

MİYELODİSPLASTİK SENDROMLU OLGULARDA PAROKSİSMAL NOKTÜRNAL HEMOGLOBİNÜRİ KLONU ARAŞTIRMASI

Mustafa N. YENEREL, Reyhan DİZ KÜÇÜKKAYA, Abdullah HACIHANEFİOĞLU,
Mehmet TURGUT, Sevgi KALAYOĞLU-BESİSİK, Melih AKTAN, Hüseyin KESKİN,
Meliha NALÇACI, Deniz SARGIN, Tanju ATAMER, Yüksel PEKÇELEN,
Günçağ DİNÇOL*

ÖZET

Edinsel kök hücre hastalıkları olan aplastik anemi (AA), paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH) ve miyelodisplastik sendrom (MDS) arasında patolojik bir ilişki olduğunu ortaya koyan çeşitli çalışmalar bildirilmektedir. Ancak MDS ve PNH arasındaki ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu çalışmada MDS tanısıyla takip edilen 20 olguda, akım sitometrisi kullanılarak, çevre kanı lökositlerinde CD55 ve CD59 defekti araştırıldı. Olguların altısında özellikle granülositlerde CD59 için ortalama 9.1 ± 6.2 oranında defekt saptandı. PNH klonu saptadığımız olgularımızda retikülositoz ve LDH yüksekliği gözlenmedi. Bu hastaların Ham testi de negatif bulundu. Bu çalışmayı MDS ve PNH nin birbiriyle ilişkili olduğunu düşündürmesi nedeniyle bildirmeyi uygun bulduk.

Anahtar kelimeler: Myelodisplastik sendrom, paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, akım sitometrisi

SUMMARY

Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. Among acquired stem cell disorders, pathological links between myelodysplastic syndromes (MDS) and aplastic anaemia (AA), and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) and AA, have been often described, whereas the relationship between MDS and PNH is still unclear. We performed flow cytometric study to detect any defect of CD55 or CD59 antigens on peripheral leukocytes in 20 MDS patients. We found $9.1\% \pm 6.2\%$ of the granulocytes were defective for CD59 in six of the 20 patients. We didn't observe reticulocytosis or elevation of LDH none of the PNH clone positive MDS patients. Ham's test was also found to be negative in this group. We report this study in order to point out the pathological link between PNH and MDS.

Key words: Myelodysplastic syndrome, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, flow cytometry

GİRİŞ

Miyelodisplastik sendrom (MDS) yaşla birlikte görülme sıklığı artan, edinsel, klonal, kök hücre hastalıklarından biridir. Normal veya hipersellüler kemik iliği bulgularına rağmen inefektif hematopoez nedeniyle çevre kanında çeşitli derecelerde sitopenilere yol açan hastalığın en karakteristik özelliği iki veya daha fazla hücre dizisinde morfolojik olarak displazilerin görülmesidir (4). Hastalık %10 ila %50 oranında akut miyeloid lösemiye dönüşüm göstermesi nedeniyle

prelösemik olarak kabul edilmektedir (10). Patogenez üzerindeki etkileri tam olarak ortaya konulmasa da yeni tanı konulmuş MDS' li olguların %40 ile 60'ında sitogenetik anomaliler de saptanmaktadır (11).

Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri (PNH) edinsel, klonal kök hücre hastalıklarından biridir. Hemopoitik kök hücrenin somatik bir mutasyonu sonucu oluşur ve hemopoitik sistemin 3 hücre dizisi de etkilenir. En tipik bulgu eritrositlerin, komplemanın hemolitik etkisine karşı duyarlı hale gel-

mesi ve böylece düşük pH' da intravasküler hemolizin gelişmesidir. PNH daki bozukluk, pig-A olarak adlandırılan ve X kromozomunun kısa kolunda lokalize olan (Xp22.1) genin somatik mutasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bozukluk sonucunda glikozil fosfatidil inozitol (GFİ) çıpasının (anchor) oluşumunda bir defekt kendini gösterir. Sonuç olarak GFİ çıpası yardımıyla hücre zarına bağlanan bazı proteinlerin eksikliği söz konusudur (9). Akım sitometrisinin yaygın kullanımı ile PNH eritrositlerinde GFİ' ye bağlı bulunan CD55 (Decay Accelerating Factor) ve CD59 (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis) un eksikliği gösterilebildiği gibi bu anomali, periferik kanda granülosit ve lenfositlerde de aynı teknikle ortaya konabilmektedir (9).

