

**Ανίχνευση πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων
με απουσία του CD55 ή και του CD59
σε ασθενείς με απλαστική αναιμία
και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα**

ΣΚΟΠΟΣ Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) είναι μια επίκτητη κλωνική διαταραχή της αιμοποίησης, που χαρακτηρίζεται από ενδαγγειακή αιμόλυση, επεισόδια φλεβικής θρόμβωσης, υποπλάσια του μυελού των οστών, λοιμώξεις και, σπάνια, εκτροπή σε οξεία λευχαιμία. Σε κυτταρικό επίπεδο, η ΝΠΑ χαρακτηρίζεται από ελάττωση ή απουσία των μορίων που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη με τη βοήθεια ενός μορίου φωσφατιδυλινοσιτόλης (ΦΙ), όπως τα CD55 και CD59. Κλώνοι «τύπου ΝΠΑ» έχουν περιγραφεί σε διάφορες αιματολογικές διαταραχές. Η σχέση της ΝΠΑ με την απλαστική αναιμία (ΑΑ) έχει πλήρως τεκμηριωθεί, ενώ αυτή μεταξύ ΝΠΑ και μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (ΜΔΣ) παραμένει ασαφής. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η παρουσία των CD55 και CD59 στην επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων σε 19 ασθενείς με ΑΑ, 118 με ΜΔΣ, 7 με ΝΠΑ και σε 121 υγιείς αιμοδότες, χρησιμοποιώντας το σύστημα μικροτυποποίησης σε γέλη sephacryl. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Έληψη και των δύο μελετούμενων μορίων από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων παρατηρήθηκε στο 36,8% των ασθενών με ΑΑ, στο 17,7% αυτών με ΜΔΣ και σε όλους τους ασθενείς με ΝΠΑ. Έληψη μόνο του CD55 βρέθηκε στο 15,7% των ασθενών με ΑΑ και στο 12,7% των ασθενών με ΜΔΣ. Τα αντίστοιχα ποσοστά των ασθενών με απουσία ή ελάττωση του CD59 από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων τους ήταν 10,5% για την ΑΑ και 2,5% για τα ΜΔΣ. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Τα αποτελέσματα αυτά παρέχουν ενδείξεις για μια πιθανή σχέση μεταξύ της ΝΠΑ, της ΑΑ και των ΜΔΣ. Περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη, ώστε να διευκρινιστούν οι κοινοί παθογενετικοί μηχανισμοί και να καθοριστούν κριτήρια ταξινόμησης για οριακές περιπτώσεις, όπου η διάγνωση είναι δύσκολη.

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) είναι μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζεται από ενδαγγειακή αιμόλυση, επεισόδια φλεβικής θρόμβωσης, μη αποτελεσματική αιμοποίηση, συχνά επεισόδια λοιμώξεων

και, σπάνια, εκτροπή σε οξεία λευχαιμία.¹⁻³ Η αιμόλυση οφείλεται στην ευαισθησία που εμφανίζουν τα παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια στη λυτική δράση του συμπληρώματος, λόγω της ελάττωσης ή της απουσίας από την επιφάνεια της μεμβράνης τους ρυθμιστικών μορίων,

Ε. Τέρπος,¹
Μ. Σαμάρκος,¹
Χ. Μελέτης,²
Β. Κομνηνάκα,¹
Ε. Αποστολίδου,¹
Ο. Μπενεποπούλου,¹
Κ. Κοροβέσης,¹
Δ. Μαυρογιάννη,¹
Κ. Αναργύρου,¹
Ν. Βύνιου,¹
Ε. Βαριάμη,¹
Κ. Κωνσταντόπουλος,¹
Γ. Μελέτης¹

¹Α΄ Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Λαϊκό Γενικό Νοσοκομείο
²Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, Αθήνα

Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndromes

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Απλαστική αναιμία
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα
Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία
CD55 (DAF)
CD59 (MIRL)

