



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
HEMATOLOJİ BİLİM DALI**

**PAROKSİSMAL NOKTURNAL HEMOGLOBİNÜRİ
HASTALIĞINDA AKIM SİTOMETRİK VE KLİNİK
BULGULARIN KARŞILAŞTIRMALI DEĞERLENDİRMESİ**

Uzm. Dr. Suphi BAŞLAR

HEMATOLOJİ YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Taner DEMİRER

ANKARA, 2012

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1. Paroksismal Nokturnal Hemoglobinüri	5
1.1.1. Etyopatogenezi	6
1.1.2. Sınıflama	6
1.1.3. Tanı	6
1.1.4. Paroksismal Nokturnal Hemoglobinüri ve Tromboz	9
1.1.5. Paroksismal Nokturnal Hemoglobinüri ve Akut Lösemi	11
1.1.6. Tedavi	11
AMAÇ	14
2. GEREK VE YÖNTEM	15
2.1. Hastalar	15
2.2. İstatistiksel Analiz	15
2.3. Akım Sitometri Yöntemi	16
2.3.1. İmmüno-fenotiplendirme Çalışması	16
2.3.2. Lökositlerde GPI ilişkili Antikorların İşaretlenmesi	16
2.3.3. Eritositlerin Yüzeyinde CD59 İfadesinin Değerlendirilmesi	16
2.3.4. Verilerin Toplanması	17
2.3.5. Verilerin Analizi	17
3. SONUÇLAR	22
4. TARTIŞMA	33
KAYNAKLAR	39

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hematoloji Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri Hastalığı'nda Akım Sitometrik ve Klinik Bulguların Karşılaştırmalı Değerlendirmesi başlıklı, Dr Suphi Başlar'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir,...

Tez Savunma Tarihi: 14 / 11 / 2012

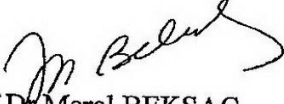


Prof.Dr Günhan GÜRMAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hematoloji Bilim Dalı Başkanı

Jüri Başkanı



Prof.Dr.Meral BEKSAÇ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hematoloji Bilim Dalı Öğ.Üy.

Üye



Prof.Dr.Taner DEMİRER

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Hematoloji Bilim Dalı Öğ.Üy.

Tez Danışmanı

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki değerli katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Taner DEMİRER'e,

Hematoloji Yan Dal eğitimim süresince bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım Hematoloji Bilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine,

Tez çalışmamda büyük yardımlarını gördüğüm Sayın Prof. Dr. Meral BEKSAÇ'a,

Hematoloji Laboratuvarı'ndan hasta verilerini elde etmemde ve akım sitometri yönteminin değerlendirilmesinde olan katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Klara DALVA'ya,

İstatistiksel analiz değerlendirmesindeki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Yasemin YAVUZ GENÇ'e

En içten duygularımla teşekkür ederim.

Uzm. Dr. Suphi BAŞLAR

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA:	Aplastik anemi
AKHN:	Allojeneik kök hücre nakli
AUC:	Area under curve
dl:	Desilitre
ECFC:	Endothelial colony-forming cell
FCM:	Flow cytometry
FL:	Femtolitre
FSC:	Forward scatter
SS:	Standart sapma
SSC:	Side scatter
g:	Yerçekimi ivmesi
GPI:	Glycosyl phosphatidylinositol
GPI-AP:	Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein
L:	Litre
LDH:	Laktat dehidrogenaz
MAC:	Membrane attack complex
MDS:	Myelodisplastik sendrom
MDS-RAEB:	Myelodysplastic syndrome-refracter anemia excess blast
mg:	Miligram
MPV:	Mean platelet volume
n:	Sayı
NO:	Nitrik oksit
p:	İstatistikte yanılma payı
PAI-1:	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
PAP:	Plazmin-antiplazmin
PNH:	Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
PIG-A:	Phosphatidylinositol glycan class A
PR3:	Proteinase 3
TFPI:	Tissue factor pathway inhibitor
tPA:	Tissue plasminogen activator
U:	Ünite
u-PA:	Urokinase plasminogen activator
u-PAR:	Urokinase plasminogen activator receptor

ÖZET

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri Hastalığında Akım Sitometrik ve Klinik Bulguların Karşılaştırmalı Değerlendirmesi

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri(PNH), X kromozomuna bağlı fosfatidilinositolglikan sınıf A geninin mutasyonu sonucu gelişen, hemoglobinüri, kan değerlerinde düşüklüğe bağlı belirtiler(halsizlik, kolay kanama bulguları) ya da tromboz ile seyreden, kan hücrelerinin az görülen bir hastalıdır. Bu çalışmada 39 PNH hastası hastalık belirtileri, laboratuvar bulguları, komplikasyonlar ve bunların klon boyutu ile ilişkisi yönünden geriye dönük olarak değerlendirilmiştir. Hastaların ortalama izlem süresi 26 aydır. Hastalar iki grup halindedir. Klasik tip PNH hasta sayısı 24 iken Aplastik Anemi(AA) ya da Myelodisplastik Sendrom(MDS) birlikteliğinde PNH tanısı alan 15 hasta vardır. Tanıda belirgin hemoliz bulguları ve izlemde tromboz gelişimi klasik tipte gözlenmiştir. AA tanılı 2 hastada izlem sürecinde hemoliz bulgularının geliştiği saptanmıştır. Klon boyutu hemoglobinüri, hemoliz testleri(yüksek retikülosit ve laktat dehidrogenaz değerleri) ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Klon boyutu ile tromboz ilişkili bulundu. Klon boyutu <%50 olan hastalarda tromboz gelişmemiştir ve tromboz gelişen tüm hastalar daha büyük klona sahip olan klasik tip PNH alt grubundadır. PNH az rastlanan bir hastalıktır, dolayısıyla bu çalışmada hasta sayısının az olmasının istatistiksel parametreler üzerindeki etkisinin de dikkate alınması gerekmektedir. İzlem sürecinde 6 hasta allojeneik kök hücre nakli sonrası gelişen komplikasyonlar, 2 hasta ise nakil için yattığı sırada hazırlama rejimi alırken olmak üzere toplam 8 hasta ölmüştür. Ölüm sayısı her iki grupta eşittir.

Sonuç olarak bu çalışmada hemoglobinüri ve LDH düzeyleri ile klon boyutu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaştığı görüldü(sırasıyla $p=0,031$ ve $p=0,001$). Diğer klinik bulgular ile klon boyutu arasında bir ilişki saptanmadı. Tromboz komplikasyonu yalnızca klasik tip PNH hastalarında

gelişmiştir. Klon boyutu %50'nin altında olan hiçbir hastada tromboz gelişmediği görüldü. Tromboz komplikasyonu gelişen hastalarda MPV değerleri, gelişmeyenlere göre anlamlı oranda yüksek bulundu($p=0,04$). Yine retikülosit ve LDH değerlerinin tromboz gelişen hastalarda diğer hastalara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görüldü(p değerleri sırasıyla 0,009 ve 0,003). Ayrıca AKHN sonrası PNH klonu bakılan 9 hastanın 7'sinde PNH klonunun yok olduğu görüldü.

SUMMARY

Comparison of Flow Cytometric and Clinical Findings in Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria(PNH) is a rare disorder of blood cells, associated with mutations of X-linked gene called phosphatidylinositol glycan class A, and presenting as hemoglobinuria, signs of cytopenias(fatigue, easy bleeding) or thrombosis. In this study, 39 patients with PNH were retrospectively evaluated with regard to disease findings, laboratory investigations, complications and relationship between those and clone size. Median follow-up time was 26 months. Patients were divided into two groups. There were 24 classical PNH and 15 Aplastic Anemia(AA) or Myelodysplastic Syndrome(MDS) associated PNH patients. Evident signs of hemolysis at the time of diagnosis and thrombosis were seen in classical PNH patients. Signs of hemolysis developed in two AA patients. Hemoglobinuria, hemolysis tests(increased reticulocyte and lactate dehydrogenase) were determined to be correlated with clone size. There was association between clone size and thrombosis. No patients with clone size smaller than %50 developed thrombosis and all patients with thrombosis were in classical PNH subtype which has greater clone size. PNH is a rare disease, therefore the effect of the small number of patients on the statistical parameters must be taken into consideration. Over the entire course of follow-up time 8 patients died, 6 due to complications of allogeneic stem cell transplantation and 2 due to conditioning regimen before transplantation. Number of deaths are equal in each subtypes.

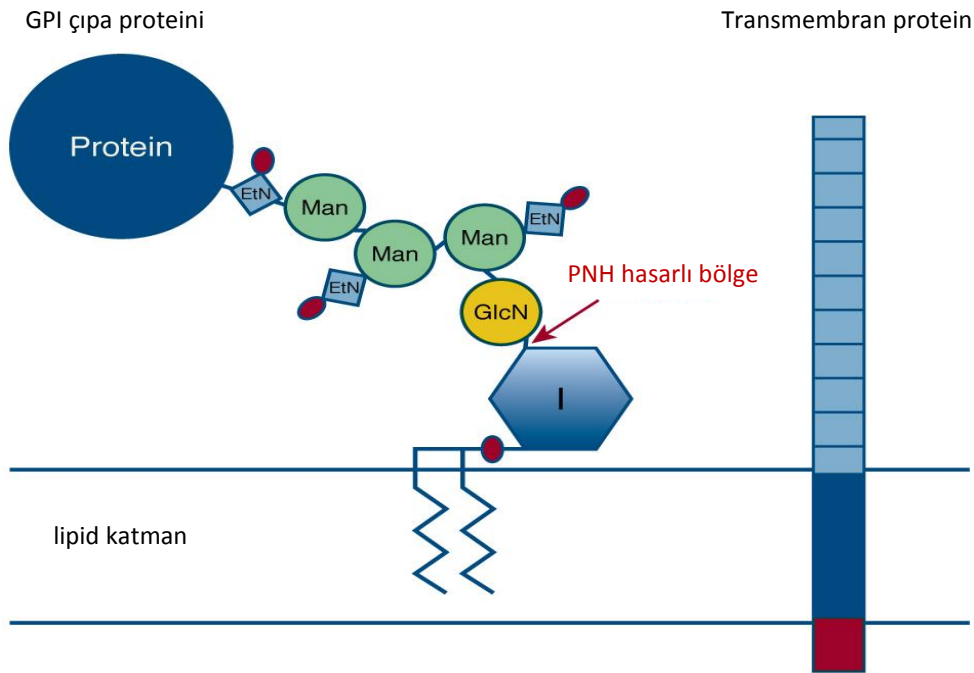
In summary, in this study there was a linear correlation between hemoglobinuria and LDH levels with clone size, which was statistically significant($p=0,031$ and $p=0,001$ respectively). Other clinical signs didn't correlate with clone size. Thrombotic complications were seen only in classical type PNH patients. No patients with clone

size smaller than %50 developed thrombosis. In patients with thrombosis, MPV levels were significantly higher than others($p=0,04$). There was also statistically significant correlation between reticulocyte and LDH levels with thrombotic events(p value 0,009 and 0,003 respectively). In addition, after allogeneic stem cell transplantation 9 patients were evaluated for PNH clone and in 7 the clone was disappeared.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri:

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri(PNH), intravasküler hemoliz bulguları, kemik iliği yetersizliği ve tromboz ile seyreden, klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Hastalık prevalansı 200000 kişide bir olgudan daha düşüktür(1). X kromozomuna bağlı fosfatidilinositolglikan sınıf A(PIG-A) geninde gelişen mutasyonlar sonucu bu gen tarafından kodlanan gliserolfosfatidilinositol-çıpa proteinlerinin(GPI-AP) kan hücreleri üzerindeki eksikliği hastalığın temel bulgusu olan hemolizden sorumludur(Şekil 1). Hastalık ilk olarak William Gull tarafından 1866 yılında tanımlanmış fakat paroksizmal soğuk hemoglobinüri ile ayrımı yapılamamıştır. PNH hastalığını ayrı bir başlık olarak tanımlayan Paul Strübing(1882) gece gelişen hemoglobinürinin uykuda solunumun yavaşlamasına bağlı gelişen karbondioksit ve laktik asidoz birikimi sonucu oluştuğunu kanıtlamaya yönelik deneyler planlamıştır(2, 3). Tromboembolik olayların hastalık ilişkili mortalitede önemli rol oynadığına dikkati çeken Crosby olmuştur(4).



Şekil 1. PNH hastalığının moleküler temeli(Parker CJ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Williams Hematology. 8th ed. Kaushansky K, ed. California, CA: McGraw-Hill; 2010: s. 523'ten alınmıştır).

