

## APLASTİK ANEMİLİ 20 VAKANIN ÇEVRE KANI MONOSİT VE GRANÜLOSİTLERİNDE CD 55 VE CD 59 TAYİNİ VE BUNLARIN KLİNİK SEYİRLE İLİŞKİSİ

Günçağ DİNÇOL\*, Meliha NALÇACI\*, Hüseyin KESKİN\*, Melih AKTAN\*,  
Nursal FİLORİNALI\*, Koray DİNÇOL\*\*

### ÖZET

Sağlıklı 14 şahısta ve 8'i çok ağır, 12'si ağır aplastik anemili vakalarda tedaviye başlamadan evvel çevre kanı monosit ve granülositlerinde "flow" sitometreyle CD 55 ve CD 59 ifadeleri incelendi. Bunlara ilaveten hasta grubuna kronik hemoliz testlerinden Ham ve şeker-su testi yapıldı. Hastalar, herbir hastada çevre kanı monosit ve granülositlerinde tespit edilen CD 55 ve CD 59 ifadelerinin normal gruptaki herhangi bir değer minimumundan küçük oluşuna, göre iki gruba ayrıldı. Böylece 9 hasta CD 55 ve CD 59 ifadeleri normal sınırlarda ve 11 hastada ise bunların ifadeleri normalden düşük olarak tespit edildi. Yirmi hastanın hiçbirinde takip edildikleri ortalama 22 (3-57) ay içinde Ham ve şeker-su testleri pozitif bulunmadı. Anti-lenfositler globulin, siklosporin A, granülosit koloni uyarıcı faktör ve metil prednizolondan oluşan yoğun immunsupressif tedaviye CD 55 ve CD 59 ifadeleri düşük olan hastaların cevaplarının normal bulunanlardan kötü olduğu tespit edildi.

**Anahtar kelimeler:** Aplastik anemi, paroksizmal noktürnal hemoglobinüri, CD 55, CD 59.

### SUMMARY

*The value of the assessment of CD 55 and CD 59 in the peripheral blood monocytes and granulocytes in patients with aplastic anemia: A study in 20 cases.* Peripheral blood monocytes and granulocytes of 14 healthy persons and 12 cases of severe and 8 cases of very severe aplastic anemia were investigated with flow cytometry for CD 55 and CD 59 expressions. Ham and sugar-water tests were also performed in the patient group. The patients could be divided into two subgroups according to the level of expression of CD 55 and CD 59. Thus, in 9 patients the expression of CD 55 and CD 59 were within normal limits whereas in 11 patients there expressions were less than the lower limits of normal values. In none of the twenty patients, the Ham and the sugar-water tests were found positive during the mean follow up period of 22 months (range 3-57 mo). It has been observed that responses of the patients to treatment (antilymphocyte globulin, cyclosporine A, granulocyte colony stimulating factor, methylprednisolone) were parallel to their values of expressions namely those with low CD 55 and CD 59 expressions responded poorly to the immunosuppressive treatment than those with normal values.

**Key words:** Aplastic anemia, CD 55, CD 59, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

### GİRİŞ

Aplastik anemi (AA) ile paroksizmal noktürnal hemoglobinüri (PNH) arasında klinik ilişki uzun zamandan beri bilinmektedir (2). Fakat AA'li vakalarda PNH klonunun gelişme mekanizması henüz kesin olarak bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı AA'li vakaların çevre kanı çekirdekli hücrelerinin bir kısmında glikozilfosfa-

tidilinozitol (GFİ) çıpa proteinlerinin eksik olduğu (4,9,10) ve böylesi vakalarda çevre kanında PNH fenotipli hücrelerin görülmelerinden önce bu hücrelerin kemik iliğinde bulunduğu tespit edilmiştir (7).

