύτταρα έχουν τεθεί στο 0,01% και για τα ουδετερόφιλα στο 0,02-0,05%, οι τιμές των κλινικών *cut-off* που προσδιορίστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν έφτασαν σε τόσο χαμηλά επίπεδα για τις συγκεκριμένες μεταβλητές. Αντιθέτως όσον αφορά στα μονοκύτταρα, οι τιμές των *clinical cut-off* που προσδιορίστηκαν συμφωνούν με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, στα οποία αναφέρεται ότι λόγω του μικρού αριθμού των

συμβάντων (*events*) που μπορούν να ανακτηθούν, οι τιμές των *clinical cut-off* κυμαίνονται περίπου στο 0,1% (*Illingworth et al. 2018; Brando et al. 2019*).

Ως εκ τούτου, ως μικρού μεγέθους κλώνοι στα λευκοκύτταρα αξιολογήθηκαν οι τιμές: για τα μονοκύτταρα MONO FLAER:  $\geq 0,099\%$  και για τα ουδετερόφιλα NEUTRO FLAER:  $\geq 0,073\%$ . Η διαφορά θα μπορούσε να εξηγηθεί εξαιτίας του μεγάλου πλήθους των ουδετεροφίλων σε σχέση με τα μονοκύτταρα, όπως επίσης και εξαιτίας του γεγονότος ότι συνήθως τα μονοκύτταρα εμφανίζονται με υψηλότερου μεγέθους κλώνους (*Illingworth et al. 2018*). Για τα ερυθροκύτταρα οι τιμές αξιολογήθηκαν ως εξής: ανάλυση έκφρασης CD59, RED CD59:  $\geq 0,095\%$ . Για τις χαμηλότερες ευρεθείσες τιμές δεν ήταν δυνατόν να ξεκαθαριστεί αν προέρχονταν από κυτταρικά θραύσματα ή συνιστούσαν μη αληθή εργαστηριακή ένδειξη (*assay artifact*).

Κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν δεν εμφανίστηκε στις τρεις μετρηθείσες μεταβλητές (ουδετερόφιλα/μονοκύτταρα και ερυθροκύτταρα) (ή έστω σε κάποια από όλες) με μέγεθος κλώνου  $>1\%$  ή σαφή PNH φαινότυπο (εκτός από τους 4 ασθενείς με νόσο PNH που εξετάστηκαν μόνο ως δείγματα ελέγχου και των οποίων οι τιμές δεν συμπεριελήφθησαν στην στατιστική ανάλυση).

Οι συγκρίσεις των παραμέτρων που έγιναν, όσον αφορά στον πληθυσμό των ασθενών, διενεργήθηκαν σε δύο επίπεδα, στο πρώτο συμπεριελήφθησαν όλοι οι ασθενείς μαζί σαν μία ομάδα έναντι των φυσιολογικών (Ομάδα-1, σύνολο: 2 πληθυσμοί), ενώ ακολούθως έγινε διαχωρισμός των ασθενών ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου και επαναλήφθηκαν οι συγκρίσεις με τους υγιείς δότες (Ομάδα-2, σύνολο: 5 πληθυσμοί).

Σχετικά με την ανάλυση των λευκοκυττάρων με FLAER, στον έλεγχο των μονοκυττάρων (MONO FLAER) μεταξύ των 2 πληθυσμών της Ομάδας-1, βρέθηκε ότι οι τιμές πάνω από τα *clinical cut-off*, στους ασθενείς ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα ( $p < 0,001$ ). Όταν η σύγκριση έγινε μετά το διαχωρισμό των ασθενών ανάλογα με το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου (Ομάδα-2), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,001$ ) με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στους πληθυσμούς SVT και AT (ασθενείς με σπλαχνική και αρτηριακή θρόμβωση/ 38,7% και 30,6%, αντίστοιχα). Κάτι αντίστοιχο παρατηρήθηκε και στον έλεγχο των ουδετεροφίλων (NEUTRO FLAER) και στην Ομάδα-1 ( $p = 0,01$ ) και στην Ομάδα-2 ( $p = 0,026$ ), με το μεγαλύτερο ποσοστό εδώ να εμφανίζεται στην υποομάδα AT (ασθενείς με αρτηριακή θρόμβωση / 22,2%). Τα

βιβλιογραφικά δεδομένα αναφέρουν ότι παρατηρείται ποικιλότητα στο μέγεθος των PNH κλώνων μεταξύ μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων (*Illingworth et al. 2018; Brando et al. 2019*). Αν και το μέγεθος του κλώνου στα ουδετερόφιλα θεωρείται πιο αξιόπιστος δείκτης, η διακύμανση η οποία παρατηρείται τόσο στην παρουσία όσο και στο μέγεθος των κλώνων στον έλεγχο των δύο αυτών μεταβλητών, υπογραμμίζει την ανάγκη ελέγχου και των δύο λευκοκυτταρικών πληθυσμών. Οι *Borowitz και συν. (2010)* αναφέρουν ότι η αξιολόγηση των μονοκυττάρων παρέχει μόνο επιβεβαιωτικές πληροφορίες, ωστόσο, από τα νεώτερα βιβλιογραφικά δεδομένα προκύπτει το συμπέρασμα ότι και οι δύο μεταβλητές (ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα) συνιστάται να ελέγχονται, καθότι σε κάποιες περιπτώσεις το μέγεθος του κλώνου στα μονοκύτταρα αντικατοπτρίζεται με μεγαλύτερη ακρίβεια από ότι στα ουδετερόφιλα (*Illingworth et al. 2018; Sutherland et al. 2018; Brando et al. 2019*). Έχει παρατηρηθεί ότι ένα μεγάλο μέρος των περιπτώσεων εμφανίζεται με υψηλότερου μεγέθους PNH κλώνους στα μονοκύτταρα, χωρίς όμως να έχει ξεκαθαρίσει πλήρως η αιτιολογία (πιθανά λόγω λοιμώξεων, διαφορετικής διάρκειας ζωής, κ.ά.) (*Illingworth et al. 2018*). Στην παρούσα μελέτη, 10/181 ασθενείς εμφάνισαν ελάχισον κλώνο, με τιμές υψηλότερες των *clinical cut-off* και στα λευκοκύτταρα και στα ερυθροκύτταρα, με την πλειονότητα αυτών να εμφανίζει ελάχιστον κλώνους στα μονοκύτταρα (8/10, και όχι στα ουδετερόφιλα) και ερυθροκύτταρα, κάτι που μπορεί να αποτελεί μία εξήγηση για τη διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των παρόντων αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της μελέτης των *Lazo-Langer και συν. (2015)*, στην οποία ουσιαστικά βρέθηκε μόνο ένα περιστατικό με ελάχισον κλώνο στα ουδετερόφιλα και όχι στα ερυθροκύτταρα ((στο δεύτερο περιστατικό οι τιμές ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης· υπενθυμίζεται ότι έλεγχος στην εν λόγω μελέτη διενεργήθηκε στα ουδετερόφιλα και ερυθροκύτταρα και όχι στα μονοκύτταρα).

Όσον αφορά στον έλεγχο των ερυθροκυττάρων, δεν βρέθηκαν πληθυσμοί PNH κλώνων (type-III και type-II) σε κάποιο από τα δείγματα της μελέτης, κάτι που ήταν αναμενόμενο για τον πληθυσμό που επιλέχθηκε. Τα ποσοστά έκφρασης του CD59 πάνω από το όριο των *clinical cut-off* (RED CD59  $\geq 0,095\%$ ), εμφάνισαν κι εδώ στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών της Ομάδας-1 ( $p < 0,001$ ), ενώ στην Ομάδα-2 ( $p < 0,001$ ) οι πληθυσμοί Other VT και AT, ήταν εκείνοι που εμφάνισαν τα υψηλότερα ποσοστά (36,7% και 33,3%, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τις υπόλοιπες υποομάδες. Έχει ήδη αναφερθεί, ότι αρχικά έγινε προσπάθεια εκτίμησης και της έκφρασης και του CD55 στα ερυθροκύτταρα, αλλά δεν συνεχίστηκε λόγω των

βιβλιογραφικών αναφορών για τη χρησιμότητα της εν λόγω ανάλυσης και για τον μη σαφή διαχωρισμό των τριών τύπων PNH κυττάρων (III=Negative, II=Dim και I=Normal) με το CD55, κάτι που επιβεβαιώθηκε και στις μετρήσεις της παρούσας μελέτης. Το CD55 (DAF) εμπλέκεται στην αρχική φάση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος, η αναστολή σε αυτό το επίπεδο δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον έλεγχο της αιμόλυσης. Αντίθετα το CD59 (MIRL) φαίνεται να έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον καταρράκτη του συμπληρώματος, δεδομένου ότι εμπλέκεται στον σχηματισμό του MAC (*Membrane Attack Complex*), ως εκ τούτου η απουσία του φαίνεται να είναι σημαίνουσα για την εμφάνιση αιμόλυσης (και πιθανά και των θρομβοεμβολικών επεισοδίων). Έχει δειχθεί ότι ανεπαρκή σε CD55 ερυθροκύτταρα (φαινότυπος *Inab*) με φυσιολογική ωστόσο έκφραση του CD59 δεν φαίνεται να εμφανίζουν τα χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα της PNH, ενώ στην αντίθετη περίπτωση (φυσιολογικά επίπεδα CD55 και ανεπάρκεια CD59) εμφανίζονται τα κλινικά συμπτώματα της νόσου (*Rother et al. 1994; Μελέτης και συν. 2009; Manivannan et al. 2017*). Από εργαστηριακής άποψης, έχει καταδειχθεί ότι η ανάλυση του CD59 είναι πιο ακριβής στα ερυθροκύτταρα, καθώς το CD59 εκφράζεται περισσότερο από το CD55, ανιχνεύεται με αρκετά φθοριοχρώματα συνδεδεμένα με αντισώματα και δίνει καλύτερο διαχωρισμό των κυτταρικών τύπων. Η σημασία της ανίχνευσης PNH κλώνων με ανάλυση έκφρασης του CD55 θεωρείται δευτερεύουσα, η χρήση του συστήνεται ως προαιρετική και δεν συνιστάται σαν το μοναδικό αντιδραστήριο ανίχνευσης, από αρκετούς ερευνητές αμφισβητείται η χρησιμότητά του στην ανάλυση ρουτίνας (*Fletcher et al. 1992; Kwong et al. 1994; Sutherland et al. 2007; Tembhare et al. 2010; Correia et al. 2016; Illingworth et al. 2018*). Ως προς τα παραπάνω ωστόσο, δεν υπάρχει απόλυτη συμφωνία, καθότι από κάποιους συνιστάται ακόμη η ταυτόχρονη χρήση και των δύο δεικτών, ισχυριζόμενοι ότι ο έλεγχος έκφρασης του CD55 πιθανά να είναι δόκιμο να συμπεριλαμβάνεται στο *panel*, σαν συμπληρωματική όμως δοκιμασία (*Rachidi et al. 2010; Manivannan et al. 2017; Devos et al. 2018*). Δεδομένων των βιβλιογραφικών αναφορών και της εικόνας των αρχικών αποτελεσμάτων, ο έλεγχος έκφρασης του CD55 στα ερυθροκύτταρα στην παρούσα μελέτη διακόπηκε.

