

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Κλινική εικόνα, διάγνωση και αντιμετώπιση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) αποτελεί επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, που χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση ενδαγγειακής αιμόλυσης, απλασίας του μυελού των οστών, θρομβωτικών διαταραχών και σπάνια εκτροπής προς οξεία λευχαιμία. Η κύρια μοριακή βλάβη της ΝΠΑ εντοπίζεται στο γονίδιο PIG-A (phosphatidylinositol glycan group A), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα Χ. Μεταλλάξεις του PIG-A αναστέλλουν τη σύνθεση της γλυκοσυλφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI), που χρησιμεύει ως «άγκυρα» για την πρόσδεση στην κυτταρική μεμβράνη αρκετών πρωτεϊνών. Αποτέλεσμα των ανωτέρω είναι η ανεπάρκεια ή η πλήρης έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών από την επιφάνεια των κυττάρων του αίματος. Τα μόρια CD55 και CD59 είναι τέτοιες πρωτεΐνες που προσδένονται στη μεμβράνη μέσω GPI και μετέχουν στη ρύθμιση του συμπληρώματος. Η απουσία τους από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων στη ΝΠΑ ευθύνεται για τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα ενδαγγειακή αιμόλυση, που αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό της νόσου και ευθύνεται για πολλές από τις κλινικές εκδηλώσεις της. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A μπορεί να βρεθούν και σε υγιή άτομα, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι οι μεταλλάξεις του PIG-A στα αιμοποιητικά κύτταρα δεν είναι αρκετές για την εμφάνιση της ΝΠΑ. Προφανώς, απαιτείται μια θετική επιλογή ανάπτυξης ή ένα εσωτερικό πλεονέκτημα του PIG-A (-) κλώνου ΝΠΑ ή μια αρνητική επιλογή έναντι του PIG-A (+) κλώνου των αιμοποιητικών κυττάρων για την εκδήλωση του κλινικού συνδρόμου της ΝΠΑ. Η παρούσα ανασκόπηση περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία που υπάρχουν μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία για τους παθογενετικούς μηχανισμούς οι οποίοι οδηγούν στην ανάπτυξη της ΝΠΑ στον άνθρωπο.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) είναι σπάνια νόσος, η οποία οφείλεται σε μια επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο PIG-A, με αποτέλεσμα ανεπάρκεια των πρωτεϊνών που συνδέονται με την «άγκυρα» γλυκοσυλο-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (GPI). Η ανεπάρκεια αυτή και ιδιαίτερα των ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος CD55 (decay-accelerating factor, DAF) και CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL) έχει ως αποτέλεσμα υπερευαισθησία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων στη δράση του αυτόλογου συμπληρώματος που οδηγεί σε ενδαγγειακή αιμόλυση και θρομβώσεις, οι οποίες αποτελούν και τις κύριες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου.¹⁻⁵ Κλώνοι ΝΠΑ εμφανίζονται συχνά

σε νοσήματα που εκδηλώνονται με μυελική ανεπάρκεια και κυρίως απλαστική αναιμία (AA), ενώ η κύρια αιτία θανάτου των ασθενών με ΝΠΑ είναι οι θρομβωτικές επιπλοκές λόγω της συνυπάρχουσας θρομβοφιλίας.

Η ΝΠΑ διακρίνεται στην κλασική μορφή, τη μορφή που συνοδεύει άλλα κλωνικά αιματολογικά νοσήματα και την υποκλινική μορφή, στην οποία δεν υπάρχει κάποια κλινική ή εργαστηριακή ένδειξη αιμόλυσης, μυελικής ανεπάρκειας ή θρομβοφιλίας.

Η σωματική μετάλλαξη ή οι μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A είναι απαραίτητη αλλά όχι και επαρκής συνθήκη για την εμφάνιση της ΝΠΑ, αφού παρόμοιες μεταλλάξεις έχουν βρεθεί ακόμη και σε φυσιολογικά άτομα, ενώ η νόσος εμφανίζεται μόνο αν επικρατήσει ο παθολογικός κλώνος. Ενδεχομένως, θεωρείται ότι ο κλώνος αυτός επικρατεί με

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(4):454-478
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(4):454-478

Γ.Χ. Μελέτης,¹
Α. Σαραντόπουλος,¹
Ι.Β. Ασημακόπουλος,¹
Ε. Τέρπος²

¹Α΄ Παθολογική Κλινική, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

²Τμήμα Ιατρικής Έρευνας, 251 Γενικό Νοσοκομείο Αεροπορίας, Αθήνα

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Clinical presentation, diagnosis and treatment

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

CD55
CD59
DAF
Θεραπεία
Κλινική εικόνα
MIRL
Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Υποβλήθηκε 30.9.2008
Εγκρίθηκε 20.10.2008

εμφάνιση αρνητικής επιλογής. Φαίνεται ότι η GPI πιθανότατα διαδραματίζει το ρόλο ενός αυτοαντισώματος, έναντι του οποίου αναπτύσσεται μια κυτταροτοξική αντίδραση από τα T-λεμφοκύτταρα, τόσο τα CD4⁺ όσο και τα CD8⁺. Η όλη αυτή διαδικασία δυνητικά έχει σχέση και με το σύστημα HLA-DR2. Η απώλεια όμως των GPI-συνδεδεμένων πρωτεϊνών (GPI-APs) καθιστά τα αιμοποιητικά κύτταρα-στόχους ανθεκτικά στη δράση των αυτοαντιδρώντων T-κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και έτσι ευνοείται η ανάπτυξη του κλώνου ΝΠΑ.⁶

Επίσης, έχουν αναφερθεί και άλλες διαταραχές των T-λεμφοκυττάρων των ασθενών με ΝΠΑ, όπως των NK-κυττάρων με αύξηση των KIR υποδοχέων, του CD25, CD54 και του HLA-DR, και έτσι ένας πληθυσμός ερυθράς σειράς με έλλειψη GPI-APs αποκτά ένα πλεονέκτημα ανάπτυξης, αφού είναι λιγότερο ευαίσθητος στην καταστροφή από τα NK-κύτταρα. *In vitro*, τα προγονικά κύτταρα των ασθενών με ΝΠΑ είναι ανθεκτικότερα στη δράση της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και του παράγοντα νέκρωσης του όγκου-α (TNF-α) και εκφράζουν πιθανότατα λιγότερα γονίδια απόπτωσης, ενώ και η διαφοροποίηση των GPI (-) μονοκυττάρων φαίνεται να είναι ελαττωματική, με αποτέλεσμα τα δενδριτικά κύτταρα να έχουν ανεπαρκή αντιγονοπαρουσιαστική ικανότητα.

Η επέκταση όμως του κλώνου ΝΠΑ στο επίπεδο των CD34⁺ κυττάρων δεν μπορεί να αποδοθεί στα αυτοαντιδραστικά T-λεμφοκύτταρα κατά της GPI, αφού τότε δεν ερμηνεύεται πώς διαφεύγει ο επικρατών κλώνος ΝΠΑ από την επιλογή ή πώς ένας μικρός κλώνος με ίδια αντιγονικά χαρακτηριστικά συμπιέζεται με αρνητική επιλογή. Πιθανότατα, η ανάπτυξη του παθολογικού κλώνου ΝΠΑ απαιτεί την επιπλέον παρουσία και κάποιου άλλου παράγοντα.

Από τους Luzzatto και Bessler προτάθηκε ότι το δεύτερο γεγονός που παρέχει κάποιο πλεονέκτημα ανάπτυξης και επέκτασης του κλώνου ΝΠΑ μετά από τη μετάλλαξη PIG-A είναι η μυελική ανεπάρκεια λόγω έλλειψης ικανού αριθμού μη κλωνικών αρχέγονων κυττάρων σε συνθήκες stress αιμοποίησης, ενώ άλλοι θεωρούν ότι η μυελική ανεπάρκεια συμμετέχει λόγω της ύπαρξης γονιδιακής αστάθειας στον κλώνο ΝΠΑ. Παρόλο που ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην παθογένεια της ΝΠΑ είναι αδιαμφισβήτητος και κυριαρχεί στην όλη διαδικασία, παραμένουν ακόμη αρκετά ζητήματα προς διευκρίνιση.

2. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ

Η ΝΠΑ είναι μια σπάνια νόσος (1–2 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο κατοίκων) που προσβάλλει όλες τις ηλικίες,

με συχνότερη ηλικία προσβολής τα 30–50 έτη. Περίπου 10% των ασθενών είναι <20 ετών, ενώ σπάνια είναι η εμφάνιση της νόσου πριν από την ηλικία των 10 ετών.^{6–10} Φαίνεται ότι υπάρχει και μια όψιμη αυξημένη συχνότητα της στην 7η δεκαετία.^{9,10} Στην Ευρώπη, η προσβολή των γυναικών σε σχέση με τους άνδρες είναι ελαφρά συχνότερη (1,2/1),^{11,12} ενώ οι άνδρες φαίνεται να προσβάλλονται συχνότερα στην Ασία.¹³ Η νόσος στα παιδιά συχνά δεν διαγιγνώσκεται έγκαιρα, με επακόλουθα προβλήματα στον κατάλληλο χειρισμό των ασθενών.¹⁴

Η ΝΠΑ συνήθως εκδηλώνεται με αιμολυτική αναιμία, φλεβικές θρομβώσεις, απλασία ή μυελική δυσπλασία, που μπορεί να θεωρηθεί ότι οφείλεται στη δράση κάποιου χημικού παράγοντα, όπως φαρμάκων, βιομηχανικών ή γεωργικών προϊόντων, όπως συμβαίνει στις περιπτώσεις απλαστικής αναιμίας.^{4,7,8,10,15,16} Σε μία περίπτωση αναφέρεται ως αιτία της ΝΠΑ ιογενής λοίμωξη του τύπου της λοιμώδους μονοπυρήνωσης.¹⁷

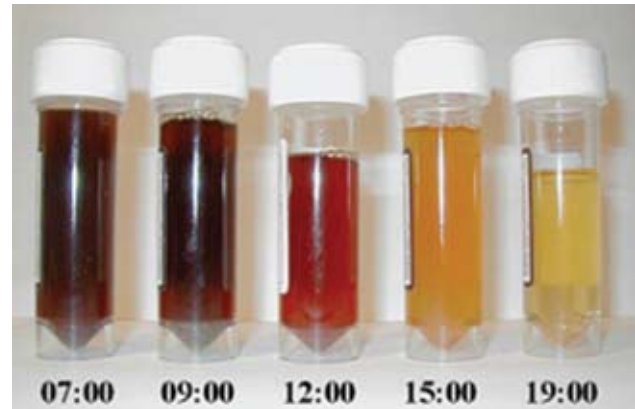
2.1. Κλινικά σημεία και μορφές της νόσου

Το κλινικό και εργαστηριακό υπόβαθρο της νόσου είναι εκείνο μιας αιμολυτικής αναιμίας με αρνητική αντίδραση Coombs. Επειδή η ΝΠΑ μπορεί να εμφανιστεί ως εκδήλωση μιας υποκείμενης νόσου του μυελού, η αιμόλυση ενδεχομένως να ευθύνεται για ένα μέρος της αναιμίας, αφού ανάλογα με το ποσοστό των ερυθρών με πλήρη ή μερική έλλειψη των CD55 ή και CD59 η αιμόλυση μπορεί να κυμαίνεται από πολύ βαριά μέχρι πλήρη έλλειψη αυτής, καθώς η μερική έλλειψη συνήθως αρκεί για την προστασία των ερυθρών από τη λύση μέσω του συμπληρώματος. Επίσης, η αιμόλυση μπορεί να επιταθεί οξέως και επεισοδιακά σε καταστάσεις ενεργοποίησης του συμπληρώματος, όπως λοιμώξεις, τραυματισμούς, εγκυμοσύνη, καταστάσεις stress κ.λπ.¹⁶ Η ΝΠΑ θεωρείται ως «ο μεγάλος υποδύομενος» ανάμεσα στα νοσήματα του αίματος λόγω των διαφόρων συμπτωμάτων που παρατηρούνται τόσο κατά την αρχική της εμφάνιση όσο και κατά τη διάρκεια της πορείας της. Ο πλέον κλασικός τύπος της νόσου είναι η επίκτητη αιμολυτική αναιμία από ενδοερυθροκυτταρικό αίτιο σε ένα νέο ενήλικα, η οποία συνοδεύεται από πρωινά υπέρχρωσα ούρα –αιμοσφαιρινουρία λόγω της ενδαγγειακής αιμόλυσης– και σπανιότερα από ήπιο ίκτερο. Συνυπάρχει μέτρια αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων και συχνά λευκοπενία ή και θρομβοπενία μέτριας βαρύτητας.^{7,8} Στις διάφορες περιπτώσεις ΝΠΑ συχνά εμφανίζονται διαγνωστικά σφάλματα, ενώ η νόσος μπορεί να διαδράμει για αρκετά χρόνια χωρίς να έχει τεθεί η ακριβής διάγνωση. Η διάγνωση της ΝΠΑ γίνεται συνήθως στις ακόλουθες καταστάσεις: (α) εμφάνιση μιας νόσου με αιμόλυση και

θρόμβωση, η οποία χαρακτηρίζει την πρωτοπαθή ή *de novo* ΝΠΑ, (β) ανακάλυψη ενός «κλώνου ΝΠΑ» σε έναν ασθενή που πάσχει από απλαστική αναιμία και έχει λάβει μήνες ή χρόνια προηγούμεως ανοσοκατασταλτική θεραπεία και (γ) η ΝΠΑ συνδυάζεται με μερικά κακοήθη νοσήματα, ιδιαίτερα της κοκκιώδους σειράς (πολύ πιο σπάνια περίπτωση). Η διάκριση αυτή είναι αδρή και μάλλον σχηματική, αφού η νόσος παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη κλινική ετερογένεια. Περίπου 30% των ασθενών εμφανίζουν μόνο αναιμία, ενώ 30% παρουσιάζουν αρχικά μόνο ήπια παγκυτταροπενία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η εξέταση του μυελού δείχνει συχνά ένα μη απλαστικό μυελό και έτσι η διαφορική διάγνωση συμπεριλαμβάνει νοσήματα με παγκυτταροπενία αλλά με «πλούσιο» μυελό. Το υπόλοιπο 30% των ασθενών με ΝΠΑ έχει προηγούμενο ιστορικό μυελικής απλασίας και ιδιαίτερα μετά από αντιμετώπισή της με ανοσοκατασταλτική θεραπεία και ειδικότερα μετά από θεραπεία με αντιλεμφοκυτταρική ή αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη (ποσοστό περίπου 20–30% των ασθενών με απλασία).^{10,18}

Οι τρεις κύριες κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι η αιμόλυση, η μυελική ανεπάρκεια και η αυξημένη τάση για ανάπτυξη θρομβώσεων. Με βάση τις αρχικές κλινικές εκδηλώσεις της νόσου, συχνά γίνεται διάκριση μεταξύ των ασθενών που εμφανίζουν «κλασική» ή αιμολυτική μορφή ΝΠΑ, των ασθενών με ΝΠΑ που σχετίζεται με απλαστική αναιμία (σύνδρομο απλαστικής αναιμίας-ΝΠΑ, ΑΑ-ΝΠΑ) και εκείνων που βρίσκονται ανάμεσα στις δύο αυτές κατηγορίες.

Το χαρακτηριστικό της «κλασικής ΝΠΑ» είναι η χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση με παροξυντικά επεισόδια οξείας αιμόλυσης, που έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αιμοσφαιρινουρίας. Η παρουσία και η βαρύτητα της αιμόλυσης –αύξηση των δικτυοερυθροκυττάρων, αιμοσφαιριναίμια και αιμοσιδηρινουρία με ή χωρίς αιμοσφαιρινουρία– ποικίλλει ευρέως ανάλογα με την αναλογία των παθολογικών ερυθρών, τη βαρύτητα της ανωμαλίας τους και την ενεργοποίηση του συμπληρώματος. Χαρακτηριστικά, η αιμόλυση επισυμβαίνει τη νύκτα και οδηγεί σε αιμοσφαιρινουρία η οποία εμφανίζεται το πρωί, ενώ κατά τη διάρκεια της ημέρας τα ούρα είναι φυσιολογικά. Πιθανότατα, σημαντικό ρόλο παίζει η μείωση του pH κατά τη διάρκεια του ύπνου^{19–22} καθώς και οι διακυμάνσεις της στάθμης της κορτιζόλης κατά τη διάρκεια της ημέρας και της νύκτας, αν και η χορήγηση πρεδνιζολόνης δεν φαίνεται να επηρεάζει το νυκτερινό ρυθμό της παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας.²⁴ Σε αρκετές περιπτώσεις η αιμοσφαιρινουρία μπορεί να μην είναι εμφανής και να μην αναφέρεται από τον ασθενή όταν η αιμόλυση δεν είναι σημαντική (εικόνες 1, 2). Συχνά το αιμολυτικό επεισόδιο δεν συνδέεται με κάποιον εκλυτικό παράγοντα, ενώ η παροξυντική αιμοσφαιρινουρία στο 50%



Εικόνα 1. Τα πρωινά ούρα των ασθενών με «κλασική» νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία είναι σκοτεινόχροα λόγω της άφθονης αιμοσφαιρίνης, ενώ γενικά γίνονται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της ημέρας (Από http://www.hmds.org.uk/pnh_review.html).



Εικόνα 2. Συλλογή ούρων 48 ωρών ασθενούς με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία. Παρατηρείται η υπέρχρωση των ούρων (αιμοσφαιρινουρία στα δείγματα πρωινών ούρων).

των περιπτώσεων εκλύεται από λοιμώξεις (ιδιαίτερα ιογενείς λοιμώξεις του πεπτικού), χειρουργικές επεμβάσεις, φυσική καταπόνηση, έμμηνο ρύση, εμβολιασμούς, μεταγγιση ή λήψη μερικών φαρμάκων, όπως σουλφοναμιδίων, ασπιρίνης, πενικιλίνης, ηπαρίνης, σιδήρου κ.λπ.^{7,22,25} Η εμφάνιση αιμόλυσης μετά από τη χορήγηση σιδήρου φαίνεται να σχετίζεται με τη διέγερση της ερυθροποίησης στα σιδηροπενικά άτομα, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού παθολογικών ερυθροκυττάρων.²⁶ Η αιμοσφαιρινουρία μπορεί να είναι παρατεταμένη, έτσι ώστε να μη λαμβάνει το χαρακτήρα της παροξυντικής, και μπορεί να διαρκέσει αρκετές εβδομάδες. Συνοδά εργαστηριακά ευρήματα είναι η αύξηση της LDH και της έμμεσης χολερυθρίνης και η μείωση των απτοσφαιρινών, χωρίς ανεύρεση άλλης διαταραχής στο μυελό εκτός από μια ερυθροβλαστική υπερπλασία με σχεδόν φυσιολογική μορφολογία και απουσία διαταραχών στον καρυότυπο.⁴ Η οξεία αιμόλυση συχνά συνοδεύεται ή ακολουθείται από επεισόδια κοιλιακών αλγών που οφείλονται σε παροδική απόφραξη φλεβών του πεπτικού συστήματος, ενώ αρκετοί ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν ως πρώτη εκδήλωση της

νόσου θρόμβωση μεγάλων κοιλιακών φλεβών. Το σημαντικότερο κλινικό πρόβλημα συνήθως είναι οι συνέπειες της αναιμίας. Η εμφάνιση αναιμίας αποτελεί χαρακτηριστικό σχεδόν όλων των περιπτώσεων της νόσου. Πρόκειται για αιμολυτική αναιμία που συνοδεύει είτε από την αρχή είτε δευτεροπαθώς την παροξυντική αιμοσφαιρινουρία, σε ποσοστό περίπου 50% των ασθενών. Η βαρύτητα της αιμολυτικής αναιμίας χωρίς αιμοσιδηρινουρία κυμαίνεται από ήπια μέχρι βαριά. Συχνά, συνοδεύεται από ουδετεροπενία ή και θρομβοπενία, ενώ ακόμα μπορεί να εμφανιστούν πυρετός, κοιλιακά άλγη, κεφαλαλγία και κατά διαστήματα επεισόδια επίτασης της αιμόλυσης.

