

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**TROMBOZ, HEMOLİTİK ANEMİ VE APLAZİ İLE
SEYREDEBİLEN PAROKSİSMAL NOKTURNAL
HEMOGLOBİNÜRİ (PNH) HASTALIĞININ SIKLIĞINI DEĞİŞİK
KLİNİK BULGULARLA GELEN VE PNH DÜŞÜNDÜREN
GRUPLARDA TARANMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Sena Ece DAVARCI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İsmet AYDOĞDU

Manisa, 2018

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince, başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmet Aydoğdu olmak üzere, bana her konuda destek olan ve eğitimime katkısı olan saygıdeğer hocalarıma içten dileklerle teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca beraber çalışma fırsatı bulduğum ve pek çok zorluğu paylaştığım tüm meslektaşlarıma, sağlık personeline ve hastane personeline çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlığı süresince bu nadir hastalık konusunda dikkatli davranarak hastaların gönderilmesi ve takibinde bize yardımcı olan tüm meslektaşlarımıza teşekkür ederiz.

Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman destek olan, tüm zorlukları benimle paylaşan, her daim dürüst, vicdanlı ve çok çalışmayı öğreten ve öğütleyen çok kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Sena Ece DAVARCI

Manisa, 2018

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	V
TABLolar	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
GRAFİKLER DİZİNİ	X
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kan Hücreleri	2
2.1.1 Eritrositler	2
2.1.2 Lökositler	2
2.1.3 Trombositler	3
2.2 Hematopoez	3
2.3 Anemi	4
2.4 Kompleman sistemi	5
2.4.1 Kompleman Aktivasyonu	6
2.5 Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH)	9
2.5.1 Patofizyoloji	10
2.5.2 Tanı	11
2.5.3 Klinik Formlar	12
2.5.3.1 Klasik Form	12
2.5.3.2 PNH İlişkili Aplastik Anemi (AA)	13
2.5.3.3 Subklinik PNH	13
2.5.3.4 PNH'da Tromboz	14

2.5.4 PNH Tedavisi	16
2.5.4.1 Subklinik PNH ve PNH İlişkili Aplastik Anemi Tedavisi.....	16
2.5.4.2 Klasik PNH Tedavisi	16
2.5.4.3 Tromboz Tedavisi	18
2.5.4.4 Tromboz Profilaksisi.....	19
2.5.5 PNH Testi İçin Klinik Endikasyonlar.....	19
2.5.6 PNH İçin Flow Sitometri Analizi	22
III.GEREÇ VE YÖNTEM	23
IV.BULGULAR	25
4.1 İstatistiksel Analiz	25
4.2 Demografik Veriler	25
V. TARTIŞMA.....	33
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	39
VII. ÖZET.....	40
VIII. ABSTRACT	42
IX.KAYNAKLAR.....	44

KISALTMALAR

PNH	: Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri
HLA	: Human Leukocyte Antigen
SCF	: Stem Cell Factor
Epo	: Eritropoetin
Tpo	: Trombopoetin
G-CSF	: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	: Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
M-CSF	: Monocyte-Colony Stimulating Factor
OEH	: Ortalama Eritrosit Hacmi
DAF	: Decay Accelerating Factor
MCP	: Membrane Cofactor Protein
CR1	: Compleman Receptor 1
Ag-Ab	: Antijen antikor kompleksi
CRP	: C Reaktif Protein
oxLDL	: Oxidized Low Density Lipoprotein
SAP	: Serum Amiloid Protein
C3Nef	: C3 Nefritik Faktör
MBL	: MannoZ Bağlayan Lektin
MASP	: MBL İlişkili Serin Proteaz
IGG	: İmmünglobulin G
RCA	: Kompleman Aktivasyonunun Düzenleyicileri
CR2	: Compleman Receptor 2

MAC	: Membrane Attack Complex
PIG-A	: Phosphatidylinositol Glycan Class A
GPI	: Glycosylphosphatidylinositol
MIRL	: Membrane Inhibitor of Reactive Lysis
NO	: Nitrik Oksit
NK	: Natural Killer
FLAER	: Fluoresan Aerolizin
LDH	: Laktik Dehidrogenaz
AA	: Aplastik Anemi
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
FDA	: Food and Drug Administration
INR	: International Normalized Ratio
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
RBC	: Red Blood Cell
WBC	: White Blood Cell
Hb	: Hemoglobin
Plt	: Platelet
İ.Bil	: İndirekt Bilirubin
IVIG	: İntravenöz İmmünglobulin
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
C	: Cinsiyet
E	: Eritrosit
G	: Granülosit

M : Monosit

ICCS : International Clinical Cytometry Society

ESCCA : European Society for Clinical Cell Analysis



TABLULAR

Tablo 1.	Anemilerin Morfolojik Sınıflandırılması	5
Tablo 2.	PNH Testi İçin Klinik Endikasyonlar	21
Tablo 3.	Dahil Edilme Kriterleri	23
Tablo 4.	Çalışmaya katılan hastaların PNH klon pozitif ve negatif oluşuna göre ortalama hemogram ve biyokimyasal değerleri	27
Tablo 5.	Lökosit düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları	29
Tablo 6.	Hemoglobin düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları	29
Tablo 7.	Trombosit düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları	30
Tablo 8.	PNH klon pozitifliği saptanan hastaların yaş-cinsiyet-hemogram ve biyokimyasal parametreleri ile ilk pozitif saptanan klon yüzdeleri	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Hematopoez.....	4
Şekil 2.	Kompleman sisteminin klasik yoldan aktivasyonu.....	7
Şekil 3.	Kompleman sisteminin alternatif yoldan aktivasyonu.....	7
Şekil 4.	Kompleman sisteminin lektin yolu ile aktivasyonu.....	8



GRAFİKLER DİZİNİ

- Grafik 1.** Çalışmaya alınan hastaların kadın-erkek oranları..... 25
- Grafik 2.** Cinsiyete göre PNH klon saptanması 26
- Grafik 3.** PNH klonu araştırılma nedenlerine göre pozitiflik oranları 28



I. GİRİŞ

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH), nadir görülen bir hastalık olup hematopoetik kök hücreyi etkileyen somatik bir mutasyonun sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Edinsel olan ve her 3 seriyi de etkileyen bu mutasyon, hematopoetik kök hücre tarafından sentezlenen olgun hücrelerin zarlarına bazı proteinlerin bağlanamaması ile sonuçlanmaktadır.

Hastalık çeşitli klinik bulgularla karşımıza çıkmakla birlikte ana olarak hemolitik, trombotik ve hipoplastik olarak üç tabloda kendini gösterir. Bu tablolar bir arada da görülebilir. Kronik intravasküler hemolizin sonucu olarak letarji, erektil disfonksiyon, hematüri, böbrek yetmezliği, pulmoner hipertansiyon gibi bulgularla karşımıza gelebileceği gibi bazen ilk ya da tek bulgu tromboz, özellikle alışlagelmedik bölgelerde gelişen (portal ven trombozu, splenik ven trombozu, mezenter ven trombozu gibi) tromboz olabilir. Hipoplastik tablo ile gelen hastalarda ise kemik iliği yetmezliği bulguları olup aplastik anemi ile karışabilmektedir.

1800'lü yılların başlarında fark edilen bu hastalık gerek değişken ve karmaşık klinik tablosu gerekse spesifik tanı testlerinin eksikliği nedeni ile geç tanı konulmaktaydı (1). Tanı alan hastalarda ise kan transfüzyonu, tromboz profilaksisi gibi destek tedavi ya da allojenik kemik iliği nakli dışında tedavi seçeneklerinin olmayışı hastalığın yüksek mortalite ile seyretmesine neden olmaktaydı. 2007 yılında bir anti-C5 monoklonal antikoru olan Eculizimab'ın tedavide yerini alması ile birlikte intravasküler hemoliz ve bunun komplikasyonlarında önemli derecede azalmalar görülmüştür. Allojenik kemik iliği nakli tek küratif tedavi olsa da hem HLA uygun vericisi olmayan hastalarda uygulanmayışı hem de nakil ilişkili morbidite ve mortalitesi göz önüne alındığında klasik PNH'da ilk seçenek olmaktan çıkmış olup sadece seçilmiş hastalarda tercih edilmektedir (2). Tanı ve tedavide bu yeni gelişmelerin ışığında çeşitli klinik bulgularla gelen bu hastalığın hangi risk gruplarında daha sık olduğunu belirlemeyi, geleceğe ise en riskli grupları belirleyip projeksiyon tutmayı amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1 Kan Hücreleri

2.1.1 Eritrositler

Eritrositlerin primer görevi akciğerler ve dokular arasındaki oksijen ve karbondioksit taşınmasının sağlanmasıdır. Sitoplazmasının büyük bir kısmı hemoglobinden oluşur. Ortalama ömrü 120 gün olup günlük olarak %1 i yenilenir. Periferal kanda en çok görülen hücrelerdir.

2.1.2 Lökositler

Nötrofiller lökositlerin erişkinlerde en sık görüleni olup bakteriyel enfeksiyonlara karşı primer bariyer görevi yapmaktadır. Dolaşımında 10 gün, dokularda 1-4 gün kalırlar.

Eozinofiller içerdiği kırmızı granüller ile dikkati çeker ve alerjik reaksiyonlar ve paraziter enfeksiyonlarda rol oynar.

Bazofiller periferal kanda en az bulunan hücrelerdir. Hipersensitivite reaksiyonlarında görev alırlar. Sitoplazmasında mavi-mor granüller içerirler.

Lenfositler, nötrofillerden sonra ikinci sıklıktaki hücrelerdir. Viral enfeksiyonlarda sayısı artar. Fonksiyonlarına göre iki grupta toplanırlar: B ve T lenfositler. B lenfositler humoral immünitinin elemanı olup antijenik uyarılar ile antikor yapımını sağlayan plazma hücrelerine dönüşür. T hücreler ise hücrel immünitede görev yapmakta olup aynı zamanda immün sistemin yönetim ve denetimini de gerçekleştirir.

Monositler periferal kanda 8-14 saat geçirdikten sonra dokulara göç eden ve doku makrofajlarını oluşturan hücrelerdir. Fagositoz ve antijenik proteinlerin işlenip sunulması olmak üzere iki ana görevi vardır.

2.1.3 Trombositler

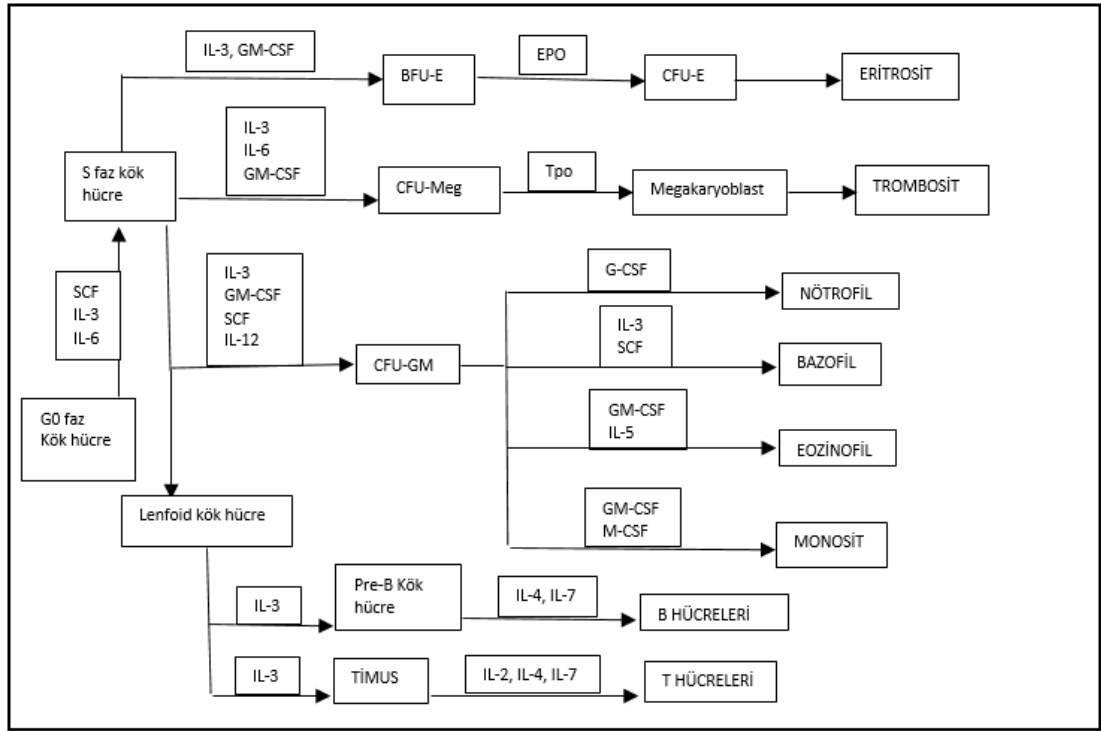
Kemik iliğinde megakaryositlerden sentezlenmekte olup hemostaz sağlanmasında görev yapar. Dolaşımdaki ömrü 10 gündür (3).