Υποβλήθηκε 7.3.2000
Εγκρίθηκε 27.7.2000

όπως το CD55 (decay accelerating factor, DAF) και το CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL).^{3,4} Τα μόρια αυτά συνδέονται φυσιολογικά με την κυτταρική μεμβράνη με τη βοήθεια ενός μορίου φωσφατιδυλοϊννοσιπόλης.⁵ Οι ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν σωματική μετάλλαξη στο φυλοσύνδετο γονίδιο *PIG-A* (glycosylphosphatidylinositol complementation group A),^{6,7} που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη απαραίτητη για τη βιοσύνθεση των μορίων φωσφατιδυλοϊννοσιπόλης.⁸ Αυτή η πρωτεΐνη μεταφέρει μια Ν-ακετυλογλυκοζαμίνη στη φωσφατιδυλοϊννοσιπόλη, για να σχηματιστεί ένα μόριο Ν-ακετυλογλυκοζαμινυλ-φωσφατιδυλοϊννοσιπόλης.⁹ Η μετάλλαξη αυτή συμβαίνει σε έναν κλώνο αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση ή την απουσία των πρωτεϊνών που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω μορίων φωσφατιδυλοϊννοσιπόλης σε όλους τους τύπους των αιμοποιητικών κυττάρων. Μερικές φορές συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο περισσότεροι του ενός κλώνοι ΝΠΑ λόγω εμφάνισης διαφορετικών μεταλλάξεων στο γονίδιο *PIG-A*.^{1,2}

Κλώνοι τύπου ΝΠΑ έχουν περιγραφεί σε διάφορες αιματολογικές διαταραχές, όπως στην απλαστική αναιμία (ΑΑ),¹⁰⁻¹³ ιδίως μετά από τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας,^{14,15} και σε μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ).^{13,16} Στα ΜΔΣ, η μη αποδοτική αιμοποίηση είναι το αποτέλεσμα μιας κλωνικής υπερπαραγωγής ενός ανώμαλου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, τόσο κινητικά, όσο και λόγω της μη φυσιολογικής απάντησης στους αυξητικούς παράγοντες.¹⁷ Μπορεί, επίσης, να υπάρχει και μη κλωνική αιμοποίηση, αν και ο παθολογικός κλώνος φαίνεται να έχει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι του φυσιολογικού υπολειμματικού κλώνου. Συνήθως τα ΜΔΣ παρουσιάζονται χωρίς εμφανή ή ιδιαιτέρη αιτία. Σε σπάνιες περιπτώσεις η απλαστική αναιμία και η ΝΠΑ μεταπίπτουν σε ΜΔΣ, ενώ συχνότερα εκτρέπονται σε οξεία λευχαιμία.^{18,19} Αν και η συσχέτιση της ΑΑ με τη ΝΠΑ έχει επαρκώς μελετηθεί,^{13,15,18} η σχέση μεταξύ ΜΔΣ και ΝΠΑ παραμένει ασαφής.

Η διάγνωση της ΝΠΑ γίνεται κλασικά με τις δοκιμασίες Ham και sucrose. Η κυτταρομετρία ροής και η μοριακή ανάλυση αποτελούν πιο ειδικές και ευαίσθητες μεθόδους διάγνωσης, αν και δεν είναι σε όλα τα εργαστήρια διαθέσιμες ως εξετάσεις ρουτίνας.^{19,20} Μια σχετικά νέα μέθοδος, το σύστημα μικροτυποποίησης σε γέλη sephacryl, χρησιμοποιείται τελευταία για την εντόπιση πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων με έλλειψη των αντιγόνων CD55 και CD59 από την επιφάνεια της μεμβράνης τους.²¹⁻²⁴ Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο αυτή για να διερευνήσουμε την ύπαρξη πληθυσμών ερυθροκυττάρων με ελάττωση ή απουσία των CD55 ή και CD59 σε

ασθενείς με ΑΑ, ΜΔΣ, ΝΠΑ και σε φυσιολογικούς αιμοδότες.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Μελετήθηκαν 137 ασθενείς, που προσήλθαν στο Εξωτερικό Αιματολογικό Ιατρείο της Κλινικής από το Νοέμβριο του 1995 έως τον Οκτώβριο του 1998. Ο πληθυσμός που μελετήθηκε περιελάμβανε 19 ασθενείς με ΑΑ και 118 ασθενείς με ΜΔΣ: 52 με ανθεκτική αναιμία (RA), 8 με ανθεκτική αναιμία με δακτυλοειδείς σιδηροβλάστες (RARS), 23 με ανθεκτική αναιμία και περίσσεια βλαστών (RAEB), 13 με ανθεκτική αναιμία και περίσσεια βλαστών σε μεταροπή (RAEB-t), 13 με χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (CMML) και 9 με ΜΔΣ και υποπλαστικό μυελό των οστών (ΥΜΔΣ). Όλοι οι ασθενείς με ΜΔΣ υποβλήθηκαν σε καρτυπική μελέτη του μυελού των οστών. Μελετήθηκαν επίσης 121 φυσιολογικοί αιμοδότες και 7 ασθενείς με ΝΠΑ, ως ομάδες ελέγχου.