Η αρχική εμφάνιση αναιμίας μπορεί να οφείλεται σε μυελική ανεπάρκεια λόγω απλασίας ή δυσπλασίας, αν και γενικά ο μυελός είναι πλούσιος, με σύγχρονη παρουσία παγκυτταροπενίας στο περιφερικό αίμα και σπανιότερα μεμονωμένης ουδετεροπενίας ή θρομβοπενίας. Αρκετά σπάνια, ο ασθενής παρουσιάζει υπόχρωμη, μικροκυτταρική, σιδηροπενική αναιμία λόγω της χρονίας απώλειας σιδήρου από τα ούρα. Σε όλες τις παραπάνω καταστάσεις είναι δυνατή η εμφάνιση όψιμης παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας.

Η συχνότητα των αιματολογικών εκδηλώσεων που χαρακτηρίζουν τη ΝΠΑ, σε μια σειρά από 133 ασθενείς, ήταν παροξυντική αιμοσφαιρινουρία στο 33–45%, αιμολυτική αναιμία χωρίς συνοδό παροξυντική αιμοσφαιρινουρία στο 40–55%, παγκυτταροπενία με πλούσιο μυελό στο 10–15% και μυελική απλασία στο 15–20% των ασθενών.¹²

Οι ασθενείς με ΑΑ-ΝΠΑ εμφανίζουν ιστορικό απλασίας του μυελού, πληρούν όλα τα κριτήρια της απλαστικής αναιμίας, με αρνητικές τις κλασικές δοκιμασίες για τη ΝΠΑ, ενώ με ευαίσθητες τεχνικές ανιχνεύεται στο αίμα ένα ποσοστό κυττάρων αρνητικών για τις GPI-APs, όπως CD55, CD59 κ.ά. Σε αυτούς τους ασθενείς επικρατεί συνήθως η εικόνα της μυελικής ανεπάρκειας, ενώ η κλινική εικόνα δεν επηρεάζεται κατά κανόνα από την παρουσία του κλώνου ή των κλώνων της ΝΠΑ. Έτσι, γι' αυτούς τους ασθενείς είναι προτιμότερο ν' αναφέρεται ότι εμφανίζουν «ΑΑ με κλώνο ΝΠΑ» και η συγκεκριμένη μυελική ανεπάρκεια χρήζει άμεσης θεραπευτικής αντιμετώπισης, που συνήθως απαιτεί διαφορετικούς χειρισμούς σε σχέση με την «κλασική» μορφή της ΝΠΑ. Στην ομάδα αυτή, τα επεισόδια θρόμβωσης, αν και έχουν αναφερθεί, είναι σπάνια.

Αρκετοί ασθενείς δεν ανήκουν σε κάποια από τις παραπάνω κατηγορίες και παρουσιάζουν έναν ποικίλοντα συνδυασμό των κλινικών εκδηλώσεων, με παρουσία τόσο αιμόλυσης όσο και μυελικής ανεπάρκειας. Σε αυτούς, η πρώτη εκδήλωση της νόσου μπορεί να είναι η εμφάνιση αιμορραγικών εκδηλώσεων, λόγω της υπάρχουσας

θρομβοπενίας, ή εν τω βάθει θρόμβωσης, ενώ μπορεί να επικρατούν της κλινικής εικόνας και μη αιματολογικές εκδηλώσεις,^{7,12,16} όπως πνευμονική εμβολή, κοιλιακά άλγη, οσφυαλγία, κεφαλαλγία, σπασμοί και παροδικές παραλύσεις περιφερικών νεύρων. Οι ασθενείς αυτοί θεωρείται ότι πάσχουν είτε από «ΝΠΑ-ΑΑ» είτε από «ΑΑ-ΝΠΑ», ανάλογα με την επικρατούσα κλινική εκδήλωση.

Τέλος, υπάρχουν λίγοι ασθενείς στους οποίους δεν επικρατεί ούτε η μυελική ανεπάρκεια ούτε η αιμόλυση, αλλά η ύπαρξη ενός μικρού συνήθως κλώνου ΝΠΑ ευθύνεται για την εμφάνιση κάποιου θρομβωτικού επεισοδίου («ελάχιστη ΝΠΑ»). Στη ΝΠΑ που συνοδεύει διάφορα αιματολογικά νοσήματα, η διάκριση στηρίζεται στην εξέταση του μυελού και στις κυτταρογενετικές διαταραχές (απλαστική αναιμία, μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο, μυελοσκληρυνση κ.λπ.). Ειδικές χρωμοσωμικές διαταραχές (5q, 7, 20q) κατευθύνουν τη διάγνωση προς μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο.⁴ Θα πρέπει να τονιστεί ιδιαίτερα ότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της μυελικής ανεπάρκειας και του κλώνου της ΝΠΑ, με αποτέλεσμα να είναι αρκετά συχνό το φαινόμενο κάποιος ασθενής με «κλασική» ΝΠΑ για αρκετά χρόνια να εμφανίζει προοδευτική παγκυτταροπενία με ελάττωση των αιμολυτικών επεισοδίων, και το αντίστροφο²⁷ (εικ. 3).

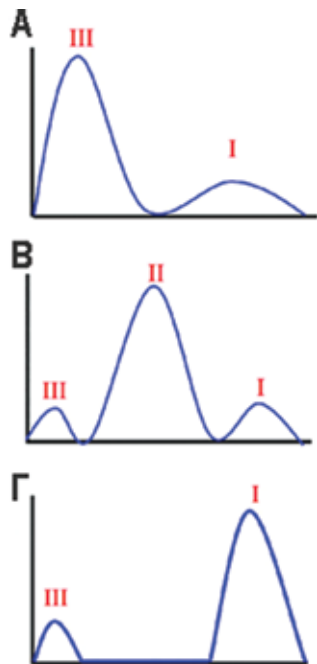
Η «ελάχιστη» ή η υποκλινική ΝΠΑ δεν παρουσιάζει κλινικά ή εργαστηριακά χαρακτηριστικά αιμόλυσης, ενώ ανιχνεύονται πληθυσμοί κυττάρων του αίματος με έλλειψη CD55 ή και CD59. Η κατηγορία αυτή συνοδεύει διάφορα νοσήματα.⁴

Στον πίνακα 1 αναφέρεται η κλινική ετερογένεια της ΝΠΑ και η προτεινόμενη ορολογία για την κάθε μορφή της νόσου, ενώ οι κλινικές εκδηλώσεις κατά την εμφάνιση της νόσου φαίνονται στον πίνακα 2.

Με βάση τα παραπάνω, σε ασθενείς με απλαστική αναιμία, ακόμη και χωρίς ένδειξη αιμόλυσης, θα πρέπει στη διάρκεια της παρακολούθησης να γίνεται έλεγχος για πληθυσμούς ΝΠΑ. Επίσης, στις περιπτώσεις με απλαστική αναιμία ή μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο θα πρέπει να αναζητούνται πληθυσμοί ΝΠΑ, αφού υπάρχουν δεδομένα ότι αυτοί οι ασθενείς πιθανότατα απαντούν καλύτερα σε θεραπεία με ανοσοκατασταλτικά.²⁷ Η κατηγορία των ασθενών που πρέπει να ελέγχονται για ΝΠΑ φαίνεται στον πίνακα 3.

2.2. Κλινική εξέταση

Εκτός από τα σημεία που σχετίζονται με την εμφάνιση κάποιας επιπλοκής της νόσου ή της αιμόλυσης, τα οποία μπορεί να συνοδεύονται από την εμφάνιση ή όχι αιμο-



Εικόνα 3. Φαινοτυπικό μωσαϊκό στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία. Ιστογράμματα ερυθρών αιμοσφαιρίων ασθενών με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία σύμφωνα με το anti-CD59. Η αναλογία και ο τύπος των ερυθρών ποικίλλουν σημαντικά και επηρεάζουν τις κλινικές εκδηλώσεις. Οι ασθενείς με υψηλή αναλογία ερυθρών νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας τύπου III (Α) έχουν κλινικά εμφανή αιμόλυση. Αν τα ερυθρά εμφανίζουν μερική ανεπάρκεια των πρωτεϊνών της άγκυρας GPI (φαινότυπος II) (Β), η αιμόλυση είναι μέτρια ακόμη και εάν το ποσοστό των παθολογικών κυττάρων είναι υψηλό. Μπορεί να τεθεί η διάγνωση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας ακόμη και με χαμηλή αναλογία ερυθρών τύπου III (Γ), αλλά η αιμόλυση διαπιστώνεται μόνο βιοχημικά. (Από Parker et al. Blood 2005, 106:3699 τροποποιημένο).

σφαιρινουρίας, στις περισσότερες περιπτώσεις υπάρχει μέτρια διόγκωση του σπλήνα, που διαπιστώνεται κυρίως στην εξέλιξη της νόσου μετά από τη λήψη πολλών μεταγγίσεων, ενώ αρκετά συχνά παρατηρείται και μέτρια διόγκωση του ήπατος.²⁸

2.3. Επιπλοκές

Η πλέον χαρακτηριστική επιπλοκή της ΝΠΑ είναι οι

φλεβικές κυρίως θρομβώσεις. Εμφανίζονται σε ποσοστό περίπου 40% των ασθενών και αποτελούν την κυριότερη αιτία θανάτου.^{4,7,8,10,12,16} Είναι συχνότερες στις περιπτώσεις όπου επικρατεί η αιμόλυση και είναι τόσο λιγότερο σπάνιες όσο συχνότερα είναι τα επεισόδια παροξυσμικής αιμόλυσης. Η εμφάνιση των θρομβώσεων φαίνεται να οφείλεται στην ελάττωση ή την απουσία από την επιφάνεια των

Πίνακας 2. Κλινικές εκδηλώσεις κατά την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας (κατά σειρά συχνότητας).

- Συμπτώματα αναιμίας
- Αιμοσφαιρινουρία
- Αιμορραγικά σημεία και συμπτώματα
- Απλαστική αναιμία
- Συμπτώματα από το πεπτικό
- Αιμολυτική αναιμία και ίκτερος
- Σιδηροπενική αναιμία
- Θρόμβωση ή εμβολή
- Λοιμώξεις
- Νευρολογικά σημεία και συμπτώματα

Πίνακας 3. Ασθενείς που πρέπει να ελέγχονται για νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία.

- Ασθενείς που εμφανίζουν αιμοσφαιρινουρία
- Ασθενείς με ενδαγγειακή αιμόλυση και αρνητική αντίδραση Coombs (ιδιαίτερα με υψηλή LDH) και ασθενείς με συνοδό σιδηροπενία
- Ασθενείς με φλεβική θρόμβωση σε ασυνήθεις θέσεις
- Σύνδρομο Budd-Chiari
- Άλλες ενδοκοιλιακές θέσεις θρόμβωσης (μεσεντέριος, πυλαία κ.λπ.)
- Θρόμβωση εγκεφαλικών φλεβών
- Θρόμβωση δερματικών φλεβών
- Ασθενείς με απλαστική αναιμία (στη διάγνωση και στην παρακολούθηση ακόμη και απουσία ενδαγγειακής αιμόλυσης)
- Ασθενείς με ανθεκτική αναιμία-ΜΔΣ
- Ασθενείς με επεισόδια δυσφαγίας και κοιλιακών αλγών με σημεία ενδαγγειακής αιμόλυσης

ΜΔΣ: Μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο

Πίνακας 1. Μορφές της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας και προτεινόμενη ορολογία.

Επικρατούσες εκδηλώσεις	Αιματολογικά ευρήματα	Μέγεθος ΝΠΑ-κλώνου	Ονοματολογία
Αιμόλυση ± θρόμβωση	Αναιμία και ελάχιστη ή καμιά άλλη κυτταροπενία	Μεγάλος	Κλασική ΝΠΑ
Αιμόλυση ± θρόμβωση	Αναιμία και ήπια ή μέσου βαθμού άλλη κυτταροπενία	Μεγάλος	Υποπλαστική ΝΠΑ
Πορφύρα ή και λοίμωξη	Μέτρια προς βαριά παγκυτταροπενία	Μεγάλος	ΑΑ/ΝΠΑ
Πορφύρα ή και λοίμωξη	Βαριά παγκυτταροπενία	Μικρός	ΑΑ με κλώνο ΝΠΑ
Θρόμβωση	Μέτρια κυτταροπενία(ες)	Μικρός	«ελάχιστη»-ΝΠΑ

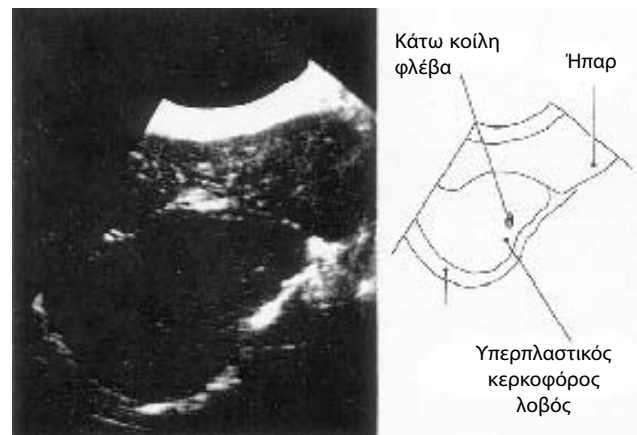
ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία, ΑΑ: Απλαστική αναιμία

αιμοπεταλίων των πρωτεϊνών GPI.^{1,29,30} Ωστόσο, δεν είναι γνωστό γιατί αυτή η επιπλοκή παρατηρείται μόνο στο 40% των ασθενών, αφού δεν έχει βρεθεί κάποιο στοιχείο αύξησης των θρομβοφιλικών παραγόντων στους ασθενείς με ΝΠΑ που εμφανίζουν θρομβώσεις.^{31,32}

Οι θρομβώσεις των ενδοκοιλιακών φλεβών αφορούν κυρίως στη σπληνική, στις ηπατικές, στις μεσεντέριες ή στην πυλαία φλέβα και έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση έντονου κοιλιακού άλγους, την ταχεία διόγκωση του σπλήνα και μερικές φορές τη ρήξη του.^{8-10,33-36} Συχνές θεωρούνται οι θρομβώσεις των μεσεντερίων αγγείων, που ευθύνονται για τα κοιλιακά άλγη στο 70% περίπου των ασθενών.⁷ Τα κοιλιακά άλγη μπορεί να είναι πολύ έντονα και επίμονα και μερικές φορές θέτουν προβλήματα διαφορικής διάγνωσης χειρουργικής κοιλίας. Όσες φορές διενεργήθηκε χειρουργική επέμβαση, διαπιστώθηκε θρόμβωση των μεσεντερίων αγγείων και μερικές φορές εντερικό έμφρακτο. Σπάνια το άλγος οφείλεται σε θρόμβωση της κάτω κοίλης φλέβας, η οποία μπορεί να καταλήξει σε θάνατο. Οι παραπάνω συνδυασμοί προκαλούν, εκτός από έντονα κοιλιακά άλγη, απότομη αύξηση του σωματικού βάρους, οιδήματα των κάτω άκρων και οξεία διόγκωση της κοιλίας. Φαίνεται ότι η συχνότητα ανάπτυξης σοβαρών θρομβώσεων σχετίζεται με το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων με έλλειψη των GPI πρωτεϊνών. Έλλειψη >50% των GPI-APs συνοδεύεται με συχνότητα θρόμβωσης περίπου 45%, ενώ έλλειψη <50% με συχνότητα θρόμβωσης περίπου 5%. Ο κίνδυνος αυξάνει κατά 1,64 για κάθε επιπλέον 10% έλλειψη των GPA-APs, ενώ ασθενείς με έλλειψη >70% έχουν 12 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρής θρόμβωσης σε σχέση με ασθενείς με κλώνο ΝΠΑ 20%.^{38,39}

Η έγκαιρη διάγνωση των ανωτέρω προσβολών είναι πολύ σημαντική, αφού συχνά συνοδεύονται από πολύ κακή πρόγνωση και ευθύνονται για το 20% περίπου των θανάτων στη ΝΠΑ, ενώ ανταποκρίνονται αρκετά καλά στην παρατεταμένη χορήγηση θεραπείας με ηπαρίνη.^{9,35-39} Συνέπεια της θρόμβωσης των ηπατικών φλεβών μπορεί να είναι και η εμφάνιση του συνδρόμου Budd-Chiari. Έχουν περιγραφεί τόσο οξείες όσο και υποκλινικές μορφές του συνδρόμου.^{35,36,40,41} Συχνά, η διάγνωση είναι δύσκολη και τίθεται με το υπερηχογράφημα κοιλίας, που παρέχει καλύτερες πληροφορίες σε σχέση με το σπινθηρογράφημα ήπατος τόσο για τον αριθμό όσο και για τη θέση των αποφραγμένων φλεβών⁴² (εικ. 4). Η οξεία μορφή του συνδρόμου χαρακτηρίζεται από οξύ κοιλιακό άλγος, εμέτους, πυρετό, κατέρρευση, διόγκωση του ήπατος, που είναι επώδυνο στην ψηλάφηση, και μερικές φορές από οξεία εμφάνιση ασκίτη και υπεζωκοτικής συλλογής. Εργαστηριακά, παρατηρείται αύξηση των τρανσαμινασών, της LDH και της αλκαλικής φωσφατάσης του ορού καθώς

και υπολευκωματιναιμία. Το σπινθηρογράφημα δείχνει μια κατά τόπους καθήλωση του ραδιενεργού κολλοειδούς, με εντονότερη κεντρική καθήλωση, λόγω της πρόσληψής του κυρίως από το διογκωμένο τετράπλευρο λοβό του ήπατος. Η αξονική τομογραφία αναδεικνύει την οφειλόμενη στην προαναφερθείσα διόγκωση του τετράπλευρου λοβού ηπατομεγαλία.^{36,43} Η φλεβογραφία των υποηπατικών φλεβών παρέχει χαρακτηριστικές εικόνες απόφραξης των υποηπατικών ή των ηπατικών φλεβών.³⁷ Η εξέταση αυτή συχνά αντενδείκνυται, όταν η διάγνωση μπορεί να τεθεί και με άλλους τρόπους, αφού μπορεί να αποβεί επικίνδυνη λόγω των επιπλοκών από την ενεργοποίηση του συμπληρώματος από το χορηγούμενο σκιαγραφικό φάρμακο.³⁶ Χαρακτηριστική είναι και η βιοψία του ήπατος, με την ανεύρεση αλλοιώσεων τύπου καρδιακού ήπατος, καθώς και –συνά– της θρόμβωσης των ηπατικών φλεβών. Η βιοψία ήπατος δεν είναι πάντα απαραίτητη, ενώ αντενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου υπάρχει βαριά θρομβοπενία. Η χορήγηση αιμοπεταλίων για τη διενέργειά της μπορεί να συνοδεύεται από κίνδυνο ανοσιακής διέγερσης⁴⁴ και είναι σημαντικό να συζητηθεί όχι τόσο για τις ενδείξεις της βιοψίας, αλλά λόγω της σύγχρονης χορήγησης επείγουσας θεραπείας με ηπαρίνη, που αποτελεί και την αποτελεσματικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση των φλεβικών θρομβώσεων. Οι μεταγγίσεις αιμοπεταλίων φαίνεται να είναι απαραίτητες σε χορήγηση ηπαρινοθεραπείας, ιδιαίτερα όταν η θρομβοπενία είναι πολύ βαριά. Η χορήγηση θρομβολυτικών, παρά τον κίνδυνο των συνοδών επιπλοκών και κυρίως των αιμορραγικών, αρχίζει να υποκαθιστά τη θεραπεία με ηπαρίνη, που συχνά είναι μη αποτελεσματική, ενώ αρκετές φορές υπάρχει και η υποψία ότι επιτείνει την αιμόλυση. Η χορήγηση στρεπτοκινάσης μέσω καθετήρα σε θρόμβωση της κάτω κοίλης ή ουροκινάσης σε ενδοφλέβια χορήγηση



Εικόνα 4. Υπερηχογράφημα ήπατος σε σύνδρομο Budd-Chiari. Ο κερκοφόρος λοβός είναι υπερτροφικός, ενώ η κάτω κοίλη φλέβα είναι συμπιεσμένη κατά τη δίοδό της μέσα από αυτόν.