2.2 Hematopoez

Kök hücreler, kendi kendini yenileme, çoğalma, farklılaşma özelliği gösteren primitif nitelikteki hücrelerdir. Totipotent, pluripotent ve unipotent olmak üzere üç gruba ayrılır. Totipotent hücreler sınırsız şekilde çoğalabilen ve farklılaşabilen hücreler olup embriyonel kök hücreler iyi bir örnektir. Pluripotent kök hücre birçok dokunun oluşmasında görevlidir. Unipotent hücreler ise tek bir yönde farklılaşmaya programlı olup hematopoetik kök hücre örnek verilebilir(4).

Hematopoetik ve lenfoid hücrelerin üretimi karmaşık olmakla birlikte ihtiyaca yanıt verecek şekilde düzenlenmektedir. Kemik iliğinde bulunan az sayıdaki kök hücreler lenfohematopoetik hücreleri oluşturmak üzere çoğalır, farklılaşır ve kendilerini yenilerler. Pluripotent ilk kök hücreler vitellüs kesesinde ve mezenkimal dokularda ortaya çıkar. Bu hücreler önce karaciğer ve böbreğe, sonra da esas hematopoezin gerçekleştiği yer olan kemik iliğine göç eder.

Lenfohematopezi etkileyen pek çok sitokin tanımlanmıştır. Çeşitli uyarıların altında bu sitokinler uyarılmakta ve kan hücreleri sentezlenmektedir. Beyaz kan hücrelerini uyaran durumlar genelde yabancı veya zararlı bir etkenle karşılaşma iken anemi durumunda oluşan hipoksi eritrosit üretimi, kanama veya anemi durumlarında trombosit üretimi uyarılmaktadır (5).



Şekil 1. Hematopoez (5)

SCF: Stem cell factor, Epo: Eritropoetin, Tpo: Trombopoetin, G-CSF: Gronulosit-Colony Stimulan Factor, GM-CSF: Gronulosit-Monosit Colony Stimulan Factor, M-CSF: Monosit Colony Stimulan Factor

2.3 Anemi

Anemi, dolaşımdaki eritrositlerin sayısının azalmasıdır. Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre anemi; hemoglobinin (Hb), 15 yaşın üstünde erkekte 13 g/dl'nin, 15 yaşın üstünde ve gebe olmayan kadında 12 g/dl' nin, gebelerde ise 11 g/ dl'nin altı olarak tanımlanır. Eritrosit üretimini bozan ya da yıkımını arttıran her türlü durumda ortaya çıkabilir (5).

Anemik kişilerde ortaya çıkan semptomlar aneminin ortaya çıkış süresine, altta yatan sebebe, yaşa ve tipine göre değişmektedir. Kronik anemiler daha geç semptom verirken akut kan kaybında semptomlar daha çabuk ortaya çıkar. Yaşlı hastalar ek komorbid hastalıkların olması ve kardiyovasküler kompensasyonun yetersizliğinden dolayı daha fazla semptomatik olur. Solukluk aneminin en sık bulgusudur.

Anemiler çok çeşitli şekilde sınıflandırılabilir gibi en sık morfolojilerine göre sınıflandırılır. Morfolojik olarak üç gruba ayrılır: Makrositer, normositer ve mikrositer (4). Tablo 1 de bu sınıflandırma yapılmıştır.

Tablo 1: Anemilerin Morfolojik Sınıflandırılması (5)

Makrositer (OEH>100 fl)	Normositer (80<OEH<100 fl)	Mikrositer (OEH<80 fl)
Vitamin B12 eksikliği	Akut kan kaybı	Demir eksikliği anemisi
Folik asit eksikliği	Dimorfik anemiler	Kronik hastalık anemisi
DNA sentezinin herediter bozuklukları	Kronik hastalık anemisi	Sideroblastik anemiler
İlaçlara bağlı DNA sentez bozuklukları	Kronik böbrek hastalığı	Talasemiler
Kanser kemoterapisi	Kemik iliği aplazisi / hipoplazisi	Kurşun zehirlenmesi
Hemolitik anemiler	Miyelofibrozis	
Hipotiroidi	Miyelodisplazi (olguların çoğu)	
Kronik karaciğer hastalığı	Fizyolojik anemi	
Miyelodisplazi (olguların bir kısmı)	Demir eksikliği anemisi (erken dönem)	
OEH: Ortalama Eritrosit Hacmi		

2.4 Kompleman sistemi

Kompleman sistemi, doğal immün sistemin önemli bir bileşenidir. Ekzojen patojen mikroorganizmaları tanımak için evrimleşmesinin yanı sıra incinen kendi dokularını da fark ederek edinsel immün sistemi aktive etmektedir (6).

Kompleman sistemi, doğal immün sistemin çok sayıda koruyucu fonksiyonlarını gerçekleştirir. Membran atak kompleksi ile bakterilerin lizisinde görev alır. Patojenlerin fagositozu için opsonizasyon görevine katılır. Kompleman aktivasyonu ile üretilen peptid anafilotoksinler, inflamatuvar yanıtların da gelişmesini sağlarlar.

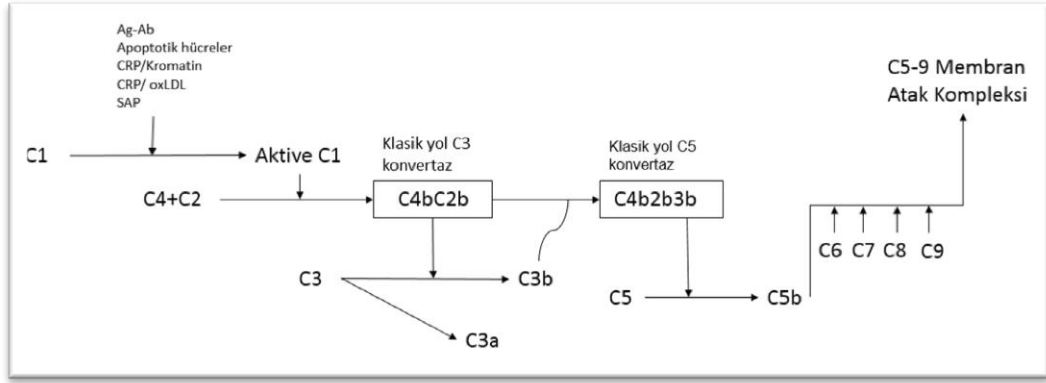
Edinsel immün yanıtın şekillendirilmesinde, kompleman sisteminin etkileri de gösterilmiştir. Kompleman proteinleri ile birlikte yapılan antijenler, B hücreleri ve diğer antijen sunan hücreler ile tutulur ve bu da T hücre aktivasyonu ile sonuçlanır. Çeşitli kompleman proteinlerinin eksikliğinde fareler üzerinde yapılan çalışmalar, B hücrelerinin optimal antikör üretimi açısından gerekli olduğunu göstermiştir. Ayrıca erken kompleman bileşiklerinin olmadığı hastalarda otoimmün hastalıklara yatkınlık olduğu bilinmektedir.

Kompleman sistemi, immün komplekslere maruz kalması halinde hemen aktive olmaktadır ancak kendinden olan ve olmayanı ayırt eden reseptörleri olan T ve B hücreleri gibi immünolojik bir belleğe sahip değildir. Aktive olan kompleman, konak ve patojen yüzeylerinde depolanabilir. Potansiyel olarak tehlikeli olan bu durum, kompleman aktivasyonunun düzenleyicileri olarak bilinen bir dizi protein tarafından kontrol edilir.

Kompleman sisteminin nasıl aktive olduğunun bilinmesi, bazı hastalıkların tedavisi açısından yeni seçeneklerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır (7).

2.4.1 Kompleman Aktivasyonu

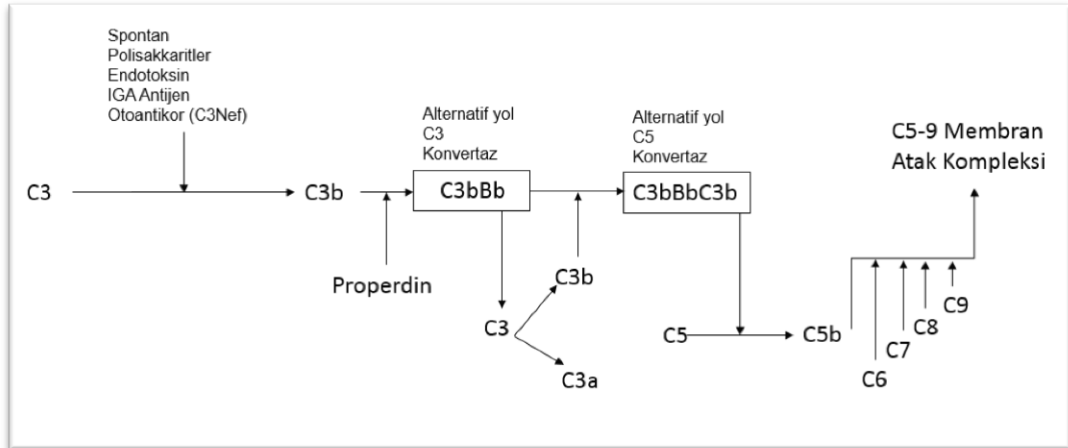
Klasik yol çoğunlukla otoantijen içeren nükleer materyalin opsonizasyon ve çıkarılmasında rol oynar. Klasik yolun düzenlenmesi çeşitli şekillerde olabilir. C1 inhibitör, DAF (Decay Accelerating Factor), MCP (Membran Cofactor Protein), CR1 (Compleman Receptor 1) doğal olarak bulunan inhibitörlerdir.



Şekil 2. Kompleman sisteminin klasik yoldan aktivasyonu (7)

Ag-ab: antijen antikor kompleksi, CRP:C reaktif protein, oxLDL: okside düşük dansiteli lipoprotein, SAP: serum amiloid protein

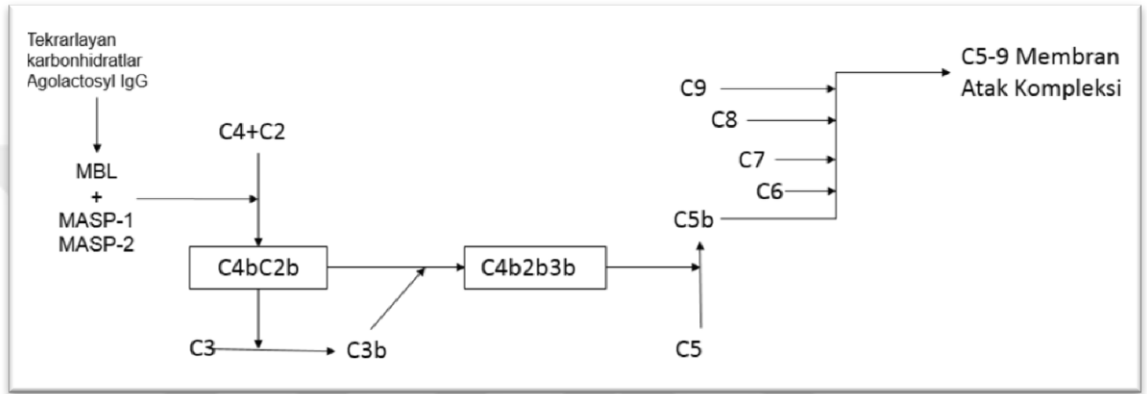
Alternatif yolda, C3 sıvı fazında düşük konsantrasyonlarda spontan olarak aktive olabilir. C3'ün glomerüler filtrasyonu ve sabit durumdaki serum konsantrasyonu göz önüne alındığında tahminen serum C3'ün %1-2'si her saatte serum içinde aktive olduğu düşünülmektedir. Böylece C3; mantar ve bakteri polisakkaritlerine, endotoksinlere ve virüsler ile enfekte hedeflere kovalent bağlanabilir.



Şekil 3. Kompleman sisteminin alternatif yoldan aktivasyonu (7)

C3Nef: C3 Nefritik Faktör

Kollektin ailesinin bir üyesi olan protein-mannoz bağlayan lektin (MBL), C1q'ya benzer bir yapısı vardır. Kollejene benzer alt üniteleri, serin proteazlar ile etkileşim halindedir. Patojenlerin yüzeyinde yer alan, tekrarlayan karbonhidratları (mannoz ve N-asetilglukozamin) bağlayan bir lektin globüler bölge görevi görür. Gram pozitif, gram negatif bakteriler, mantarlar, parazitler ve virüsler MBL tarafından tanınmaktadır.