Son yıllarda PNH ile MDS'nin birbirleriyle ilişkili olduğunu düşündüren çalışmalar bildirilmektedir. Örneğin bazı MDS'li hastalarda PNH klonu saptanırken bazı PNH'li olgularda da takipler sırasında MDS geliştiği bildirilmektedir (5,6). Yine bir başka klonal hastalık olan aplastik anemi (AA) olgularında da özellikle immünosupresif tedavi uygulananlarda geç bir komplikasyon olarak PNH'nin gelişmesi bu hastalarda tanı konulduğu sırada PNH'ya ait bazı bulguların varlığını akla getirmektedir (2,7,10,12). Yine bölümümüzde AA'li hastalarla yapılmış olan bir çalışmada yeni tanı konulmuş olan vakalarımızın %55'inde immünsupressif tedaviden önce çevre kanı çekirdekli hücrelerinden en az bir hücre serisinde GFİ- çıpa proteinlerinden CD55 ve CD59 ifadelerinde azalma olduğu tespit edilmiştir (3). Bu gözlemler bu üç grup klonal kök hücre hastalığı arasında patogenetik bir bağ olduğunu düşündürmektedir. AA ile PNH arasında çok iyi belirlenmiş olan bu ilişki henüz MDS ve PNH arasında tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Bu çalışmada MDS tanısıyla takip edilen olgularda çevre kanı lökositlerinde PNH de-

fekti olan hücrelerin sıklığı ve klinik bulgularla ilişkisi araştırıldı.

MATERYAL ve METOD

Hematoloji polikliniğimizde MDS tanısı konularak takip altına alınan 20 olgu değerlendirildi.

Kan sayımları, biyokimyasal tetkikler rutin yöntemlerle yapıldı. Serum demiri, total demir bağlama kapasitesi ve serum ferritin tayinleriyle birlikte değerlendirildi. Hastaların tümünde kemik iliği aspirasyonu, MDS' li olgularda ayrıca kemik iliği biyopsisi yapıldı ve Temel Bilimler, Patoloji Anabilim dalında değerlendirildi. PNH klonu, çevre kanı lökositlerin CD55 ve CD59 ekspresyonlarındaki defekte göre değerlendirildi. Bu amaçla EDTA'lı çevre kanı örnekleri kullanıldı ve CD55 ve CD59 (Farmingden) antikorları ile hazırlanan örnekler FacsCalibur akım sitometrisi (Becton Dickenson) kullanılarak analiz edildi (9). Analizler sırasında her hasta için sağlıklı erişkin bir kişiden alınan kan örnekleri de eşzamanlı olarak çalışıldı. Kontrol grubu örneklerini arttırmak amacıyla çeşitli nedenlerle daha önce değerlendirilen örnekler de çalışmaya dahil edildi. PNH klonu saptanan MDS'li hastalarda yapılan Ham ve şeker-su testleri ile hemosiderinüri tayini için standart yöntemler kullanıldı. Hastalarımızın ikisinde sitogenetik inceleme yapılabildi, ancak bir özellik saptanmadı.