κατά τη διάρκεια υποτροπής συχνά έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική ταχεία βελτίωση των εκδηλώσεων, με εξαίριση του κωλύματος και απουσία υποτροπής μετά από 5 χρόνια.⁴⁵ Τελευταία, καλύτερα αποτελέσματα για τη φλεβική θρόμβωση της ΝΠΑ έχει δώσει η χορήγηση ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου (tPA).⁴⁶

Συχνά εμφανίζονται όχι πολύ θορυβώδεις μορφές συνδρόμου Budd-Chiari, οι οποίες χαρακτηρίζονται συνήθως από παρουσία μη σταθερής ηπατομεγαλίας,³⁶ που ανακαλύπτεται συνήθως στα άτομα που παραπονούνται για κοιλιακά άλγη. Οι εργαστηριακές διαταραχές και οι διαταραχές τομοπυκνωμετρίας που συνοδεύουν την ηπατική κυτταρόλυση αποτελούν σταθερά ευρήματα και συνήθως θέτουν τη διάγνωση.³⁵ Οι διαταραχές αυτές θα πρέπει να αναζητούνται μόλις τεθεί η διάγνωση της ΝΠΑ και στη συνέχεια να παρακολουθούνται κατά περιοδικά διαστήματα. Η ύπαρξη ηπατικών διαταραχών και η εμφάνιση του βιοχημικού συνδρόμου θέτει την ένδειξη για έναρξη θεραπείας με ηπαρίνη ή τη χορήγηση θρομβολυτικών φαρμάκων.³⁶

Οι θρομβώσεις εγκεφαλικών αγγείων κατά την πορεία της νόσου είναι επίσης συχνές και βαριές και συνοδεύονται από την εμφάνιση σπασμών, παραλύσεων, αφασίας, ταχείας εγκατάστασης κώματος, ενώ αρκετά συχνά προηγείται εμφάνιση κεφαλαλγίας. Οι θρομβώσεις των εγκεφαλικών αγγείων είναι συχνά μεμονωμένες και επίμονες. Η διάγνωση τίθεται συνήθως με την αξονική τομογραφία και –αν είναι απαραίτητο– με τη διενέργεια εγκεφαλικής αρτηριογραφίας, που δείχνει συνήθως φλεβική απόφραξη και ιδιαίτερα θρόμβωση του οβελιαίου κόλπου.⁴⁷ Η χορήγηση προφυλακτικής θεραπείας δεν είναι πάντα αποτελεσματική. Σπανιότερες είναι οι θρομβώσεις των άκρων.

Η νεφρική ανεπάρκεια αποτελεί μια ακόμη επιπλοκή της ΝΠΑ. Η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, που υπερβαίνει την ικανότητα δέσμευσης από τις απτοσφαιρίνες του ορού, εναποτίθεται στα εγγύς εσπειραμένα νεφρικά σωληνάρια στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού ως αιμοσιδηρίνη και όταν η ικανότητα επαναρόφησης ξεπεραστεί, η αιμοσφαιρίνη διέρχεται απευθείας στα ούρα (αιμοσφαιρινουρία).⁴⁸ Ένα συχνό εύρημα από τις βιοψίες νεφρού ασθενών με ΝΠΑ, αλλά και στην ιστοχημική χρώση στο ίζημα των ούρων, είναι η εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα, ενώ με τη μαγνητική τομογραφία φαίνεται πολύ καλά η εναπόθεσή της στο φλοιό των νεφρών.⁴⁹ Για την εμφάνιση οξείας νεφρικής ανεπάρκειας συνήθως ευθύνεται η θρόμβωση των νεφρικών φλεβών, η οποία μπορεί να εξηγήσει επίσης την ανάπτυξη χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας λόγω φλοιωδών εμφράκτων ή και νέκρωσης των θηλών, που παρατηρούνται στην ενδοφλέβια πυελογραφία ή στις νεκροτομές τέτοιων ασθενών. Ένδειξη της παρουσίας των

ανωτέρω θρομβωτικών επιπλοκών αποτελεί η εμφάνιση επίμονης οσφυαλγίας σε ασθενείς με ΝΠΑ. Συχνά, η νεφρική ανεπάρκεια μπορεί να είναι και το αποτέλεσμα υποτροπιαζουσών ουρολοιμώξεων. Σπάνια μπορεί να εμφανιστεί οξεία νεφρική ανεπάρκεια, ιδιαίτερα σε αφυδατωμένους ασθενείς, ενώ στο 10% των ασθενών με χρόνια ΝΠΑ υπάρχει νεφρική ανεπάρκεια.^{9,12,50,51}

Οι συχνές λοιμώξεις αποδίδονται στη συνυπάρχουσα ουδετεροπενία ή στις λειτουργικές διαταραχές των πολυμορφοκυττάρων και ευθύνονται για το 10% περίπου των θανάτων. Η παρουσία ακόμη και κοινών λοιμώξεων μπορεί να προκαλέσει επίταση ή έκλυση της αιμόλυσης⁵¹ και αρκετές φορές εμφάνιση μυελικής ανεπάρκειας του τύπου απλασίας ή δυσπλασίας. Τα αιμολυτικά επεισόδια μπορεί να συνοδεύονται από έντονο σπασμό του οισοφάγου, ενώ οι άνδρες συχνά εμφανίζουν διαταραχές της στυτικής λειτουργίας.

Σπάνια οι ασθενείς με ΝΠΑ στην πορεία της νόσου εμφανίζουν μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο ή οξεία λευχαιμία (5% και 1%, αντίστοιχα, στη 10ετία) με σχεδόν πάντοτε φαινότυπο μυελογενούς λευχαιμίας, ενώ στα λευχαιμικά κύτταρα σχεδόν πάντα απουσιάζουν οι πρωτεΐνες GPI.⁵²

2.4. Εργαστηριακές εξετάσεις

Αρχικά, η αναιμία είναι συνήθως ορθόχρωμη ορθοκυτταρική ή μακροκυτταρική και αργότερα μπορεί να γίνει υπόχρωμη μικροκυτταρική λόγω της συνοδού σιδηροπενίας. Συχνά παρατηρούνται αύξηση της έμμεσης χολερυθρίνης, μέτρια δικτυοερυθροκυττάρωση και σαφείς ενδείξεις παρουσίας αιμόλυσης. Γενικά, ο μυελός των οστών παρουσιάζει υπερπλασία της ερυθράς σειράς. Η καταστολή του μυελού ποικίλλει ευρέως από πολύ μικρή μέχρι πολύ βαριά, όπως σε απλαστική αναιμία.⁵³

Στο επίχρισμα του περιφερικού αίματος τα ερυθρά έχουν συνήθως φυσιολογική μορφολογία, χωρίς την παρουσία σφαιροκυττάρωσης ή άλλης μορφολογίας συμβατής με αιμολυτική αναιμία, ενώ η ωσμωτική αντίσταση των ερυθρών είναι φυσιολογική. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ αιμολυτικής αναιμίας με ή χωρίς συνοδό παροξυστική αιμοσφαιρινουρία, με μείωση ή απουσία των απτοσφαιρινών και συχνή παρουσία συνεχούς αιμοσιδηρινουρίας. Η απώλεια σιδήρου με τα ούρα μπορεί να φθάσει και τα 8 mg την ημέρα.⁵⁴

Αρκετές φορές η αναιμία είναι μέτριας βαρύτητας και η ανάδειξη αιμόλυσης δύσκολη λόγω της φυσιολογικής τιμής της έμμεσης χολερυθρίνης. Η αιμόλυση στις μορφές με παγκυτταροπενία είναι μόλις υποσημεινόμενη και η αναιμία συνδυάζεται συχνότερα με μυελική ανεπάρκεια, ιδιαίτερα

όταν αυτή είναι έντονη. Η παρουσία ήπιας αιμόλυσης κατά τη διάρκεια της νόσου θα πρέπει να αναζητείται συστηματικά και βοηθά σημαντικά στη διάγνωση. Όταν η αναιμία είναι μικροκυτταρική και υπόχρωμη με συνοδό σιδηροπενία, η αιμόλυση μπορεί να είναι υποκλινική και να παρατηρείται μόνο μετά από χορήγηση θεραπείας με σίδηρο, λόγω της μεγαλύτερης παραγωγής παθολογικών ερυθρών.⁵⁵ Η αντίδραση Coombs είναι κατά κανόνα αρνητική και μερικές φορές θετική, του τύπου του συμπληρώματος.

Στο 70% των περιπτώσεων παρατηρείται λευκοπενία και ήπια ουδετεροπενία (<1,5×10⁹/L πολυμορφοπύρρηνα). Σε ορισμένες περιπτώσεις η ουδετεροπενία μπορεί να είναι βαριά (<0,5×10⁹/L πολυμορφοπύρρηνα).⁷ Η ουδετεροπενία οφείλεται σε μειωμένη παραγωγή, ενώ η επιβίωση των πολυμορφοπυρήνων απουσία σπληνομεγαλίας είναι φυσιολογική. Η εμφάνιση παγκυτταροπενίας στην *de novo* ΝΠΑ υπολογίζεται περίπου στο 15% 8–10 έτη από τη διάγνωση.^{10,18} Συχνά παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης των πολυμορφοπυρήνων (LAP), η μέτρηση της οποίας μπορεί να δίνει μηδενική τιμή. Αν και δεν έχουν περιγραφεί μορφολογικές διαταραχές των πολυμορφοπυρήνων, οι λειτουργικές διαταραχές τους είναι συχνές και κυρίως οι διαταραχές φαγοκυττάρωσης. Στο μυελό, η κοκκώδης σειρά μπορεί να είναι είτε φυσιολογική είτε να υπολείπεται συνολικά, με διαταραχές ωρίμανσης.

Θρομβοπενία με αριθμό αιμοπεταλίων <150×10⁹/L παρατηρείται στο 80% των περιπτώσεων, ενώ αιμοπεταλία <50×10⁹/L διαπιστώνονται περίπου στο 50–70% των ασθενών.⁷ Δεν έχουν περιγραφεί μορφολογικές ή λειτουργικές διαταραχές των αιμοπεταλίων, αν και λόγω έλλειψης των πρωτεϊνών GPI από την επιφάνεια των αιμοπεταλίων η συμβολή τους στην εμφάνιση των θρομβώσεων είναι σημαντική. Τα μεγακαρουκύτταρα στο μυελό είναι φυσιολογικά ή ελαττωμένα.

Η παγκυτταροπενία μπορεί να υπάρχει ήδη από τη διάγνωση της νόσου στο 30% των περιπτώσεων και οφείλεται στην παρουσία απλασίας μάλλον παρά μυελικής δυσπλασίας.¹² Συχνά, το αποκαλυπτικό στοιχείο της νόσου μπορεί να είναι η διαπίστωση μεμονωμένης ουδετεροπενίας ή θρομβοπενίας. Η ανεύρεση στοιχείων αιμολυτικής αναιμίας, ακόμη και όταν αυτή δεν είναι εμφανής, κατευθύνει σημαντικά προς τη διάγνωση της ΝΠΑ. Η ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης δείχνει συχνά μικρή αύξηση της εμβρυϊκής αιμοσφαιρίνης.⁷

Στη ΝΠΑ διαπιστώνεται μείωση διαφόρων αντιγόνων των ομάδων αίματος (κυρίως τα αντιγόνα A1, αλλά επίσης τα A, B και H). Συχνή είναι η ανεύρεση αύξησης του αντιγόνου i, που μαζί με την αύξηση της αιμοσφαιρίνης F υποδεικνύει την αυξημένη δραστηριότητα της ερυθράς σειράς, ενώ

μείωση των αντιγόνων A, B και H αντανακλά την ύπαρξη μιας ενζυμικής ανεπάρκειας των τρανσφερασών.

Σε ασθενείς με ΝΠΑ έχουν περιγραφεί σπάνιες κυτταρογενετικές ανωμαλίες, όπως απώλεια του χρωμοσώματος Y και τρισωμία 9, αν και καμιά από αυτές δεν είναι διαγνωστική ή επιβεβαιωτική της νόσου.⁵⁶

Τα εργαστηριακά ευρήματα στη ΝΠΑ συνοψίζονται στον πίνακα 4.

3. ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

3.1. Κυτταρομετρία ροής

Η σύγχρονη μέθοδος αναγνώρισης της νόσου είναι η κυτταρομετρία ροής με μονοκλωνικά αντισώματα κατά των διαφόρων πρωτεϊνών της μεμβράνης που ανεπαρκούν στη ΝΠΑ.^{57–59} Στους ασθενείς με ΝΠΑ ανιχνεύεται μια αναλογία κυττάρων του αίματος τα οποία εμφανίζουν ανεπάρκεια των πρωτεϊνών που συνδέονται στη μεμβράνη με το μόριο GPI (CD55, CD59 κ.λπ.) (εικόνες 5–9). Τα αποτελέσματα εκ-

Πίνακας 4. Εργαστηριακά ευρήματα στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.

Μη ειδικά ευρήματα

- Κυτταροπενία που αφορά σε μία ή περισσότερες μυελικές σειρές
- Μακροκυττάρωση, ανισοκυττάρωση, πολυχρωματοφιλία
- Δικτυοερυθροκυττάρωση
- Μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης των πολυμορφοπυρήνων
- Αύξηση της LDH
- Μείωση των απτοσφαιρινών
- Αιμοσφαιρινουρία, αιμοσιδηρινουρία
- Σιδηροπενική αναιμία, ανεπάρκεια φυλλικού
- Ευρήματα μυελού των οστών
- Ποικίλλουν από υπερπλασία της ερυθράς σειράς μέχρι υποπλασία με ελάχιστη ή κατά τόπους αιμοποίηση
- Υποπλασία ή απλασία μίας ή περισσότερων μυελικών σειρών
- Αυξημένος αριθμός μαστοκυττάρων (αναφέρεται από μερικούς)

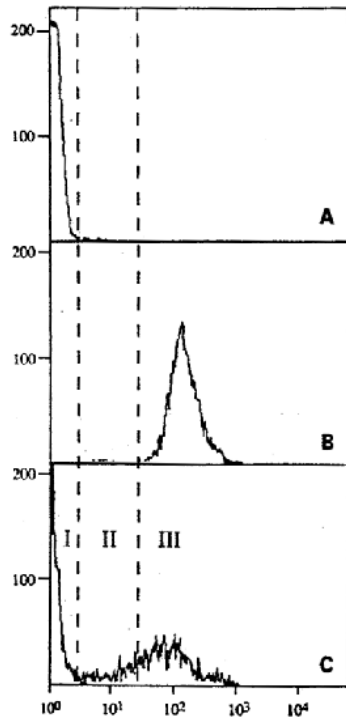
Καρούτυπος

- Συνήθως φυσιολογικός

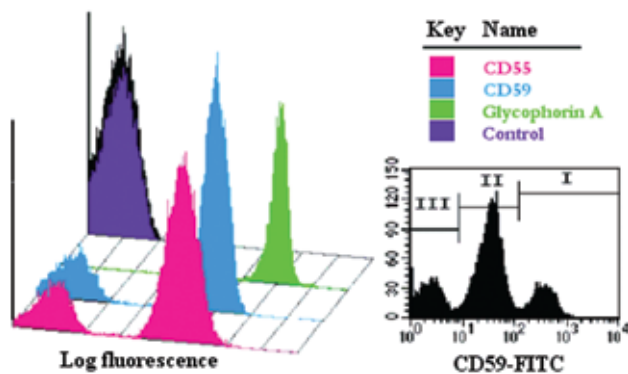
Ειδικές εξετάσεις

- Αυξημένη ευαισθησία των ερυθρών στη λύση από το συμπλήρωμα, που ενεργοποιείται με οξινοποίηση του ορού (δοκιμασία Ham), ψυχρό αντίσωμα, σουκρόζη, θρομβίνη ή δηλητήριο κόμπρας
- Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής των συνδεδεμένων με GPI πρωτεϊνών της μεμβράνης στα κύτταρα του περιφερικού αίματος και του μυελού, στα οποία βρίσκονται ελαττωμένες
- Ερυθρά αιμοσφαίρια με απουσία του CD55 ή και του CD59 με τη χρήση μικροσωληναρίων γέλης sephacryl

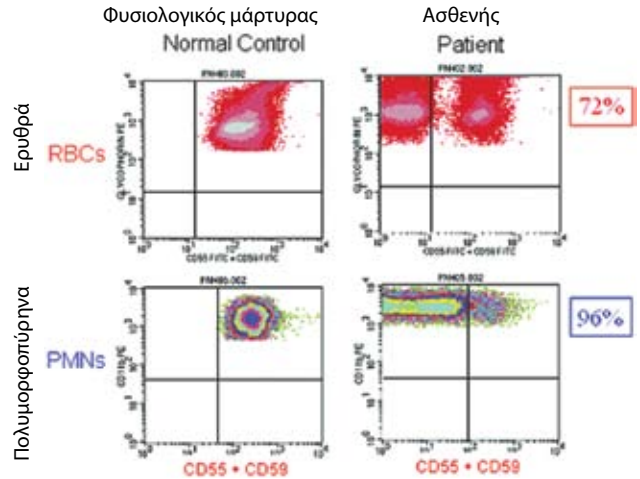
φράζονται ως ποσοστό των αρνητικών κυττάρων, ενώ το έλλειμμα θεωρείται σημαντικό όταν τα αρνητικά κύτταρα υπερβαίνουν το 5%. Για τις αρχικές μελέτες συνιστάται ο έλεγχος τουλάχιστον δύο GPI πρωτεϊνών, για να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι η κλινική έκφραση δεν είναι



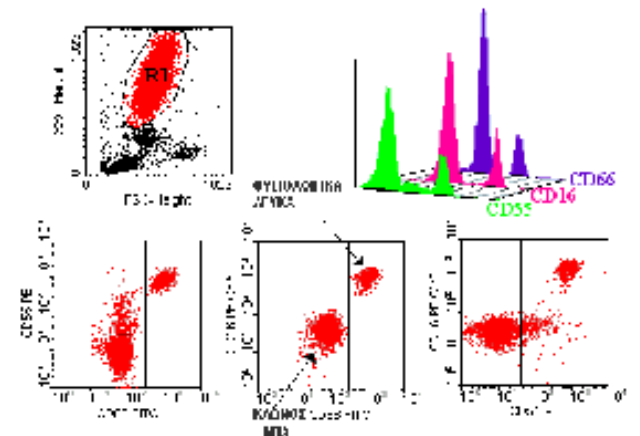
Εικόνα 5. Ανίχνευση CD59 σε φυσιολογικά ερυθρά (άνω) και σε ασθενή με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) (κάτω). Εμφανίζονται τρεις πληθυσμοί κυττάρων νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ III: Πλήρης απουσία, ΝΠΑ I: Φυσιολογική έκφραση, ΝΠΑ II: Ενδιάμεση έκφραση μορίων CD59). (Από Navenot et al. Rev Fr Transf Hemobiol 1993, 36:135 τροποποιημένο).



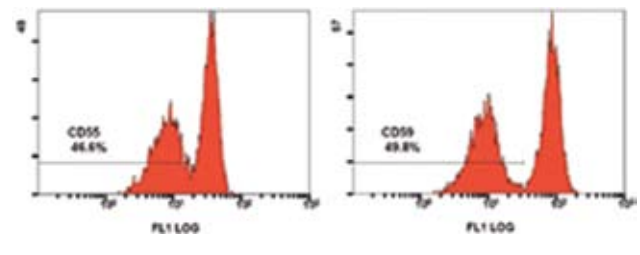
Εικόνα 6. Κυτταρομετρία ερυθρών στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). Ανάλυση ερυθρών για έλλειψη CD55, CD59 και Glycophorin-A (CD235a). Τα φυσιολογικά και τα ερυθρά ΝΠΑ (CD55 και CD59) φαίνονται στο ιστόγραμμα. Το ιστόγραμμα κάτω δεξιά δείχνει τρεις πληθυσμούς με έλλειψη CD59 (I: Φυσιολογικός, II: Μερική έλλειψη, III: Πλήρης έλλειψη). (Από http://www.hmbs.org.uk/pnh_review.html).



Εικόνα 7. Κυτταρομετρική ανάλυση ερυθρών και πολυμορφοκυττάρων ασθενών με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία. Η ανάλυση του αίματος ασθενούς με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (άνω) δείχνει μεγάλο ποσοστό ερυθρών και πολυμορφοκυττάρων με έλλειψη GPI-APs. Το ποσοστό των πολυμορφοκυττάρων με έλλειψη (96%) είναι υψηλότερο από εκείνο των ερυθρών (72%) λόγω της εκλεκτικής λύσης των ερυθρών από το συμπλήρωμα. (Από Parker et al. Blood 2005, 106:3699 τροποποιημένο).



Εικόνα 8. Κυτταρομετρία ροής πολυμορφοκυττάρων στη νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία. Τα πολυμορφοκύτταρα επιλέγονται (άνω αριστερά, ερυθρή περιοχή) και αναλύονται για έκφραση CD16, CD55 και CD66 (κάτω). Παρατηρούνται δύο πληθυσμοί (φυσιολογικός και με κλώνο νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας). (Από http://www.hmbs.org.uk/pnh_review.html).