1.1.1. Etyopatogenez:

PNH hastalığında hemolizin nedeni, doğal bağışık yanıtın bir bileşeni olan komplement sisteminin alternatif yolağıdır(5, 6). Bu sistem kişiyi patogenetik mikroorganizmalardan koruma işlevini gerçekleştirir. Normal koşullarda sürekli saldırı halinde olan komplement sisteminden hücreleri korumak için görevli proteinler hücre zarına GPI çıkışı ile bağlıdır(Şekil 1). Hücre yüzeyinde bulunan CD55, CD59 bu proteinlerden ilk tanımlanmış olanlarıdır(7-10). Bu proteinlerin yokluğu kan hücrelerinin komplement sistemi karşısında savunmasız kalmasına yol açar. Bunun sonucunda kronik intravasküler hemoliz gerçekleşir.

1.1.2. Sınıflama:

PNH başlangıç belirtileri, klinik bulgular ve doğal seyir yönünden 3 alt gruba ayrılmıştır(11). Bu gruplar şu şekilde tanımlanmıştır:

1. *Klasik PNH*: İnvasküler hemoliz bulguları(artmış retikülosit ve laktat dehidrogenaz düzeyleri, hemoglobinüri) ile seyreden, diğer kemik iliği anormalliklerinin eşlik etmediği hasta grubudur. Kemik iliği incelemesinde normal selülarite, eritroid hiperplazi ve normal morfolojik özellikler bulunur.

2. *Diğer kemik iliği yetmezliklerinin eşlik ettiği PNH*: Bu hastalarda da klinik ve laboratuvar olarak hemoliz bulguları bulunmakla birlikte altta yatan bir kemik iliği anormalliği vardır. Bu grupta altta yatan kemik iliği hastalığı aplastik anemi(AA), myelodisplastik sendrom(MDS) ya da daha az oranda myelofibrozistir. Bu tanımlar için ilgili hastalıkların tanısal bulgularını içeren kemik iliği biyopsisi ya da sitogenetik ve moleküler anormalliklerin saptanması gerekmektedir.

3. *Subklinik PNH*: Diğer kemik iliği yetmezliklerinin eşlik ettiği, klinik ve laboratuvar olarak hemoliz saptanmayan, küçük boyutta klonal PNH alt grubudur.

1.1.3. Tanı:

PNH tanısı intravasküler hemoliz bulguları içeren, çevre kanında sferositoz bulunmayan, Coombs testi negatif saptanan her hastada düşünülmelidir. Ayrıca

aplastik anemi tanılı her hastada tanıda PNH klonu aranmalı ve aralıklı olarak(6 ayda bir) izlem yapılmalıdır. MDS hastalarında, tartışmalı olmakla birlikte, refrakter sitopeni alt grubunda klon taraması yapılması önerilmektedir(12). PNH tetkiki endikasyonları Tablo 1’de özetlenmiştir(1).

Tablo 1. PNH taraması gerektiren durumlar

Tekrarlayan hemoglobinüri

Non-sferositik, Coombs negatif, intravasküler hemoliz

Aplastik anemi

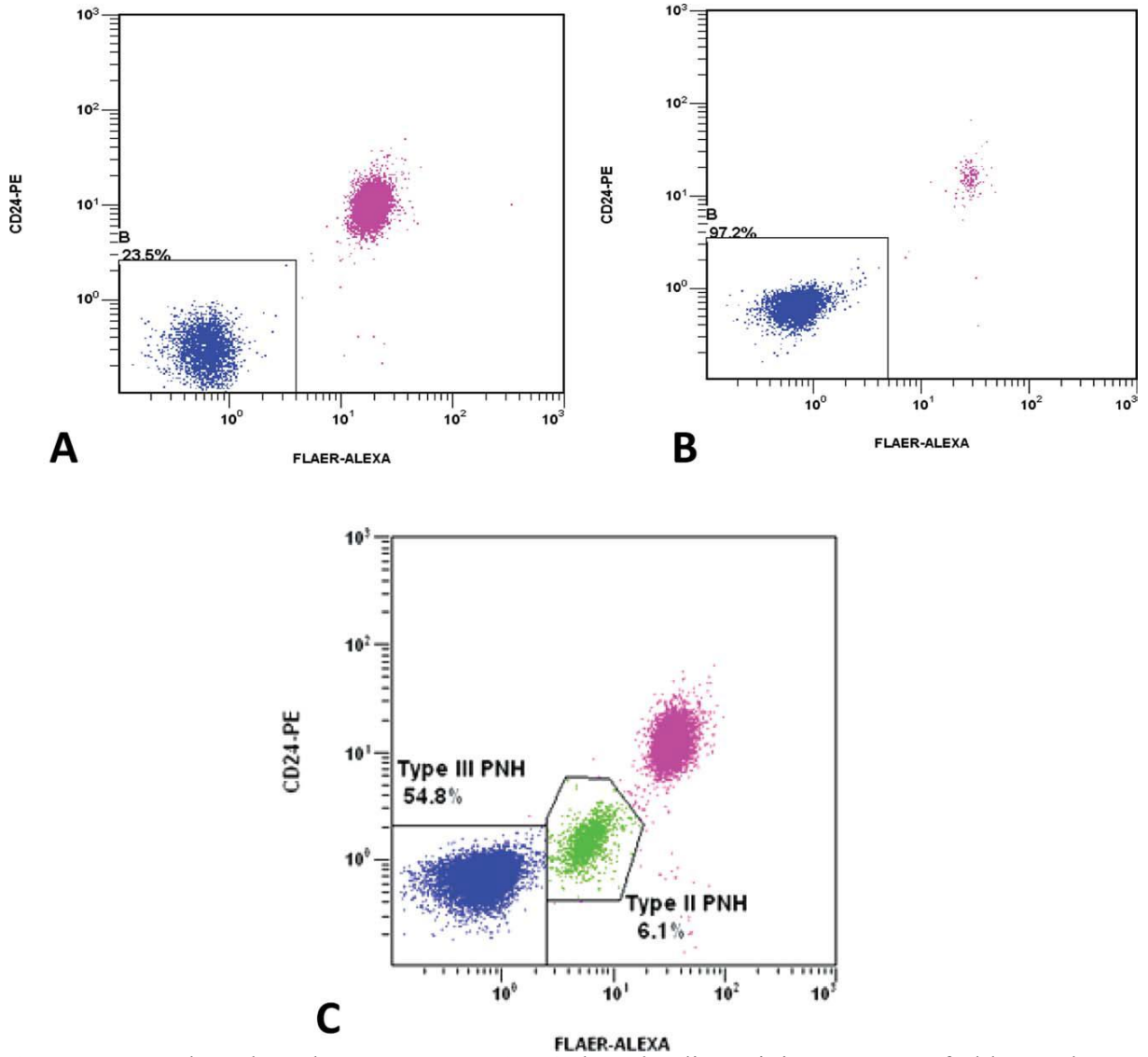
Myelodisplastik sendrom-refrakter anemi ya da –multilineage displazi

Anormal bölgelerde venöz tromboz(sıklıkla intravasküler hemoliz bulguları eşlik eder)

- Budd-Chiari sendromu
 - Diğer abdominal bölgeler
 - Serebral venler
 - Deri venleri
-

Hastalık tanısı için günümüze gelene kadar farklı tetkik yöntemleri kullanılmıştır. Bunlardan ilki, hastaların yıkanmış eritrositlerini aynı kan grubundan asitlenmiş serum ile inkübe etme temeline dayanan Ham testidir. Bu testin geliştirilmesi bazı aşamalardan geçmiştir. Hastaların gündüz uyumasını sağlayan Strübing hemoglobinürinin uyku sonrası geliştiğini gözlemlemiştir. Hemoliz ile uyku arasındaki bu ilişkiden yola çıkan Strübing, hemoglobinürinin uyku durumunda solunumun ve kan dolaşımının yavaşlaması ile artan arteriyel karbondioksitin kan pH’ını düşürmesi nedeni ile olduğu sonucuna ulaşılıyor. Strübing tarafından ortaya atılan bu düşünce test aşamasında başarıya ulaşmamıştır. Aynı düşünceyi savunan Thomas H. Ham hastalara sodyum bikarbonat verilmesi ile hemoglobinemi ve hemoglobinürinin azaldığını, sodyum klorit ile ise arttığını göstermiştir(2, 13). Bunun sonucunda yayınladığı iki makale Ham testinin temelini oluşturmuştur(14, 15). Daha sonrasında Hartmann tarafından şeker-su testi geliştirilmiştir(16). İlk olarak 1990 yılında van der

Schoot ve ark. tarafından önerilen akım sitometri diğer tetkiklerin yerini almıştır(11, 17-19, Şekil 2). Bu yöntem diğerlerine göre daha duyarlı bir test olduğu gibi kantitatif değer verdiği için izlemde de kullanılabilir. Akım sitometri yöntemi ile elde edilen sonuçlar hastalık bulguları, gelişen komplikasyonlar ile ilgili bilgi verir. Ayrıca AA beraberinde saptanan PNH klonunun aralıklı izlenmesi klinik yaklaşımda önem taşımaktadır(12).



Şekil 2. PNH hastalarında FLAER ve CD24 değerlendirmesini gösteren 3 farklı örnek. **A:** PNH granülosit popülasyonu 23.5% **B:** PNH granülosit popülasyonu 97% **C:** PNH granülosit popülasyonu 60.9% (54.8% Tip III hücreler ve 6.1% Tip II hücreler)(Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe 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: s. 219'dan alınmıştır.)

PNH hastalığına X kromozomuna bağlı PIG-A geninde gelişen mutasyonların yol açtığı biliniyor. Bu gende 100'den fazla mutasyon çeşidi tanımlanmıştır(20-22). Hastalıkta anormal kan hücreleri monoklonal olmakla birlikte aynı hastada birden fazla mutasyon saptanabilmektedir. Bunun klinik pratikte önemi gösterilememiştir(23). Mutasyon analizi tetkiki günümüzde rutin olarak kullanılmamaktadır.

1.1.4. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri ve Tromboz:

PNH hastalığında en önemli mortalite nedeni tromboembolik olaylardır(24-27). Sıklıkla klasik tipte gelişen bir komplikasyon olmakla birlikte de Latour ve ark. tarafından değerlendirilen hasta serisinde AA/MDS PNH hastalarında da anlamlı oranda saptanmıştır(28). Trombozun altında yatan neden henüz net olarak açığa kavuşmamıştır. Bu konuyla ilgili olarak çok sayıda farklı mekanizma sorumlu tutulmuştur.

Tromboz nedeni olarak ortaya atılan görüşlerden biri endotel hücrelerinin bu olaydaki rolüdür. Eritrositlerin hemolizi sonucu ortaya çıkan serbest hemoglobin ve yıkıma uğrayan monositlerden salınan mikropartiküllerin(örneğin doku faktörü) endotel hücrelerine doğrudan zarar verebileceği biliniyor(29). Yapılan çalışmalarda bunu destekleyen veriler elde edilmiştir(30-34). Endotelin tromboz patogenezindeki rolü ile ilgili bir diğer iddia bu hücrelerin de kan hücreleri gibi PIG-A mutasyonu sonucu hasarlı olduğu ve komplement ilişkili yıkıma karşı savunmasız olduğu görüşüdür. Endotel öncül hücrelerinin kemik iliğinden köken aldığı biliniyor(35). PNH hastalarında endotel koloni oluşturan hücrelerde(ECFC) CD55 ve CD59 eksikliğini gösteren(34) ve MDS hastalarında kanda dolaşan endotel hücrelerinin hematopoetik öncül hücrelerle aynı sitogenetik özellikler taşıdığını gösteren(36) çalışmalar bu iddiayı desteklemektedir. Bununla birlikte allojeneik nakil yapılan hastalarda verici tipi endotel hücrelerini araştırdıkları çalışmalarında Mueller ve ark. endotel hücrelerinin çok az bir kısmının vericiden kaynaklandığını saptamışlardır(37). Bir başka çalışmada ise, karaciğer nakli hastalarında alıcı tipi, kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerinin özellikle karaciğerde(diğer organlardan farklı olarak) çoğaldığı görülmüştür(38). PNH hastalığında trombotik olayların belirli bölgelerde(özellikle intraabdominal venlerde ve en sık hepatik vende) daha sık olduğu da düşünülürse

GPI eksikliği olan, kemik iliği kaynaklı endotel hücrelerinin trombozda rol oynadığı sonucu çıkarılabilir.

PNH hastalığında tromboz oluşum mekanizması ile ilgili bir diğer görüş ise, pıhtılaşma yolu inhibitörlerinden olan doku faktörü yolağı inhibitörü(TFPI) ve proteinaz 3(PR3) eksikliğinin tromboza neden olduğu yönündedir. Her iki protein de hücre zarına GPI çıpası ile bağlıdır(39-41). Ayrıca Jankowska ve ark. çalışmalarında GPI eksikliği olan nötrofillerde PR3 bulunmadığını ve dolaşımdaki PR3 düzeyinin PNH granülosit klon boyutu ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada PR3 ile trombosit etkinliğinin azaldığı görülmüştür(42).