Η ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη των CD55 και CD59 έγινε με τη χρήση του συστήματος μικροτυποποίησης σε γέλη sephacryl (DiaMed-ID Micro Typing System-PNH test, DiaMed AG, Switzerland). Χρησιμοποιήθηκε φλεβικό αίμα σε EDTA-K₃ και η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε μέσα στις πρώτες 6 ώρες από τη λήψη του δείγματος. Αρχικά, παρασκευαζόταν εναιώρημα ερυθροκυττάρων 0,8% (v/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος 0,8% (ID-diluent 2, modified LISS) σε θερμοκρασία δωματίου. 50 μL του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων τοποθετούνταν στην άνω επιφάνεια τριών μικροσωληναρίων, που περιείχαν γέλη sephacryl με κονίκλειο ανοσοσφαιρίνη κατά ποντικού. Στη συνέχεια, 50 μL μονοκλωνικού αντι-ανθρώπινου CD55 (clone BRIC 216), CD59 (clone MEM 43) και ID-PNH-αρνητικού μάρτυρα (dilution buffer for anti-CD55 and anti-CD59) τοποθετούνταν στα αντίστοιχα μικροσωληνάκια. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 15 min και φυγοκέντρηση στα 126 g για 10 min σε ID-φυγόκεντρο 24S (CE conform, DiaMed-Hellas Ltd).

Οι φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί, που έφεραν στην επιφάνειά τους CD55 ή CD59, παρέμεναν στην κορυφή των αντίστοιχων μικροσωληναρίων συνδεδεμένοι με τα σωματίδια της γέλης (θετικοί πληθυσμοί). Αντίθετα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια με απουσία των αντιγόνων CD55 ή CD59 δεν παρουσίαζαν συγκόλληση και καθίζαναν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων (αρνητικοί πληθυσμοί). Όταν ανιχνεύονταν θετικοί και αρνητικοί πληθυσμοί, ένα μόνο τμήμα του αριθμού των ερυθροκυττάρων εμφάνιζε την έλλειψη του μελετούμενου αντιγόνου. Σε αρχικά πειράματα, χρησιμοποιώντας διάφορα μίγματα (75%, 50%, 25% και 10%) ερυθρών αιμοσφαιρίων ασθενών με ΝΠΑ και πλήρη απουσία των CD55 και CD59, και συμβατών ερυθροκυττάρων φυσιολογικών ατόμων, βρέθηκε ότι μπορούσαν να ανιχνευθούν πληθυσμοί ερυθρών με έλλειψη του CD55 ή και του CD59 σε ποσοστό 10% και άνω του συνολικού αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων.²² Η αξιολόγηση της παρουσίας των υποπληθυσμών ερυθροκυττάρων γινόταν από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και εκφραζόταν ημιποσοτικά ως 100%, 75%, 50%, 25% και 10% του συνόλου των ερυθρών. Σε όλες τις περιπτώσεις με CD55 ή CD59-αρ-

νητικούς πληθυσμούς ερυθρών εκτελούνταν οι δοκιμασίες Ham και sucrose.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταξύ των φυσιολογικών ατόμων βρέθηκαν δύο με 10% αρνητικούς πληθυσμούς ερυθρών για τα αντιγόνα CD55 και CD59 (1,6%), ένας με μόνο 10% απουσία του CD55 (0,8%) και δύο με 10% απουσία μόνο του CD59 (1,6%). Όλοι οι ασθενείς με ΝΠΑ παρουσίαζαν σύγχρονη έλλειψη των CD55 και CD59. Σε 7/19 (36,8%) ασθενείς με ΑΑ βρέθηκε σύγχρονη απουσία των CD55 και CD59, ενώ η συχνότητα της μεμονωμένης έλλειψης των CD55 και CD59 ήταν 15,7% (3/19) και 10,5% (2/19), αντίστοιχα. Διπλοί αρνητικοί πληθυσμοί βρέθηκαν σε 21/118 (17,7%) ασθενείς με ΜΔΣ και μεμονωμένη απουσία των CD55 και CD59 παρατηρήθηκε στο 12,7% (15/118) και 2,5% (3/118) των ασθενών, αντίστοιχα.

Μεταξύ των 118 ασθενών με διάφορους τύπους ΜΔΣ, η συχνότητα της σύγχρονης έλλειψης των CD55/CD59 κυμαινόταν από 7,6–55,5% (πίν. 1). Η υψηλότερη συχνότητα (5/9, 55,5%) παρατηρήθηκε σε ασθενείς με υποπλαστικό μυελό (ΥΜΔΣ). Υψηλές συχνότητες βρέθηκαν επίσης σε ασθενείς με RAEB (30,4%) και RARS (25%). Μεμονωμένη απουσία του CD55 παρατηρήθηκε με μεγαλύτερη συχνότητα στους ασθενείς με RARS (37,5%) και RAEB-t (23%), ενώ έλλειψη της έκφρασης μόνο του CD59 βρέθηκε σε 3/52 (5,7%) περιπτώσεις με RA.