Εικόνα 9. Έκφραση CD55 και CD59 στα πολυμορφοκύτταρα παρουσία κλώνου νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας. (Από Speletas et al. Arch Hellen Med 2007, 24:398).

αποτέλεσμα κληρονομικής μεμονωμένης έλλειψης μίας μόνο GPI πρωτεΐνης.⁴ Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια η αναλογία των κυττάρων που παρουσιάζουν ανεπάρκεια αυτών των πρωτεϊνών, καθώς και το επίπεδο της έκφρασής τους τόσο στα ερυθρά όσο και στα πολυμορφοπύρρηνα και στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Τα ερυθρά με πλήρη έλλειψη των CD55 και CD59 ονομάζονται ερυθρά τύπου ΝΠΑ III, τα ερυθρά με μερική έλλειψη –περίπου το 10% της φυσιολογικής έκφρασης– ονομάζονται τύπου ΝΠΑ II, ενώ τα ερυθρά με φυσιολογική έκφραση ονομάζονται τύπου ΝΠΑ I. Επειδή από το ποσοστό των κυττάρων τύπου ΝΠΑ εξαρτώνται τόσο η πρόγνωση όσο και η θεραπευτική αντιμετώπιση, απαιτείται κυτταρομετρική ανάλυση υψηλής ευαισθησίας από ειδικευμένα εργαστήρια, τα οποία μετρούν ακόμη και πολύ μικρούς πληθυσμούς κυττάρων ΝΠΑ (<1%).⁴

Η σύγκριση της δοκιμασίας Ham με το φαινότυπο των ερυθρών κατά την κυτταρομετρία ροής με τη χρήση αντισώματος anti-CD59 δείχνει την ύπαρξη καλής συσχέτισης των δύο μεθόδων. Εντούτοις, όταν υπάρχει υψηλός αριθμός κυττάρων ΝΠΑ τύπου II, η ευαισθησία της κυτταρομετρίας είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη της δοκιμασίας Ham. Σε αντίθεση με τη δοκιμασία Ham, με την κυτταρομετρία μπορεί να διαπιστωθεί έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών όχι μόνο στα ερυθρά αλλά και στα πολυμορφοπύρρηνα, στα μονοκύτταρα, στα λεμφοκύτταρα και στα αιμοπετάλια, παρέχοντας πληροφορίες για το μέγεθος του κλώνου της ΝΠΑ. Το ποσοστό των πολυμορφοπυρήνων τύπου ΝΠΑ στο περιφερικό αίμα αντανάκλα πιθανόν πιο αξιόπιστα το πραγματικό μέγεθος του κλώνου της ΝΠΑ. Έτσι, η μέτρηση των πολυμορφοπυρήνων με ανεπάρκεια των συνδεδεμένων με GPI πρωτεϊνών είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση των ασθενών με ΝΠΑ, ενώ ποσοστό μόνο 20–50% των ασθενών με ΝΠΑ εμφανίζει ανεπάρκεια αυτών των πρωτεϊνών στα λεμφοκύτταρα.

Η κυτταρομετρία ροής αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για την ανίχνευση των κλώνων ΝΠΑ.⁶⁰ Διενεργείται στο περιφερικό αίμα ή στο μυελό και έχει την ικανότητα ανίχνευσης μικρών πληθυσμών κυττάρων του αίματος με ολική ή μερική έλλειψη του CD55 ή και CD59 κυρίως, ενώ καθορίζει και το ποσοστό του παθολογικού κλώνου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί εντούτοις ότι η ποσοτική εκτίμηση του μεγέθους του κλώνου ΝΠΑ μπορεί να επηρεαστεί από την ανάγκη ικανών μεταγίσεων και την αιμόλυση, που μειώνουν το πραγματικό ποσοστό των παθολογικών ερυθρών στην κυκλοφορία. Έτσι, για σαφείς πληροφορίες για το ποσοστό των ερυθρών τύπου ΝΠΑ η μέτρηση πρέπει να γίνεται πριν από τη μετάγγιση και τουλάχιστον 1 μήνα μετά (εφόσον βέβαια υπάρχει κλινική ασφάλεια για την αποφυγή της). Φαίνεται ότι, σε όλους τους

ασθενείς, ο παθολογικός κλώνος μεταβάλλεται σημαντικά σε διάφορες περιόδους παρακολούθησης της νόσου. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι προτιμότερη η ανάλυση των δικτυοερυθροκυττάρων και των λευκών αιμοσφαιρίων για τον προσδιορισμό του κλώνου ΝΠΑ.

Υπό διερεύνηση βρίσκεται σήμερα η ποσοτική εκτίμηση των παθολογικών πληθυσμών με αερολυσίνη –τοξίνη που εκκρίνεται από την *Aeromonas hydrophila*– συνδεδεμένη με φθοριόχρωμα (fluorescent labeled aerolysin, FLAER). Η ουσία αυτή καταστρέφει τα κύτταρα μετά από σύνδεσή της με υποδοχείς GPI της μεμβράνης και δημιουργία καναλιών. Τα κύτταρα της ΝΠΑ είναι ανθεκτικά στη δράση της σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα.⁶¹

Με την κυτταρομετρία ροής μπορεί να ανευρεθούν και CD34⁺ κύτταρα με έλλειψη CD55 ή και CD59. Εντούτοις, η ανάλυση αυτή δεν είναι απαραίτητη για την οριστική διάγνωση της ΝΠΑ.⁶²

3.2. Έλεγχος μεταλλάξεων PIG-A

Όπως αναφέρθηκε, η ανεπάρκεια των πρωτεϊνών GPI στους ασθενείς με ΝΠΑ οφείλεται σε μια επίκτητη σωματική μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A, ενώ η διάγνωση της ΝΠΑ γίνεται με την αναζήτηση μίας ή περισσότερων μεταλλάξεων. Προς το παρόν, λόγω τεχνικών δυσκολιών, ο έλεγχος αυτός γίνεται σχεδόν μόνο για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά με την πρόοδο της τεχνολογίας πιθανόν στο μέλλον να καταστεί ακόμη και μέθοδος ρουτίνας για τη διάγνωση της ΝΠΑ.^{3,63,64}

3.3. Μικροσωληνάκια γέλης sephacryl

Η ανίχνευση των ερυθρών με απουσία του CD55 ή και του CD59 με τη χρήση μικροσωληναρίων γέλης sephacryl και μονοκλωνικά αντισώματα κατ' αυτών των αντιγόνων φαίνεται να είναι μια πολύ καλή, ταχεία, φθηνή και απλή ημιποσοτική μέθοδος για τη διάγνωση της παρουσίας στο περιφερικό αίμα πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων τύπου ΝΠΑ.^{65–81}

Η ανίχνευση των ερυθροκυτταρικών πληθυσμών με έλλειψη των CD55 και CD59 γίνεται με τη χρήση του συστήματος μικροτυποποίησης σε γέλη sephacryl (DiaMed-ID Micro Typing System-PNH test). Χρησιμοποιείται φλεβικό αίμα σε EDTA-K₃, ενώ η δοκιμασία πραγματοποιείται μέσα στις πρώτες 6 ώρες από τη λήψη του δείγματος. Αρχικά, παρασκευάζεται εναιώρημα ερυθροκυττάρων 0,8% (v/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος 0,8% (ID-diluent 2, modified LISS) σε θερμοκρασία δωματίου. Στην άνω επιφάνεια τριών μικροσωληναρίων τοποθετούνται 50

μL του εναιωρήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων 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 (ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης, dilution buffer, για anti-CD55 και anti-CD59) τοποθετούνται στα αντίστοιχα μικροσωληνάρια. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 15 min και φυγοκέντρηση στα 126 g για 10 min σε ID-φυγόκεντρο 245 (CE conform, DiaMed-Hellas Ltd).

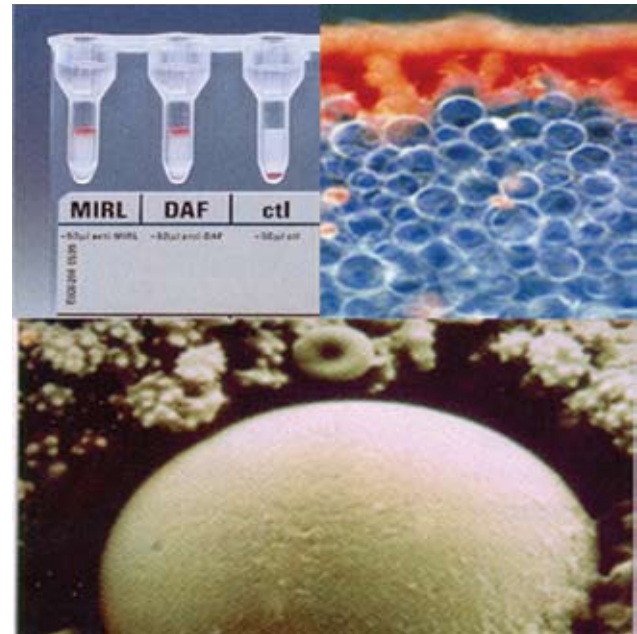
Οι φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί, που φέρουν στην επιφάνειά τους CD55 ή CD59, παραμένουν στην κορυφή των αντίστοιχων μικροσωληναρίων συνδεδεμένοι με τα σωματίδια της γέλης (θετικοί πληθυσμοί). Αντίθετα, τα ερυθρά αιμοσφαίρια με απουσία των αντιγόνων CD55 ή CD59 δεν παρουσιάζουν συγκόλληση και καθιζάνουν στον πυθμένα των μικροσωληναρίων (αρνητικοί πληθυσμοί). Όταν ανιχνεύονται θετικοί και αρνητικοί πληθυσμοί, ένα μόνο τμήμα του αριθμού των ερυθροκυττάρων εμφανίζει την έλλειψη του μελετώμενου αντιγόνου. Σε αρχικά πειράματα, χρησιμοποιώντας διάφορα μείγματα (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 ανιχνευτούν πληθυσμοί ερυθρών με έλλειψη του CD55 ή και του CD59 σε ποσοστό 10% και άνω του συνολικού αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η αξιολόγηση της παρουσίας των υποπληθυσμών ερυθροκυττάρων πραγματοποιείται από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και εκφράζεται ημιποσοτικά ως 100%, 75%, 50%, 25% και 10% του συνόλου των ερυθρών (εικόνες 10–12).

Ιστορικά, οι παρακάτω δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκαν ως αδρός έλεγχος ή και για επιβεβαίωση της διάγνωσης της ΝΠΑ, δεικνύοντας την παθολογική ευθραυστότητα των ερυθροκυττάρων στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Οι δοκιμασίες αυτές έχουν σχεδόν εγκαταλειφθεί διαγνωστικά, επειδή δεν είναι ευαίσθητες και είναι λιγότερο ακριβείς σε σχέση με την κυτταρομετρία ροής.⁸²

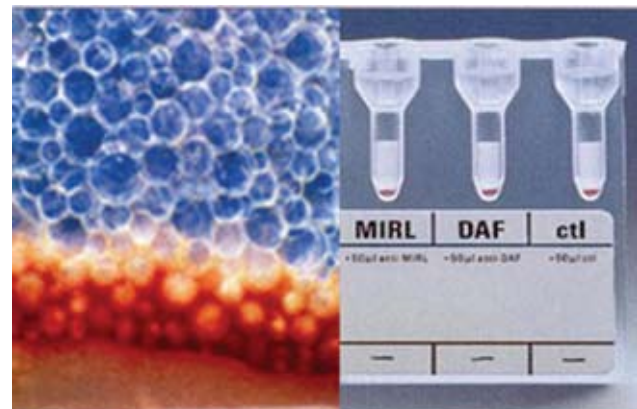
3.4. Δοκιμασία του οξινισθέντος ορού

Η πλέον αξιόλογη είναι η δοκιμασία Ham, κατά την οποία τα ερυθρά αιμοσφαίρια του ασθενούς επάγονται για 30 min στους 37 °C με πρόσφατο ορό συμβατού φυσιολογικού ατόμου, οξινισθέντα έτσι ώστε το pH να κυμαίνεται από 6,5–7, και στη συνέχεια μετράται η επακολουθούσα αιμόλυση (εικ. 13). Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει σημαντικά με την προσθήκη MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 4 mmol/L). Η βαρύτητα της αιμόλυσης αντικατοπτρίζει την αναλογία των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων. Στις

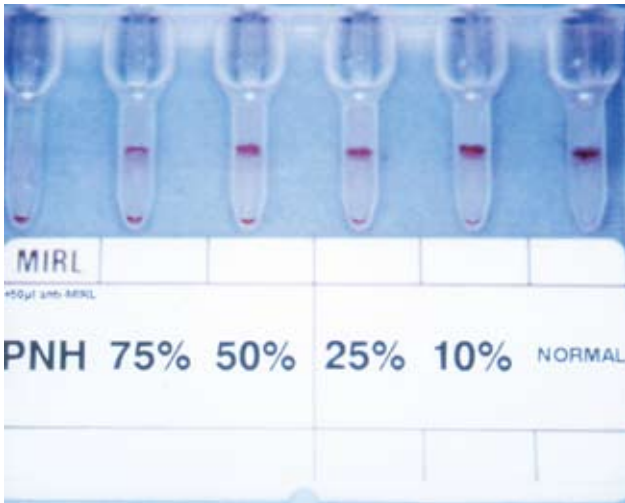
παραπάνω συνθήκες δεν εμφανίζεται καθόλου λύση των ερυθρών του μάρτυρα. Στις αμφίβολες περιπτώσεις, όπου ο παθολογικός πληθυσμός είναι πολύ μικρός, η ευαισθησία της δοκιμασίας αυξάνει αν χρησιμοποιηθούν νεαρά ερυθρά αιμοσφαίρια, όπως εκείνα της υπερκείμενης στιβάδας μετά από φυγοκέντρηση. Η δοκιμασία δεν είναι ειδική για τη ΝΠΑ, παρά μόνον όταν είναι θετική επίσης στον οξινισθέντα ορό του ασθενούς (μερικές φορές αυτόματα



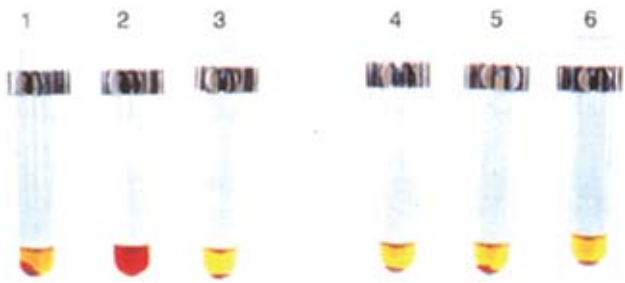
Εικόνα 10. Δοκιμασία νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαινουρίας σε γέλη sephacryl. Οι φυσιολογικοί ερυθροκυτταρικοί πληθυσμοί που φέρουν στην επιφάνειά τους τα CD55 και CD59 συνδέονται με τα σωματίδια της γέλης, μέσω της σύνδεσης CD55/anti-CD55/κονίκλειος IgG ή CD59/anti-CD59/κονίκλειος IgG και παραμένουν στην κορυφή των μικροσωληναρίων.



Εικόνα 11. Δοκιμασία νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαινουρίας σε γέλη sephacryl. 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.



Εικόνα 12. Δοκιμασία νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας σε γέλη spherocryl. Χρησιμοποιώντας μείγματα (75%, 50%, 25% και 10%) ερυθρών αιμοσφαιρίων ασθενών με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία, με πλήρη απουσία των CD55 και CD59 και συμβατών ερυθροκυττάρων φυσιολογικών ατόμων, βρέθηκε ότι μπορούσαν να ανιχνευτούν πληθυσμοί ερυθρών με έλλειψη των CD55 ή και CD59 σε ποσοστό 10% και άνω του συνολικού αριθμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Η παρουσία των επιμέρους υποπληθυσμών αξιολογείται από δύο ανεξάρτητους παρατηρητές και εκφραζόταν ημιποσοτικά ως 100%, 75%, 50%, 25% και 10% του συνόλου των ερυθρών.



Εικόνα 13. Δοκιμασία Ham. Τα παθολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια (αριστερά) δείχνουν σημαντική αιμόλυση με τη μεσολάβηση συμπληρώματος σε οξινισθέντα πρόσφατο ορό στους 37 °C. Η προθέρμανση του ορού αδρανοποιεί το συμπλήρωμα κι έτσι δεν εμφανίζεται λύση των παθολογικών κυττάρων (1, 4: μη οξινισθείς, 2, 5: οξινισθείς, 3, 6: αδρανοποιημένος). (Από Adattatada Pasquinelli F. *Diagnostiche e Tecniche di Laboratorio*).

χωρίς ύπαρξη συμπληρώματος, αφού είναι μη ενεργός), αρνητική στον αδρανοποιημένο ορό μετά από θέρμανση και αρνητική αν ο οξινισμένος ορός του ασθενούς δοκιμαστεί σε φυσιολογικά ερυθρά. Οι παραπάνω χαρακτηριστικές αποκλείουν τις διάφορες κληρονομικές ή επίκτητες σφαιροκυτταρώσεις ανοσολογικής αρχής, που μπορεί να δώσουν θετική μια συνήθη δοκιμασία Ham. Η δοκιμασία Ham είναι επίσης θετική στις δυσερυθροποιητικές αναιμίες τύπου II (HEMPAS), αλλά είναι αρνητική αν χρησιμοποιηθεί ο ορός του ασθενούς και μερικών φυσιολογικών ατόμων, ενώ είναι αρνητική η δοκιμασία σουκρόζης.^{82,83}

3.5. Δοκιμασία αιμόλυσης σε σουκρόζη

Τα ερυθρά του ασθενούς και μια μικρή ποσότητα ορού επωάζονται σε διάλυμα σουκρόζης χαμηλής ιοντικής ισχύος, η οποία ευοδώνει την καθήλωση του συμπληρώματος στη μεμβράνη των ερυθρών. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος που επισυμβαίνει αποδίδεται σε αντίδραση αντιγόνου-αντισώματος ή σε ενεργοποίηση της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος. Η δοκιμασία έχει μεγάλη σημασία μόνον όταν η αιμόλυση είναι >5%. Θα πρέπει να είναι θετική επίσης στο φυσιολογικό ορό, ενώ θα πρέπει να είναι θετική σε αιμόλυση ανοσολογικής αρχής, όταν χρησιμοποιείται μόνον ο ορός του ασθενούς.

Η δοκιμασία σουκρόζης είναι μια απλή και ευαίσθητη δοκιμασία. Όταν είναι αρνητική, απομακρύνει από τη διάγνωση της ΝΠΑ, εκτός εάν πρόκειται για ασθενή που έχει μεταγγιστεί πρόσφατα ή έχει χρησιμοποιηθεί ως αντιπηκτικό ηπαρίνη ή EDTA.⁸²⁻⁸⁴

3.6. Δοκιμασία λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων με θέρμανση

Μετρά την αυτόματη λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με εμφάνιση ερυθρωπής χρώσης του ορού από αίμα που έχει πήξει και έχει παραμείνει για 3 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C. Είναι μια πολύ απλή και ευαίσθητη δοκιμασία, αλλά αποβαίνει επίσης θετική τόσο στις κληρονομικές σφαιροκυτταρώσεις όσο και στις αιμόλυσεις ανοσολογικής αρχής.^{82,83}

3.7. Δοκιμασία λύσης από ψυχροσυγκολλητίνη

Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις ψυχροσυγκολλητινών στον ορό, παρουσία συμπληρώματος, εμφανίζεται καθήλωση και ενεργοποίηση του συμπληρώματος στα ερυθρά, με αποτέλεσμα τη λύση τους. Η δοκιμασία αυτή είναι θετική στις διάφορες κληρονομικές και επίκτητες δυσερυθροποιήσεις, αλλά επιτρέπει την αρκετά ακριβή εκτίμηση του ποσοστού των παθολογικών ερυθροκυττάρων στις περιπτώσεις ΝΠΑ.^{82,85}

3.8. Άλλες εξετάσεις

Στις βαριές μορφές της νόσου είναι χαρακτηριστική η μείωση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης (AChE) των ερυθρών αιμοσφαιρίων, που αφορά μόνο στα παθολογικά κύτταρα του αίματος, ενώ απουσιάζει στις πολύ ελαφρές μορφές. Η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης είναι μηδενική στον πληθυσμό των ερυθρών που είναι παθολογικά ευαίσθητα στο συμπλήρωμα. Αυτή η πληροφορία μπορεί να δοθεί επίσης με ανάλυση των

ερυθρών με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση αντισωμάτων κατά της χολινεστεράσης και έμμεσο ανοσοφθορισμό, κι έτσι με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι δυνατή η ποσοτική μέτρηση της βαρύτητας της νόσου και η εξέλιξή της. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για τη διάγνωση της νόσου, ιδιαίτερα όταν ο παθολογικός πληθυσμός των ερυθρών είναι πολύ μικρός. Η εξέταση αυτή μπορεί να αντικατασταθεί από μια πιο απλή δοκιμασία στο μικροσκόπιο φθορισμού με τη χρήση αντισωμάτων κατά της AChE και εφαρμογή φθορίζοντα αντισφαιρινικού ορού.⁸²

4. ΕΞΕΛΙΞΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ

Η εξέλιξη της νόσου εξαρτάται από τη βαρύτητα της αναιμίας, τη συχνότητα των επεισοδίων οξείας αιμόλυσης, τη βαρύτητα της μυελικής ανεπάρκειας και την εμφάνιση ή όχι θρομβωτικών επεισοδίων.

