

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία Από τη μοριακή βλάβη και το βιοχημικό έλλειμμα στην κλινική της έκφραση

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια σπάνια νόσο του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου, την οποία λίγοι κλινικοί ιατροί, ακόμη και αιματολόγοι, έχουν παρακολουθήσει σε ολόκληρη την κλινική της εξέλιξη και φυσική πορεία. Το βιοχημικό και το μοριακό υπόβαθρο της νόσου ανακαλύφθηκε στα τέλη του προηγούμενου αιώνα, ύστερα από ερευνητικές προσπάθειες δεκαετιών. Περισσότερες από 180 διαφορετικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *PIG-A*, το οποίο εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος *X*, έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση της νόσου, οδηγώντας σε διαταραχή της βιοσυνθετικής οδού της «άγκυρας» της γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης, ενός γλυκοπρωτεϊνικού μηχανισμού σύνδεσης των πρωτεϊνών στη μεμβράνη των κυττάρων. Η ΝΠΑ αποτελεί το πρώτο και ίσως το μοναδικό παράδειγμα επίκτητης αυτοάνοσης αιμολυτικής αναιμίας με αρνητική αντίδραση Coombs λόγω διαταραχής της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, χωρίς διαταραχή της μορφολογίας των ερυθρών, η οποία οδηγεί σε επεισόδια πρωινής αιμοσφαιρινουρίας –σκουρόχροα νυκτερινά και πρώτα πρωινά ούρα– τα οποία και ανησυχούν τον ασθενή, ενώ το χρώμα τους «καθαρίζει» κατά τη διάρκεια της ημέρας. Η έλλειψη του CD55 και του CD59 από την επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων, ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος, οι οποίες συνδέονται μέσω της «άγκυρας» που απουσιάζει, ερμηνεύουν καλά τη χρόνια ενδαγγειακή αιμόλυση με τη συνοδό αιμοσιδηρινουρία της νόσου. Ωστόσο, δεν επεξηγούν επαρκώς τις θρομβοεμβολικές διαταραχές σε ασυνήθεις θέσεις, καθώς και –σε μεγαλύτερο βαθμό– τη μυελική ανεπάρκεια, η οποία συμπληρώνει τη χαρακτηριστική τριάδα της νόσου. Η παρούσα ανασκόπηση περιλαμβάνει όλα τα στοιχεία τα οποία υπάρχουν μέχρι σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία αναφορικά με τη μοριακή βλάβη και το βιοχημικό έλλειμμα που χαρακτηρίζει τη ΝΠΑ, καθώς και την περιγραφή των πολύπλοκων παθογενετικών οδών που οδηγούν στις βασικές της κλινικές εκδηλώσεις.

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2015, 32(4):391–421
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2015, 32(4):391–421

Ι.Β. Ασημακόπουλος,¹
Λ. Παπαγεωργίου,¹
Ο. Καμπουροπούλου,²
Μ. Σαμάρκος,²
Ε. Πλάτα,¹
Ε. Βαριάμη,²
Θ.Π. Βασιλακόπουλος,¹
Π. Τσαφταρίδης,¹
Μ.Κ. Αγγελούπουλου,¹
Κ. Κωνσταντόπουλος,¹
Ε. Τέρπος,³
Γ. Μελέτης¹

¹Αιματολογική Κλινική και Μονάδα Μεταμόσχευσης Μυελού των Οστών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Αθήνα
²Α΄ Παθολογική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Λαϊκό», Αθήνα
³Θεραπευτική Κλινική, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιατρική Σχολή, Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα», Αθήνα

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From the molecular and biochemical defect to the clinical presentations

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αιμολυτική αναιμία
CD55
CD59
DAF
GPI
MIRL
Μυελική ανεπάρκεια
Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Υποβλήθηκε 3.10.2014

Εγκρίθηκε 17.12.2014

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) ή αναιμία/νόσος των Marchiafava-Micheli αποτελεί μια

σπάνια, επίκτητη, μη κακοήγη κλωνική διαταραχή του πολυδύναμου αρχέγονου αιμοποιητικού κυττάρου (multipotent hematopoietic stem cell, mHSC).¹ Αν και ορθά ταξινομείται ως η μοναδική μορφή αιμολυτικής αναιμίας που οφείλεται

σε επίκτητη παθολογική διαταραχή της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου,² ουσιαστικά πρόκειται για μια καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια.³ Η χαρακτηριστική κλινική τριάδα της χρόνιας ενδαγγειακής αιμόλυσης με αιμοσιδηρινουρία και παροξυσμικά επεισόδια αιμοσφαιρινουρίας, των θρομβοεμβολικών επεισοδίων και της ποικίλου βαθμού μυελικής ανεπάρκειας¹ την αναδεικνύουν σε ένα ξεχωριστό κλινικό σύνδρομο. Παρά το γεγονός ότι οι πρώτες αναφορές σε ασθενείς με ΝΠΑ αποδίδονται στο Γερμανό ιατρό Schmidt το 1678,⁴ το Σκωτσέζο Charles Stewart το 1794 και το Βικτοριανό Άγγλο ιατρό William Gull το 1866,⁵ η πρώτη επιστημονικά τεκμηριωμένη περιγραφή της νόσου, ως ξεχωριστή κλινική οντότητα, έγινε από το Γερμανό Paul Strübing το 1882.⁶ Η κύρια συνεισφορά του συνίσταται στο γεγονός ότι διαχώρισε τη ΝΠΑ από την παροξυσμική αιμοσφαιρινουρία εκ ψύχους που σχετίζεται με τη σύφιλη, λόγω της παρουσίας ερυθροκυτταρικών αντισωμάτων Donath-Landsteiner, καθώς και την αιμοσφαιρινουρία εκ βαδίσσεως. Ο Strübing περιέγραψε την περίπτωση ενός επιδιορθωτή αμαξών, 29 ετών, με διαλείποντα επεισόδια κόπωσης, παροξυσμούς αιμοσφαιρινουρίας κατά τη διάρκεια της νύκτας, που υφίσταντο την ημέρα, και κοιλιακά άλγη, αποδίδοντας την εν λόγω κλινική εικόνα σε διαταραχή της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης η οποία καθιστά το ερυθρό ευαίσθητο σε όξινο περιβάλλον (συσσώρευση CO₂ και γαλακτικού οξέος κατά τη διάρκεια του ύπνου). Ωστόσο, η εργασία του αγνοήθηκε, με αποτέλεσμα η νόσος να συνιστά κλασικό αντικείμενο της Αιματολογίας, από τη δεκαετία του 1930, μετά τις κλινικές περιγραφές και τις μελέτες των Marchiafava και Nazari⁷ στις αρχές του αιώνα και μετέπειτα του Micheli, ο οποίος στις δημοσιεύσεις του, το 1931, χρησιμοποίησε τον όρο “splenomegalic haemolytic anaemia with haemoglobinuria and haemosiderinuria, Marchiafava-Micheli type”,⁸ απ’ όπου προήλθε το προσωνύμιο «νόσος ή αναιμία Marchiafava-Micheli».

Ήδη από το 1911 τα *in vitro* πειράματα του Hijmans van den Bergh επαλήθευσαν την υπόθεση του Strübing, καθώς απέδειξε ότι τα ερυθρά αιμοσφαίρια του «παροξυσμικού ίκτερου», όπως αρχικά ονομάστηκε το σχετικό σύνδρομο, αιμολύονταν όταν επώαζονταν σε ορό, είτε του ασθενούς, είτε φυσιολογικών ατόμων, παρουσία CO₂, σε αντίθεση με τα ερυθρά φυσιολογικών ατόμων, τα οποία παρέμεναν άθικτα.⁹ Το 1939, οι Ham και Dingle δημοσίευσαν ότι η λύση του ερυθρού σχετίζεται με το συμπλήρωμα και είναι μεγαλύτερη σε οξυνοσθέντα ορό.¹⁰ Στα εν λόγω αποτελέσματα βασίστηκε η δοκιμασία Ham, η οποία μαζί με τη δοκιμασία σουκρόζης του Hartmann¹¹ εφαρμόστηκαν για τη διάγνωση της ΝΠΑ, τουλάχιστον για 50 έτη, έως την ανακάλυψη της κυτταρομετρίας ροής. Το 1944, ο Dacie παρατήρησε για πρώτη φορά τη σχέση της ΝΠΑ με την απλασία σε έναν

ασθενή με αναιμία Fanconi,¹² ενώ λίγα χρόνια αργότερα, το 1966, μαζί με τον Rosse απέδειξαν ότι τα ερυθρά είναι ένα μωσαϊκό από κύτταρα με διαφορετική ευαισθησία στο συμπλήρωμα.^{13,14} Η απομόνωση ενός τύπου ισοενζύμου G6PD από τον «ευαίσθητο» στο συμπλήρωμα πληθυσμό, από τους Oni και Luzzatto, το 1970,¹⁵ τεκμηρίωσε αδρά την κλωνική φύση της νόσου και ενίσχυσε την υπόθεση του Dacie ότι ο φαινοτυπικός της μωσαϊκισμός είναι αποτέλεσμα σωματικής μετάλλαξης. Παράλληλα, η αποκάλυψη ότι τόσο τα ουδετερόφιλα όσο και τα αιμοπετάλια των ασθενών με ΝΠΑ είναι ευαίσθητα στο συμπλήρωμα¹⁶ συνηγορεί στο ότι η βλάβη στη νόσο εντοπίζεται στο mHSC. Το 1975, ο Low βασιζόμενος σε παρατηρήσεις προηγούμενων δεκαετιών, για την απουσία τουλάχιστον τριών διαφορετικών πρωτεϊνών από την επιφάνεια του «παθολογικού» πληθυσμού, όπως η ακετυλοχολινεστεράση των ερυθρών, η αλκαλική φωσφατάση των ουδετεροφίλων και η 5-νουκλεοτιδάση των λεμφοκυττάρων, πρότεινε ένα νέο μηχανισμό σύνδεσης στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω μιας «άγκυρας» γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (glycosyl-phosphatidyl-inositol, GPI).¹⁷ Έτσι, κατέστη αντιληπτό ότι το «βιοχημικό έλλειμμα» στη ΝΠΑ αφορούσε σε μια μετα-μεταφραστική διεργασία που συμμετέχει στην έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη του mHSC, επηρεάζοντας όλες τις κυτταρικές σειρές. Στη δεκαετία του 1980, η απομόνωση του DAF (decay accelerating factor, CD55) από την κυτταρική μεμβράνη με τη δράση της φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης-ειδικής φωσφολιπάσης C (phosphatidyl-inositol-specific phospholipase C, PI-PLC),^{18,19} καθώς και του MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis, CD59),²⁰ και η κατανόηση της σημασίας της απουσίας τους, ως ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος, ερμηνεύει άριστα την παθοφυσιολογία της αιμόλυσης στη ΝΠΑ. Τελικά, το 1993, με τη συνεχιζόμενη έρευνα, τον καθορισμό της δομής της GPI και με τη βοήθεια τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA, οι Takeda et al κατόρθωσαν να αποδείξουν ότι η μοριακή βλάβη στη ΝΠΑ ήταν μια γενετική μετάλλαξη που διαταράσσει τη βιοσύνθεση της «άγκυρας» αυτής,²¹ σε άλλοτε άλλο βαθμό.

Σήμερα, είναι γνωστό ότι η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ΝΠΑ είναι αποτέλεσμα μιας σωματικής μετάλλαξης του γονιδίου *PIG-A* (phosphatidyl-inositol glycan class A), που εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X (Χρ22.1), σε ένα mHSC. Έτσι, αποτελεί το μοναδικό γνωστό παράδειγμα επίκτητης γενετικής X-συνδεόμενης διαταραχής, που χαρακτηρίζεται βιοχημικά από ανεπαρκή έκφραση ή πλήρη έλλειψη από τη μεμβράνη των κυττάρων του αιμοποιητικού όλων εκείνων των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούν την «άγκυρα» GPI ως μηχανισμό πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη (GPI-anchored proteins, GPI-AP).¹ Συχνά, στο ίδιο άτομο απαντώνται περισσότεροι από

έναν κλώνο ΝΠΑ με διαφορετικές μεταλλάξεις του *PIG-A* γονιδίου και έτσι η νόσος χαρακτηρίζεται από γονοτυπικό και, κατ' επέκταση, φαινοτυπικό μωσαϊκισμό.³ Παρ' όλο που η παρουσία και ο βαθμός του βιοχημικού ελλείμματος, με τις συνοδές κυτταρικές διαταραχές, ερμηνεύουν και καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό κλινικές εκδηλώσεις, όπως η αιμόλυση, οι θρομβώσεις και οι λοιμώξεις, οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που διέπουν τη μυελική απλασία δεν έχουν διαλευκανθεί πλήρως. Μάλιστα, η σπάνια παρουσία *PIG-A(-)* κλώνων στα κύτταρα, τόσο του περιφερικού αίματος όσο και του μυελού των οστών, σε υγιή άτομα²² δημιουργεί ερωτήματα για το κατά πόσο η μοριακή βλάβη επαρκεί από μόνη της για την επιλογή, την επέκταση και την επικράτηση των παθολογικών κλώνων. Σύμφωνα με το μοντέλο της «διπλής παθογένεσης» των Rotoli και Luzzatto,²³ εκτός από τη σωματική μετάλλαξη του *PIG-A* γονιδίου, ένα περιβάλλον ανοσολογικά μεσολαβούμενης μυελικής ανεπάρκειας, όπου ο *GPI(-)* κλώνος έχει σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης στο μυελό των οστών, συμπληρώνει αδρά το μοτίβο της παθογένεσης της νόσου.^{1,24} Πρόσφατα δεδομένα από πειραματικά μοντέλα αναδεικνύουν το θεμελιώδη ρόλο των T- κυτταροτοξικών και ρυθμιστικών κυττάρων και της αλληλεπίδρασής τους με τα mHSC μέσω των μορίων του συμπλέγματος μείζονος ιστοσυμβατότητας (major histocompatibility complex, MHC), των αποπτωτικών μορίων και των αντι-αποπτωτικών μονοπατιών, καθώς και των ανασταλτικών κυτταροκινών στην αιμοποίηση της ΝΠΑ.²⁵

Κλείνοντας, αξίζει να σημειωθεί ότι η ΝΠΑ θεωρείται ως ο «μεγάλος υποδύμενος» ανάμεσα στα διάφορα νοσήματα του αιμοποιητικού συστήματος, λόγω της ποικιλίας των συμπτωμάτων που παρατηρούνται τόσο κατά την αρχική

εμφάνιση της νόσου, όσο και την κλινική της πορεία. Επί πλέον, η νόσος μπορεί να διαδράμει για αρκετά χρόνια χωρίς να έχει τεθεί η διάγνωση. Έτσι, η ανάπτυξη ευαίσθητων τεχνικών διάγνωσης της ΝΠΑ, όπως η κυτταρομετρία ροής υψηλής ευαισθησίας, επέτρεψε την ανίχνευση πολύ μικρών κλώνων ΝΠΑ (<1%),²⁶ που δεν θα εντοπιζόνταν διαφορετικά. Μάλιστα, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης δοκιμασίας, σε συνδυασμό με την ύπαρξη και το βαθμό της ενδαγγειακής αιμόλυσης, καθώς και τα ευρήματα από το μυελό των οστών, επιτρέπουν, σχηματικά, την ταξινόμηση της ΝΠΑ σε τρεις βασικές κλινικές μορφές (International PNH Interest Group): (α) Την «κλασική» ή «αιμολυτική» ΝΠΑ ή *de novo* ΝΠΑ, (β) το «ΝΠΑ-σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας» και (γ) την «υποκλινική» ΝΠΑ²⁶ (πίν. 1). Αν και ο αδρός αυτός διαχωρισμός είναι σχηματικός, εφ' όσον η φυσική ιστορία της νόσου χαρακτηρίζεται από πολύ μεγαλύτερη κλινική ετερογένεια, ωστόσο αποδεικνύεται θεμελιώδης στην επιλογή της καταλληλότερης θεραπευτικής προσέγγισης²⁷ (αντι-C5 μονοκλωνικό αντίσωμα, ανοσοκατασταλτική αγωγή, μεταμόσχευση μυελού των οστών κ.ά.). Έτσι, ο όρος «νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία», όπως χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά από τον Ολλανδό ιατρό J. Enneking το 1928,²⁸ αν και διαχρονικά χαρακτηριστικός, δεν αντικατοπτρίζει το ευρύ φάσμα της φυσικής ιστορίας της νόσου, καθώς περιγράφει μόνο ένα κλινικό χαρακτηριστικό, το οποίο εμφανίζεται σε ποσοστό <25% των ασθενών, παρά το γεγονός ότι οι φλεβικές θρομβώσεις, οι λοιμώξεις και η μυελική απλασία καθορίζουν εξ ίσου ή και σε μεγαλύτερο βαθμό τη βαρύτητα, την πρόγνωση και τη θεραπεία της νόσου. Καθώς, λοιπόν, η παθοφυσιολογία της νόσου θα γίνεται περισσότερο κατανοητή, η χρησιμοποίηση ενός πιο αντιπροσωπευτικού όρου για την ακριβή περιγραφή της νόσου φαίνεται απαραίτητη.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ) (International PNH Interest Group).

Ευρήματα/κατηγορία	Ρυθμός ενδαγγειακής αιμόλυσης*	Μυελός των οστών (ΜΟ)	Κυτταρομετρία ροής (ΚΡ)	Όφελος από θεραπεία με εκουλιζουμάμπη
«Κλασική» ΝΠΑ	Σοβαρή αιμόλυση (αρκετά αυξημένη LDH, συχνά με επεισόδια μακροσκοπικής αιματουρίας)	Νορμο- ή υπερ-κυτταρικός ΜΟ με κατά φύση ή σχεδόν κατά φύση μορφολογία**	Μεγάλος ΝΠΑ πληθυσμός (>50%) <i>GPI(-)</i> πολυμορφοκυττάρων	Υπάρχει
«ΝΠΑ-σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας»	Ήπια (συχνά με ελάχιστες διαταραχές στους βιοχημικούς δείκτες της αιμόλυσης)	Στοιχεία συνυπάρχοντος συνδρόμου μυελικής ανεπάρκειας (AA ή MDS)	Αν και ποικίλλει, το ποσοστό των <i>GPI(-)</i> πολυμορφοκυττάρων είναι συνήθως σχετικά χαμηλό (<10%)	Τυπικά όχι, αλλά ίσως ένα μικρό ποσοστό (<10%), που έχουν μεγάλους κλώνους και κλινικά σημαντική αιμόλυση
«Υποκλινική ΝΠΑ»	Χωρίς κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα αιμόλυσης	Στοιχεία συνυπάρχοντος συνδρόμου μυελικής ανεπάρκειας (AA ή MDS)	Πολύ μικρός (<1%) πληθυσμός <i>GPI(-)</i> πολυμορφοκυττάρων (υψηλής ευαισθησίας ΚΡ)	Δεν υπάρχει

* Βασιζόμενος στη μακροσκοπική αιματουρία, την LDH ορού και τα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ) περιφερικού αίματος

** Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες απαντώνται σπάνια

AA: Απλαστική αναμία, MDS: Myelodysplastic syndrome (μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο)

2. ΤΟ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΚΑΙ ΤΟ ΜΟΡΙΑΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

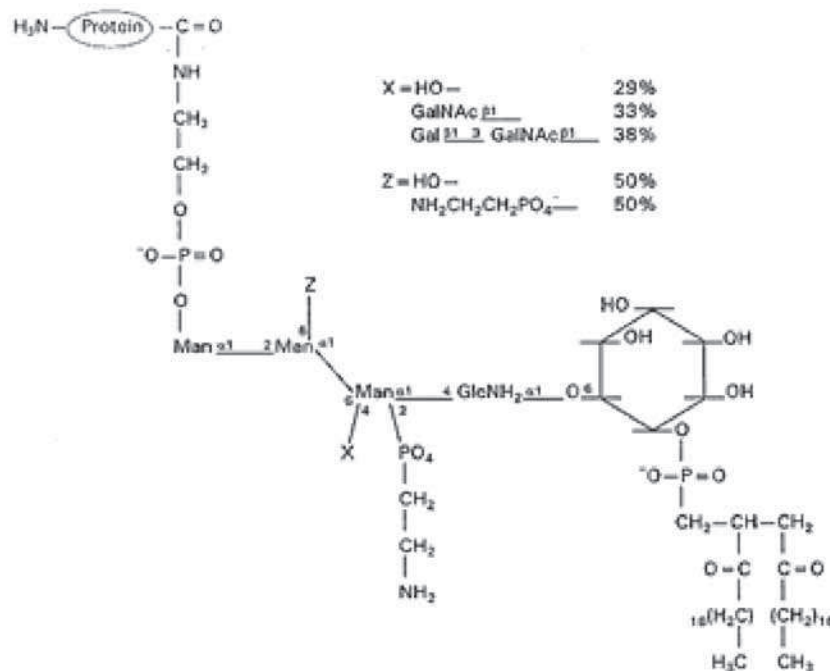
2.1. Δομή της GPI

Η περιγραφή ενός νέου μηχανισμού προσάρτησης των πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη από τον Low, διαφορετικό από την υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή που ενσωματώνεται στη διπλοστοιβάδα των φωσφολιπιδίων, συνέβαλε σημαντικά τόσο στην κατανόηση της βιολογίας της νόσου όσο και στην αποκάλυψη της γενετικής της προέλευσης.¹⁷ Έτσι, τα «παθολογικά» κύτταρα στη ΝΠΑ χαρακτηρίζονται από διαταραχή της βιοσυνθετικής οδού της «άγκυρας» GPI, οδηγώντας στην έλλειψη ή στην ανεπαρκή έκφραση των GPI-AP. Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος που κατέχει στην κυτταρική βιολογία αντικατοπτρίζεται από τον υψηλό βαθμό διατήρησής της και τη μεγάλη διασπορά της ανάμεσα στους διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.³⁰ Ο καθορισμός της δομής, της βιοσυνθετικής οδού και της βιολογικής λειτουργίας της έχει βασιστεί κυρίως σε παρατηρήσεις στο *Trypanosoma brucei*,³¹ του οποίου η βασική γλυκοπρωτεΐνη επιφανείας (variant specific glycoprotein, VSG), που επιτρέπει στο μικροοργανισμό να διαφεύγει της ανοσιακής απόκρισης του ξενιστή, συνδέεται με αυτή την «άγκυρα» στη μεμβράνη του.

Ο βασικός πυρήνας της δομής της GPI (εικ. 1) αποτελείται από τρία τμήματα: (α) Ένα μόριο φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης

(phosphatidyl-inositol, PI), στο οποίο συνδέεται ένα μόριο λιπαρού οξέος, (β) ένα μόριο «σώμα» γλυκάνης, αποτελούμενο από μόριο N-γλυκοζαμίνης (N-glucosamine, GlcN) και μια αλυσίδα από τρία μόρια μαννόζης (mannose, Man) και (γ) ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης (phosphoethanolamine, PEA), που προστίθεται στην τελευταία Man.³²

Η πρόσδεση της «άγκυρας» στη μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω ενός μορίου λιπαρού οξέος. Το γεγονός ότι η PI-PLC μπορούσε να απελευθερώσει από τη μεμβράνη των ουδετεροφίλων το ένζυμο της αλκαλικής φωσφατάσης αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ενός νέου μηχανισμού πρόσδεσης στην κυτταρική μεμβράνη. Η ειδική αυτή φωσφολιπάση διασπά το φωσφορικό δεσμό ανάμεσα στο λιπαρό οξύ και τη γλυκερόλη της PI.¹⁷ Ακόμη πιο σημαντικό ρόλο στη δομή της GPI διαδραματίζει το αμινοξύ που προσφέρει το καρβοξυτελικό άκρο για τη θέση ω, γιατί καθορίζει την πρωτεΐνη που θα συνδεθεί στην «άγκυρα». Όπως θα περιγραφεί παρακάτω, το γεγονός ότι μόνο συγκεκριμένα αμινοξέα μπορούν να βρεθούν στη θέση ω,³³ το αμινοξύ που προσφέρει το καρβοξυτελικό άκρο για τη σύνδεση της πρωτεΐνης με την GPI αποδεικνύεται κεφαλαιώδους σημασίας σε καταστάσεις ανεπαρκούς έκφρασης της «άγκυρας», αφού ο ανταγωνισμός μεταξύ των GPI-AP επηρεάζει την τελική μεμβρανική τους έκφραση και κατά συνέπεια καθορίζει δυνητικά τον κυτταρικό φαινότυπο, τις διαταραχές των κυττάρων του αίματος και τις κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ.