Şekil 4. Kompleman sisteminin lektin yolu ile aktivasyonu (7)

MBL: Mannoz bağlayan lektin, MASP: MBL ile ilişkili serin proteaz, IgG: Immunglobulin G

Kompleman aktivasyonunun düzenleyicileri (RCA), klasik ya da alternatif C3 konvertazlarıyla C3b üretimini kısıtlayan proteinlerdir. C3b, C3 konvertaza eklenerek C5 konvertazı meydana getirdiğinden bu iki enzim kompleksinin düzenlenmesi birbiri ile bağlantılı olmaktadır. C3/C5 konvertazlarının düzenlenmesinden sorumlu altı RCA proteini bulunmaktadır. Bu proteinler; faktör H, C4 bağlayıcı protein, membran kofaktör proteini (MCP, CD46), bozulmayı hızlandıran faktör (DAF, CD55), kompleman reseptör-1 (CR1, CD35) ve kompleman reseptör-2 (CR-2, CD21)'dir.

C5'in konvertaz aracılığıyla C5a ve C5b olarak ayrılması sonrasında C5b, C6 ve C7 ile birleşir. Bu da C8'i bağlar. C8 bağlandıktan sonra da C9 membrana çekilir ve membran atak kompleksi (MAC) oluşur. MAC oluşumu

reaktif oksijen radikallerinin oluşumu ile prokoagülan bir etkiye sahiptir. Endotel aktivasyonu ile doku faktörü sentezini uyarması prokoagülan etkisini arttırmaktadır. MAC oluşumunun artması; hücresel proliferasyonda, inflamasyonda ve koagülasyonda artış ile sonuçlanır ve bu durum kontrol edilmese tehlikeli bir tabloya ilerleyebilir. CD59, glikoprotein yapıda olup glikozil fosfatidilinozitol kuyruk ile hücre membranına bağlıdır. Bu MAC için bir inhibitör olarak görev yapmaktadır. C5b-C8 kompleksine sıkıca bağlanır ve C9 bağlanmasına engel olur (7).

2.5 Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH)

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri, kök hücreyi etkileyen edinsel somatik bir mutasyon sonucunda ortaya çıkan nadir bir hastalık olup 0.13-1.6/100.000 hastayı etkilemektedir (8). PNH, kompleman sisteminin kontrolsüz aktivasyonu sonucu ortaya çıkan intravasküler hemoliz ve trombosit aktivasyonu temeline dayanan ve sistemik komplikasyonları olan bir durumdur (9).

Büyük ölçekli epidemiyolojik çalışmalar, PNH hastalarının %35'inin teşhis tarihinden itibaren beş yıl içerisinde yaşamlarını yitirdiğini ve on yıllık mortalitelerinin yaklaşık %50'ye ulaştığını göstermiştir. Mortaliteden büyük oranda tromboz sorumludur. Morbidite ve mortalitenin diğer nedenleri renal yetmezlik, pulmoner hipertansiyon, erektil disfonksiyon ve disfaji olarak sıralanabilir.

Değişken klinik bulguları nedeni ile PNH tanısı gecikmekte ve bu da morbidite ve mortalite riskinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle erken tanı morbidite ve mortalitenin azaltılması için önemlidir (10).

2.5.1 Patofizyoloji

Hastalık, X'e bağılı phosphatidylinositol glycan class A (PIG-A) genini inaktive eden bir somatik mutasyon sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu gen spesifik bir N-acetylglucosamine transferaz enziminin alt birimini kodlamaktadır. Bu enzim hücre yüzeyine birçok proteini bağlayan glycosylphosphatidylinositol (GPI) molekülünün kompleks sentez basamaklarının ilk basamağında yer almaktadır. Bunun sonucunda, PNH klonuna ait hücrelerde bu proteinler ciddi miktarda ya da tamamen eksik olmaktadır (11). Bu proteinler kompleman sisteminin regülasyonunda görev almakta olup bunlar CD55 (Decay Accelerating Factor, DAF) ve CD59 (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis, MIRL) 'dur. CD55, C3 konvertaz (C3bBb ve C4b2a) oluşumunu ve stabilizasyonunu inhibe etmektedir. Tarihsel olarak CD55, yokluğu PNH eritrositlerinin artmış kompleman aracılı yıkımından sorumlu olabileceği rapor edilen ilk kompleman regülatörüydü. Yapılan çalışmalar sonucunda PNH hücrelerinde eksik olduğu bulunan bir başka kompleman inhibitörü olan CD59 tanımlandı. CD59, C5b-C8 kompleksine C9'un dahil edilmesini engelleyerek membran atak kompleksi (MAC) oluşumunu önlemektedir (6). CD55 ve CD59 yokluğunda eritrositler savunmasız hale gelmekte ve kompleman aracılı intravasküler hemolize yol açmaktadır (12).

PNH eritrositleri, kompleman aracılı yıkıma PNH lökositleri ve trombositlerine göre daha duyarlıdır. İntravasküler hemoliz sonucunda ortaya çıkan serbest hemoglobin dolaşımdan temizlenmeden önce haptoglobüline bağlanmaktadır. Ancak, haptoglobülin doygunluğa ulaştığında dolaşımdaki serbest hemoglobin nitrik oksite (NO) irreversibl olarak bağlanarak NO azalmasına yol açmaktadır (13). NO azalması, PNH hastalarının semptomlarının büyük çoğunluğundan sorumludur. Düz kas distonisi disfaji ve karın ağrısına yol açmaktadır. Erektile disfonksiyon sık görülmektedir. NO azalması arteryel vazokonstrüksiyon ile renal kan akımında azalma ile böbrek yetmezliğine, arteryel hipertansiyona ve pulmoner hipertansiyona (sık görülmekle birlikte tanı konulmamış pulmoner emboli ile ilişkili olarak) neden olmaktadır.

PNH'da mutant hematopoetik hücrede malign olmayan klonal bir genişleme görülmektedir. Bu evrimi açıklamada farklı mekanizmalar ortaya atılmıştır. Bunları gösterecek çalışmaların eksikliğine rağmen en çok kabul gören açıklama iki adım hipotezidir. İlk basamak PIG-A mutasyonunun ortaya çıkmasıdır. Bu sırada, klonal genişleme olmayıp hasta asemptomatiktir. İkinci adım olarak, bundan sonra, kemik iliğinde T hücre ve Natural Killer (NK) hücre aktivasyonuna yol açan bir hasar gereklidir. PIG-A mutasyonu olmayıp hasarlı olan hematopoetik hücreler bu bağışıklık sistemi hücreleri tarafından yok edilirken, PIG-A mutant hücreler kaçmaktadır. Bunun nedeni büyük olasılıkla GPI çapası ile bağlanan peptidlerin veya T hücre saldırısı için gerekli aksesuar moleküllerin PIG-A mutasyonu nedeni ile yok olmasıdır. Bu PNH hücrelerini T hücre aracılı sitotoksiniteye karşı dirençli hale getirmektedir. Sonuçta kemik iliği yetmezliği ve PIG-A mutant hücrelerin klonal ekspansiyonu olmaktadır (12).

2.5.2 Tanı

PNH tanısı eskiden in vitro olarak asitlik (Ham testi) ya da osmolarite (sükroz testi) ile kompleman aktivasyonu ile konmaktaydı (12). Her iki test de hem spesifik değildi hem de gerçekleştirmesi vakit almaktaydı. Daha spesifik bir test olan kompleman lizis duyarlılık testi, değişen miktarlardaki kompleman konsantrasyonlarında eritrositlerin hemoliz miktarını ölçmektedir. PNH hücreleri, normal hücrelerden daha düşük konsantrasyonlarda yıkıma uğramaktadır. Ancak, bu test zahmetli ve standardizasyonu zor olup az miktardaki anormal hücreleri gözden kaçırma riskine sahiptir (1). Günümüzde akım sitometrisi nedeni ile bu testler eskide kalmıştır. CD55 ve CD59 özgül antikorları tarafından tespit edilir. Bu monoklonal antikorlar GPI-bağımlı proteinlere bağlanmakta ve bunların olmaması küçük miktarlarda bile PNH hücrelerinin tespitinde kullanılabilir. CD55 ve CD59'un nadir konjenital eksiklikleri yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceğinden, klonun miktarını tespit etmek için en az iki farklı GPI-bağımlı proteine yönelik iki farklı monoklonal antikor kullanmak gereklidir. Dahası, testler en az iki farklı kan

hücreleri dizisinde yapılmalıdır. Eğer sadece eritrositler taranırsa yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkabilir. Nitekim, yakın zamanda hemolitik kriz ya da transfüzyon yapılmış ise PNH eritrositlerini tespit etmek zorlaşır.

PNH hastalarının kan hücreleri genetik bir mozaik gösterebilir. Tip I hücreler, GPI-çıpalı proteinleri normal yoğunlukta eksprese ederler. Tip II hücreler, kısmen GPI-çıpalı proteinlerin eksikliğini gösterirler. Tip III hücreler ise GPI-çıpalı proteinlerden tamamen yoksundurlar. Akım sitometrisi, bu farklı popülasyonları doğru bir şekilde ayırt edebilmektedir.

PNH tanısı için akım sitometrisi sırasında yeni bir ajan olan floresan aerolizin (FLAER) kullanımı gittikçe artmaktadır. Aerolizin, *Aeromonas hydrophila* bakterisinin primer virülans faktörü, GPI çıpasına selektif ve yüksek afinite ile bağlanır. PNH'daki GPI çıpa defektini daha doğru bir değerlendirmeye olanak tanır. Ayrıca, %1'in altındaki PNH klonları bile tespit edilebilmektedir (12).

Akım sitometrisine ek olarak PNH tanısında; artmış indirekt bilirubin düzeyi, artmış laktik dehidrogenaz (LDH) düzeyi, hemoglobinüri, hemosiderinüri, haptoglobulin düzeyinde azalma, retikülositoz ve kemik iliğinde eritroid hiperplazi de destekleyici laboratuvar bulgularıdır (13).

2.5.3 Klinik Formlar

PNH'daki klinik polimorfizm tanımlanmıştır. Üç adet klinik form tanımlanmıştır: Klasik PNH, PNH ilişkili aplastik anemi (AA) ve subklinik PNH.

2.5.3.1 Klasik Form

PNH'ın klasik formu çoğunlukla genç popülasyonu etkilemektedir. Komplemanın sürekli aktivasyonu nedeni ile kronik intravasküler hemolitik aneminin etkileri görülmektedir. Ameliyat olmak, enfeksiyonlar, alkol alımı gibi durumlar bu hemolitik durumu arttırabilir. Klinisyenler anemi, hemoglobinüri, sarılık ve genel semptomlar (yorgunluk, halsizlik) ile karşılaşabilir. Enfeksiyon

durumunda hemolizde kötüleşme siktir. Klasik formda, kemik iliği yetmezliği bulguları yoktur. Hastalar disfaji, karın ağrısı veya erektil disfonksiyondan (%35) yakınmaktadırlar. PNH'da trombotik olaylar siktir. Böbrek yetmezliği, PNH'ın korkulan komplikasyonudur. Bu durum; NO azalmasına bağlı arteryal vazokonstrüksiyona, kronik hemosiderozise ve mikrovasküler trombozlara bağlı ortaya çıkmaktadır. Hastaların %40'ında tekrarlayan enfeksiyonlar (üst solunum yolu veya akciğer enfeksiyonları) görölmekte olup PNH hastalarının ikinci ölüm nedenidir. Bu hastalarda miyelodisplastik sendrom (MDS) veya akut miyeloid lösemi (AML) gelişme riski sırasıyla %5 ve %2.5 olup genel popölasyona göre yüz kat daha yüksektir.

2.5.3.2 PNH İlişkili Aplastik Anemi (AA)

Bu hastaların büyük çoğunluğu düşük oranda PNH klonu (<%10) eksprese etmektedir. Klinisyenler, hemolizin klinik ve/veya biyolojik kanıtlarını iki veya üç sitopeniyle (hemoglobün < 10 gr/dl, nötrofil < 1000 /IL, trombositler < 80000 IL) görmektedir. Genellikle, klinik tabloda kemik iliği yetmezliği baskındır.

2.5.3.3 Subklinik PNH

Subklinik PNH, hemoliz olmaksızın <%1 PNH klonu tespit edilmesiyle tanı alır. PNH klonlarının çoğunluğu subkliniklidir. Çalışmalar göstermiştir ki test edilen tüm AA hastalarında %60'a kadar ve düşük riskli MDS hastalarında ise %20'e kadar PNH klonu mevcuttur. Bazı çalışmalar ise daha düşük oranlarda PNH klonu göstermiştir. Bununla birlikte, PNH ilişkili AA'de immünsüpresif tedaviye daha iyi yanıt ve daha iyi prognoz gözlenmiştir. PNH düşük riskli MDS ile ilişkili olduğunda (çoğunlukla refrakter anemi), kan hücrelerinde daha az oranda morfolojik anormallikler, daha ciddi trombositopeni, daha düşük oranda karyotipik anormallikler (örneğin monozomi 7 ve trizomi 8), daha yüksek oranda HLA-DR15, daha düşük oranda AML progresyonu ve siklosporine daha yüksek olasılıkla yanıt gözlenmiştir.