Μερικές περιπτώσεις της νόσου παρουσιάζουν μοιραία έκβαση σε μερικούς μήνες ή σε μερικά χρόνια από τη διάγνωση, ενώ άλλες είναι συμβατές με μακροχρόνια επιβίωση (>20 έτη).^{4,7} Η μέση επιβίωση κυμαίνεται από 10–15 έτη, ενώ οι συχνότερες αιτίες θανάτου είναι οι θρομβώσεις (30–45%) και οι αιμορραγίες (25–40%). Η θνητότητα ανέρχεται σε 5% περίπου κατ' έτος. Δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες θεωρούνται η αναιμία με αιμοσφαιρίνη <9 g/dL, ο αριθμός αιμοπεταλίων <150×10⁹/L, ο αριθμός πολυμορφοκυττάρων <1,5×10⁹/L και η ηλικία >40 ετών. Η παρουσία θρομβοπενίας μέτριας βαρύτητας είναι ένα συχνό εύρημα στους ασθενείς που εμφάνισαν ή θα εμφανίσουν επεισόδια θρομβώσεων.¹²

Μερικοί ασθενείς με ήπιες μορφές της νόσου –περίπου 15% των ασθενών– δεν εμφανίζουν επιπλοκές και συνήθως δεν έχουν ανάγκη μεταγγίσεων.^{7,10,12,22} Μερικές φορές, οι ασθενείς παρουσιάζουν μακροχρόνια ύφεση της νόσου με σύγχρονη μείωση της αναλογίας των παθολογικών κυττάρων στο περιφερικό αίμα, ενώ μερικοί ασθενείς διατηρούν ακόμη για μερικά χρόνια τις χαρακτηριστικές βιολογικές διαταραχές της και μερικοί άλλοι εμφανίζουν υποτροπή μετά από ύφεση άλλοτε άλλης διάρκειας. Στις περιπτώσεις της νόσου που παρουσιάζουν πλήρη ύφεση, φαίνεται ότι ο παθολογικός κλώνος –για κάποιον άγνωστο λόγο– χάνει το πλεονέκτημα ανάπτυξης, όπως συμβαίνει στο φυσιολογικό μυελικό μικροπεριβάλλον.^{7,10,22}

Σε άλλες περιπτώσεις, η «κλασική» ΝΠΑ εξελίσσεται σε παγκυτταροπενία με πλούσιο ή απλαστικό μυελό των οστών. Στο 10–25% περίπου των περιπτώσεων ΝΠΑ η νόσος εξελίσσεται σε δευτεροπαθή απλαστική αναιμία.^{7,8,10–22}

Σπάνια (0–4% στις διάφορες σειρές) η νόσος καταλήγει

σε οξεία λευχαιμία (συνήθως οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία, ΟΜΛ), της οποίας μπορεί να προηγείται μια φάση μυελοδυσπλασίας για διάστημα μηνών ή και ετών. Επίσης, έχει περιγραφεί και η ανάπτυξη δευτεροπαθούς μυελοϊνώσεως ή λεμφικής λευχαιμίας.^{8,10,12,52,86–88}

Οι γυναίκες με ΝΠΑ μπορεί να εμφανίσουν σοβαρές επιπλοκές και αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (20–25%). Σε πολλές περιπτώσεις η νόσος διαγιγνώσκεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (25% σε μια αναδρομική μελέτη). Η εγκυμοσύνη κατά την πορεία της νόσου αποτελεί αιτία επίτασης της αιμόλυσης και της μυελικής ανεπάρκειας, καθώς και αιτία των θρομβωτικών επιπλοκών, των λοιμώξεων, των αιμορραγιών, του ενδομήτριου θανάτου του εμβρύου και των αυτόματων αποβολών. Σε άλλες περιπτώσεις, η εγκυμοσύνη ενδέχεται να διαδράμει χωρίς σοβαρές επιπλοκές και να γεννηθεί ένα τελειόμηνο φυσιολογικό παιδί.^{89,90} Συνιστάται συστηματική αντιπηκτική θεραπεία με ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους ήδη από τη διαπίστωση της εγκυμοσύνης και στενή παρακολούθηση με συνεργασία αιματολόγου και γυναικολόγου.

5. ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ ΠΟΥ ΠΡΟΗΓΕΙΤΑΙ Ή ΣΥΝΟΔΕΥΕΙ ΚΑΠΟΙΑ ΑΛΛΗ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ

5.1. Απλαστική αναιμία και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

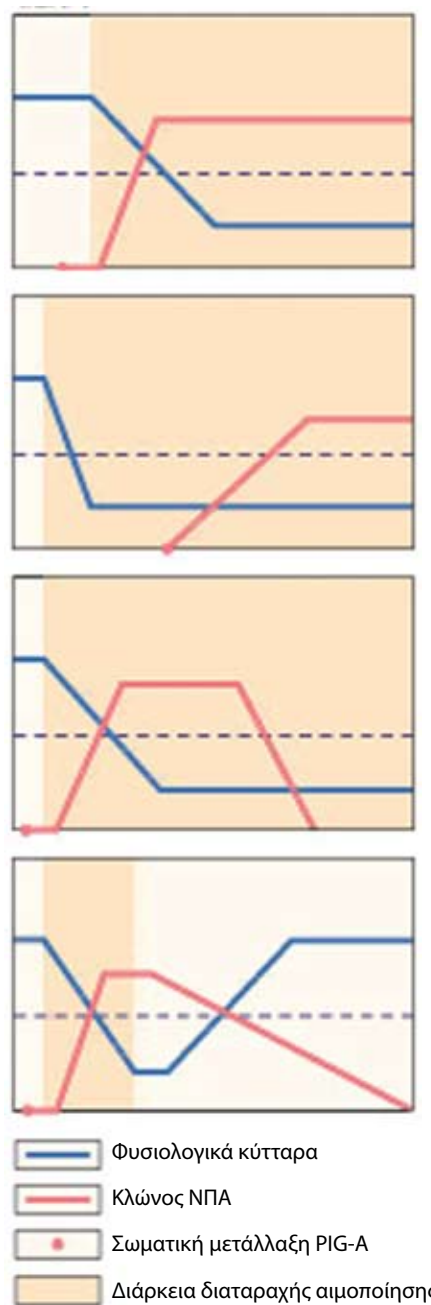
Όπως αναφέρθηκε στην κλινική εικόνα της ΝΠΑ, η σχέση μεταξύ της ΑΑ και της ΝΠΑ είναι πολύ στενή. Αν και συνήθως η ΑΑ δεν χαρακτηρίζεται από την επικράτηση κάποιου κλωνικού πληθυσμού, στην εξέλιξή της σε άλλοτε άλλο χρονικό διάστημα μπορεί να επιπλακεί με νοσήματα που εμφανίζουν κλωνικό χαρακτήρα, όπως η ΝΠΑ, τα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (ΜΔΣ) και η οξεία μη λεμφοβλαστική λευχαιμία (ΟΜΛ).^{2,3,90} Μερικές φορές, η ΝΠΑ εκδηλώνεται κατά την περίοδο έναρξης της αποκατάστασης της ερυθροποίησης ή αρκετό χρόνο από την εμφάνιση της πλήρους ή μερικής ύφεσης της ΑΑ (17–70 μήνες) μετά από θεραπεία με αντιλεμφοκυτταρικό ορό.⁹¹ Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι κύτταρα με φαινότυπο ΝΠΑ ανιχνεύονται με την κυτταρομετρία ροής σε ποσοστό 10–57% των ασθενών με ΑΑ,^{17,31,65,70–74,78–81,92} κυρίως μετά από τη χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής. Η ΝΠΑ που αναπτύσσεται σε ασθενείς με ΑΑ οι οποίοι έλαβαν αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη ή κυκλοσπορίνη συνήθως δεν ανήκει στην «κλασική» μορφή, ενώ όλοι οι ασθενείς εμφάνισαν μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A που δεν υπήρχαν όταν είχε τεθεί η διάγνωση της ΑΑ.⁹³ Πολύ σημαντικό για τη διερεύνηση της σχέσης των δύο νοσημάτων θεωρείται το γεγονός ότι ο μυελός της ΝΠΑ στις *in vitro* καλλιέργειες

συμπεριφέρεται όπως αυτός της AA, ακόμη και όταν δεν είναι υποκυτταρικός (τόσο τα GPI⁻ όσο και τα GPI⁺ αρχέγονα κύτταρα εμφανίζουν πτωχή ανάπτυξη.⁹⁴ Επίσης, τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα και των δύο νοσημάτων εμφανίζουν παρόμοια αντοχή στην απόπτωση.³² Η μελέτη των διαφόρων κυτταροκινών έδειξε ότι, και στις δύο νόσους, όσο χαμηλότερα ήταν τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και των λευκών αιμοσφαιρίων τόσο υψηλότερες ήταν οι τιμές της ερυθροποιητίνης και του G-CSF, ενώ δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές για την ιντερλευκίνη-6 (IL-6), τον TNF-α, τον παράγοντα ανάπτυξης των αρχέγονων κυττάρων (SCF), τον παράγοντα ανάπτυξης των κοκκιοκυττάρων/ μονοκυττάρων (GM-CSF) και την IFN-γ^{95,96} (εικ. 14).

Όπως αναφέρθηκε ήδη, τα GPI⁻ κύτταρα δεν εμφανίζουν κάποιο πλεονέκτημα ανάπτυξης στο περιβάλλον του φυσιολογικού μυελού και πιθανόν ο υποκυτταρικός μυελός της απλαστικής αναιμίας τους το παρέχει, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό και την επικράτησή τους.¹⁹ Το αν αυτό οφείλεται στην ικανότητά τους να «διαφεύγουν» από τη δράση των κυτταροτοξικών T-λεμφοκυττάρων –έχουν υποδοχείς GPI-πρωτεΐνες– ή στη μειωμένη δράση των κυτταροκινών αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Στην απλαστική αναιμία, η μυελική ανεπάρκεια οφείλεται σε αυτοάνοση καταστολή των αρχέγονων κυττάρων από T-λεμφοκύτταρα, η καταστροφική δράση των οποίων μπορεί να κατευθύνεται κατά των πρωτεϊνών της «άγκυρας» GPI και έτσι τα GPI⁻ αρχέγονα κύτταρα εμφανίζουν πλεονέκτημα επιβίωσης και κλωνική ανάπτυξη, αν και η άποψη αυτή παραμένει ακόμα θεωρητική.⁹⁷

5.2. Μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Τα ΜΔΣ αποτελούν επίκτητη κλωνική διαταραχή του αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου και εμφανίζονται κυρίως σε ηλικιωμένα άτομα. Χαρακτηρίζονται από μη αποδοτική αιμοποίηση, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρου βαθμού κυτταροπενιών στο περιφερικό αίμα, παρά το συνήθως υπερκυτταρικό μυελό, καθώς και από μορφολογικές ανωμαλίες σε μία ή περισσότερες κυτταρικές σειρές. Στα ΜΔΣ έχουν περιγραφεί διάφορες κυτταρογενετικές διαταραχές, όπως μονοσωμία 7, 7q-, μονοσωμία 5, 5q-, τρισωμία 8 κ.ά., καθώς και μοριακές βλάβες σε πρωτοογκογονίδια (N-ras), ογκοκατασταλτικά γονίδια (p53) και μεταγραφικούς παράγοντες (IRF-1, EVI-1) των αιμοποιητικών κυττάρων. Περίπου το 30% των ασθενών με ΜΔΣ εκτρέπονται σε οξεία λευχαιμία. Όλες οι παραπάνω διαταραχές καθώς και η εξέλιξη σε οξεία λευχαιμία των ΜΔΣ μπορεί να υποδηλώνουν την ύπαρξη κάποιας γενετικής έλλειψης σταθερότητας στον παθολογικό κλώνο.



Εικόνα 14. Περιπτώσεις συνδυασμού απλαστικής αναιμίας και νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ) ανάλογα με τους φυσιολογικούς και τους κλώνους ΝΠΑ. (α) ΝΠΑ: Η σωματική μετάλλαξη του PIG-A προκαλεί μυελική ανεπάρκεια, που, όταν αναπτυχθεί ο κλώνος της ΝΠΑ, εμφανίζει πλεονέκτημα ανάπτυξης. (β) Απλαστική αναιμία εξελισσόμενη σε ΝΠΑ: Η μετάλλαξη του PIG-A ακολουθεί τη μυελική ανεπάρκεια και έχει άμεσο πλεονέκτημα. (γ) ΝΠΑ εξελισσόμενη σε απλαστική αναιμία: Εξέλιξη της περίπτωσης α, όπου αρχικά ο κλώνος ΝΠΑ είναι αρκετά μεγάλος ώστε να καλύπτει τη μυελική ανεπάρκεια και, τελικά, ο κλώνος αυξάνεται ενώ παραμένει η μυελική ανεπάρκεια. (δ) Αποκατάσταση από ΝΠΑ: Ο μυελός αποκαθίσταται ενώ μειώνεται ο κλώνος ΝΠΑ.

Επιπλέον, ένδειξη υπέρ αυτής της άποψης αποτελεί το γεγονός της παρουσίας κλώνου ΝΠΑ στους ασθενείς με

ΜΔΣ. Η ΝΠΑ μπορεί να προηγείται ή να ακολουθεί την εμφάνιση του ΜΔΣ.^{98,99} Σε μελέτες με κυτταρομετρία ροής βρέθηκαν ερυθρά αιμοσφαίρια και πολυμορφοπύρρηνα με φαινότυπο ΝΠΑ (CD55⁻ και CD59⁻) σε ασθενείς με ΜΔΣ.^{65,70,71,74,78-81,100,101} Στις περιπτώσεις αυτές, συνήθως δεν υπήρχε σχέση μεταξύ της παρουσίας του κλώνου της ΝΠΑ και της προηγηθείσας αγωγής ή του χρόνου διάγνωσης του ΜΔΣ, ενώ βρέθηκαν μία ή περισσότερες μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A.¹⁰⁰ Παρά τα παραπάνω ευρήματα, οι ασθενείς συνήθως δεν εμφανίζουν *in vivo* ή *in vitro* αιμόλυση. Η διαφορά στην παρουσία αιμόλυσης μεταξύ ασθενών με ΜΔΣ και κλώνο ΝΠΑ και της «κλασικής» ΝΠΑ μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η ανάπτυξη του κλώνου της ΝΠΑ δεν ευνοείται στο μικροπεριβάλλον του μυελού των ΜΔΣ. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τη διευκρίνιση της σχέσης των δύο νοσημάτων.

5.3. Οξεία λευχαιμία και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Η εμφάνιση ΟΜΛ σε ασθενείς με ΝΠΑ παρατηρείται σε ποσοστό που κυμαίνεται κατά διάφορες μελέτες από 0–4%^{8,10,12} και μπορεί να ανήκει σε οποιοδήποτε από τους υπότυπους της κατά FAB ταξινόμησης.^{88,102-104} Ωστόσο, σπάνια οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν αιμόλυση και επανεμφάνιση του φαινοτύπου της ΝΠΑ μετά από την πλήρη ύφεση της νόσου.¹⁰⁵ Οι βλάστες της ΟΜΛΛ είναι συνήθως CD55⁻, ενώ η μέτρηση της αλκαλικής φωσφατάσης των λευκών δίνει μειωμένη ή μηδενική τιμή. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι τα λευχαιμικά κύτταρα προέρχονται από τον κλώνο της ΝΠΑ, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες, όπου βρέθηκαν λευχαιμικά κύτταρα με έλλειψη των CD55 και CD59 σε ασθενείς με ΝΠΑ οι οποίοι εκτράπηκαν σε ΟΜΛ.¹⁰⁶ Στους ασθενείς αυτούς, οι βλάστες εμφανίζουν πολλαπλές μεταλλάξεις στο γονίδιο PIG-A, σε αντίθεση με τους βλάστες της *de novo* ΟΜΛ, ενώ δεν βρέθηκαν καρυοτυπικές ανωμαλίες που να συσχετίζονται με την εκτροπή της ΝΠΑ σε ΟΜΛ.

Ωστόσο, πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία βλαστικών κυττάρων με έλλειψη CD55 ή και CD59 τόσο σε ασθενείς με ΟΜΛΛ που δεν είχαν προηγούμενο ιστορικό ΝΠΑ ή κληρονομική έλλειψη των CD55 και CD59 όσο και σε πολλές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές λευχαιμικών κυττάρων.^{103,104} Η έλλειψη των δύο αυτών GPI-πρωτεϊνών φαίνεται ότι οφείλεται είτε σε μειωμένη παραγωγή του αντίστοιχου mRNA, είτε σε διαταραχή της βιοσύνθεσης της GPI-άγκυρας λόγω βλάβης του γονιδίου PIG-A. Το ποσοστό ανίχνευσης κυττάρων με φαινότυπο ΝΠΑ (CD55⁻, CD59⁻) ανέρχεται στο 10–20% των ασθενών με ΟΜΛΛ.^{65,66,68,71,74,75,78,80,107}

5.4. Μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Η ΝΠΑ έχει περιγραφεί σε συνδυασμό κυρίως με μυελοϊνώση,^{86,108} ενώ έχουν αναφερθεί περιπτώσεις εξέλιξης της ΝΠΑ σε μυελοειδή μεταπλασία ή κάποιο άλλο μυελοϋπερπλαστικό σύνδρομο (ΜΥΣ). Η δοκιμασία Ham και σουκρόζης έχουν βρεθεί θετικές σε ένα ποσοστό ασθενών με ΧΜΛ και μυελοϊνώση⁸⁶ και σε ασθενείς με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή μυελοϊνώση, ενώ σε μερικούς ασθενείς παρατηρούνται εργαστηριακά δεδομένα αιμόλυσης χωρίς θετικές δοκιμασίες Ham και σουκρόζης. Ερυθρά αιμοσφαίρια με έλλειψη των CD55 ή και CD59 έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με ΜΥΣ.^{65,73,74,77,78} Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι τα αντισώματα κατά του CD59 πιθανόν προκαλούν διάφορες ενδοκυττάριας διαταραχές, όπως ενεργοποίηση πρωτεϊνών με δράση τυροσινικής κινάσης, φωσφορυλίωση των υποδοχέων των πρωτεϊνών p120 και Shc και ενεργοποίηση της ενδοπλασματικής μη εκκριτικής τυροσινικής κινάσης Syk. Η παρατήρηση αυτή ίσως μπορεί να εξηγήσει το γιατί οι ασθενείς με ΝΠΑ, που παρουσιάζουν διαταραχή στην έκφραση των GPI-πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου του CD59, είναι ευαίσθητοι στην εμφάνιση μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών.