Το ποσοστό των ερυθροκυττάρων με μεμονωμένη έλλειψη των CD55 ή CD59 σπάνια υπερέβαινε το 10% του συνολικού πληθυσμού. Σε ασθενείς με σύγχρονη απουσία των CD55/CD59, το ποσοστό των ερυθρών αιμοσφαιρίων με απουσία του CD55 κυμαινόταν μεταξύ

10% και 50%, ενώ αυτών με απουσία του CD59 μεταξύ 10% και 75% (πίν. 2). Μόνο σε 2/7 ασθενείς με ΝΠΑ η απουσία των δύο αντιγόνων αφορούσε το σύνολο των ερυθροκυττάρων. Θετικές δοκιμασίες Ham και sucrose βρέθηκαν σε όλους τους ασθενείς με ΝΠΑ, σε 4/19 (21%) ασθενείς με ΑΑ και σε έναν ασθενή με ΥΜΔΣ. Οι 4 ασθενείς με ΑΑ και θετικές δοκιμασίες Ham και sucrose παρουσίαζαν ταυτόχρονη έλλειψη των CD55/CD59, σε ποσοστό που κυμαινόταν μεταξύ 25–50% και 25–75%, αντίστοιχα. Ωστόσο, 3 ασθενείς με συνδυασμένη απουσία των αντιγόνων CD55 και CD59 σε ποσοστό 10–50% του ερυθροκυτταρικού πληθυσμού είχαν αρνητικές δοκιμασίες Ham και sucrose, ενώ οι περισσότερες περιπτώσεις με αρνητικό αποτέλεσμα διαπιστώθηκαν σε ασθενείς με μεμονωμένες ελλείψεις, συνήθως σε ποσοστό ίσο ή μικρότερο του 10% των ερυθροκυττάρων.

Ο καρτυπικός έλεγχος των ασθενών με ΥΜΔΣ ανέδειξε δύο ασθενείς με ανωμαλία στο 7 χρωμόσωμα (7q-), έναν με τρισωμία 8, έναν με del20, ενώ 5 είχαν φυσιολογικό καρύτυπο. Σύγχρονη απουσία των CD55/CD59 από την επιφάνεια των ερυθροκυττάρων βρέθηκε στον ασθενή με τρισωμία 8 (25%, 75%), στον ασθενή με del20 (10%, 10%) και σε 2 από τις 4 περιπτώσεις με φυσιολογικό χρωμοσωμικό έλεγχο (10%, 10%), ενώ οι ασθενείς με έλλειψη του 7q είχαν φυσιολογικούς ερυθροκυτταρικούς πληθυσμούς.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ΝΠΑ έχει συσχετιστεί με διάφορες αιματολογικές διαταραχές. Η σχέση της με την ΑΑ έχει συχνά μελετηθεί και η ύπαρξη κοινών παθογενετικών μηχανισμών έχει τεκμηριωθεί.^{10,12,13,15} Οι κλώνοι ΝΠΑ που έχουν πε-

Πίνακας 1. Ομάδες των ατόμων που ελέγχθηκαν για την εμφάνιση πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων με απουσία του CD55 ή και του CD59.

Διάγνωση	No	CD55(-)/CD59(-)	CD55(-)/CD59(+)	CD55(+)/CD59(-)
Φυσιολογικά άτομα	121	2/121 (1,6%)	1/121 (0,8%)	2/121 (1,6%)
Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία	7	7/7 (100%)	0/7	0/7
Απλαστική αναιμία	19	7/19 (36,8%)	3/19 (15,7%)	2/19 (10,5%)
Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα	118	21/118 (17,7%)	15/118 (12,7%)	3/118 (2,5%)
RA	52	5/52 (9,6%)	7/52 (13,4%)	3/52 (5,7%)
RARS	8	2/8 (25%)	3/8 (37,5%)	0/8
RAEB	23	7/23 (30,4%)	1/23 (4,3%)	0/23
RAEB-t	13	1/13 (7,6%)	3/13 (23%)	0/13
CMMML	13	1/13 (7,6%)	1/13 (7,6%)	0/13
ΥΜΔΣ	9	5/9 (55,5%)	0/9	0/9

Πίνακας 2. Ποσοστό πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων με έλλειψη του CD55 ή και του CD59. (ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιριουρία, ΥΜΔΣ: Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο με υποκυτταρικό μυελό των οστών).