AA ve düşük riskli MDS alt grubunun immünite ilişkili hastalıklar olabileceği hipotezi öne sürülmüştür. Bu immün sürecin aynı zamanda PNH klonunun büyümesini desteklediği düşünülmektedir. Malign veya enfeksiyöz bir sürece yanıt olarak otoimmünitenin hematopoetik kök hücrelere karşı etki ederek bir kemik iliği yetmezliği sendromuna neden olduğu öne sürülmüştür. GPI-çıpalı UL16 proteinlerinin ekspresyonu otoreaktif immüno-kompetan hücrelerin fark edilmesini sağlar. PNH hücreleri bu immün saldırıdan kaçarlar.

PNH klonunun ekspansiyonu hematopoetik dokunun benign istilası olarak değerlendirilebilir. Bu şöyle desteklenebilir: Geçici PNH klonları AA'de sıklıkla görülmektedir ve immünsüpresif tedavi ile normal hematopoetik hücrelerin geri gelmesi ile kademeli olarak ortadan kaybolmaktadırlar.

2.5.3.4 PNH'da Tromboz

PNH hastalarının %40'ında trombotik olaylar görülmektedir ve bu hastalıkta ölümlerin majör nedenidir. PNH hastalarının %40-67'si trombotik komplikasyonlardan ölmektedir. PNH'da majör güçlüğü trombozu anlamak, ön görmek ve tedavi etmek oluşturmaktadır.

%85 vakada trombotik olaylar venöz kökenlidir ancak arteryal tromboz da nadir değildir (%15). Tromboz; derin ven trombozu, pulmoner emboli, miyokard enfarktüsü veya santral sinir sistemi arterleri gibi olağan bölgeleri etkilemekle birlikte tipik olarak hepatik venler (%40,7-44 Budd-Chiari Sendromu), kavernöz sinüs, santral sinir sistemi venleri, mezenterik venler veya dermal venler gibi alışılmadık bölgelerde ortaya çıkar.

PNH hastalarında, trombozun görüldüğü yaş genel popülasyondan daha düşüktür. Diğer PNH hastaları ile kıyaslandığında Afrika-Amerika veya Latin-Amerika kökenli hastalarda tromboz riski daha fazladır. Çin ve Japon kökenli hastalarda daha düşük risk bildirilmiştir. Ancak bu iki çalışma tartışmalıdır.

Antitrombotik tedaviye (warfarin, fraksiyone olmayan heparin, enoxaparin, aspirin, tirofiban) rağmen tromboz tekrarlamaktadır.

Gebelikte ve postpartum dönemde tromboz siktir. oğunluğu tromboza bağlı olmak üzere %20 anne ölümü ve %10 perinatal mortalite bildirilmiştir. Bu nedenle, bazı yazarlar PNH hastalarına gebelik önermemektedir.

Hiperkoagölabilitenin tam patofizyolojisi bilinmemekle birlikte kesinlikle multifaktöryeldir (12). Daha yüksek oranda PNH klonuna sahip hastalar, düşük oranda klona sahip hastalara oranla daha yüksek tromboz riskine sahiptir. Bu da dolaşımdaki PNH kan hücrelerinin sayısı ile tromboz arasında direkt bir ilişki olduğunu göstermektedir (13). Son dönemde yapılan çalışmalar da bu hipotezi desteklemektedir. Hall ve ark. yaptığı bir çalışmada 10 yıllık tromboz riski PNH pozitif granülosit klon düzeyi %50'nin üzerinde olan hastalarda %44 iken %50'nin altında olan hastalarda %5,8 olarak saptanmıştır. Moyo ve ark. yaptığı bir hesaplamada PNH pozitif granülosit klon düzeyinde her %10'luk artış için tromboz görölme olasılığının 1,64 kat arttığını saptadı (14).

İlginç olarak, PNH hastalarında trombotik olaylar akut hemolitik bir periyod sonrasında sık olarak ortaya çıkmaktadır. Bu yetersiz kompleman inhibisyonun ya da hemolizin bu hastalarda görölen trombofilinin altında yatan önemli faktörlerden biri olabileceğini düşündürmektedir. Hastalarda görölen hemolizin tedavisinde kompleman inhibitörlerinin kullanımı ile kompleman aktivasyonun ve intravasküler hemolizin inhibisyonu şiddetle bu hastalardaki trombozu azaltmaktadır (13).

2.5.4 PNH Tedavisi

2.5.4.1 Subklinik PNH ve PNH İlişkili Aplastik Anemi Tedavisi

Subklinik PNH'da, herhangi bir klinik semptom olmadıkça tedavi vermeye gerek yoktur. Yine de bu hastaları yakından izlemek gereklidir (her 6-12 ayda bir) çünkü klon genişlemesi olabilir ve hastalık klasik PNH'a dönüşebilir.

PNH ilişkili aplastik aneminin tedavisinin temelini altta yatan kemik iliği yetmezliğinin tedavisi oluşturmaktadır. Bu amaçla immünsüpresif tedavi ya da allojenik kemik iliği nakli yapılabilir.

2.5.4.2 Klasik PNH Tedavisi

Eculizumab'ın geliştirilmesi ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) ve Avrupa Tıbbi Ajansı tarafından 2007'de onay alması üzerine klasik PNH yönetimi dramatik bir şekilde değişti. Bu hümanize monoklonal antikor, kompleman C5'in terminal aktivasyonunu ve C5a ve C5b-C9 oluşumunu engelleyerek hemolizi önler.

Eculizumab 25-45 dakika içinde intravenöz infüzyon ile uygulanır. 7 günde bir 600 mg olacak şekilde 4 doz indüksiyon verilir. Bundan 7 gün sonra 900 mg verilip 14 günde bir 900 mg olacak şekilde tedaviye devam edilir.

Eculizumab tedavisinin etkinliği bir randomize plasebo-kontrollü faz 3 çalışması ile değerlendirilmiştir. Kemik iliği rezervi iyi olan ve transfüzyon bağımlı olan PNH hastalarında hemolizi ve transfüzyon gereksinimini azalttığı ve anemi, halsizlik gibi semptomları düzelterek yaşam kalitesini arttırdığı gözlenmiştir.

Açık etiketli ikinci bir faz 3 çalışması eculizumab tedavisinin uzun dönem etkinliği ve güvenliğini araştırdı. Doksan yedi hastanın doksan altısında hemolizi tamamen önlediği tespit edilmiş olup hızlı bir yanıt alındı. En sık yan etkiler baş ağrısı, nazofarenjit ve üst solunum yolu enfeksiyonu olarak ortaya çıktı.

Etkin kompleman inhibisyonu araya giren enfeksiyonlar nedeni ile bozulabilir ve bu da hemolizi tetikleyebilir. Bu nedenle gerekli durumlarda antibiyotik kullanımından çekinilmemelidir.

Renal bozukluğu olan hastalarda eculizumab kullanımının iyi tolere edildiği ve renal fonksiyonlarda iyileşme sağladığı görüldü.

Eculizumab'ın tromboembolik olaylar insidansı üzerine etkisi üç klinik çalışma ile araştırıldı. Bu tedavi sırasında tromboembolik olayların oranında %87-94 arasında azalma gözlemlendi.

Eculizumab tedavisi alan hastaların neisserial sepsis açısından artmış risk altında olduğu akılda tutulmalıdır. Aşılamaya rağmen yıllık riski %0,5'tir.

Bazı hastalarda eculizumab tedavisine suboptimal yanıt gözlenmiştir. Bununla ilgili farklı açıklamalar mevcuttur.

Eculizumab tedavisi alan hastaların büyük çoğunluğunda kalıcı olarak retikülositoz, bilirubin ve laktik dehidrogenaz (LDH) enzim düzeyinde yükselme ve haptoglobülin seviyesinde azalma önlenir. Küçük grup hastada ise tedaviye rağmen anemide veya konstitusyonel semptomlarda az düzelme ya da hiç düzelme olmadığı görüldü. Bu durum eculizumab tedavisi sırasında artmış ekstravasküler hemolize bağlı olabilir. Eculizumab tarafından intravasküler hemoliz önlediği için kompleman sisteminin erken komponentleri (C3 opsoninler) ile yüklü PNH eritrositlerinin sayısı artar. DAF tarafından düzenlenmediği için C3 konvertaz eculizumab ile bloke olmaz. Bu opsonize olan kırmızı kan hücreleri retiküloendotelyal sistemin hücreleri tarafından fark edilir. Çoğunluğu dalakta, az miktarda karaciğerde olmak üzere ekstravasküler hemoliz ile sonuçlanır.

Tedavi alırken ekstravasküler hemoliz gelişmesi durumunda eğer hastanın konstitusyonel veya anemi semptomu ya da transfüzyon ihtiyacı yoksa herhangi bir tedavi gerekmez. Eğer ekstravasküler hemoliz semptomları var ise konsensüs olmasa da bazı yazarlar kortikosteroidler veya splenektomi önermektedir.

Ecilizumab, yaşam boyu alınan bir tedavidir. Günümüzde PNH tedavisinin tek küratif yöntemi allojenik kemik iliği naklidir. Allojenik kemik iliği nakli yalnızca hayatı tehdit edici sitopenileri olan veya ecilizumab tedavisi ile hemoliz veya tromboz kontrol altına alınamayan hastalarda önerilmektedir (12).

2.5.4.3 Tromboz Tedavisi

PNH tanılı bir hastada tromboz yüksek morbidite ve mortalite nedeni ile acil tedavi gerektirir. Randomize kontrollü çalışmalar olmamasına rağmen geniş PNH merkezlerinden elde edilen tecrübeler mevcuttur. Akut tromboz tedavisi; majör kontraendikasyonlar yok ise heparin (düşük molekül ağırlıklı heparin tedavisi verildiyse anti-Xa düzeyi hedefi 0,5-1 arası) ile hemen antikoagülan tedavinin başlanmasını ve ecilizumab monoklonal antikor tedavisinin başlanması içerir. Antikoagülasyonun uzun dönem devamı için herhangi bir kontraendikasyon yoksa K vitamini antagonistleri önerilir. PNH'ın sık komplikasyonlarından biri de mevcut trombozun genişlemesi ya da tekrarlayan trombozlardır. Yeni antikoagülanların PNH'da kullanımı ile ilgili yayınlanmış deneyimler mevcut değildir.

Heparin tedavisi başlanması ile birlikte hemolizin aktive olduğu rapor edilmiştir, çünkü düşük dozlarda heparin kompleman sistemini alternatif yoldan aktive etmektedir. Ancak, yüksek dozlarda inhibitör görev yapmaktadır. Buna rağmen, PNH eritrositleri ve trombositlerinin prokoagülan özelliği devam etmektedir. Akut tromboz tedavisinde ecilizumab kullanımı artmış durumdadır ve bu konuda deneyimler olumlu yöndedir. Trombozun yayılımı veya tekrarlama ecilizumab tedavisi ile engellenmiş gibi görülmektedir. PNH'lı bir hastada trombotik olayların görülmesi ecilizumab tedavisi başlanması için primer nedenlerden biri olup gecikmeden başlanmalıdır (9).

2.5.4.4 Tromboz Profilaksisi

Randomize çalışmalar yok ama bazı veriler warfarin kullanımının efektif bir şekilde trombozu önlediğini önermektedir. Ancak, warfarin PNH hastalarında ölümcül kanamalara neden olabilmektedir.

PNH hastalarında antikoagölan tedavinin kullanımının güçlükleri dikkate mutlaka alınmalıdır. Bu hastalarda sıklıkla medüller hipoplaziye ya da karaciğer yetmezliğine bağlı trombositopeni gelişmektedir. Bu da antikoagölan tedavi sırasında kanama riskini arttırmaktadır. Ayrıca, bu hastalarda terapötik INR aralığı sağlanmak ösofagial spazm veya mezenterik yetmezlik nedeni ile gelişen beslenme bozukluğu nedeniyle zordur.

Hall ve ark. yaptığı retrospektif bir çalışmaya dayanarak PNH granülosit klonu %50< olan ve kontraendikasyonu olmayan hastalarda K vitamini antagonisti profilaksisini dikkate almayı önermektedir. Diğer yazarlar ise PNH'da primer antikoagölan profilaksisinin gebelik dışında kanıtlanmış bir yararı olmadığını belirtmektedir. Trombotik risk faktörlerine göre profilaktik antikoagölan tedaviden fayda görecek PNH subgruplarının belirlenmesi önem taşımaktadır.

Herhangi bir antikoagölan tedaviden bağımsız olarak, eculizumab trombozdan korunmada en iyi tedavi olarak görünmekte olup bunu kanıtlayacak prospektif çalışmalara halen ihtiyaç vardır. Daha önce tromboz öyküsü olan ve halen eculizumab tedavisi almakta olan hastalarda antikoagölasyon için herhangi bir kontraendikasyon yoksa veya antikoagölasyonun kesilmesinin güvenli olduğuna dair daha fazla kanıt sağlanmadığı sürece tedaviye devam edilmesi önerilir (12).