Εικόνα 1. Η βασική δομή του πυρήνα της «άγκυρας» GPI: (α) Ένα μόριο φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (στο οποίο μπορεί να συνδέεται ένα μόριο λιπαρού οξέος), (β) ένα σώμα γλυκάνης αποτελούμενο από ένα μόριο γλυκοζαμίνης και τρεις ομάδες μαννόζης, και (γ) ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης προσκολλημένο στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (από Μελέτης και συν).⁴⁹

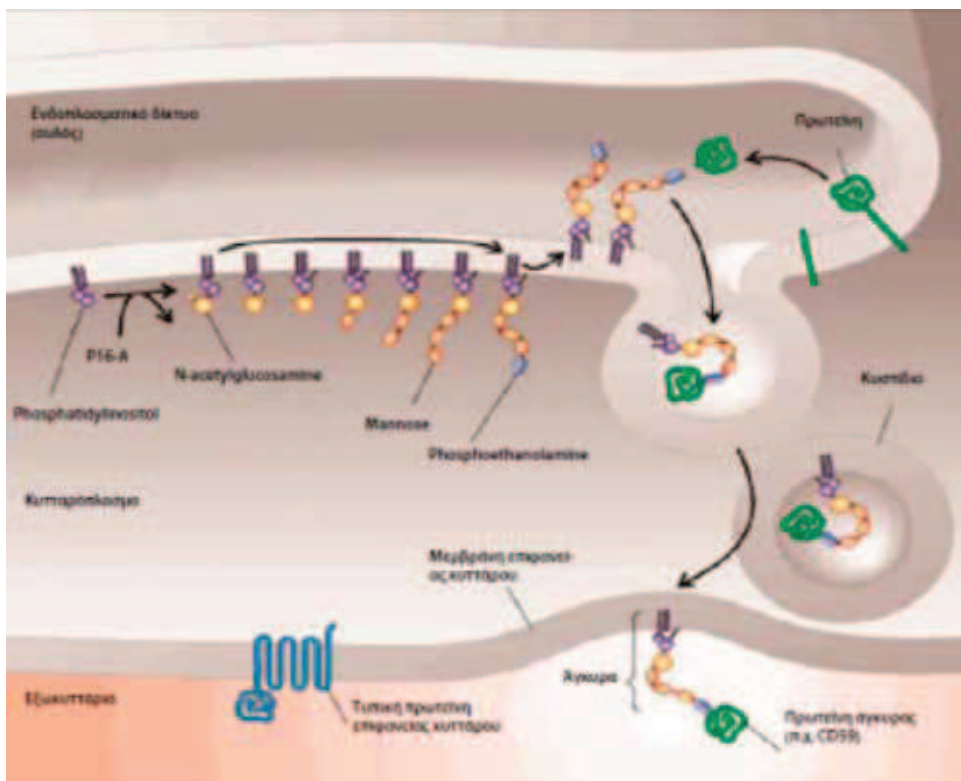
Στην ιδιότητα της αερολυσίνης, μιας τοξίνης που εκκρίνεται από το ανθρώπινο βακτηριακό παθογόνο *Aeromonas hydrophilia*, να συνδέεται εκλεκτικά με μεγάλη συγγένεια στον πυρήνα του μορίου της GPI (ethanolamine-HPO₄-6Man-α-1-2Man-α-1-6Man-α-1-4GlcNH₂1-6-*myo*-inositol 1HPO₄) και να σχηματίζει διαύλους στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο, στηρίζεται η εφαρμογή της FLAER (fluorescein-labeled proaerolysin variant) κυτταρομετρίας ροής, μιας ιδιαίτερα ευαίσθητης δοκιμασίας στη διάγνωση της ΝΠΑ.³⁴

2.2. Βιοσυνθετική οδός της GPI

Η βιοσύνθεση της GPI λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmatic reticulum, ER) και επιτελείται σχηματικά σε τέσσερα στάδια (εικ. 2). Η ακριβής θέση κάθε αντίδρασης δεν έχει αποσαφηνιστεί. Κάποια βήματα συμβαίνουν στην κυτταροπλασματική πλευρά του ER, ενώ άλλα

στον αυλό του. Σε αδρές γραμμές, αρχικά (α) προστίθεται ένα μόριο GlcNAc στην PI προκειμένου να σχηματιστεί η GlcNAc-PI. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στην κυτταροπλασματική πλευρά του ER και κατόπιν το αναπτυσσόμενο μόριο στρέφεται στον αυλό. Η GlcNAc (β) αποκετυλιώνεται και ένα μόριο παλμιτικού οξέος προστίθεται στην ινοσιτόλη, σχηματίζοντας έτσι την GlcN-PI, ενώ ακολουθούν (γ) τρεις μαννοζυλίωσεις (διαδοχική προσθήκη μορίων Man στην GlcN-PI), όπου ως δότης χρησιμοποιείται η δολιχουλ-φωσφορουλ-μαννόζη (dolichyl-phosphoryl-mannose, DPM). Στην τελευταία Man θα προστεθεί ένα μόριο φωσφορικού εστέρα αιθανολαμίνης (PEA). Τέλος, (δ) σε μια αντίδραση τρανσαμίνωσης στον αυλό του ER, η νεοσυντιθέμενη πρωτεΐνη προστίθεται στο νέο μόριο της GPI.³⁵

Η τελευταία αντίδραση «σηματοδοτείται» από μια ακολουθία στην πρωτεΐνη που περιλαμβάνει 11–15 υδρόφοβα αμινοξέα, μια μικρότερη υδρόφιλη ακολουθία και το αμινο-



Εικόνα 2. Βιοσυνθετική οδός της GPI στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα. Η βιοσύνθεση της «άγκυρας» αρχίζει στην κυτταροπλασματική πλευρά του ερυθροκυττάρου (ER), με τη μεταφορά της Ν-ακετυλο-γλυκοζαμίνης σε ένα μεμβρανικό φωσφολιπίδιο που καλείται φωσφατιδυλ-ινοσιτόλη. Μετά από προσθήκη μορίων, κυρίως μαννόζης, που δημιουργούν ένα μόριο γλυκοζυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI), η νεοσχηματιζόμενη πεπτιδική αλυσίδα μεταφέρεται στον αυλό του ER, όπου το υδροφιλικό της μέρος –συγκροτούμενο από ένα μόριο φωσφοαιθανολαμίνης– συνδέεται ομοιοπολικά με το καρβοξυτελικό άκρο της προ-πρωτεΐνης. Αφού μεταφερθεί στην κυτταρική επιφάνεια, η πρωτεΐνη προσδένεται στο κύτταρο μέσω της «άγκυρας», σε αντίθεση με τη συνήθη σύζευξη, όπου μια επιφανειακή πρωτεΐνη ενσωματώνει στο κύτταρο δικές της διαμεμβρανικές περιοχές. Μια βλάβη σε ένα οποιοδήποτε στάδιο της βιοσυνθετικής αυτής οδού δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή έκφραση όλων των πρωτεϊνών που συνδέονται μέσω της GPI στην κυτταρική μεμβράνη. Όπως θα περιγραφεί αναλυτικότερα παρακάτω, στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) η βλάβη εντοπίζεται στο αρχικό βήμα της οδού. Ανάμεσα στα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της «άγκυρας», μόνο το *PIG-A* εδράζεται στο χρωμόσωμα Χ, με αποτέλεσμα να υπάρχει μόνο ένα λειτουργικό αλληλόμορφο (λόγω της αδρανοποίησης), το οποίο «χάνεται» σε περίπτωση μετάλλαξης (από Μελέτης και συν).⁴⁹

ξύ που προσφέρει το καρβοξυτελικό άκρο, το οποίο καλείται θέση ω. Η θέση ω μπορεί να καταληφθεί από συγκεκριμένα αμινοξέα και η προτεραιότητα με την οποία συμμετέχουν στην αντίδραση της τρανσαμίνωσης καθορίζεται από την εξής σειρά: σερίνη > ασπαραγίνη > γλυκίνη > αλανίνη > ασπαρτικό οξύ >> κυστεΐνη > λευκίνη > βαλίνη >>> όλα τα υπόλοιπα αμινοξέα. Ενδεχομένως, υπάρχουν και άλλες, άγνωστες ακόμη, προϋποθέσεις, εκτός από το γεγονός ότι το αμινοξύ στη θέση ω+2 θα πρέπει να έχει μικρή πλευρική αλυσω. ³³ Η εν λόγω εξάρτηση της συγγένειας για τη σύνδεση της πρωτεΐνης στην GPI από τη θέση ω διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό του κυτταρικού φαινότυπου σε καταστάσεις ανεπαρκούς έκφρασης της GPI.

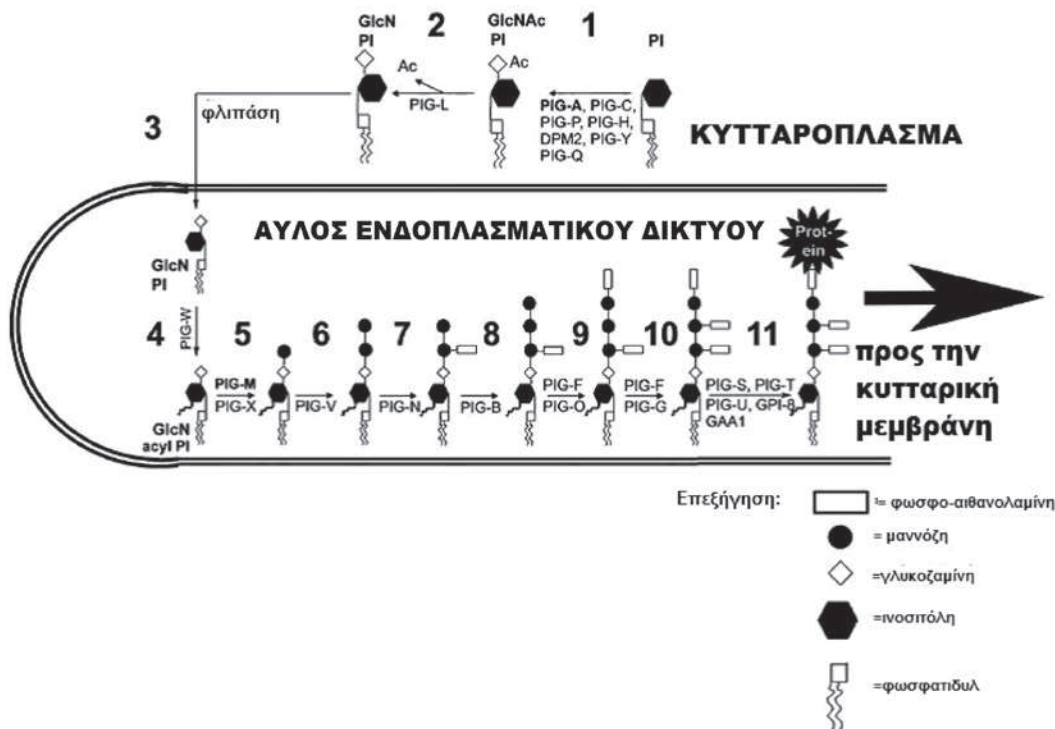
Κατόπιν, η αρτιγενής πρωτεΐνη, συνδεδεμένη με την «άγκυρα» GPI, μεταφέρεται στη συσκευή Golgi και από εκεί στην κυτταρική μεμβράνη, όπου εναποτίθεται σε ειδικές περιοχές, μεγέθους 50–350 nm, γνωστές ως «μικροτομείς» (microdomains) ή «λιπιδικές σχεδίες» (lipids rafts). Η συγκεκριμένη ειδική μεμβρανική κατανομή των GPI-AP σχετίζεται με την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω της προσέλευσης βοηθητικών μορίων. ³⁶

2.3. Το βιοχημικό «έλλειμμα» και η γενετική βλάβη στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Τα «παθολογικά» κύτταρα της ΝΠΑ χαρακτηρίζονται

από το γεγονός ότι αδυνατούν να συνθέσουν ή συνθέτουν ελάχιστα ποσά της «άγκυρας» GPI. Τουλάχιστον 11 βήματα-αντιδράσεις αποτελούν το βιοσυνθετικό μονοπάτι της GPI, ενώ έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 20 υπεύθυνα γονίδια ^{35,37} (εικ. 3). Θεωρητικά, η βλάβη σε οποιοδήποτε σημείο της οδού αυτής θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε ανεπαρκή έκφραση ή έλλειψη των GPI-AP από την κυτταρική επιφάνεια και την κλινική εκδήλωση της ΝΠΑ. Ωστόσο, η μεταβολική σήμανση πρόδρομων μορίων στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της «άγκυρας» ανέδειξε σχεδόν απόλυτη απουσία ενδιάμεσων προϊόντων που περιέχουν γλυκοζαμινικά ή παράγωγα Man, ³⁸ υποδεικνύοντας ότι το έλλειμμα στο μονοπάτι εντοπίζεται στο πρώτο βήμα. Αυτό αφορά στη μεταφορά της GlcNAc από την ουριδίνη 5'-διφωσφορική GlcNAc (UDP-GlcNAc) στην PI για το σχηματισμό της GlcNAc-PI. Η εν λόγω αντίδραση καταλύεται από την GlcNAc:PI α1-6 GlcNAc τρανσφεράση, ένα ενζυμικό σύμπλεγμα του οποίου οι υπομονάδες κωδικοποιούνται από τουλάχιστον 7 διαφορετικά γονίδια: *PIG-A*, ³⁹ *PIG-C*, ⁴⁰ *PIG-H*, ⁴¹ *GPI1*, ⁴² *PIG-Y*, ⁴³ *PIG-P* και *DPM2*. ⁴⁴

Ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του 1970 είχαν δημιουργηθεί 9 διακριτές συμπληρωματικές ομάδες (A-I) Thy-1⁺ λεμφοματικών κυτταρικών σειρών ποντικού, για τη μελέτη της έκφρασης μορίων της κυτταρικής επιφάνειας. Μάλιστα, το γεγονός ότι το Thy-1 ήταν GPI-συνδεδεμένο στη μεμβράνη αποδείχθηκε ευτυχής συγκυρία. ⁴⁵ Έτσι, εκμεταλλεόμενοι



Εικόνα 3. Τα 11 βήματα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της GPI, σε συνάρτηση με τα ένζυμα που συμμετέχουν σε κάθε βήμα (από Almeida et al). ³⁷

το μωσαϊκισμό της ΝΠΑ και αναπτύσσοντας GPI(+) και GPI(-) κυτταρικές σειρές από ασθενείς με ΝΠΑ, οι Takeda et al (Osaka group) παρατήρησαν την αποκατάσταση της έκφρασης της GPI σε όλες τις «παθολογικές» κυτταρικές σειρές μετά από σύντηξη με όλες τις συμπληρωματικές ομάδες, με εξαίρεση την τάξη A. Μάλιστα, οι GPI(-) κυτταρικές σειρές, αλλά όχι οι GPI(+), είχαν όμοιο έλλειμμα στη βιοσυνθετική οδό με τα τάξης A Thy-1-λεμφωματικά κύτταρα. Το υπεύθυνο γονίδιο, το οποίο απουσιάζει στη συμπληρωματική ομάδα A, ταυτοποιήθηκε και έλαβε το όνομα *PIG-A* (phosphatidylinositol glycan complementation class A). Η επιμόλυνση GPI(-) κυτταρικών σειρών με *PIG-A* cDNA διόρθωνε την έκφραση των GPI-AP στην κυτταρική μεμβράνη, ενώ διακριτές, λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις του *PIG-A* ανευρέθηκαν μόνο στις GPI(-) σειρές, και όχι στις GPI(+), αποδεικνύοντας ότι πρόκειται για σωματικές παρά για γενετικές μεταλλάξεις. Επί πλέον, τα ουδετερόφιλα έφεραν τις ίδιες *PIG-A* μεταλλάξεις με αυτές των GPI(-) λεμφικών κυτταρικών σειρών, υποδεικνύοντας ότι η γονιδιακή βλάβη εντοπίζεται στο mHSC. Έως σήμερα, μεταλλάξεις του *PIG-A* έχουν απομονωθεί από τη συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών με ΝΠΑ, με την ίδια συχνότητα ανάμεσα στα δύο φύλα, λόγω του γεγονότος ότι αποτελεί το μόνο γονίδιο της βιοσυνθετικής οδού της GPI που εδράζεται στο χρωμόσωμα X και του φαινομένου της «αδρανοποίησης» του (όλα τα υπόλοιπα γονίδια εδράζονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα).²¹ Όπως θα γίνει εμφανές παρακάτω, ο προσδιορισμός του γενετικού υπόβαθρου της ΝΠΑ ερμηνεύει απόλυτα το φαινοτυπικό μωσαϊκισμό της νόσου και αναδεικνύει την ολιγοκλωνική φύση της.

2.4. *PIG-A* γονίδιο και νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Παρά το μεγάλο αριθμό γονιδίων που συμμετέχουν στη σύνθεση της «άγκυρας» GPI (εικ. 4), η έλλειψη των GPI-AP από τη μεμβράνη των κυττάρων του αιμοποιητικού στους ΝΠΑ ασθενείς (πίν. 2), στη συντριπτική πλειοψηφία τους, είναι άμεση συνέπεια σωματικής μετάλλαξης στο φυλοσύνδετο γονίδιο *PIG-A* ενός mHSC.^{21,39,46} Πράγματι, το πλέον αρχέγονο κύτταρο του αιμοποιητικού στο οποίο έχει ανιχνευτεί απουσία των GPI-AP έχει ανοσοφαινότυπο CD34(+)/CD38(-).⁴⁷ Έτσι, η ΝΠΑ αποτελεί το πρώτο παράδειγμα επίκτητης γονιδιακής διαταραχής που δεν κληρονομείται ούτε μεταδίδεται στους απογόνους. Οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε όλες τις κυτταρικές σειρές του αιμοποιητικού και τα «παθολογικά» κύτταρα ανήκουν στον ίδιο κλώνο.^{21,48,49}

Το γονίδιο *PIG-A*, μήκους 17 kb, εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος X, στη θέση Xp22.1, και απο-

τελείται από 6 εξόνια⁵⁰ (εικ. 5). Το πρώτο εξόνιο είναι πολύ μικρό και δεν μεταφράζεται. Το δεύτερο εξόνιο κωδικοποιεί το ήμισυ περίπου της ώριμης πρωτεΐνης και ακολουθείται από τρία μικρότερα εξόνια. Το τελευταίο εξόνιο κωδικοποιεί

ΣΤΑΔΙΟ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ UDP-GlcNAc → GlcNAc-PI

Όνομα γονιδίου	Εντόπιση
PIG-A	Xp22.1
PIG-C	1q23.3
PIG-H	14q11-q24
PIG-P	21q22.2
GPI (PIG-Q)	16p13.3
DPM2	9q33
PIG-Y	4q21

ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΣΤΑΣΙΑ

Όνομα γονιδίου	Εντόπιση
PIG-L	17p12
PIG-M	1q22
PIG-N	18q21
PIG-B	15q21-p21
PIG-F	2q16-p21
PIG-O	9
DPM1	20q13.1
DPM3	1q21.2
SL15 (MPDU1)	17p13.1
PIG-V	1p36.11
PIG-W	17p12
PIG-X	3q29

ΣΤΑΔΙΟ ΤΡΑΝΣΑΜΙΝΩΣΗΣ

Όνομα γονιδίου	Εντόπιση
GPIB (PIG-K)	1p22.2-p22.3
GAA1 (GPA1)	8q24.3
PIG-S	17
PIG-T	20q12-q13
PIG-U	20q11

Εικόνα 4. Γονίδια που λαμβάνουν μέρος στη βιοσύνθεση της «άγκυρας» GPI σε αδρή συνάρτηση με τη βιοσυνθετική οδό της εν λόγω πρωτεΐνης. Για το σχηματισμό του πρόδρομου μορίου της «άγκυρας» GPI συμμετέχουν περίπου 10 διαφορετικά ένζυμα, ενώ καθένα από αυτά κωδικοποιείται από διαφορετικά γονίδια (Από Wyrick-Glatzel et al, *Labmed* 2006, 37:237-243). Αξίζει να σημειωθεί ότι, από το συγκεκριμένο σύνολο των γονιδίων, μόνο το *PIG-A* εδράζεται στο χρωμόσωμα X. Η σημασία της εντόπισής του στο χρωμόσωμα X, όπως θα αναλυθεί ακόμη περισσότερο παρακάτω, είναι η αιτία για την οποία στη συντριπτική πλειονότητα των περιπτώσεων η νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) δεν έχει αναφερθεί ως μετάλλαξη άλλου γονιδίου εκτός από το *PIG-A*, καθώς όλα τα υπόλοιπα εδράζονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Έτσι, μία μόνο μετάλλαξη στη θέση Xp22 αρκεί για τη μερική ανεπάρκεια ή την απώλεια του μεταφραστικού προϊόντος του συγκεκριμένου γονιδίου (ακόμη και στα θήλεα, λόγω της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος). Ο βιοσυνθετικός δρόμος παραγωγής της GPI και το βιοχημικό υπόβαθρο της νόσου περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω (από Μελέτης και συν).⁴⁹

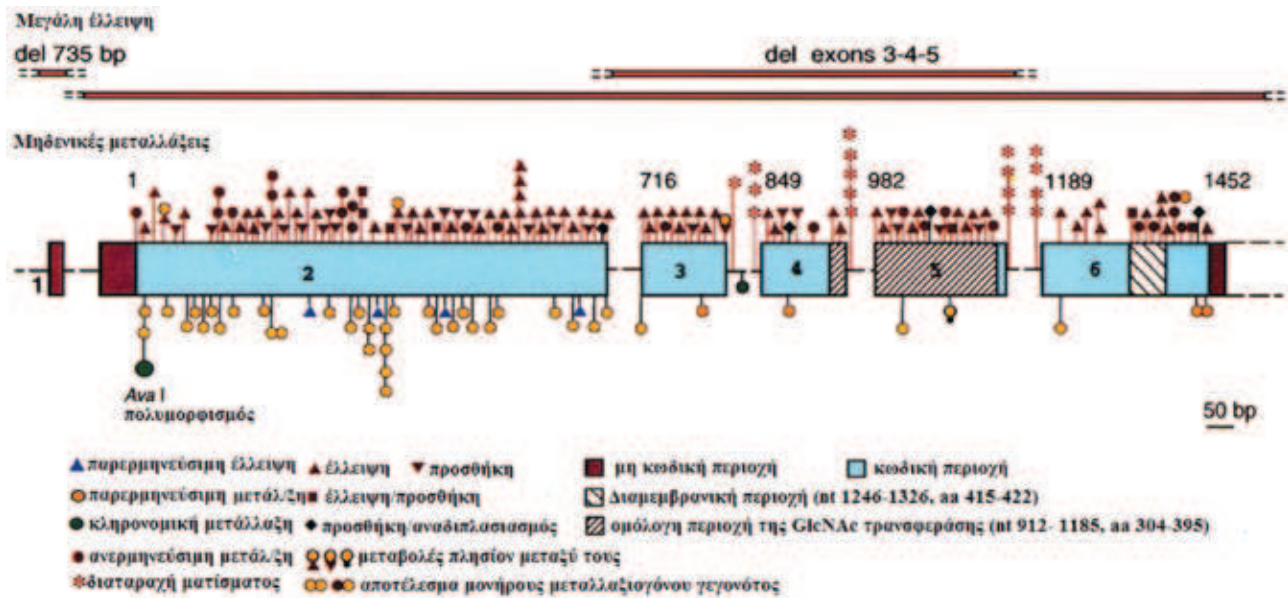
Πίνακας 2. GPI-APs που απουσιάζουν από τα κύτταρα του αίματος στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ).