Διάγνωση (No)	% CD55(-)/CD59(-) (No)	% CD55(-)/CD59(+) (No)	% CD55(+)/CD59(-) (No)
Φυσιολογικά (121)	10-10 (2)	10 (1)	10 (2)
ΝΠΑ (7)	25-10 (3)	0	0
	25-25 (1)		
	75-50 (1)		
	100-100 (2)		
Απλαστική αναιμία (19)	10-25 (1)	10 (3)	10 (1)
	25-50 (1)		25 (1)
	25-75 (1)		
	50-25 (3)		
	50-75 (1)		
RA (52)	10-10 (4)	10 (7)	10 (3)
	10-25 (1)		
RARS (8)	10-10 (1)	10 (3)	0
	10-25 (1)		
RAEB (23)	10-10 (3)	10 (1)	0
	10-25 (1)		
	10-75 (1)		
	25-50 (1)		
	25-75 (1)		
RAEB-t (13)	10-10 (1)	10 (3)	0
CMMML (13)	10-10 (1)	10 (1)	0
ΥΜΔΣ (9)	10-10 (4)	0	0
	25-75 (1)		

ριγραφεί στην ΑΑ συνήθως δεν προκαλούν αιμόλυση, λόγω του μικρού αριθμού ερυθροκυττάρων με ελαττωμένη έκφραση των αντιγόνων που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη με τη βοήθεια μορίων φωσφατιδυλοϊνοσιόλης.²⁵ Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια 7/19 ασθενών με ΑΑ (36,8%) είχαν ταυτόχρονη έλλειψη των CD55 και CD59. Οι δοκιμασίες Ham και sucrose ήταν θετικές σε 4 ασθενείς, χωρίς αυτοί να εμφανίζουν στοιχεία αιμόλυσης. Στους ασθενείς αυτούς, που πληρούσαν όλα τα κριτήρια της βαριάς ΑΑ, η παρουσία των κλώνων τύπου ΝΠΑ δεν επηρέαζε την κλινική τους εικόνα και η θεραπευτική τους προσέγγιση βασίστηκε στη μυελική ανεπάρκεια κυρίως και όχι στην παρουσία των πληθυσμών τύπου ΝΠΑ.²⁵ Ένα μικρό ποσοστό ερυθροκυττάρων τύπου ΝΠΑ έχει αναφερθεί ότι εμφανίζεται ακόμα και σε φυσιολογικά άτομα,^{20,26} φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στην παρούσα μελέτη, όπου 5 από τους 121 φυσιολογικούς αιμοδότες παρουσίασαν πληθυσμούς ερυθροκυττάρων με απουσία των CD55 ή και των CD59. Αν και τα κύτταρα της ΝΠΑ δεν εμφανίζουν πλεονέκτημα ανάπτυξης στο μικροπεριβάλλον του φυσιολογικού μυελού των οστών, είναι πιθανό ότι σε περιπτώσεις καταστολής των αρχέγονων αιμοποι-

ητικών κυττάρων ο κλώνος της ΝΠΑ έχει τη δυνατότητα να «ξεφεύγει» από τη δράση των κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και να αναπτύσσεται εκλεκτικά, οδηγώντας έτσι στην παραγωγή αιμοποιητικών κυττάρων με φαινότυπο ΝΠΑ.^{2,19,25,26}

Οι ασθενείς με ΥΜΔΣ διαχωρίστηκαν σε αυτή τη μελέτη από τους άλλους υπότυπους των ΜΔΣ (σύμφωνα με την κατά FAB ταξινόμηση, όλοι ανήκαν στην κατηγορία της RA), λόγω των ιδιαίτερων ομοιοτήτων μεταξύ της ΑΑ και των ΥΜΔΣ. Σε αρκετές περιπτώσεις, οι δύο οντότητες διαχωρίζονται δύσκολα με βάση τα κλινικά δεδομένα και την ιστολογική εικόνα της βιοψίας του μυελού των οστών, ιδιαίτερα όταν ο καρυότυπος είναι φυσιολογικός.²⁷ Στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών των ασθενών με ΑΑ παρατηρείται αυξημένος αριθμός ενεργοποιημένων CD8+ T-λεμφοκυττάρων, τα οποία αναστέλλουν την *in vitro* ανάπτυξη τόσο των αυτόλογων όσο και των HLA-συμβατών αποικιών αιμοποιητικών κυττάρων,²⁸ ενώ συγχρόνως προάγουν την απόπτωσή τους στο μυελό, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μυελικής ανεπάρκειας.²⁵ Ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να συμβαίνει και στους ασθενείς με ΥΜΔΣ, έτσι