5.5. Λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Σπάνια, έχει περιγραφεί εξέλιξη της ΝΠΑ σε λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα.^{12,109,110} Ωστόσο, έλλειψη του CD55 έχει αναφερθεί σε ασθενείς με μη Hodgkin λέμφωμα που δεν είχαν ιστορικό προηγηθείσας ΝΠΑ, ενώ έχει εντοπιστεί μείωση ή απουσία των CD55 και CD59 στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με λεμφοϋπερπλαστικά σύνδρομα.^{68,69,71,74,76,78} Σε ασθενείς με μη Hodgkin λέμφωμα, που έλαβαν θεραπεία με Campath-1H (anti-CD52 μονοκλωνικό αντίσωμα), βρέθηκε ότι από την επιφάνεια των T-λεμφοκυττάρων απουσίαζε όχι μόνο το CD52, που είναι μια GPI-πρωτεΐνη, αλλά και άλλες πρωτεΐνες που συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη μέσω GPI-άγκυρας, όπως οι CD48 και CD59. Η μοριακή ανάλυση σε αυτούς τους ασθενείς ανέδειξε μια μετάλλαξη στο γονίδιο PIG-A. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίζουν την υπόθεση ότι η απενεργοποίηση του CD52 μπορεί να οδηγήσει σε επέκταση του GPI-κυτταρικού πληθυσμού, με φαινοτυπικές και μοριακές διαταραχές όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται στη ΝΠΑ.¹¹¹

6. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Προς το παρόν, οι εφαρμοζόμενες θεραπευτικές προσπάθειες δεν έχουν αποδώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα.

Αν και η μέση επιβίωση των ασθενών με συντηρητικά μέσα φθάνει τα 10–12 χρόνια, έχουν αναφερθεί αρκετοί παράγοντες που συνδέονται με χειρότερη πρόγνωση. Οι παράγοντες αυτοί συνήθως προσφέρουν μικρή βοήθεια στην απόφαση για μεταμόσχευση στην πορεία της νόσου, αν και μερικοί παρέχουν ικανές ενδείξεις. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι παράγοντες που σχετίζονται με κακή πρόγνωση και οι οποίοι πιθανόν καθιστούν επιβεβλημένη την εφαρμογή μεταμόσχευσης μυελού. Αυτοί είναι (α) η εμφάνιση θρόμβωσης (ανάλογα με την εντόπιση, σχετικός κίνδυνος θανάτου/RR=10,2), (β) η παγκυτταροπενία (RR=5,5), (γ) η μετάπτωση σε ΜΔΣ ή οξεία λευχαιμία (RR=19,1) και (δ) η ύπαρξη θρομβοπενίας κατά τη διάγνωση (RR=2,2).^{4,10} Η αλλογενής μεταμόσχευση μυελού των οστών είναι σήμερα η μόνη θεραπεία που μπορεί να οδηγήσει στην ίαση της νόσου. Οι πρόοδοι σε αυτόν τον τομέα, από την εμπειρία στη μεταμόσχευση τόσο στην απλαστική αναιμία όσο και στην οξεία λευχαιμία, θα επιτρέψουν την εφαρμογή της μεθόδου σε μεγάλο αριθμό ατόμων με βαριές μορφές της νόσου. Εξάλλου, η αποτελεσματικότητα της αντιμετώπισης του συνδρόμου Budd-Chiari με παρατεταμένη χορήγηση ηπαρίνης ή θρομβολυτικών φαίνεται ότι έχει βελτιώσει γενικά την πρόγνωση των θρομβωτικών επεισοδίων. Οι απαραίτητες εξετάσεις για την αξιολόγηση και το χειρισμό των ασθενών αναφέρονται στον πίνακα 5.

6.1. Μεταγγίσεις

Όταν δεν είναι εφικτός ο έλεγχος της κατάστασης με συγχορήγηση κορτικοειδών ή ανδρογόνων, συνιστάται καταστολή της ερυθροποίησης με τακτικές μεταγγίσεις. Υπερφόρτωση σιδήρου σπάνια παρατηρείται επί ΝΠΑ, ενώ συνιστάται τακτική υποκατάσταση φυλλικού οξέος λόγω αυξημένων απαιτήσεων. Οι μεταγγίσεις ερυθρών ενδείκνυνται όταν η αναιμία δεν γίνεται καλά ανεκτή (αιμοσφαιρίνη <9 g/dL), καθώς και για την αντιμετώπιση

Πίνακας 5. Χρήσιμες εξετάσεις για το χειρισμό ασθενών με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία.

- Γενική αίματος
- Δικτυοερυθροκύτταρα
- Τιμή LDH, χολερυθρίνης, απτοσφαιρινών ορού
- Κυτταρομετρική ανάλυση ερυθρών (ή και με γέλη sephacryl) και πολυμορφοκυττάρων για έλλειψη CD55 ή και CD59
- Μελέτη σιδήρου ορού (τιμή ορού, TIBC, κορεσμός τρανσφερίνης, φερρίνη)
- Ουρία και κρεατινίνη αίματος
- Ερυθροποιητίνη ορού
- Αιμοσιδηρίνη ούρων (ένδειξη χρόνιας αιμόλυσης)

μιας βαριάς κρίσης παροξυστικής αιμόλυσης. Είναι μάλλον βέβαιο ότι ο φυσιολογικός αιματοκρίτης αναστέλλει σημαντικά την παθολογική αιμόλυση. Οι μεταγγίσεις γίνονται υποχρεωτικά με πλυμένα με φυσιολογικό ορό ερυθρά ή, καλύτερα, με κατεψυγμένα ερυθρά που επαναθερμαίνονται κατά τη στιγμή της χορήγησης. Οι μονάδες αίματος θα πρέπει να μην περιέχουν λευκά, αιμοπετάλια και πλάσμα, που αποτελούν, αντίστοιχα, παράγοντες κινδύνου αλλοανοσοποίησης,²⁵ ενεργοποίησης του συμπληρώματος και συνεπώς αύξησης της λύσης, αν και όλα αυτά δεν είναι πλήρως επιβεβαιωμένα.¹¹² Παρά τις παραπάνω προφυλάξεις, υπάρχει πιθανότητα οι μεταγγίσεις να εκλύουν επεισόδια θρομβώσεων, αφού δεν είναι γνωστό αν η προαναφερθείσα μεταφορά GPI-πρωτεϊνών στα ερυθρά της ΝΠΑ πραγματοποιείται *in vivo* και από ποιους παράγοντες εξαρτάται, αφού *in vitro* επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως η συγκέντρωση λευκωματίνης και άλατος, η θερμοκρασία κ.ά. Η χορήγηση αίματος είναι επιβεβλημένο να γίνεται με φίλτρο λευκών για την πρόληψη αντιδράσεων. Συνήθως, ο κίνδυνος αιμοχρωμάτωσης στους ασθενείς με ΝΠΑ που απαιτούν συχνές μεταγγίσεις είναι μικρός λόγω της σύγχρονης απώλειας σιδήρου στις περιπτώσεις με προεξάρχουσα αιμόλυση (αιμοσφαιρινουρία/αιμοσιδηρινουρία), ενώ αποτελεί σημαντικό πρόβλημα όταν η αναιμία οφείλεται κυρίως στη μυελική ανεπάρκεια.⁴

6.2. Ανδρογόνα

Ανάλογη, και επιπλέον και αναβολική δράση, έχουν και τα ανδρογόνα, που χρησιμοποιούνται μόνα ή σε συνδυασμό με κορτικοειδή. Η μακροχρόνια χορήγηση ανδρογόνων (οξυμεθολόνη, μετενολόνη ή νταναζόλη σε υψηλές δόσεις) μόνων ή σε συνδυασμό με κορτικοειδή, όπως στην αντιμετώπιση της απλαστικής αναιμίας, μπορεί να είναι αποτελεσματική και στη ΝΠΑ, με βελτίωση όλων ή μερικών μυελικών σειρών. Προς το παρόν ο μηχανισμός δράσης τους είναι άγνωστος, αλλά πιθανολογείται η αναστολή του συμπληρώματος. Τα αποτελέσματα είναι καλύτερα στις μορφές της νόσου με παγκυτταροπενία, τόσο με πλούσιο όσο και με πτωχό μυελό. Υπάρχουν όμως ενδείξεις ότι αυτή η θεραπεία συνοδεύεται συχνά από επίταση της αιμόλυσης και αύξηση της εμφάνισης κοιλιακών αλγών λόγω πιθανής αύξησης των ερυθροκυττάρων με ανεπάρκεια GPI-πρωτεϊνών και κατά συνέπεια αύξησης της πιθανότητας εμφάνισης αιμολυτικών επεισοδίων.^{4,11,113,114}

6.3. Σίδηρος

Οι ασθενείς συχνά γίνονται σιδηροπενικοί και απαιτείται υποκατάσταση του ελλείποντος σιδήρου. Τόσο η έλλειψη σιδήρου όσο και η χορήγησή του, ιδιαίτερα σε παρεντερική

μορφή, συνοδεύονται από έξαρση της αιμόλυσης, ενώ η από του στόματος χορήγηση συχνά δεν επαρκεί, δεδομένης της συνεχούς απώλειας σιδήρου από τα ούρα. Η θεραπεία με σίδηρο είναι συνήθως απαραίτητη, αφού η σιδηροπενική αναιμία είναι συχνή ακόμη και στους ασθενείς που λαμβάνουν μεταγγίσεις. Τόσο ο από του στόματος όσο –και πολύ περισσότερο– ο παρεντερικά χορηγούμενος σίδηρος γίνεται καλά ανεκτός, αν και έχει αναφερθεί επίταση της αιμόλυσης ιδιαίτερα με την παρεντερική χορήγηση.^{4,54,113} Και στην περίπτωση αυτή, η αιμόλυση οφείλεται στην αύξηση των παθολογικών ερυθρών αιμοσφαιρίων με έλλειψη των GPI-πρωτεϊνών.¹¹⁵ Η εμφάνιση αιμολυτικής αντίδρασης θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με κορτικοειδή, ανδρογόνα και μεταγγίσεις για καταστολή της ερυθροποίησης.

6.4. Κορτικοειδή

Η κλασική θεραπευτική προσέγγιση στη ΝΠΑ, μολονότι έως ένα βαθμό αμφιλεγόμενη, περιλαμβάνει τη χορήγηση κορτικοειδών για την αντιμετώπιση της οξείας αιμολυτικής κρίσης και της χρόνιας αιμόλυσης. Τα κορτικοειδή εμφανίζουν ταχεία κλινική αποτελεσματικότητα, πιθανώς αναστέλλοντας τη δράση του συμπληρώματος, και χορηγούνται και σε ώσεις ανά τακτά χρονικά διαστήματα ως συντήρηση.

Τα κορτικοειδή παρέχουν άλλοτε άλλη βοήθεια και σε ορισμένους ασθενείς φαίνεται να μετριάζουν την ένταση της αιμόλυσης. Σε μερικούς ασθενείς (περίπου στο 40%), δόση 0,25–1 mg/kg/ημέρα βελτιώνει ταχέως την αιμόλυση –αναστολή συμπληρώματος– και μειώνει την ανάγκη μεταγγίσεων. Σε περίπτωση αιμολυτικής κρίσης η δόση της πρεδνιζόνης πρέπει να αυξηθεί. Τέλος, αναφέρεται ότι στα 2/3 των ασθενών με ΝΠΑ που έλαβαν πρεδνιζόνη παρατηρήθηκε μείωση των παθολογικών ερυθροκυττάρων στο περιφερικό αίμα και δεν εμφανίστηκε κανένα επεισόδιο αιμόλυσης, ενώ αύξηση της αιμοσφαιρίνης παρατηρήθηκε μόνο στον έναν από αυτούς.^{4,113,114}

6.5. Δεξτράνη

Φαίνεται ότι η χορήγηση δεξτράνης, η οποία αναστέλλει *in vitro* την αιμόλυση των ερυθρών της ΝΠΑ, θα μπορούσε να μειώσει παροδικά και την αιμόλυση *in vivo*.¹¹⁴ Ωστόσο, η αύξηση των αιμορραγικών επιπλοκών υποδηλώνει ότι η θεραπευτική αυτή επιλογή θα πρέπει μάλλον να εγκαταλειφθεί.

6.6. Ερυθροποιητίνη

Εάν η σχετική έλλειψη ερυθροποιητίνης συνεισφέρει στην αναιμία, οι ασθενείς θα πρέπει να λαμβάνουν ερυθρο-

ποιητίνη. Ωστόσο, απαιτείται στενή παρακολούθησή τους, δεδομένου ότι η διέγερση της ερυθροποίησης μπορεί να συνοδεύεται από έξαρση της αιμόλυσης λόγω διέγερσης του κλωνικού πληθυσμού ερυθροβλαστών.

Η χορήγηση ερυθροποιητίνης έχει εφαρμοστεί σε λίγους ασθενείς με ΝΠΑ και μυελική ανεπάρκεια και έχει βρεθεί ασφαλής και πιθανόν ικανή να αυξήσει την τιμή της αιμοσφαιρίνης, ανεξαρτήτως των επιπέδων της στον ορό των ασθενών.^{4,96,115} Παρότι τα επίπεδα της ερυθροποιητίνης στον ορό των ασθενών με ΝΠΑ είναι συνήθως αυξημένα,⁹⁵ η χορήγησή της έχει ευνοϊκό αποτέλεσμα, ενδεχομένως λόγω της εκλεκτικής της δράσης στους φυσιολογικούς κλώνους των αρχέγονων κυττάρων της ερυθράς σειράς,⁹⁶ αν και μπορεί να επιτείνει την αιμόλυση λόγω αύξησης των παθολογικών πληθυσμών ερυθρών.

6.7. Αντιπηκτικά

Οι ανταγωνιστές της βιταμίνης Κ χορηγούνται σε περίπτωση θρόμβωσης ή σε επαπειλούμενη θρόμβωση στα άτομα που εμφανίζουν κοιλιακά ή οσφυϊκά άλγη και σε περίπτωση συνδρόμου Budd-Chiari, αλλά τα αποτελέσματα είναι αμφίβολα. Φαίνεται όμως ότι η προφυλακτική χορήγηση βαρφαρίνης (χωρίς αντενδείξεις) σε ασθενείς με πληθυσμούς πολυμορφοπυρήνων ΝΠΑ >50% μείωσε τα θρομβοεμβολικά επεισόδια.^{4,11,32,38} Επειδή τα αποτελέσματα των μελετών δεν είναι επί του παρόντος σαφή, δεν υπάρχουν ακόμη οδηγίες για την εφαρμογή της αντιπηκτικής αγωγής ανάλογα με τους πληθυσμούς ΝΠΑ, την ηλικία, τη συνεργασιμότητα των ασθενών και την παρουσία άλλων συνοδών νοσημάτων. Η ηπαρίνη φαίνεται ότι είναι το φάρμακο εκλογής για το οξύ ή το υποξύ σύνδρομο Budd-Chiari.^{4,35,36} Η δράση της αποτελεί αντικείμενο διχογνωμίας, ενώ σπάνια έχει ενοχοποιηθεί για επίταση της αιμόλυσης, αν και το γεγονός αυτό είναι ασύνηθες. Μετά την οξεία φάση και τη βελτίωση της κλινικής, της εργαστηριακής και της σπινθηρογραφικής εικόνας, η αρχική ενδοφλέβια χορήγηση ηπαρίνης μπορεί να αντικατασταθεί με χορήγηση βαρφαρίνης (με επιθυμητό INR 3–4) ή ηπαρίνης χαμηλού μοριακού βάρους. Τα θρομβολυτικά –στρεπτοκινάση ή ουροκινάση– προτιμώνται λιγότερο σε σχέση με την ηπαρίνη κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης, αν και η χορήγηση του ενεργοποιητή του ιστικού πλασμινογόνου φαίνεται να έχει καλά αποτελέσματα, ενώ μερικοί προτείνουν ακτινολογικές επεμβατικές προσεγγίσεις.^{46,116}

Η προφυλακτική αντιπηκτική θεραπεία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης πρέπει να αρχίζει αμέσως μετά από τη διαπίστωσή της και να συνεχίζεται για 6 περίπου εβδομάδες μετά τον τοκετό. Προτιμάται η ηπαρίνη χαμηλού μοριακού βάρους λόγω της μικρότερης συχνότητας εμφάνισης θρομ-

βοπενίας από ηπαρίνη σε σχέση με την κλασική ηπαρίνη. Τα αντιπηκτικά από το στόμα αντενδείκνυνται λόγω της τερατογενετικής δράσης τους, ενώ μπορούν να δοθούν μετά από τον τοκετό.

6.8. Χημειοθεραπεία

Δεν έχουν γίνει προσπάθειες χορήγησης έντονης χημειοθεραπείας ανάλογες με εκείνες που εφαρμόζονται στις οξείες λευχαιμίες. Η βαρύτητα μερικών μορφών πιθανόν να το απαιτεί, χωρίς όμως να είναι γνωστό αν η επιτευχθείσα ύφεση θα έχει διάρκεια μερικών μηνών, όπως συμβαίνει στις βαριές επίκτητες μυελικές δυσπλασίες. Οι μονοθεραπείες με χορήγηση χλωραμβουκίλης, μερκαπτοπουρίνης, βουσουλφάνης, αζαθειοπρίνης ή βινκριστίνης φαίνεται ότι σπάνια παρέχουν ικανοποιητικά αποτελέσματα.⁸⁷

6.9. Σπληνεκτομή

Η διενέργεια σπληνεκτομής προδιαθέτει σε σημαντικές λοιμώξεις και θρομβώσεις, γι' αυτό και συνιστάται μόνο σε περιπτώσεις με πολύ μεγάλη και συμπτωματική διόγκωση του οργάνου.⁴

6.10. Ανοσοκατασταλτική αγωγή

Για τους ασθενείς που ταξινομούνται στη μορφή της νόσου με έντονη μυελική απλασία (AA-ΝΠΑ) και δεν έχουν συμβατό συγγενή δότη ή των οποίων η κατάσταση δεν επιτρέπει τη διενέργεια μεταμόσχευσης μυελού, έχει επιχειρηθεί η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη, κυκλοσπορίνη ή συνδυασμό τους. Τα αποτελέσματα είναι ικανοποιητικά, ακόμη και για τους ασθενείς που ανήκουν είτε στη μορφή «ΝΠΑ-ΑΑ» είτε ακόμη και στην «κλασική ΝΠΑ».^{117,118}

6.11. Μεταμόσχευση μυελού των οστών

Εφόσον η ΝΠΑ είναι κλωνική νόσος του πολυδύναμου αιμοποιητικού κυττάρου, η αλλογονιδιακή μεταμόσχευση αποτελεί τη μόνη θεραπευτική επιλογή που ενέχει τις προϋποθέσεις ίασης της νόσου. Μέχρι σήμερα, η μεγαλύτερη σειρά από 220 καταγεγραμμένους ασθενείς προέρχεται από τη Γαλλική Ομάδα Μελέτης. Από την ομάδα αυτή, η μέση επιβίωση ήταν 12 έτη και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μεταμόσχευσης προσδιόρισε τους παρακάτω παράγοντες με προγνωστική αξία: ηλικία >55 ετών, ιστορικό θρομβωτικού επεισοδίου, εξέλιξη σε παγκυτταροπενία, μεταμόρφωση σε οξεία λευχαιμία, θρομβοπενία κατά τη διάγνωση.¹⁰ Η Διεθνής Ομάδα Καταγραφής Μεταμοσχεύσεων Μυελού των Οστών (International

Bone Marrow Transplant Registry, IBMTR) ανέφερε ότι η πιθανότητα διαιτούς επιβίωσης σε 48 ασθενείς με ΝΠΑ που έλαβαν μόσχευμα από συγγενή συμβατό δότη ανερχόταν σε 56%. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν 28 έτη, ενώ η πλειονότητα των θανάτων παρουσιάστηκε τον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση.¹¹⁹ Η Ευρωπαϊκή Ομάδα Μεταμοσχεύσεων Μυελού των Οστών (European Blood and Marrow Transplant Group), στο πρόσφατο συνέδριο της Αμερικανικής Αιματολογικής Εταιρείας (2008), ανακάλυψε ότι η πιθανότητα πενταετούς επιβίωσης είναι 70% σε ασθενείς με ΝΠΑ που έλαβαν αλλογονιδιακή μεταμόσχευση από συμβατό συγγενή δότη. Ωστόσο, στην ομάδα αυτή των ασθενών μόνο το 54% πληρούσε τα κριτήρια της κλασικής ΝΠΑ. Η διάμεση ηλικία των ασθενών ήταν 30 έτη και οξεία ή χρόνια νόσος του μοσχεύματος κατά του ξενιστή (GvHD) εμφανίστηκε στο 15% και 20% των ασθενών, αντίστοιχα.¹²⁰

Η απόφαση για μεταμόσχευση μυελού εξαρτάται από την κλινική ετερογένεια της νόσου, τη φυσική της ιστορία και το συνδυασμό της με σύνδρομα μυελικής ανεπάρκειας. Η αλλογονιδιακή μεταμόσχευση μυελού από συμβατό συγγενή δότη ή η ομοιογονιδιακή μεταμόσχευση καθώς και η αλλογονιδιακή μεταμόσχευση από αρχέγονα κύτταρα ομφάλιου λώρου φαίνεται ότι έχουν δώσει καλά αποτελέσματα.^{10,119-123} Η θεραπεία προετοιμασίας για τη μεταμόσχευση σε ασθενείς με ΝΠΑ-ΑΑ περιλαμβάνει συνδυασμό κυκλοφωσφαμίδης και αντιλεμφοκυτταρικού ορού, ενώ πιο έντονα σχήματα απαιτούνται για την κλασική νόσο (προσθήκη προκαρβαζίνης με ή χωρίς χορήγηση βουσουλφάνης, φλουνταραμπίνης ή μόνο με κυκλοφωσφαμίδη ή και ακτινοβολία), ενώ δεν υπάρχουν ακόμα σαφή δεδομένα για εφαρμογή ηπιότερων σχημάτων προετοιμασίας.¹²⁴⁻¹²⁹ Σήμερα, είναι αποδεκτό ότι η αλλογονιδιακή μεταμόσχευση μυελού από απόλυτα HLA συμβατό αδελφό ή αδελφή δότη είναι η θεραπεία εκλογής για ασθενείς νεαρής ηλικίας που εμφανίζουν βαριές παγκυτταροπενίες, απειλητικές για τη ζωή θρομβώσεις, ανθεκτική αιμολυτική αναιμία που απαιτεί συχνές μεταγγίσεις και κακοήθη μετατροπή της νόσου.^{10,119,120}

Ωστόσο, αρκετά ακόμη ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα όσον αφορά στην αλλογονιδιακή μεταμόσχευση στη ΝΠΑ. Λόγω της απρόβλεπτης εξέλιξης της νόσου και της πιθανότητας ακόμη και αυτόματης ύφεσης, δεν είναι σαφές ποια είναι η κατάλληλη χρονική στιγμή για τη μεταμόσχευση, αν θα πρέπει να χρησιμοποιείται συμβατικό ή ελαττωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας, αφού το τελευταίο συνοδεύεται από μικρότερη περιμεταμοσχευτική θνησιμότητα αλλά και από εντονότερη GvHD, και ποια είναι η θέση της αλλογονιδιακής μεταμόσχευσης από HLA συμβατό μη μέλος της οικογένειας ή της μεταμόσχευσης από

μη απόλυτα HLA-συμβατό δότη. Τέλος, δεν είναι σαφής η θέση της αλλογονιδιακής μεταμόσχευσης μετά από τη νέα δυνατότητα εφαρμογής ειδικής θεραπείας με αναστολείς του συμπληρώματος, όπως το eculizumab. Για την απάντηση σε αυτά τα ερωτήματα απαιτούνται συνεργατικές μελέτες μεγάλου αριθμού ασθενών. Οι ενδείξεις και τα δεδομένα της αλλογονιδιακής μεταμόσχευσης στους ασθενείς με ΝΠΑ παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Αλλογονιδιακή μεταμόσχευση στους ασθενείς με νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία.