BULGULAR

MDS tanısıyla izlenen olguların ve kontrol grubunun demografik özellikleri ve çevre kanı değerleri Tablo 1'de gösterildi. MDS'li olguların 14'ü erkek, altısı kadın idi ve yaşları 29 ile 90 arasında değişmekteydi (ortanca: 61, ortalama: 59±11). MDS' li hastaların ikisi kronik miyelomonositer lösemi, üçü artmış blastlı refrakter anemi (RAEB), biri halka sideroblastlı refrakter anemi (RARS)

Tablo 1. Olguların demografik özellikleri ve çevre kanı değerleri

	MDS	KONTROL
Olgu sayısı	20	32
Yaş	59±11,	33±7,
Cinsiyet	6 Kadın, 14 Erkek	13 Kadın, 19 Erkek
Çevre kanı değerleri		
Lökosit	4600 /mm ³ (1700 /mm ³ - 26 000 /mm ³)	6100/mm ³ (4600 /mm ³ - 11 000/mm ³)
Hb	7,7 g/dl ± 1,8 g/dl	13,2 g/dl ± 1,4 g/dl
MCV	95 fl ± 10 fl	88 fl ± 8 fl
Trombosit	76000 /mm ³ (22 000 /mm ³ - 296 000 /mm ³)	290 000 /mm ³ (155 000 /mm ³ - 420 000 /mm ³)
Retikülosit	%1,89 ± 1	

ve 14'ü refrakter anemi alt grubundandı. MDS'li olguların akım sitometrisiyle yapılan analiz sonuçları ve kontrol grubundaki ortalama CD55 ve CD59 defektif lökosit altgrup oranları Tablo 2'de gösterildi.

Bu tabloda belirtilen kontrol grubu verilerinden daha yüksek oranda CD55 ve CD59 defektif sağtanan olgular PNH klonu taşıyıcısı olarak kabul edildi. Yirmi MDS hastasının altısında özellikle lenfosit ve monositlerde CD55 ve CD59 defektif olduğu gözlemlendi. Bu altı olguda, CD55 ekspresyonu açısından lenfositlerde ve monositlerde sırasıyla ortalama %20,3±8 ve %15,8±7,5 oranında defektif saptanırken granülositlerde bu oran %1,45±1,3 olarak bulundu. CD59 açısından da lenfosit ve monositlerde benzer sonuçlar alındı. Ancak PNH tanısı için özellikle değerli olarak kabul edilen granülositlerdeki defektif CD59 için ortalama %9,1±6,2 idi. MDS'li olgular içinde PNH defektif olgular dahil olmak üzere hiç birinde hemoliz bulgusu saptanmadı. Bu hastaların hiçbirinde immünosüpresif tedavi kullanılmamıştı ve MDS tanısı ile PNH klonu saptanması arasında tedavi ile ilgili bir ilişki saptanmadı. Bizim PNH klonu saptadığımız MDS olgularımızda retikülositoz ve LDH yüksekliği gözlenmediği gibi hiç birinde Ham testi pozitifliği de saptanmadı. PNH klonu saptanan MDS'li olgularımızın dördü MDS-RA alt grubuyken, biri MDS-RARS, biri de MDS-RAEB alt grubundaydı.

TARTIŞMA

Son yıllarda, edinsel kök hücre hastalıklarından olan MDS, AA ve PNH arasında patolojik bir ilişki olduğunu düşündürülen çeşitli gözlemler bildirilmiştir (3,6,8,12). AA ile PNH arasında çok iyi belirlenmiş olan bu ilişki henüz MDS ve PNH açısından tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (8). AA'li olgularda özellikle immünosüpresif tedavi görenlerinde PNH klonu %30 ile %50 oranında tespit edilmeye başlanmıştır (2). MDS'li olgularımızda PNH klonunun daha az oranda tespit edilmesi ve hiç birinde immünosüpresif ilaç kullanılmamış olması AA'li olgulardan farkını oluşturmaktadır. AA ve MDS olguları arasında PNH klonu görülme sıklığı arasındaki bu farklılığın nedeni de henüz ortaya konulamamıştır. Yine PNH'lı olguların MDS'ye dönüşümü yanısıra aynı olguların AA'ya dönebileceği de gösterilmiştir (6). MDS'li olgularda yapılan sitogenetik çalışmalar trizomi 8'in MDS klonu için ayrı bir belirteç olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bu açıdan değerlendirildiğinde trisomi 8, PNH defektif granülositlerde de saptanmış ve/fakat normal fenotipli granülositlerde gösterilememiştir. Bu gözlemler birlikte PNH klonunun MDS klonundan geliştiği düşünülmektedir (5). Aynı araştırmacılar bunun tam tersi olarak PNH klonunun MDS klonundan değil, normal rezidüel kök hücrelerden ortaya çıktığını, trisomi 8 klonunun PNH defektif hücrelerde oluştuğunu ve