İntravasküler hemoliz serbest hemoglobinin açığa çıkmasına neden olur. Prooksidan etkisi olan serbest hemoglobin doğrudan endotel hücrelerine toksik etki yapar. Ayrıca nitrik oksit(NO) ile bağlanarak doku düzeyinde bu bileşiğin azalmasına neden olur. NO normalde düz kas gevşemesi, trombositlerin inhibisyonu ve antiinflamatuvar etkiden sorumludur. Böylelikle NO eksikliği tromboza eğilim yaratır(29, 30).

Trombositlerin kontrolsüz bir şekilde uyarılması bir diğer olası nedendir. Trombosit yüzeyinde normalde bulunan CD55 ve CD59, PNH klonu taşıyan trombositlerde bulunmamaktadır(43, 44). PNH hastalarında trombosit yaşam süresinin değişmediğini dolayısıyla trombositlerin komplement sistemi tarafından yıkılmadığını gösteren çalışmalar vardır(45, 46). Bu veriler PNH hastalığında trombositopeninin nedeninin kemik iliği yetmezliği olduğu sonucunu çıkarır. Komplement sistemi tarafından CD59 aracılığı ile uyarılan trombositlerden protrombinaz salınımının artması, bu GPI çıpa proteininin yokluğunun protrombinaz yetersizliğine ve sonuçta tromboz gelişimine eğilim yarattığını düşündürmektedir(47). Ayrıca Wiedmar ve ark. trombositlerin membran atak kompleksi(MAC) tarafından uyarıldıklarında yüzeylerinde daha fazla faktör 5 bağlanma bölgesi oluştuğunu ve trombin üretimini arttırdıklarını göstermişlerdir(48).

Komplement sisteminin GPI bulundurmayan hücreleri uyararak prokoagulan mikropartiküller salınımına yol açması bir diğer hipotezdir(30). Yine Wiedmar ve ark. tarafından yapılan çalışmada MAC uyarısı ile PNH klonu taşıyan trombositlerin

normal trombositlere göre daha fazla mikropartikül salgıladığı görülmüştür(48). Sonuç olarak komplement uyarısı ile salınan mikropartiküllerin trombozu tetikleyebileceği düşünülebilir.

Fibrinoliz ve antikoagülasyonun engellenmesi de tromboza neden olabilir(30). Ürokinaz plazminojen aktivatör(u-PA) reseptörüne(u-PAR) bağlanarak plazminojeni plazmine çevirir. Böylelikle fibrinolizde görev alır. PNH hastalığında lökositler ve trombositlerde u-PAR eksiktir(49, 50). Diğer fibrinoliz inhibitörleri olan α 2-antiplazmin, plazmin-antiplazmin(PAP) kompleksleri ve plazminojen aktivatör inhibitör-1(PAI-1) ve fibrinolizi tetikleyen doku tipi plazminojen aktivatörü(tPA) PNH hastalarda normal düzeylerde bulunmuştur(34, 51).

PNH hastalığında tromboz alışlagelmişin dışındaki bölgelerde gelişir. Sıklıkla intraabdominal, intrakranyal bölgelerde saptanır. En sık hepatik vende(Budd-Chiari Sendromu) tromboza rastlanır(25, 28, 30, 52).

Hastalarda mortalite ve morbiditede önem taşıyan bu komplikasyonun sıklığının artan klon boyutu ile ilişkili olduğu biliniyor(24, 25, 28, 53). Bu nedenle büyük klona sahip hastalarda(granülosit klon boyutu>%50) warfarin ile primer profilaksi önerilmiştir. Fakat bu yaklaşım da hastaların tümünde trombozu önlemekte yeterli değildir(25). Ekulizumab komplement yolağında görevli olan C5'i inhibe eden bir tür monoklonal antikordur. Bu ilacın PNH hastalarında tromboembolik komplikasyon riskini azalttığı gösterilmiştir(54, 55).

1.1.5. Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri ve Akut Lösemi:

Bir klonal kök hücre hastalığı olan PNH seyrinde akut lösemi gelişebilmektedir. Bu komplikasyonun sıklığı bir seride %1 olarak bildirilmiştir(56). Literatürde bildirilmiş olgular vardır(57-61).

1.1.6. Tedavi:

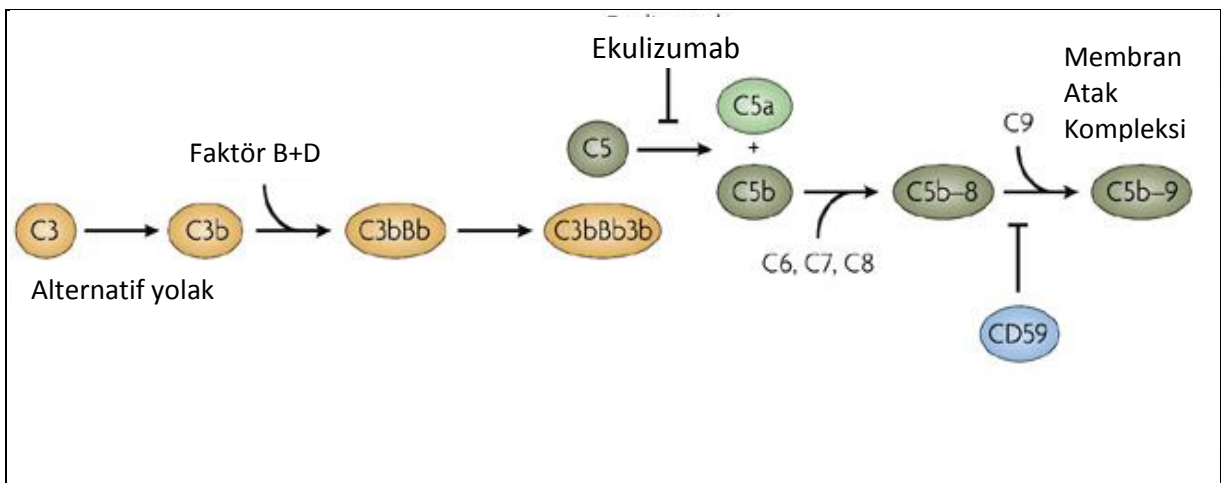
PNH hastalığına yaklaşımda ilk temel ilke destek tedavisi ve oluştuğunda komplikasyonların(tromboz, akut lösemi) tedavisidir. Ön planda hemoliz ile seyreden

olgularda kemik iliğinde yıkım ve yapım arttığından bu hastalar için folik asit desteği uygun bir yaklaşımdır. Hastalarda dönem dönem transfüzyon gereksinimi olabilir.

Hastalığın etyopatogenetik temelini oluşturan komplement sistemi üzerine bilinen bir etkisi bulunmayan steroid tedavide kullanılmaktadır. Steroid tedavisinin etkin bir yöntem olduğu yönünde bir kanıt yoktur. Yapılan çalışmalarda bu ilacın tedavideki yerini destekler yönde sonuçlar elde edilememiştir(11, 62-65). Bununla birlikte yan etkileri de göz önüne alındığında steroid tedavisinin PNH tedavisinde etkin ve yararlı bir yaklaşım olmadığı söylenebilir.

Androjen tedavisinin yararını gösteren çalışmalar bulunmaktadır(65, 66). Yan etkileri, karaciğer toksisitesi, prostat hipertrofisi, virilizasyondur. Tedavi süresince karaciğer testlerinin izlemi önerilir.

PNH hastalığı komplement ilişkili hemolizin bir sonucudur. Monoklonal antikor olan ekulizumab komplement sisteminin alternatif yolağında görevli C5'i inhibe eder(Şekil 3). Ekulizumab tedavisinin hastalığın tedavisinde etkin olduğunu ve tromboz komplikasyonunu engellediğini gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır(54, 55, 67-70). Ekulizumab komplement sistemini engellediği için tedavi altındaki hastalarda kapsüllü mikroorganizmalara karşı bağışık yanıtta yetersizlik söz konusudur. Bu hastalarda özellikle meningokok enfeksiyonu riski yüksektir. Bu nedenle hastalara tedavi öncesi aşı yapılmalıdır.



Şekil 3. Ekulizumab etki mekanizması.(Parker CJ, Kar S, Kirckpatrick P. Nature Reviews Drug Discovery. 2007; 6: s. 515'ten alınmıştır.)

Allojeneik kök hücre nakli kûratif tedavi seçeneğidir. Etkin ama yan etkileri nedeni ile yüksek mortalite riski taşıyan bir yaklaşımdır. Myeloablatif ve non-myeloablatif hazırlama rejimlerinin her ikisi ile de iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir(71-75). Peffault de Latour ve ark. tarafından 211 hasta ile yapılan bir çalışmada tromboz öyküsü olan hastaların daha yüksek mortalite riski taşıdığı gösterilmiştir(71).

AMAÇ:

Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri(PNH) kronik intravasküler hemoliz ve beraberinde tromboz, kemik iliği yetmezliği ve daha az sıklıkla lösemi gibi komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Başta tromboz olmak üzere gelişen bu komplikasyonlar hastalığın mortalite ve morbiditesini belirlemektedir. Tedavi bu klinik durumlara göre şekillenmektedir. Günümüzde hastalığın tanısında akım sitometri yöntemi kullanılmaktadır. Bu tetkik yöntemi ile PNH hastalığı klon boyutu belirlenerek hastalık seyri, şiddeti ile ilgili fikir edinilmesini sağlayacak sayısal veri elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada hasta grubumuzda akım sitometri yöntemi ile elde edilen verilerin hastalığın klinik seyri ile ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla hastaların PNH klon boyutu hastalık ile ilgili laboratuvar testleri ve klinik bulgularla karşılaştırılmış ve klon boyutunun bu yöndeki etkisini göstermek hedeflenmiştir. Bu şekilde elde edilen sonuçlar hastalığın tedavisine yön vermede yararlı olacaktır.

PNH hastalığında en önemli mortalite nedeni trombozdur. Bu komplikasyonun altında yatan neden net olarak bilinmemektedir. Yapılan bir çok çalışma tromboz etyopatogenezinde bir çok etkenin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda tromboz komplikasyonu gelişen hastaların laboratuvar verileri diğer hastalarla karşılaştırılmıştır. Bu yolla tromboembolik olaylara eşlik eden laboratuvar anormallikleri değerlendirilerek hastaların bu açıdan risk durumlarını belirlemek amaçlanmıştır.

Allojeneik kök hücre nakli(AKHN) PNH hastalığında bilinen tek küratif tedavi seçeneğidir. Bu tedavi önemli mortalite oranına sahiptir. Bu tedavinin özellikle de tromboz komplikasyonu gelişen hastalarda daha yüksek mortalite riski taşıdığı biliniyor. Hasta grubumuzda kliniğimizde AKHN yapılan hastalarda gelişen komplikasyonlar değerlendirilmiş ve literatür verileri ile bu anlamda karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hastalar:

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2001-2012 yılları arasında izlenen 39 Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri(PNH) hastası değerlendirilmiştir. Hastalar arasında ilk tanıyı belirtilen tarih aralığından önce diğer merkezlerde almış hastalar bulunmakla birlikte bu hastaların da tanısı hastanemizde akım sitometrik yöntemle doğrulanmıştır. Hastaların 24'ü klasik tip, 15'i kemik iliği yetmezliği beraberinde PNH hastasıdır. Klasik tip PNH hastaları; hemoliz ve/veya tromboz gibi bulgularla seyreden, kemik iliği biyopsisinde selülarite normal ya da artmış olan, akım sitometri tetkikinde en az iki seride PNH klonu saptanan hastalar olarak tanımlanmışlardır. Kemik iliği yetmezliği beraberinde PNH ise sitopenilerle seyreden ve kemik iliği incelemesinde düşük selülarite ve/veya displazik özellikler saptanan hastalardır. Hasta verileri semptomlar(karın ağrısı, halsizlik, hemoglobinüri, sarılık, kolay kanama bulguları), laboratuvar tetkikleri(tam kan sayımı, retikülosit, laktat dehidrogenaz) ve komplikasyonlar(tromboz, lösemi, ölüm) açısından taranmıştır.

2.2. İstatistiksel Analiz:

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk Testi kullanılarak değerlendirildi. Parametrik test varsayımları sağlandığı durumda iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında Student's T Testi kullanılırken, sağlanmadığı durumda Mann Whitney U Testi kullanıldı. Parametrik test varsayımları sağlandığı durumda iki bağımlı grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında "iki eş arasındaki farkın önemlilik testi" kullanılırken, sağlanmadığı durumda iki ortancanın karşılaştırılmasında Wilcoxon Testi kullanıldı. Gruplarda oranların karşılaştırılmasında Fisher's Exact Testi ve Ki-Kare Testi kullanıldı. Ortalama yaşam süreleri Kaplan-Meier analizi kullanılarak elde edildi. Analizler SPSS 15.0 paket programı kullanılarak yapılmış olup, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı düzey olarak alındı. Normal ve anormal laktat dehidrogenaz düzeylerini ayırmak için sınır klon boyutunu belirlemek amacı ile ROC(receiver operating characteristic) analizi yapıldı.