ώστε να μπορεί να ερμηνευθούν τα υψηλά ποσοστά ανταπόκρισης των ασθενών αυτών στην ανοσοκατασταλτική αγωγή με κυκλοσπορίνη ή αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη.^{29,30}

Έχει περιγραφεί η σχέση μεταξύ ΝΠΑ και ΜΔΣ, χωρίς ωστόσο να έχει διευκρινιστεί η παθογενετική συσχέτιση των δύο οντοτήτων. Το 1998, οι Iwanaga et al ανέφεραν ότι παρατήρησαν απουσία των CD55 και CD59 από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και τα πολυμορφοπύρνα στο 10% των ασθενών με RA,¹⁶ ενώ οι Dunn et al, πρόσφατα, δημοσίευσαν ότι τα πολυμορφοπύρνα 9/39 ασθενών (23%) με ΜΔΣ παρουσίαζαν έλλειψη των μορίων που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης.¹³ Στην παρούσα μελέτη, σύγχρονη απουσία των CD55 και CD59 παρατηρήθηκε στο 17,7% των ασθενών με ΜΔΣ. Το φαινόμενο αυτό ήταν συχνότερο στους ασθενείς με υψηλής κακοήθειας ΜΔΣ (8/36 ασθενείς με RAEB και RAEB-t, 22,2%) σε σχέση με τους ασθενείς με χαμηλής κακοήθειας ΜΔΣ (7/60 ασθενείς με RA και RARS, 11,6%). Η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης πληθυσμών ερυθροκυττάρων με έλλειψη CD55 και CD59 σε βαρύτερης πρόγνωσης ΜΔΣ και το μεγάλο ποσοστό παρουσίας ανάλογων πληθυσμών σε ΥΜΔΣ τονίζουν τη σχέση μεταξύ ΝΠΑ και ΜΔΣ, αν και ο παθογενετικός μηχανισμός που οδηγεί στο κοινό βιοχημικό έλλειμμα μπορεί να είναι διαφορετικός στις δύο οντότητες.

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να γίνει η διάκριση μεταξύ της ΝΠΑ, ως νοσολογικής οντότητας, και της φαινοτυπικής ανωμαλίας που μπορεί να ανιχνευθεί σε διάφορες κλωνικές αιματολογικές διαταραχές. Η διάκριση αυτή δεν είναι πάντα ξεκάθαρη. Στην παρούσα μελέτη, γυναίκα 20 ετών, με ΥΜΔΣ, εμφάνισε 25% έλλειψη του CD55 και 75% έλλειψη του CD59. Οι δοκιμασίες Ham και sucrose ήταν θετικές, χωρίς ωστόσο στοιχεία αιμόλυσης. Η καρυοτυπική ανάλυση ανέδειξε τρισωμία 8 σε

όλες τις μεταφάσεις.³¹ Αντίστοιχα, έχει πρόσφατα περιγραφεί μία περίπτωση ΜΔΣ με τρισωμία 8 με 3% πολυμορφοπύρνα με φαινότυπο ΝΠΑ, ενώ τα υπόλοιπα είχαν φυσιολογικό φαινότυπο.¹⁶ Καθώς η τρισωμία 8 θεωρείται ως δείκτης κλωνικότητας στα ΜΔΣ, είναι φανερό ότι, στην περίπτωση αυτή, ο ίδιος κλώνος παρουσιάζει χαρακτηριστικά ΜΔΣ και ΝΠΑ, χωρίς να είναι εφικτό να διαπιστωθεί ποια ήταν η αρχική ανωμαλία. Τέλος, έχει περιγραφεί περίπτωση ΑΑ με ταυτόχρονη εξέλιξη σε ΜΔΣ και ΝΠΑ.³² Οι περιπτώσεις αυτές αποδεικνύουν την πολύπλοκη σχέση μεταξύ των ΝΠΑ, ΑΑ και ΜΔΣ και παρέχουν ενδείξεις για την πιθανότητα ύπαρξης κοινών παθογενετικών μηχανισμών.