Burada tanısı yeni konulmuş ve tedavi olmamış 20 AA'lı vakamızın çevre kanı monosit ve granülositlerinde CD55 ve CD 59 ifadeleri incelendi. Bunlara ilaveten her vakada,

Mecmuaya gelen tarih: 24.12.1999

\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Çapa, İstanbul

\*\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Onkoloji Enstitüsü, Çapa, İstanbul

PNH için klasik hemoliz testlerinden, Ham ve şeker su testi yapıldı ve laboratuvar sonuçları ile klinik bulguları arasında olası bir ilişkinin varlığı araştırıldı.

## MATERYAL ve METOD

Çalışma materyelimiz Hematoloji Bilim Dalında yatırılarak 8'ine çok ağır AA ve 12'sine ağır AA tanısı konulan 20 vaka ile 14 sağlıklı erişkinden oluşmaktaydı. Hasta grubumuzun yaş ortalaması 37 (16-72) yıl idi. Antilenfositer globulin (ALG) (15 mg/kg/günx5 gün, i.v.), metilprednisolon (MP) (2 mg/kg/günx5 gün per oral, doz tedricen azaltılarak bir ay sonunda kaldırılır), siklosporin A (CyA) (5mg/kg/gün x 180 gün peroral), granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) (5µg/kg/günx90 gün cilt altına) den oluşan yoğun immunsupresif tedavi 18 vakaya uygulandı. İki vakaya bu tedavi yapılmadı. Zira, hastalardan biri kısa süre yaşadı

ve tedavi uygulanmadan öldü. Diğer vakada hem at hem de tavşan kaynaklı antilenfositer globuline karşı ağır allerji tespit edildiği gibi CyA ya bağlı böbrek fonksiyon bozuklukları da oluştu. İmmunsupresif tedaviye kısmi ve tam yanıt veren 15 vaka ortalama 22 (3-57) ay takip edildi (Tablo 1).

Hem hasta hem de kontrol grubumuz çevre kanı monosit ve granülositlerinde GFİ-çıpa proteinlerinden CD 55 ve CD 59 ifadeleri "flow" sitometreyle tayin edildi. PNH için Ham ve şeker su testi yalnız hasta grubuna "flow" sitometrik incelemeyle aynı zamanda yapıldı

## BULGULAR

Tüm vakalarda Ham ve şeker su testi negatif idi. Her bir hastada çevre kanı monosit ve granülositlerinde tespit edilen CD 55 ve CD 59 ifadesinin normal (kontrol) grubundaki

Tablo 1. Hastaların özellikleri ve tedavi sonuçları

|                              | Tüm AA'li vakalar | CD55, CD 59 normal ifadedeli AA'ler | CD 55, CD 59 en az bir hücre serisinde düşük ifadedeli AA'ler |
|------------------------------|-------------------|-------------------------------------|---|
| Vaka sayısı                  | 20                | 9                                   | 11  |
| Kadın / Erkek                | 5/15              |                                     |   |
| Ortalama yaş                 | 37 (16-72)        |                                     |   |
| Takip süresi (ay)            | 22 (3-57)         |                                     |   |
| Hastalığın şiddeti:          |                   |                                     |   |
| Çok ağır AA                  | 8                 | 4                                   | 4   |
| Ağır AA                      | 12                | 5                                   | 7   |
| Tedavi                       |                   |                                     |   |
| Tedavi yok                   | 1                 | 1                                   |   |
| Oxy+G-CSF                    | 1                 |                                     | 1   |
| İS tedavi (ALG+CyA+G-CSF+MP) | 18                | 9                                   | 9   |
| Cevap                        |                   |                                     |   |
| Tam cevap                    | 10                | 6                                   | 4   |
| Kısmi cevap                  | 5                 | 3(tedavinin 3. Ayında)              | 2   |
| Cevapsız                     | 3                 |                                     | 3   |
| Nüks                         | 2                 | 2                                   |   |
| Vefat                        |                   |                                     |   |
| İS tedavi almış              | 3                 |                                     | 3   |
| İS tedavi almamış            | 1                 |                                     | 1   |