2.3. Akım Sitometri Yöntemi:

Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri ön tanısı ile laboratuvara iletilen EDTA'lı çevre kan örnekleri en geç 24 saat içinde immunfenotipik incelemeleri tamamlanacak şekilde işleme alınmıştır. Gelen örneklerde öncelikle lökosit alt gruplarında GPI ilişkili antijen ifadeleri değerlendirilmiş, bir veya iki hücre grubunda anormal bir antijen ifadesi tespit edildiğinde eritrositlerdeki CD59 ifadelerinin değerlendirilmesi için ek bir çalışma kurularak sonuçlar raporlanmıştır(76, 77).

2.3.1. İmmunfenotiplendirme Çalışması:

Hücrelerin granulosit/monosit/lenfosit olarak gruplanarak GPI ilişkili antijenlerin tanımlanması için lökositleri işaretlerken CD45_{PerCP}, CD14_{PE}, CD55_{FITC}, CD59_{FITC}, CD16_{FITC}, CD24_{FITC}, CD11b_{PE}, CD3_{PerCP}, CD19_{PE}, eritrositleri işaretlerken CD235a(GpA)_{FITC} ve CD59_{PE} antikorumları (Becton Dickinson, San Jose,USA) kullanılmıştır(panel için bakınız tablo 2).

2.3.2. Lökositlerde GPI İlişkili Antikorumların İşaretlenmesi:

Adı geçen antikorumların 10ar µL'si tablo 2'de belirtildiği şekilde tüplere dağıtıldıktan sonra tüplerin üzerine 100'er µL kan örneği eklenerek 20 dk oda ısısında karanlıkta bekletilir. Her bir tüpün üzerine 2 mL "Lysing solution" eklenerek 10 dk beklenir ve örneklerdeki eritrositlerin parçalanması sağlanır. Eritrositler parçalandıktan sonra tüpler oda ısısında 250g'de 10 dk santrifüj edilir ve üzerlerindeki sıvı dökülür. Tüpün dibinde kalan hücreler 2 mL PBS(Phosphate Buffered Saline) eklenip hücrelerin vortekslenmesini takiben 250 g'de 10 dk santrifüj edilerek yıkanır. Yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır. Dipte kalan hücrelerin üzerine 0.5mL %1 paraformaldehit içeren tespit çözeltisi eklenerek hücrelerin verileri akan hücre ölçerinde(FCM) toplanır ve analiz edilir(76).

2.3.3. Eritositlerin Yüzeyinde CD59 İfadesinin Değerlendirilmesi:

1 mL PBS solusyonu içine 10 µL kan örneği eklenip örneğin PBS içinde iyice karışması sağlanır. 1/100 oranında seyrelmiş olan eritrositlerden 50 µL alınarak başka bir deney tübüne aktarılır ve üzerine 3µL CD235a(GpA)_{FITC} ve 0,5 µL CD59_{PE}

antikoru eklenip karıştırılır ve 20 dk oda ısında karanlıkta bekletilir. Tüpün üzerine 2 mL PBS eklenerek 250g'de 5 dk santrifüj edilip üstte kalan sıvı dökülür. Yukarıda tanımlanan yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanır. Dipte kalan hücrelerin üzerine 0,5 mL PBS eklenerek hücreler resüspande edilir ve bekletilmeden akan hücre ölçerde veriler toplanarak analiz edilir(77).

2.3.4. Verilerin Toplanması:

Belirtilen antikorlarla işaretlenmiş olan lökosit ve eritrositlerin verileri günlük kontrol ve kalibrasyonları yapılmış olan akan hücre ölçer cihazında toplanır (Analizlerin yapıldığı zaman periyoduna göre BD Calibur San Jose, USA veya BC FC500 Miami, USA cihazları kullanılmıştır). Lökositler için floresan sinyaller logaritmik, öne ve dik açı ile kırılan ışık linear bir skala kullanarak toplanırken eritrositler için gerek ışık saçılımı gerekse floresan sinyaller logaritmik skala kullanılarak toplanmıştır. Örneklerden lökositler için 100.000 hücre/tüp, eritrositler için ise 50.000 hücre/tüp olacak şekilde veriler toplanarak analiz edilmek üzere hafızaya kaydedilmiştir.

2.3.5. Verilerin Analizi:

Verilerin analizi Cell Quest (BD, San Jose USA) veya RxF (BC, Miami USA) yazılımları kullanılarak yapılmıştır.

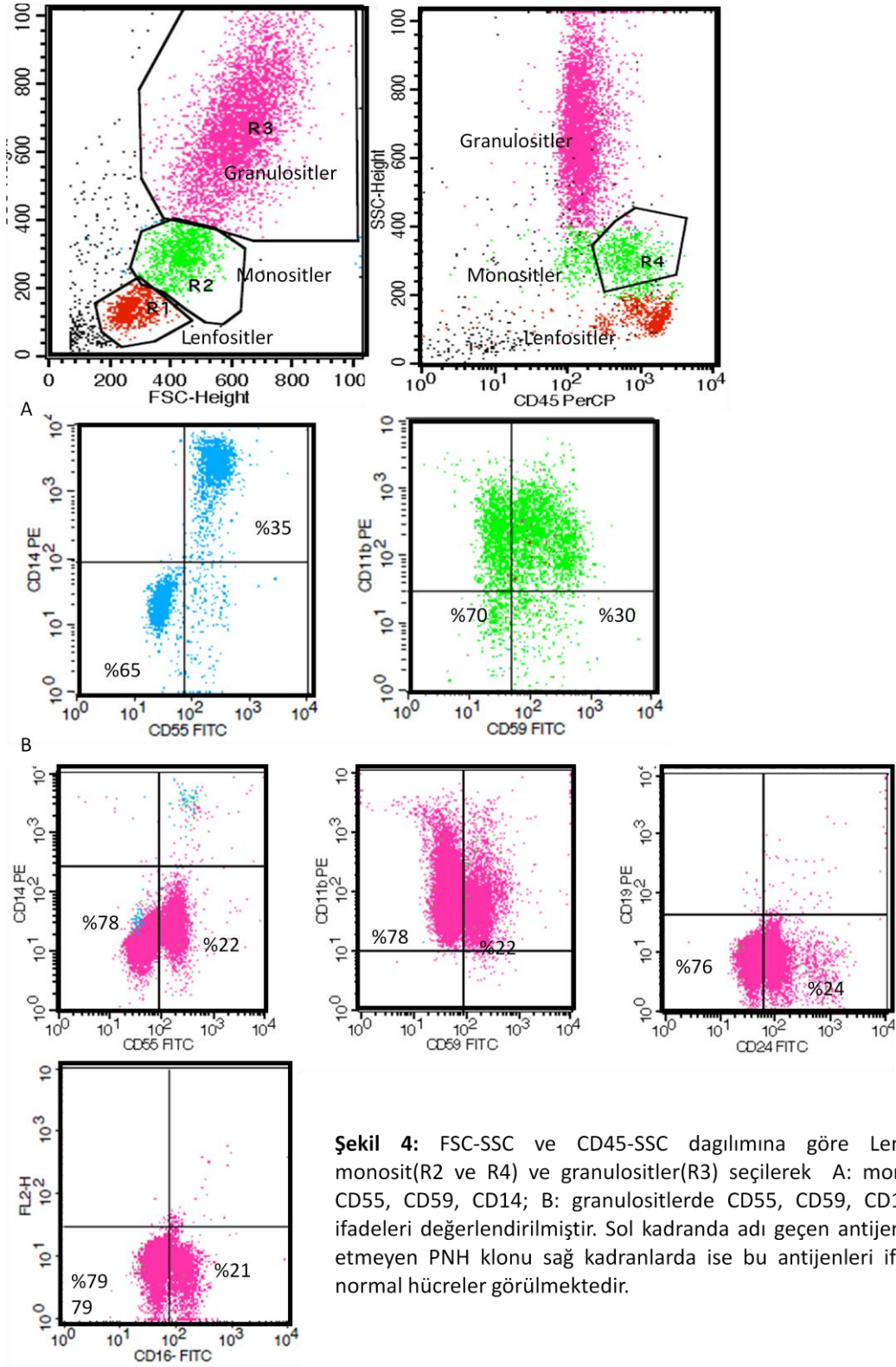
Lökositlerin analizi: CD45- Side Scatter (SSC) dağılımlarına göre lenfosit , monosit ve granülositlerin Forwardscatter(FSC)-SSC grafiklerindeki yerleri belirlenerek her bir hücre grubu işaretlenerek gruplanmıştır. Daha sonra granülositlerde CD55, CD59, CD16, CD24, monositlerde CD14, CD55, CD59, lenfositlerde CD3, CD19, CD55 CD59 ifadeleri değerlendirilerek antijenleri ifade eden ve etmeyen hücrelerin oranları tespit edilmiştir(76). Tanısal değerlendirmede sadece monosit ve granülositlerde yapılan değerlendirmeler kullanılmıştır(Şekil 4).

Eritrositlerin analizi: FSC-SSC dağılımına göre agregre olmuş eritrositler bir grup olarak tanımlanmış ve bu hücre grubundaki hücrelerin CD59 ifadeleri değerlendirilerek TipI(normal), Tip II(CD59 zayıf ifade edilen) ve Tip III (CD59 ifade etmeyen) hücrelerin oranları hesaplanmıştır(77). Bu gruplamanın yapılabilmesi için PNH olmadığı bilinen bir örnekte yapılan çalışma ile normal, PNH tanısı kesinleşmiş

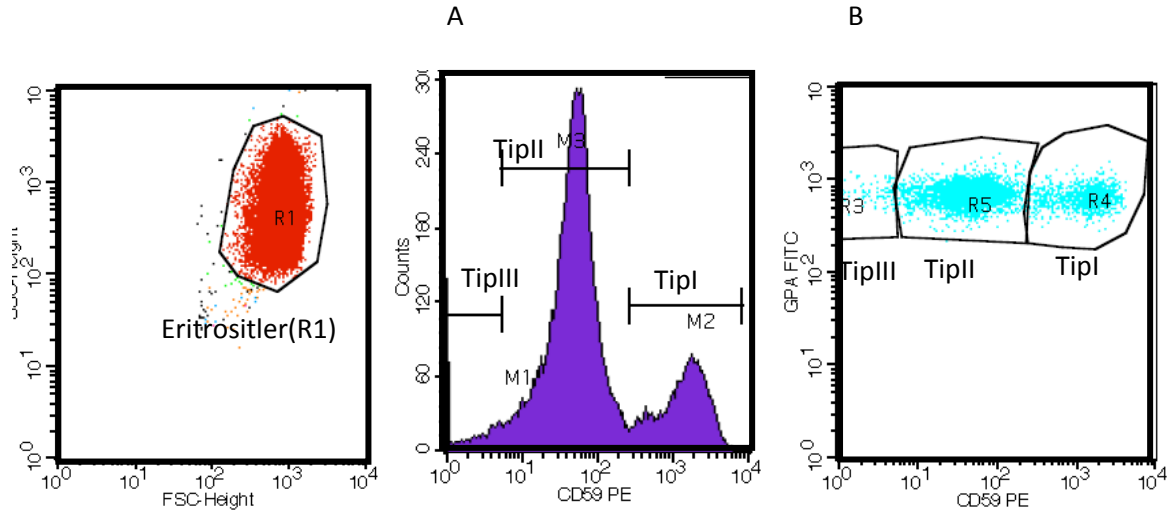
bir hastadaki çalışma ile de Tip III hücreler için tanımlanmış olan sınırlar kılavuz olarak kullanılmıştır(Şekil 5). En az 2 hücre serisinde bir PNH klonunun varlığının gösterilmiş olması PNH tanısını destekleyen bir veri olarak değerlendirilmiş ve eğer mevcutsa her hücre serisi için klonun büyüklüğü raporda ifade edilmiştir.

Tablo 2: Çalışmada kullanılan antikorların listesi

	Antikor		
Fluorokrom	FITC	PE	PerCP
Tüp 1 (WBC)	CD59	CD14	CD45
Tüp 2 (WBC)	CD55	CD11B	CD3
Tüp 3 (WBC)	CD24	CD19	-
Tüp 4 (WBC)	CD16	-	-
Tüp 5 (RBC)	GPA	CD59	-



Şekil 4: FSC-SSC ve CD45-SSC dağılımına göre Lenfosit(R1), monosit(R2 ve R4) ve granulositler(R3) seçilerek A: monositlerde CD55, CD59, CD14; B: granulositlerde CD55, CD59, CD16, CD24, ifadeleri değerlendirilmiştir. Sol kadranda adı geçen antijenleri ifade etmeyen PNH klonu sağ kadrarlarda ise bu antijenleri ifade eden normal hücreler görülmektedir.



Şekil 5: FSC-SSC dağılımına göre seçilen eritrositlerde A: CD59 dağılımı (Soldan sağa doğru Tip III, Tip II ve Tip I hücreler) ve B: gpA-CD59 dağılımı (Soldan sağa doğru Tip III, Tip II ve Tip I hücreler) görülmektedir.