Αντιγόνο	Μεμβράνη έκφρασης
<i>Ενζυμα</i>	
Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	Ερυθρά
5'-εκτονουκλεοτιδάση (CD73)	Αρκετά B- και T-λεμφοκύτταρα
Αλκαλική φωσφατάση πολυμορφοπυρήνων (NAP)	Πολυμορφοπύρηνα
<i>Μόρια προσκόλλησης</i>	
Blast-1/CD48	Λεμφοκύτταρα
LFA-3 ή CD58	Όλα τα κύτταρα του αίματος
CD67	Πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα
CD66	Πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα
<i>Πρωτεΐνες επιφανείας που ρυθμίζουν το συμπλήρωμα</i>	
Decay-accelerating factor (DAF ή CD55)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
Homologous restriction factor-60 (HRF-60 ή C8bp)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
Membrane-inhibitor of reactive lysis (MIRL ή CD59 ή HRF-20)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
<i>Υποδοχείς</i>	
Fcγ υποδοχέας III (FcγRIII ή CD16)	Πολυμορφοπύρηνα, NK, μακροφάγα, αρκετά T-λεμφοκύτταρα
Monocyte differentiation antigen (CD14)	Μονοκύτταρα, μακροφάγα, κοκκιοκύτταρα
Urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR)	Μονοκύτταρα, κοκκιοκύτταρα
<i>Αντιγόνα ομάδων αίματος</i>	
Αντιγόνα Cromer (DAF)	Ερυθρά
Αντιγόνα Yt (AChE)	Ερυθρά
Αντιγόνο Holley Gregory	Ερυθρά
Αντιγόνο John Milton Hagen (JMh)	Ερυθρά, λεμφοκύτταρα
Υπόλειμμα Dombrock	Ερυθρά
<i>Αντιγόνο πολυμορφοπυρήνων</i>	
NA1/NA2 (CD16)	Πολυμορφοπύρηνα
NB1/NB2	Πολυμορφοπύρηνα
<i>Άλλες πρωτεΐνες επιφανείας με άγνωστη λειτουργία</i>	
Αντιγόνο CAMPATH-1 (CDw52)	Όλα τα κύτταρα του αίματος
CD24	B-T-λεμφοκύτταρα, πολυμορφοπύρηνα, ηωσινόφιλα

την υπόλοιπη πρωτεΐνη και φέρει μια μη μεταφραζόμενη αλληλουχία. Το mRNA αποτελείται από μια κύρια μεταφραζόμενη αλληλουχία μήκους 3,8 kb και δύο μικρότερες περιοχές μήκους 3,3 και 2,8 kb που δεν μεταφράζονται. Έτσι, το γονίδιο *PIG-A* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη, την *rig-A*, μεγέθους 54 kD, αποτελούμενη από 484 αμινοξέα.⁵¹ Η πρωτεΐνη αυτή είναι απαραίτητη υπομονάδα του ενζυμικού συμπλέγματος μιας τρανσφεράσης που καταλύει το πλέον πρώιμο βήμα στο σχηματισμό της GPI, ενώ το cDNA του αποκαθιστά το «έλλειμμα» στα λεμφωματικά κύτταρα ποντικού τάξης A και στα «παθολογικά» GPI(-) κύτταρα των ΝΠΑ ασθενών.²¹

Το γεγονός ότι το *PIG-A* εδράζεται στο χρωμόσωμα X είναι εξαιρετικής σημασίας, καθώς μπορεί να εξηγήσει το

γιατί η συντριπτική πλειοψηφία των περιπτώσεων ΝΠΑ ανήκουν στη συμπληρωματική τάξη A. Όπως συμβαίνει στην περίπτωση φυλοσύνδετων διαταραχών, θα αναμενόταν μια σημαντική επικράτηση των αρρένων έναντι των θηλέων ασθενών, καθώς οι πρώτοι φέρουν ένα μοναδικό αλληλόμορφο για ένα γενετικό τόπο. Ωστόσο, η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X στα θήλεα άτομα «μεταμορφώνει» τα σωματικά κύτταρα σε «απλοειδή» για ένα γενετικό τόπο, κι έτσι χαρακτηρίζονται από σωματικό κυτταρικό μωσαϊσμό [παρουσία δύο διακριτών κυτταρικών πληθυσμών, *PIG-A*(+) και *PIG-A*(-) στο μυελό και στο περιφερικό αίμα], που αποτελεί άλλωστε και θεμελιώδες χαρακτηριστικό της ίδιας της νόσου, ανεξάρτητα του φύλου. Έτσι, μία μόνο σωματική μετάλλαξη σε ένα mHSC, που συμβαίνει μετά



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της δομής και των μεταλλάξεων του γονιδίου *PIG-A*. Οι κωδικές περιοχές αναπαριστώνται με κουτιά, τα ιντρόνια (introns) με γραμμές, ο αριθμός των νουκλεοτιδίων (nt) πάνω από τα εξόνια (exons). Οι μηδενικές μεταλλάξεις (null mutations), όπως μεταβολές πλαισίου ανάγνωσης (frame-shift), ανερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (nonsense) και αυτές που οδηγούν σε διαταραχή του ματίσματος (splice site), απεικονίζονται πάνω από το γονίδιο. Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense) και ελλείψεις που δεν μεταβάλλουν το πλαίσιο ανάγνωσης (in-shift deletions) απεικονίζονται κάτω από το γονίδιο. Όλες οι μεταλλάξεις είναι σωματικές, εκτός του πολυμορφισμού, που απεικονίζεται με πράσινο χρώμα (από Luzzato και Nafa, τροποποιημένο).⁵²

την «αδρανοποίηση» του χρωμοσώματος X, αρκεί για τη δημιουργία του ΝΠΑ φαινότυπου, ερμηνεύοντας την παρατηρούμενη όμοια επίπτωση της ΝΠΑ ανάμεσα στα δύο φύλα. Όλα τα υπόλοιπα γονίδια που εμπλέκονται στη σύνθεση της «άγκυρας» είναι αυτοσωμικά^{50,51} και συνεπώς οι λειτουργικά σημαντικές μεταλλάξεις πρέπει να εντοπίζονται και στα δύο αλληλόμορφα, ώστε να διαταραχθεί η παραγωγή της GPI.

Μέχρι σήμερα, τουλάχιστον 180 μεταλλάξεις του *PIG-A* έχουν ανιχνευτεί στα κύτταρα του αιμοποιητικού ΝΠΑ ασθενών,⁵² ενώ λίγες από αυτές έχουν επαναληφθεί, χωρίς να έχει ενοχοποιηθεί κάποιος μεταλλαξιογόνος παράγοντας (ιονίζουσα ακτινοβολία, χημειοθεραπεία κ.ά.),⁵³ εκτός από τη χλωραμφενικόλη σε ορισμένους ασθενείς με απλαστική αναιμία (AA),⁵⁴ οι οποίοι στη συνέχεια παρουσίασαν ΝΠΑ. Αν και εξαπλώνονται σε όλη την κωδική περιοχή, η υψηλότερη συχνότητα εντοπίζεται στο εξόνιο 2, ίσως επειδή είναι το μεγαλύτερο. Τα 2/3 των περιπτώσεων αφορούν σε μικρές ελλείψεις (deletions), μικρές προσθήκες (insertions) ή μικρές ελλείψεις-προσθήκες, που προκαλούν μεταβολή του πλαισίου ανάγνωσης (frame-shift mutations) ή σε ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού (nonsense), οδηγώντας σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη *rig-A* (*rig-A*₀). Μεγάλες ελλείψεις (>100 νουκλεοτίδια) έχουν περιγραφεί μόνο σε δύο περιπτώσεις, ενώ μία ολική έλλειψη του *PIG-A* και δύο μικροί διπλασιασμοί έχουν αναφερθεί επίσης. Ελλείψεις στον

εκκινητή έχουν αναφερθεί και οδηγούν σε μερική έκφραση των GPI-AP στην κυτταρική επιφάνεια. Το υπόλοιπο 1/3 των μεταλλάξεων αφορά σε σημειακές μεταλλάξεις. Τρεις τύποι έχουν περιγραφεί ως σήμερα: (α) Αυτές που διαταράσσουν την τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ενδοκυττάριας αποδόμησής της, (β) εκείνες που οδηγούν σε πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού και (γ) μεταλλάξεις που επηρεάζουν το μέγεθος και τη σταθερότητα του m-RNA (splice site mutations). Παράλληλα, έχουν αναφερθεί σημειακές μεταλλάξεις στον προαγωγό και την 3'-αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου.⁵²

Το πιο συχνό αποτέλεσμα των μεταλλάξεων του *PIG-A* είναι η δημιουργία ενός πρόωρου κωδικονίου τερματισμού, καθώς και η διαταραχή του ματίσματος του m-RNA.⁵² Αμφότερα καταλήγουν σε μια μη λειτουργική πρωτεΐνη που αποδομείται ενδοκυττάρια, προκαλώντας την πλήρη απουσία των GPI-AP (μηδενικός φαινότυπος, null phenotype) από την επιφάνεια των κυττάρων του αίματος (τύπου III ΝΠΑ κύτταρα). Από την άλλη, αν και κάποιες “missense” μεταλλάξεις οδηγούν στην πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας της GPI και άλλες δημιουργούν ένα μεταφραστικό προϊόν με υπολειπόμενη λειτουργικότητα, θα εμφανιστεί μια μικρή, ποικίλουσα, έκφραση των GPI-AP (τύπου II ΝΠΑ κύτταρα).⁵⁵ Στην τελευταία περίπτωση, εμφανίζεται ανταγωνισμός μεταξύ των πρωτεϊνών που θα συνδεθούν στην «άγκυρα» GPI. Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν το καταλληλότερο αμινοξύ για

τη θέση ω εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια και συνεπώς θα ανιχνευτούν σε υψηλότερα ποσοστά στην επιφάνεια του κυττάρου. Για παράδειγμα, σε πολυμορφοπύρηνια με μερική ανεπάρκεια του μορίου της GPI, η μεμβρανική έκφραση του FcγIII υποδοχέα (CD16) είναι μεγαλύτερη, συγκριτικά με το CD55 ή το CD59.⁵⁶ Από την άλλη, η μη αποτελεσματική βιοσύνθεση της «άγκυρας» GPI δυνητικά έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη ανοσοπαρουσίαση αντιγονικών επιτόπων της, καθώς και των GPI-AP, στην κυτταρική μεμβράνη του mHSC, μέσω των μορίων MHC.⁵⁷

Η αδυναμία των ανθρώπινων εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων, σε πειραματικά μοντέλα, όπου το γονίδιο *PIG-A* είχε απενεργοποιηθεί, να σχηματίσουν τροφοβλάστη υπέδειξε ότι η απουσία κάποιας GPI-AP και, συγκεκριμένα, των συνυποδοχέων της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης-4 (bone morphogenetic protein-4, BMP-4) από τη μεμβράνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αύξηση και στη διαφοροποίηση.⁵⁸ Έτσι, η μετάλλαξη του *PIG-A* στα γεννητικά κύτταρα φαίνεται ότι είναι ασύμβατη με τη ζωή, εξηγώντας το λόγο που έχουν παρατηρηθεί μόνο σωματικές μεταλλάξεις. Πρόσφατα, οι Johnston et al περιέγραψαν για πρώτη φορά την παρουσία κληρονομικής ΝΠΑ σε μια οικογένεια, λόγω μιας μετάλλαξης τύπου “nonsense” στο τελευταίο εξόνιο του γονιδίου *PIG-A* στα γεννητικά κύτταρα. Αποτέλεσμα ήταν η δημιουργία μιας υπολειμματικής πρωτεΐνης, ακολουθίας μεγέθους 109 αμινοξέων, της οποίας απουσίαζε το καρβοξυτελικό άκρο. Τα θήλεα άτομα ήταν ασυμπτωματικοί φορείς, ενώ 3 άρρενα νεογνά εμφάνισαν δυσμορφικό προσώπιο με συνοδό δυσπλασία του σκελετού, του εγκεφάλου, της καρδιάς και των πνευμόνων, και τελικά απεβίωσαν εντός του πρώτου μήνα από τη γέννησή τους. Μάλιστα, η μερική αποκατάσταση της έκφρασης των GPI-AP, ύστερα από τη μεταμόρφωση *PIG-A*₀ κυτταρικών σειρών με το cDNA που έφερε την υπό μελέτη μετάλλαξη, αντανάκλασε ότι ακόμη και η υπολειπόμενη λειτουργικότητα της «άγκυρας» GPI είναι απαραίτητη στην εμβρυϊκή ζωή. Ωστόσο, η νεογνική θνητότητα που παρατηρήθηκε στην οικογένεια αντικατοπτρίζει τη ζωτική σημασία της δομικής ακεραιότητας του *PIG-A* στην εμβρυογένεση.⁵⁹

Τέλος, η ανεύρεση τουλάχιστον δύο διακριτών κλώνων (με διαφορετική μετάλλαξη του *PIG-A*), με ταυτόχρονη συνύπαρξη και φυσιολογικής αιμοποίησης, στο ήμισυ και πλέον των ασθενών με ΝΠΑ,^{24,55} σε συνδυασμό με την περίπτωση ενός ασθενούς με αλλογενή μεταμόσχευση μυελού των οστών, όπου κατά την υποτροπή μία δεκαετία μετά η μετάλλαξη ήταν διαφορετική από την αρχική,⁶⁰ είναι σημαντικές για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας της νόσου. Οι συγκεκριμένες παρατηρήσεις ενισχύουν την άποψη ότι το μυελικό μικροπεριβάλλον συμμετέχει ενεργά στην επιλογή, στην επέκταση και στην επικράτηση

του παθολογικού κλώνου, διεργασίες οι οποίες δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη πλήρως.

2.5. Άλλοι μηχανισμοί ανεπάρκειας των GPI-AP

Σπάνιοι εναλλακτικοί μηχανισμοί που οδηγούν σε ανεπάρκεια των GPI-AP από την κυτταρική μεμβράνη έχουν επίσης ανακαλυφθεί. Κατά κύριο λόγο αφορούν σε μοριακές βλάβες στα γονίδια που μετέχουν στη βιοσύνθεση της GPI, ενισχύοντας τη σημασία της στη φυσιολογική ανάπτυξη και στην ομοίωση του ανθρώπινου οργανισμού.

Η μια περίπτωση αφορά σε δύο διαφορετικές οικογένειες με κληρονομική αδυναμία σύνθεσης της «άγκυρας» GPI, λόγω μετάλλαξης στον προαγωγό του γονιδίου *PIG-M*. Ως συνέπεια ήταν μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή, η οποία χαρακτηριζόταν από μειωμένη έκφραση όλων των GPI-AP από την κυτταρική μεμβράνη. Οι ασθενείς εμφάνισαν ενδοκοιλιακές θρομβώσεις (όπως στην ηπατική και στην πυλαία φλέβα) στην ηλικία των 2 ετών, ενώ αργότερα παρουσίασαν ανθεκτικές στη θεραπεία επιληπτικές κρίσεις, τύπου αφαίρεσης. Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι η ανεπάρκεια των GPI-AP διακυμαινόταν ανάμεσα στα διάφορα κύτταρα και στους ιστούς. Έτσι, τα πολυμορφοπύρηνια παρουσίαζαν σχεδόν απόλυτη απουσία της έκφρασης των GPI-AP στη μεμβράνη τους, ενώ τα ερυθρά είχαν φυσιολογική έκφραση. Κατ' αυτόν τον τρόπο, απουσίαζε η αναιμία και η αιμόλυση. Ομοίως, απύσα ήταν και η μυελική ανεπάρκεια στους εν λόγω ασθενείς.^{61,62}

Ασθενείς με υπερφωσφαταιμικό σύνδρομο διανοητικής διαταραχής (*hyperphosphatasia mental retardation syndrome, HPMR*), γνωστό και ως σύνδρομο *Mabry*. Πρόκειται για έναν αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο διανοητικής διαταραχής με χαρακτηριστικό προσώπιο, νευρολογικές διαταραχές και αυξημένη αλκαλική φωσφατάση ορού, που οφείλεται σε “missense” μεταλλάξεις του γονιδίου *PIG-V*.⁶³ Στους ασθενείς με «σύνδρομο πολλαπλών συγγενών ανωμαλιών-υποτονίας-επιληψίας» (*multiple congenital anomalies hypotonia seizures syndrome, MCAHS*) ανιχνεύτηκε μια “missense” κληρονομική μετάλλαξη του *PIG-N* γονιδίου, που κωδικοποιεί τη φωσφορική τρανσφεράση-1 της αιθινολαμίνης. Οι ασθενείς αυτοί εμφάνισαν μειωμένη έκφραση του CD59 από τη μεμβράνη των ινοβλαστών, χωρίς όμως κάποιο κλινικό εύρημα από τη χαρακτηριστική τριάδα της ΝΠΑ.⁶⁴ Τρεις διαφορετικές κυτταρικές σειρές λεμφώματος Burkitt, καθώς και πρωταρχικά κύτταρα μετά από καλλιέργεια κυττάρων ασθενών με λέμφωμα Burkitt, βρέθηκαν να παρουσιάζουν σημαντικά μειωμένη έκφραση των GPI-AP, λόγω μεταγραφικής σίγασης του *PIG-Y* ή και του *PIG-L*.⁶⁵

Πρόσφατα, οι Krawitz et al περιέγραψαν μια περίπτωση ΝΠΑ χωρίς σωματική μετάλλαξη του *PIG-A*. Προκειμένου να

διαλευκανθεί το γενετικό υπόβαθρο της νόσου, οι ερευνητές προχώρησαν σε μεθόδους ανάλυσης του DNA σε όλα τα εξόνια των γονιδίων που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση της «άγκυρας» GPI. Έτσι, ταυτοποιήθηκε η παρουσία ετερόζυγης γεννητικής, τύπου “splice site”, μετάλλαξης στο *PIG-T* και μια σωματική έλλειψη 8 mb, στην κοκκιώδη σειρά, που επηρέαζε το άλλο αλληλόμορφο. Ενώ μια γενετική βλάβη στο *PIG-A* γονίδιο οδηγεί σε διαταραχή της σύνθεσης της GPI, το *PIG-T* είναι απαραίτητο για τη διαδικασία της σύνδεσης της πρωτεΐνης στην «άγκυρα» GPI. Μάλιστα, εφ’ όσον εδράζεται σε αυτοσωμικό χρωμόσωμα, απαιτούνται δύο μεταλλάξεις ώστε να μην παραχθεί το μεταφραστικό του προϊόν. Έτσι, η εν λόγω αναφορά αποτελεί το πρώτο γνωστό παράδειγμα ότι ο φαινότυπος ΝΠΑ μπορεί να εκδηλωθεί ακόμη και παρουσία ενός φυσιολογικού μορίου GPI, όταν η πρόσδεση των GPI-AP σε αυτήν σε ένα mHSC δεν είναι εφικτή.⁶⁶

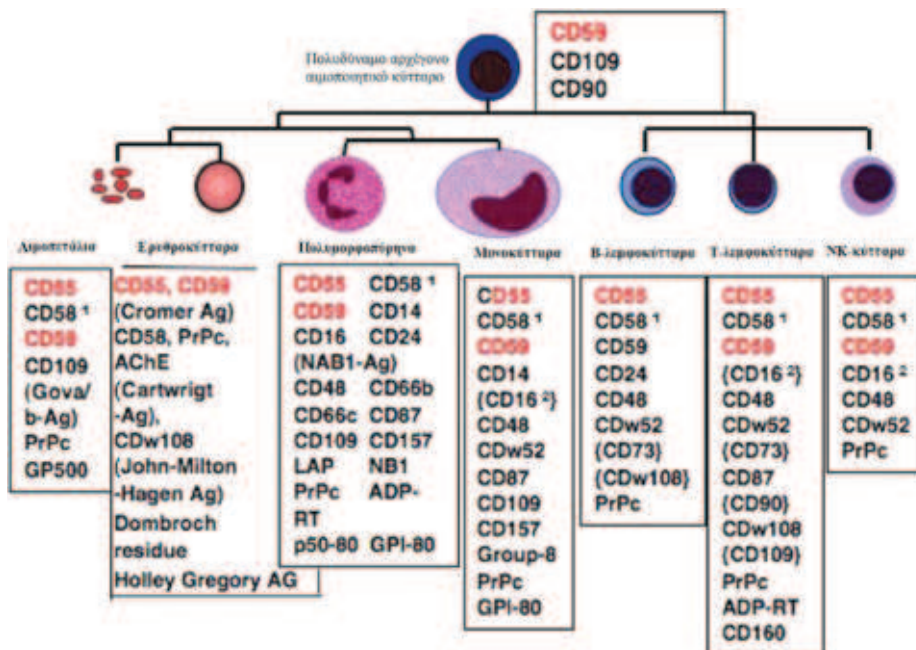
Τέλος, αν και δεν σχετίζεται με κάποιο γονίδιο στη βιοσύνθεση της GPI, η μοναδική περίπτωση ενός ασθενούς με καθολική έλλειψη του CD59, λόγω “frame-shift” μετάλλαξης του υπεύθυνου γονιδίου, οδήγησε στην εμφάνιση κλινικής εικόνας παρόμοιας με τη ΝΠΑ, όπως επεισοδίων σημαντικού μεγέθους αιμόλυσης διαμεσολαβούμενης από το συμπλήρωμα και αρτηριακής θρόμβωσης.⁶⁷ Από την άλλη, άτομα με το σπάνιο φαινότυπο ομάδας αίματος Inab ή Dr(a-), που

χαρακτηρίζονται από απουσία ή ανεπάρκεια του CD55 από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, δεν εμφανίζουν αιμόλυση στη δοκιμασία Ham, παρά την αυξημένη εναπόθεση, κατά περίπου 20 φορές, C3 κλάσματος του συμπληρώματος.^{68,69} Ο ρόλος αυτών των δύο GPI-AP στην παθοφυσιολογία της νόσου θα αναλυθεί παρακάτω.

3. ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΗΣ «ΑΓΚΥΡΑΣ» GPI (GPI-AP) ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ

3.1. Ο κυτταρικός φαινότυπος στα κύτταρα νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας

Ορόσημο στην παθογένεια της νόσου και μοναδικό χαρακτηριστικό της μεμβράνης των «παθολογικών» κυτάρων όλων των αιμοποιητικών σειρών είναι το γεγονός ότι ανεπαρκούν ή απουσιάζουν όλες οι πρωτεΐνες που χρησιμοποιούν το μόριο της «άγκυρας» GPI για την πρόσδεσή τους στην κυτταρική επιφάνεια¹⁹ (εικ. 6). Η μειωμένη ή η καθόλου παραγωγή της GPI, ανάλογα με το είδος της γενετικής βλάβης στο γονίδιο *PIG-A*, έχει ως αποτέλεσμα την απουσία των GPI-AP από την κυτταρική μεμβράνη και την ενδοκυττάρια αποδόμηση των εν λόγω πρωτεϊνών στο ER.⁷⁰ Ωστόσο, ορισμένες από αυτές εκφράζονται στην



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της παρουσίας των GPI-AP στις διάφορες κυτταρικές σειρές του περιφερικού αίματος. Στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ), επειδή η υπεύθυνη μετάλλαξη εντοπίζεται στο αρχέγονο αιμοποιητικό κύτταρο, η ανεπάρκεια ή η έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών αφορά σε όλες τις αιμοποιητικές σειρές. Τα αντιγόνα ομάδας αίματος σημειώνονται με «{ }». Η έκφραση μόνο μετά από ενεργοποίηση ή σε έναν υπότυπο του κυττάρου υποδεικνύεται με «()» (PrPc: Πρωτεΐνη prion, AChE: Ακετυλοχολινεστεράση (acetylcholinesterase), LAP: Αλκαλική φωσφατάση των λευκών (leukocyte alkaline phosphatase), EDN: Ηωσινοφιλική νευροτοξίνη (eosinophil-derived neurotoxin), ADP-RT: Mono-ADP-ριβουσυλ-τρανσφεράση). ¹Συνδυασμός GPI-συνδεδεμένου και διαμεμβρανικού ισότυπου, ²Διαμεμβρανικά συνδεδεμένος ισότυπος (από Bessler και Hiken 2008, τροποποιημένο).

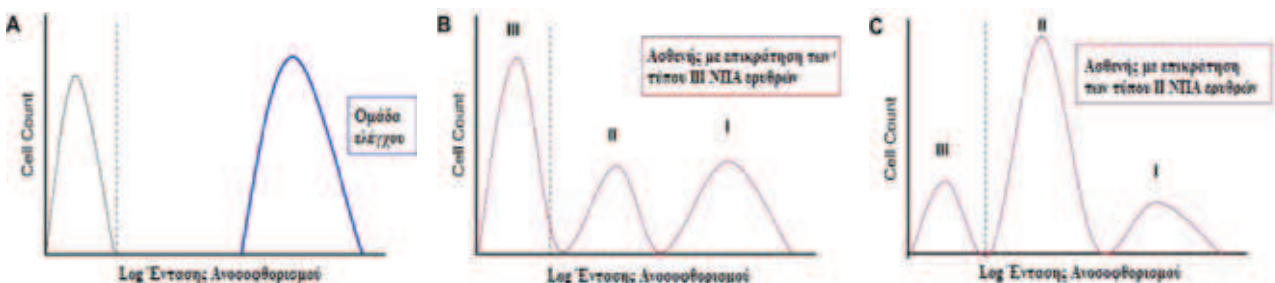
επιφάνεια των κυττάρων μέσω ενός εναλλακτικού διαμεμβρανικού τύπου πρόσδεσης, χωρίς να έχει διευκρινιστεί αν διατηρούν τη λειτουργικότητά τους, όπως συμβαίνει με τον FcγRIII (CD16) και τον LFA-3 (CD58).^{71,72} Ένας επιπρόσθετος συγχυτικός παράγοντας στην εκτίμηση του κυτταρικού φαινότυπου συναντάται σε ασθενείς που συνθέτουν μικρές ποσότητες του μορίου της GPI, δημιουργώντας ανταγωνισμό μεταξύ των πρωτεϊνών, ανάλογα με την καταλληλότητα του αμινοξέος στη θέση ω της πρωτεΐνης.