Tablo 2. Myelodisplastik sendromlu olguların akım sitometrik inceleme sonuçları

Vaka	Tanı	CD55 negatif topluluk oranı			CD59 negatif topluluk oranı		
		Lenfosit	Monosit	Granülosit	Lenfosit	Monosit	Granülosit
1.	RA	3.1	5.8	1.8	5	2.8	8.3
2.	RA	8.4	0.9	0.3	8.9	2.7	1.6
3.	RA	2.6	0.3	0.4	2.7	0.1	1.4
4.	RA	4.9	0.6	0.1	5.4	1.1	0.5
5.	RA	3.0	0.4	0.2	4.4	2.5	0.5
6.	RA	8.3	3.1	0.9	6.9	4.3	2.1
7.	RA	2.2	0.8	0.1	3.5	0.9	1.3
8.	RA	3.5	0.2	0.6	5.2	3.1	2.2
9.	RA	3.3	2.1	1.0	2.8	0.3	1.6
10.	RA	4.9	0.6	0.1	5.4	1.1	0.9
11.	RA	19.8	29	2.1	25	32.8	8.3
12.	RA	32	13.7	0.3	23.3	27.4	3.1
13.	RA	9.2	16.7	2.9	16.8	30.4	9.3
14.	RA	19.6	5.9	3	15.5	19.1	7.1
15.	RARS	15.2	13.2	0.3	28.2	46.1	21.1
16.	RAEB	26.5	16.6	0.1	20.6	20.4	5.8
17.	RAEB	1.5	1.8	0.9	2.3	1.7	1.9
18.	RAEB	2.6	0.8	0.4	3.7	0.9	1.1
19.	KMML	2.4	1.1	0.6	5.9	2.7	1.9
20.	KMML	4.9	2.5	0.3	5.7	3.3	1.8
	Kontrol						
	Ort ± SS	3 ± 1.8	1 ± 1.8	1 ± 1.2	3 ± 2.1	1 ± 0.9	1 ± 1.2
	Ort +1.96xSS	6.4	4.4	3.3	7	2.7	3.3

trisomi 8 anomalisi gösteren MDS olgularının PNH ya sekonder olarak geliştiği hipotezini de ortaya atmıştır (5). Bu konuda 40 MDS olgusuyla yapılan bir çalışmada dört olguda granülositlerde %16 ila %95 oranında (ortanca %19) defekt saptandığı bildirilmiştir (5). Bu olguların dördünde de Ham testi pozitif bulunmuştur. Bu olgulardaki hemoliz derecelerinin PNH olgularıyla karşılaştırıldığında çok düşük olarak saptandığı görülmüştür. Hemoliz açısından MDS/PNH olgularında saptanan bu farklılığın nedeni tam olarak oraya konulmasa da PNH klonunun daha düşük proliferasyon kapasitesi olabileceği ve yine bu olgularda PNH klonunun genişlemesini baskılayan bir durum olabileceği düşünülmektedir. Bunların yanında takip sürelerinin PNH klonunun klinik tabloya hakim olacak şekilde çoğalıp yayılması

için yeterli olmadığı da düşünülebilmektedir. Zira Avrupa Kan ve Kemik iliği Transplantasyon grubunun retrospektif bir çalışmasında, immünosupresif tedaviden sonra uzun yaşayan AA'larda PNH riski, teşhisten sonraki 7 yıl içinde %13 olarak değerlendirilmiştir (2).