2.5.5 PNH Testi İçin Klinik Endikasyonlar

PNH hastaları, çoğu ortak olan, çok geniş yelpazede belirtiler ve semptomlar ile karşımıza çıkabilir ancak nadir olan bu hastalık için her anemi ve tromboz durumunda taranması uygun değildir. Bununla birlikte, bazı klinik durumlar PNH bulunma olasılığını arttırır ve bunları araştırmaya değer.

PNH hastalarının çok az bir kısmı hemoglobinüri ile prezente olmakla birlikte açıklanamayan hemoglobinürisi olan her hasta araştırılmalıdır. Hemoliz bulguları olan hastaları test etme ihtiyacı biraz tartışmalıdır. Coombs pozitif hemolitik anemi diğer endikasyonların yokluğunda tarama gerektirmez. Ancak Coombs negatif hemolitik anemiler özellikle karakteristik hücresel anormallikler (sferositler, sickle cell vb.) ve enfeksiyöz bir neden yoksa PNH açısından taranmalıdır. Bu durum demir eksikliği anemisi için de geçerlidir, çünkü kronik intravasküler hemoliz üriner demir eksikliği ile sonuçlanmaktadır.

Tromboz PNH hastalarının %40 'ında görülmekle birlikte hastalar nadiren bu şekilde başvurur. Ancak bu hastalarda Budd-Chiari Sendromu, serebral venler vb. alışılmadık yerlerde tromboz görüldüğünden bu alışılmadık prezentasyon PNH taranmasını hak eder. Tromboz ve sitopeni veya intravasküler hemolizin birlikte olduğu hastalar da PNH taranmasını gerektirir. Hastaların ortalama %10'unu karın ağrısı veya disfaji ile prezente olmakta ancak bunlar non-spesifik semptomlar olması nedeniyle eşlik eden intravasküler hemolizin kanıtları varsa ya da bu semptomlar başka herhangi bir nedenle açıklanamıyorsa PNH taranmalı, yoksa rutin taranması önerilmemektedir.

Sitopenisi olan hastaların PNH taranması açısından tartışmalar vardır. Genç, sitopenisi olan hipoplastik veya aplastik anemili hastalar mutlaka ayırıcı tanı açısından PNH klonu taranmalıdır. Ancak anemisi olan hastadan nadiren taramaya ihtiyaç duyar. Anemi ancak geniş bir araştırma sonucundan açıklanamadıysa PNH klonu açısından taranmalıdır (Tablo 2).

PNH tanısı alan hastalar, klon boyutu açısından belirli aralıklarla izlenmelidir. Eğer hastalık stabil seyrediyorsa yıllık kontrol yeterli olabilir. Ancak klinik ve hematolojik parametrelerdeki herhangi bir değişiklik daha sık izlem gerektirir; çünkü klinik tabloda kötüleşme veya hastalıkta ilerleme ile klon boyutunda değişiklik klinik tablodaki değişikliği yansıtmaktadır. Eculizumab alan hastalarda da düzenli klon takibi yararlı olup bunun sıklığı konusunda görüş birliğine varılmamıştır. Tedavinin erken dönemlerinde klon

takip sıklığı eritrosit klon stabilizasyonu sağlanana kadar sık yapılması faydalıdır. Bu durum sağlandıktan sonra takip sıklığı klinik duruma bağlı olarak ayarlanmalıdır(1).

Tablo 2: PNH Testi İçin Klinik Endikasyonlar (1)

Hemoglobinüri veya yüksek plazma hemoglobini ile kanıtlanmış intravasküler hemoliz

Açıklanamayan hemolize aşağıdaki bulguların eşlik etmesi halinde

- Demir eksikliği veya
- Karın ağrısı veya ösofagial spazm veya
- Tromboz veya
- Nötropeni ve/veya trombositopeni

Diğer kazanılmış Coombs negatif şistositik ve enfeksiyöz olmayan hemolitik anemi

Alışılmadık karakterde trombozlar

- Alışılmadık bölgeler: Hepatik ven (Budd-Chiari Sendromu), diğer intraabdominal venler (portal, splenik, splanknik), serebral sinüsler, dermal venler
- Eşlik eden hemolitik anemi bulguları olması
- Eşlik eden sitopeni

Kemik iliği yetmezliği kanıtları

- Şüphelenilen veya kanıtlanmış hipoplastik veya aplastik anemi
- Tek seride displazi ile seyreden refrakter sitopeni
- Yeterli tetkike rağmen açıklanamayan sitopeni

Küçük klon tespit edilen aplastik anemili hastaların seri şekilde klon takibi yapılması önemlidir, çünkü aplastik anemi tablosu hemolitik PNH'a dönebilir ve bu klon progresyonu ile önceden tahmin edilebilir (1).

2.5.6 PNH İçin Flow Sitometri Analizi

PNH testi için periferal kandan alınan örnek tercih edilmektedir. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) en sık kullanılan antikoagulandır. Test için 1-3 ml kan yeterlidir. PNH hücrelerinin saptanmasında numune taşınması önemli bir sorun değildir; nk bunlar laboratuvara nakliye için gerekli normal sreler boyunca stabildir. rnek alınmasının üzerinden 24 saat geçtiyse alınan örnek +4 derecede saklanmalıdır.

Kırmızı kan hücre (RBC) analizi, yedi güne kadar buzdolabında saklanan numunelerde gerçekleştirilebilir ancak tercihen RBC testinin derhal tercihen örnek alındıktan sonra 48 saat içinde gerçekleştirilmesi önerilir nk zamanla PNH hücrelerinde kayıp olup olmadığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Ancak lökosit analizinde zamanla granülositlerin dağılımında ve antijen ekspresyonunda ortaya çıkabilecek değişiklikler nedeni ile sonuçların yorumlanması zorlaşabilir. Bu nedenle örnek alımından sonra 24-48 saat içinde çalışılması önerilmektedir.

Rutin bir PNH tetkikinde yalnız RBC analizi yapılması PNH tanısı için yeterli olmayabilir nk hemoliz ya da kan transfüzyonu klon boyutunu değiştirebilir. Bu nedenle doğru PNH klon boyutunun anlaşılabilmesi için lökositlerde de analiz yapılmalıdır. Lenfositler uzun yaşam ömrü ve birçok GPI-bağlı proteinin değişik ekspresyonu nedeni ile analiz için uygun değildir. Ancak hem nötrofiller hem de monositler uygun hedeflerdir. Her iki popülasyonda anormallik tespit edilmesi teşhise olan güveni arttırır (1).

III.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza hastanemize 15 Mayıs 2015 ile 31 Ocak 2018 tarihleri arasında başvuran, PNH düşündürülen hastalardan aşağıda bulunan tablo 3'deki bulgular saptanan hastalar dahil edildi.

Tablo 3: Dâhil edilme kriterleri

LDH yüksekliği, retikülositoz, indirekt hiperbilirubinemi ve Coombs negatifliği bulgularından herhangi birinin ya da daha fazlasına ek olarak aşağıdakilerde herhangi biri varlığında
Hemoglobinüri ile gelen intravasküler hemoliz tablosu Böbrek fonksiyon bozukluğu Hepatik ve/veya portal ve/veya mezenterik ven trombozu LDH yüksekliği veya sitopeni olan diğer venöz trombozlar Budd-Chiari Sendromu
Kemik iliği yetmezliğine ek aşağıdakilerden herhangi biri varlığında
Aplastik anemi MDS (hipoplastik veya dirençli sitopeni ya da blast artışı olmayan) Nedeni açıklanamayan sitopeni veya LDH yüksekliği
Splenektomi tedavisi sonrası nüks saptanan immün trombositopeni

LDH: Laktik Dehidrogenaz, MDS: Miyelodisplastik Sendrom

Dâhil edilme kriterlerini taşıdığı saptanan hastalardan iki adet EDTA'lı tüpe, her bir tüp için 2 ml kan alındı. Alınan örnekler 48 saat içinde çalışıldı. PNH klon araştırması FacsCanto II Flow Sitometri cihazında gerçekleştirildi.

Değerlendirme GPI, CD45, CD15 ve CD64 kapılama antikorlarının bağlanma bölgesine bağlanan CD59, CD24 ve CD16 ile FLAER antikorları kullanılarak yapıldı. Eritrositlerde tip II ve tip III PNH hücresi tespiti için CD59 kullanıldı. Doğrulama amacı ile granüositlerde CD24, monositlerde CD14 kullanıldı.

Çalışmaya alınan hastalarımızın hemogram, LDH ve indirekt bilirubin değerleri kaydedildi.



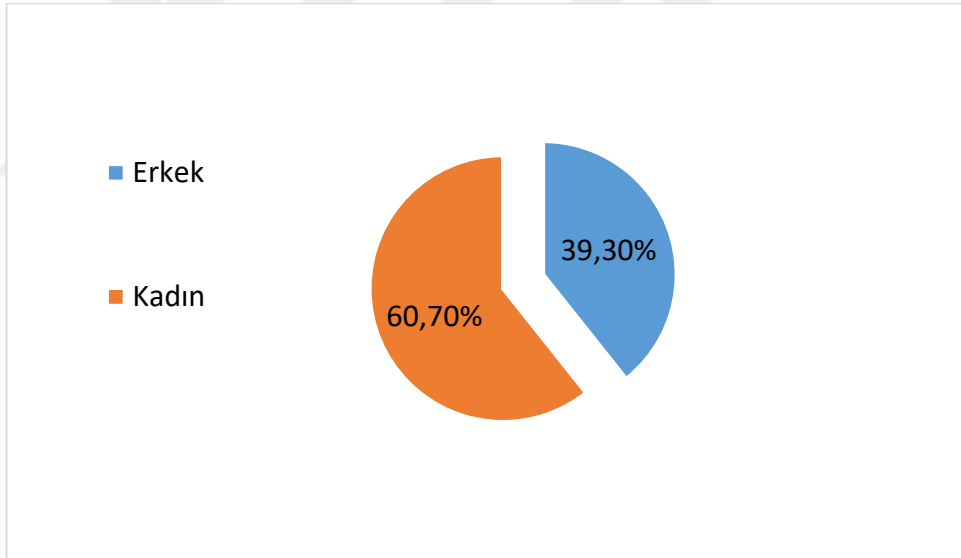
IV.BULGULAR

4.1 İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada veriler SPSS 15,0 bilgisayar istatistik paket programı aracılığıyla tanımlayıcı istatistikler (ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum değerler) gruplar arası karşılaştırmalar Mann Whitney U testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

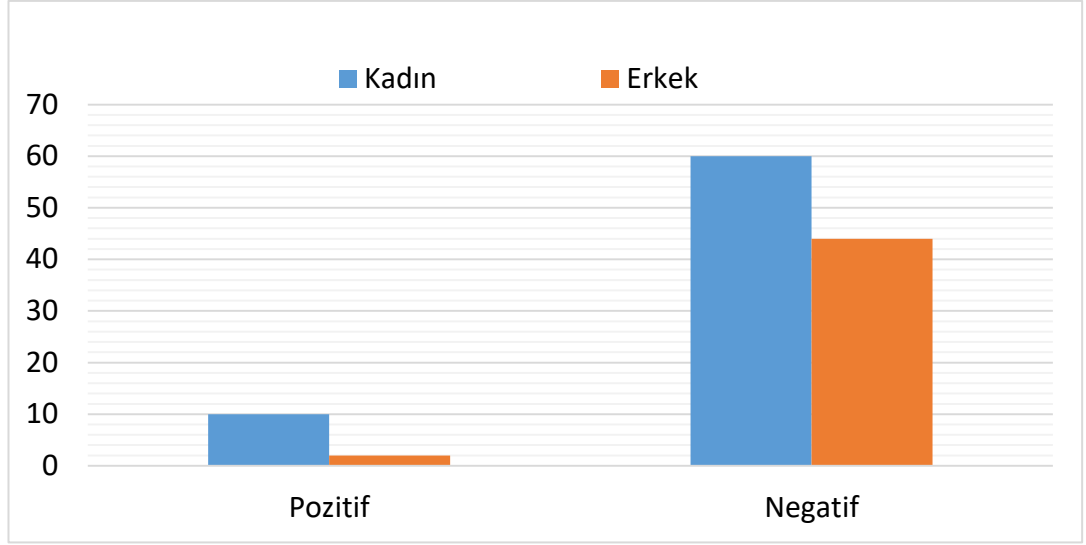
4.2 Demografik Veriler

Çalışmaya alınan 116 hastanın 70'i kadın (%60,3), 46'sı erkek (%39,7) idi (Grafik 1).



Grafik 1. Çalışmaya alınan hastaların kadın-erkek oranları

Çalışmaya alınan 116 hastanın 12'sinde (%10,3) PNH klonu pozitif olarak saptandı. Bu hastaların 2'si (%1,7) erkek, 10'nu (%8,6) kadın olarak saptandı (Grafik 2). PNH klon pozitifliği yüzde olarak kadınlarda daha yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).