Oxy: Oksimetolon, ALG: Antilenfositer globulin, CyA: Siklosporin A, G-CSF: Granülosit koloni uyarıcı faktör, MP: Metilprednisolon, İS: İmmunsupresif

herhangi bir değerin minimumdan küçük oluşuna göre AA li vakalar iki gruba ayrıldı. Buna göre 9 (%45) vakanın ortalama CD 55 ifadeleri monositlerde %92,78±5,76 ve granüositlerde %94,51±6,02; ortalama CD 59 ifadeleri ise monositlerde %90,78±8,04 ve granüositlerde %97,11±4,08 bulundu. Kontrol grubunda ise ortalama CD 55 ifadeleri monositlerde %93,81±5,44 ve granüositlerde %97,55±2,73; ortalama CD 59 ifadeleri monositlerde %86,44±10,81 ve granüositlerde %97,12(4,21 olarak tespit edildi. Kontrol grubunun sonuçları ile 9 vakalık hasta grubunun karşılaştırıldığında aralarında bir fark olmadığı görüldü (p<0,05). Buna karşılık 11 (%55) vakalık hasta grubunda ortalama CD 55 ifadeleri monositlerde %54,15±25,08 ve granüositlerde %53,62±32,92 bulundu. Bu sonuçlar kontrol grubundakinden anlamlı olarak düşük idi (p<0,001). Bu grupta monositlerde CD 59 ifadeleri (ortalama %77,16±22,21) diğer iki gruptan farklı bulunmadı (p>0,05). Fakat granüositlerde CD 59 ifadeleri (ortalama %89,25±11,70) her iki gruptakinden daha düşük tespit edildi (p<0,05) (Tablo 2).

Dokuz vakalık AA grubundaki her vakada immunosupressif tedaviyle ilk 3 ayda kısmi düzelme sağlandı. Tedavi bitim süresi olan 6 ayı dolduran 6 vakada tam düzelme görüldü. Bu vakaların hiçbirinde takip edildikleri 22 (3-57) aylık sürede nüks tespit edilmedi. Tedaviden önce yapılmış olan tüm testlerin 6 ay ile 1 yıllık aralıklarla tekrarlarında da bir değişiklik görülmedi.

Onbir vakalık hasta grubunda immunsupressif tedavi uygulanan 9 vakadan ancak 6 tanesi tedaviye müspet cevap verdi. Cevaplı 6 vakadan birinde düzelme diğerlerinde olduğu gibi ilk tedavi küründe olmayıp ancak 2. kürde elde edildi. Tedaviye cevap vermeyen 3 vaka öldü. Bu grupta yaşayan 7 vakanın ortalama 22 (3-57) aylık takibinde tekrarlanan Ham ve şeker su testleri yine negatif idi. Bunlardan tam düzelme gösteren 3 vakanın tedaviden önce düşük ifade edilen CD 55 i iki vakada granüositlerde %16, %55 ve bir vakada monositlerde %33 iken tedaviden sonra bu ifadeler sırası ile %86, %81,5, %90 olup normal kontrol değerlerindeki gibi bulundu. Fakat bunlardan birinde nüks sırasın-

**Tablo 2.** Grupların karşılaştırılması (tek yönlü varyant analizi, çoklu karşılaştırma için LSD testi uygulandı)

|   | CD 55 ifadesi (%)                               | CD 55 ifadesi (%)                               | CR 59 ifadesi (%)                               | CD 59 ifadesi (%)                               |
|---|---|---|---|---|
|   | Monosit   | Granüosit                                       | Monosit   | Granüosit                                       |
| CD 55, CD 59 normal ifadeli 9 AA'li vaka (ortalama ± standart sapma)      | 92,78±5,76                                      | 94,51±6,02                                      | 90,78±8,04                                      | 97,11±4,08                                      |
| CD 55, CD 59 düşük ifadeli 11 AA'li vaka (ortalama ± standart sapma)      | 54,15±25,08                                     | 53,62±32,92                                     | 77,16±22,21                                     | 89,25±11,70                                     |
| CD 55, CD 59 ifadesi normal 14 şahıs (kontrol) (ortalama± standart sapma) | 93,8±5,44                                       | 97,55±2,73                                      | 86,44±10,81                                     | 97,12±4,21                                      |
| K: kontrol<br>V: vaka   | K-9V p>0,05<br>K-11 V p<0,001<br>9V-11V p<0,001 | K-9V p>0,05<br>K-11 V p<0,001<br>9V-11V p<0,001 | K-9V p>0,05<br>K-11 V p<0,001<br>9V-11V p<0,001 | K-9V p>0,05<br>K-11 V p<0,001<br>9V-11V p<0,001 |