Ανάλογα με την έκφραση της «άγκυρας» GPI στην επιφάνειά τους, τα κύτταρα στη ΝΠΑ ταξινομούνται, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, σε τρεις κατηγορίες: (α) Αυτά με πλήρη έλλειψη των GPI-AP ή τύπου III ΝΠΑ κύτταρα, (β) εκείνα με μερική ανεπάρκεια των GPI-AP (περίπου 10% της φυσιολογικής έκφρασης) ή τύπου II ΝΠΑ κύτταρα και, τέλος, (γ) αυτά με φυσιολογική έκφραση των GPI-AP ή τύπου I φυσιολογικά κύτταρα.⁷³ Ο σχετικός διαχωρισμός βρίσκεται ιδιαίτερη εφαρμογή και έχει σπουδαία κλινική σημασία στην ευαισθησία των ερυθρών στη λυτική δράση του συμπληρώματος, ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της οποίας θα περιγραφεί ακολούθως. Η ταξινόμηση αυτή θα πρέπει να βασίζεται κυρίως στην ερυθροκυτταρική έκφραση του CD59, παρά του CD55.⁷⁴ Τα τύπου III και τα τύπου II ερυθρά είναι 15–25 και 3–5 φορές πιο ευαίσθητα στο συμπλήρωμα σε σύγκριση με τα τύπου I ερυθρά.⁷⁵ Αντιθέτως, η υπολειμματική έκφραση των GPI-AP στα κυκλοφορούντα λευκά αιμοσφαίρια είναι συχνά πιο δύσκολο να καθοριστεί, και η ανάλυσή της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το «στοχευμένο» αντιγόνο. Ωστόσο, η εν λόγω ετερογένεια στη βαρύτητα της έλλειψης αντικατοπτρίζει το πώς το είδος της μοριακής βλάβης και το μέγεθος του «παθολογικού» κλώνου καθορίζουν το βαθμό της κλινικής έκφρασης της νόσου,⁷⁶ εισάγοντας έτσι την έννοια του «φαινοτυπικού μωσαϊκισμού» (εικ. 7).

Στα φυσιολογικά κύτταρα, ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών, τουλάχιστον 20–30 διαφορετικές πρωτεΐνες, χρησιμοποιεί την GPI ως μηχανισμό σύνδεσης στην κυτταρική μεμβράνη (πίν. 2). Δεν υπάρχει εμφανής ομοιότητα μεταξύ τους, εφόσον η βασική βιολογική τους λειτουργία ποικίλλει, ανάλογα μάλιστα με την κυτταρική σειρά στην οποία εκφράζονται. Σε αυτές περιλαμβάνονται διάφοροι κυτταρικοί υποδοχείς, αντιγόνα ομάδων αίματος, μόρια προσκόλλησης, ένζυμα, ενεργοποιητές της μεταγραφικής διαδικασίας, ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος, καθώς και μόρια με άγνωστη λειτουργία έως σήμερα.⁷⁵ Αν οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται φυσιολογικά στις διάφορες αιμοποιητικές σειρές, τότε θα απουσιάζουν από τα κύτταρα του ΝΠΑ κλώνου. Μάλιστα, όλες οι αιμοποιητικές σειρές και τα προγονικά κύτταρα θα επηρεάζονται, αν και η λεμφική σειρά συνήθως σε μικρότερο βαθμό κατά τη διάγνωση της νόσου.⁷⁷ Η ανίχνευση της έλλειψης τουλάχιστον δύο διαφορετικών GPI-AP στα κυκλοφορούντα κύτταρα του περιφερικού αίματος, με τη βοήθεια της κυτταρομετρίας ροής, αποτελεί την πλέον ευαίσθητη και ειδική μέθοδο διάγνωσης της νόσου.²⁶ Στον πίνακα 1 φαίνονται οι πρωτεΐνες που συνδέονται μέσω της GPI και το είδος του κυττάρου στη μεμβράνη του οποίου συνδέονται.

3.2. Διαταραχές της κυτταρικής λειτουργίας στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία

Η ύπαρξη παθοφυσιολογικών μηχανισμών σύνδεσης ανάμεσα στα κλινικά χαρακτηριστικά της ΝΠΑ και της απώλειας συγκεκριμένων GPI-AP από τη μεμβράνη, λόγω της ανεπάρκειας της βιοσυνθετικής οδού της GPI, είναι αδιαμφισβήτητη. Η διευκρίνιση των μηχανισμών αυτών είναι απαραίτητη για την κατανόηση της αιτιοπαθογένειας της νόσου, η οποία, αν και έχει περιγραφεί σε μεγάλο βαθμό, δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Εν τούτοις, υπάρχουν



Εικόνα 7. Φαινοτυπικός μωσαϊκισμός στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). (Α) Ένα υποθετικό ιστόγραμμα κυτταρομετρίας ροής με ερυθρά, σημασμένα με FITC-labeled anti-CD59 (μπλε γραμμή). Η «διακεκομμένη καμπύλη» αναπαριστά τη χρώση με ένα μη ειδικό ιστοτυπικό μέσο ελέγχου. Τα φυσιολογικά ερυθρά παρουσιάζουν ομοιόμορφο και έντονο φθορισμό. (Β) Τα ερυθροκύτταρα είναι ένα μωσαϊκό φυσιολογικών και παθολογικών κυττάρων. Ερυθρά με φυσιολογική ένταση φθορισμού καλούνται «τύπου I» ΝΠΑ κύτταρα (I). Ερυθρά με πλήρη έλλειψη του GPI-AP που μελετάται καλούνται «τύπου III» ΝΠΑ κύτταρα. Ερυθρά με μερική ανεπάρκεια καλούνται «τύπου II» ΝΠΑ κύτταρα (II). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ένταση του φθορισμού εκφράζεται με λογαριθμική μετατροπή. Έτσι, τα «τύπου II» ΝΠΑ κύτταρα εκφράζουν το 10% της φυσιολογικής πυκνότητας των GPI-APs. (C) Ο τύπος και η ποσότητα των GPI-AP(-) ερυθρών ποικίλλουν σημαντικά ανάμεσα στους ΝΠΑ ασθενείς (από Parker).³

ορισμένες συσχέτισεις που έχουν σαφώς καθοριστεί και αφορούν σε λειτουργικές διαταραχές ανάλογα με το είδος της κυτταρικής μεμβράνης στην οποία εκφράζεται η απόυσα GPI-AP. Οι πλέον σημαντικές περιγράφονται αδρά στις επόμενες παραγράφους.

Ενδεχομένως, η πλέον προεξέχουσα αντικατοπτρίζεται στην παρουσία ενδαγγειακής αιμόλυσης, απ' όπου προέκυψε και ο όρος ΝΠΑ. Όπως θα περιγραφεί λεπτομερέστερα σε επόμενη ενότητα, η λύση των ερυθρών της ΝΠΑ είναι αποτέλεσμα της απουσίας δύο ρυθμιστικών πρωτεϊνών του συμπληρώματος (complement regulatory proteins, Cregs) από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, λόγω της απουσίας της GPI, επιτρέποντας έτσι την υπέρμετρη και ανεξέλεγκτη δράση του καταρράκτη του συμπληρώματος. Τα υπεύθυνα αυτά μόρια είναι το CD55 ή DAF^{68,69} και το CD59 ή MIRL,⁶⁷ και σε μικρότερο βαθμό η C8bp (C8 binding protein) ή ο HRF-60 (homologous restriction factor-60).⁷⁸ Επί πλέον, η απουσία του CD59 από τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων και η συνεπακόλουθη αυξημένη εναπόθεση του μεμβρανο-επιθετικού συμπλέγματος (membrane attack complex, MAC) συνδέεται με την αυξημένη ενεργοποίησή τους,⁷⁹ συμβάλλοντας, μαζί με άλλους παράγοντες, στη θρομβοφιλική διάθεση που χαρακτηρίζει τη νόσο. Εκτός όμως από ρυθμιστές του συμπληρώματος, αυτές οι δύο GPI-AP διατελούν και άλλους ρόλους, ανάλογα με τη μεμβράνη του κυττάρου στην οποία εκφράζονται. Έτσι, ο DAF λειτουργεί ως υποδοχέας για διάφορα παθογόνα (echovirus 7, enterovirus 70, coxsackievirus A21/B1/B3/B5).⁸⁰⁻⁸² Παράλληλα, εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων, καθώς και στην κυτταρική σηματοδότηση, ως συνδετικό μόριο για το CD97.⁸³ Τέλος, συμμετέχει στη ρύθμιση της T-κυτταρικής ανοσίας,⁸⁴ όσο και της φαγοκυττάρωσης.⁸⁵ Από την άλλη, ο MIRL ρυθμίζει επί πλέον την ικανότητα πολλαπλασιασμού και παραγωγής κυτταροκινών των λεμφοκυττάρων, μέσω της διέγερσής τους από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, συμμετέχοντας έτσι και στην επίκτητη ανοσία.⁸⁶ Επίσης, συνδέεται με το CD2 μόριο των T-λεμφοκυττάρων επάγοντας την ενεργοποίησή τους,⁸⁷ ενώ συμμετέχει ενεργά στη διακυτταρική επικοινωνία.⁸⁸

Η απουσία του μορίου FcγRIII (CD16)⁸⁹ από την κυτταρική μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα τη διαταραχή της χημειοταξίας και της φαγοκυττάρωσης των πολυμορφοκυττάρων παρουσία ενεργοποιημένου συμπληρώματος. Επίσης, η ελλιπής έκφραση άλλων GPI-AP από την επιφάνεια των πολυμορφοκυττάρων, όπως το CD66b, το CD66c και το CD87, που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στην προσκόλληση των συγκεκριμένων κυττάρων στο στρώμα,⁹⁰ ευθύνεται για την ανεπάρκεια του μηχανισμού της διενδοθηλιακής μετανάστευσής τους στους ιστούς, που παρατηρείται στη νόσο.⁹¹ Επί πλέον, το

CD157, μια μεμβρανική πρωτεΐνη από τις GPI-AP, είναι σημαντικός διαμεσολαβητής της προσκόλλησης και της μετανάστευσης ουδετεροφίλων.⁹² Η ουδετεροπενία, εν τούτοις, δεν φαίνεται να οφείλεται στη λύση των πολυμορφοκυττάρων από το ενεργοποιημένο συμπλήρωμα. Ο χρόνος επιβίωσης των CD59(-) ουδετεροφίλων είναι φυσιολογικός⁷⁶ και η ουδετεροπενία μάλλον οφείλεται σε ανεπάρκεια παραγωγής λόγω μυελικής υποπλασίας⁹³ ή και σε υπερβολική αύξηση της περιθωριακής δεξαμενής και μη αποδοτική κοκκιοποίηση.⁹⁴ Έτσι, γίνεται κατανοητό ότι οι ασθενείς με ΝΠΑ έχουν αυξημένη ευαισθησία στις λοιμώξεις, ακόμη και όταν δεν εμφανίζουν ουδετεροπενία.

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι συμμετέχουν είναι η έλλειψη του υποδοχέα της πρωτεΐνης που συνδέει τη λιποπολυσακχαρίδη των παθογόνων μικροοργανισμών (lipopolysaccharide-binding protein receptor) ή CD14 από τη μεμβράνη των ΝΠΑ μονοκυττάρων,⁹⁵ καθώς και η μειωμένη ενεργοποίηση των «παθολογικών» GPI(-) λεμφοκυττάρων, λόγω της απουσίας του CD58 και του CD59. Εκτός από την παρουσία «ενεργοποιημένων» αιμοπεταλίων στη ΝΠΑ λόγω της απουσίας του CD59 από τη μεμβράνη τους, η απουσία άλλων GPI-AP, όπως ο υποδοχέας της ουροκινάσης (urokinase-plasminogen activator receptor, u-PAR) από την επιφάνεια των μονοκυττάρων,⁹⁶ που συμμετέχουν στην ινωδόλυση, εμπλέκονται εξ ίσου στην παθογένεση της θρόμβωσης στη ΝΠΑ.

Ωστόσο, η βιολογική σημασία της απουσίας άλλων GPI-AP από την κυτταρική μεμβράνη των «παθολογικών» κυττάρων, όπως η ακετυλοχολινεστεράση, στις διάφορες κυτταρικές σειρές δεν έχει καθοριστεί ακόμη. Ομοίως, σε αντίθεση με τα τυπικά κλινικά ευρήματα της νόσου, το πλέον «γοητευτικό» χαρακτηριστικό της ΝΠΑ, το γεγονός ότι αποτελεί μια καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια όπου οι GPI(-) κλώνοι παρουσιάζουν ένα σχετικό πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, σε ένα μικροπεριβάλλον μυελικής ανεπάρκειας, επεκτείνονται και επικρατούν, δεν μπορούσε απλά να συνδεθεί με την απώλεια της μεμβρανικής έκφρασης κάποιας GPI-AP. Έτσι, η διαλεύκανση των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στο μυελό των οστών των εν λόγω ασθενών αναδεικνύεται κεφαλαιώδους σημασίας στη βαθύτερη κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που διέπουν την παθογένεση της νόσου.

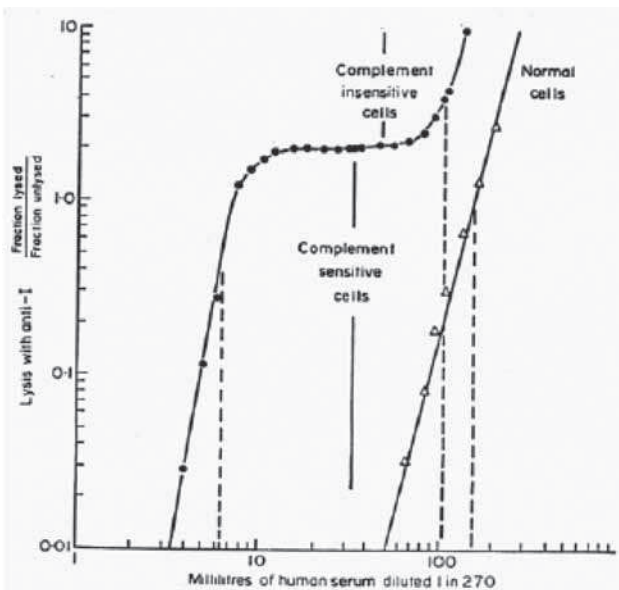
4. ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΚΑΙ ΓΟΝΟΤΥΠΙΚΟΣ ΜΩΣΑΪΚΙΣΜΟΣ ΣΤΗ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑ

Όπως έχει ήδη γίνει κατανοητό, το περιφερικό αίμα των ασθενών με ΝΠΑ είναι ένα μωσαϊκό φυσιολογικών και

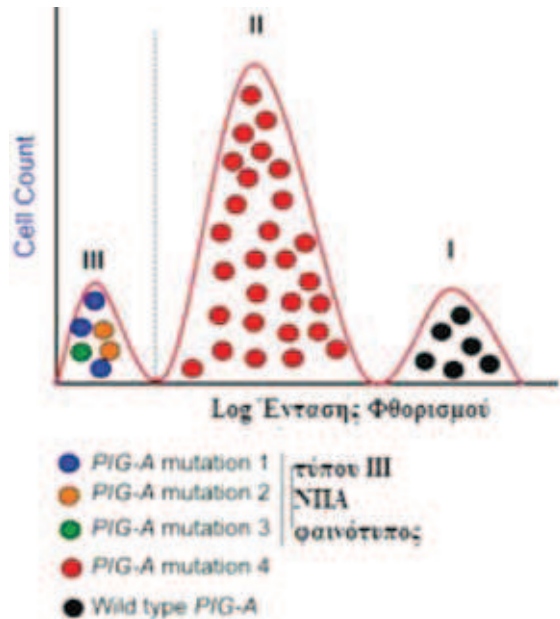
παθολογικών κυττάρων. Αν και οι πρώτες ενδείξεις για την παρουσία μωσαϊκισμού στη νόσο βασίστηκαν στην απουσία λύσης ενός πληθυσμού ερυθρών στη δοκιμασία Ham,¹⁰ οι Rosse και Dacie, αναπτύσσοντας μια ποσοτική μέθοδο για την εκτίμηση της ευαισθησίας των ερυθρών στη λυτική δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος, ανέδειξαν πρώτοι το φαινόμενο^{13,14} (εικ. 8). Μάλιστα, ο Rosse περιέγραψε με μεγαλύτερη λεπτομέρεια την παρουσία τριών διακριτών ερυθροκυτταρικών πληθυσμών, σε συνάρτηση με την αυξανόμενη ευαισθησία τους στο συμπλήρωμα, διαχωρίζοντας τα ερυθρά σε τύπου I, II και III.⁷³ Έτσι, ανέδειξε ότι όλοι οι ασθενείς είχαν περισσότερους από έναν πληθυσμούς ΝΠΑ ερυθροκυττάρων και ότι το ποσοστό τους ποικίλλει σημαντικά ανάμεσα στους ασθενείς (εικ. 7). Στη συνέχεια, οι Holguin et al καθόρισαν την υποκείμενη αιτιοπαθογένεια της διαφοράς αυτής αποδεικνύοντας ότι από τη μεμβράνη των τύπου III ερυθρών απουσιάζουν πλήρως ο DAF και ο MIRL, ενώ τα τύπου II ερυθρά χαρακτηρίζονται από μερική ανεπάρκεια των αντίστοιχων μορίων από την

κυτταρική μεμβράνη (10% της φυσιολογικής έκφρασης του κάθε αντιγόνου). Τα τύπου I ερυθρά παρουσίαζαν φυσιολογική μεμβρανική έκφραση των Cregs.²⁰ Έτσι, η μεγάλη διακύμανση, όσον αφορά στην ευαισθησία έναντι του συμπληρώματος, οφείλεται στην ποσοτική διαφορά της ερυθροκυτταρικής έκφρασης του CD55 και του CD59, η οποία είναι στενά συνυφασμένη με μια κλωνική διαδικασία, όπως είχε αναδειχθεί ήδη από τις μελέτες των Rosse και Dacie,^{13,14} αλλά και αυτές αναφορικά με την έκφραση του ισοενζύμου G6PD ανάμεσα σε ευαίσθητους και μη ευαίσθητους στο συμπλήρωμα πληθυσμούς.¹⁵

Τέλος, οι παρατηρήσεις των Endo et al απέδειξαν ότι ο φαινοτυπικός μωσαϊκισμός είναι συνέπεια του γονοτυπικού. Έτσι, σε έναν ασθενή με ΝΠΑ αναγνωρίστηκαν τέσσερις διαφορετικοί κλώνοι, με μετάλλαξη του *PIG-A* (εικ. 9). Τα τύπου II ΝΠΑ κύτταρα προέρχονται από ένα mHSC με μετάλλαξη του *PIG-A* γονιδίου τύπου "missense", όταν τα τύπου III ΝΠΑ κύτταρα από τρεις μοριακά διακριτούς κλώνους με διαφορετικές μεταλλάξεις οδηγούσαν σε ένα



Εικόνα 8. Ευαισθησία των ερυθρών στο συμπλήρωμα και ανάδειξη του «μωσαϊκού» της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαινουρίας (ΝΠΑ). Ανιχνεύτηκαν ευαίσθητα (sensitive) και μη ευαίσθητα (insensitive) στο συμπλήρωμα (complement) ερυθρά (cells). Ερυθρά από ασθενή με ΝΠΑ («γεμάτοι κύκλοι») και από φυσιολογικό εθελοντή («άδεια τρίγωνα») επώαστηκαν με αντίσωμα σε περίσσεια και ελάχιστα διαλύματα ορού, ως πηγή συμπληρώματος, ενώ υπολογίστηκε η επακόλουθη αιμόλυση. Τα σημεία της καμπύλης όπου παύει η λύση των ευαίσθητων και αρχίζει η λύση των μη ευαίσθητων κυττάρων σημειώνεται με τη «συνεχή γραμμή». Οι «διακεκομμένες γραμμές» σηματοδοτούν τη διάλυση του ορού που απαιτείται για να αιμολυθεί το 50% των φυσιολογικών, των ευαίσθητων ΝΠΑ και των μη ευαίσθητων ΝΠΑ ερυθρών. Οι εν λόγω μελέτες ανέδειξαν ότι τα ΝΠΑ ερυθρά είναι 25 φορές περισσότερο ευαίσθητα στο συμπλήρωμα απ' ό,τι τα φυσιολογικά και ότι το περιφερικό αίμα των ασθενών με ΝΠΑ είναι ένα μωσαϊκό από φυσιολογικά και παθολογικά κύτταρα (από Rosse).⁷³



Εικόνα 9. Τα κύτταρα της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαινουρίας (ΝΠΑ) χαρακτηρίζονται από γονοτυπικό μωσαϊκισμό. Ο *PIG-A* γονότυπος καθορίζει το ΝΠΑ φαινότυπο. Στο ιστόγραμμα της κυτταρομετρίας ροής του ασθενούς με τις τέσσερις μεταλλάξεις ΝΠΑ, σχεδόν το 75% της ολικής αιμοποίησης προέρχεται από τον κλώνο με την παρερμηνεύσιμη (missense) μετάλλαξη που παράγει τον τύπου II ΝΠΑ φαινότυπο. Τρεις διακριτές *PIG-A* μεταλλάξεις παράγουν τύπου III ΝΠΑ φαινότυπο (ή μη δεινικό φαινότυπο, null phenotype). Και οι τρεις μαζί διακριτοί κλώνοι συμβάλλουν στο 11% της φυσιολογικής αιμοποίησης. Στην περίπτωση αυτή, ο τύπου II ΝΠΑ κυτταρικός κλώνος έχει επικρατήσει έναντι των υπολοίπων στην αιμοποίηση του ασθενούς. Το υπόλοιπο 14% της αιμοποίησης προέρχεται από τη φυσιολογική αιμοποίηση (wild-type *PIG-A*). Το ιστόγραμμα του συγκεκριμένου ασθενούς έχει παραμείνει αμετάβλητο για 15 συναπτά έτη, ενισχύοντας τη θεωρία ότι η ΝΠΑ είναι μια καλοήγητη κλωνική μυελοπάθεια (από Parker, τροποποιημένο).³

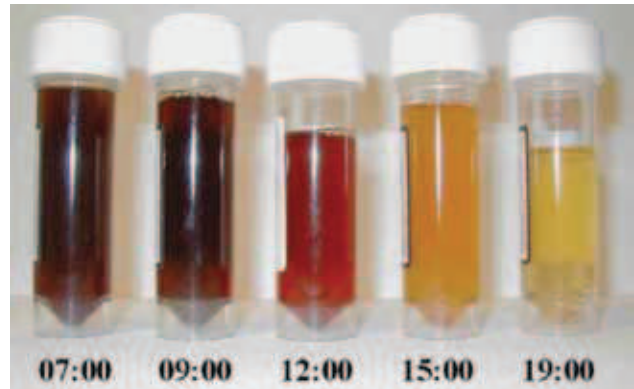
«μηδενικό φαινότυπο». Μάλιστα, άλλη μια σημαντική παρατήρηση αφορούσε στο γεγονός ότι σχεδόν το 75% των ερυθροκυττάρων του ασθενούς προέρχονταν από ένα μόνο ΝΠΑ κλώνο, όταν οι άλλοι τρεις ΝΠΑ κλώνοι συνεισέφεραν, από κοινού, στο 11% της ολικής ερυθροποίησης. Το υπόλοιπο 14% των ερυθρών αιμοσφαιρίων είχε φυσιολογική έκφραση των GPI-AP και προερχόταν από φυσιολογικά mHSC, χωρίς μετάλλαξη του *PIG-A*. Η εν λόγω αναλογία του γονοτυπικού μωσαϊκισμού παρέμεινε σταθερή για >15 έτη, χωρίς μεταβολή του φαινοτυπικού μωσαϊκισμού.⁹⁷ Με αυτόν τον τρόπο, εισήχθησαν για πρώτη φορά στην παθοφυσιολογία της ΝΠΑ οι έννοιες της «κλωνικής επιλογής» (clonal selection), της «κλωνικής επέκτασης» (clonal expansion) και της «κλωνικής επικράτησης» (clonal dominance), σύμφωνα με τις οποίες πολλαπλοί, διαφορετικοί παθολογικοί κλώνοι μπορούν να ταυτοποιηθούν σε κάθε ΝΠΑ ασθενή, αλλά η συνεισφορά του καθενός στη συνολική αιμοποίηση δεν είναι ομοιόμορφη. Διάφοροι μηχανισμοί επιλογής, κυρίως ανοσολογικής αρχής, του επικρατούντος παθολογικού κλώνου, σε συνδυασμό με θεμελιώδη ενδογενή χαρακτηριστικά του παθολογικού mHSC, είναι οι συνιστώσες που αναδεικνύουν τη ΝΠΑ σε μια καλοήγη ολιγοκλωνική μυελοπάθεια.

5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΤΗΣ ΝΥΚΤΕΡΙΝΗΣ ΠΑΡΟΞΥΝΤΙΚΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΟΥΡΙΑΣ

5.1. Αιμολυτική αναιμία και αναστολείς του συμπληρώματος

Η ΝΠΑ είναι γνωστή για τις κλινικές εκδηλώσεις της επίκτητης Coombs-αρνητικής, μη σφαιροκυτταρικής, αιμολυτικής αναιμίας λόγω ενδοερυθροκυτταρικού ελλείμματος. Αν και η αιμοσιδηρινουρία (εναπόθεση αιμοσιδηρίνης στα επιθηλιακά κύτταρα και το ίζημα των ούρων) υπάρχει σε όλους τους ασθενείς με κλασική ΝΠΑ, λόγω της χρόνιας αιμόλυσης, τα παροξυσμικά επεισόδια της πρώτης πρωινής αιμοσφαιρινουρίας (όταν η επαναροφητική ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων στα εγγύς νεφρικά σωληνάρια του φλοιού εξαντληθεί), που σταδιακά βελτιώνεται κατά τη διάρκεια της ημέρας, εμφανίζονται μόλις στο 25% των ασθενών (εικ. 10). Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν στη λύση της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης ερμηνεύονται απόλυτα από την αναστολή της βιοσυνθετικής οδού της GPI, που οδηγεί στην ανεξέλεγκτη δράση του ενεργοποιημένου συμπληρώματος στην επιφάνεια των κυττάρων του περιφερικού αίματος.