3. SONUÇLAR

Bu çalışmada toplam 39 hasta değerlendirilmiştir. Bütün hastalarda tanı testi olarak akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Hastalar arasında cinsiyet dağılımı benzerdir(K/E=20/19). Ortanca hastalık başlangıç yaşı 31(4-57 yaş) olarak saptanmıştır. Ortanca izlem süresi 26 aydır(5-396 ay). Hastalık alt grupları 24 klasik tip ve 15 Aplastik Anemi(AA) ya da Myelodisplastik Sendrom(MDS) birlikteliğinde olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Başlangıçta AA tanısı alan 2 hastada zaman içinde belirgin hemoliz bulguları gelişmiş ve klasik PNH tablosu gözlenmiştir. Hastalık belirtileri halsizlik(en sık), hemoglobinüri, kolay kanama bulguları, karın ağrısı ve sarılıktır. Granülositler üzerinde saptanan ortanca klon boyutu %70(%0,1-100 arası) olarak belirlenmiştir. Tanıda kan hücre serilerinde saptanan düşüklükler değerlendirildiğinde en sık rastlanan pansitopeni(%53) ve sonrasında sırası ile bisitopeni(çoğunlukla anemi ve trombositopeni şeklinde) ve anemidir. Toplam 8 hastada tromboz gelişmiştir ve bunların tamamı klasik tip PNH hastasıdır. Hastaların demografik özellikleri Tablo 3'de görülmektedir. Hastalarda tromboz gelişimi en sık intraabdominal bölgede ve en sık hepatik venedir(Budd-Chiari S., 4 hastada, %50). Tüm tromboz olguları arasında 2 hastada 3, 2 hastada 2 ve 4 hastada ise 1 bölgede tromboz gelişmiştir(Tablo 4). Yalnız 1 klasik PNH hastasında lösemi gelişimi(%4) saptanmıştır. Bu oran literatürde %1 olarak bildirilmiştir(56). İzlem süresince 8 hasta ölmüştür.

Hastalarda klon boyutu ile hemoliz arasında bire bir ilişki olduğu gösterildi. Hemoliz değerlendirmesinde laktat dehidrogenaz ve retikülosit değerleri(akım sitometri ile eş zamanlı bakılan) göz önünde bulundurulduğunda artan klon boyutu ile bu tetkiklerin paralellik gösterdiği saptandı. Yine bu değerlerin klasik tip PNH hastalarında anlamlı oranda daha yüksek olduğu görüldü. Hemoliz için belirlenen granülosit klon boyutu sınır değeri %18,5 olarak belirlendi(Şekil 6). Ayrıca klinik bulgular arasında hemoglobinüri ve LDH ile klon boyutu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaştığı görüldü(sırasıyla $p=0,031$ ve $p=0,001$).

Hastalığın diğer belirtileri(hemoglobinüri dışında) olan karın ağrısı, sarılık ve halsizlik ile klon boyutu arasında bir ilişki saptanmadı. Kolay kanama bulgularının(dış eti kanaması, vücutta morarmalar gibi) daha küçük klona sahip hastalarda olduğu

gözlenmesine rağmen bu durumun istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı görüldü($p=0,080$).

Hastalarda tromboz komplikasyonu yalnızca klasik tip PNH hastalarında gelişmiştir. Klon boyutu %50 altında olan hiçbir hastada tromboz gelişmediği görüldü(Tablo 5). Tüm tromboz olgularını, klon boyutu AA/MDS PNH olgularından anlamlı oranda daha büyük olan klasik tip PNH hastaları oluşturmaktaydı. İzlemde tromboz komplikasyonu gelişen hastaların akım sitometri ile eş zamanlı bakılan trombosit ve MPV değerleri diğer hastalarla karşılaştırıldığında MPV değerlerinin anlamlı oranda yüksek olduğu($p=0,04$), trombosit değerlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmayacak şekilde düşük($p=0,90$) olduğu görüldü. Yine aynı dönem bakılan retikülosit ve laktat dehidrogenaz değerlerinin de tromboz gelişen hastalarda diğer hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü(sırasıyla $p=0,009$ ve $p=0,003$) (Tablo 6). Tromboz riski yönünden bir değerlendirme yapıldığında LDH ve MPV iki bağımsız değişken olarak ele alındı. Bu değerlendirmede LDH sınır değeri 330U/L ve MPV sınır değeri 10,5FL olarak belirlendi. Bunun sonucunda LDH ve MPV düzeylerinin her ikisinin de belirlenen sınır değerden yüksek olduğu(yani 2 risk değişkeninin birlikte bulunduğu) hastalarda tromboz riski %66,7, yalnız birinin yüksek olduğu hastalarda %21,4 ve bu risk değişkenlerinden hiç birinin bulunmadığı hastalarda %0 olarak saptandı(Tablo 7). Aynı risk .değerlendirmesi, granülosit klon boyutu(sınır olarak alınan değer %50) ve MPV değişkenleri ile yapıldığında da benzer sonuçlar elde edildi(sırasıyla 2 risk değişkeni bulunduran hastalar için %40, 1 risk değişkeni için %31,6 ve hiçbir risk değişkeni olmayanlar için %0) (Tablo 8). Bu sonuçlarla granülosit klon boyutu, LDH ve MPV değişkenlerinin ikili olarak değerlendirildiğinde birbirinden bağımsız olarak PNH hastalarında tromboz riskini arttırdıkları söylenebilir.

Çalışmamızda 16 hastaya(8 klasik PNH, 7 AA/MDS, 1 hasta akut lösemi komplikasyonu sonrası) allojeneik kök hücre nakli yapılmıştır. Yalnız 1 hastaya akraba dışı vericiden kök hücre nakli tedavisi uygulanmış, diğer hastalara ise kardeş vericiden KHN yapılmıştır. Nakil sonrası PNH klonu bakılan 9 hastanın 7'sinde PNH klonunun yok olduğu görülmüş, 1 hastada ise nakil öncesinde %55 olan granülosit klon boyutunun %0,7 düzeyine düştüğü görülmüştür. Bu hastanın kan değerlerinde

düzelme gözlenmiştir. Akraba dışı vericiden kök hücre nakli yapılan hastada ise greft reddi gelişmiştir. Bu hastanın nakil sonrası yapılan akım sitometri tetkiki sonucu PNH klonunun aynı şekilde bulunmakta ve tetkiklerinde hemoliz bulguları sürmektedir. Kök hücre nakli sonrası gelişen komplikasyonlarla 6 hasta, kök hücre nakli hazırlama rejimi alırken aplazik dönemde ise 2 hasta ölmüştür.

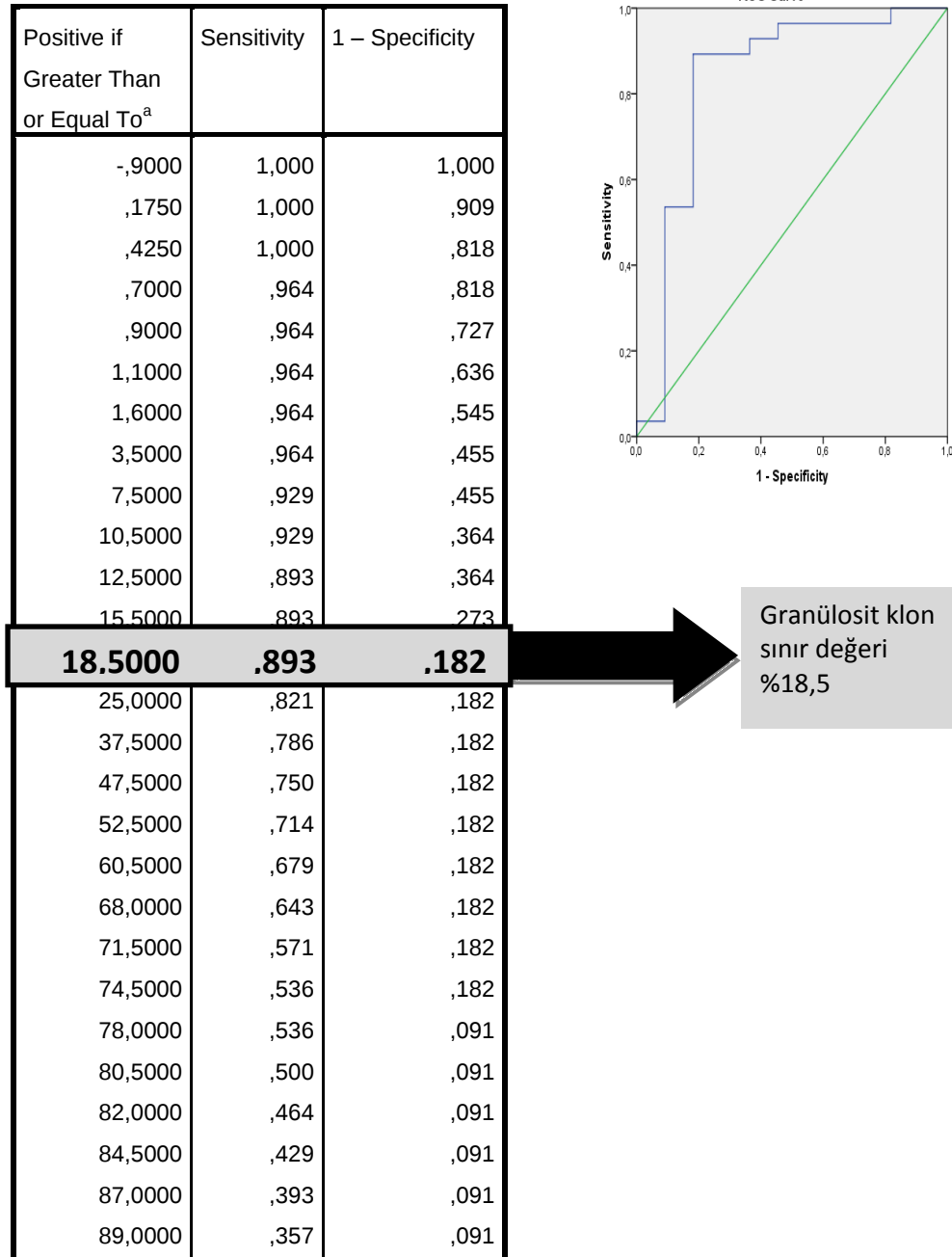
Tablo 3. Hasta özellikleri

Yaş, ortalanca (aralık)	31 (4-57)
Cinsiyet(K/E)	20/19
Alt grup, n (%)	
Klasik tip PNH	24 (61,5)
AA/MDS ile PNH	15 (38,5)
Belirtiler, n (%)	
Karın ağrısı	5 (12,8)
Halsizlik	18 (46,2)
Hemoglobinüri	6 (15,4)
Sarılık	3 (7,7)
Kanama bulguları	6 (15,4)
Sitopeniler, n (%)	
Anemi	5 (12,8)
Bisitopeni	13 (33,3)
Pansitopeni	21 (53,8)
Retikülosit, ortalanca (aralık)	0,1042 (0,0058-0,3304)
Laktat dehidrogenaz, ortalanca (aralık)	832 (122-6434)
Klon boyutu (%), ortalanca(aralık)	
Granülosit (39 hasta)	70 (0,1-100)
Eritrosit (28 hasta)	29 (0-92)
Monosit (26 hasta)	47,5 (0-95)
Lenfosit (3 hasta)	8 (0-22)
Tromboz gelişen hastalar, n(%)	8 (20,5)
Tromboz bölgesi, n	
İntraabdominal venler	
Hepatik ven	4
Portal ven	3
İntestinal venler	3
Splenik ven	1
İntrakranyal venler	1
Pulmoner ven	1
Alt ekstremit venleri	1
İlaç tedavileri, n (%)	
Metil-prednisolon	16 (41)
Danazol	10 (25,6)
İmmünsüpresif tedavi(CsA, ATG)	16 (66,7)
Ekulizumab	9 (23,1)
AKHN, n (%)	
Klasik tip	9 (23)
AA/MDS	7 (18)
Lösemi gelişimi, n (%)	1 (2,6)
Ölüm, n (%)	8 (20,5)

Tablo 4. Tromboz bölgeleri

Tromboz komplikasyonu	Hastalar n (%)
Toplam	8(100)
Tromboz bölgesi	
İntraabdominal venler	
Hepatik ven	4 (50)
Portal ven	3 (37,5)
İntestinal venler	3 (37,5)
Splenik ven	1 (12,5)
İntrakranyal venler	1 (12,5)
Pulmoner ven	1 (12,5)
Alt ekstremitte venleri	1 (12,5)
Tromboz bölge sayısı	
3	2 (25)
2	2 (25)
1	4 (50)

Şekil 6. Granülosit klon boyutu ile hemoliz ilişkisi



ROC eğrisi(Receiver operating characteristic curve). Hemoliz için öngörülen PNH klon değerini belirlemek amacı ile laktat dehidrogenaz >330 mg/dl (1.5 x üst sınır) normalin üstü değer olarak alınmıştır.