da CD 55 granülositlerde %37 olarak tedaviden önceki gibi (%55) düşük ifade edildiği gözlemlendi. Biri tam ve üçü kısmi düzelme gösteren diğer 4 vakanın takibinde CD 55 ve CD 59 ifadelerinde bir değişiklik tespit edilmedi.

## TARTIŞMA

İmmüsupressif tedavi alan AA'li bazı vakalarda geç bir komplikasyon olarak PNH'nin gelişmesi (3,8,12) AA'li hastalarda tanı konulduğu zaman PNH'ye ait bazı bulguların varlığını akla getirir. Pratikte uygulanabilen mevcut imkanlar içinde "flow" sitometre ile hematopoetik hücrelerde GFİ-çıpa proteinlerinin eksikliğini göstererek bir PNH klonunun varlığının ortaya çıkarmak mümkün olabilir. Çalışmamızda yeni AA tanısı almış vakalarımızın %55 inde immüsupressif tedaviden önce çevre kanı çekirdekli hücrelerinden en az bir hücre serisinde GFİ-çıpa proteinlerinden CD 55 ve CD 59 ifadelerinde azalma tespit edildi.

Eritrositlerde CD 55 ve CD 59 eksikliğinde hemoliz oluşumunu gösteren Ham ve şeker-su testi bu vakalarda tedaviden önceki gibi tedaviden sonra da ortalama 22 (3-57) aylık takip süresince negatif olarak bulundu. Belki bu takip süremiz PNH klonunun klinik tabloya hakim olacak kadar çoğalıp yayılması için yeterli bir zaman olmayabilir. Zira Avrupa Kan ve Kemik iliği Transplantasyon grubunun retrospektif bir çalışmasında, immüsupressif tedaviden sonra uzun yaşayan AA'lilerde PNH riski teşhisten sonraki 7 yıl içinde %13 olarak değerlendirilmiştir (3). İmmüsupressif tedavinin PNH klonunu ortadan kaldırmadığı bilinmektedir. PNH seyrinde gelişen AA'li vakalarda immüsupressif tedavi ile hematopoez üzerine immünkompetant hücrelerin inhibitör etkilerinin kaldırılmasıyla AA'nin düzeldiği ve PNH klonuna ait bulguların devam ettiği gösterilmiştir (11).

Uyguladığımız yoğun immüsupressif tedaviye (1) cevabın CD 55 ve CD 59 ifadeleri normal bulunan grupta, düşük bulunanlardan aşikar iyi olduğu tespit edildi (Tablo 1). Bu konuda böylesi çalışmalar çok fazla olmasa da bizim sonuçlarımız hem GFİ-çıpa proteinlerini eksik ifade eden yeni tanı almış AA'lilerin oranı bakımından hem de bu grubun, uyguladığımız immüsupressif tedavi protokolları farklı olmasına rağmen, immüsupressif tedaviye iyi cevap vermemeleri bakımından Schrezenmeier ve arkadaşlarının bildirdikleri sonuçlara benzemektedir (10).