Η κατανομή των μικρών PNH κλώνων ανά πληθυσμό παρουσιάζεται στους πίνακες 15 & 16. Ο πίνακας 16 παραθέτει αναλυτικά την κατανομή των μικρών κλώνων σε περισσότερες από μία μεταβλητές, ανά υποομάδα. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (*Borowitz et al. 2010; Rachidi et al. 2010; Sutherland et al. 2012;*

*Illingworth et al. 2018; Devos et al. 2018*), τα αποτελέσματα, που πρέπει να ληφθούν υπόψη στον πίνακα 16, είναι αυτά των τριών τελευταίων στηλών, όπου εμφανίζονται τα ποσοστά ελάσσονος κλώνου σε παραπάνω από μία μεταβλητές. Στο σύνολο των ασθενών, η πλειονότητα των ‘υπόπτων’ περιπτώσεων (10/181) παρουσιάστηκε με κλώνο στα MONO FLAER & RED CD59 (8/10), ενώ στα NEUTRO FLAER & RED CD59 βρέθηκαν 5/10 περιστατικά (τα τρία στην υποομάδα της αρτηριακής θρόμβωσης). Το γεγονός ότι τα μονοκύτταρα εμφανίζονται συνήθως με μεγαλύτερο μέγεθος κλώνου, πιθανά εξηγεί τα ανωτέρω αποτελέσματα (πιθανά σε χαμηλότερες τιμές *clinical cut-off* να εμφανίζονται και υψηλότερες τιμές στα ουδετερόφιλα), όπως επίσης και την διαφορά στα αποτελέσματα με την εργασία των *Lazo-Langer et al. (2015)*.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η υποομάδα της αρτηριακής θρόμβωσης (AT) πέρα από το γεγονός ότι εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά ελάσσονων PNH κλώνων (11,1%), ήταν εκείνη που εμφάνισε υψηλά ποσοστά τιμών (πάνω από τα *clinical cut-off*) και στις τρεις μετρηθείσες μεταβλητές (30,6% για τα μονοκύτταρα, 22,2% για τα ουδετερόφιλα και 33,3% για τα ερυθροκύτταρα), όπως επίσης και τις περισσότερες περιπτώσεις ελάσσονα PNH κλώνου στα NEUTRO FLAER & RED CD59 (3/10). Τα ανωτέρω αποτελέσματα, ειδικά για την συγκεκριμένη ομάδα, χρήσιμο θα είναι να επανεκτιμηθούν και να εμπλουτιστούν με μεγαλύτερο πλήθος ασθενών.

Αν και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, δεν θα μπορούσε κανείς να ισχυριστεί ότι τα άτομα με ‘ύποπτο’ αποτέλεσμα (τιμές υψηλότερες των *clinical cut-off*) σε μία μόνο κυτταρική σειρά φέρουν PNH κλώνο (*Borowitz et al. 2010; Rachidi et al. 2010; Devos et al. 2018*), παρατηρήθηκε ότι οι μισοί περίπου από τους εξετασθέντες (48,62%) εμφανίστηκαν με υψηλότερες των *cut-off* τιμές σε μία μεταβλητή, ενώ σε όλες τις υποομάδες, κάποιες από τις εξετασθείσες μεταβλητές (συγκεκριμένα τα MONO FLAER και RED CD59) εμφανίζονται με υψηλά ποσοστά τιμών. Πιο συγκεκριμένα: οι υποομάδα *Other VT* παρουσιάζεται με υψηλότερες τιμές στα RED CD59 (36,7%), ενώ η υποομάδα *SVT* (σπλαχνική θρόμβωση) εμφάνισε υψηλό ποσοστό (38,7%) στα MONO FLAER. Η αρτηριακή υποομάδα (AT) εμφανίστηκε με υψηλές τιμές τόσο στα MONO FLAER (30,6%) όσο και στα RED CD59 (33,3%). Ο έλεγχος στα ουδετερόφιλα σε καμία άλλη ομάδα δεν εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές (η υποομάδα *AT*, ωστόσο, εμφανίστηκε με τις υψηλότερες τιμές/22,2% σε σχέση με τις άλλες υποομάδες) (Πίνακες 15 & 16). Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν οι συγκεκριμένες μεταβλητές (MONO FLAER & RED CD59),

θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμους προγνωστικούς δείκτες (*alert signal*) για πιθανή εμφάνιση θρομβοεμβολικού επεισοδίου στο μέλλον σε (νέους κυρίως) ασθενείς με ανεξήγητα θρομβοεμβολικά επεισόδια. Τα παραπάνω ευρήματα θα πρέπει να αξιολογηθούν με επιπλέον μελέτες, με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων καθώς και με κλινική και εργαστηριακή επανεκτίμηση.

Επειδή οι συμμετέχοντες στην παρούσα μελέτη, από την στιγμή που δεν νοσούσαν, δεν θεώρησαν σκόπιμο να έρθουν για επανέλεγχο, δεν υπάρχει ακόμη πλήρης επιβεβαίωση των ευρημάτων· ο επανέλεγχος ωστόσο θεωρείται αναγκαίος προκειμένου να εομβαιωθεί η εμμένουσα παρουσία και καταδειχθεί (ή όχι) η σημαντικότητα της εμφάνισης των ανιχνευθέντων ελάσσονων κλώνων, ιδιαίτερα για συγκεκριμένες ομάδες (*SVT* και *AT*). Για τα άτομα με ήδη υπάρχουσα ένδειξη παρουσίας υψηλών τιμών έστω και σε μία μόνο κυτταρική σειρά, πιθανά θα ήταν σκόπιμος τουλάχιστον ένας ακόμη επανέλεγχος προκειμένου να διαπιστωθεί αφενός μεν εάν πρόκειται για τυχαίο εύρημα ή όχι, αφετέρου δε να διερευνηθεί πιθανή εμφάνιση κλώνου και σε δεύτερη κυτταρική σειρά στο πέρασμα του χρόνου. Είναι γνωστό ότι από τη βιβλιογραφία ότι, καθώς το μέγεθος του κλώνου αλλάζει με την πάροδο του χρόνου, οι ασθενείς χωρίς κλινικές εκδηλώσεις και μέγεθος κλώνου <1% θα πρέπει να ελέγχονται μία φορά το χρόνο, ενώ σε ασθενείς με μεγαλύτερο μέγεθος κλώνου και κλινικά συμπτώματα, ο έλεγχος πρέπει να γίνεται τουλάχιστον δύο φορές το χρόνο (*Devos et al. 2018; Brando et al. 2019*). Το μέγεθος του κλώνου μπορεί να μειωθεί ή να καταστεί και μη ανιχνεύσιμο, ως εκ τούτου, σε περιπτώσεις επιδείνωσης των κλινικών εκδηλώσεων (εμφάνιση αιμόλυσης ή θρομβοεμβολικού επεισοδίου) συνιστάται άμεση επανεκτίμηση (*Borowitz et al. 2010; Manivannan et al. 2017; Devos et al. 2018*). Σύμφωνα με τους *Manivannan και συν. (2017)* «η επανεκτίμηση θεωρείται κριτικής σημασίας δεδομένου ότι οι ασθενείς με πολύ μικρό μέγεθος κλώνου συνήθως απλά παρακολουθούνται». Ωστόσο, για την καλύτερη αξιολόγηση των εν λόγω αποτελεσμάτων και προκειμένου να καταδειχθεί η αξιοπιστία και σημαντικότητα των ανωτέρω ευρημάτων, εκτός της ανάγκης της επανεκτίμησης, χρειάζεται και έλεγχος σε μεγαλύτερο πλήθος ασθενών.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι η παρουσία ελάσσονων PNH κλώνων είναι συχνή σε περιπτώσεις ανεπάρκειας μυελού των οστών (*AA/MDS*) χωρίς κυρίαρχη αιμόλυση, η επανεκτίμηση θεωρείται απαραίτητη, προκειμένου, αφού επιβεβαιωθεί η εμμένουσα παρουσία των ελάσσονων κλώνων, να διερευνηθεί και να αποκλειστεί πιθανή διαταραχή λόγω κλωνικής επέκτασης (*Meletis et al. 2001; Asimakopoulos et al. 2014;*



*Devalet et al. 2015; Manivannan et al. 2017; Illingworth et al. 2018; Brodsky 2021; Fattizzo et al. 2020; Vyrides et al. 2021; Babushok 2021).*

Οι *Shen και συν. (2014)*, στην προσπάθειά τους να διευκρινίσουν τον μηχανισμό κλωνικής επέκτασης και τη διακριτή συμπεριφορά των κλώνων PNH, υπέθεσαν ότι ενδέχεται να εμπλέκονται πρόσθετες σωματικές μεταλλάξεις προγονικής φύσης. Δεν πραγματοποιήθηκε ανάλυση μεταλλάξεων στα δείγματά μας, ωστόσο, η παρουσία πρόσθετων σωματικών μεταλλάξεων θα μπορούσε να αποτελεί μια εξήγηση για την ύπαρξη των μικρών κλώνων στον πληθυσμό που εξετάστηκε, εάν βέβαια η έμμενουσα παρουσία τους επιβεβαιωθεί σε επανεκτίμηση.