Grafik 2. Cinsiyete göre PNH Klon Saptanması

Çalışmaya alınan hastaların ortalama yaşı $54,3 \pm 17,8$ /yıl (19-88), ortalama lökosit sayıları 6462 ± 4136 / μ L (960-27000), ortalama hemoglobin değeri $9,5 \pm 2,3$ gr/dl (3,8-15,6), ortalama trombosit düzeyi 203646 ± 153283 / μ L (5000-857000), ortalama LDH düzeyi 412 ± 660 U/L (89-5167) ve ortalama indirekt bilirubin düzeyi $0,83 \pm 0,9$ mg/dl (0,1-5,8) olarak saptandı.

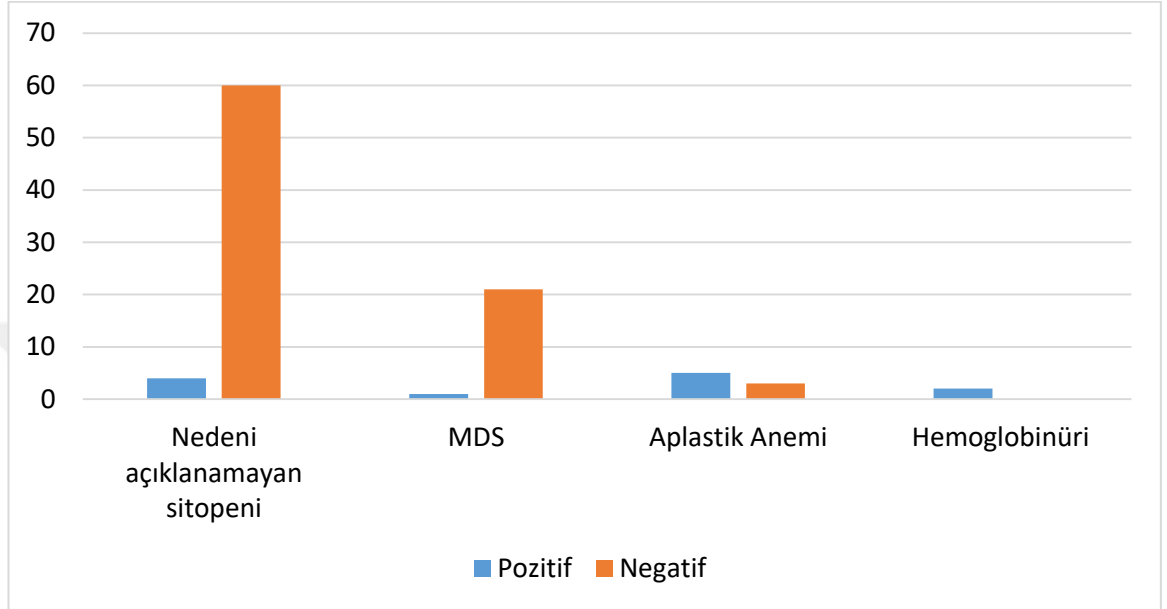
PNH klon pozitifliği saptanan hastaların yaş ortalaması $48,3 \pm 15,6$ /yıl, ortalama lökosit değeri 4499 ± 2245 / μ L, ortalama hemoglobin değeri $9,9 \pm 2,4$ gr/dl, ortalama trombosit değeri 86583 ± 70103 / μ L, ortalama LDH düzeyi 427 ± 350 U/L ve ortalama indirekt bilirubin değeri $0,8 \pm 0,9$ mg/dl olarak saptandı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışmaya katılan hastaların PNH klon pozitif ve negatif oluşuna göre ortalama hemogram ve biyokimyasal değerleri

	PNH	Sayı	Ortalama	Standart Deviasyon
Yaş (yıl)	Pozitif	12	48,3	15,6
	Negatif	104	55	18
Lökosit (/µL)	Pozitif	12	4499	2245
	Negatif	104	6688	4250
Hemoglobin (gr/dl)	Pozitif	12	9,9	2,4
	Negatif	104	9,5	2,3
Trombosit (/µL)	Pozitif	12	86583	70103
	Negatif	104	217153	154685
Laktik Dehidrogenaz (LDH) (U/L)	Pozitif	12	427	350
	Negatif	104	410	688
İndirekt Bilirubin (mg/dl)	Pozitif	12	0,8	0,96
	Negatif	104	0,83	0,94

PNH klonu çalışılma nedenlerine göre kemik iliği yetmezliğine ek açıklanamayan sitopeni veya laktik dehidrogenaz enzim yüksekliği olan 64 hastanın 4'ünde (%6,3), hipoplastik veya dirençli sitopeni ya da blast artışı olmayan 22 miyelodisplastik sendrom tanılı hastanın 1'inde (%4,5), aplastik anemili 8 hastanın 5'inde (%62,5) ve laktik dehidrogenaz enzim yüksekliği, retikülositoz, indirekt hiperbilirubinemi ve Coombs negatifliği bulgularının bir veya daha fazlasının bulunduğu hemoglobinüri ile gelen intravasküler hemolizli iki hastanın tamamında (%100) PNH klonu pozitif saptandı (Grafik 3). Laktik dehidrogenaz enzim yüksekliği, retikülositoz, indirekt hiperbilirubinemi ve Coombs negatifliği bulgularının bir veya daha fazlasının bulunduğu böbrek fonksiyon bozukluğu olan iki, portal ven trombozlu on dört,

splenik ven trombozlu iki, sitopeni olan diğer venöz trombozlu bir ve splenektomi sonrası nüks immün trombositopeni tanılı bir hastada PNH klonu saptanmadı.



Grafik 3. PNH klonu araştırılma nedenlerine göre pozitiflik oranları

Çalışmaya dâhil edilen 116 hastada tüm nedenler göz önüne alındığında PNH klonu pozitifliği saptanması sıklığı oransal olarak sırasıyla %4,3 aplastik anemi, %3,4 kemik iliği yetmezliğine ek açıklanamayan sitopeni veya laktik dehidrogenaz enzim yüksekliği, %1,7 laktik dehidrogenaz enzim yüksekliği, retikülositoz, indirekt hiperbilirubinemi ve Coombs negatifliği bulgularının bir veya daha fazlasının bulunduğu hemoglobinüri ile gelen intravasküler hemoliz ve %0,8 miyelodisplastik sendrom (MDS) saptandı.

PNH klonu araştırılan hastaların lökosit sayısına göre lökopenik olan 46 hastanın 7'sinde (%15,2), lökosit sayısı normal olan 60 hastanın 5'inde (%8,3) klon pozitifliği saptanmış olup lökositozu olan hastaların hiç birinde klon pozitifliği saptanmamıştır. Lökosit sayısına göre lökopenik olan grupta

oransal olarak daha yüksek pozitiflik saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,5$) (Tablo 5).

Tablo 5. Lökosit düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları

	PNH		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Lökopeni (μL)	7 (%15,2)	39 (%84,8)	46 (%100)
Normal (μL)	5 (%8,3)	55 (%91,7)	60 (%100)
Lökositoz (μL)	0 (%0)	10 (%100)	10 (%100)
Toplam	12 (%10,3)	104 (%89,7)	116 (%100)

Çalışmaya alınan hastaların hemoglobin değerine göre anemik olan 93 hastanın 8'inde (%8,6), hemoglobin değeri normal olan 22 hastanın 4'ünde (%18,2) PNH klonu pozitif saptanmış olup hemoglobin değeri yüksek olan 1 hastada klon pozitifliği saptanmamıştır. Hemoglobin değerine göre anemik olan grupta oransal olarak daha yüksek pozitiflik saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,5$) (Tablo 6).

Tablo 6. Hemoglobin düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları

	PNH		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Anemi (gr/dl)	8 (%8,6)	85 (%91,4)	92 (%100)
Normal (gr/dl)	4 (%18,2)	18 (%81,8)	22 (%100)
Yüksek (gr/dl)	0 (%0)	1 (%100)	1 (%100)
Toplam	12 (%10,3)	104 (%89,7)	116 (%100)

Çalışmaya alınan hastaların trombosit değerine göre trombositopenik olan 56 hastanın 11'inde (%19,6), trombosit değeri normal olan 45 hastanın 1'inde (%2,2) PNH klonu pozitif saptanmış olup trombositozu olan hastaların hiç birinde klon pozitifliği saptanmamıştır. Trombosit değerine göre trombositopenik olan grupta oransal olarak daha yüksek pozitiflik saptanmış olup istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Trombosit düzeylerine göre PNH pozitiflik oranları

	PNH		Toplam
	Pozitif	Negatif	
Trombositopeni (μL)	11 (%19,6)	45 (%80,4)	56 (%100)
Normal (μL)	1 (%2,2)	44 (%97,8)	45 (%100)
Trombositoz (μL)	0 (%0)	15 (%100)	15 (%100)
Toplam	12 (%10,3)	104 (%89,7)	116 (%100)

PNH klon pozitifliği saptanan 112 hastanın hemogram, LDH ve indirekt bilirubin değerleri ile ilk saptanan klon yüzdelerini tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. PNH klon pozitifliği saptanan hastaların yaş-cinsiyet-hemogram ve biyokimyasal parametreleri ile ilk pozitif saptanan klon yüzdeleri

No	Yaş	C	WBC	Hb	Plt	LDH	İ.Bil	PNH Klon Yüzde (%)		
								E	G	M
1	37	K	4760	6,1	260000	201	0,5	77,4	98,68	94,65
2	65	K	3200	6,5	16000	407	0,3	0,27	2,42	6,73
3	76	K	4700	9,8	48000	231	0,5	0,4	0,13	1,55
4	62	K	3400	8,4	85000	845	0,7	17,46	93,75	96,9
5	28	E	10900	7,3	140000	1347	0,54	11,7	83,35	84,44
6	34	K	2800	10,6	20000	256	3,8	0,34	0,91	1,32
7	64	E	5830	12,1	38000	416	0,5	1,3	0,32	0,36
8	48	K	5000	11,2	104000	217	0,5	1,46	3,1	3,2
9	55	K	3200	11,7	155000	202	0,4	0	0,34	0,87
10	31	K	4000	9,6	43000	190	0,4	0,14	0,23	0,47
11	50	K	3700	13,3	60000	237	0,36	0,2	0,53	1,93
12	34	K	2500	12,5	70000	581	1,1	11,54	13,44	74,43

C: Cinsiyet, WBC: Lökosit, Hb: Hemoglobün, Plt: Trombosit, LDH: Laktik dehidrogenaz, İ.Bil: İndirekt bilirubin, E: Eritrosit, G: Granülosit, M: Monosit

Tablo 8'deki hastalardan 1 numaralı hasta anemi ve hemoglobünürü ile başvurmuş. Gönderilen PNH klonu pozitif saptandı. Anemi semptomları ve transfüzyon bağımlılığı nedeniyle Eculizumab tedavisi başlandı. 2 numaralı hastada pansitopeni ve LDH yüksekliği nedeniyle yapılan kemik iliği biyopsi sonucu aplastik anemi ile uyumlu saptanmış. Bu hastaya metilprednizolon ve siklosporin tedavisi verilmiş, transfüzyon desteği sağlanmış. Bakılan ilk PNH klonu pozitif olan hasta klon takibine alındı. Hastanın izlemde immünesupresif tedaviye yanıtızsızlık, transfüzyon bağımlılığı olması ve klon progresyonu

(eritrositlerde %0,2, granüositlerde %11,2 ve monositlerde %8,17) saptanması üzerine hastaya Eculuzimab tedavisi başlandı. 4 numaralı hasta pansitopeni ve LDH yüksekliği nedeniyle başvurmuş. Yapılan kemik iliği biopsisi MDS ile uyumlu saptanmış. Hasta trombositopenisi nedeni ile metilpredinizolon ve intavenöz immünglobülin (IVIG) tedavisi ile anemi nedeniyle transfüzyon desteği almış. Hastadan PNH klonu gönderildi. Hastanın gönderilen PNH klonu pozitif saptanması, transfüzyon ihtiyacının devam etmesi, hemoglobinüri ve retikülositozunun olması nedeniyle hastaya Eculizumab tedavisi başlandı. 5 numaralı hasta halsizlik, karın ağrısı, idrar renginde koyulaşma nedeniyle başvurmuş. Yapılan tetkiklerinde bisitopeni, LDH yüksekliği ve hemoglobinüri saptanması üzerine PNH klonu gönderildi. Bisitopeni ve LDH yüksekliği nedeniyle kemik iliği biyopsisi yapılmış. Kemik iliği biyopsisinde eritroid hiperplazi saptanmış. PNH klonu pozitif saptanan hasta PNH tanısı olarak Eculizumab tedavisi başlandı. 8 numaralı hasta koroner arter hastalığı nedeniyle kardiyoloji tarafından takipliyken trombositopeni saptanması nedeniyle yönlendirilmiş. Hastanın PNH klonu pozitif saptandı. Klon takibinde yavaş progresyon var ancak henüz tedavi endikasyonu mevcut olmadığından klon takibine devam ediliyor. 12 numaralı hasta halsizlik ve solukluk nedeni ile başvurmuş. Tetkiklerinde pansitopeni, LDH yüksekliği ve kemik iliği aspirasyonunda eritroid hiperplazi saptanmış. Eritrosit transfüzyonu yapılmış. Transfüzyon ihtiyacı devam eden hastadan bakılan PNH klonu pozitif saptandı. Tedavi önerilen hasta tedaviyi kabul etmedi ve klinik takibinden ayrıldı. 3, 9, 10, 11 numaralı hastalardan aplastik anemi; 6 ve 7 numaralı hastalardan nedeni açıklanamayan sitopeni nedeniyle PNH gönderildi. Klon pozitifliği saptanması nedeniyle hastalar klon takibine alındı. Bu hastalarda henüz klon progresyonu gözlenmedi. Hiçbir hastamızda trombotik komplikasyonlar yaşanmadı.