GFİ-çıpa proteinlerini düşük ifade eden gruba dahil olan 3 vaka immüsupressif tedaviye tam cevap verdikleri sırada granülosit ve monositlerde tekrarlanan CD 55 ve CD 59 ifadeleri normal kontrollerindeki gibi bulunduğunu ve bunlardan birinde nüks sırasında tekrarlanan GFİ-çıpa proteinleri ifadelerinin normal kontrolünkünden düşük olduğu müşahade edildi. İmmüsupressif tedaviye tam cevap veren hastalarda CD 55 ve CD 59 ifadelerinin normal kontrolünki gibi bulunması hastanın GFİ-çıpa proteinleri değişikliğe uğramamış hematopoetik hücrelerin tedavi etkisiyle normal bir şekilde gelişip çoğalması yanında, bu proteinleri düşük ifade eden hücrelerin sayılarının nisbi olarak azalmasıyla izahı mümkün olabilir. Hastalık nüks ettiği zaman GFİ-çıpa proteinleri ifadelerinde düşme, bu proteinleri düşük ifade eden hücrelerin intrinsek gelişme avantajıyla ilgili olmadığı, GFİ-çıpa proteinleri ifadeleri normal olan hücre popülasyonunun azalmasıyla ilgili olması muhtemeldir. Çünkü hücre kültür çalışmalarında normal fenotipli AA'lilere ait hücrelerdeki gibi AA/PNH sendromlu hücrelerde de gelişmenin azaldığı tespit edilmiştir (6). Ayrıca immün mekanizma kemik iliği kök hücrelerini etkileyip aplaziye neden olurken GFİ çıpa proteinlerinin eksikliği bu proteinlerden yoksun hücreleri immün aracılıkla yok olmaktan koruduğu ileri sürülmüştür (5).

Sonuç olarak çevre kanı çekirdekli hücrelerin en az bir hücre serisinde CD 55 ve CD 59 ifadeleri düşük olan vakaların immunsupressif tedaviye cevaplarının bunları normal ifade edenlerden kötü olduğu kanaatine varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Bacigalupo A, Broccia G, Corda G, Arcese W, Carotenu M, Gallamini A, Locatelli F, Mori PG, Saracco P, Todeschini G, Coser P, Lacopino P, van Lint MT and Gluckman E.: Antilymphocyte globulin, cyclosporine and granulocyte colony stimulating factor in patients with acquired severe aplastic anemia (SAA): A pilot study of the EBMT SAA Working Party. *Blood* 85:1348 (1995).
2. Dacie JV and Lewis SM. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: clinical manifestations, haematology and nature of the disease. *Series Haematologica* 5:3 (1972).
3. De Planque M, Bacigalupo A, Wüsch A, Hows JM, Devergie A, Frickhofen N, Brand A, Nissen C. Long term follow-up of severe aplastic anemia patients treated with antithymocyte globulin. *Br J Haematol* 73:121 (1989).
4. Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobhaci ML, Jonveaux P, Vu T, Bazarbachi A, Carosella ED, Sigaux F, and Socie G. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; search for a pathogenetic link.: *Blood* 85:1354 (1995).
5. Luzzato JP, Sloand EM, Sato T, Anderson S and Young NS.: Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell* 88: 1 (1997).
6. Maciejewski JP, Sloand EM, Sato T, Anderson S and Young NS. Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein deficient clone. *Blood* 89:1173 (1997).
7. Nakakuma H, Nakakura S, Iwamoto N, Kawaguchi T, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, Shido T and Takatsuki K. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in bone marrow of patients with pancytopenia. *Blood* 85: 1371 (1995).
8. Najean Y and Haguenauc O. Long term (5- to 20 years) evolution of nongrafted aplastic anemias. *Blood* 76:2222 (1990).
9. Schubert J, Vogt HG, Zielinka-Skowronek M, Freund M, Kaltwasser JP, Hoelzer D and Schmidt RE. Development of the glycosylphosphatidylinositol - anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83:2323 (1994).
10. Schrezenmeier H, Hertenstein B, Wagner B, Ragravac-har A, Heimpol 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 phosphatidylinositolglycan anchored proteins. *Experimental Hematology* 23:81 (1995).
11. Stoppa AM, Vey N, Sainy D, Arnoulet C, Comerlo J, Cappiello MA, Gastout A and Maraninchi D. Correction of aplastic anemia complicating paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: absence of eradication of the PNH clone and dependence of response on cyclosporin A administration. *Br J Haematol* 93:42 (1996).
12. Tichelli A, Gratwohl A, Wüksek A, Nissen C and Speck B. Later haematological complicating in severe aplastic anemia. *Br J Haematol* 69: 413 (1988).