- Μυελική ανεπάρκεια – σύνδρομο ΝΠΑ/ΑΑ (μειωμένης έντασης σχήμα προετοιμασίας)
- Μείζονες επιπλοκές σχετιζόμενες με τη ΝΠΑ
- 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 ΝΠΑ 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%

ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία, ΑΑ: Απλαστική αναιμία, GvHD: Νόσος μοσχεύματος κατά του ξενιστή

6.12. Αναστολείς συμπληρώματος

Αφού η αιμόλυση είναι αποτέλεσμα δράσης του συμπληρώματος, η αναστολή αυτής της δράσης φαίνεται λογικός θεραπευτικός στόχος. Στη λογική αυτή άρχισε πρόσφατα να εφαρμόζεται θεραπεία με ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του κλάσματος C5 του συμπληρώματος (eculizumab).

Πρόσφατα, η χρησιμοποίηση σε ασθενείς του eculizumab (Soliris®), ενός μονοκλωνικού αντισώματος κατά του C5 που αναστέλλει την τελική ενεργοποίηση του συμπληρώματος, φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική στους ασθενείς με κλασική ΝΠΑ. Το φάρμακο δείχνει αποτελεσματικό στον έλεγχο της αιμόλυσης, μειώνει σημαντικά την ανάγκη μεταγγίσεων, μειώνει τον κίνδυνο θρόμβωσης, βελτιώνει την ποιότητα ζωής και γίνεται καλά ανεκτό παρά τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λοιμώξεων. Σε μια μελέτη φάσης III, με τελικό σημείο αξιολόγησης τη μείωση των μεταγγίσεων, το eculizumab συγκρίθηκε

με εικονικό φάρμακο (placebo) σε 87 τυχαιοποιηθέντες ασθενείς με ΝΠΑ. Το eculizumab χορηγήθηκε σε δόση 600 mg εβδομαδιαίως για 4 εβδομάδες, ακολουθούμενο από δόση 900 mg ανά δεύτερη εβδομάδα μέχρι την 26η εβδομάδα. Σταθεροποίηση των επιπέδων αιμοσφαιρίνης και απεξάρτηση από μεταγγίσεις επιτεύχθηκε στο 49% (21 από 43) των ασθενών που έλαβαν eculizumab και σε κανέναν από τους 44 ασθενείς που έλαβαν εικονικό φάρμακο ($P < 0,001$). Κατά τη διάρκεια της μελέτης δεν χορηγήθηκε καμία μετάγγιση ανά ασθενή στην ομάδα του eculizumab, σε σύγκριση με 10 μονάδες ανά ασθενή στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου ($P < 0,001$). Επίσης, το eculizumab ελάττωσε σημαντικά το βαθμό ενδαγγειακής αιμόλυσης.¹³⁰ Σε δεύτερη μελέτη φάσης III, το eculizumab μείωσε επίσης σημαντικά την ανάγκη για μεταγγίσεις, καθώς και τη συχνότητα εμφάνισης θρομβώσεων.¹³¹ Ωστόσο, το eculizumab δεν φαίνεται να είναι αποτελεσματικό στη μυελική ανεπάρκεια της ΝΠΑ.^{130–132}

Δύο εβδομάδες πριν από την έναρξη της θεραπείας με eculizumab όλοι οι ασθενείς πρέπει να εμβολιάζονται έναντι της *Neisseria meningitides*, καθώς η αναστολή του συμπληρώματος στο επίπεδο του C5 αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης λοιμώξεων από μικροοργανισμούς όπως η *Neisseria meningitides* και η *Neisseria gonorrhoeae*. Το eculizumab είναι ασφαλές φάρμακο και καλά ανεκτό, αλλά πρέπει να χορηγείται συνεχώς, αφού δεν θεραπεύει την υποκείμενη βλάβη στη ΝΠΑ. Η συχνότερη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η κεφαλαλγία, που επισυμβαίνει στο 50% των ασθενών, συνήθως μετά από την πρώτη ή τη δεύτερη χορήγηση και πολύ σπάνια στη συνέχεια. Η πλέον επικίνδυνη ανεπιθύμητη ενέργεια είναι η σηψαιμία από *Neisseria*, με ετήσιο κίνδυνο εμφάνισης 0,5% ακόμη και στους ασθενείς που έχουν εμβολιαστεί. Ο εμβολιασμός πρέπει να επαναλαμβάνεται κάθε 3–5 χρόνια εφόσον ο ασθενής συνεχίζει να λαμβάνει το eculizumab.¹³³

Οι περισσότεροι ασθενείς βελτιώνονται μέσα σε λίγες ώρες ή ημέρες μετά από τη λήψη του eculizumab. Η παρακολούθησή τους βασίζεται σε έλεγχο με γενική αίματος, καταμέτρηση ΔΕΚ, προσδιορισμό LDH και πλήρη βιοχημικό έλεγχο εβδομαδιαίως τις πρώτες 4 εβδομάδες και στη συνέχεια μία φορά το μήνα. Η LDH επανέρχεται πολύ γρήγορα στα φυσιολογικά επίπεδα, ενώ τα ΔΕΚ παραμένουν σχεδόν πάντα αυξημένα, καθώς οι ασθενείς συνεχίζουν να έχουν κάποιο μικρό βαθμό εξωαγγειακής αιμόλυσης λόγω απομάκρυνσης ερυθροκυττάρων με περίσσεια C3 από το σπλήνα. Ενδαγγειακή αιμόλυση και επανεμφάνιση των συμπτωμάτων της ΝΠΑ παρατηρείται μόνο στο 2% των ασθενών που έχουν ανταποκριθεί στο eculizumab. Τυπικά, αυτό συμβαίνει μία ή δύο ημέρες πριν από την επόμενη δόση του φαρμάκου και συνοδεύεται

από σημαντική αύξηση της LDH. Αν το φαινόμενο αυτό λαμβάνει χώρα σε τακτική βάση, το μεσοδιάστημα μεταξύ των χορηγήσεων πρέπει να μειωθεί στις 12-13 ημέρες ή η δόση του eculizumab να αυξηθεί στα 1200 mg κάθε 14 ημέρες. Σε περιπτώσεις λοιμώξεων (π.χ. ιογενών) που προκαλούν επανεμφάνιση της αιμόλυσης, η δόση του eculizumab δεν απαιτεί τροποποίηση.¹³³

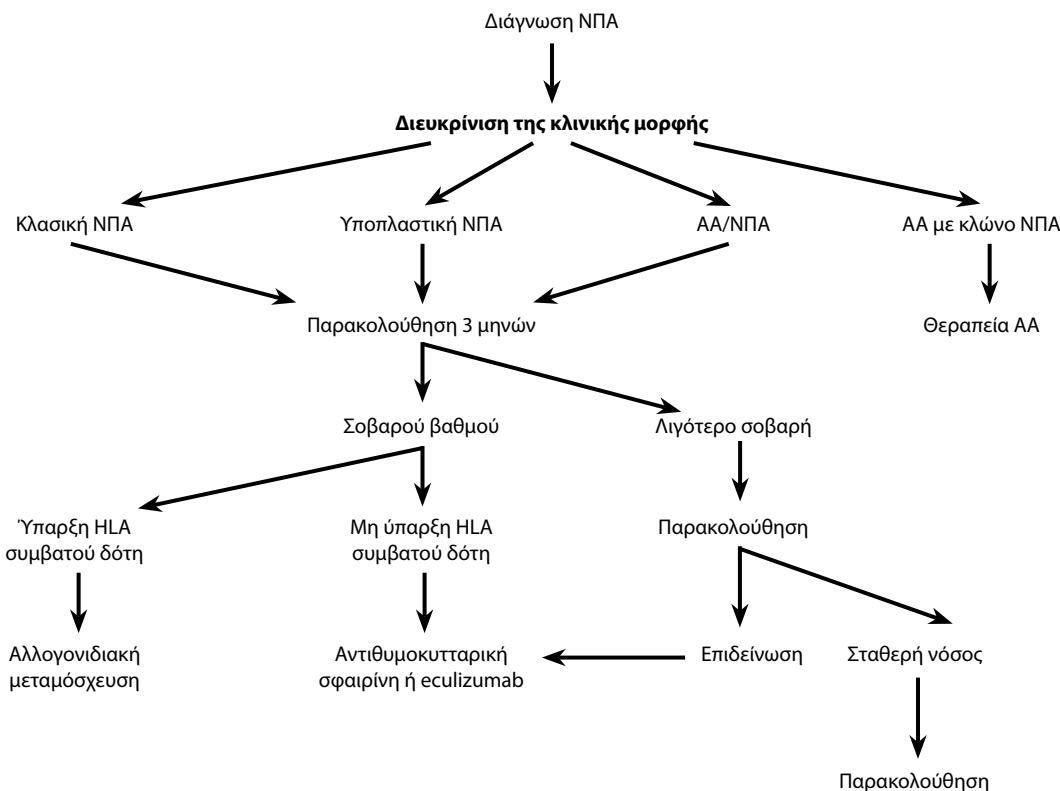
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ανακεφαλαιώνοντας όλα τα παραπάνω δεδομένα, ο αλγόριθμος για την αντιμετώπιση της ΝΠΑ φαίνεται στον πίνακα 7. Στις μορφές με «κλασική ΝΠΑ», «ΑΑ-ΝΠΑ» ή «ΝΠΑ με υποπλαστικό μυελό, ΝΠΑ-ΑΑ» ο ασθενής θα πρέπει να παρακολουθείται για 3 μήνες, και στην περίπτωση που η νόσος χαρακτηρίζεται ως βαριάς πρόγνωσης ακολουθεί αλλογονιδιακή μεταμόσχευση μυελού από HLA συμβατό συγγενή δότη, εφόσον η γενική κατάσταση και η ηλικία του ασθενούς το επιτρέπουν. Το eculizumab συνιστάται για ασθενείς με κλασική ΝΠΑ που παρουσιάζουν βαριά αναιμία, είναι μεταγγισιοεξαρτώμενοι, έχουν εμφανίσει θρομβωτικό επεισόδιο ή συχνούς παροξυσμούς κοιλιακού

άλγους και έχουν νεφρική ανεπάρκεια ή άλλη οργανική βλάβη λόγω της ΝΠΑ.¹³³ Σε ασθενείς με βαριά «ΝΠΑ με υποπλαστικό μυελό, ΝΠΑ-ΑΑ» που δεν είναι κατάλληλοι για αυτόλογη μεταμόσχευση, η χορήγηση ανοσοκατασταλτικής αγωγής με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη και κυκλοσπορίνη θεωρείται η θεραπεία εκλογής. Αν η νόσος δεν εμφανίζει χαρακτήρες βαριάς μορφής ο ασθενής λαμβάνει μόνο υποστηρικτική αγωγή, ενώ αν η νόσος επιδεινωθεί ακολουθείται επιθετικότερη τακτική. Τέλος, η μορφή της νόσου που χαρακτηρίζεται ως «ΑΑ με κλώνο ΝΠΑ» αντιμετωπίζεται όπως η κλασική απλαστική αναιμία.

Στο μέλλον αναμένονται πληροφορίες από βασικές μελέτες (α) για τους ακριβείς μηχανισμούς της θρομβοφιλίας στη ΝΠΑ (διευκρίνιση για την αυξημένη προσβολή των ηπατικών, μεσεντερίων, εγκεφαλικών, δερματικών φλεβών), (β) για τη διευκρίνιση της κλωνικής επιλογής -σχέση μεταξύ ΝΠΑ και απλαστικής αναιμίας, ΝΠΑ και ανθεκτικής αναιμίας-ΜΔΣ- και (γ) για τη βάση της κλωνικής επικράτησης. Επίσης, αναμένονται κλινικές μελέτες που θα παράσχουν πληροφορίες για (α) τους θεραπευτικούς χειρισμούς της θρομβοφιλίας στη ΝΠΑ, (β) τις ενδείξεις για μεταμόσχευση μετά από τις νέες θεραπείες, (γ) την

Πίνακας 7. Αλγόριθμος θεραπείας της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας.



ΝΠΑ: Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία, ΑΑ: Απλαστική αναιμία

εγκυμοσύνη και ΝΠΑ (κίνδυνοι μητέρας-εμβρύου), (δ) την διαφοράς και (ε) τη διευκρίνιση της φυσικής ιστορίας των υπαρξη διαφορετικών χειρισμών ανάλογα με γεωγραφικές υποκλινικών μορφών της ΝΠΑ.

ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Clinical presentation, diagnosis and treatment

J. MELETIS,¹ A. SARANTOPOULOS,¹ J.V. ASIMAKOPOULOS,¹ E. TERPOS²

¹First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Laiko" General Hospital, ²Department of Medical Research, 251 General Air Force Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(4):454–478

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare acquired disorder of hematopoietic stem cell characterized by the presence of intravascular hemolysis, marrow failure, nocturnal hemoglobinuria, thrombosis and rarely leukemia transformation. PNH is related to a somatic mutation in the phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A), X-linked gene, responsible for a deficiency in glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs). The lack of GPI-APs complement regulatory proteins CD55 and CD59 leads to hemolysis. The diagnosis is based on flow cytometry, which allowed direct quantification of the GPI-AP-deficient cells. The clinical polymorphism of PNH has been recognized by four presentations; one form, predominantly hemolytic without overt marrow failure, referred to classic PNH, one with marrow failure that is often described as the aplastic anemia PNH syndrome (AA-PNH), a very mild disease with almost no symptoms (mini-PNH), and the hypoplastic form of PNH. Thromboses remain a major life threatening complication affecting outcomes in all disease subcategories. Thrombotic events are characterized by involvement of unusual sites (hepatic, mesenteric, cerebral, dermal veins). Treatment of PNH is mainly symptomatic. Allogeneic bone marrow transplantation is the only curative option in case of severe complications during the course of the diseases. A new targeted treatment strategy is the inhibition of the terminal complement cascade with the monoclonal antibody eculizumab which is a C5-inhibitor humanized monoclonal antibody. In classic PNH recent studies have shown that eculizumab is efficient to reduce complement mediated intravascular hemolysis, reduce the need for transfusions, improve the quality of life in patients with PNH and reduce the risk for thromboembolic complications, which are the main cause of mortality in PNH. Concerning the AA-PNH syndrome, allogeneic bone marrow transplantation is the reference treatment in young patients with a sibling donor. Immunosuppressive therapy remains an important treatment modality in this subcategory for patients without a donor or ineligible for BMT. Recurrent thrombotic events remains even now associated with bad prognosis, whatever the form of the disease.