Έχει αποδειχθεί ότι μεταλλάξεις του PIG-A γονιδίου, που φαίνεται να προέρχονται από κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες (colony forming cells/CFCs) και όχι από βλαστοκύτταρα, ανιχνεύθηκαν και σε υγιή άτομα (σε μικρή συχνότητα), υποδεικνύοντας ότι οι μεταλλάξεις του γονιδίου PIG-A μπορεί να μην επαρκούν από μόνες τους για την ανάπτυξη PNH. Τα CFCs έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται, αλλά όχι να αυτό-ανανεώνονται, ως εκ τούτου η προκληθείσα βλάβη δεν μπορεί να εδραιωθεί (*Araten et al. 1999; Burman et al. 1999; Ware et al. 2001; Hu et al. 2005; Brodsky 2006; Malato et al. 2012; Asimakopoulos et al. 2014; Hill et al. 2017*). Ως εκ τούτου, το ερώτημα που τίθεται είναι, εάν κάποια από τα αποτελέσματα της μελέτης αντικατοπτρίζουν τον επιπολασμό παροδικών ελάσσονων PNH κλώνων στο γενικό πληθυσμό και εάν αυτοί οι 'κλώνοι' πράγματι συσχετίζονται με την εμφάνιση θρομβωτικών επεισοδίων. Η επανάληψη του ελέγχου μπορεί να βοηθήσει στην επιβεβαίωση της εμμονής των σπάνιων αυτών PNH πληθυσμών.

Οι συσχετίσεις κατά *Spearman* μεταξύ των παραμέτρων που εξετάστηκαν με κυτταρομετρία ροής έγιναν σύμφωνα με τον διαχωρισμό της Ομάδας-1 (2 πληθυσμοί). Καμία από τις συσχετίσεις που έγιναν δεν ήταν υψηλή με συντελεστή συσχέτισης  $r > 0,5$ . Ωστόσο, στην ομάδα των ασθενών υπήρξε ασθενώς θετική συσχέτιση (μετρίου βαθμού,  $r = 0,34$ ) μεταξύ μονοκυττάρων και ουδετεροφίλων (MONO FLAER και NEUTRO FLAER), συσχέτιση που έχει αναφερθεί και στην βιβλιογραφία, για PNH ασθενείς όμως. Φαίνεται (αν και με μέτρια συσχέτιση) ότι το μέγεθος των κλώνων στα ουδετερόφιλα αυξάνεται παράλληλα με αυτό των μονοκυττάρων, κάτι που δεν αποτελεί μη αναμενόμενο εύρημα, δεδομένου ότι οι δύο σειρές προέρχονται από κοινό πρόγονο (δεν παρατηρήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ μονοκυττάρων ή ουδετεροφίλων με το CD59,  $r < 0,1$ ). Όσον αφορά στον πληθυσμό των υγιών ατόμων, οι συσχετίσεις ήταν όλες χαμηλές τόσο μεταξύ MONO FLAER &

NEUTRO FLAER όσο και μεταξύ NEUTRO FLAER & RED CD59 και MONO FLAER & RED CD59. Πρόκειται για φυσιολογικά άτομα χωρίς εμφάνιση υψηλών τιμών, επομένως τα αποτελέσματα ήταν αναμενόμενα.

Η εμφάνιση θρομβοεμβολικών επεισοδίων αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τον γενικό πληθυσμό, ενώ ο απόλυτος κίνδυνος φλεβικής θρόμβωσης κυμαίνεται στο 1-2% ετησίως, αυξάνεται δε όσο αυξάνει η ηλικία. Ο κίνδυνος υποτροπής μετά το πρώτο θρομβοεμβολικό επεισόδιο κυμαίνεται στο 5-7%, ενώ οι ασθενείς που έχουν ήδη υποστεί ένα θρομβωτικό επεισόδιο έχουν ~50 φορές υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης νέου σε σχέση με τον υπόλοιπο πληθυσμό. Οι ασθενείς που έχουν εμφανίσει ένα πρώτο επεισόδιο είναι πάντα σε κίνδυνο υποτροπής, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα που έχει παρέλθει από την πρώτη εμφάνιση, ωστόσο είναι γεγονός ότι ο κίνδυνος υποτροπής μειώνεται με τον χρόνο (*Fahrni et al. 2015; Heit, 2015*). Για την εύρεση των ανεξάρτητων παραγόντων που σχετίζονται με την υποτροπή, έγινε ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης (*logistic regression analysis*) και προέκυψαν οι σχετικοί λόγοι (*Odds ratios*) με τα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) 95%. Με την ανάλυση λογαριθμιστικής παλινδρόμησης έγινε συσχέτιση της εμφάνισης υποτροπής στους ασθενείς ανάλογα με δημογραφικά τους στοιχεία, λοιπά στοιχεία από το ιστορικό τους και βάσει των αποτελεσμάτων της μελέτης. Οι σχετικοί λόγοι (*Odds ratios*) προέκυψαν έχοντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την εμφάνιση υποτροπής και ως ανεξάρτητες τα δημογραφικά στοιχεία των ασθενών, το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου, το θετικό ή μη οικογενειακό ιστορικό, καθώς και τις τιμές των μεταβλητών από τα αποτελέσματα του ελέγχου. Σύμφωνα με τα ανωτέρω, το είδος του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου και η ύπαρξη του θετικού οικογενειακού ιστορικού βρέθηκαν να συσχετίζονται με την ύπαρξη υποτροπής. Το ποσοστό των ασθενών με υποτροπή ποικίλλει σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του αρχικού θρομβωτικού επεισοδίου. Ειδικότερα, οι περιπτώσεις της φλεβικής θρόμβωσης (*Other VT*) βρέθηκαν με 7,27 ( $p=0,003$ ) φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης υποτροπής (συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα) σε σχέση με τις περιπτώσεις της σπλαχνικής θρόμβωσης (*reference*), ενώ οι περιπτώσεις με θετικό οικογενειακό ιστορικό είχαν περισσότερες πιθανότητες (2,49 φορές,  $p=0,044$ ) να εμφανίσουν υποτροπή σε σχέση με αυτές που είχαν αρνητικό οικογενειακό ιστορικό. Οι μεταβλητές που ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής και η παρουσία ελάσσονων PNH κλώνων δεν βρέθηκαν να αποτελούν προγνωστικούς δείκτες για εμφάνιση υποτροπής.

Δεν έχει αναφερθεί έως τώρα κανένα επεισόδιο υποτροπής στους συγκεκριμένους ασθενείς (από την αρχή της μελέτης). Ωστόσο, απαιτείται επανεκτίμηση και έλεγχος μεγαλύτερου αριθμού ατόμων, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα.

## 5.1 Περιορισμοί της μελέτης

- Πρόκειται για αναδρομική μελέτη. Εκκρεμεί η ολοκλήρωση του επανελέγχου των ασθενών.
- Ο αριθμός των συμμετεχόντων ήταν περιορισμένος. Ειδικότερα οι ομάδες με σπλαχνική και αρτηριακή θρόμβωση είχαν μικρό πλήθος ατόμων. Χρειάζεται μεγαλύτερο πλήθος ατόμων (ιδιαίτερα στις προαναφερθείσες υποομάδες) προκειμένου να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα.
- Χρήσιμη θα ήταν η δυνατότητα ένταξης περισσότερων δεικτών στο *panel* ανάλυσης [π.χ. CD10: για καλύτερη οριοθέτηση των ουδετερόφιλων (αναφέρεται ότι η χρήση του CD15 πιθανά απαιτεί τιτλοδότηση λόγω πρόκλησης aggregation), CD64: για ακριβέστερη οριοθέτηση των μονοκυττάρων, χρήση CD157 σε συνδυασμό με το FLAER: σαν επιπλέον δείκτης ανίχνευσης PNH κλώνων στα λευκοκύτταρα (τελευταία συστήνεται ιδιαίτερα η χρήση του τόσο για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που φαίνεται ότι προσφέρει, όσο για την εξοικονόμηση χρόνου και κόστους)].
- Δεν διενεργήθηκε έλεγχος των πρωτεϊνών του καταρράκτη του συμπληρώματος στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, προκειμένου να αποσαφηνιστεί πιθανή εμπλοκή του στην εμφάνιση των θρομβωτικών επεισοδίων (ακόμη και αν δεν παρατηρείται εμφάνιση PNH κλώνου).
- Δεν διενεργήθηκε έλεγχος πιθανής ενεργοποίησης του μηχανισμού της πήξης (π.χ. TGA, TEG, έλεγχος παρουσίας MPs) προκειμένου να διευκρινισθεί πιθανή διαφορά στα άτομα με ένδειξη ελάσσοнос κλώνου σε σχέση με τα άτομα που δεν εμφάνισαν υψηλές τιμές, όπως επίσης και σε σχέση με τους υγιείς δότες. Τα αποτελέσματα πιθανά θα είχαν ιδιαίτερη σημασία για τους ασθενείς της αρτηριακής ομάδας.

## 5.2 Συμπεράσματα

Ο έλεγχος για την παρουσία κλώνων PNH θεωρείται απαραίτητος αφενός σε ασθενείς με υποψία νόσου PNH, αφετέρου δε σε ασθενείς (ιδιαίτερα νεαρής ηλικίας) με επεισόδια ανεξήγητης θρόμβωσης ή θρόμβωση σε ασυνήθη σημεία, αν και από τα αποτελέσματά της μελέτης δεν προκύπτει ότι οι παράμετροι που εξετάστηκαν συσχετίζονται με την πρόγνωση της νόσου ή την εμφάνιση πιθανού θρομβωτικού επεισοδίου στο μέλλον.