1. Eğri altında kalan alan (AUC: Area Under Curve) 0,5'ten istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. ROC eğrisi altında kalan alan 0,831(p=0,001) olarak elde edilmiştir.

2. Granülosit klon boyutu için en iyi kesim noktası 18,5 olarak bulunmuştur.

3. En iyi kesim noktası Youden's indeks kullanılarak elde edilmiştir.

Tablo 5. Granülosit klon boyutu ile tromboz ilişkisi(Pearson Ki-Kare Testi ile)

			Tromboz		Toplam	p
			Yok	Var		
Granülosit klon	<%50	Sayı	16	0	16	0,008
		Oran	%100	%0	%100	
	≥%50	Sayı	15	8	23	
		Oran	%65,2	%34,8	%100	
Toplam		Sayı	31	8	39	
		Oran	%79,5	%20,5	%100	

Tablo 6. Tromboz ilişkili değişkenler

	Yok(n=31)		Var(n=8)		
Faktörler	Ortalama±SS	Ortanca(aralık)	Ortalama±SS	Ortanca(aralık)	p
MPV (FL)	8.64±1.4	8.5(7-11.7)	9.74±1.4	9.5(8.2-11.9)	0,04
Trombosit (x10³/ul)	90000±89000	59000(8000-344000)	81000±79000	45000(19000-209000)	0,90
Retikülosit (x10⁶/ul)	0,11±0,08	0,08(0,006-0,33)	0,20±0,09	0,17(0,07-0,32)	0,009
LDH (U/L)	1140±1454	592(122-6310)	2881±1830	2508(517-6434)	0,003
Granülosit klon boyutu(%)	47,1±39,8	45(0,1-100)	79,9±16,6	84,5(50-97)	0,076

SS: Standart sapma, MPV: Mean Platelet Volume, LDH: Laktat Dehidrogenaz

Tablo 7. Tromboz riski değerlendirmesi(LDH≥330U/L ve MPV≥10,5fL sınır değerler olarak alındı).

			Tromboz		Toplam	p
			Yok	Var		
LDH ve MPV	0	Sayı	8	0	8	0,05
		Oran	%100	%0	%100	
	1	Sayı	22	6	28	
		Oran	%78,6	%21,4	%100	
	2	Sayı	1	2	3	
		Oran	%33,3	%66,7	%100	
Toplam		Sayı	31	8	39	
		Oran	%79,5	%20,5	%100	

Tablo 8. Tromboz riski değerlendirmesi(Granülosit klon boyutu $\geq$ %50 ve MPV $\geq$ 10,5FL sınır değerler olarak alındı).

			Tromboz		Toplam	p
			Yok	Var		
Klon boyutu ve MPV	0	Sayı	15	0	15	0,04
		Oran	%100	%0	%100	
	1	Sayı	13	6	19	
		Oran	%68,4	%31,6	%100	
	2	Sayı	3	2	5	
		Oran	%60	%40	%100	
Toplam		Sayı	31	8	39	
		Oran	%79,5	%20,5	%100	

Tablo 9. Klon boyutu ile klinik ve laboratuvar ilişkili değişkenlerin karşılaştırması

Granülosit klon boyutu(%)				
Semptomlar	Hasta sayısı(%)	Ortalama±SS	Ortanca(Aralık)	p
Karın ağrısı				
(+)	5(12,8)	62,4±18,5	70(30-76)	0,933
(-)	34(87,2)	52,6±40,7	64(0,1-100)	
Halsizlik				
(+)	18(46,2)	59,3±38	76,5(0,1-100)	0,390
(-)	21(53,8)	49,1±39,2	66(0,25-97)	
Hemoglobinüri				
(+)	6(15,4)	89±4,2	89(83-94)	0,031
(-)	33(84,6)	47,4±38,5	50(0,1-100)	
Sarılık				
(+)	3(7,7)	79,3±21,8	86(55-97)	0,268
(-)	36(92,3)	51,7±39	68(0,1-100)	
Kolay kanama				
(+)	6(15,4)	24,4±32,4	18,5(0,6-88)	0,080
(-)	33(84,6)	59,2±37,5	73(0,1-100)	
Hemoliz tetkikleri				
LDH				
(>330)	28(71,8)	67,13±31,8	80,5(0,6-100)	0,001
(≤330)	11(28,2)	20,3±33	2(0,1-98)	
Retikülosit				
(>0,16)	9(23)	81,3±19	92(50-97)	0,020
(≤0,16)	30(77)	45,6±39,2	37,5(0,1-100)	
Tromboz				
(+)	8(20,5)	79,9±16,6	84,5(50-97)	0,076
(-)	31(79,5)	47,1±39,8	45(0,1-100)	
Alt gruplar				
Klasik tip	24(61,5)	74,5±27,3	84,5(5-100)	0,000
AA/MDS	15(38,5)	20,9±30,1	10(0,1-98)	

SS: Standart Sapma, LDH: Laktat dehidrogenaz, AA/MDS: Aplastik Anemi/Myelodisplastik Sendrom

4. TARTIŞMA

Paroksizmal Nokturnal Hemoglobinüri(PNH) az rastlanan bir hematopoetik klonal kök hücre hastalığıdır. Hastalığın tanı ve izleminde akım sitometri önemli yer tutmaktadır(78). Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tanı alan 39 hasta geriye dönük olarak değerlendirilmiştir. Hastaların tümünde tanı akım sitometri ile doğrulanmıştır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, az görülen PNH hastalığı tanısı ve izleminde hastaların diğer kliniklerden yönlendirildiği bir merkezdir. Tanıda kullanılan akım sitometri yöntemi hematoloji laboratuvarında uzun yıllardır uygulanmaktadır. Akım sitometri yönteminde yaklaşık olarak son bir yıldır diğer antikorlara ek olarak FLAER de kullanılmaktadır. FLAER uygulanan toplam 9 akım sitometri tetkik sonucu bulunmaktadır. Bu tetkiklerde FLAER yanında CD14, CD24, CD59 gibi antikorlar da kullanılmış ve bu antikorlarla elde edilen verilerin FLAER sonuçları ile aynı olduğu görülmüştür. PNH tanısı ilk olarak Ham's testi ya da şeker-su testi ile saptanan hastalarda da akım sitometri tetkiki yapılarak en az 2 seride PNH klonu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı hasta grubumuzda akım sitometri yöntemi ile elde edilen verilerin hastalığın klinik seyri ile ilişkisini değerlendirmektir. Bir başka deyişle çalışmamızda PNH klon boyutunun hastalık ile ilgili laboratuvar testleri ve klinik bulgulara etkisini göstermek hedeflenmektedir. PNH klon boyutu ile hastalığın diğer özellikleri karşılaştırılırken granülositer seri üzerinde saptanan klon değerlendirmeye alınmıştır. Granülosit klon boyutunun klinik olarak daha anlamlı bilgi verdiği bilinmektedir(11). PNH hastalığı sürecinde granülositlerin yaşam döngüsü normal seyrinde ilerlemektedir(79). Çevre kanındaki yaşam süresi granülositlerden(yaklaşık 6 saat) daha uzun olan eritrositlerin(yaklaşık 120 gün) hemoliz nedeniyle yıkıma uğramaları ve transfüzyon desteği gibi nedenlerle bu hücre serisi üzerindeki klon boyutu daha küçük saptanabilmektedir. PNH hastalığında eritrositlerin yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir(80).

Hastalar iki alt grup halindedir. Birinci grup ağırlıklı olarak hemolitik anemi bulguları ve tromboz ile kendini gösteren, kemik iliği biyopsisinde normal ya da artmış selülarite ve eritroid seride artış gibi bulguların saptandığı klasik tip paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, diğeri ise kemik iliği yetmezliği bulguları ön planda olan,

kemik iliği biyopsisinde düşük selülarite ya da displazik özellikler saptanan ve kıyasla daha küçük klonu sahip aplastik anemi ya da myelodisplastik sendrom birlikteliğinde paroksizmal nokturnal hemoglobinüridir(AA/MDS PNH). AA hastalarının %50'den fazlasında PNH klonu olduğu biliniyor(81-84). Myelodisplastik Sendrom tanılı hastalarda PNH klonunun yalnızca Refrakter Sitopeni(RS) alttipinde saptanıp diğer alttiplerde(blast artışlı MDS, halkalı sideroblastlı MDS) olmadığını bildiren kaynaklarda(83, 85) bu oran %17-20 olarak bildirilmekle birlikte, Galili ve ark. tarafından 4500 MDS hastası ile yapılan değerlendirmede bu oran daha yüksek(%55) saptanmış ve tüm MDS alttiplerinde PNH klonu olduğu görülmüştür(80). Bizim hastalarımızda tanı anında kemik iliği incelemesinde displazi bulguları saptanan toplam 3 hastanın birinde kemik iliğinde %5 blast saptanırken(MDS RAEB I) diğerleri refrakter sitopeni şeklindedir. Aplastik anemi(AA) hastalarının %10'dan fazlasında zaman içinde klinik olarak belirgin PNH tablosu gelişmektedir(86). Bu çalışmamızda 2 hastanın tanısı AA PNH iken izlemde klasik PNH bulguları(laktat dehidrogenaz ve retikülosit düzeylerinde artışla ortaya çıkan belirgin hemoliz) geliştiği görülmüştür.

Çalışmamızda hemoliz değerlendirmesinde göz önüne alınan değişkenler serum laktat dehidrogenaz(LDH) ve retikülosit değerleridir. LDH ve retikülosit düzeylerine akım sitometri ile eş zamanlı bakıldı. Artan klon boyutu ile ayrı ayrı bu değerler arasında doğrudan ilişki olduğu çalışmamızda gözlemlendi(LDH>1,5 x üst sınır için $p=0,001$; retikülosit>0,16 için $p=0,02$). Ayrıca LDH göz önüne alındığında hemoliz riski için sınır klon boyutu(granülositlerde) %18,5 olarak belirlendi. Jeffrey J. Pu ve ark. 27 hasta ile yaptıkları bir çalışmada LDH değerlerinin artan klon boyutu ile arttığını gösteriyorlar. Bu çalışmada granülosit klon boyu sınır değeri %23 olarak saptanıyor(81). Bu sonuç bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin literatür verileri ile paralel olduğunu göstermektedir. Yine bir intravasküler hemoliz bulgusu olan hemoglobinürinin artan klon boyutu ile paralellik gösterdiği değerlendirmemizde göze çarpmaktadır($p=0,031$). Daha önceden yapılan çalışmalarda da bu yönde sonuçlar elde edildiği bilinmektedir(24, 53). Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da literatür verileri ile uyumludur. Bizim çalışmamızda alt gruplar(klasik tip ve AA/MDS birlikteliğinde) arasında LDH ve retikülosit değerleri anlamlı derecede farklı bulundu(her ikisi için de $p=0,000$). Ayrıca yine her iki alt grubun klon boyutu yönünden birbirinden farklı

olduğu, klasik tipte AA/MDS eşliğinde PNH hastalarına göre klon boyutunun daha büyük olduğu görüldü($p=0,000$).

Hemoglobinüri dışında kalan bulguların(karın ağrısı, sarılık, halsizlik, kolay kanama bulguları) klon boyutu ile ilişkili olmadığı görüldü. Victor M. Moyo ve ark. tarafından yapılan ve halsizlik ile klon boyutu arasında bir ilişki saptamayan ama karın ağrısının klon boyutu daha büyük olan hastalarda daha sık rastlandığını gösteren çalışma ile bu anlamda uyumlu değildir. Aynı çalışmada değerlendirilen özofagus spazmı ve impotans bulguları da klon boyutu ile doğru orantılı bulunmuştur(24). Bizim hasta grubumuzda bu yönde yakınmaları olan hastalar yoktur. Bununla birlikte değerlendirmemizde kolay kanama bulgularının(vücutta ekimozlar, diş eti kanaması, burun kanaması, menoraji) olduğu hastaların, istatistiksel olarak anlamlı değere ulaşmasa da($p=0,080$), diğer hastalara göre daha küçük klona sahip oldukları belirlendi(ortanca %18,5 ve %73). Bu durum küçük boyutta klonu olan AA/MDS PNH hastalarının daha derin trombositopeni ile seyretmeleri ile ilişkili olabilir. Ayrıca belirtmemiz gerekir ki klinik bulguların literatür ile karşılaştırmasını yaparken bizim çalışmamızda hasta sayısının azlığını göz önünde bulundurmamız gerekmektedir.