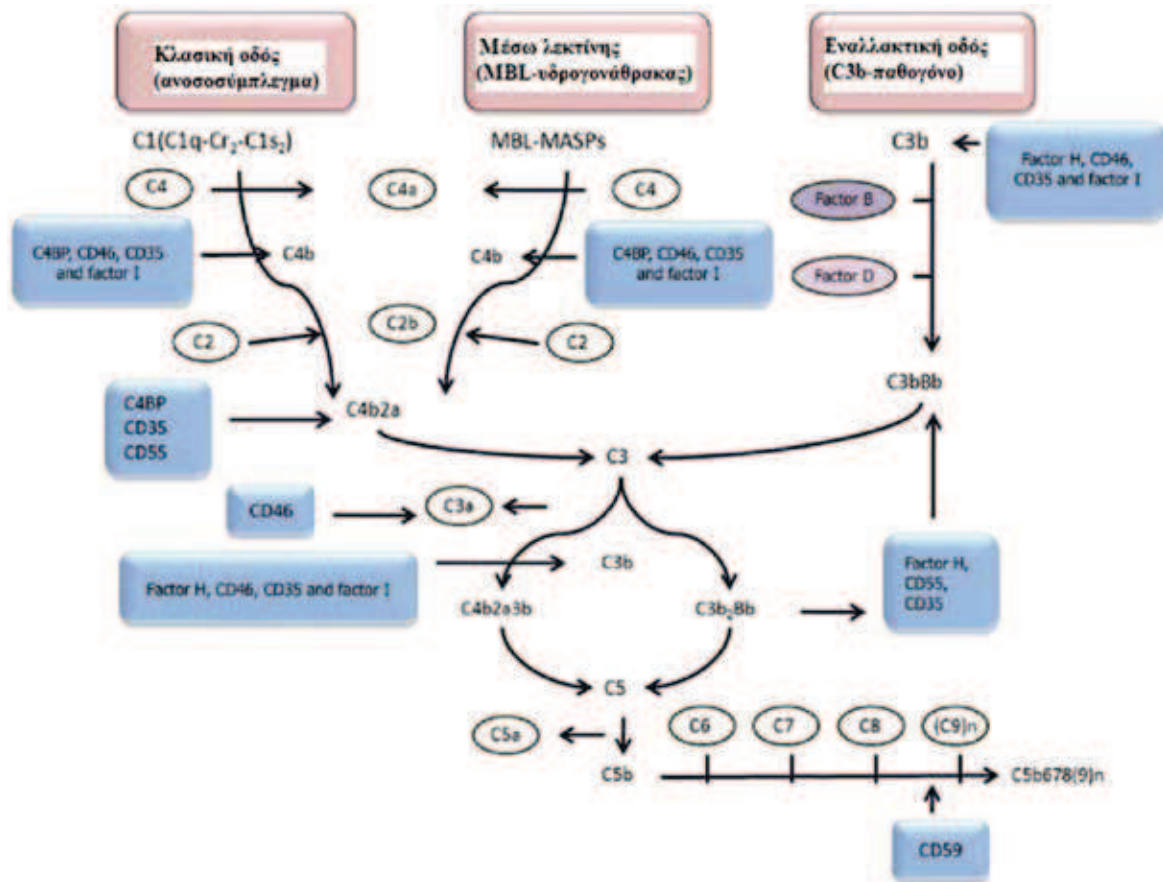
Περισσότερες από 60 πρωτεΐνες και προϊόντα ενεργοποίησης που αλληλεπιδρούν σε μια καθορισμένη αλληλουχία αντιδράσεων, είτε διαλυτά στο πλάσμα είτε συνδεδεμένα



Εικόνα 10. Αιμοσφαιρινουρία σε ασθενή με «κλασική» νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). Στις 7 π.μ. τα ούρα είναι σκουρόχρωσα, αφού περιέχουν μεγάλη ποσότητα ελεύθερης αιμοσφαιρίνης, λόγω της αιμόλυσης. Τα ούρα καθαρίζουν κατά τη διάρκεια της ημέρας.

στις κυτταρικές επιφάνειες, συνιστούν το σύστημα του συμπληρώματος, ένα βασικό συστατικό τόσο της φυσικής όσο και της επίκτητης ανοσίας. Η ενεργοποίηση του εν λόγω καταρράκτη των ενζυμικών αντιδράσεων οδηγεί στο σχηματισμό ανοσοπροστατευτικών, ανοσορρυθμιστικών, προφλεγμονωδών και κυτταρολυτικών μορίων. Εν συντομία, ανάλογα με το ερέθισμα για την έναρξη της «πρώιμης ενεργοποίησης», υπάρχουν τρεις οδοί ενεργοποίησης του συμπληρώματος: η κλασική, η εναλλακτική και της λεκτίνης. Και οι τρεις καταλήγουν στο σχηματισμό του συμπλέγματος της C3 και, κατόπιν, της C5 κονβερτάσης. Τελικό κοινό προϊόν είναι ο σχηματισμός του MAC (C5b-9), γνωστό και ως τελικό σύμπλεγμα του συμπληρώματος (terminal complement complex, TCC), το οποίο σχηματίζει έναν πόρο στη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα, που επιτρέπει εκλεκτικά την είσοδο νερού, ιόντων και μικρών μορίων στον ενδοκυτταριο χώρο, οδηγώντας το κύτταρο σε λύση. Παράλληλα, μόρια του καταρράκτη προάγουν διεργασίες όπως η χημειοταξία και η οψωνινοποίηση, που επάγουν τη φαγοκυττάρωση^{98,99} (εικ. 11).

Ρυθμιστικές πρωτεΐνες του συμπληρώματος, όπως το CD55 (DAF) και το CD59 (MIRL), που εκφράζονται σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες, περιλαμβανομένων και των αιμοποιητικών κυττάρων, προστατεύουν τους ιστούς απέναντι στη δράση του αυτόλογου συμπληρώματος. Ο DAF ρυθμίζει την πρώιμη φάση ενεργοποίησης του συμπληρώματος μέσω της αναστολής σχηματισμού νέων ενζύμων της κονβερτάσης του C3 και του C5 συμπλέγματος (C4b2a της κλασικής οδού και της λεκτίνης, καθώς και C3bBb της εναλλακτικής οδού) και επιταχύνοντας την καταστροφή των ήδη προσχηματισμένων συμπλεγμάτων. Ο MIRL παρεμβαίνει στη δόμηση του MAC μέσω της φυσικής του ενσωμάτωσης στο C5b-8 σύμπλεγμα, εμποδίζοντας την προσθήκη του C9^{98,99} (εικ. 11).

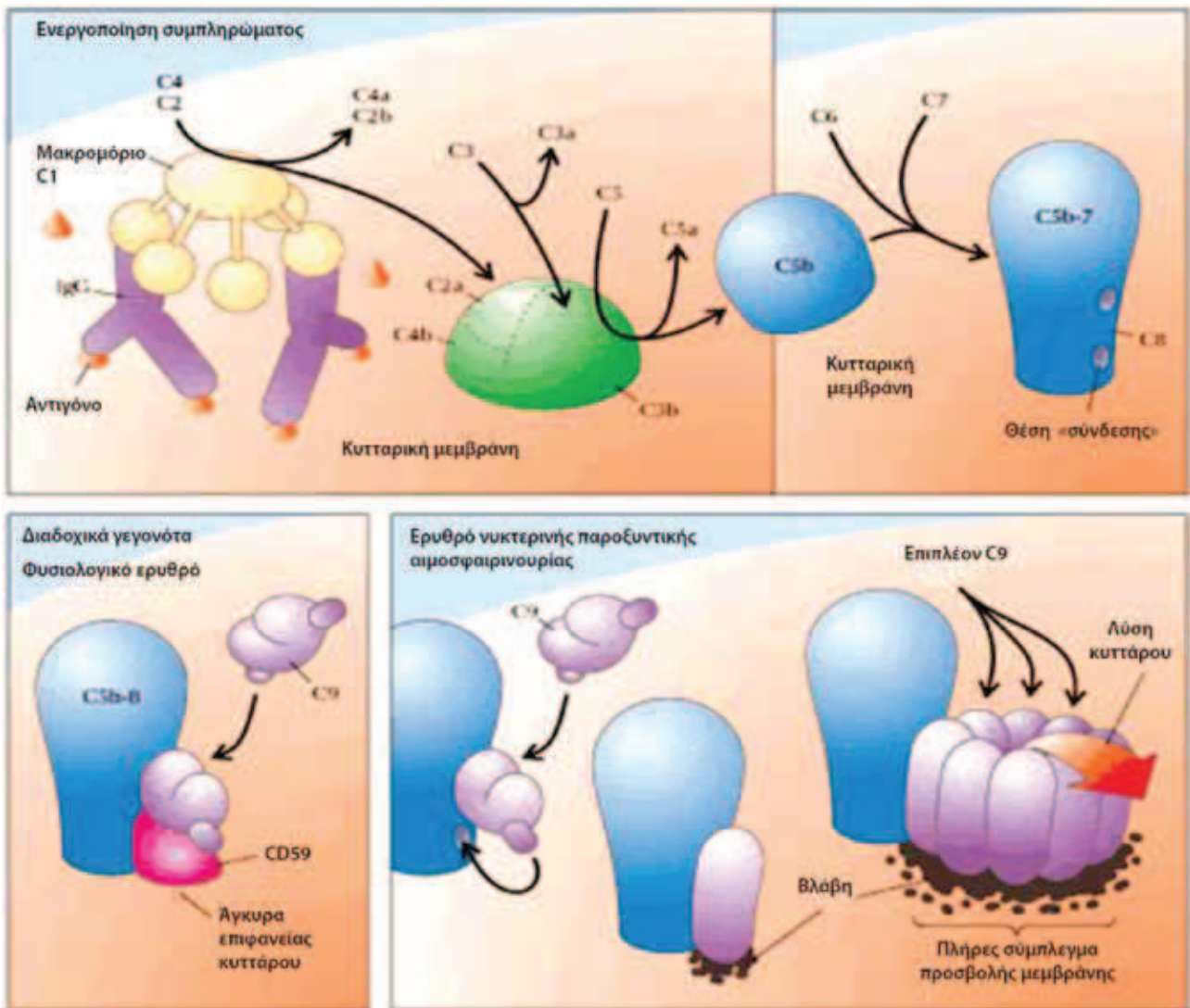


Εικόνα 11. Ο «καταρράκτης» του συμπληρώματος (Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: With complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2007, 7:9–18).

Τα «παθολογικά» ερυθρά στη ΝΠΑ είναι ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος, ανεξαρτήτως της οδού ενεργοποίησής του, λόγω της απουσίας ή της ανεπαρκούς έκφρασης από τη μεμβράνη των CD55 και CD59, τα οποία συνδέονται στη μεμβράνη μέσω της «άγκυρας» GPI. Η ευαισθησία τους καθορίζεται από το βαθμό της απουσίας των GPI-AP και διαχωρίζονται ανάλογα σε τύπου I, II, III κύτταρα, όπως έχει ήδη περιγραφεί. Τα τύπου III κύτταρα έχουν μέσο χρόνο ζωής από 17–60 ημέρες, τα τύπου II κύτταρα 45 ημέρες και τα τύπου I κύτταρα φυσιολογικό χρόνο ζωής 120 ημερών.¹⁰⁰ Η ανάλυση της έκφρασης των GPI-AP στην επιφάνεια των αιμοποιητικών κυττάρων, και συγκεκριμένα στα ερυθρά, αναδεικνύει ότι σχεδόν το 40% των ασθενών με ΝΠΑ έχουν συνδυασμό τύπου I, II και III κυττάρων στο περιφερικό αίμα. Ο βαθμός της αιμόλυσης εξαρτάται από το ποσοστό των παθολογικών κυττάρων και τη βαρύτητα του ελλείμματος στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη και, συγκεκριμένα, από τη σχετική αναλογία των τύπου II και τύπου III κυττάρων (εικ. 7). Γενικά, όσο μεγαλύτερο το ποσοστό των τύπου III κυττάρων, τόσο πιο σημαντική η βαρύτητα της αιμόλυσης. Καθώς η εναλλακτική οδός βρίσκεται σε μια

κατάσταση συνεχούς και σε μικρό βαθμό ενεργοποίησης, ήπιου βαθμού αιμόλυση στη ΝΠΑ είναι συνεχής, ωστόσο παροξυσμοί συμβαίνουν λόγω λοιμώξεων, χειρουργείων, κόπωσης, αυξημένης κατανάλωσης οιοπνεύματος κ.ά., οπότε και ευοδώνεται η ενεργότητα του καταρράκτη.

Ο ρόλος του CD59 στη ρύθμιση του συμπληρώματος αναδεικνύεται πιο σημαντικός από τον αντίστοιχο του CD55 (εικ. 12). Τα ερυθρά στα οποία το CD59 έχει αδρανοποιηθεί *in vitro* μέσω αντισωμάτων παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία στο συμπλήρωμα, ανάλογη με τα «παθολογικά» ΝΠΑ κύτταρα. Αντίστοιχα, η αδρανοποίηση του CD55 οδηγεί σε μόλις ήπια αύξηση της ευαισθησίας.¹⁰¹ Πράγματι, ερυθρά αιμοσφαίρια με ανεπάρκεια του DAF (φαινότυπος Inab),^{102,103} που διατηρούν την ικανότητα έκφρασης φυσιολογικών επιπέδων CD59, δεν εμφανίζουν κάποια από τις χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ, όπως η αιμολυτική αναιμία ή οι θρομβώσεις,¹⁰⁴ με εξαίρεση έναν ασθενή που εμφάνισε θρόμβωση της ηπατικής φλέβας.¹⁰⁵ Ωστόσο, τα ερυθρά αυτά χαρακτηρίζονται από αυξημένη εναπόθεση του C3 στην επιφάνειά τους.^{68,69} Αντιθέτως, υπάρχει μόνο μία αναφορά στη διεθνή βιβλιογραφία ασθενούς με καθολική



Εικόνα 12. Δράση του CD59. Επάνω απεικονίζεται η «κλασική» οδός ενεργοποίησης του συμπληρώματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία του συμπλέγματος C5b-8. Κάτω αριστερά, φαίνεται η δράση του CD59 στα φυσιολογικά κύτταρα, που εμποδίζει την ενσωμάτωση του C9 στο σύμπλεγμα C5b-8 και τον πολυμερισμό του. Αντίθετα, η απουσία του από το κύτταρο της νυκτερινής παροξυντικής αιμοσφαιρινουρίας (NPA) έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του από το MAC (C5b-9) (κάτω δεξιά) (από Μελέτης και συν).⁴⁹

ανεπάρκεια του CD59, αλλά με φυσιολογική έκφραση του CD55, ο οποίος είχε χαρακτηριστικά κλινικά συμπτώματα της νόσου, όπως σημεία ενδαγγειακής αιμόλυσης και εγκεφαλική θρόμβωση.^{67,106} Εν τούτοις, απουσίαζε το τρίτο χαρακτηριστικό στοιχείο της ΝΠΑ, η μυελική ανεπάρκεια. Έτσι, δεδομένου ότι αποτελεί τη μοναδική περίπτωση εκλεκτικής καθολικής έλλειψης του CD59, είναι επισφαλές να υποστηρηχθεί με *in vivo* πειραματικά ευρήματα ο κριτικός ρόλος του MIRL.

Όπως είναι κατανοητό, οι ασθενείς με ΝΠΑ υφίστανται θεωρητικά και εξωαγγειακή αιμόλυση εξ αιτίας της απουσίας του CD55 από την ερυθροκυτταρική μεμβράνη, που οδηγεί στην οφωνινοποίηση των παθολογικών ερυθρών από παράγωγα του C3 κλάσματος και την απομάκρυνσή

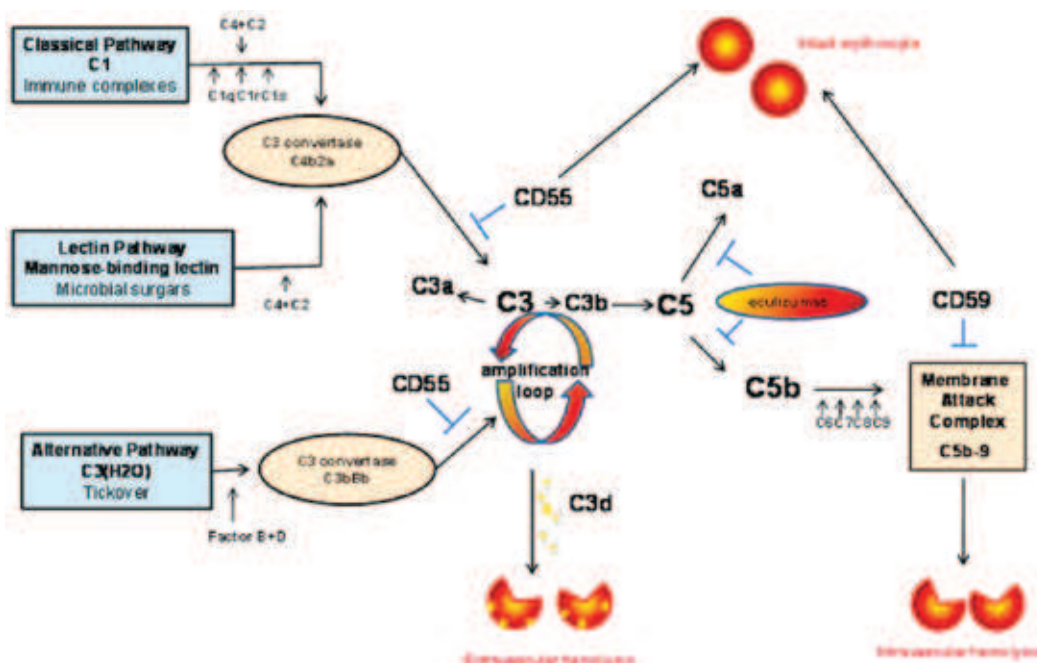
τους από τα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος (ΔΕΣ). Εφ' όσον η απουσία του CD59 οδηγεί σε ταχεία κυτταρική καταστροφή, το γεγονός αυτό δεν είναι τόσο εμφανές στη φυσική πορεία της νόσου. Ωστόσο, η χρησιμοποίηση αναστολέων της τελικής οδού του συμπληρώματος, όπως η εκουλιζουμάμπη (eculizumab) (αντι-C5 αντίσωμα, Soliris®, Alexion Pharmaceuticals, Inc), κατέστησε το εν λόγω φαινόμενο πιο εμφανές (εικ. 13). Πράγματι, αφού η αιμόλυση είναι αποτέλεσμα της δράσης του συμπληρώματος, η αναστολή του καταρράκτη φαίνεται ένας λογικός θεραπευτικός στόχος. Με το σκεπτικό αυτό, το 2007 η εκουλιζουμάμπη έλαβε έγκριση από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration, FDA) και τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Φαρμάκων (European Medicines

Agency, EMA) ως θεραπεία της «κλασικής» ΝΠΑ,¹⁰⁷ χωρίς, ωστόσο, να έχει κάποια επίδραση ούτε στην υποκείμενη μοριακή διαταραχή ούτε στη συνυπάρχουσα μυελική ανεπάρκεια. Επειδή το C5 κλάσμα είναι κοινό και στις τρεις οδούς, αναστέλλεται η ενεργοποίηση του καταρράκτη ανεξάρτητα από το ερέθισμα.¹⁰⁸ Επί πλέον, η αναστολή της διάσπασης του C5 όχι μόνο εμποδίζει το σχηματισμό του C5a και του C5b (αρχικού τμήματος του MAC), ισχυρών προφλεγμονωδών, χημειοτακτικών και κυτταρολυτικών μορίων, αλλά διατηρεί τη σημαντική ανοσορρυθμιστική και ανοσοπροστατευτική δράση των πρόδρομων εκείνων μορίων που καταλήγουν στην C3b-εξαρτώμενη οψωνινοποίηση και στην κάθαρση των ανοσοσυμπλεγμάτων.

Έτσι, μια μικρή ομάδα ασθενών που λαμβάνουν εκουλιζουμάμπη δεν εμφανίζουν βελτίωση της αναιμίας και των υπόλοιπων συμπτωμάτων της κλασικής ΝΠΑ. Σε αυτούς τους ασθενείς, η αναστολή σχηματισμού του MAC, αν και αποτρέπει την άμεση λύση του ερυθρού στην κυκλοφορία, επιτρέπει την κλινική εκδήλωση της ανεπάρκειας του DAF, μέσω της διαταραχής της ρύθμισης της C3 κονβερτάσης της εναλλακτικής οδού, και την εναπόθεση προϊόντων του ενεργοποιημένου C3 κλάσματος στην επιφάνεια των κυττάρων, τα οποία είναι Coombs-θετικά για το C3, αλλά όχι για την IgG.¹⁰⁹ Άλλωστε, πριν από την έναρξη θεραπείας

με εκουλιζουμάμπη δεν ανιχνεύονται παράγωγα του C3 κλάσματος στην ερυθροκυτταρική μεμβράνη, υποδηλώνοντας ότι τα ερυθρά, στην επιφάνεια των οποίων το συμπλήρωμα έχει ενεργοποιηθεί, λύνονται απ' ευθείας από το MAC, οδηγώντας σε μειωμένο χρόνο ζωής των παθολογικών ερυθρών. Απεναντίας, η έναρξη θεραπείας οδηγεί σε αύξηση του χρόνου ζωής των παθολογικών ερυθρών, τα οποία χαρακτηρίζονται από αυξημένη εναπόθεση C3b/iC3b συμπλέγματος στη μεμβράνη τους, το οποίο μετατρέπεται σε C3d. Το τελευταίο αναγνωρίζεται από υποδοχείς των κυττάρων του ΔΕΣ, οδηγώντας σε εξωαγγειακή αιμόλυση.¹¹⁰

Τέλος, τα επίπεδα του παράγοντα Η πιθανόν να επηρεάζουν τη βαρύτητα της αιμόλυσης στη ΝΠΑ, καθώς η εν λόγω πρωτεΐνη του πλάσματος ελέγχει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος, ενώ δρα συνεργικά με τον DAF και τον MIRL. Συγκεκριμένα, ο παράγοντας αυτός αναστέλλει το σχηματισμό της C3 κονβερτάσης της εναλλακτικής οδού (C3bBb), ευοδώνει την κάθαρσή της από την κυκλοφορία, ενώ επί πλέον αναστέλλει το σχηματισμό της δρώντας και ως συμπαραγοντας του παράγοντα Ι στη μετατροπή του ενεργού C3b σε ανενεργό iC3b και κατόπιν σε C3dg/C3d¹¹¹ (εικ. 11). Η κλινική σημασία του παράγοντα Η αναδείχθηκε πρόσφατα με την ανάπτυξη ενός νέου αναστολέα του συμπληρώματος, της πρωτεΐνης TT30, μιας ανασυνδυασμέ-



Εικόνα 13. Σχηματική παράσταση του καταρράκτη του συμπληρώματος και της δράσης του. Η θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με νυκτερινή παροξυστική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ), με τελικούς αναστολείς του συμπληρώματος (π.χ. αντι-C5 αντίσωμα, eculizumab), έκανε πιο εμφανή την εξωαγγειακή (extravascular) αιμόλυση, λόγω της έλλειψης του CD55. Η έλλειψη του CD59 οδηγεί σε ταχύτερη κυτταρική καταστροφή και ενδαγγειακή αιμόλυση (intravascular), η οποία είναι χρόνια, λόγω της συνεχούς κατάστασης ενεργοποίησης του συμπληρώματος (εναλλακτική οδός), ενώ οι παροξυσμοί οφείλονται σε καταστάσεις αύξησης της ενεργότητάς του (όπως λοιμώξεις, χειρουργικές επεμβάσεις, κατανάλωση οινοπνεύματος κ.ά.) (από Pu JJ, Brodsky RA. *Clin Transl Sci* 2011, 4:219–224).