Ένα σημαντικό ζήτημα είναι εάν, σε ασθενείς, με ανεξήγητα θρομβωτικά επεισόδια ή επεισόδια θρόμβωσης σε ασυνήθεις θέσεις, οι οποίοι βρέθηκαν αρνητικοί ως προς την παρουσία PNH κλώνων και σε αυτούς με εμφάνιση ελάσσονων κλώνων στον αρχικό έλεγχο, θα πρέπει να πραγματοποιείται επανέλεγχος, ιδιαίτερα στις υποτροπιάζουσες περιπτώσεις. Το παραπάνω ερώτημα έχει να κάνει κυρίως με ασθενείς με επεισόδιο/α σπλαχνικής και αρτηριακής κυρίως θρόμβωσης (και ιδιαίτερα με αυτούς που εμφανίζουν ελάσσονα κλώνο ή κύτταρα με φαινότυπο PNH στην πρώτη εκτίμηση), δεδομένου ότι τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης μικρών PNH κλώνων και υψηλότερων των *clinical cut-off* τιμών παρατηρήθηκαν στις δύο αυτές υποομάδες.

Καμία από τις παραμέτρους που ελέγχθηκαν ούτε η παρουσία μικρών κλώνων δεν φαίνεται να έχει καμία επίδραση στην πιθανότητα υποτροπής, ενώ ο τύπος του αρχικού θρομβωτικού συμβάντος και η ύπαρξη θετικού οικογενειακού ιστορικού συσχετίζονταν με την εμφάνιση υποτροπής.

Η υποομάδα της αρτηριακής θρόμβωσης (AT) ήταν εκείνη που εμφάνισε υψηλά ποσοστά τιμών και στις τρεις ελεγχθείσες μεταβλητές, όπως επίσης και το υψηλότερο ποσοστό παρουσίας ελάσσονων PNH κλώνων (11,1%). Τα αποτελέσματα ειδικά για την συγκεκριμένη ομάδα, χρειάζεται να επανεκτιμηθούν και να εμπλουτιστούν με μεγαλύτερο πλήθος ασθενών.

Είναι αναγκαία η μελέτη σε μεγαλύτερο πλήθος ασθενών προκειμένου να εξαχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παροξυντική νυχτερινή αιμοσφαιρινουρία/PNH αποτελεί μια σπάνια επίκτητη διαταραχή των πολυδύναμων αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων, που προκαλείται από μια σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο της γλυκάνης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης τάξης-A (PIG-A). Η φλεβική θρόμβωση είναι μία από τις συχνότερες εκδηλώσεις της νόσου, εμφανίζεται σε ποσοστό έως και 40% των ασθενών με PNH και αποτελεί κύρια αιτία νοσηρότητας. Περισσότερο από το ένα τρίτο των θρομβωτικών επεισοδίων εντοπίζεται στις ηπατικές φλέβες, στην κάτω κοίλη φλέβα και στις εγκεφαλικές φλέβες.

**Στόχος της μελέτης:** Να αξιολογηθεί η συχνότητα ανάπτυξης και ο ρόλος των ελάσσονων PNH κλώνων σε περιστατικά με εμφάνιση θρόμβωσης ανεξήγητης αιτιολογίας, σε ασθενείς χωρίς γνωστή συγγενή ή επίκτητη θρομβοφιλική προδιάθεση.

**Σχεδιασμός της μελέτης:** 181 άτομα που εμφάνισαν ανεξήγητο θρομβωτικό επεισόδιο (πνευμονική εμβολή, σπλαχνική θρόμβωση, φλεβική θρόμβωση σε άλλες θέσεις εκτός της σπλαχνικής και αρτηριακή θρόμβωση) σε νεαρή ηλικία και 100 υγιείς δότες, εξετάστηκαν για την παρουσία κλώνων PNH με κυτταρομετρία ροής. Οι δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στα λευκοκύτταρα (μονοκύτταρα/ουδετερόφιλα) με τη χρήση του αντιδραστηρίου FLAER και στα ερυθροκύτταρα με την αξιολόγηση της έκφρασης του CD59. Καθώς η εμφάνιση μεγάλων κλώνων ήταν μη αναμενόμενη στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν, η μελέτη επικεντρώθηκε στην παρουσία και εμπλοκή των μικρών PNH κλώνων, βάσει των τιμών των *clinical cut-off* που υπολογίστηκαν από τους υγιείς δότες.

**Αποτελέσματα:** Στην ομάδα των ασθενών, 10 άτομα από τα 181 εμφανίστηκαν με ελάσσονα PNH κλώνο. Η παρουσία ελάσσονος κλώνου δεν φαίνεται να συσχετίζεται με την εμφάνιση θρομβωτικού επεισοδίου ή υποτροπής.

**Συμπεράσματα:** Ο έλεγχος για PNH θα πρέπει να διενεργείται σε ασθενείς (ιδιαίτερα σε νέους) με ανεξήγητο/α επεισόδιο/αθρόμβωσης ή θρόμβωση σε ασυνήθη σημεία. Σύμφωνα με τα δεδομένα της μελέτης, δεν συνάγεται ότι οι παράμετροι που ελέγχθηκαν με κυτταρομετρία ροής συσχετίζονται με την πρόβλεψη εμφάνισης PNH

νόσου ή πιθανή υποτροπή του θρομβοεμβολικού επεισοδίου. Καθώς, σε κάποιες υποομάδες των ασθενών, παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό ελάσσονων PNH κλώνων και υψηλών τιμών, η επανεκτίμηση και η συστηματική παρακολούθηση ενδέχεται να είναι απαραίτητη στα άτομα αυτά. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό ατόμων, για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων.

**Λέξεις-Κλειδιά:** υποκλινικοί ελάσσονες PNH κλώνοι, ανεξήγητα επεισόδια θρόμβωσης, σπλαχνική θρόμβωση, κυτταρομετρία ροής.

## SUMMARY

**Background:** Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is a rare acquired disorder of a pluripotent hematopoietic stem cell, caused by a *PIG-A* gene somatic mutation. Thrombosis occurs in 40% of PNH patients and consists a main cause of morbidity. More than one-third of thrombotic episodes are located in hepatic veins, the inferior vena cava and cerebral veins.

**Study objective:** To evaluate the presence and role of PNH subclinical/minor clone(s) in idiopathic VTE patients, with no known congenital or acquired thrombophilia.

**Study design:** 181 patients having experienced idiopathic thrombosis and 100 healthy controls were screened for PNH clone(s) presence by flow cytometry. Testing was performed on white blood cells using FLAER analysis and on red blood cells using CD59 expression. The study was focused on the presence of minor clone(s), according to the clinical cut-off values raised from the healthy population.

**Results:** Ten out of 181 patients were revealed with a small PNH clone in both cell lines (WBCs and RBCs). The presence of a minor clone was not found to be associated with thrombosis prognosis or recurrence.

**Conclusions:** PNH screening should be performed (especially) in young adults with unexplained thrombosis or thrombosis in unusual sites. According to our data, it is not concluded that the tested parameters are associated with disease prognosis or VTE recurrence. In certain populations, a higher percentage of minor clone(s) was observed; re-examination and systematic follow-up might be useful for specific individual cases. Further studies with a larger number of individuals may be needed.





## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal R, Chapple P, Brown M, Szer J, Juneja S. Analysis of abnormal clones by the fluorescent aerolysin method in paroxysmal nocturnal and other marrow disorders. *Int. Jnl. Lab. Hematol.* 2015Feb; 37(1):14–21.
- Agno W, Dentali F, De Stefano V, Barco S et al. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in patients with splanchnic vein thrombosis. *Thrombosis Research* 2014 Jun; 133(6):1052-5.
- Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2008; 100: 878-85.
- Alfinito F, Del Vecchio L, Rocco S, et al. Blood cell flow cytometry in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a tool for measuring the extent of the PNH clone. *Leukemia* 1996; 10: 1326-30.
- Almeida AM, Murakami Y, Layton DM, et al. Hypomorphic promoter mutation in PIGM causes inherited glycosylphosphatidylinositol deficiency. *Nat Med* 2006; 12: 846-51.
- Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzato L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96:5209–14.
- Araten DJ, Thaler HT, Luzzatto L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Thromb Haemost* 2005; 93: 88-91.
- Araten DJ, Notaro R, Thaler HT. Thrombolytic therapy is effective in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a series of nine patients and a review of the literature *Haematologica* 2012; 97: 344-52.
- Armstrong EM, Bellone JM, Hornsby LB, Treadway S, Phillippe HM. Acquired Thrombophilia. *J Pharm Pract* 2014 Jun; 27(3):234-42.
- Arruda MM, Rodrigues CA, Yamamoto M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From pathophysiology to treatment. *Rev Assoc Med Bras* 2010; 56: 214-220.
- Asimakopoulos J, Terpos E, Papageorgiou L, Kampouroulou O, Giakoumis A, et al. The presence of CD55- and/or CD59-deficient erythrocytic populations in patients with rheumatic diseases reflects an immune-mediated bone-marrow derived phenomenon. *Med Sci Monit* 2014 Jan 27; 20:123-39.

- Babushok DV. When does a PNH clone have clinical significance? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2021; 2021(1):143-152.
- Bartholomew JR. Update on the management of venous thromboembolism. *Cleve Clin J Med* 2017 Dec; 84(12 Suppl 3):39-46.
- Basavaraj MG, Gruber FX, Sovershaev M, et al. The role of TFPI in regulation of TF-induced thrombogenicity on the surface of human monocytes. *Thromb Res* 2010; 126: 418-25.
- Bektas M, Copley-Merriman C, Khan S, Sarda SP, Shammo JM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: role of the complement system, pathogenesis, and pathophysiology. *J Manag Care Spec Pharm* 2020 Dec; 26(12-b Suppl): S3-S8.
- Belcher JD, Chen C, Nguyen J, et al. Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease. *Blood*. 2014; 123(3):377–390.
- Bertina RM. The prothrombin 20210 G to A variation and thrombosis. *Curr Opin Hem* 1998; 5(5):339–342.
- Besa EC. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, in *eMedicine*. 2007, WebMD.
- Bessler M, Mason P, Hillmen P, Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 1994; 343:951-953.
- Bessler M, Schaefer A, Keller P. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Insights from recent advances in molecular biology. *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 15, No 4 (October), 2001: pp 255-267.
- Bessler M, Hiken J. The pathophysiology of disease in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 2008: 104-110.
- Boccuni P, Del Vecchio L, Di Noto R, Rotoli B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000; 33(1)25–43.
- Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010Jul; 78(4):211-30.
- Brando B, Gatti A, Preijers F. Flow Cytometric Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Pearls and Pitfalls - A Critical Review Article. *EJIFCC*. 2019 Nov 25; 30(4):355-370.