Bizim PNH klonu saptadığımız MDS olgularımızda retikülositoz ve LDH yüksekliği gözlenmediği gibi hiçbirinde Ham testi pozitifliği de saptanmadı. PNH klonu saptanan MDS'li olgularımızın dördü MDS-RA alt grubuyken biri MDS-RARS, biri de MDS-RAEB alt grubundaydı. Bu konuda yapılmış olan diğer çalışmada olguların hepsinin RA grubunda olduğu bildirilmiştir ve bu durum o çalışmada RA alt grubunun MDS olgularının çoğunluğunu oluşturmasıyla açıklanmıştır (5).

Bu çalışmayı MDS, PNH ve AA gibi 3 kök hücre hastalığının birbirleriyle ilişkili olduklarını düşündürmesi nedeniyle bildirmeyi uygun bulduk. Herhangi bir çıkarıma varabilmek için daha ileri ve uzun süreli araştırmalara gereksinin olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bennet JM, Catovsky D, Daniel T, et al: FAB Cooperative group: Proposal for the classification of the myelodysplastic syndroms. *Br J Haematol.* 51: 189 (1982).
2. De Planque MM, Bacigalupo A, Wursch A, Hows JM, Devergie A, Frickhofen N, Brand A, Nissen C: Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globulin. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol.* 73:121 (1989).
3. Dinçol G, Nalçacı M, Keskin H, Aktan M, Filorinalı N, Dinçol K: Aplastik anemili 20 vakanın çevre kanı monosit ve granülositlerinde CD55 ve CD59 tayini ve bunların Klinik seyirle ilişkisi. *İstanbul Tıp Fakültesi Mecmuası* 63:2: (2000).
4. Greenberg PL: Myelodysplastic syndrome Ch 60. *Hematology: basic principles and practice.* Edited by Ronal Hoffman et al. 3rd edition Churchill Livingstone (2000).
5. Iwanaga M, Furukawa K, Amenomori T, Mori H, Nakamura H, Fuchigami K, Kamihira S, Nakakuma H, Tomonaga M: Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol.* 102: 465, (1998).
6. Jong-Youl J, Toze JA, Marsh JCW, Mathhey F, Gordon-Smith EC: Myelodysplasia following aplastic anemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome after treatment with immunosuppression and G-CSF: evidence for the emergence of a separate clone. *Br J Haematol.* 94: 510 (1996).
7. Najean Y, Haguenauer O: Long-term (5 to 20 years) Evolution of nongrafted aplastic anemias. The Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Blood* 1:76 (1990).
8. Nakakuma H, Nagakura S, Iwamoto N, Kawaguchi T, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, Shido T, Takatsuki K: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in bone marrow of patients with pancytopenia. *Blood* 85: 5 (1995).
9. Rotoli B, Bessler M, Alfinito F, del Vecchio L: Membrane proteins in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Blood Reviews* 7:75 (1993).
10. Tichelli A, Gratwohl A, Wursch A, Nissen C, Speck B: Late haematological complications in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* Jul; 69:413 (1988).
11. Toyama K, Ohyashiki K, Yoshida Y, Abe T, Asano S, Hirai H, Hirashima K, Hotta T, Kuramoto A, Kuriya S, et al: Clinical implications of chromosomal abnormalities in 401 patients with myelodysplastic syndromes: a multicentric study in Japan. *Leukemia* 7:499 (1993).
12. Yenerel MN, Nalçacı M, Atamer T, Pekçelen Y: Paroksizmal noktürnal hemoglobüri ile 11 hastanın klinik ve hematolojik yönlerinin incelenmesi. *Klinik Gelişim Dergisi* 11:3 (1998).