νης πρωτεΐνης σύντηξης, που αποτελείται από την iC3b/C3dg-συνδεδετική περιοχή του CR2 (complement receptor 2) και την CAP (complement alternative pathway) περιοχή του παράγοντα Η. Η CR2 περιοχή της ΤΤ30 στρέφει ειδικά την πρωτεΐνη έναντι περιοχών αυξημένης ενεργοποίησης του συμπληρώματος, όπως αυτές που χαρακτηρίζονται από αυξημένη εναπόθεση iC3b και C3d στη μεμβράνη των ερυθρών, προκειμένου να δράσει η CAP, με ιδιότητες του παράγοντα Η.^{110,112} Έτσι, η ΤΤ30 χαρακτηρίζεται από την εκλεκτική αναστολή της εναλλακτικής οδού του καταρράκτη, αντικαθιστώντας το ρόλο του DAF που απουσιάζει, προφυλάσσοντας τόσο την ενδαγγειακή όσο και την εξωαγγειακή αιμόλυση και προσδίδοντας στα «παθολογικά» ερυθρά φυσιολογικό χρόνο ζωής, παρά την παρουσία ενεργοποιημένου συμπληρώματος.

Κλείνοντας, αξίζει να αναφερθεί επιγραμματικά ότι, ιδιαίτερα σε καταστάσεις βαριάς αιμόλυσης, η ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στο πλάσμα δεσμεύει το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide, NO), προκαλώντας κλινικές εκδηλώσεις όπως κόπωση, κοιλιακό άλγος, οισοφαγικό σπασμό, στυτική δυσλειτουργία, πιθανόν θρόμβωση κ.ά. Πράγματι, οι συγκεκριμένες κλινικές εκδηλώσεις είναι πιο συχνές σε ασθενείς με μεγάλους κλώνους ΝΠΑ (>60% του συνολικού πληθυσμού των ουδετεροφίλων), σε σύγκριση με μικρούς κλώνους.¹¹³ Η ανάλυση του ρόλου του NO στην παθοφυσιολογία της νόσου θα αναλυθεί παρακάτω.

5.2. Συμμετοχή του μονοξειδίου του αζώτου

Το NO είναι σημαντικός ρυθμιστής της φυσιολογίας των αγγείων. Αρκετές από τις κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ μπορεί να εξηγηθούν με βάση την κατανάλωσή του από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη και την έκπλυσή του από την κυκλοφορία. Η ενδαγγειακή αιμόλυση σχετίζεται με πολλά συμπτώματα και σημεία της ΝΠΑ (εικ. 14) – κοινά και σε άλλα αιμολυτικά σύνδρομα – περιλαμβανομένων της θρόμβωσης, της κόπωσης, της διαταραχής της λειτουργικότητας, της μειωμένης ποιότητας ζωής, της αιμοσφαιρινουρίας, της δύσπνοιας, της δυσφαγίας, του κοιλιακού άλγους, της αναιμίας και της στυτικής δυσλειτουργίας. Οι εν λόγω κλινικές εκδηλώσεις συνδέονται με σοβαρές επιπλοκές, όπως οξεία νεφρική ανεπάρκεια, χρόνια νεφρική νόσο, ισχαιμία του εγκεφάλου-παροδικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ), μεσεντέρια ισχαιμία, ηπατική ανεπάρκεια, εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση, πνευμονική υπέρταση και πνευμονική εμβολή, οι οποίες έχουν αναγνωρισθεί ως σημαντικοί παράγοντες νοσηρότητας και θνητότητας στους ασθενείς με ΝΠΑ και με άλλα αιμολυτικά σύνδρομα. Με εξαίρεση την αναιμία, στην πλειονότητά τους μπορούν άμεσα να αποδοθούν στην απελευθέρωση ελεύθερης



Εικόνα 14. Κλινικές εκδηλώσεις στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ) λόγω της διαταραχής της μεμβράνης του ερυθροκυττάρου, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία στο συμπλήρωμα και την αιμόλυση. Σύνδεση της κυτταρικής διαταραχής με την κλινική εικόνα (ΠΕ: Πνευμονική εμβολή, ΕΦΘ: Εν τω βάθει φλεβοθρόμβωση, ΑΕΕ: Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, OEM: Οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου και άλλα οξεία στεφανιαία σύνδρομα, ΓΕΣ: Γαστρεντερικό σύστημα) (από Rachidi et al. *Eur J Intern Med* 2010, 21:260–267, τροποποιημένο).

αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα και την επακόλουθη έκπλυση του NO από την κυκλοφορία.¹¹⁴

Το NO κατέχει σημαντική θέση στη διατήρηση της ομοιοστασίας του τόνου των αγγείων, καθώς αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της χάλασης των λείων μυϊκών ινών (LMI). Φυσιολογικά στο ενδοθήλιο, το οξυγόνο και η αργινίνη αντιδρούν με τη NO-συνθετάση για την παραγωγή NO και κιτροουλίνης. Το παραγόμενο NO διατηρεί φυσιολογικό τον αγγειακό τόνο και περιορίζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Η αργινάση-1 είναι ένα ένζυμο το οποίο μετατρέπει την L-αργινίνη, υπόστρωμα για τη σύνθεση του NO, σε ορνιθίνη. Η δραστηριότητα της αργινάσης-1 είναι ιδιαίτερα αυξημένη στα νεαρά ερυθρά και στα δικτυοερυθροκύτταρα (ΔΕΚ), τα οποία κυκλοφορούν άφθονα στο αίμα σε αιμολυτικά σύνδρομα, όπως η δρεπανοκυτταρική αναιμία ή η ΝΠΑ.¹¹⁵ Τα επίπεδά της στο πλάσμα είναι επίσης ιδιαίτερα αυξημένα σε ασθενείς με δείκτες αυξημένου ρυθμού αιμόλυσης,¹¹⁶ όπως συμβαίνει στη ΝΠΑ.

Στην ενδαγγειακή αιμόλυση, όπου οι απτοσφαιρίνες του πλάσματος μειώνονται λόγω της δέσμευσής τους από την αιμοσφαιρίνη η οποία απελευθερώνεται από τη λύση των ερυθρών, η παρουσία ελεύθερης αιμοσφαιρίνης στο πλάσμα, που έχει σημαντική συγγένεια με το ενδογενές NO, οδηγεί στην έκπλυσή του.¹¹⁴ Παράλληλα, η αργινάση-1 που απελευθερώνεται από τα αιμολυμένα ερυθρά οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της παραγωγής του NO.^{115,116}

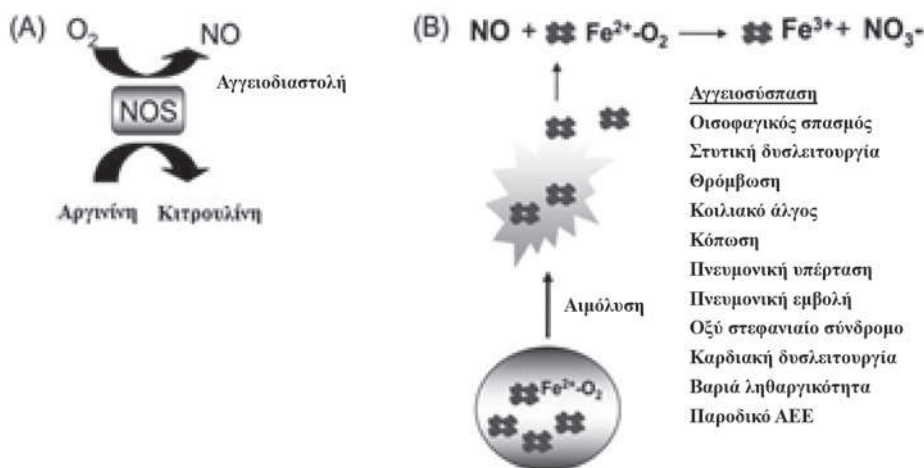
Στη ΝΠΑ, η μείωση του NO από τους ιστούς εκδηλώνεται, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, με αίσθημα κόπωσης, σοβαρή ληθαργικότητα, κοιλιακά άλγη, οισοφαγικό σπασμό, διαταραχές της στύσης και πιθανότατα θρομβώσεις, που αποτελούν συχνές εκδηλώσεις στους ασθενείς αυτούς,¹¹³ ενώ συνδέεται παθογενετικά με την αύξηση των συστηματικών και των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων.¹¹⁴ Άλλωστε, ήπιου έως μέτριου βαθμού πνευμονική υπέρταση έχει αναγνωριστεί σε ασθενείς με άλλες κληρονομικές αιμολυτικές νόσους, όπως η θαλασαιμία και η κληρονομική σφαιροκυττάρωση, γνωστή με τον όρο «διαμεσολαβούμενη από αιμόλυση πνευμονική υπέρταση» (haemolysis-associated pulmonary hypertension), η οποία αποτελεί συχνή αιτία θανάτου στους ασθενείς με αιμολυτική νόσο¹¹⁷ (εικ. 15).

Συγκεκριμένα στη ΝΠΑ, ο τυπικός βαθμός της αιμόλυσης υπερβαίνει τον αντίστοιχο των υπόλοιπων κληρονομικών, επίκτητων και ιατρογενών αιμολυτικών καταστάσεων, με τιμές γαλακτικής αφυδρογονάσης (lactate dehydrogenase, LDH) >20 φορές του φυσιολογικού.¹¹⁸ Έτσι, η χρόνια αιμόλυση στη ΝΠΑ οδηγεί σε μεγαλύτερο βαθμό στην αύξηση της συστολικής αρτηριακής πίεσης (ΣΑΠ) –που αποτελεί δείκτη της μεταβολής του αγγειακού τόνου της συστηματικής κυκλοφορίας– καθώς και στην εμφάνιση σημείων πνευμονικής υπέρτασης, όπως η δύσπνοια, επίπεδα NT-proBNP ≥ 160 pg/mL (φυσιολογικές τιμές: 16–49 pg/mL, ευαισθησία 86%, ειδικότητα 95%) (N-terminal pro-brain natriuretic peptide, μη επεμβατικός δείκτης των πνευμονικών αγγειακών αντιστάσεων και της δυσλειτουργίας της δεξιάς κοιλίας).¹¹⁹ Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει μια αιτιολογική σχέση μεταξύ ελεύθερης αιμοσφαιρίνης,

έκπλυσης του NO, και NT-proBNP. Επίσης, τα υψηλά επίπεδα NT-proBNP σχετίζονται με αυξημένες τιμές LDH, ασπαρατικής αμινοτρανσφεράσης (aspartate transaminase, AST) και ολικής χολερυθρίνης, καθώς και με χαμηλά επίπεδα αιμοσφαιρίνης, τα οποία αναμένονται στη χρόνια αιμόλυση.¹¹⁹ Η αναστολή της αιμόλυσης μέσω της εκουλιζουμάμπης οδηγεί σε βελτίωση της δύσπνοιας, της ΣΑΠ (της τάξης των 10 mmHg κατά μέσον όρο) και των επιπέδων του NT-proBNP, η οποία, μάλιστα, προηγείται και δεν συνοδεύεται από αξιόλογη μεταβολή της αιμοσφαιρίνης του αίματος.¹²⁰

5.3. Θρομβοεμβολικά επεισόδια και διαταραχή της πήκτικότητας

Εκτός όμως από την αιμόλυση, φαίνεται ότι η έλλειψη των GPI-AP συμμετέχει στην παθογένεση της θρομβωτικής διάθεσης, η οποία αποτελεί μια σοβαρή και συχνά θανατηφόρα επιπλοκή που εμφανίζεται στο 30–40% περίπου των ασθενών με ΝΠΑ.¹⁰⁵ Μάλιστα, όπως φαίνεται από τις μελέτες των Hill et al, οι περιπτώσεις υποκλινικής θρόμβωσης είναι αρκετά συχνές,¹²¹ αναδεικνύοντας την υποεκτίμηση της επίπτωσής της. Ο κίνδυνος της φλεβικής θρόμβωσης φαίνεται ότι σχετίζεται με το μέγεθος του κλώνου των πολυμορφοπύρηνων ουδετεροφίλων.¹¹³ Εφ' όσον το μέγεθος του ουδετεροφιλικού κλώνου συνδέεται στενά με το αντίστοιχο των αιμοπεταλίων,¹²² πολύ πιθανόν και ο τελευταίος να επηρεάζει τον κίνδυνο θρομβώσεων. Η φλεβική θρόμβωση εμφανίζεται συχνά σε ασυνήθεις θέσεις και κυρίως ενδοκοιλιακά (π.χ. μεσεντέριες, ηπατικές φλέβες) ή σε εγκεφαλικές φλέβες. Ο κίνδυνος της αρτηρι-



Εικόνα 15. Συμμετοχή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) στην παθοφυσιολογία της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας (ΝΠΑ). (Α) Φυσιολογικά, η συνθέταση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) σχηματίζει κιτρουλίνη και NO. (Β) Μηχανισμός κατανάλωσης του NO από την ελεύθερη αιμοσφαιρίνη στην κυκλοφορία των ασθενών με ΝΠΑ, κατά την ενδαγγειακή αιμόλυση, με σχηματισμό μεθαιμοσφαιρίνης, και οι κλινικές εκδηλώσεις λόγω σύσπασης των λείων μυϊκών ινών. Δεν απεικονίζεται η απελευθέρωση ερυθροκυτταρικής αργινίνης, που μειώνει την αργινίνη, υπόστρωμα της NOS (από Brodsky RA. *Blood Rev* 2007, 22:65–74, τροποποιημένο).

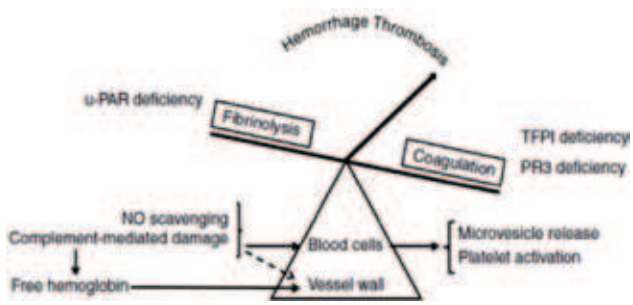
ακής θρόμβωσης είναι επίσης αυξημένος συγκριτικά με τους υγιείς ασθενείς, ενώ εμφανίζεται σε θέσεις όπως οι εγκεφαλικές ή οι στεφανιαίες αρτηρίες.^{1,105,123,124} Η θρόμβωση είναι ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωση, ιδιαίτερα στους ΝΠΑ ασθενείς με υποκλινική μορφή.^{125,126} Η κλινική της σημασία αντικατοπτρίζεται στην επίπτωσή της, καθώς και στο γεγονός ότι αποτελεί αιτία νοσηρότητας και θνητότητας των ασθενών αυτών. Έτσι, πολλαπλοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την εξήγηση της θρομβοφιλίας στη ΝΠΑ (εικ. 16).

Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων πολύ πιθανόν να συμμετέχει στην παθογένεση της θρόμβωσης στη ΝΠΑ. Ενώ τα φυσιολογικά αιμοπετάλια εκφράζουν τον DAF και τον MIRL στην επιφάνειά τους, τα εν λόγω μόρια απουσιάζουν από τα «παθολογικά» κύτταρα, τα οποία δεν χαρακτηρίζονται από ευαισθησία στο συμπλήρωμα, λόγω της ικανότητάς τους να αποβάλλουν το MAC.¹²⁷ Σε δύο μικρές μελέτες 16 ασθενών, ο χρόνος ζωής τους ήταν φυσιολογικός, στην πλειονότητα των περιπτώσεων.^{128,129} Η παρατήρηση ότι μετά από θεραπεία με το αντι-C5 αντίσωμα eculizumab τόσο το μέγεθος του κλώνου των παθολογικών αιμοπεταλίων όσο και ο αριθμός τους παρέμενε σταθερός, ενισχύει την άποψη ότι επιβιώνουν της καταστροφικής δράσης του συμπληρώματος.¹³⁰ Μάλιστα, αν και η θρομβοπενία στη ΝΠΑ είναι συχνή εκδήλωση, φαίνεται ότι οφείλεται περισσότερο στη συνυπάρχουσα μυελική ανεπάρκεια παρά στη δράση του συμπληρώματος. Έτσι, αν και το συμπλήρωμα δεν

φαίνεται να καταστρέφει άμεσα τα αιμοπετάλια, σίγουρα οδηγεί στην ενεργοποίησή τους.

Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι το CD59 προστατεύει τα αιμοπετάλια από τη δράση του συμπληρώματος, ενώ η απουσία του διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση θρομβώσεων στη ΝΠΑ. Ακόμη και στα φυσιολογικά κύτταρα, η παρουσία του MAC οδηγεί στην έκκριση του παράγοντα V (factor V, FV) από τα α κοκκία, αυξάνει τη δραστηριότητα της προθρομβινάσης και οδηγεί στην απελευθέρωση μικροκυστιδίων *in vitro*.¹³¹ Φαίνεται λοιπόν ότι η ανεπάρκεια του CD59 ευοδώνει την ενεργοποίησή τους από το συμπλήρωμα σε μεγαλύτερο βαθμό, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη προπηκτική δραστηριότητα και δημιουργία θρόμβου. Αναστέλλοντας πειραματικά το CD59 αυξάνονται οι προπηκτικές ιδιότητες,⁷⁹ όπως θα αναμενόταν μετά τη συσσώρευση σχηματισμένων MAC στη μεμβράνη των GPI(-) αιμοπεταλίων. *In vitro* μελέτες από τους Wiedmer et al έδειξαν ότι τα «παθολογικά» κύτταρα πράγματι εμφανίζουν στην επιφάνειά τους περισσότερες περιοχές υποδοχής για τον ενεργοποιημένο FV (FVa) και αυξημένη παραγωγή θρομβίνης μετά από διέγερση από το MAC, σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα.¹³²

Τα μικροσωματίδια (microparticles) είναι μικρά μεμβρανικής προέλευσης μικροκυστιδία που αποβάλλονται από τα αιμοπετάλια, μετά την ενεργοποίησή τους μέσω φλεγμονής ή κυτταρικής βλάβης. Φυσιολογικά, οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από ανιονικά, όξινα φωσφολιπίδια, όπως η φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidyl-serine, PS), στο εσωτερικό τους μέρος, και βασιζόμενα στη χολίνη φωσφολιπίδια (όπως η σφιγγομυελίνη και η φωσφατιδυλοχολίνη) στο εξωτερικό τους μέρος. Η διέγερση των αιμοπεταλίων από το συμπλήρωμα φαίνεται ότι οδηγεί στην απώλεια αυτής της μεμβρανικής ασυμμετρίας και την έκθεση των όξινων φωσφολιπιδίων –ειδικά PS– προς την πλευρά του πλάσματος, ακολουθούμενη από διαταραχή του κυτταροσκελετού και απελευθέρωση μικροσωματιδίων. Η έκθεση της PS στην επιφάνεια είτε των μικροσωματιδίων είτε της μεμβράνης θεωρείται ότι αποτελεί μια καταλυτική επιφάνεια για τη συναρμολόγηση των προπηκτικών συμπλεγμάτων της προθρομβινάσης (FVa/FXa) και της τενάσης (FVIIIa/FIXa).^{133,134} Έτσι, *in vivo*, με τη βοήθεια μιας δοκιμασίας βασιζόμενης στην προθρομβινάση, τα ολικά επίπεδα των μικροσωματιδίων που περιέχουν PS φαίνεται να είναι υψηλότερα στους ΝΠΑ ασθενείς, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά άτομα, ενώ ήταν ανεξάρτητη από το μέγεθος του κλώνου στο περιφερικό αίμα.¹³⁴ Είναι αξιοσημείωτο δε ότι αν και τα «παθολογικά» ερυθρά απελευθερώνουν *in vitro* προπηκτικά μικροσωματίδια σε μεγαλύτερες ποσότητες μετά από διέγερση από το συμπλήρωμα,^{135,136} το γεγονός ότι δεν ανιχνεύονται τα συγκεκριμένα μικροσωματίδια άμεσα *in*



Εικόνα 16. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί θρόμβωσης στη νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία (ΝΠΑ). Η ισορροπία της αιμόστασης ανάμεσα στην πήξη (coagulation) και στην ινωδολύση (fibrinolysis) επηρεάζεται από παράγοντες του τοιχώματος των αγγείων (vessel wall) και των κυττάρων του αίματος (blood cells). Μηχανισμοί όπως (α) η απελευθέρωση ελεύθερης αιμοσφαιρίνης (free hemoglobin), που ενεργοποιεί το ενδοθήλιο και καταναλώνει το μονοξείδιο του αζώτου (nitric oxide, NO, scavenging), και (β) η απελευθέρωση μικροσωματιδίων (microvesicles release) στην κυκλοφορία και η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (platelet activation), λόγω της ευαισθησίας των GPI(-) κυττάρων στη λυτική δράση του συμπληρώματος (complement-mediated damage), καθώς και η ανεπάρκεια (deficiency) GPI-συνδεδεμένων ινωδολυτικών παραγόντων, όπως ο u-PAR, και αντιπηκτικών παραγόντων, όπως ο αναστολέας του ιστικού παράγοντα (TFPI) και η πρωτεΐνη 3 (PR3), μεταβάλλουν την ισορροπία προς τη θρομβοφιλική κατάσταση (thrombosis) της ΝΠΑ (από van Bijnen et al. *J Thromb Haemost* 2012, 10:1–10).

vivo ενισχύει την άποψη ότι αυτά καθαίρονται τάχιστα από την κυκλοφορία, θέτοντας έτσι υπό αμφισβήτηση την κλινική τους σημασία στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης. Ακολούθως, τα αυξημένα επίπεδα του ιστικού παράγοντα των λευκοκυττάρων (leukocyte-derived tissue factor, LD-TF), σε δύο ΝΠΑ ασθενείς με σοβαρά υποτροπιάζοντα επεισόδια θρόμβωσης, σε σύγκριση με φυσιολογικούς αιμοδοτές,¹³⁷ ενισχύει το εύρημα ότι στα GPI(-) λευκοκύτταρα το C5a κλάσμα του συμπληρώματος ευοδώνει ακόμη περισσότερο την έκφραση του μονοκυτταρικού TF και την απελευθέρωση μικροσωματιδίων που περιέχουν TF, τα οποία παρουσιάζουν έντονη προπηκτική δράση.¹³⁸

Εκτός από το CD59, υπάρχουν ενδείξεις ότι και άλλοι παράγοντες που σχετίζονται με την «άγκυρα» GPI συμμετέχουν –μέσω της ανεπάρκειάς τους– στη διαμόρφωση της υπερπηκτικής κατάστασης της ΝΠΑ. Τέτοια είναι η περίπτωση του αναστολέα της οδού του ιστικού παράγοντα (tissue factor pathway inhibitor, TFPI), ενός μορίου το οποίο, δημιουργώντας σύμπλεγμα με τον TF και τους ενεργοποιημένους παράγοντες VII (FVIIa) και X (FXa), αναστέλλει την ενδογενή οδό της πήξης. Ο TFPI παράγεται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα (endothelial cells, EC) (85%) αλλά και στα ενεργοποιημένα κύτταρα, όπως τα αιμοπετάλια και τα μονοκύτταρα, ή κυκλοφορεί διαλυτός στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, ο ισότυπος TFPIa που εκφράζεται στα αιμοπετάλια συνδέεται στη μεμβράνη τους μέσω του μορίου της GPI (όπως και ο ισότυπος TFPIβ, που απουσιάζει όμως από τη μεμβράνη των αιμοπεταλίων).^{139,140} Είναι χαρακτηριστικό ότι, ενώ σε κατάσταση ηρεμίας τα αιμοπετάλια δεν εκφράζουν TFPIa, η ενεργοποίησή τους οδηγεί τόσο στην παραγωγή όσο και στην απελευθέρωσή του σε μικροκυστίδια, μαζί με άλλους προπηκτικούς παράγοντες.¹⁴¹ Είναι εύλογο λοιπόν το συμπέρασμα ότι τα διεγερμένα GPI(-) κύτταρα στερούνται του παράγοντα αυτού από την επιφάνειά τους, γεγονός που οδηγεί στην περαιτέρω ευόδωση της πήξης.