- Brodsky RA, Vala MS, Barber JP, Medof ME, Jones RJ. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8756-8760.
- Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL, Lawrence TS, Jones RJ, Buckley JT. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin. *Blood* 1999; 93:1749-1756.
- Brodsky RA, Mukhina GL, Li S, et al. Improved detection and characterization of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria using fluorescent aerolysin. *Am J Clin Pathol* 2000; 114: 459-466.
- Brodsky RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 516:24-28.
- Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008; 111: 1840-1847.
- Brodsky RA. Advances in the diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2008A; 22: 65-74.
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008; 2008B: 111-115.
- Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009; 113: 6522-6527.
- Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014 Oct 30; 124(18):2804-11.
- Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Review. *Blood*. 2021 Mar 11; 137(10):1304-1309.
- Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; 68: 533-544.
- Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, et al. Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 5899-904.
- Burman RW, Popovich BW, Jacky PB, Turker MS. Fully expanded FMR1 CGG repeats exhibit a length- and differentiation-dependent instability in cell hybrids that is independent of DNA methylation. *Hum Mol Genet* 1999; 8:2293-2302.
- Burnier L, Fontana P, Kwak BR, et al. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Throm Haemost* 2009; 101: 439-451.

- Camargos Rocha JM, Silva ML, De Lima Souza ME, Murao M, Da Silva Araújo SS, Santos SME. Detection of PNH cells by flow cytometry, using multiparameter analysis. *J Bras. Patol. Med. Lab.* 2014; v.50, n.2, 105-114.
- Carmel R, Coltman CA, Yatteau RF, et al. Association of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with erythroleukemia. *N Engl J Med* 1970; 283: 1329-1331.
- Castoldi E, Rosing J. APC resistance: biological basis and acquired influences. *J Thromb Haemost* 2010; 8:445–453.
- Chen G, Kirby M, Zeng W, Young NS, Maciejewski JP. Superior growth of glycoposphatidylinositol-anchored protein-deficient progenitor cells in vitro is due to the higher apoptotic rate of progenitors with normal phenotype in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30:774-782.
- Collier ME, Mah PM, Xiao Y. Microparticle-associated tissue factor is recycled by endothelial cells resulting in enhanced surface tissue factor activity. *Thromb Haemost* 2013; 110: 966-976.
- Correia RP, Bento LC, Bortolucci ACA, Alexandre AM, Vaz A, Schimidell D, et al. Technical advances in flow cytometry-based diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Einstein* 2016; 14(3):366-73.
- Cowall DE, Pasquale DN, Dekker P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating as erythroleukemia. *Cancer* 1979; 43: 1914-1916.
- Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; a classic description by Paul Strubling in 1882, and a bibliography of the disease. *Blood* 1951; 6: 270-284.
- Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: relation of the clinical manifestations to underlying pathogenic mechanisms. *Blood* 1953; 8: 769-812.
- Curran KJ, Kernan NA, Prockop SE, Scaradavou A, Small TN, Kobos R, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric patients. Published online in Wiley Online Library ([wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)). 2012; 59(3):0–0.
- Dacie JV, Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: variation in clinical severity and association with bone-marrow hypoplasia. *Br J Haematol* 1961; 7: 442-457.
- Dacie J. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria In: *The haemolytic anaemias: congenital and acquired*. London: J & A Churchill Ltd; 1967; 1128-1260.
- Dacie JL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical manifestation, haematology, and nature of the disease. *Series Haematol* 1972; 3: 3-23.
- Dahlbäck B. Advances in understanding pathogenic mechanisms of thrombophilic disorders. *Blood*. 2008 Jul1; 112(1):19-27.

- Dahmani A, Roudot H, Cymbalista F, et al. Evaluation of fluorescently labeled aerolysin as a new kind of reagent for flow cytometry tests. Optimization of use of FLAER, hints and limits. *Am J Clin Pathol* 2016; 145: 407-417.
- Daniels GL, Tohyama H, Uchikawa M. A possible null phenotype in the Cromer blood group complex. *Transfusion* 1982; 22:362-363.
- De Latour RP, Schrezenmeier H, Mary JY, et al. Stem Cell Transplantation for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: An on Going Joint Study of the AAWP EBMT Group and the French Society of Hematology. *ASH Annual Meeting Abstracts*. *Blood* 2008A; 112: 34-42.
- De Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood* 2008B; 112:3099–106.
- Dentali F, Poli D, Scoditti U, et al. Long-term outcomes of patients with cerebral vein thrombosis: a multicenter study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012; 10:1297-1302.
- Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogné JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol*. 2015 Sep; 95(3):190-8.
- Devine DV, Gluck WL, Rosse WF, Weinberg JB. Acute myeloblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J Clin Invest* 1987A; 79:314-317.
- Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 1987B; 79: 131-7.
- Devos T, Meers S, Boeckx N, Gothot A, Deeren D, Chatelain B, et al. Diagnosis and management of PNH: Review and recommendations from a Belgian expert panel. *Eur. J Haematol*. 2018; 101:737–749.
- Dragoni F, Iori AP, Pignoloni P, et al. Thrombophilic screening in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a pilot study. *Br J Haematol*. 2010;150(4):492-494.
- Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999; 131: 401-408.
- Eichinger S, Heinze G, Jandeck LM, et al. Risk assessment of recurrence in patients with unprovoked deep vein thrombosis or pulmonary embolism: the Vienna prediction model. *Circulation*. 2010; 121:1630–1636.

- Ellis-Pegler RB, Schwabe C, Ajari I, et al. An orally administered small molecule factor D inhibitor (ACH-4471) for treatment of PNH and complement diseases: preliminary phase 1 results in healthy volunteers. European Hematology Association (EHA) Conference; 2016 Jun 9-12; Copenhagen, Denmark. Abstract nr LB2250.
- Emadi A, Brodsky RA. Successful discontinuation of anticoagulation following eculizumab administration in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 2009; 84: 699-701.
- Endo M, Beatty PG, Vreeke TM, et al. Syngeneic bone marrow transplantation without conditioning in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: in vivo evidence that the mutant stem cells have a survival advantage. *Blood* 1996; 88:742-750.
- Endo M, Ware RE, Vreeke TM, Singh SP, Howard TA, Tomita A, et al. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 2546-2557 (b).
- Fahrni J, Husmann M, Gretener SB, Keo HH. Assessing the risk of recurrent venous thromboembolism—a practical approach. *Vascular Health and Risk Management* 2015; 11 451–459.
- Fattizzo B, Giannotta J, Zaninoni A, Kulasekararaj A, Cro L, Barcellini W. Small Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones in Autoimmune Hemolytic Anemia: Clinical Implications and Different Cytokine Patterns in Positive and Negative Patients. *Front Immunol.* 2020 Jun 4; 11:1006.
- Fieni S, Bonfanti L, Gramellini D, Benassi L, Delsignore R. Clinical management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pregnancy: a case report and updated review. *Obstet Gynecol Surv* 2006; 61:593-601.
- Fletcher A, Bryant JA, Gardner B, Judson PA, Spring FA, Parsons SF, et al. New monoclonal antibodies in CD59: use for the analysis of peripheral blood cells from paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) patients and for the quantitation of CD59 on normal and decay accelerating factor (DAF)-deficient erythrocytes. *Immunology* 1992; 75 507- 512.
- Foley JH, Walton BL, Aleman MM, et al. Complement activation in arterial and venous thrombosis is mediated by plasmin. *E Bio Medicine.* 2016; 5:175–182.
- Forsberg UH, Bazil V, Stefanova I, Schroder I. Gene for human CD59 (likely Ly-6 homologue) is located on the short arm of chromosome 11. *Immunogenetics* 1989; 30:188–193.
- Fujioka S, Asai T. Prognostic features of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 1989; 52: 1386-1394.

- Fu R, Li L, et al. Analysis of clinical characteristics of 92 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single institution experience in China. *J Clin Lab Anal.* 2020; 34(1):e23008.
- Fujita T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2:346-53.
- Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001; 357: 932-3.
- Garcia RP, Eikenboom HC, Tesselaar ME, et al. Plasma levels of microparticle-associated tissue factor activity in patients with clinically suspected pulmonary embolism. *Thromb Res* 2010; 126: 345-9.
- Gatti A, Del Vecchio L, Geuna M, et al. Multicenter validation of a simplified method for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria screening. *Eur J Haematol* 2017; 99: 27-35.
- Gerber LD, Kodukula K, Udenfriend S. Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* 1992; 267: 12168-12173.
- Girolami A, Treleani M, Bonamigo E, Tasinato V, Girolami B. Venous thrombosis in rare or unusual sites: a diagnostic challenge. *Semin Thromb Hemost.* 2014; 40:81-87.
- Graham DL, Gastineau DA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a marker for clonal myelopathy. *Am J Med* 1992; 93: 671-674.
- Gralnick HR, Vail M, McKeown LP, et al. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995; 91: 697-702.
- Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, et al. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 685-95.
- Grunewald M, Grunewald A, Schmid A, et al. The platelet function defect of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Platelets* 2004; 15: 145-54.
- Hall C, Richards S, Hillmen P. The glycosylphosphatidylinositol anchor and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria/aplasia model. *Acta Haematologica* 2002; 108 (4):219-30.
- Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Hemost. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 102:3587-3591.
- Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996; 87: 5332-5340.