PNH hastalarında tromboz komplikasyonu sıklığı %29 ile %44 arası değişen oranlarda bildirilmiştir.(24, 26, 27, 87). Bir başka geriye dönük değerlendirmede ise P. de Latour ve ark. 460 hastalık serilerinde 116 hastada(%25,5) tromboz komplikasyonu geliştiğini göstermişlerdir. Yine aynı seride 10 yıllık toplam tromboz gelişme riski klasik tip PNH hastalarında %37, AA/MDS PNH grubunda ise %30 olarak bildirilmiştir(28). Çalışmamızda 39 hasta içinde bu oranın %20,5 olduğu görüldü. Literatüre bakıldığında bu çalışmalarda hastaların büyük bölümünde tanı Ham's Testi ve Sükroz Testi gibi küçük PNH klonlarına duyarlı olmayan yöntemlerle saptanmıştır(26-28). Ayrıca bir diğer çalışmada ise yalnızca klasik tip PNH hastaları değerlendirilmiştir(87). Klasik tip PNH hastalarında klon boyutunun daha büyük olduğu bilinmektedir(28, 11, 88) ve bizim çalışmamızda da bu doğrulanmıştır. Tromboz riskinin klon boyutu ile ilişkili olduğu daha önceden bildirilmiştir(24, 25, 28, 53). Sonuç olarak, bu çalışmada değerlendirdiğimiz hasta grubunda tromboz oranının daha düşük olması daha önceki çalışmalarda büyük klona sahip PNH tanılı hastaların sayısının yüksek olması ile açıklanabilir. Ayrıca tromboz riskinin etnik gruplarda

farklılık gösterdiği yönünde veriler de bulunmaktadır(53, 87). Moyo ve ark. ise toplam 49 hastanın(24 klasik tip ve 25 AA/MDS eşliğinde) 44'ünde tanıyı akım sitometri ile belirledikleri çalışmada 14 hastada(%29) tromboz geliştiğini göstermişlerdir(24). Çalışmamızda tromboz komplikasyonu gelişen hastaların granülosit klon boyutunun daha büyük olduğu görülmeye rağmen bunun istatistiksel olarak anlamlı sayılan değeri bulmadığı görüldü(ortanca klon boyutu %84,5 ve %45, $p=0.076$). Öngörülen istatistiksel sınır değere($p<0,05$) ulaşılmasının hasta sayısının az olması ile ilişkili olduğu düşünülebilir. Bunun yanı sıra granülosit klon boyutu <50 olan hastaların hiç birinde tromboz gelişmediği görüldü. Granülosit klon boyutu ≥ 50 olan hastalarla diğerleri karşılaştırıldığında bu grupta tromboz oranının anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi($p=0,008$). Hastalık alt grupları göz önüne alındığında tüm tromboz olaylarının yalnız klasik tip PNH hastalarında geliştiği görüldü. Alt grupların klon boyutları karşılaştırıldığında klasik tip PNH hastalarında daha büyük olacak şekilde anlamlı fark saptandı($p=0,000$). Tüm bu veriler trombozun granülosit klon boyutu ile ilişkili ve artan klon boyutu ile bu komplikasyonun gelişme riskinin artmakta olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca hastaların tanıdaki akım sitometri tetkikinin yapıldığı dönem bakılan MPV ve trombosit değerleri karşılaştırıldı. İzlem süresince tromboz komplikasyonu görülen hastaların MPV değerlerinin diğerlerinden yüksek olduğu($p=0,04$), trombosit değerlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan derecede düşük($p=0,90$) olduğu görüldü. Akım sitometri tetkiki ile eş zamanlı bakılan bu değerlerin(MPV ve trombosit düzeyi) tromboz dönemi değişmediği gözlemlendi. Yine tromboz gelişen hastaların MPV ile eş zamanlı retikülosit ve LDH düzeylerinin her ikisinin de diğer hastalardan daha yüksek olduğu belirlendi(p değerleri sırasıyla 0,009 ve 0,003). Bu hastalarda saptanan yüksek MPV değerlerinin gelişen hemolize bağlı olarak kemik iliğinde üretilen genç trombositler nedeni ile olduğu düşünülebilir. Tüm bu sonuçlar ışığında tromboz komplikasyonunun, daha şiddetli hemoliz olan olgularda geliştiği sonucu çıkarılabilir. PNH hastalarında saptanan trombozun altında yatan nedenin hemoliz olduğu konusunda görüşler bulunmaktadır (29, 30, 89, 90). Bununla birlikte literatüre bakıldığında PNH hastalarında MPV düzeylerini değerlendiren bir çalışma yoktur. Fakat yüksek MPV düzeylerinin trombosit işlevi ve artmış trombosit reaktivitesi(daha kısa kanama zamanı, artmış trombosit agregasyonu) ile ilişkili olduğu bilinmektedir(91, 92). Ayrıca daha yüksek MPV değerlerinin artmış tromboz riski ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar

bulunmaktadır(93-95). Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmamızda tromboz komplikasyonu gelişen hastalarda saptanan yüksek MPV düzeylerinin kemik iliğinde yeni üretilen genç trombositlerin oranındaki artışı gösterdiği söylenebilir. Bu genç trombositlerin prokoagulan olarak daha aktif olduğu ve tromboza yatkınlık yarattığı sonucuna varılabilir.

Tromboz riski yönünden bir değerlendirme yapıldığında bağımsız değişkenler olarak LDH ile MPV ve granülosit klon boyutu ile MPV ikili olarak ele alındı. Bu değerlendirmelerde LDH sınır değeri 330U/L, MPV sınır değeri 10,5fL ve granülosit klon boyutu sınır değeri %50 olarak belirlendi. Bunun sonucunda LDH ve MPV düzeyleri doğrultusunda 2 risk değişkeninin birlikte bulunduğu hastalarda tromboz riskinin yalnız birinin yüksek olduğu hastalara ve bu risk değişkenlerinden hiç birinin bulunmadığı hastalara oranla daha yüksek olduğu görüldü(Tablo 7). Aynı risk .değerlendirmesi, granülosit klon boyutu ve MPV değişkenleri ile yapıldığında da benzer sonuçlar elde edildi(Tablo 8). Bu sonuçlarla granülosit klon boyutu, LDH ve MPV değişkenlerinin ikili olarak değerlendirildiğinde birbirinden bağımsız olarak PNH hastalarında tromboz riskini arttırdıkları sonucuna varıldı.

Tromboz komplikasyonu gelişen hastalar içerisinde en sık Budd-Chiari Sendromu'nun görüldüğü ve bu bölgede tromboz gelişen hasta sayısının 4(%50) olduğu belirlendi. Bunun dışında diğer intraabdominal venler(portal ven, intestinal venler, splenik ven), intrakranyal venler, pulmoner ven, alt ekstremitte venlerinde tromboz gelişmiştir. Ziakas ve ark. tarafından 339 PNH tanılı tromboz olgusu değerlendirildiğinde %40,7 ile Budd-Chiari Sendromu ilk sırada yer almıştır(52). Warfarin profilaksisinin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarında Hall C ve ark. izlem sürecinde tromboz gelişen 29 hasta içinde 10 hastada(%33) tromboz bölgesinin hepatik ven olduğunu saptamışlardır(25). Tromboz gelişen PNH hastalarında Budd-Chiari Sendromu sıklığı diğer kaynaklarda da %41-44 arası değişen oranlarda bildirilmiştir(28, 30). Budd-Chiari Sendromu tanılı hastalar arasında altta yatan neden olarak PNH hastalığı %5-12 arası değişen oranlarda bulunmaktadır(96-99). Beraberinde hemoliz olmadan Budd-Chiari Sendromu ya da diğer bölgelerde tromboz gelişen PNH olguları bildirilmiştir(100, 101). Karşıt görüşler bulunmakla birlikte(12) tüm Budd-Chiari Sendromu olgularında PNH tetkiki yapılması

gerekliliği görüşü de öne sürülmektedir(99). Hastaların yarısında trombozun birden fazla bölgede(2 hastada 3, 2 hastada 2 ve 4 hastada 1 bölgede) geliştiği görüldü.

PNH tedavisinde allojeneik kök hücre nakli(AKHN) tek küratif tedavi seçeneğidir(71-74). Çalışmamızda toplam 16 hastaya AKHN uygulanmıştır. Bu hastalar arasında klasik PNH tanılı hasta sayısı 8, AA/MDS PNH 7'dir. Bir hastaya ise klasik PNH tanısı ile izlenirken akut myeloid lösemi gelişmesi sonucu AKHN tedavisi uygulanmıştır. AKHN 15 hastaya HLA tam uyumlu kardeş vericiden, 1 hastaya ise akraba dışı vericiden yapılmıştır. AKHN sonrası 9 hastada PNH klonuna bakılmıştır. Bu hastalar arasında 1 hastada(akraba dışı vericiden KHN) PNH klonunun aynı şekilde bulunduğu, 1 hastada ise granülositlerdeki klonun %0,7 değerine düştüğü görüldü. Bu hastanın kan sayımı ve hemoliz tetkiklerinin düzeldiği saptandı. Diğer hastalarda KHN sonrası yapılan akım sitometri tetkikinde PNH klonu yoktu. İzlem süresince gerçekleşen ölümler 5 hastada nakil ilişki komplikasyonlar(1 sinüzoidal obstrüksiyon sendromu, 2 sepsis, 2 graft versus host hastalığı), 1 hastada ise lösemi nedeni ile yapılan AKHN sonrası nüks gelişmesi ve bunun ardından aldığı kemoterapi sürecinde gelişen enfeksiyon nedeniyle. Diğer 2 hasta ise AKHN için hastaneye yattıktan sonra hazırlama rejimi aldıkları sırada(1 karaciğer yetmezliği ve 1 enfeksiyon) ölmüşlerdir. Sinüzoidal obstrüksiyon sendromu ve karaciğer yetmezliği nedeni ile ölen 2 hastada nakil öncesi izlem sürecinde tromboz(her ikisinde de Budd-Chiari S.) saptanmıştır.AKHN küratif bir tedavi seçeneği olmasına rağmen yüksek mortalite riski taşıyan bir tedavi seçeneğidir. Bu tedavide tromboz öyküsü ve GVHH önemli mortalite nedenleridir(71, 75). Hasta sayısı az olmakla birlikte bizim hasta grubumuzda da bu verileri doğrulayan sonuçlar elde edildi.

Sonuç olarak bu çalışmada hemoglobinüri ve LDH düzeyleri ile klon boyutu arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı değerlere ulaştığı görüldü(sırasıyla $p=0,031$ ve $p=0,001$). Diğer klinik bulgular ile klon boyutu arasında bir ilişki saptanmadı. Tromboz komplikasyonu yalnızca klasik tip PNH hastalarında gelişmiştir. Klon boyutu %50'nin altında olan hiçbir hastada tromboz gelişmediği görüldü. Tromboz komplikasyonu gelişen hastalarda MPV değerleri gelişmeyenlere göre anlamlı oranda yüksek bulundu($p=0,04$). Ayrıca AKHN sonrası PNH klonu bakılan 9 hastanın 7'sinde PNH klonunun yok olduğu görüldü.

KAYNAKLAR

1. Parker CJ. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. In: Williams Hematology. 8th ed. Kaushansky K, ed. California, CA: McGraw-Hill; 2010: 521-31.
2. Parker CJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an historical overview. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2008: 93-103.
3. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; a classic description by Paul Strübling in 1882, and a bibliography of the disease. Blood. 1951; 6(3):270-84.
4. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Blood. 1953;8:769-812.
5. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. J Immunol. 2006 1; 176(3):1305-10.
6. Parker CJ, Hemolysis in PNH, in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and the Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins, edited by NS Young, J Moss, s 49. Academic Press, San Diego, 2000.
7. Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen KF. Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. J Immunol. 1982; 129(1):184-9.
8. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, and Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80(16): 5066–5070.
9. Pangburn MK, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80(17):5430-4.

10. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest.* 1989; 84(1):7-17.
11. Parker C, Omine M, Richards S, et al. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 2005;106:3699-3709.
12. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe 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(4):211-30.
13. Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A study of the mechanism of hemolysis to acid-base equilibrium. *N Engl J Med.* 1937;217:915-917.
14. Ham TH. Studies on destruction of red blood cells. I. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an investigation of the mechanism of hemolysis with observations of five cases. *Arch Intern Med.* 1939;64:1271-1305.
15. Ham TH, Dingle JH. Studies on the destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest.* 1939;18:657-672.
16. Hartmann RC, Jenkins DE. The "sugar-water" test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med.* 1966;275:155-157.
17. van der Schoot CE, Huizinga TW, van't Veer-Korthof ET, Wijmans R, Pinkster J, von dem Borne AE. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood.* 1990; 76(9):1853-9.

18. Rotoli B, Nafa D, Risitano AM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: Principles of Molecular Medicine, 2nd edition. Runge MD and Patterson C, ed. Philadelphia, Humana Press.; 2006: 838–47.
19. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996; 87(12): 5332-40.
20. Rosti V. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2000; 85(1): 82-7
21. Miyata T, Yamada N, Iida Y, et al. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1994; 330: 249-55.
22. Bessler M, Mason PJ, Hillmen P, Luzzatto L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Lancet* 1994; 343:951-3.
23. Araten DJ, Luzzatto L. The mutation rate in PIG-A is normal in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2006; 108(2): 734-6
24. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol*. 2004; 126:133–138.
25. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood*. 2003; 102: 3587-3591.
26. Hillmen P., Lewis S.M., Bessler M., Luzzatto L., Dacie J.V. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *New Engl J Med*. 1995; 333: 1253-1258
27. Socie´ G, Mary JY, de Gramont A, et al. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors: French Society of Haematology. *Lancet*. 1996; 348: 573-577.