Επίσης, η πρωτεϊνάση-3 (proteinase 3, PR3) είναι ένα ένζυμο το οποίο εκφράζεται στα ουδετερόφιλα και συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη χρησιμοποιώντας έμμεσα το μόριο της GPI, μέσω του συμπαράγοντα NB1 (CD177).¹⁴² Η PR3 συμμετέχει στο μηχανισμό της πήξης πλειοτρόπως, όπως μέσω της κάθαρσης του υποδοχέα της πρωτεΐνης C στα EC,¹⁴³ της αποδόμησης του TFPI, της ευόδωσης της έκφρασης του ενδοθηλιακού TF¹⁴⁴ και της κάθαρσης του παράγοντα von Willebrand¹⁴⁵ (von Willebrand factor, vWF). Επί πλέον, φαίνεται ότι η PR3 αναστέλλει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, που μεσολαβείται από τη θρομβίνη.¹⁴⁶ Έτσι, η αποδεδειγμένη απουσία της στα GPI(-) ουδετερόφιλα πολύ πιθανόν να ευοδώνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και γενικότερα την πήξη μέσω των μηχανισμών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Μάλιστα, η ελεύθερη

στο πλάσμα PR3 σχετίζεται αντίστροφα με το μέγεθος του ΝΠΑ κλώνου των πολυμορφοκυττάρων.¹⁴⁷

Στην παθογένεση της φλεβικής θρόμβωσης στη ΝΠΑ πιθανόν να διαδραματίζει ρόλο και κάποια διαταραχή του ινωδολυτικού συστήματος λόγω απουσίας ενός υποδοχέα ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator receptor, u-PAR, CD87) από τα ΝΠΑ μονοκύτταρα και τα αιμοπετάλια.⁹⁶ Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι τα επίπεδα του u-PAR στο πλάσμα των ΝΠΑ ασθενών είναι αυξημένα¹⁴⁸ και ότι σχετίζονται θετικά με το μέγεθος του παθολογικού κλώνου των ουδετεροφίλων,¹⁴⁹ υποδηλώνοντας ότι, χωρίς την «άγκυρα» GPI, ο u-PAR δεν μπορεί να συνδεθεί στην κυτταρική μεμβράνη. Έτσι, ο ελεύθερος στο πλάσμα υποδοχέας ενδεχομένως να συναγωνίζεται με τον συνδεδεμένο στη μεμβράνη για την πρόσδεση της ουροκινάσης (urokinase plasminogen activator, u-PA).¹⁵⁰ Είναι αξιοσημείωτο ότι το σχετικό μόριο ανήκει στην ίδια υπεροικογένεια πρωτεϊνών, όπως ο CD59, έχοντας παρόμοια δομή.¹⁵¹ Διαδραματίζοντας η u-PA το ρόλο της ενεργοποίησης του ινωδολυτικού μηχανισμού που καταλήγει στο σχηματισμό πλασμίνης και στη λύση του θρόμβου, η απουσία του εν λόγω υποδοχέα από την κυτταρική μεμβράνη έχει ως συνέπεια τη σταθεροποίηση του σχηματισθέντος θρόμβου, προάγοντας τη θρόμβωση.⁹⁶

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, το NO συμμετέχει ενεργά στη διατήρηση του φυσιολογικού τόνου των ΑΜΙ του τοιχώματος των αγγείων, αναστέλλει την ενεργοποίηση και τη συγκόλληση των αιμοπεταλίων, ενώ έχει και αντιφλεγμονώδη επίδραση στο ενδοθήλιο. Είναι φυσικό επακόλουθο λοιπόν, μέσω αυτών των μηχανισμών, η κατανάλωσή του λόγω της ενδαγγειακής αιμόλυσης στη ΝΠΑ να αυξάνει τον κίνδυνο θρόμβωσης στους συγκεκριμένους ασθενείς.¹¹⁴ Εν τούτοις, είναι ανεπαρκή έως τώρα τα δεδομένα που συσχετίζουν άμεσα τα χαμηλά επίπεδα NO με τα θρομβωτικά επεισόδια στη ΝΠΑ. Από την άλλη πλευρά, καθώς οι φλέβες στερούνται ΑΜΙ και τα αιμοπετάλια συμβάλλουν ελάχιστα στην παθογένεση της φλεβικής θρόμβωσης, η έρευνα θα έπρεπε να προσανατολιστεί μάλλον στη διευκρίνιση της συμμετοχής του στα αρτηριακά θρομβωτικά συμβάματα.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι ο ρόλος της βλάβης των EC είναι θεμελιώδης στην παθοφυσιολογία της θρόμβωσης. Υπάρχουν λοιπόν μελέτες που υποστηρίζουν την παρουσία υψηλών επιπέδων δεικτών ενεργοποίησης των EC στη ΝΠΑ, όπως του vWF και του διαλυτού VCAM-1 (soluble vascular cell adhesion molecule 1, sVCAM-1, CD106),^{152,153} υποδηλώνοντας ενδοθηλιακή βλάβη είτε από την τοξική δράση της ελεύθερης αιμοσφαιρίνης,¹¹⁴ είτε από το συμπλήρωμα. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις πως τα πρόδρομα EC προέρχονται από το μυελό των οστών.¹⁵⁴ Στα μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα τα κυκλοφορούντα EC φέρουν τις ίδιες χρωμο-

σωμικές ανωμαλίες με τα αρχέγονα αιμοποιητικά κύτταρα,¹⁵⁵ υποδηλώνοντας έτσι την κοινή τους προέλευση.¹⁵⁶ Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη αν τα EC των ασθενών με ΝΠΑ φέρουν τη μετάλλαξη *PIG-A*, ώστε να είναι περισσότερο ευαίσθητα στη λυτική δράση του συμπληρώματος. Πρώιμες μελέτες δείχνουν ότι μάλλον η εν λόγω υπόθεση ισχύει και στη ΝΠΑ.¹⁵³ Παρ' όλα αυτά, ακόμη και στα φυσιολογικά EC, το MAC αυξάνει σημαντικά την έκφραση του TF και των μορίων προσκόλλησης.

Σπάνια οι ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν γενετικές ή επίκτητες διαταραχές θρομβοφιλικών παραγόντων, όπως η πρωτεΐνη C, η πρωτεΐνη S, ο παράγοντας V Leiden, η αντιθρομβίνη III και η ομοκυστεΐνη,^{1,152,157-159} ενώ δεν φαίνεται να σχετίζεται η παρουσία τους με την εμφάνιση θρομβωτικών εκδηλώσεων. Ομοίως, η παρουσία αντιπηκτικού του λύκου ή αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων δεν αποδείχθηκε να σχετίζεται σημαντικά με θρομβωτικά επεισόδια στους ασθενείς με ΝΠΑ.^{159,160} Βέβαια, ο αριθμός των ασθενών στις σχετικές μελέτες είναι πολύ μικρός για να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί η παρουσία μεταλλάξεων του JAK-V617F σε 3 ασθενείς με κλασική ΝΠΑ, ανάμεσα σε 21 ασθενείς με ΝΠΑ και σύνδρομο Budd-Chiari. Μάλιστα, ακόμη πιο ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η βλάβη αυτή εμφανίστηκε μόνο στον παθολογικό κλώνο (με μετάλλαξη του *PIG-A*) και όχι στα φυσιολογικά κύτταρα.¹⁶¹ Το εν λόγω εύρημα σίγουρα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, εφ' όσον η παρουσία μετάλλαξης JAK2-V617F είναι συχνή στα μυελοϋπερπλαστικά νοσήματα (myeloproliferative diseases, MPDs), όπου υπάρχει αυξημένος κίνδυνος θρόμβωσης σε θέσεις παρόμοιες με αυτές της ΝΠΑ. Αν και η διάγνωση τέτοιων διαταραχών ανιχνεύει ασθενείς με ΝΠΑ σε μεγαλύτερο κίνδυνο για θρομβωτικό επεισόδιο, η προγνωστική τους αξία σε περίπτωση υποτροπής, σε μη επιλεγμένους ασθενείς, δεν έχει μελετηθεί ακόμη εκτενώς.¹⁶² Έτσι, η αξία τους όσον αφορά σε θεραπευτικές αποφάσεις είναι άγνωστη και δεν συστήνονται ως δοκιμασία ρουτίνας. Επιγραμματικά, αξίζει να σημειωθεί ότι το μέγεθος του κλώνου ΝΠΑ στα πολυμορφοπύρρηνα όχι μόνο αντανάκλα τον αυξημένο κίνδυνο θρομβωτικών εκδηλώσεων, αλλά, σε ορισμένες περιπτώσεις, αποτελεί σημαντικό κριτήριο για χορήγηση προφυλακτικής αντιπηκτικής θεραπείας.^{26,163}

Τέλος, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα ανέδειξαν την παρουσία ενός GPI-specific CD1d-restricted T-κυτταρικού πληθυσμού, ο οποίος συμμετέχει στην παθογένεση της μυελικής ανεπάρκειας στη ΝΠΑ. Καθώς όμως το μόριο της GPI δεν εκφράζεται αποκλειστικά στον αιμοποιητικό ιστό, υπάρχει η δυνατότητα να πλήττονται και άλλα συστήματα, σε περίπτωση που αυτή αποτελεί το αντιγόνο-στόχο. Συνεπώς, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το CD1d εκφράζεται στο μυϊκό χιτώνα των ενδοκοιλιακών αγγείων, καθώς

συμβάλλει στην ερμηνεία της παθογένεσης των φλεβικών θρομβώσεων και ειδικά της αυξημένης εμφάνισής τους σε θέσεις όπως ενδοκοιλιακά ή ενδοεγκεφαλικά.¹⁶⁴

5.4. Μυελική υποπλασία και σύνδρομο μυελικής ανεπάρκειας

Η κυτταροβρίθεια του μυελού των οστών στους ασθενείς με ΝΠΑ τοποθετείται μέσα σε ένα ευρύ φάσμα, τα άκρα του οποίου κυμαίνονται από την πλήρη απλασία έως την έντονη κυτταροβρίθεια με υπερπλασία της ερυθράς σειράς. Οι ασθενείς με ΝΠΑ εμφανίζουν ποικίλους βαθμούς αναιμίας, ουδετεροπενίας και θρομβοπενίας στη διάγνωση. Η επίπτωση της αναιμίας κυμαίνεται στο 88-94%, της λευκοπενίας στο 41-72% και της θρομβοπενίας στο 51-80%.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Εκτός από την περιφερική καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων λόγω αιμόλυσης, οι κυτταροπενίες προκαλούνται πρωταρχικά από τη μυελική ανεπάρκεια παρά από την περιφερική καταστροφή, εφ' όσον ο χρόνος ζωής των πολυμορφοπυρήνων και των αιμοπεταλίων είναι σχεδόν φυσιολογικός.^{128,129,168} Ακόμη και επί απουσίας εμφανούς κυτταροπενίας στο περιφερικό αίμα και στο μυελό των οστών, ο αριθμός των προγονικών αιμοποιητικών κυττάρων, όπως τα CD34(+) και τα προγονικά κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες (colony-forming cells, CFC), είναι μειωμένα, όπως στην AA.¹⁶⁹⁻¹⁷¹

Παρατηρώντας τη βιολογία της νόσου σε βάθος, αν και οι περισσότερες κλινικές εκδηλώσεις της ΝΠΑ απορρέουν από τη μοριακή βλάβη του γονιδίου *PIG-A* και από τη συνεπακόλουθη λειτουργική ανεπάρκεια των διαφόρων αιμοποιητικών σειρών, η διαταραχή της αιμοποίησης, καθολικά παρούσα σε ποικίλο βαθμό σε όλους τους ΝΠΑ ασθενείς, δεν μπορεί να ερμηνευτεί αποκλειστικά από το γενετικό αυτό έλλειμμα.^{172,173} Άλλωστε, μεταλλάξεις του *PIG-A* γονιδίου έχουν ανιχνευτεί στα κύτταρα του περιφερικού αίματος φυσιολογικών αιμοδοτών.²² Η πλειονότητα των πειραματικών και των κλινικών ευρημάτων υποστηρίζει την παρουσία μιας ανοσολογικής επίθεσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, αν και οι ακριβείς παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Πράγματι, μικρού και μεσαίου μεγέθους κλώνοι ΝΠΑ ανευρίσκονται έως και στο 70% των ασθενών με AA.^{1,49,174-179} Ανοσολογικοί μηχανισμοί κατέχουν σημαντικό ρόλο στη βλάβη του αιμοποιητικού ιστού, οδηγώντας σε κατανάλωση της δεξαμενής των mHSC ή σε λειτουργική ανεπάρκειά τους και συνοδό πανκυτταροπενία, αντικατοπτρίζοντας έτσι την παθοφυσιολογική σύνδεση των δύο διαταραχών. Τυπικά, έως και 20% GPI(-) πολυμορφοπύρρηνα ανιχνεύονται στο περιφερικό αίμα ασθενών με AA, κατά τη στιγμή της διάγνωσης, ενώ ορισμένοι παρουσιάζονται με μεγάλους μεγέθους κλώνους (έως 70%). Η κυτταρογενετική ανάλυση

των συγκεκριμένων κυττάρων αναδεικνύει την παρουσία κλωνικών μεταλλάξεων του *PIG-A*. Επί πλέον, πολλοί από αυτούς τους ασθενείς παρουσιάζουν επέκταση του *PIG-A* μεταλλαγμένου κλώνου, ενδεχομένως λόγω της επιλεκτικής ανοσολογικής επίθεσης έναντι της φυσιολογικής αιμοποίησης, από την οποία διαφεύγει. Πράγματι, οι εν λόγω ασθενείς εκδηλώνουν τυπικά κλινικά συμπτώματα της νόσου (π.χ. αιμοσφαιρινουρία).^{1,177-179}

Μικροί πληθυσμοί «τύπου ΝΠΑ» ανευρίσκονται έως και στο 50% των ασθενών με μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (myelodysplastic syndrome, MDS).^{1,49,175-177} Σπάνια, ωστόσο, έχει επιβεβαιωθεί η κλωνικότητά τους, μέσω της μοριακής ανίχνευσης της υποκειμένης μετάλλαξης του *PIG-A* γονιδίου.^{180,181} Μάλιστα, οι ασθενείς αυτοί εμφανίζουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ταξινομούνται ως ανθεκτική αναιμία-μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (refractory anaemia, RA-MDS) και εμφανίζουν τα εξής: Υποκυτταρικό μυελό, HLA-DR15 θετικότητα, φυσιολογική κυτταρογενετική ανάλυση, μέτρια προς σοβαρή θρομβοπενία, και υψηλότερη πιθανότητα ανταπόκρισης στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία.^{1,176,177} Ωστόσο, σε αντίθεση με την ΑΑ, φαίνεται ότι οι MDS ασθενείς σπανιότερα αναπτύσσουν κλινική ΝΠΑ, ενώ η παρουσία τους ενδέχεται να μη σχετίζεται τελικά με καλύτερη ανταπόκριση στην ανοσοκατασταλτική θεραπεία ή με καλύτερη πρόγνωση.¹⁸¹ Τα αποκλίνοντα αυτά συμπεράσματα πιθανόν εν μέρει να απορρέουν από τη δυσκολία απόλυτης διάκρισης ανάμεσα στην ΑΑ και το υποκυτταρικό MDS, όπου η ποσοτική ανάλυση των CD34(+) κυττάρων στο μυελό των οστών είναι εξαιρετικά χρήσιμο μέσο για το διαχωρισμό των δύο αυτών οντοτήτων.^{182,183} Τέλος, φαίνεται ότι η βλάβη στην ΑΑ, όπως και στη ΝΠΑ, εντοπίζεται σε

ένα πιο πρώιμο αρχέγονο κύτταρο συγκριτικά με νόσους όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία, το MDS και η οξεία λευχαιμία. Στις τελευταίες περιπτώσεις, τα Β-λεμφοκύτταρα πιθανόν να προέρχονται από το λευχαιμικό κλώνο, αλλά τα Τ-λεμφοκύτταρα σπάνια συμμετέχουν. Οι μικροί GPI(-) πληθυσμοί προέρχονται από CFC που είναι δεσμευμένα, όπως συμβαίνει και σε φυσιολογικούς αιμοδοτές.¹⁸¹

Παράλληλα, στη διαμόρφωση της μυελικής ανεπάρκειας καθοριστικός αναδεικνύεται ο ρόλος συγκεκριμένων υποτύπων ολιγοκλωνικών λεμφοκυττάρων, ανασταλτικών κυτταροκινών της αιμοποίησης και αποπτωτικών μηχανισμών.²⁷ Άλλωστε, έχει αποδειχθεί η στενή σύνδεση των διαφόρων μορφών της ΝΠΑ με συγκεκριμένα αντιγόνα ΜHC, αντανακλώντας ότι οι GPI(-) κλώνοι είναι αποτέλεσμα μιας ανοσολογικά μεσολαβούμενης διαδικασίας, όπως συμβαίνει και με άλλα αυτοάνοσα νοσήματα.¹⁸⁴ Αυτές οι παθοφυσιολογικές διεργασίες πιθανόν να αντανakλώνται και στην παρουσία «τύπου ΝΠΑ» ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με αυτοάνοσα νοσήματα του συνδετικού ιστού, όπως περιγράφηκε πρόσφατα για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η έλλειψη του CD55 από την επιφάνεια των ερυθρών, και όχι του CD59, φαίνεται να αποτελεί δείκτη της συμβολής της αυτοανοσίας στη διαταραχή της ερυθροποίησης, μέσω μιας ανοσολογικά μεσολαβούμενης μυελικής ανεπάρκειας στο μυελό των οστών των συγκεκριμένων ασθενών.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Με αυτόν τον τρόπο η παθοφυσιολογία της μυελικής ανεπάρκειας είναι στενά συνυφασμένη τόσο με την παθογένεση της νόσου όσο και με την τελική κλινική της έκφραση, η εκτενής περιγραφή της οποίας δεν αποτελεί σκοπό της παρούσας ανασκόπησης.

ABSTRACT

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: From the molecular and biochemical defect to the clinical presentation

J.V. ASIMAKOPOULOS,¹ L. PAPAGEORGIOU,¹ O. KAMPOUROPOULOU,² M. SAMARKOS,² E. PLATA,¹ E. VARIAMI,² T.P. VASSILAKOPOULOS,¹ P. TSAFTARIDIS,¹ M.K. ANGELOPOULOU,¹ K. KONSTANTOPOULOS,¹ E. TERPOS,³ J. MELETIS¹

¹Hematology Department and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Laikon" General Hospital, Athens, ²First Department of Internal Medicine, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Laikon" General Hospital, Athens, ³Department of Clinical Therapeutics, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, "Alexandra" General Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2015, 32(4):391-421

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) or Marchiafava-Micheli disease is an acquired clonal hematopoietic stem cell disorder that few clinicians or even hematologists have followed throughout its full natural history and clinical course. The molecular and biochemical background of PNH was elucidated at the end of the last century following

decades of research. Over 180 somatic mutations of the X-linked gene *PIG-A* in hematopoietic stem cells have been implicated in the pathogenesis of PNH, resulting in impairment of the biosynthetic pathway of the glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) molecule, which is a glycoprotein mechanism for membrane anchoring. PNH is the first and single example of acquired autoimmune hemolytic anemia with a negative Coombs' test. It is based on a red cell membrane defect with normal morphology, which leads to paroxysmal episodes of hemoglobinuria, with dark-coloured urine most noticeable in the morning. The red cell membrane deficiency of CD55 and CD59, GPI-anchored complement regulatory proteins, adequately explains the symptom of chronic intravascular hemolysis with hemosiderinuria, although the pathogenesis of thromboembolic events in unusual sites and bone marrow failure, which complement the characteristic clinical triad of PNH manifestations, still remains obscure. This review summarizes the available scientific elements of the unique molecular and biochemical defect of PNH and describes the underlying pathogenetic pathways that lead to its clinical manifestations.

Key words: Aplastic anemia, Bone marrow failure, CD55, CD59, Decay accelerating factor, Hemolytic anemia, Membrane inhibitor factor, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria

Βιβλιογραφία

- MELETIS J, TERPOS E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Med Sci Monit* 2003, 9:RA161–RA172
- ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ. Από το αιματολογικό εύρημα στη διάγνωση. 7η έκδοση. Εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα, 2009:163
- PARKER CJ. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 2007, 35:523–533
- ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΧ, ΤΕΡΠΟΣ Ε, ΛΙΛΑΚΟΣ Κ. *Νυκτερινή παροξυντική αιμοσφαιρινουρία*. Εκδόσεις Νηρέας, Αθήνα, 2011
- JOHNSON RJ, HILLMEN P. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Nature's gene therapy? *Mol Pathol* 2002, 55:145–152
- STRÜBING P. Paroxysmale Haemoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr* 1882, 8:1–16
- MARCHIAFAVA E, NAZARI A. Nuovo contributo allo studio degli itteri cronici emolitici. *Policlinico (Med)* 1911, 18:241–254
- MICHELLI F. Anaemia (splenomegalia) emolitica con emoglobinuria-emosiderinuria tipo Marchiafava. *Haematologica* 1931, 12:101
- HIJMANS VAN DEN BERGH AA. Ictère hémolytique avec crises hémoglobinuriques. Fragilité globulaire. *Rev Med (Paris)* 1911, 31:63–69
- HAM TH, DINGLE JH. Studies on 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
- HARTMANN RC, JENKINS DE. The "sugar-water" test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1966, 275:155–157
- DACIE JV, GIPLIN A. Refractory anaemia (Fanconi type): Its incidence in three members of one family, with in one case a relationship to chronic haemolytic anaemia with nocturnal haemoglobinuria (Marchiafava-Micheli disease or "nocturnal haemoglobinuria"). *Arch Dis Child* 1944, 19:155–162
- ROSSE WF, DACIE JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 1966, 45:736–748
- ROSSE WF, DACIE JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. II. The role of complement components in the increased sensitivity of PNH red cells to immune lysis. *J Clin Invest* 1966, 45:749–757
- ONI SB, OSUNKOYA BO, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 1970, 36:145–152
- ASTER RH, ENRIGHT SE. A platelet and granulocyte membrane defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Usefulness for the detection of platelet antibodies. *J Clin Invest* 1969, 48:1199–1210
- LOW MG, FINEAN JB. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J* 1977, 167:281–284
- NICHOLSON-WELLER A, MARCH JP, ROSENFELD SI, AUSTEN KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80:5066–5070
- DAVITZ MA, LOW MG, NUSSENZWEIG V. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. *J Exp Med* 1986, 163:1150–1161
- 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, 84:7–17
- TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, IIDA Y, ENDO Y, FUJITA T ET AL. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the *PIG-A* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993, 73:703–711
- ARATEN DJ, NAFA K, PAKDEESUWAN K, LUZZATTO L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in nor-

- mal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:5209–5214
23. ROTOLI B, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 1989, 26:201–207
 24. LUZZATTO L, BESSLER M. The dual pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Curr Opin Hematol* 1996, 3:101–110
 25. NOWAK J, WOZNAK J, MENDEK-CZAJKOWSKA E, DLUGOKECKA A, MIKA-WITKOWSKA R, ROGATKO-KOROS M ET AL. Potential link between MHC-self-peptide presentation and hematopoiesis; the analysis of HLA-DR expression in CD34-positive cells and self-peptide presentation repertoires of MHC molecules associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell Biochem Biophys* 2013, 65:321–333
 26. PARKER C, OMINE M, RICHARDS S, NISHIMURA J, BESSLER M, WARE R ET AL. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005, 106:3699–3709
 27. RISITANO AM, ROTOLI B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics* 2008, 2:205–222
 28. ENNEKING J. Eine neue Form intermittierender Haemoglobinurie (haemoglobinuria paroxysmalis nocturia). *Klin Wochenschr* 1928, 7:2045
 29. LOW MG. Glycosyl-phosphatidylinositol: A versatile anchor for cell surface proteins. *FASEB J* 1989, 3:1600–1608
 30. LOW MG. Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. *Biochem J* 1987, 244:1–13
 31. FERGUSON MA, HOMANS SW, DWEK RA, RADEMACHER TW. Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* 1988, 239:753–759
 32. KAMITANI T, MENON AK, HALLAQY, WARREN CD, YEH ET. Complexity of ethanolamine phosphate addition in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in mammalian cells. *J Biol Chem* 1992, 267:24611–24619
 33. UDENFRIEND S, MICANOVIC R, KODUKULA K. Structural requirements of a nascent protein for processing to PI-G anchored form: Studies in intact cells and cell-free systems. *Cell Biol Int Rep* 1991, 15:739–759
 34. PARKER MW, VAN DER GOOT FG, BUCKLEY JT. Aerolysin – the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol* 1996, 19:205–212
 35. KINOSHITA T, INOUE N. Dissecting and manipulating the pathway for glycosyl-phosphatidylinositol-anchor biosynthesis. *Curr Opin Chem Biol* 2000, 4:632–638
 36. BRODSKY RA. New insights into paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006:24–28, 516
 37. ALMEIDA A, LAYTON M, KARADIMITRIS A. Inherited glycosylphosphatidyl inositol deficiency: A treatable CDG. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1792:874–880
 38. MAHONEY JF, URAKAZE M, HALL S, DeGASPERI R, CHANG HM, SUGIYAMA E ET AL. Defective glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria granulocytes. *Blood* 1992, 79:1400–1403
 39. MIYATA T, TAKEDA J, IIDA Y, YAMADA N, INOUE N, TAKAHASHI M ET AL. The cloning of *PIG-A*, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 1993, 259:1318–1320
 40. INOUE N, WATANABE R, TAKEDA J, KINOSHITA T. *PIG-C*, one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* GPI2. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 226:193–199
 41. KAMITANI T, CHANG HM, ROLLINS C, WANECK GL, YEH ET. Correction of the class H defect in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Ltk-cells by a human cDNA clone. *J Biol Chem* 1993, 268:20733–20736
 42. WATANABE R, INOUE N, WESTFALL B, TARON CH, ORLEAN P, TAKE-DA J ET AL. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of *PIG-A*, *PIG-H*, *PIG-C* and *GPI1*. *EMBO J* 1998, 17:877–885
 43. MURAKAMI Y, SIRIPANYAPHINYO U, HONG Y, TASHIMA Y, MAEDA Y, KINOSHITA T. The initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires *PIG-Y*, a seventh component. *Mol Biol Cell* 2005, 16:5236–5246
 44. WATANABE R, MURAKAMI Y, MARMOR MD, INOUE N, MAEDA Y, HINO J ET AL. Initial enzyme for glycosylphosphatidylinositol biosynthesis requires *PIG-P* and is regulated by DMP2. *EMBO J* 2000, 19:4402–4411
 45. HYMAN R. Somatic genetic analysis of the expression on cell surface molecules. *Trends Genet* 1988, 4:5–8
 46. BESSLER M, MASON PJ, HILLMEN P, MIYATA T, YAMADA N, TAKEDA J ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the *PIG-A* gene. *EMBO J* 1994, 13:110–117
 47. TERSTAPPEN LW, NGUYEN M, HUANG S, LAZARUS HM, MEDOF ME. Defective and normal haematopoietic stem cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1993, 84:504–514
 48. BESSLER M, MASON P, HILLMEN P, LUZZATTO L. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 1994, 343:951–953
 49. ΜΕΛΕΤΗΣ ΙΧ, ΣΑΡΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ Α, ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΙΒ, ΤΕΡΠΟΣ Ε. Παθογενετικοί και παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί για την εμφάνιση της νυκτερινής παροξυστικής αιμοσφαιρινουρίας. *Αρχ Έλλ Ιατρ* 2009, 26:206–229
 50. BESSLER M, HILLMEN P, LONGO L, LUZZATTO L, MASON PJ. Genomic organization of the X-linked gene (*PIG-A*) that is mutated in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21. *Hum Mol Genet* 1994, 3:751–757
 51. IIDA Y, TAKEDA J, MIYATA T, INOUE N, NISHIMURA J, KITANI T ET AL. Characterization of genomic *PIG-A* gene: A gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 83:3126–3131
 52. LUZZATTO L, NAFA K. Genetics of PNH. In: Young NS, Moss J (eds) *PNH and the GPI-linked proteins*. Academic Press, San Diego, 2000:21–47
 53. KYLE RA. Second malignancies associated with chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 1982, 9:131–142
 54. QUAGLIANA JM, CARTWRIGHT GE, WINTROBE MM. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria following drug-induced aplastic anemia. *Ann Intern Med* 1964, 61:1045–1052
 55. TREMML G, KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Learning about PNH cells from patients and mice. *Haema* 1998, 1:12–20