- Ham TH, Dingle JH. Studies on destruction of red blood cells. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest* 1939; 18: 657-672.
- Hartmann RC, Jenkins DE Jr, McKee LC, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine (Baltimore)* 1966; 45: 331-363.
- Hartmann RC, Jenkins DE. The “sugar-water” test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1966; 275: 155-157.
- Hauser CA, Brichta A, Pabinger-Fasching I, Jager U. Fibrinolytic therapy with rt-PA in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and Budd-Chiari syndrome. *Ann Hematol* 2003; 82: 299-302.
- Heit JA. Thrombophilia: Common questions on laboratory assessment and management. *Hematology* 2007; 127-135.
- Heit JA. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat Rev Cardiol.* 2015; 12(8): 464–474.
- Helley D, De Latour RP, Porcher R, Rodrigues CA, Galy-Fauroux I, Matheron J, et al. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010; 95(4):574–81.
- Hernandez-Campo PM, Almeida J, Sanchez ML, et al. Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: A frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2006; 70B: 71-81.
- Hernandez-Campo PM, Almeida J, Matarraz S, et al. Quantitative analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins during the maturation of different hematopoietic cell compartments of normal bone marrow. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72: 34-42.
- Hill A, Hillmen P, Richards SJ, et al. Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005; 106: 2559-2565.
- Hill A, Platts PJ, Smith A, et al. The incidence and prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and survival of patients in Yorkshire. *Blood.* 2006; 108: 985.
- Hill A, Reid SA, Rother RP, et al. High definition contrast enhanced MR imaging in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) suggests a high frequency of subclinical thrombosis. *BJH* 2007A; 137:181–182.



- Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *BJH* 2007B May; 137(3):181-92.
- Hill A, Rother RP, Arnold L, et al. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica*. 2010; 95(4):567–573.
- Hill A, Rother RP, Wang X, et al. Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *BJH* 2010; 149: 414-25.
- Hill A, Sapsford RJ, Scally A, et al. Underrecognized complications in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: raised pulmonary pressure and reduced right ventricular function. *BJH* 2012; 158(3):409-414.
- Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013; 121(25): 4985-4996.
- Hill A, Reid SA, Rother RP, et al. High definition contrast-enhanced MR imaging in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) suggests a high frequency of subclinical thrombosis. *Blood*. 2015; 108 (11):292.
- Hill A, Gava A, Taubel J, et al. A subcutaneously administered investigational RNAi therapeutic (ALN-CC5) targeting complement C5 for treatment of PNH and complement-mediated diseases: interim phase 1 study results. European Hematology Association (EHA) Conference; 2016 Jun 9-12; Copenhagen, Denmark. Abstract nr S474.
- Hill A, DeZern AE, Kinoshita T, Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3:17028.
- Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995; 333: 1253-1258.
- Hillmen P, Richards SJ. Flow cytometry in PNH: serial analysis and the prediction of outcome [abstract]. In: Presented at the American Society of Haematology forty-first annual meeting. San Diego (CA): *Blood* 94 (Suppl 1), 1999. p. 412a.
- Hillmen P, Hall C, Marsh JC, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004; 350: 552-559.
- Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006; 355: 1233-1243.

- 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(12):4123–4128.
- Hillmen P, Elebute M, Kelly R, et al. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 2010; 85: 553-559.
- Hochsmann B, Murakami Y, Osato M, et al. Complement and inflammasome overactivation mediates paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with autoinflammation. *J Clin Invest* 2019; 129: 5123-5136.
- Holguin MH, Frederick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989A; 84: 7-17.
- Holguin MH, Wilcox LA, Bernshaw NJ, Rosse WF, Parker CJ. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1989B; 84:1387-1394.
- Horikawa K, Nakakuma H, Kawaguchi T, Iwamoto N, Nagakura S, Kagimoto T, et al. Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1997; 90:2716-2722.
- Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005; 105:3848-3854.
- Huang Y, Liu X, Chen F, Zhou W, Li H, Long Z, et al. Prediction of thrombosis risk in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Annals of Hematology* 2019; 98:2283–2291.
- Hugel B, Socié G, Toti F, et al. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anaemia. *Blood* 1999; 93: 3451-3456.
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, et al. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22-7.
- Hussain S, Qureshi A, Kazi J. Renal involvement in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nephron Clin Pract* 2013; 123: 28-35.
- Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DelVecchio L. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies. *Cytometry B Clin Cytom.* 2018; 94(1):49-66.

- Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR. Sensitive and accurate identification of PNH clones based on ICCS/ESCCA PNH Consensus Guidelines—A summary. *Int J Lab Hematol*. 2019; 41(Suppl. 1):73–81.
- Inoue N, Kinoshita T, Orii T, et al. Cloning of a human gene, PIG-F, a component of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, by a novel expression cloning strategy. *J Biol Chem* 1993; 268: 6882-6885.
- Inoue N, Watanabe R, Takeda J, et al. PIG-C, one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* GPI2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 193-199.
- 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: 4232-4236.
- Ismail MM, Tooze JA, Flynn JA, Gordon-Smith EC, Gibson FM, Rutherford TR, et al. Differential apoptosis and Fas expression on GPI-negative and GPI-positive stem cells: a mechanism for the evolution of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2003; 123:545-551.
- Issaragrisil S, Leaverton PE, Chansung K, et al. Regional pattern in the incidence of aplastic anemia in Thailand. *Am. J. Hematol* 1999; 61: 164-168.
- Jacquemin M, Peerlinck K. Free hemoglobin: a boost to platelet thrombi. *Blood*. 2015; 126(20):2261–2262.
- Jankowska AM, Szpurka H, Calabro M, et al. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a factor contributing to thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2011; 96:954-62.
- Jenkins DEJ. Diagnostic tests for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ser Haematol* 1972; 5: 24-41.
- Jin JY, Tooze JA, Marsh JC, et al. Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-linked protein deficiency on the platelets of patients with aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: two distinct patterns correlating with expression on neutrophils. *Br J Haematol* 1997; 96: 493-6.
- Jing L, Lin Y, Long C, Li Q, Hao T, et al. Identification of acquired PIGA mutations and additional variants by next-generation sequencing in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Lab Hematol*. 2020; 42:473–481.
- Johnson RJ, Hillmen P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's genetherapy? *J Clin Pathol: Mol Pathol* 2002; 55:145–152.
- Johnson JM, Ricardo A, Arata M, Lickliter J, DeMarco SJ, Fahrner R, Hammer RP, Newstat B, Roychowdhury D, Tobe S, Winslow D, Treco D.A. Phase 1 single-ascending-dose clinical study of RA101495, a subcutaneously

administered synthetic macrocyclic peptide inhibitor of complement C5 for treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. European Hematology Association (EHA) Conference; 2016B Jun 9-12; Copenhagen, Denmark.

Kamitani T, Chang HM, Rollins C, et al. Correction of the class-H defect in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Ltk-cells by a human cDNA clone. *J Biol Chem* 1993; 268: 20733-20736.

Kaplan M. Eculizumab (Alexion). *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 1017-1023.

Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, et al. Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. *Genomics* 1994; 23: 566-574.

Kawakami Z, Ninomiya H, Tomiyama J, Abe T. Deficiency of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) neutrophils and monocytes: heterogeneous deficiency of decay-accelerating factor (DAF) and CD16 on PNH neutrophils. *Br J Haematol* 1990; 74:508-513.

Keage Mc. Eculizumab: a review of its use in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Drugs*. 2011; 71(17):2327-2345.

Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, et al. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a sustained efficacy and improved survival. *Blood* 2011; 117(25): 6786–92.

Kinoshita T, Inoue N, Takeda J. Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995; 60: 57-103.

Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, et al. *Leukocyte typing VI*. New York: Garland Publishing, 1997.

Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, et al. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2011; 152: 631-639.

Krawitz PM, Hochsmann B, Murakami Y, et al. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 2013; 122: 1312-1315.

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: 546-554.

Kulasekararaj AG, Jiang J, Smith AE, et al. Somatic mutations identify a sub-group of aplastic anemia patients that progress to myelodysplastic syndrome. *Blood* 2014; 124: 2698-2704.

- Kumpers P, Herrmann A, Lotz J, et al. A blue kidney chronic renal failure as a consequence of siderosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria? *Clin Nephrol* 2006; 66: 210-213.
- Kucher N. Clinical practice. Deep-vein thrombosis of the upper extremities. *N Engl J Med*. 2011; 364:861-869.
- Kwong YL, Lee CP, Chan TK. Flow cytometric measurement of glycosylphosphatidylinositol-linked surface proteins on blood cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 102(1):30–35.
- La Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, et al. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008; 22: 530-7.
- Lacroix R, Dignat-George F. Microparticles: new protagonists in pericellular and intravascular proteolysis. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39: 33-39.
- Lai S, Venugopal P, Leslie W. Long-term remission of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following chemoimmunotherapy for non-Hodgkin lymphoma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2012; 10: 134-136.
- Langemeijer S, Davies WW, Nunn M, et al. Twelve weeks safety and efficacy results of a novel C5 inhibitor Coversin in PNH with resistance to eculizumab due to complement C5 polymorphism. Abstract; European Hematology Association (EHA) Conference; 2016 Jun 9-12; Copenhagen, Denmark.
- Lazo-Langner A, Kovacs MJ, Hedley B, Al-Ani F, Keeney M, Louzada ML, et al. Screening of Patients with Idiopathic Venous Thromboembolism for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Clones. *Thromb Res.* 2015; 135(6):1107–1109.
- Lee GR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, ninth edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1993: 1232-1244.
- Lee JW, Jang JH, Kim JS, Yoon SS, Lee JH, Kim YK, et al. Clinical signs and symptoms associated with increased risk for thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria from a Korean Registry. *Int. J Hematol.* 2013; 97(6):749-757.
- Lee JW, Bachman E, Aguzzi R, et al. ALXN1210, a long -acting C5 inhibitor, results in rapid and sustained reduction of LDH with a monthly dosing interval in patients with PNH: preliminary data from a dose-escalation study. Abstract; European Hematology Association (EHA) Conference; 2016 Jun 9-12; Copenhagen, Denmark.
- Leidich SD, Kostova Z, Latek RR, et al. Temperature-sensitive yeast GPI anchoring mutants *gpi2* and *gpi3* are defective in the synthesis of N-acetylglucosaminyl

- phosphatidylinositol. Cloning of the GPI2 gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 13029-13035.
- Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol* 1967; 13: 236-251.
- Leung LL, Morser J. Plasmin as a complement C5 convertase. *EBio Medicine*. 2016; 5:20–21. 93.
- Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol* 1967; 13: 236-251.
- Liebman HA, Feinstein DI. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thromb Res* 2003; 111: 235-8.
- Lijfering WM, Brouwer JLP, Veeger NJGM, Bank I, Coppens M, Middeldorp S, et al. Selective testing for thrombophilia in patients with first venous thrombosis: results from a retrospective family cohort study on absolute thrombotic risk for currently known thrombophilic defects in 2479 relatives. *Blood* 2009 May 21; 113(21):5314-22.
- Linnemann B, Schmidt H, Schindewolf M, et al. Etiology and VTE Risk Factor Distribution in Patients with Inferior Vena Cava Thrombosis. *Thromb Res* 2008; 123:72-8.
- Liu J, Miwa T, Hilliard B, Chen Y, Lambris JD, Wells AD, et al. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo. *J Exp Med* 2005; 201:567-577.
- Longhi MP, Harris CL, Morgan BP, Gallimore A. Holding T cells in check-a new role for complement regulators? *Trends Immunol* 2006; 27:102-108.
- Longo L, Bessler M, Beris P, et al. Myelodysplasia in a patient with pre-existing paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a clonal disease originating from within a clonal disease. *Br J Haematol* 1994; 87: 401-403.
- Louwes H, Vellenga E, de Wolf JT. Abnormal platelet adhesion on abdominal vessels in asymptomatic patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 2001; 80: 573-6.
- Lussana F, Dentali F, Ageno W, Kamphuisen P. Venous Thrombosis at Unusual Sites and the Role of Thrombophilia. *Sem Thromb Hem* 2007; 33(6):582–587.
- Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell* 1997; 88: 1-4.
- Luzzatto L, Jafa K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (ed). *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the GPI-linked proteins*. New York, Academic Press, 2000:21-47.

- Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. *Curr OpinGenet Dev*2006; 16:317–322.
- Luzzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. First published: 23 Feb 2016; 5 (F1000 Faculty Rev):209.
- Maciejewski JP, Young NS, Yu M, et al. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thromb Res* 1996; 83: 433-47.
- Maciejewski JP, Rivera C, Kook H, et al. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycoposphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* 2001; 115: 1015-1022.
- Madkaikar M, Gupta M, Jijina F, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: diagnostic tests, advantages and limitations. *Eur J Haematol* 2009; 83: 503-511.
- Makris M. Thrombophilia: grading the risk. *Blood*. 2009; 113:5038- 5039.
- Malato A, Saccullo G, Coco LL, Mancuso S, Santoro M, Martino S, et al. Thrombotic complications in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a literature review. *Blood Transfus*. 2012; 10(4):428-435.
- Manivannan P, Ahuja A, Pati HP. Diagnosis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: Recent Advances. *Indian J Hematol. Blood Transfus*. 2017; 33(4):453–462.
- Maroney SA, Cunningham AC, Ferrel J, et al. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1114-24.
- Maroney SA, Haberichter SL, Friese P, et al. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood* 2007; 109: 1931-7.
- Martinelli I, Franchini M, Mannucci PM. How I treat rare venous thromboses. *Blood*. 2008; 112:4818-4823.
- Mathieu D, Rahmouni A, Villeneuve P, et al. Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995; 85: 3283-3288.
- McAree B, O'Donnell M, Fitzmaurice G et al. Inferior vena cava thrombosis: A review of current practice. *Vasc Med* 2013; 18:32–43.
- McMullin MF, Hillmen P, Jackson J, et al. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J Intern Med* 1994; 235: 85-9.

- Meletis J, Terpos E, Samarkos M, Meletis C, Konstantopoulos K, Komninaka V, et al. Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. *Haematologia (Budap)*. 2001; 31(1):7-16.
- Meletis J, Terpos E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *MedSciMonit* 2003; 9: RA161-RA172.
- Μελέτης Γ, Σαραντόπουλος Α, Ασημακόπουλος Ι, Τέρπος Ε. Κλινική εικόνα, διάγνωση και αντιμετώπιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2009; 26(4):454-478.
- Meppiel E, Crassard I, Latour RP, De Guibert S, Terriou L, Chabriat H, et al. Cerebral Venous Thrombosis in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Medicine* 2015; 94(1): e362.
- Mon Pere N, Lenaerts T, Pacheco JM, Dingli D. Evolutionary dynamics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *PLoS Comput Biol*. 2018; 14(6):e1006133.
- Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*. 2004; 126:133-8.
- Μπούχλα Α, Γρουζή Ε, Κυριάκου Η, Λαδά Ε, Τραυλού Α, Παππά Β, Κοκόρη Σ. Φλεβικές θρομβώσεις σε ασυνήθεις θέσεις. Η συμβολή του αιματολόγου. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2017; 34(6):771-789.
- Mueller RJ, Stussi G, Puga YG, et al. Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2011; 96: 119-27.
- Nakakuma H, Nagakura S, Kawaguchi T, et al. Persistence of affected T lymphocytes in long-term clinical remission in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994; 84: 3925-8.
- Nakakuma H, Kawaguchi T. Pathogenesis of selective expansion of PNH clones. *Int J Hematol*. 2003; 77(2):121-124.
- Nakamura N, Inoue N, Watanabe R, et al. Expression cloning of PIG-L, a candidate N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. *J Biol Chem* 1997; 272: 15834-15840.
- Ninomiya H, Hasegawa Y, Nagasawa T, et al. Excess soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in the plasma of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria inhibits cell-associated fibrinolytic activity. *Int J Hematol* 1997; 65: 285-91.
- Ninomiya H, Kawashima Y, Hasegawa Y, et al. Complement-induced procoagulant alteration of red blood cell membranes with microvesicle formation in



paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH): implication for thrombogenesis in PNH. *Br J Haematol* 1999; 106: 224-31.

Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am J Hematol.* 1999; 62(3):175-82.

Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, et al. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)* 2004; 83:193–207.

Nuoffer C, Jenö P, Conzelmann A, et al. Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 1991; 11: 27-37.

Olteanu H, Karandikar NJ, McKenna RW, et al. Differential usefulness of various markers in the flow cytometric detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in blood and bone marrow. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 781-788.

Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011; 108: 1284-1297.

Palereti G, Leguani C, Cosmi B, Valdre L, Lunghi B, Bernadi F, Coccheri S. Predictive value of D Dimer test for recurrent venous thromboembolism after anticoagulation withdrawal in subjects with a previous idiopathic event and in carriers of congenital thrombophilia. *Circulation* 2003; 106, 1436.

Parker CJ, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005 Dec 1; 106(12): 3699–3709.

Parker CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007; 35:523-533.

Parker CJ. Bone marrow failure syndromes: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009; 23: 333-346.

Peacock-Young B, Macrae FL, Newton DJ, Hill A, Ariëns RAS. The prothrombotic state in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a multifaceted source. *Haematologica* 2018; 103(1):9-17.

Pedersen TL, Yong K, Pedersen JO, Hansen NE, Dano K, Plesner T. Impaired migration in vitro of neutrophils from patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1996; 95:45-51.

Petitou M, Casu B, Lindahl U. 1976–1983, a critical period in the history of heparin: the discovery of the antithrombin binding site. *Biochimie.* 2003; 85:83-89.

- Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007; 21: 157-171.
- Ploug M, Plesner T, Ronne E, et al. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992; 79:1447-55.
- Post TW, Arce MA, Liszewski MK, Thomson ES et al. Structure of the gene for human complement protein decay accelerating factor. *J Immunol* 1990; 144:740-744.
- Pu JJ, Mukhina G, Wang H, et al. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol* 2011; 87: 37-45.
- Qari M, Abdel-Razeq H, Alzeer A, Alizadeh H, Kristensen J, al-Sayegh F, et al. Recent advances in the diagnosis and treatment of deep vein thrombosis: a regional consensus. *Curr Opin Investig Drugs*. 2003 Mar; 4(3):309-15.
- Rachidi S, Musallam KM, Taher AT. A closer look at paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Review article. *European Journal of Internal Medicine* 21 2010; 260–267.
- Rahman K, Gupta R, Harankhedkar S, Gupta T, Sarkar MK, Nityanand S. Utility of CD157 as a Common Leukocytes Marker for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Screening in a Single Tube Five Color Combination. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2018 Apr; 34(2): 304–309.
- Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, et al. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS 13 cleavage site. *Blood* 2009; 114: 1666-74.
- Ray JG, Burows RF, Ginsberg JS, Burrows EA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the risk of venous thrombosis: review and recommendations for management of the pregnant and non pregnant patient. *Haemostasis* 2000; 30:103-117.
- Renesto P, Si-Tahar M, Moniatte M, et al. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the amino terminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 1997; 89: 1944-53.
- Richards SJ, Norfolk DR, Swirsky DM, et al. Lymphocyte subset analysis and glycosylphosphatidylinositol phenotype in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998; 92: 1799-806.
- Richards SJ, Rawstron AC, Hillmen P. Application of flow cytometry to the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000; 42: 223-233.

- Richards SJ, Morgan GJ, Hillmen P. Immunophenotypic analysis of B cells in PNH: insights into the generation of circulating naive and memory B cells. *Blood* 2000; 96: 3522-8.
- Richards SJ, Cullen MJ, Dickinson AJ, et al. Evolution of GPI-deficient clones predicts clinical course in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood* 2004; 104: 172
- Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the clinical laboratory. *Clin Lab Med* 2007; 27: 577-90.
- Richards SJ, Hill A, Hillmen P. Recent advances in the diagnosis, monitoring and management of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Cytom B Clin Cytom* 2007; 72:291–298.
- Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics* 2008; 2:205-222.
- Risitano AM, Notaro R, Marando L, et al. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood*. 2009; 113(17):4094–4100.
- Risitano AM, Marotta S, Ricci P, Marano L, Frieri C, 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.
- Riva N, Ageno W. Approach to thrombosis at unusual sites: Splanchnic and cerebral vein thrombosis. *Vascular Medicine* 2017; 22(6):529–540.
- Romualdi E, Ageno W. Venous thrombosis at unusual site in women. *Thromb Res* 127 Suppl. 3 2011; S86–S88.
- Ronne E, Pappot H, Grondahl-Hansen J, et al. The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995; 89: 576-81.
- Rosse WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990; 75:1595-1601.
- Rosse W. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffman R, Shattil SJ, editors. *Hematology: basic principals and practice*. New York: Churchill Livingstone: New York; 2000. p. 331-342.