Στην παρούσα μελέτη, η συχνότητα των ερυθροκυττάρων με μεμονωμένη έλλειψη του CD55 ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των κυττάρων με μεμονωμένη έλλειψη του CD59. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να εξηγηθεί από μια εκλεκτική παραμονή του CD59 στα ερυθρά των ασθενών με ΝΠΑ.^{20,33}

Τα δεδομένα από τη μελέτη παρέχουν σαφείς ενδείξεις για την παρουσία φαινότυπου ερυθρών τύπου ΝΠΑ σε ασθενείς με ΑΑ και ΜΔΣ. Εντούτοις, παρά τις σημαντικές πληροφορίες, η ανίχνευση των υποπληθυσμών ερυθρών τύπου ΝΠΑ με τη χρήση του συστήματος μικροτυποποίησης με γέλη sephacryl (ID-PNH) παραμένει μια καθαρά ημιποσοτική μέθοδος εκτίμησης της απουσίας του CD55 ή και του CD59 από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και εμφανίζει το μειονέκτημα της αδυναμίας ανίχνευσης του φαινότυπου ΝΠΑ σε άλλα αιμοποιητικά κύτταρα πλν των ερυθροκυττάρων. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες, με τη χρήση τόσο κυτταρομετρίας ροής όσο και μοριακών τεχνικών, για την πλήρη κατανόηση της σχέσης μεταξύ ΝΠΑ, ΑΑ και ΜΔΣ και για τη θέσπιση διαγνωστικών κριτηρίων σε οριακές περιπτώσεις ασθενών, όπου η διάγνωση είναι πολύ δύσκολο να τεκμηριωθεί.

ABSTRACT

Detection of CD55 and/or CD59 deficient red cell populations in patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndromes

E. TERPOS,¹ M. SAMARKOS,¹ C. MELETIS,² V. KOMNINAKA,¹ E. APOSTOLIDOU,¹ O. BENOPOULOU,¹ K. KOROVESIS,¹ D. MAVROGIANNI,¹ K. ANARGYROU,¹ N. VINIOU,¹ E. VARIAMI,¹ K. KONSTANTOPOULOS,¹ J. MELETIS¹

¹First Department of Internal Medicine, University of Athens, School of Medicine, Laiko General Hospital, Athens

²Department of Electrical and Computer Engineering, National Technical University of Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2000, 17(4):383-389

OBJECTIVE Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is an acquired clonal stem cell disorder characterized by intravascular hemolysis, venous thrombosis, marrow hypoplasia, frequent episodes of infection and, rarely,

leukemic conversion. At the cellular level PNH is characterized by the decrease or absence of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules, such as CD55 and CD59, on the cell surface. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-like clones have been described in various hematological disorders. The link between PNH and aplastic anemia (AA) is established but the relationship of PNH with myelodysplastic syndromes (MDS) remains unclear. **METHOD** In this study the presence of CD55 and/or CD59 defective (PNH-like) red cell populations was evaluated in 19 patients with AA, 118 with MDS and 7 with PNH, and in 121 healthy blood donors, using the sephacryl gel test microtyping system. **RESULTS** Red cell populations deficient in both molecules CD55 and CD59 were detected in 36.8% of AA patients, in 17.7% of MDS patients and in all PNH patients. CD55 deficient red cell populations were found in 15.7% of patients with AA and in 12.7% of patients with MDS. CD59 deficient populations were found in 10.5% of patients with AA and in 2.5% of patients with MDS. **CONCLUSIONS** These results indicate an association between PNH, AA and MDS. Further investigation is necessary to elucidate the mechanisms of this association, and to define classification criteria for borderline cases, where diagnosis is difficult.

Key words: Aplastic anemia, CD55 (DAF), CD59 (MIRL), GPI-anchor proteins, Myelodysplastic syndromes, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Βιβλιογραφία