28. Peffault de Latour R, Mary JY, Salanoubat C, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 2008; 112: 3099-3106.
29. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma haemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA*. 2005; 293: 1653-1662.
30. Van Bijnen ST, Van Heerde WL, Muus P. Mechanisms and clinical implications of thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Thromb Haemost* 2012; 10: 1.
31. Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* 2008; 100: 878–85.
32. Simak J, Holada K, Risitano AM, Zivny JH, Young NS, Vostal JG. Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2004; 125: 804–13.
33. Grunewald M, Siegemund A, Grunewald A, Schmid A, Koksche M, Schopflin C, Schauer S, Griesshammer M. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14: 685–95.
34. Helley D, de Latour RP, Porcher R, Rodrigues CA, Galy-Fauroux I, Matheron J, Duval A, Schved JF, Fischer AM, Socie G. Evaluation of hemostasis and endothelial function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010; 95: 574–81.
35. Murasawa S, Asahara T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 36–42.
36. la Porta MG, Malcovati L, Rigolin GM, Rosti V, Bonetti E, Travaglini E, Boveri E, Galli A, Boggi S, Ciccone M, Pramparo T, Mazzini G, Invernizzi R, Lazzarino M, Cazzola M. Immunophenotypic, cytogenetic and functional

characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008; 22: 530-37.

37. Mueller RJ, Stussi G, Puga YG, Nikolic M, Soldini D, Halter J, Meyer-Monard S, Gratwohl A, Passweg JR, Odermatt B, Schanz U, Biedermann BC, Seebach JD. Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2011; 96: 119–27.
38. Gao Z, McAlister VC, Williams GM. Repopulation of liver endothelium by bone-marrow-derived cells. *Lancet* 2001; 357: 932–3.
39. Zhang J, Piro O, Lu L, Broze GJ Jr. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003; 108: 623–7.
40. Maroney SA, Cunningham AC, Ferrel J, Hu R, Haberichter S, Mansbach CM, Brodsky RA, Dietzen DJ, Mast AE. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1114–24.
41. von Vietinghoff S, Tunnemann G, Eulenberg C, Wellner M, Cristina CM, Luft FC, Kettritz R. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007; 109: 4487–93.
42. Jankowska AM, Szpurka H, Calabro M, Mohan S, Schade AE, Clemente M, Silverstein RL, Maciejewski JP. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: a factor contributing to thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2011; 96:954–962.
43. Maciejewski JP, Young NS, Yu M, Anderson SM, Sloand EM. Analysis of the expression of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins on platelets from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Thromb Res* 1996; 83: 433–47.
44. Vu T, Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Sigaux F, Carosella ED, Menier C, Scrobohaci ML, Socie G. Aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: a study of the GPI-anchored proteins on human platelets.

Br J Haematol 1996; 93: 586–9.

45. Devine DV, Siegel RS, Rosse WF. Interactions of the platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with complement. Relationship to defects in the regulation of complement and to platelet survival in vivo. *J Clin Invest* 1987; 79: 131–7.
46. Louwes H, Vellenga E, de Wolf JT. Abnormal platelet adhesion on abdominal vessels in asymptomatic patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 2001; 80: 573–6.
47. Sims PJ, Wiedmer T. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995; 6: 275–82.
48. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1993; 82: 1192–6.
49. Ploug M, Plesner T, Ronne E, Ellis V, Hoyer-Hansen G, Hansen NE, Dano K. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992; 79: 1447–55.
50. Sloan EM, Pfannes L, Scheinberg P, More K, Wu CO, Horne M, Young NS. Increased soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) is associated with thrombosis and inhibition of plasmin generation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) patients. *Exp Hematol* 2008; 36: 1616–24.
51. Gralnick HR, Vail M, McKeown LP, Merryman P, Wilson O, Chu I, Kimball J. Activated platelets in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995; 91: 697–702.
52. Ziakas PD, Poulou LS, Rokas GI, Bartzoudis D, Voulgarelis M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome: an overview.

J Thromb Haemost. 2007; 5: 642-645.

53. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)*. 2004; 83: 193-207.
54. Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socié G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2007; 110(12): 4123-8.
55. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, Mitchell LD, Cohen DR, Gregory WM, Hillmen P. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 2011; 117(25): 6786-92.
56. Harris JW, Kosciak R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma*. 1999; 32(5-6): 401-26.
57. Katahira J, Aoyama M, Oshimi K, Mizoguchi H, Okada M. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating in TdT-positive acute leukemia. *Am J Hematol*. 1983; 14(1): 79-87.
58. Cowall DE, Pasquale DN, Dekker P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating as erythroleukemia. *Cancer*. 1979; 43(5): 1914-6.
59. Kawano F, Chosa M, Matsuoka M, Oyamada N, Takatsuki K. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: termination in acute monocytic leukemia and reappearance after chemotherapy with N4-palmitoyl-1-beta-D-arabinofuranosylcytosine (PL-AC) and vincristine. *Jpn J Clin Oncol*. 1987; 17(2): 123-8.

60. Kaufmann RW, Schechter GP, McFarland W. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria terminating in acute granulocytic leukemia. *Blood*. 1969; 33(2): 287-91.
61. 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(4): 525-7.
62. Issaragrisil S, Piankijagum A, Tang-naitrisorana Y. Corticosteroids therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol*. 1987; 25(1): 77-83.
63. Zhao M, Shao Z, Li K, Chen G, Liu H, Zhang Y, He H, Shi J, He G, Chu Y, Yang T. Clinical analysis of 78 cases of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria diagnosed in the past ten years. *Chin Med J (Engl)*. 2002; 115(3):398-401.
64. 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.
65. Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1982; 60: 20-23.
66. Hartmann RC, Jenkins DE Jr, McKee LC, Heyssel RM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: clinical and laboratory studies relating to iron metabolism and therapy with androgen and iron. *Medicine (Baltimore)*. 1966; 45: 331-363.
67. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Röth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP, Luzzatto L. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2006; 355(12): 1233-43.

68. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, de Castro C, Fu CL, Maciejewski JP, Bessler M, Kroon HA, Rother RP, Hillmen P. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2008; 111(4): 1840-7.
69. Hillmen P, Risitano A, Schrezenmeier H, Schubert J, Maciejewski J, Dührsen U, Muus P, Szer J, de Castro C, Socié G, Brodsky A. Long-term outcomes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) with sustained eculizumab treatment [abstract]. *Haematologica* 2011, 96(Suppl 2): 105.
70. Socié G, Muus P, Schrezenmeier H, Hochsmann B, Maciejewski JP, Weitz IC, Hill A, Bessler M, Risitano AM. Terminal complement inhibitor eculizumab improves complement-mediated platelet consumption and thrombocytopenia in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria(PNH) [abstract]. *Blood* 2009; 114: 4030
71. Peffault de Latour R, Schrezenmeier H, Bacigalupo A, Blaise D, de Souza CA, Vigouroux S, Willemze R, Terriou L, Tichelli A, Mohty M, de Guibert S, Marsh J, Passweg J, Mary JY, Socie G. Allogeneic stem cell transplantation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2012 Jun 11.
72. Takahashi Y, McCoy JP, Jr., Carvallo C, Rivera C, Igarashi T, Srinivasan R, et al. In vitro and in vivo evidence of PNH cell sensitivity to immune attack after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2004; 103(4): 1383-90.
73. Santarone S, Bacigalupo A, Risitano AM, Tagliaferri E, Di Bartolomeo E, Iori AP, Rambaldi A, Angelucci E, Spagnoli A, Papineschi F, Tamiazzo S, Di Nicola M, Di Bartolomeo P. Hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: long-term results of a retrospective study on behalf of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). *Haematologica*. 2010; 95(6): 983-8.

74. Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Benvenuto F, Figari O, Mordini N, Berisso G, Bregante S, Frassoni F, Bacigalupo A. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*. 2000; 85(1): 59-62.
75. Matos-Fernandez NA, Abou Mourad YR, Caceres W, Kharfan-Dabaja MA. Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009; 15(6): 656-61.
76. Richards SJ, Whitby L, Cullen MJ, Dickinson AJ, Granger V, Reilly JT, Hillmen P, Barnett D. Development and evaluation of a stabilized whole-blood preparation as a process control material for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2009; 76(1): 47-55.
77. Sutherland DR, Kuek N, Azcona-Olivera J, Anderson T, Acton E, Barth D, Keeney M. Use of a FLAER-based WBC assay in the primary screening of PNH clones. *Am J Clin Pathol*. 2009; 132(4): 564-72.
78. Hall SE, Rosse WF. The use of monoclonal antibodies and flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1996 15; 87(12): 5332-40.
79. Brubaker LH, Essig LJ, Mengel CE. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1977; 50(4): 657-62.
80. Rosse WF. The life-span of complement-sensitive and -insensitive red cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 1971; 37(5): 556-62.
81. Pu JJ, Mukhina G, Wang H, Savage WJ, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients presenting as aplastic anemia. *Eur J Haematol*. 2011; 87(1): 37-45.
82. Schrezenmeier H, Hertenstein B, Wagner B, Raghavachar A, Heimpel H. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal

hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp Hematol.* 1995; 23(1): 81-7.

83. Nakao S, Sugimori C, Yamazaki H. Clinical significance of a small population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in the management of bone marrow failure. *Int J Hematol.* 2006; 84(2): 118-22.
84. Galili N, Ravandi F, Palermo G, Bubis J, Illingworth A, Castro-Malaspina H, Raza A. Prevalence of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells in patients with myelodysplastic syndromes(MDS), aplastic anemia(AA), or other bone marrow failure(BMF) syndromes: Interim results from the EXPLORE trial. *J Clin Oncol(Meeting Abstracts)* May 2009 vol. 27 no. 15S 7082
85. Wang H, Chuhjo T, 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(12): 3897-902.
86. KinoshitaT, Inoue N. Relationship between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol.* 2002; 75: 117-22.
87. Araten DJ, Thaler HT, Luzzatto L. High incidence of thrombosis in African-American and Latin-American patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Thromb Haemost.* 2005; 93: 88-91.
88. Maciejewski JP, Rivera C, Kook H, Dunn D, Young NS. Relationship between bone marrow failure syndromes and the presence of glycoposphatidyl inositol-anchored protein-deficient clones. *Br J Haematol* 2001; 115: 1015-22.
89. Cappellini MD. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology/the Education Program of the American Society of Hematology* 2007; 74–78.

90. Kozuma Y, Sawahata Y, Takei Y, et al. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2011; 152:631.
91. Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, Rushin CA, Valeri CR. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol*. 1982; 50(3): 509-19.
92. Martin JF, Trowbridge EA, Salmon G, Plumb J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B2 production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. *Thromb Res*. 1983; 32(5):443-60.
93. Braekkan SK, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T, Størmer J, Hansen JB. Mean platelet volume is a risk factor for venous thromboembolism: the Tromsø Study, Tromsø, Norway. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(1): 157-62.
94. Gasparyan AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des*. 2011; 17(1): 47-58.
95. Gulcan M, Varol E, Etli M, Aksoy F, Kayan M. Mean platelet volume is increased in patients with deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2012; 18(4): 427-30.
96. Valla D, Dhumeaux D, Babany G, Hillon P, Rueff B, Rochant H, et al. Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. A spectrum from asymptomatic occlusion of hepatic venules to fatal Budd-Chiari syndrome. *Gastroenterology* 1987;93:569–575.
97. Murad SD, Valla DC, de Groen PC, Zeitoun G, Hopmans JA, Haagsma EB, et al. Determinants of survival and the effect of portosystemic shunting in patients with Budd-Chiari syndrome. *Hepatology* 2004;39:500–508.

98. Plessier A, Sibert A, Consigny Y, Hakime A, Zappa M, Denninger MH, et al. Aiming at minimal invasiveness as a therapeutic strategy for Budd-Chiari syndrome. *Hepatology* 2006;44:1308-1316.
99. Hoekstra J, Leebeek FW, Plessier A, Raffa S, Darwish Murad S, Heller J, Hadengue A, Chagneau C, Elias E, Primignani M, Garcia-Pagan JC, Valla DC, Janssen HL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Budd-Chiari syndrome: findings from a cohort study. *J Hepatol.* 2009; 51(4): 696-706
100. Kumar KS, Malet PF, Rutherford C. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with no evidence of hemolysis presenting as Budd–Chiari syndrome. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 2238–9.
101. Bellido M, van der Velden VH, Leebeek FW, Te Boekhorst PA. Thrombotic complications without evidence of hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: is eculizumab indicated? *Ann Hematol.* 2012 Jul 4.