Key words: CD55, CD59, Clinical presentation, DAF, MIRL, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Treatment

Βιβλιογραφία

1. ROSSE WF, WARE RE. The molecular basis of PNH. *Blood* 1995, 86:3277–3286
2. YOUNG NS, ABKOWITZ JL, LUZZATTO L. New insights into the pathophysiology of acquired cytopenias. *Hematology* 2000, 1:18–38
3. LUZZATTO L, JAJA K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds) *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the GPI-linked proteins*. Academic Press, New York, 2000:21–47
4. PARKER C, OMINE M, RICHARDS S, NISHIMURA J, BESSLER M, WARE R ET AL. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005, 106:3699–3709
5. ROSSE WF, HILLMAN P, SCHREIBER AD. Immune mediated hemolytic anemia. *Hematology* 2000, 1:48–62
6. HILLMAN P, LEWIS SM, BESSLER M, LUZZATTO L, DACIE JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333:1253–1258
7. DACIE JV, LEWIS SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Clinical manifestations, hematology and nature of disease. *Ser Haematol* 1972, 5:3–23
8. KAUFMANN RW, SCHECHTER GP, MCFARLAND W. PNH terminating in acute granulocytic leukemia. *Blood* 1969, 33:287–291
9. 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* 2004, 83:193–207
10. SOCIE G, MARY JY, DE GRAMONT A, RIO B, LEPORRIER M, ROSE C ET AL. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Long-term follow-up and prognostic factor. *Lancet* 1996, 348:573–577

11. SIRCHIA G, LEWIS SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Clin Haematol* 1975, 4:199–229
12. GRAMONT A. *Hemoglobinurie paroxystique nocturne. Etude clinique et biologique de 142 patients*. These Med, Paris, 1982
13. BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ et al (eds) *Hematology: Basic principles and practice*. Philadelphia, 2005:419–427
14. VAN DEN HEUVEL-EIBRINK MM, BREDIUS RG, TE WINKEL ML, TAMMINGA R, DE KRAKER J, SCHOUTEN-VAN MEETEREN AY ET AL. Childhood paroxysmal nocturnal haemoglobinuria, a report of 11 cases in the Netherlands. *Br J Haematol* 2005, 128:571–577
15. AKSOY M, ERDEM M, DINCOL G. Two rare complications of chronic benzene poisoning: Myeloid metaplasia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Report of two cases. *Blut* 1975, 30:255–263
16. ROSSE WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Present status and future prospects. *West J Med* 1980, 132:219–228
17. VOGEL SJ, REINHARD EH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria associated with infectious mononucleosis. *Blood* 1979, 54:351–353
18. PEFFAUT DE LATOUR R, SOCIE G. L'hémoglobinurie paroxystique nocturne. *Rev Prat* 2007, 57:701–703
19. ROSSE WF. Hematopoiesis and the defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 1997, 100:953–954
20. ROSSE WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine* 1997, 76:63–94
21. TREMML G, KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Learning about PNH cells from patients and from mice. *Haema* 1998, 1:12–20
22. KRUAETRACHUE M, WASI P, NA-NAKORN S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in Thailand with special reference to an association with aplastic anemia. *Br J Haematol* 1978, 39:267–276
23. BLUM SF, SULLIVAN JM, GARDNER FH. The exacerbation of hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by strenuous exercise. *Blood* 1967, 30:513–517
24. HANSEN NE. Sleep related plasma haemoglobin levels in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Acta Med Scand* 1968, 184:547–549
25. SIRCHIA G, FERRONE S, MERCURIALI F. Leukocyte antigen antibody reaction and lysis of PNH erythrocytes. *Blood* 1970, 36:334–336
26. ROSSE WF, GUTTERMAN LA. The effect of iron therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1970, 36:559–565
27. WANG H, CHUHJOT, YASUE S, OMINE M, NAKAO S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 2002, 100:3897–3902
28. ROTOLI B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Baillieres Clin Haematol* 1989, 2:113–118
29. LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101–110
30. ROSSE WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria as a molecular disease. *Medicine* 1997, 77:63–93
31. GRISCELLI-BENNACEUR A, GLUCKMAN E, SCROBOHACI ML, JONVEAUX P, VU T, BAZARBACHI A ET AL. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Search for a pathogenetic link. *Blood* 1995, 85:1354–1563
32. NAFA K, BESSLER M, MASON P, VULLIAMY T, HILLMEN P, CASTROMALASPINA H ET AL. Factor V Leiden mutation investigated by amplification created restriction enzyme site (ACRES) in PNH patients with and without thrombosis. *Haematologica* 1996, 81:540–542
33. SLOAN EM, YOUNG NS. Thrombotic complications in PNH. In: Young NS, Moss J (eds) *Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins*. Academic Press, San Diego, 2000:101–112
34. ZIMMERMAN D, BELL WR. Venous thrombosis and splenic rupture in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1980, 68:275–279
35. HARTMANN RC, LUTHER AB, JENKINS DE, TENORIO LE, SABA HI. Fulminant hepatic venous thrombosis (Budd-Chiari syndrome) in PNH: Definition of a medical emergency. *Johns Hopkins Med J* 1980, 146:247–254
36. LEIBOWITZ AI, HARTMANN RC. The Budd-Chiari syndrome in PNH revisited. *Br J Haematol* 1981, 49:659–660
37. DESSYPRIS EN, CLARK DA, MCKEE LC, KRANTZ SB. Increased sensitivity to complement of erythroid and myeloid progenitors in PNH. *N Engl J Med* 1983, 309:690–693
38. MOYO VM, MUKINA GL, BARRETT ES, BRODSKY RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 2004, 126:133–138
39. HALL C, RICHARDS S, HILLMEN P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2003, 102:3587–3591
40. PEYTERMANN R, RHODES RS, HARTMANN RC. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with particular reference to progressive diffuse hepatic venous thrombosis. *Ser Haematol* 1972, 5:115–136
41. STEINBERG D, CARVALHO AC, CHESNEY CM, COLMAN RW. Platelet hypersensitivity and intravascular coagulation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Med* 1975, 59:845–850
42. BIRGENS HS, HANCKE S, ROSENKLINT A, HANSEN NE. Ultrasonic demonstration of clinical and subclinical hepatic venous thrombosis in PNH. *Br J Haematol* 1986, 64:737–743
43. SPENCER JA. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in pregnancy: Case report. *Br J Obstet Gynaecol* 1980, 87:246–248
44. KUNSTLINGTR, ROSSE WF. Erythrocyte acetyl cholinesterase deficiency in PNH. A comparison of the complement sensitive and insensitive populations. *Blood* 1969, 33:607–616
45. SHOLAR PW, BELL WR. Thrombolytic therapy for inferior vena cava thrombosis in PNH. *Ann Intern Med* 1985, 103:539–541
46. MCMULLIN MF, HILLMEN P, JACKSON J, GANLY P, LUZZATTO L. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Intern Med* 1994, 235:85–89
47. JOHNSON RV, KAPLAN SR, BLAIBLOCK Z. Cerebral venous thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Neurology* 1970, 20:681–686
48. TITTON RL, COAKLEY FV. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with thrombotic Budd-Chiari syndrome and renal cortical hemosiderin. *Radiology* 2002, 225:67–70

49. MATHIEU D, RAHMOUNI A, VILLENEUVE P, ANGLADE MC, ROCHANT H, VASILE N. Impact of magnetic resonance imaging on the diagnosis of abdominal complications of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 85:3283–3288
50. CLARK DA, BUTLER SA, BRAREN V, HARTMANN RC, JENKINS DE JR. The kidneys in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1981, 57:83–89
51. MOORAKI A, BOROUMAND B, MOHAMAD ZADEH F, AHMED SH, BASTANI B. Acute reversible renal failure in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Nephrol* 1998, 50:255–257
52. HARRIS JW, KOSCICK R, LAZARUS HM, ESCHLEMAN JR, MEDOF ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma* 1999, 32:401–426
53. DACIE JV, LEWIS SM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Variation in clinical severity and association with bone marrow hypoplasia. *Br J Haematol* 1961, 7:442–457
54. HARTMANN RC, JENKINS DE, MCKEE LV, HEYSSEL RM. Clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine* 1966, 45:331–363
55. KANN HE, MENGEL CE, WALL RL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria obscured by the presence of iron deficiency. *Ann Intern Med* 1967, 67:593–596
56. LEE GR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: *Wintrrobe's clinical hematology*. 9th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1993:1232–1244
57. SCHUBERT J, ALVARADO M, UCIECHOWSKI P, ZIELINSKA-SKOWRONEK M, FREUND M, VOGT H. Diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1991, 79:487–492
58. HALL SE, ROSSE WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87:5332–5340
59. RICHARDS SJ, RAWSTON AC, HILLMEN P. Application of flow cytometry to diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry* 2000, 42:223–233
60. VARMA N, VARMA S, VOHRA H, MALIK K, GAREWAL G. Flow cytometric detection of PNH defect and response to therapy in aplastic anemia patients. *Methods Cell Sci* 2003, 24:77–78
61. BRODSKY RA, MUCKINA GL, NELSON KL, LAWRENCE TS, JONES RJ, BUCKLEY JT. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aegolysin. *Blood* 1999, 93:1749–1756
62. PRINCE GM, NGUYEN M, LAZARUS HM, BRODSKY RA, TERSTAPEN LW, MEDOF MF. Peripheral blood harvest of unaffected CD34⁺Cd38⁻ hematopoietic precursors in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86:3381–3386
63. TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, IIDA Y, ENDO Y, FUJITA T ET AL. Deficiency of GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73:703–711
64. ΜΕΛΕΤΗΣ Γ, ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΙΒ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαινουρίας. *Αρχ Έλλ Ιατρ* 2009, 26:206–229
65. 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 micro typing system. *Leuk Lymphoma* 1998, 28:177–182
66. TERPOS E, MICHALI E, SAMARKOS M, MELETIS C, TSIMBERIDOU A, KANELLOPOULOU G ET AL. “PNH-like” red cell populations in acute leukemia and myeloproliferative syndromes. *Br J Haematol* 1998, 102:P-1228
67. TERPOS E, MICHALI E, MELETIS C, SAMARKOS M, TSIMBERIDOU A, VARIAMI E ET AL. “PNH-like” red cell populations in patients with anemia of different etiology. *Vox Sang* 1998, 74(Suppl 1):P-1434
68. TERPOS E, MICHALI E, SAMARKOS M, MELETIS C, TSIMBERIDOU A, NODAROS K ET AL. Detection of PNH red cell populations in acute leukaemia, lymphoproliferative syndromes and solid tumors using the sephacryl gel test microtyping system. *Proceedings of 8th International Congress on Anticancer Treatment, Paris, 1998:159*
69. TERPOS E, SAMARKOS A, KOURAMBA A, KATSAROU O, STAVROPOULOS J, MASOURIDIS ET AL. Reduction of CD55 and/or CD59 in red blood cells of patients with HIV infection. *Med Sci Monit* 2008, 14:CR276–CR280
70. ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΣΑΜΑΡΚΟΣ Μ, ΜΙΧΑΛΗ Ε, ΜΕΛΕΤΗΣ Χ, ΠΑΪΚΟΣ Σ, ΚΟΡΟΒΕΣΗΣ Κ ΚΑΙ ΣΥΝ. Φαινότυπος ερυθρών αιμοσφαιρίων τύπου νυκτερινής παροξυσμικής αιμοσφαινουρίας σε ασθενείς με απλαστική αναιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. *Haema* 1988, 1(Suppl 1):231
71. ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΧ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαινουρία. Κλινική εικόνα – σχέση με άλλα αιματολογικά νοσήματα. *Ιπποκράτης* 1999, 7:1–16
72. 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 anaemia, myelodysplastic syndromes and myeloproliferative disorders. *Haematologia* 2001, 31:7–16
73. TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, TSIRONI M, KOROVESIS K ET AL. Unusual association between increased bone resorption and presence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria phenotype in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2003, 78:344–348
74. MELETIS J, TERPOS E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003, 9:RA161–172
75. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Red cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria – phenotype in patients with acute leukemia. *Hematology* 2002, 7:69–74
76. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with lymphoproliferative syndromes. *Hematol J* 2001, 2:33–37
77. MELETIS J, TERPOS E, SAMARKOS M, MELETIS C, APOSTOLIDOU E, KOMNINAKA V ET AL. Detection of CD55- and/or CD59-deficient red cell populations in patients with plasma cell dyscrasias. *Int J Hematol* 2002, 75:40–44
78. MELETIS J, TERPOS E. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Clinical presentation and association with other haematological disorders. *Haema* 2001, 4:79–88
79. MELETIS J, TERPOS E, MAVROGIANNI D, LILAKOS K, APOSTOLIDOU

- Ε, TSIONI M ET AL. Aplastic anaemia with large PNH-like red cell population. *Haema* 2003, 6:103–106
80. ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΣΑΜΑΡΚΟΣ Μ, ΜΕΛΕΤΗΣ Χ, ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ Ε, ΚΟΜΝΗΝΑΚΑ Β, ΜΕΛΕΤΗΣ Ι. Ανίχνευση πληθυσμών ερυθροκυττάρων με απουσία των CD55 ή και CD59 σε μυελοϋπερπλαστικά σύνδρομα. *Ιατρική* 2000, 77:471–475
 81. ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΣΑΜΑΡΚΟΣ Μ, ΜΕΛΕΤΗΣ Χ, ΚΟΜΝΗΝΑΚΑ Β, ΑΠΟΣΤΟΛΙΔΟΥ Ε, ΜΠΕΝΟΠΟΥΛΟΥ Ο ΚΑΙ ΣΥΝ. Ανίχνευση πληθυσμών ερυθρών αιμοσφαιρίων με απουσία του CD55 ή και του CD59 σε ασθενείς με απλαστική αναιμία και μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα. *Αρχ Έλλ Ιατρ* 2000, 17:383–389
 82. PARKER CJ. Historical aspects of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: "Defining the disease". *Br J Haematol* 2002, 117:3–22
 83. JENKINS DE JR. Diagnostic tests for PNH. *Ser Haematol* 1972, 5:24–41
 84. GOTZE O, MULLER-EBERHARD HJ. PNH lysis initiated by the C3 activator system. *N Engl J Med* 1972, 286:180–184
 85. ROSSEWF, DACIE JV. Immune lysis of normal and PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966, 45:736–748
 86. HANSEN NE, KILLMANN SA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in myelofibrosis. *Blood* 1970, 36:428–431
 87. ALMQUIST A, HOLIN J, WAHLIN A. Response to busulphan treatment of PNH and myelofibrosis in one and the same patient. *Acta Med Scand* 1981, 209:133–135
 88. KRAUSE JR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and acute non-lymphocytic leukemia. A report of three cases exhibiting different cytologic types. *Cancer* 1983, 51:2078–2082
 89. 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
 90. TICHELLI A, SOCIE G, MARCH J, BARGE R, FRICKHOFEN N, McCANN S ET AL. Outcome of pregnancy and disease course among women with aplastic anemia treated with immunosuppression. *Ann Intern Med* 2002, 137:164–172
 91. TICHELLI A, GRATWOHL A, WURSCH A, NISSEN C, SPECK B. Late haematological complications in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 1988, 69:413–418
 92. DE PLANQUE MM, BACIGALUPO A, WURSCH A, HOWS JM, DEVERGIE A, FRICKHOFEN N ET AL. Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globuline. Severe Aplastic Anaemia Working Party of European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 1989, 73:121–126
 93. NAGARAJAN S, BRODSKY RA, YOUNG NS, MEDOF ME. Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. *Blood* 1995, 86:4656–4661
 94. DUNN DE, NAGARAJAN S, DEVETTEN M, WEICHOLD FF, MEDOF ME, YOUNG NS ET AL. The knock-out model of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pig-a (-) hematopoiesis is reconstituted following intercellular transfer of GPI-anchored proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7938–7943
 95. NAKAKUMA H, NAGAKURA S, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, IWAMOTO N, KAGIMOTO T ET AL. Markedly high plasma erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor levels in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 1997, 66:451–457
 96. ASTORI C, BONFICHI M, PAGNUCCO G, BERNASCONI P, LAZZARINO M, ORLANDI E ET AL. Treatment with recombinant human erythropoietin (rHuEpo) in a patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Evaluation of membrane proteins CD55 and CD59 with cytofluorometric assay. *Br J Haematol* 1997, 97:586–588
 97. LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired X-linked genetic disease with somatic-cell mosaicism. *Curr Opin Genet Dev* 2006, 16:317–322
 98. 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
 99. LUZZATTO L, FAMILUSI JB, WILLIAMS CK, JUNAID TA, ROTOLI B, ALFINITO F. The PNH abnormality in myeloproliferative disorders: Association of PNH and acute erythremic myelosis in two children. *Haematologica* 1979, 64:13–30
 100. 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
 101. VAN KAMP H, SMIT JW, VAN DEN BERG E, RUUD HALIE M, VELLENGA E. Myelodysplasia following paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Evidence for the emergence of a separate clone. *Br J Haematol* 1994, 87:399–400
 102. SEYA T, HARA T, OKADA M, KOJIMA A, MATSUMOTO M, AKEDO H. Two models of homologous C3 deposition on Ramos Burkitt's lymphoma cell substrains co-expressing DAF (CD55), CD59 and CR2 (CD21), and on cells lacking them. *Int Immunol* 1992, 4:1361–1371
 103. SEYA T, TEJIMA H, FUKUDA H, HARA T, MATSUMOTO M, HATANAKA M ET AL. Acute promyelocytic leukemia with CD59 deficiency. *Leuk Res* 1993, 17:895–896
 104. HIRSCH VJ, NEUBACH PA, PARKER DM, REESE MH, STONE MJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Termination in acute myelomonocytic leukemia and reappearance after leukemic remission. *Arch Intern Med* 1981, 141:525–527
 105. SHICHISHIMA T, TERASAWA T, HASHIMOTO C, OHTO H, TAKAHASHI M, SHIBATA A ET AL. Discordant and heterogeneous expression of GPI-anchored membrane proteins on leukemic cells in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993, 81:1855–1862
 106. HARA T, KOJIMA A, FUKUDA H, MASAOKA T, FUKUMORIY, MATSUMOTO M ET AL. Levels of complement regulatory proteins, CD35 (CR1), CD46 (MCP) and CD55 (DAF) in human haematological malignancies. *Br J Haematol* 1992, 82:368–372
 107. NAKAHATA J, TAKAHASHI M, FUSE I, NAKAMORI Y, NOMOTO N, SAITOH H ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with myelofibrosis: Progression to acute myeloblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1993, 12:137–142
 108. CHRISTOU T, SUBRAMANIAN S, FUNG C. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria preceding malignant lymphoma. *Arch Intern Med* 1987, 147:377–378
 109. OMURA GA. Coexistence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hema-*

- tol 1981, 11:439–441
110. HERTENSTEIN B, WAGNER B, BUNJES D, DUNCKER C, RAGHAVACHAR A, ARNOLD R ET AL. Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after *in vivo* application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 1995, 86:1487–1492
 111. VINIOU N, MICHALI E, MELETIS J, ANDREOPOULOS A, VAIPOULOS G, STAVROYIANNI N ET AL. Trisomy 8 in a patient who responded to therapy with all-trans-retinoic acid and developed paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1997, 97:135–136
 112. BRECHER ME, TASWELL HF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells: A myth revisited. *Transfusion* 1989, 29:681–685
 113. ROSSE WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1982, 60:20–23
 114. SHICHISHIMA T, SAITOH Y, NOJI H, TERASAWA T, MARUYAMA Y. *In vivo* effects of various therapies on complement-sensitive erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 1996, 63:291–302
 115. BOURANTAS K. High-dose recombinant human erythropoietin and low-dose corticosteroids for treatment of anemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Acta Haematol* 1994, 91:62–65
 116. GRIFFITH JF, MAHMOOD AE, COOPER S, ELIAS E, WEST RJ, OL-LIFF SP. Radiological intervention in Budd-Chiari syndrome: Technique and outcome in 18 patients. *Clin Radiol* 1996, 51:775–784
 117. STOPPA AM, VEY N, SAINTY D, ARNOULET C, CAMERLO J, CAPPIELLO MA ET AL. Correction of aplastic anaemia complicating paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Absence of eradication of the PNH clone and dependence of response on cyclosporin A administration. *Br J Haematol* 1996, 93:42–44
 118. PAQUETTE RL, YOSHIMURA R, VEISEH C, KUNKEL L, GAJEWSKI J, ROSEN PJ. Clinical characteristics predict response to antithymocyte globulin in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1997, 96:92–97
 119. SASO R, MARSH J, CEVRESKA L, SZER J, GALE RP, ROWLINGS PA ET AL. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999, 104:392–396
 120. PEFFAULT DE LATOUR R, SCHREZENMEIER H, MARY JY, BACIGALUPO A, DE SOUZA C, WILLEMEZ R ET AL. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An ongoing joint study of the AAWP EBMT group and the French Society of Hematology. *Blood* 2008, 112, 1181 (abstract)
 121. GRAHAM ML, ROSSE WF, HALPERIN EC, MILLER CR, WARE RE. Resolution of Budd-Chiari syndrome following bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1996, 92:707–710
 122. DOUKAS MA, FLEMING D, JENNINGS D. Identical twin marrow transplantation for venous thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; long-term complete remission as assessed by flow cytometry. *Bone Marrow Transplant* 1998, 22:717–721
 123. STORB R, EVANS S, THOMAS ED, BUCKNER CD, CLIFT RA, FEFER A ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and refractory marrow failure treated by marrow transplantation. *Br J Haematol* 1973, 24:743–750
 124. ANTIN JH, GINSBURG D, SMITH BR, NATHAN DG, ORKIN SH, RAPPEPORT JM. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood* 1985, 66:1247–1250
 125. BEMBA M, GUARDIOLA P, GANDERET L, DEVERGIE A, RIBAUD P, ESPE-ROU H ET AL. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 1999, 105:366–368
 126. CHO SG, LIM J, KIM Y, EOM HS, JIN CY, HAN CW ET AL. Conditioning with high-dose cyclophosphamide may not sufficient to provide a long-term remission of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following syngeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001, 28:987–988
 127. FLOTHO C, STRAHM B, KONTNY U, DUFFNER U, PETERS AM, DUPUIS W ET AL. Stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in childhood. *Br J Haematol* 2002, 118:124–127
 128. GROSSKREUTZ C, ROSS V, SCIGLIANO E, FRUSTMAN S, ISOLA L. Low dose total body irradiation, fludarabine, and antithymocyte globulin conditioning for non-myceloablative allogeneic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003, 9:453–459
 129. LEE JL, LEE JH, CHOI SJ, CHOI SJ, KIM S, SEOL M ET AL. Allogeneic hematopoietic transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol* 2003, 71:114–118
 130. HILLMEN P, YOUNG NS, SCHUBERT J, BRODSKY RA, SOCIÉ G, MUUS PET AL. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2006, 355:1232–1243
 131. BRODSKY RA, YOUNG NS, ANTONIOLI E, RISITANO AM, SCHREZENMEIER H, SCHUBERT J 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
 132. BRODSKY RA. Advances in diagnosis and therapy of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood Rev* 2007, 22:65–74
 133. BRODSKY RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2009, 113:6522–6527

Corresponding author:

J. Meletis, First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Athens, “Laiko” General Hospital, 17 Agiou Thoma street, GR-115 27 Athens, Greece
e-mail: imeletis@cc.uoa.gr