V. TARTIŞMA

PNH; kronik, progresif, hayatı tehdit edici, multi-sistemik bir hastalık olup hematopoetik kök hücrede somatik bir mutasyonun sonucunda ortaya çıkan klonal, kompleman ilişkili hemolizle karakterize bir tablodur. Nadir bir hastalık olması nedeniyle prevalansını ve insidansını içeren veriler azdır. Bizim de amacımız toplumda riskli hasta gruplarının belirlenmesi ve bu grupların belirlenerek, özellikle bu gruplarda PNH hastalığının araştırılmasını sağlamaktır. Bu amaçla en sık görülen gruplar belirleyerek taramamız planlandı ve yapıldı. Bu amaçla PNH taramasını bugün tarama yöntemi olarak kullanılan FLAER yöntemi ile yapıldı. Hastanemizde ve çevre ilçelerde bu kriterleri taşıdığı saptanan hastaların kanlarından çalışma yapıldı. Hastalardan hemoliz ve tromboz bulguları için ilgili testleri de birlikte yapıldı.

Bu konuda, hastaların kriterlerinin belirlenerek yapıldığı tarama ülkemizde yoktur. İngiltere’de yapılan geniş ölçekli bir çalışmada prevalansı 15,9/1.000.000 ve insidansı 1,3/1.000.000 olarak yayınlandı. Türkiye’de PNH prevalans ve insidansına yönelik epidemiyolojik veri henüz mevcut değildir (10). İnsidansı henüz bilinmemekle birlikte 0,1-0,2/100.000 olduğu tahmin edilmektedir(12). Bizim çalışmamıza alınan hastaların %10,3’ünde PNH klonu saptanmıştır. Morado ve ark. çalışmasında %14,3 oranında (15), Mercier ve ark. çalışmasında ise %9 oranında (8) saptanmıştır. PNH oranları çalışmalar arasında birbirine yakın sonuçlar vermekle birlikte Morado ve ark. daha yüksek oranda saptaması; yapılan çalışmanın İspanya ve Brezilya laboratuvarlarında PNH saptanan hastaları içeren çok merkezli, 3938 hastayı içeren daha geniş ölçekli bir çalışma olmasına bağlı olabilir (15).

Morado ve ark. klasik PNH bulguları olup daha önce herhangi bir hematolojik hastalık tanısı almayan ya da kemik iliği yetmezliğinin eşlik ettiği hematolojik hastalık tanısı almış olan kişilerde yaptığı bir çalışmada PNH klonu, 15-59 yaş grubunda daha yüksek oranda saptanmış olup 15-39 yaş grubunda %19,4 ve 40-59 yaş grubunda %12,5 oranında saptandı (15). Dicle Üniversitesi’nden Dal ve ark. Yayınladığı bir çalışmada PNH tanısı alan

hastaların yaş aralığı 17-46 arasında değişmekteydi (16). Bizim çalışmamızda PNH klon pozitifliği saptanan hastaların yaş ortalaması 48,3 olarak saptandı.

Bessler ve ark. PNH tanısı alanların çoğunlukla genç erişkinler olduğunu ancak çocuklar ve yaşlılarda da görülebildiğini, her iki cinsi de eşit derecede etkilediğini rapor etti (13). Bizim çalışmamızda PNH klonu saptanan hastaların %1,7'si erkek, %8,6'sı kadın olup istatistiksel olarak anlamlı değildi.

2018 yılında yayımlanan ICCS/ESCCA (Uluslararası Klinik Sitometri Grubu/Avrupa Klinik Hücre Analizi Grubu) Konsensus Kılavuzu'nda, PNH düşünülen hastaların başlangıç testleri tam kan sayımı, LDH, retikülosit sayımı ve Coombs testleri olarak belirtilmiştir. Anemi nedeniyle PNH testi yapmadan önce aneminin sık görülen nedenleri dışlanmalıdır. LDH yüksekliği veya retikülositoz gibi hemolizin laboratuvar bulguları olan hastalardan sık görülen nedenler dışlandıktan sonra PNH testi gönderilmelidir. Ek olarak, açıklanamayan trombozu olan genç hastalardan veya alışılmadık bölgelerde (intraabdominal venler, serebral venler, dermal venler vb.) tromboz gelişen hastalardan, özellikle de eş zamanlı hemoliz bulguları varsa PNH testi yapılması düşünülmelidir. Kalıtsal veya kazanılmış aplastik anemi ve MDS gibi bazı PNH dışı durumda da PNH testi yapılmalıdır. Aplastik anemi ve MDS'de açıklanamayan sitopeni durumunda ayırıcı tanı açısından PNH test edilmelidir (17).

Biz de kliniğimizde araştırdığımız hastalarımızdan kemik iliği yetmezliği bulgularının eşlik ettiği nedeni açıklanamayan sitopeni ve/veya LDH yüksekliği olanların %6,3'ünde (4/64), hipoplastik veya dirençli sitopeni ya da blast artışı olmayan MDS olanların %4,5'inde (1/22), aplastik anemi olanlarda %62,5'inde (5/8) ve hemoglobinüri ile başvuran intravasküler hemolizli olanların %100'ünde (2/2) PNH klonu pozitif saptadık. LDH yüksekliği, retikülositoz, indirekt hiperbilirubinemi ve Coombs negatifliği bulgularının bir veya daha fazlasının bulunduğu böbrek fonksiyon bozukluğu olan (2/2), portal ven trombozlu (14/14), splenik ven trombozlu (2/2), sitopeni olan diğer venöz trombozlu (1/1) ve splenektomi sonrası nüks İTP'li (1/1) olan

hastaların %100'ünde PNH klonu negatif saptadık. Mercier ve ark. hipoplastik/aplastik kemik iliği olan hastalarda %47, hemolitik anemi olan hastalarda %7, MDS tanılı hastalarda %5, sitopeni (hemolizin eşlik ettiği veya açıklanamayan) hastalarda %3 ve trombozlu hastalarda %2 oranında PNH saptadılar (8). MDS nedeni ile PNH açısından test edilen hastalarda benzer oranlarda sonuçlar elde edilmişken bizim çalışmamızda sitopeni ve aplastik anemi nedeni ile test edilen hastalarda daha yüksek oranda PNH saptanmıştır. Ancak iki çalışmada da dikkat çeken özellik aplastik veya hipoplastik kemik iliği saptanan hastalarda yüksek oranda PNH saptanmış olmasıdır. Bu grup hasta klinik başvurusunda mutlaka PNH açısından değerlendirilmesi gerekir.

Parker ve ark. klasik PNH tanılı hastaların hastalıklarının bir döneminde mutlaka hemoglobinüri tarif ettikleri halde aplastik anemi veya MDS'ye eşlik eden PNH durumunda klon boyutunun rölatif olarak küçük olması nedeniyle bu bulgunun olmayabileceğini ve PNH tanısı alan 80 hastalık bir seride hastaların %26'sının hemoglobinüri, %9'unun hemolitik anemi ve sarılık ile başvurduğunu belirtmişlerdir (14). Ge ve ark. Çin'de yaptığı tek merkezli bir çalışmada klasik PNH grubunda başlangıç semptomu olarak hemoglobinüri %82 oranına ulaşmakla birlikte PNH ilişkili aplastik anemi ve subklinik PNH grubunda %1,4 oranında saptanmıştır (18). Mercier ve ark. yaptığı çalışmada hiçbir hastanın başlangıç semptomu hemoglobinüri görülmemesini PNH klon boyutu ve klinik subtipine bağlamışlardır (8). Bizim çalışmamızda hemoglobinüri ile başvuran hastalarımızda %100 oranında PNH saptanması; intravasküler hemoliz bulgularının eşlik etmesi, bu hastaların klasik PNH tanısı alması ve klon boyutunun büyük olması bu görüşleri desteklemektedir.

Literatür ve kılavuzlar alışılmadık bölgelerde (hepatik venler, mezenterik venler, splenik ven, dermal venler gibi) gelişen hastalarda ayırıcı tanıda PNH düşünülmesini; eşlik eden sitopeni ve/veya intravasküler hemoliz bulgusu da var ise mutlaka PNH test edilmesini önermektedir. Ancak PNH hastalarının ne kadarının primer olarak tromboz ile ortaya çıktığını gösteren veri azdır (19). Şahin ve ark. trombozlu hastalarda %7 oranında (10), Parker ve ark.'nın tromboz veya emboli ile başvuran grupta %6 oranında (14) PNH

saptandığını belirtmesi, Mercier ve ark. trombozlu hastalarda %2 oranında (8) PNH saptaması bu bulgunun nadir bir başvuru nedeni olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda 17 trombozlu hasta dahil edilmiş olup bu hastalarda PNH saptanmamış olması az görülen bir başvuru nedeni için test edilen hasta sayısının az olmasına bağlı olabilir. PNH hastalarında trombozun çoğunlukla akut hemoliz ataklarını izlemesi bu hastalarda trombofilinin altta yatan önemli mekanizmalardan birinin kompleman inhibisyonu veya hemoliz olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca kompleman inhibitörleri ile yapılan tedaviye ait çalışmalar hemolizin inhibisyonu ile PNH hastalarındaki trombotik olaylarda belirgin azalma görüldüğünü ortaya koymuşlardır (13). Bizim PNH saptanan hastalarımızın sadece 2'sinde belirgin intravasküler hemoliz bulguları olması ve bu hastalara başvurduktan sonra klasik PNH tanısının hızlı konması ve tedavilerinin başlanması, trombotik komplikasyonların önlenmesine neden olmuş olabilir. Ek olarak, trombotik bulgular nedeni ile test edilen hastalarımızın LDH yüksekliği ve/veya sitopeni dışında eşlik eden intravasküler hemoliz bulgularının olmayışı da bu teoriyi desteklemektedir. Ayrıca LDH yüksekliği pek çok klinik tabloya eşlik edebilmesi nedeni ile belki de trombozlu hastalarda tek başına olması PNH'dan önce daha sık görülen nedenleri akla getirmelidir. PNH'da trombozun altta yatan mekanizmaları tam aydınlatılamasa da trombotik komplikasyonlar gelişen hastalarda PNH'a ek başka faktörler rol oynuyor olabilir. Literatürdeki çalışmaların farklı bölgelerde yapılmış olması farklı etnik gruplar arasında trombozun görülme sıklığının farklı olabileceğini ve bizim çalışmamızda da tromboz grubunda PNH saptanmamasını açıklayabilir. Ancak farklı etnik gruplar arasında PNH'ye ek olarak kalıtsal protrombotik durumların olabileceği teorisi PNH'daki tromboz ile bilinen kalıtsal trombofililer arasında hiçbir korelasyon saptanmayan bir çalışma ile çürütülmüştür (9). Nafa ve ark., 66 PNH hastasında Faktör V Leyden mutasyonu araştırmış ve sağlıklı kontrollerle benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Dragoni ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise PNH hastalarında antitrombin 3, protein C ve protein S düzeyleri normal sınırlarda saptanmış ve Faktör V Leyden, metilen tetrahidrofolat redüktaz ve protrombin gen mutasyonları benzer sıklıkta saptanmıştır (19). Yine de PNH hastalarında

trombozun görülmesi açısından farklı bölgelerde farklı faktörler rol oynuyor olabilir. Trombozun ortaya çıkması, Asya toplumlarında %5-10 oranında bildirilirken Avrupa ve Birleşmiş Devletler'den %30-40 oranında bildirilmiştir (19). Bu da trombotik komplikasyonların ortaya çıkmasında etkili olan faktörlerin ve altta yatan mekanizmalarının anlaşılması açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır. Böyle nadir bir hastalığın az görülen bir ilk başvuru nedeni olmasına rağmen tromboz, morbidite ve mortalitenin birinci sıradaki sebebi olması nedeniyle uygun kriterler altında test edilmeye değer bir bulgudur.