- ROSTI V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2000, 85:82–87
- LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101–110
- ΜΕΛΕΤΗΣ Ι, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαινουρία. Παθογενετικοί μηχανισμοί. *Ιπποκράτης* 1998, 6:112–129
- NAKAKUMA H. Mechanism of intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Am J Hematol* 1996, 53:22–29
- ROSSE WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990, 36:142–145
- BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, LUZZATTO L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 1994, 343:951–953
- TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, LIDA Y, ENDO Y, FUJITA T ET AL. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the *PIG-A* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73:703–711
- KINOSHITA T, INOUE N, TAKEDA J. Defective glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Adv Immunol* 1995, 60:57–103
- MASTERON W, DOERING T, HART G, ENGLUND PT. A novel pathway for the glycan assembly: biosynthesis of the glycosyl-phosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. *Cell* 1989, 56:793–800
- GRUISCELLI-BENNACEUR A, GLUCKMAN E, SCROBOHACI ML, JONVEAUX P, VU T, BAZARBACHIA ET AL. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood* 1995, 85:1354–1363
- NAGARAJAN S, BRODSKY RA, YOUNG NS, MEDOF ME. Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. *Blood* 1995, 85:4656–4661
- SCHREZENMEIER H, HERTENSTEIN B, WAGNER B, RAGHAVACHER A, HEIMPEL HA. Pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored protein. *Exp Hematol* 1995, 23:81–87
- DUNN DE, TANAWATTANACHAROEN P, BOCCUNI P, NAGAKURA S, GREEN SW, KIRBY MR ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999, 131:401–408
- DE PLANQUE MM, BACIGALUPO A, WURSCH A, HOWS JM, DEVERGIE A, FRICKHOFEN N ET AL. Long-term follow-up of severe aplastic patients treated with antithymocyte globulin. Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 1989, 73:121–126
- PIAGGIO G, PODESTA M, PITTO A, SESSAREGO M, FIGARI O, FUGAZZA G ET AL. Coexistence of normal and clonal haemopoiesis in aplastic anaemia patients treated with immunosuppressive therapy. *Br J Haematol* 1999, 107:505–511
- IWANAGA M, FURUKAWA K, AMENOMORI T, MORI H, NAKAMURA H, FUCHIGAMI K ET AL. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1998, 102:465–474
- GREENBERG PL. Biologic and clinical implications of marrow culture studies in the myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 1996, 33:163–175
- ΜΕΛΕΤΗΣ Ι, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαινουρία. Κλινική εικόνα-σχέση με άλλα αιματολογικά νοσήματα. *Ιπποκράτης* 1999, 7:1–16
- ROTOLI B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Baillier's Clin Hematol* 1989, 2:113–138
- KWONG YL, LEE CP, CHAN TK, CHAN TC. Flow cytometric measurement of glycosylphosphatidyl-inositol-linked surface proteins on

- blood cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Clin Pathol* 1994, 102:30–35
21. GUIMBRETIERE L, BERNARD D, MAISONNEUVE H, HAROUSSEAU JL, GUIMBRETIERE J, MULLER JY ET AL. Diagnostic de l'hémoglobinurie nocturne paroxystique: utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la glycoprotéine DAF. *Presse Med* 1993, 22:467–471
 22. MELETIS J, MICHALI E, SAMARKOS M, KONSTANTOPOULOS K, MELETIS C, TERPOS E ET AL. Detection of "PNH red cell" populations in hematological disorders using the sephacryl gel test microtyping system. *Leuk Lymphoma* 1997, 28:177–182
 23. NILSON BO, HAGSTROM U, ENGLUND A, SAFWENBERG J. A simplified assay for the specific diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Detection of DAF (CD55)⁻ and HRF20 (CD59)⁻ erythrocytes in microtyping cards. *Vox Sang* 1993, 64:43–46
 24. NOVENOT JM, BERNARD D, PETIT-FRIOUX Y, LOIRAT MJ, GUIMBETIERE J, MULLER JY ET AL. Diagnostic rapide des hémoglobinuries nocturnes paroxystiques par agglutination en gel. *Revue Fr Transf D'Hemobiol* 1993, 36:135–147
 25. TREMML G, KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Learning about PNH cells from patients and mice. *Haema* 1998, 1:12–20
 26. HILLMEN P, RICHARDS SJ. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2000, 108:470–479
 27. TUZUNER N, COX X, ROWE JM, WATROUS D, BENNETT JM. Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br J Haematol* 1995, 91:612–617
 28. ZOUMBOS NC, GASCON P, DJEU JY, TROST SR, YOUNG NS. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Engl J Med* 1985, 312:257–265
 29. JOHASOVA A, NEUWIRTOWA R, CERMAK J, VOZOBULOVA V, MOCIKOVA K, SISKOVA M ET AL. Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *Br J Haematol* 1998, 100:304–309
 30. MOLLDREM JJ, CAPLES M, MAVROUDIS D, PLANTE M, YOUNG NS. Antithymocyte globulin for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 1997, 99:699–705
 31. VINIOU N, MICHALI E, MELETIS J, ANDREOPOULOS A, VAIPOULOS G, STAVROGIANNI N ET AL. Trisomy 8 in a patient who responded to therapy with all-trans-retinoid acid and developed paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1997, 97:135–136
 32. NAGAKURA S, KAWAGUCHI T, FUJIMOTO K, HORIKAWA K, IWAMOTO N, NAKAKUMA H. Sequential development of myelodysplasia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in a patient with preceding aplastic anemia. *Int J Hematol* 1997, 65:187–189
 33. WILCKOX LA, EZZELL JL, BERNSHAW NJ, PARKER CJ. Molecular basis of the enhanced susceptibility of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria to hemolysis in acidified serum. *Blood* 1991, 78:820–829
- Corresponding author:*
- C. Meletis, First Department of Internal Medicine, University of Athens, School of Medicine, Laiko General Hospital, 17 Ag. Thoma street, GR-115 27 Athens, Greece
E-mail: imeletis@cc.uoa.gr
-