- Rosse WF, Dacie JD. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966; 45: 736-748.
- Rosse WF. The life-span of complement-sensitive and -insensitive red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1971; 37:556-562.
- Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1982; 60: 20-23.
- Rosse WF, Young NS, Gongora-Biachi R. Hypoproliferative disorders of stem cells. *Rev Invest Clin* 1997; 1: 83-88.
- Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine* 1997; 76: 63-94.
- Rosse WF, Nishimura J. Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present state and future problems. *Int J Hematol* 2003; 77(2):113–120
- Rosse WF. Pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: missing cell proteins. UpToDate16.2 [CD] 2008 02/15/2008. [cited 2008 aug 18] (Available from: <http://www.uptodate.com/home/index.html>).
- Rother RP, Rollins SA, Mennone J, Chodera A, Fidel SA, et al. Expression of recombinant transmembrane CD59 in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria B cells confers resistance to human complement. *Blood* 1994; 84: 2604-2611.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653–62.
- Rother RP, Bell L, Hillmen P, et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293:1653-1662.
- Rother RP, Rollins SA, Mojcik CF, et al. Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1256-1264.
- Rotoli B, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2: 113-138.
- Sachdeva MUS, Varma N, Chandra D, et al. Multiparameter FLAER-based flow cytometry for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria enhances detection rates in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2015; 94: 721-8.
- Sahin F, Akay OM, Ayer M, et al. Pessg PNH diagnosis, follow-up and treatment guidelines. *Am J Blood Res* 2016; 6: 19-27.

- Salvagno GL, Pavan C, Lippi G. Rare thrombophilic conditions. *Ann Transl Med* 2018 Sep; 6(17):342.
- Saso R, Marsh J, Cevreska L, et al. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999; 104: 392-396.
- Schrezenmeier H, Muus P, Socié 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(5):922-929.
- Schubert J, Roth A. Update on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: on the long way to understand the principles of the disease. *Eur J Haematol* 2015; 94: 464-473.
- Segers O, Castoldi E. Factor V Leiden and activated protein C resistance. *Adv Clin Chem* 2009; 49:121-57.
- Shatzel J, O' Donnell M, Olson SR, Kearny MR, et al. Venous thrombosis in unusual sites: A practical review for the hematologist. Review article. *Eur J Haematol* 2019; 102:53–62.
- Shen W, Clemente MJ, Hosono N, et al. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 2014; 124: 4529-4538.
- Shichishima T, Terasawa T, Hashimoto C, Ohto H, Uchida T, Maruyama Y. Heterogenous expression of decay accelerating factor and CD59/membrane attack complex inhibition factor on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) erythrocytes. *Br J Haematol* 1991 Aug; 78(4):545-550.
- Shichishima T, Noji H. Red Cell Disorders. A new Aspect of the Molecular Pathogenesis of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology* 2002; 7:211-27.
- Simak J, Holada K, Risitano AM, et al. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004; 125: 804-13.
- Sims PJ, Rollins SA, Wiedmer T. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b–9 complex. *J Biol Chem* 1989; 264: 19228-35.
- Sims PJ, Wiedmer T. The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today* 1991; 12: 338-42.
- Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 275-82.

- Sloand EM, Pfannes L, Scheinberg P, et al. Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Exp Hematol* 2008; 36: 1616-24.
- Smith LJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Lab Sci* 2004; 17: 172-177.
- Socié G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, Heudier P, Rochant H, Cahn JY, Gluckman E. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet*. 1996 Aug31; 348(9027):573-7.
- Socie G, Schrezenmeier H, Muus P, Lisukov I, Roth A, Kulasekararaj A, et al. Changing prognosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria disease subcategories: an analysis of the International PNH Registry. *Intern Med J*. 2016; 46(9):1044-53.
- Steppich BA, Seitz I, Busch G, et al. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost* 2008; 100: 1068-75.
- Steppich BA, Hassenpflug M, Braun SL, et al. Circulating tissue factor and microparticles are not increased in patients with deep vein thrombosis. *Vasa* 2011; 40: 117-22.
- Stern RM, Connell NT. Ravulizumab: a novel C5 inhibitor for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ther Adv Hematol*. 2019; 10: 2040620719874728.
- Stevens SM, Woller SC, Bauer KA, Kasthurin R, Cushman M, Streiff M, Lim W, Douketis JD. Guidance for the evaluation and treatment of hereditary and acquired thrombophilia. *J Thromb Thrombolysis* 2016; 41:154–164.
- Sugarman J, Devine DV, Rosse WF. Structural and functional differences between decay-accelerating factor and red cell acetylcholinesterase. *Blood* 1986; 68: 680-684.
- Sugimori C, Padron E, Caceres G, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and concurrent JAK2(V617F) mutation. *Blood Cancer J* 2012; 2: e63.
- Sutherland DR, Kuek N, Davidson J, et al. Diagnosing PNH with FLAER and Multiparameter Flow Cytometry. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2007; 72B: 167-77.
- Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, et al. Use of a FLAER based WBC Assay in the Primary Screening of PNH Clones. *Am J Clin Pathol* 2009 Oct; 132(4):564-572.

- Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B* 2012; 82B:195–208.
- Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, et al. ICCS/ESCCA Consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) and related disorders. Part 2 – Reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 2018; 94: 23-48.
- Takahashi M, Takeda J, Hirose S, et al. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 1993; 177: 517-521.
- 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): 703-711.
- Tedesco F, Pausa M, Nardon E, et al. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* 1997; 185:1619-27.
- Telen MJ, Rosse WF, Parker CJ, Moulds MK, Moulds JJ. Evidence that several high frequency human blood group antigens reside on phosphatidylinositol-linked erythrocyte membrane proteins. *Blood* 1990; 75:1404-1407.
- Tembhare P, Ramani M, Syed K, Gupta AD. Flow cytometric analysis of erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria reveals superiority of CD59 as a diagnostic marker compared to CD55. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53, 2010; 699–703.
- Thaler J, Ay C, Weinstabl H, et al. Circulating procoagulant microparticles in cancer patients. *Ann Hematol* 2011; 90: 447-53.
- Tomita M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455:269-286.
- Tseng JE, Hall SE, Howard TA, Ware RE. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 1995; 50:244-253.
- Urbano-Ispizua Á, Muus P, Schrezenmeier H, Almeida AM, Wilson A, Ware RE. Different clinical characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in pediatric and adult patients. *Haematologica* 2017; 102e76.
- Valeriani E, Riva N, Di Nisio M, Ageno W. Splanchnic Vein Thrombosis: Current Perspectives. *Vasc Health Risk Manag.* 2019 Oct 22; 15:449-461.

- Van Bijnen STA, Van Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Thromb Haem* 2011; 10: 1-10.
- Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hem* 2016; 91(1): 46-49.
- Van der Schoot CE, Huizinga TW, van't Veer-Korthof ET, Witjans R, Pinkster J, von dem Borne AE. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leucocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood* 1990; 76:1853-1859.
- Vidugiriene J, Menon AK. Early lipid intermediates in glycosylphosphatidylinositol anchor assembly are synthesized in the ER and located in the cytoplasmic leaflet of the ER membrane bilayer. *J Cell Biol* 1993; 121: 987-996.
- Villegas-Mendez A, Montes R, Ambrose LR, et al. Proteolysis of the endothelial cell protein C receptor by neutrophil proteinase 3. *JThromb Haemost* 2007; 5:980-8.
- Von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, et al. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007; 109: 4487-93.
- Vossen JH, Ram AF, Klis FM. Identification of SPT14/CWH6 as the yeast homologue of hPIG-A, a gene involved in the biosynthesis of GPI anchors. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1243: 549-551.
- Vu T, Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, et al. Aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a study of the GPI-anchored proteins on human platelets. *Br J Haematol* 1996; 93: 586-9.
- Vyrides N, Douka V, Gavriilaki E, Papaioannou G, Athanasiadou A, Neofytou S, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and myelodysplastic syndrome: Disappearance of cytogenetic abnormalities. *Cancer Genet.* 2021; 250-251:1-5.
- Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* 2001; 98: 1802-11.
- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344: 1058-1066.
- Wang H, Chuhjo T, Yasue S, et al. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002; 100: 3897-3902.
- Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, et al. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 2009; 94: 29-37.



- Ware RE, Hall SE, Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 1991; 325: 991-996.
- Ware RE, Nishimura J, Moody MA, Smith C, Rosse WF, Howard TA. The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998; 92:2541-2550.
- Ware RE, Pickens CV, De Castro CM, Howard TA. Circulating PIG-A mutant T lymphocytes in healthy adults and patients with bone marrow failure syndromes. *Exp Hematol* 2001; 29:1403-1409.
- Watanabe R, Inoue N, Westfall B, et al. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *EMBO J* 1998; 17: 877-885.
- Watanabe R, Kinoshita T, Masaki R, et al. PIG-A and PIG-H, which participate in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, form a protein complex in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1996; 271: 26868-26875.
- Weitz I. Thrombosis in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2011; 37(3): 315–321.
- Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, et al. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82: 1192-6.
- Woodard P, Wang W, Pitts N, et al. Successful unrelated donor bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27: 589-592.
- Young NS, Maciejewski JP. Genetic and environmental effects in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Little PIG-A gows ‘‘why, why, why?’’. *J. Clin. Invest* 2000; 106:572-577.
- Young NS, Scheinberg P, Calado RT. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol* 2008; 15: 162-168.
- Yuan X, Braunstein EM, Ye Z, et al. Generation of glycosylphosphatidylinositol anchor protein-deficient blood cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 819-829.
- Zhang J, Piro O, Lu L, et al. Glycosylphosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003; 108: 623-7.
- Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview. *J Thromb. Haemost.* 2007; 5(3):642-645.

- Ziakas PD, Poulou LS, Pomoni A. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria at a glance: a clinical review. *Curr Vasc Pharmacol*. 2008; 6(4):347-353.
- Zittoun R, Bernadou A, James JM, et al. Acute myelomonocytic leukaemia: a terminal complication of paroxysmal nocturnal haemolobinuria. *Acta Haematol* 1975; 53: 241-248.
- Zhou Z, Han H, Cruz MA, López JA, Dong JF, Guchhait P. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS13: A mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb Haemost*. 2009; 101(6): 1070–1077.
- Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89: 1121-32.
- Zwicker JI, Liebman HA, Neuberg D, et al. Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6830-4.