Çalışmamız sırasında PNH klonu saptanan 12 hastadan dördüne Eculizumab tedavisi başlanmıştır. Bu hastalardan ikisi intravasküler hemoliz ve hemoglobinüri olmak üzere klasik PNH bulguları ile başvuran 37 yaşında kadın hasta ve 28 yaşında erkek hasta idi. Dal ve ark. çalışmasında klasik PNH tanısı alan hastaların yaşı 24 ile 46 arasındaydı (16). Bu bulgular klasik PNH'nin genç yaş grubunda daha sık görüldüğünü düşündürmektedir. 62 yaşında MDS tanılı hastanın ilk klinik başvurusunda trombositopeni hakim olup trombosit düzeyi transfüzyon ihtiyacı gösterecek kadar düşüktü. Bu hasta immünsüpresif tedavi almıştır. Trombositopeni tablosu immünsüpresif tedavi kesildiğinde ılımlı düzeyde devam eden hasta izleme alınmıştır. Klinik izleminde blast artışı olmayan hastanın eritrosit transfüzyon ihtiyacı gelişmesi üzerine bakılan PNH klonu pozitif saptanmış olup hastanın klinik tablosuna intravasküler hemoliz bulguları da eklenmesi üzerine hastaya Eculizumab tedavisi başlanmıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar düşük oranda PNH hücreleri olan aplastik anemi veya refrakter anemi-MDS hastalarının immünsüpresif tedaviye daha yüksek oranda yanıt verebileceğini öne sürmektedir (14). Bu hastanın da ilk başvuruda tedaviye yanıt vermesi bu duruma bağlı olabilir. Ancak ilerleyen dönemde intravasküler hemoliz tablosunun eklenmesi hastalığın değişken ve progresif klinik seyriyi ortaya koymaktadır. Şahin ve ark. PNH tanı, takip ve tedavisi açısından bir kılavuz hazırlamışlardır. Buna göre %0,01'den daha fazla PNH klon boyutuna sahip hastalar takip edilmelidir. Klon boyutu %1'den küçük ve klinik ve laboratuvar olarak intravasküler hemoliz bulgusu yok ise yıllık takip yapılabilir. Klon boyutu zaman içinde artarsa veya %1'den büyük ise 6 ayda bir takip

edilmelidir. PNH klon boyutu zamanla azalabilir veya saptanamaz hale gelebilir. Bu nedenle klinik belirtilerin kötüleşmesi, tromboembolik olay ve hemolizdeki artış durumunda anında test önerilir. AA/subklinik PNH durumunda hastaların %15-17'si belli bir zaman içinde hemolitik anemi tablosu geliştireceği göz önüne alınarak hemoliz bulgularının ve PNH klonal genişlemesinin saptanması açısından yakın takibin yapılması gerektiğini önermektedirler. Yine aplastik anemi ve MDS-refrakter anemi hastalarına tanı anında PNH klonu bakılmasını ve negatif saptansa bile yıllık klon takibi, pozitif saptanan hastalara ise 6 aylık takip yapılmasını önermektedirler (10). Borowitz ve ark. küçük klon boyutu saptanan aplastik anemi hastalarında seri klon takibini önermektedir çünkü aplastik anemi tablosu hemolitik PNH'a dönüşebilir ve bu durum klon boyutundaki artış ile öngörülebilmektedir(1). Bizim çalışmamızda da 65 yaşında aplastik anemi tanısı alan hastanın tanı anında bakılan PNH klonu pozitif saptandı. İmmünsupresif tedavi başlanan hasta klon takibine alındı. Hastanın tedaviye yanıtızsız olması nedeni ile klon tekrarı 3 ay sonra bakıldı. Klon boyutunda progresyon saptandı ve hastaya Eculizumab tedavisi başlandı. Hastanın tedavi sonrası transfüzyon ihtiyacı kalmadı. Ancak tedavi başlandığı andaki PNH klon boyutu granülositer seride %14,09 iken tedavi altında yapılan takiplerinde klon genişlemesinin devam ettiği ve son kontrolünde granülositer seride %83,31 olduğu görüldü. Bu da yakın takibin önemini ve klinik bulguların test sıklığının hastanın kliniği de göz önüne alınarak dikkatli bir şekilde düzenlenmesi gerektiğini gösterdi. Küçük PNH klon boyutu saptanan diğer 7 hastanın takipleri 6 ay ara ile devam etmektedir. Bu hastalardan 6'sında henüz klon progresyonu gözlenmemiştir. 48 yaşında aplastik anemi tanısı ile takip edilen hastanın klon boyutunda küçük artışlar devam etmekle birlikte klinik ve laboratuvar olarak stabil seyretmektedir. Bu nedenle hastanın klon takibi 6 ay ara ile devam etmektedir. Ancak hasta daha erken klon boyutu bakılması açısından yakın takibe alınmıştır. 1 hasta ise tedaviyi kabul etmeyerek izlemiden çıkmıştır.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamıza 116 hasta dahil edilmiş olup 12 hastada PNH klonu saptanmıştır. Kemik iliği aplazisi ile gelen LDH yüksekliğinin eşlik ettiği hastalarda klon daha sık olarak bulunmuştur. İntravasküler hemoliz olan hastalarda doğal olarak PNH klonu saptanmıştır. Bizim hasta grubumuzda trombozu olan hastalarda PNH klonu, belki kriterlerimizin, belki de hasta sayımızın yetersizliğinden daha az bulunmuştur.

Çalışmamız sırasında dört hastaya Eculizumab tedavisi başlanmıştır. Bu hastalarımızın tedavi ile birlikte klinik yanıtı mevcut olup hayat kalitelerinde belirgin düzelme mevcuttur. Tedavi alan hastalarımızın hiç birinde henüz trombotik komplikasyon yaşanmamıştır. Eculizumab tedavisi alan hastaların klon takibine 6 ay ara ile devam edilmektedir. Hastalarımızdan edindiğimiz tecrübe ve literatürün eşliğinde küçük klon boyutu saptanan hastaların klon takibine de 6 ay ara ile devam edilmektedir.

PNH; halsizlik, karın ağrısı, yutma güçlüğü gibi non-spesifik bulguları olabilen, başlangıcı ve seyri değişkenlik gösteren, progresif, morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Bu nedenle kemik iliği aplazisi/hipoplazisi saptanan hastalar ile LDH yüksekliği veya intravasküler hemoliz tablolarının eşlik ettiği açıklanamayan sitopeni, MDS-refrakter anemi, atipik trombozların görüldüğü hastalar mutlaka PNH açısından taranmalıdır. Klon varlığı saptanan hastalara ise 6 ay ara ile klon takibi yapılmalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamız henüz sayı olarak yetersizdir. Hastalığın sıklığının tespiti ve riskli grupların ortaya konması açısından daha çok hasta içeren geniş ölçekli ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

VII. ÖZET

Amaç: Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH), nadir görülen bir hastalıktır. Değişken ve karmaşık kliniği ile tanıda gecikmeler yaşanmaktadır. Morbidite ve mortalitesi yüksek olup erken tanınması halinde önlenabilmektedir. Bu nedenle hastalığın hangi risk gruplarında daha sık olduğunu belirleyerek geleceğe projeksiyon tutmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Literatür eşliğinde PNH açısından en riskli gruplar belirlendi. Manisa ili içerisinde bu riskli gruplara dahil olduğu belirlenen 70 kadın ve 46 erkek olmak üzere toplam 116 hastadan PNH klonu araştırıldı. Bu amaçla PNH taramasını bugün altın standart olarak kabul edilen FLAER yöntemi ile gerçekleştirildi.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 116 hastanın 12'sinde PNH klonu saptanmıştır. Kemik iliği aplazisi ile gelen LDH yüksekliğinin eşlik ettiği hastalarda klon daha sık olarak bulunmuştur. İntravasküler hemoliz olan hastalarda PNH klonu saptanmıştır. Portal, splenik ve mezenter ven trombozu olan hastalarda PNH klonu saptanmamıştır. PNH klonu saptanan dört hastaya Eculizumab başlanmıştır. Yedi hastaya 6 ay ara ile klon takibi yapılmaktadır.

Sonuç: PNH; başlangıcı ve seyri değişkenlik gösteren, progresif, morbiditesi ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Bu nedenle kemik iliği aplazisi/hipoplazisi saptanan hastalar ile LDH yüksekliği veya intravasküler hemoliz tablolarının eşlik ettiği açıklanamayan sitopeni, MDS-refrakter anemi, alışılmadık bölgelerde olan trombozların görüldüğü hastalar mutlaka PNH açısından taranmalıdır. Bizim çalışmamızda trombozu olan hastalarda PNH klonu, kriterlerimizin veya hasta sayımızın yetersizliğinden daha az bulunmuş

olabilir. Hastalığın sıklığının tespiti ve riskli grupların ortaya konması açısından daha çok hasta içeren geniş ölçekli ve çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, anemi, tromboz



VIII. ABSTRACT

Screening of the frequency of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), associated with thrombosis, hemolytic anemia and aplasia, in groups with different clinical findings and suggesting PNH

Purpose: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH) is a rare disease. Due to variable and complicated clinic, there are delays in the diagnosis. Morbidity and mortality are high and can be prevented in case of early recognition. For this reason, we aimed to keep a projection for the future by determining which risk groups the disease is more frequent.

Materials and Methods: The most risky groups in terms of PNH were identified in the literature. A total of 116 patients (70 female and 46 male) who were determined to be included in these risk groups in Manisa province were examined for PNH clone. For this purpose, PNH scanning was performed by the FLAER method which is accepted as the gold standard today.

Findings: PNH clones were detected in 12 of 116 patients included in the study. Clones were found more frequently in patients with elevated LDH with bone marrow aplasia. PNH clone was found in patients with intravascular hemolysis. PNH clones were not detected in patients with portal, splenic and mesenteric vein thrombosis. Eculizumab was initiated in four patients who detected a PNH clone. Seven patients are followed up with clones by 6 months interval.

Results: PNH is a progressive, morbidly and mortal disease with variable onset and course. Patients with bone marrow aplasia/hipoplasia and patients with unexplained cytopenia, MDS-refractor anemia, thrombosis with unusual sites associated with LDH elevation or intravascular hemolysis should be screened for PNH. In our study, in patients with thrombosis, the PNH clone may have been found to be less than the deficiency of our criteria or patient count. There is a need for large-scale and multicenter studies involving more patients to determine the frequency of the disease and to identify risk groups.

Key Words: Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria, anemia, thrombosis

IX.KAYNAKLAR

1. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010 ;78:211–30.
2. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri (PNH) Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Türk Hematoloji Derneği 2011;2:15-25
3. Kern WF. Çevresel Kanın İçeriği. PDQ Hematoloji (içinde). 1st ed. London; 2005:1-11
4. Sayinalp N. Anemilere Genel Yaklaşım. İliçin G, Biberöğlü K, Süleymanlar G, Ünal S., İç Hastalıkları (içinde), 3. Baskı Ankara; 2012: 1592-1593
5. Goldman L., Ausiello D., Hematolojik Hastalıklar. 23. Ed; Goldman's Cecil Medicine (içinde). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2013:1165-1171
6. Risitano AM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology* 2012; 217(11):1080-1087
7. Goldman L., Ausiello D., İmmünoloji ve İnflamasyonun Prensipleri. 23. Ed; Goldman's Cecil Medicine (içinde). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 2013:282-288
8. Mercier T, Devos T, Mukovnikova M, Boeckx N. Diagnosing nocturnal paroxysmal hemoglobinuria: a single center 4-year experience. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2017; 39: 329–336
9. Hill A, Kelly RJ, Hillmen P. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2013;121:4985–96.

10. Sahin F, Akay OM, Ayer M, et al. PNH diagnosis, follow-up and treatment guidelines. *Am J Blood Res* 2016;6(2):19-27
11. Luzatto L. Recent advances in the pathogenesis and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2016, 5(F1000 Faculty Rev):209
12. Devalet B, Mullier F, Chatelain B et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review: *European Journal of Haematology*. 2015: 190–198
13. Bessler M, Hiken J. The Pathophysiology of Disease in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:104-110.
14. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Kinoshita T, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005;106:3699–3709.
15. Morado M, Freire Sandes A, Colado E et al. Diagnostic screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Prospective multicentric evaluation of the current medical indications. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017 Sep;92(5):361-370
16. Dal MS, Karakuş A, Ekmen MÖ, Ayyildiz O. Presentation and Management of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria: A Single-Center Experience. *Hematol Rep*. 2016 Mar 25;8(1):6409.
17. Dezern AE, Borowitz MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018 Jan;94(1):16-22.
18. Ge M, Li X, Shi J, Shao Y, Zheng Y. Clinical features and prognostic factors of Asian patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: results from a single center in China. *Ann Hematol*. 2012 Jul;91(7):1121-8.

- 19.** Ahluwalia J, Naseem S, Sachdeva MU et al. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria is rare cause for thrombosis of the intra-abdominal veins in the ethnic Indian population - results from FLAER-based flowcytometry screening. *Eur J Haematol.* 2014;92(5):435-43.