56. EDBERG JC, SALMON JE, WHITLOW M, KIMBERLY RP. Preferential expression of human Fc gamma RIIPMN (CD16) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Discordant expression of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins. *J Clin Invest* 1991, 87:58–67
57. PAPADOPOULOS KP, SUCIU-FOCA N, HESDORFFER CS, TUGULEA S, MAFFEI A, HARRIS PE. Naturally processed tissue- and differentiation stage-specific autologous peptides bound by HLA class I and II molecules of chronic myeloid leukemia blasts. *Blood* 1997, 90:4938–4946
58. CHEN G, YE Z, YU X, ZOU J, MALI P, BRODSKY RA ET AL. Trophoblast differentiation defect in human embryonic stem cells lacking *PIG-A* and GPI-anchored cell-surface proteins. *Cell Stem Cell* 2008, 2:345–355
59. JOHNSTON JJ, GROPMAN AL, SAPP JC, TEER JK, MARTIN JM, LIU CF ET AL. The phenotype of a germline mutation in *PIG-A*: The gene somatically mutated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hum Genet* 2012, 90:295–300
60. NAFA K, BESSLER M, DEEG HJ, LUZZATTO L. New somatic mutation in the *PIG-A* gene emerges at relapse of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1998, 92:3422–3427
61. ALMEIDA AM, MURAKAMI Y, LAYTON DM, HILLMEN P, SELICK GS, MAEDA Y ET AL. Hypomorphic promoter mutation in *PIGM* causes inherited glycosyl-phosphatidylinositol deficiency. *Nat Med* 2006, 12:846–851
62. ALMEIDA AM, MURAKAMI Y, BAKER A, MAEDA Y, ROBERTS IA, KINOSHITA T ET AL. Targeted therapy for inherited GPI deficiency. *N Engl J Med* 2007, 356:1641–1647
63. KRAWITZ PM, SCHWEIGER MR, RÖDELSPERGER C, MARCELIS C, KÖLSCH U, MEISEL C ET AL. Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies *PIGV* mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet* 2010, 42:827–829
64. MAYDAN G, NOYMAN I, HAR-ZAHAV A, NERIAH ZB, PASMANIK-CHOR M, YEHESEKEL A ET AL. Multiple congenital anomalia-hypotonia-seizures syndrome is caused by mutation in *PIGN*. *J Med Genet* 2011, 48:383–389
65. HU R, MUKHINA GL, LEE SH, JONES RJ, ENGLUND PT, BROWN P ET AL. Silencing of genes required for glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Burkitt lymphoma. *Exp Hematol* 2009, 37:423–434.e2
66. KRAWITZ PM, HÖCHSMANN B, MURAKAMI Y, TEUBNER B, KRÜGER U, KLOPOCKI E ET AL. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in *PIGT*. *Blood* 2013, 122:1312–1315
67. YAMASHINA M, UEDA E, KINOSHITA T, TAKAMI T, OJIMA A, ONO H ET AL. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1990, 323:1184–1189
68. LEVENE C, HAREL N, LAVIE G, GREENBERG S, LAIRD-FRYER B, DANIELS GL. A “new” phenotype confirming a relationship between Cra and Tca. *Transfusion* 1984, 24:13–15
69. LUBLIN DM, ATKINSON JP. Decay-accelerating factor: Biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol* 1989, 7:35–58
70. KODUKULA K, AMTHAUER R, CINES D, YEH ET, BRINK L, THOMAS LJ ET AL. Biosynthesis of phosphatidylinositol-glycan (PI-G)-anchored membrane proteins in cell-free systems: PI-G is an obligatory cosubstrate for COOH-terminal processing of nascent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89:4982–4985
71. KUROSAKI T, RAVETCH JV. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma III. *Nature* 1989, 342:805–807
72. DUSTIN ML, SELVARAJ P, MATTALIANO RJ, SPRINGER TA. Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature* 1987, 329:846–848
73. ROSSE WF. Variations in the red cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1973, 24:327–342
74. MADKAIKAR M, GUPTA M, JIJINA F, GHOSH K. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Diagnostic tests, advantages, and limitations. *Eur J Haematol* 2009, 83:503–511
75. ROSSE WF. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1990, 75:1595–1601
76. TOMITA M. Biochemical background of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1455:269–286
77. NAKAKUMA H, NAGAKURA S, KAWAGUCHI T, IWAMOTO N, HIDAKA M, HORIKAWA K ET AL. Persistence of affected T lymphocytes in long-term clinical remission in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1994, 84:3925–3928
78. WATTS MJ, DANKERT JR, MORGAN EP. Isolation and characterization of a membrane-attack-complex-inhibiting protein present in human serum and other biological fluids. *Biochem J* 1990, 265:471–477
79. SIMS PJ, ROLLINS SA, WIEDMERT. Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem* 1989, 264:19228–19235
80. BERGELSON JM, MOHANTY JG, CROWELL RL, ST JOHN NF, LUBLIN DM, FINBERG RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 1995, 69:1903–1906
81. CLARKSON NA, KAUFMAN R, LUBLIN DM, WARD T, PIPKIN PA, MINOR PD ET AL. Characterization of the echovirus 7 receptor: Domains of CD55 critical for virus binding. *J Virol* 1995, 69:5497–5501
82. KARNAUCHOW TM, TOLSON DL, HARRISON BA, ALTMAN E, LUBLIN DM, DIMOCK K. The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J Virol* 1996, 70:5143–5152
83. HAMANN J, VOGEL B, VAN SCHIJNDEL GM, VAN LIER RA. The seven-span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 1996, 184:1185–1189
84. LIU J, MIWA T, HILLIARD B, CHEN Y, LAMBRIS JD, WELLS AD ET AL. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity *in vivo*. *J Exp Med* 2005, 201:567–577
85. SHIBUYA T, IZUCHI K, KUROIWA A, HARADA H, KUMAMOTO A, SHIRAKAWA K. Study on nonspecific immunity in pregnant women: II. Effect of hormones on chemiluminescence response of peripheral blood phagocytes. *Am J Reprod Immunol* 1991, 26:76–81
86. LONGHI MP, HARRIS CL, MORGAN BP, GALLIMORE A. Holding T cells in check – new role for complement regulators? *Trends Immunol* 2006, 27:102–108
87. ROSSE WF, PARKER CJ. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.

- Clin Haematol* 1985, 14:105–125
88. DAVIES A, SIMMONS DL, HALE G, HARRISON RA, TIGHE H, LACHMANN PJ ET AL. CD59, a LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 1989, 170:637–654
 89. SELVARAJ P, DUSTIN ML, SILBER R, LOW MG, SPRINGER TA. Deficiency of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Functional correlates and evidence for a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Exp Med* 1987, 166:1011–1025
 90. BOCCUNI P, DEL VECCHIO L, DI NOTO R, ROTOLI B. Glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored molecules and the pathogenesis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000, 33:25–43
 91. PEDERSEN TL, YONG K, PEDERSEN JO, HANSEN NE, DANØ K, PLESNER T. Impaired migration *in vitro* of neutrophils from patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1996, 95:45–51
 92. FUNARO A, ORTOLAN E, FERRANTI B, GARGIULO L, NOTARO R, LUZZATTO L ET AL. CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration. *Blood* 2004, 104:4269–4278
 93. DIXON RH, ROSSE WF. Mechanism of complement-mediated activation of human blood platelets *in vitro*: Comparison of normal and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria platelets. *J Clin Invest* 1977, 59:360–368
 94. STERN M, ROSSE WF. Two populations of granulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1979, 53:928–934
 95. KWONG YL, LEE CP, CHAN TK, CHAN LC. Flow cytometric measurement of glycosylphosphatidyl-inositol-linked surface proteins on blood cells of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Clin Pathol* 1994, 102:30–35
 96. PLOUG M, PLESNER T, RØNNE E, ELLIS V, HØYER-HANSEN G, HANSEN NE ET AL. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral blood leucocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1992, 79:1447–1455
 97. ENDO M, WARE RE, VREEKE TM, SINGH SP, HOWARD TA, TOMITA A ET AL. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1996, 87:2546–2557
 98. WALPORT MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001, 344:1058–1066
 99. WALPORT MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001, 344:1140–1144
 100. NAVENOT JM, MULLER JY, BLANCHARD D. Investigation of the survival of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria red cells through the immunophenotyping of reticulocytes. *Transfusion* 1998, 38:337–342
 101. ROSSE WF, NISHIMURA J. Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Present state and future problems. *Int J Hematol* 2003, 77:113–120
 102. LIN RC, HERMAN J, HENRY L, DANIELS GL. A family showing inheritance of the Inab phenotype. *Transfusion* 1988, 28:427–429
 103. TELEN MJ, HALL SE, GREEN AM, MOULDS JJ, ROSSE WF. Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay-accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF. *J Exp Med* 1988, 167:1993–1998
 104. REID ME, MALLINSON G, SIM RB, POOLE J, PAUSCH V, MERRY AH ET AL. Biochemical studies on red blood cells from a patient with the Inab phenotype (decay-accelerating factor deficiency). *Blood* 1991, 78:3291–3297
 105. HILLMEN P, HADZIC D, O'CONNOR SJM, MOWAT A. Hepatic vein thrombosis in a patient with the Inab phenotype: Is deficiency of DAF important in the development of thrombosis in PNH? *Blood* 1995, 86(Suppl 1):514a
 106. MOTOYAMA N, OKADA N, YAMASHINA M, OKADA H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria due to hereditary nucleotide deletion in the HRF20 (CD59) gene. *Eur J Immunol* 1992, 22:2669–2673
 107. PARKER CJ. Management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the era of complement inhibitory therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011, 2011:21–29
 108. THOMAS TC, ROLLINS SA, ROTHER RP, GIANNONI MA, HARTMAN SL, ELLIOTT EA ET AL. Inhibition of complement activity by humanized anti-C5 antibody and single-chain Fv. *Mol Immunol* 1996, 33:1389–1401
 109. BERZUINI A, MONTANELLI F, PRATI D. Hemolytic anemia after eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2010, 363:993–994
 110. RISITANO AM, NOTARO R, MARANDO L, SERIO B, RANALDI D, SEN-ECA E ET AL. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009, 113:4094–4100
 111. FERREIRA VP, PANGBURN MK. Factor H mediated cell surface protection from complement is critical for survival of PNH erythrocytes. *Blood* 2007, 110:2190–2192
 112. RISITANO AM, NOTARO R, PASCARIELLO C, SICA M, DEL VECCHIO L, HORVATH CJ ET AL. The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood* 2012, 119:6307–6316
 113. 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
 114. ROTHER CD, BELL L, HILLMEN P, GLADWIN MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005, 293:1653–1662
 115. AZIZI E, DROR Y, WALLIS K. Arginase activity in erythrocytes of healthy and ill children. *Clin Chim Acta* 1970, 28:391–396
 116. MORRIS CR, KATO GJ, POLJAKOVIC M, WANG X, BLACKWELDER WC, SACHDEV V ET AL. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005, 294:81–90
 117. AESSOPAS A, FARMAKIS D, KARAGIORGA M, VOSKARIDOU E, LOUTRADI A, HATZILIAMI A ET AL. Cardiac involvement in thalassemia intermedia: A multicenter study. *Blood* 2001, 97:3411–3416
 118. HILLMEN P, HALL C, MARSH JC, ELEBUTE M, BOMBARA MP, PETROBE ET AL. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion

- requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004, 350:552–559
119. VOSKARIDOU E, TSETOS G, TSOUSTSIAS A, SPYROPOULOU E, CHRISTOULAS D, TERPOS E. Pulmonary hypertension in patients with sickle cell/beta thalassemia: Incidence and correlation with serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations. *Haematologica* 2007, 92:738–743
 120. HILL A, ROTHER RP, WANG X, MORRIS SM Jr, QUINN-SENGER K, KELLY R ET AL. Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2010, 149:414–425
 121. HILL A, REID SA, ROTHER RP, GLADWIN MT, COLLINSON PO, GAZDC ET AL. High definition contrast-enhanced MR imaging in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) suggests a high frequency of subclinical thrombosis. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2006, 108:979
 122. JIN JY, TOOZE JA, MARSH JC, GORDON-SMITH EC. Glycosylphosphatidyl-inositol (GPI)-linked protein deficiency on the platelets of patients with aplastic anaemia and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Two distinct patterns correlating with expression on neutrophils. *Br J Haematol* 1997, 96:493–496
 123. ZIAKAS PD, POULOU LS, ROKAS GI, BARTZOUDIS D, VOULGAR-ELIS M. Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Sites, risks, outcome. An overview. *J Thromb Haemost* 2007, 5:642–645
 124. POULOU LS, VAKRINOS G, POMONI A, MICHALAKIS K, KARIANAKIS G, VOULGARELIS M ET AL. Stroke in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Patterns of disease and outcome. *Thromb Haemost* 2007, 98:699–701
 125. ASIMAKOPOULOS JV, PAPAGEORGIOU L, PETEVI K, BOUTSIKAS G, KANELLOPOULOS A, GAINAROU G ET AL. Hematology quiz – Case 36: Hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with marrow hypoplasia. *Arch Hellen Med* 2013, 30:636–637
 126. DE LATOUR RP, MARY JY, SALANOUBAT C, TERRIOU L, ETIENNE G, MOHTY M ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Natural history of disease subcategories. *Blood* 2008, 112:3099–3106
 127. SIMS PJ, WIEDMER T. The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today* 1991, 12:338–342
 128. 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, 79:131–137
 129. LOUWES H, VELLENGA E, DE WOLF JT. Abnormal platelet adhesion on abdominal vessels in asymptomatic patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 2001, 80:573–576
 130. HILL A. Eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Clin Adv Hematol Oncol* 2005, 3:849–850
 131. SIMS PJ, WIEDMERT. Induction of cellular procoagulant activity by the membrane attack complex of complement. *Semin Cell Biol* 1995, 6:275–282
 132. 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, 82:1192–1196
 133. ZWAAL RF, SCHROIT AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997, 89:1121–1132
 134. HUGEL B, SOCIÉ G, VU T, TOTI F, GLUCKMAN E, FREYSSINET JM ET AL. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999, 93:3451–3456
 135. NINOMIYA J, KAWASHIMA Y, HASEGAWA Y, NAGASAWA T. Complement-induced procoagulant alteration of red blood cell membranes with microvesicle formation in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH): Implication for thrombogenesis in PNH. *Br J Haematol* 1999, 106:224–231
 136. KOZUMA Y, SAWAHATA Y, TAKEI Y, CHIBA S, NINOMIYA H. Procoagulant properties of microparticles released from red blood cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2011, 152:631–639
 137. LIEBMAN HA, FEINSTEIN DI. Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thromb Res* 2003, 111:235–238
 138. OWENS AP 3rd, MACKMAN N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* 2011, 108:1284–1297
 139. ZHANG J, PIRO O, LU L, BROZE GJ Jr. Glycosyl phosphatidylinositol anchorage of tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2003, 108:623–627
 140. MARONEY SA, CUNNINGHAM AC, FERREL J, HU R, HABERLICHTER S, MANSBACH CM ET AL. A GPI-anchored co-receptor for tissue factor pathway inhibitor controls its intracellular trafficking and cell surface expression. *J Thromb Haemost* 2006, 4:1114–1124
 141. MARONEY SA, HABERLICHTER SL, FRIESE P, COLLINS ML, FERREL JP, DALE GL ET AL. Active tissue factor pathway inhibitor is expressed on the surface of coated platelets. *Blood* 2007, 109:1931–1937
 142. VON VIETINGHOFF S, TUNNEMANN G, EULENBERG C, WELLNER M, CRISTINA CARDOSO M, LUFT FC ET AL. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood* 2007, 109:4487–4493
 143. VILLEGAS-MENDEZ A, MONTES R, AMBROSE LR, WARRENS AN, LAFFAN M, LANE DA. Proteolysis of the endothelial cell protein C receptor by neutrophil proteinase 3. *J Thromb Haemost* 2007, 5:980–988
 144. STEPPICH BA, SEITZ I, BUSCH G, STEIN A, OTT I. Modulation of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1 by neutrophil proteases. *Thromb Haemost* 2008, 100:1068–1075
 145. RAIFE TJ, CAO W, ATKINSON BS, BEDELL B, MONTGOMERY RR, LENTZ SR ET AL. Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near ADAMTS13 cleavage site. *Blood* 2009, 114:1666–1674
 146. RENESTO P, SI-TAHAR M, MONIATTE M, BALLOY V, VAN DORSSELAER A, PIDARD D ET AL. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: Evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the throm-

- bin receptor. *Blood* 1997, 89:1944–1953
147. JANKOWSKA AM, SZPURKA H, CALABRO M, MOHAN S, SCHADE AE, CLEMENTE M ET AL. Loss of expression of neutrophil proteinase-3: A factor contributing to thrombotic risk in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 2011, 96:954–962
 148. RØNNE E, PAPPOT H, GRØNDHAL-HANSEN J, HØYER-HANSEN G, PLESNER T, HANSEN NE ET AL. The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 1995, 89:576–581
 149. SLOAND EM, PFANNES L, SCHEINBERG P, MORE K, WU CO, HORNE M ET AL. 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, 36:1616–1624
 150. NINOMIYA H, HASEGAWA Y, NAGASAWA T, ABE T. Excess soluble urokinase-type plasminogen activator receptor in the plasma of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria inhibits cell-associated fibrinolytic activity. *Int J Hematol* 1997, 65:285–291
 151. ROSSE WF, WARE RE. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995, 86:3277–3286
 152. GRÜNEWALD M, SIEGEMUND A, GRÜNEWALD A, SCHMID A, KOKSCH M, SCHÖPFLIN C ET AL. Plasmatic coagulation and fibrinolytic system alterations in PNH: Relation to clone size. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003, 14:685–695
 153. HELLEY D, DE LATOUR RP, PORCHER R, RODRIGUES CA, GALY-FAUROUX I, MATHERON J ET AL. Evaluation of hemostasis and endothelial cell function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving eculizumab. *Haematologica* 2010, 95:574–581
 154. MURASAWA S, ASAHARA T. Endothelial progenitor cells for vasculogenesis. *Physiology (Bethesda)* 2005, 20:36–42
 155. DELLA PORTA MG, MALCOVATI L, RIGOLIN GM, ROSTI V, BONETTI E, TRAVAGLINO E ET AL. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2008, 22:530–537
 156. MUELLER RJ, STUSSI G, PUGA YUNG G, NIKOLIC M, SOLDINI D, HALTER J ET AL. Persistence of recipient-type endothelium after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2011, 96:119–127
 157. NAFA K, BESSLER M, MASON P, VULLIAMY T, HILLMEN P, CASTROMALASPINA H ET AL. Factor V Leiden mutation investigated by amplification created restriction enzyme site (ACRES) in PNH patients with and without thrombosis. *Haematologica* 1996, 81:540–542
 158. GRISCELLI-BENNACEUR A, GLUCKMAN E, SCROBOHACI ML, JONVEAUX P, VU T, BAZARBACHI A ET AL. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Search for pathogenetic link. *Blood* 1995, 85:1354–1363
 159. DRAGONI F, IORI AP, PIGNOLONI P, MINOTTI C, CHIAROTTI F, MAZZUCCONI MG ET AL. Thrombophilic screening in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: A pilot study. *Br J Haematol* 2010, 150:492–494
 160. DARNIGE L, PEFFAULT DE LATOUR R, ZEMORI L, SOCIÉ G, FISCHER AM, HELLEY D ET AL. Antiphospholipid antibodies in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria receiving eculizumab. *Br J Haematol* 2011, 153:789–791
 161. SUGIMORI C, SHAIN KH, CACERES G, SOKOL L, ARATEN DJ, MACIEJEWSKI JP ET AL. Co-existence of JAKV617F and PIG-A mutations in primary Budd-Chiari syndrome. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2009, 114:3193
 162. BAGLIN T, GRAY E, GREAVES M, HUNT BJ, KEELING D, MACHIN S ET AL. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. *Br J Haematol* 2010, 149:209–220
 163. HALL C, RICHARDS S, HILLMEN R. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 2003, 102:3587–3591
 164. KARADIMITRIS A, LUZZATTO L. The cellular pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Leukemia* 2001, 15:1148–1152
 165. SOCIÉ G, MARY JY, DE GRAMONT A, RIO B, LEPORRIER M, ROSE C ET AL. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet* 1996, 348:573–577
 166. HILLMEN P, LEWIS SM, BESSLER M, LUZZATTO L, DACIE JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 1995, 333:1253–1258
 167. HILLMEN P, RICHARDS SJ. Implications of recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 2000, 108:470–479
 168. NISHIMURA J, KANAKURA Y, WARE RE, SCHICHISHIMA T, NAKAKUMA H, NINOMIYA H ET AL. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine (Baltimore)* 2004, 83:193–207
 169. BRUBAKER LH, ESSIG LJ, MENGEL CE. Neutrophil life span in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1977, 50:657–662
 170. MOORE JG, HUMPHRIES RK, FRANK MM, YOUNG N. Characterization of the hematopoietic defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 1986, 14:222–229
 171. IWAMOTO N, KAWAGUCHI T, HORIKAWA K, NAGAKURA S, KAGIMOTO T, SUDA T ET AL. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood* 1996, 87:4944–4948
 172. COHEN P, GARDNER FH, BARNETT GO. Reclassification of the thrombocytopenias by the chrome 51 method for measuring platelet life span. *N Engl J Med* 1961, 264:1294–1299
 173. ROTOLI B, ROBLEDO R, LUZZATTO L. Decreased number of circulating BFU-Es in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1982, 60:157–159
 174. MACIEJEWSKI JP, SLOAND EM, SATO T, ANDERSON S, 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* 1997, 89:1173–1181
 175. MELETIS J, MICHALI E, SAMARKOS M, KONSTANTOPOULOS K, MELETIS C, TERPOS E ET AL. Detection of “PNH red cell” populations in hematological disorders using the Sephacryl Gel Test microtyping system. *Leuk Lymphoma* 1997, 28:177–182
 176. WANG H, CHUHO T, YASUE S, OMINO M, NAKAO S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome.

- Blood* 2002, 100:3897–3902
177. DUNN DE, TANAWATTANACHAROEN P, BOCCUNI P, NAGAKURA S, GREEN SW, KIRBY MR ET AL. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 1999, 131:401–408
 178. MELETIS J, TERPOS E. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: Clinical presentation and association with other haematological disorders. *Haema* 2001, 4:79–88
 179. MUKHINA GL, BUCKLEY JT, BARBER JP, JONES RJ, BRODSKY RA. Multilineage glycosylphosphatidylinositol anchor-deficient haematopoiesis in untreated aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001, 115:476–482
 180. MELETIS J, TERPOS E, MAVROGIANNI D, LILAKOS K, APOSTOLIDOU E, TSIRONI M ET AL. Aplastic anaemia with large “PNH-like” red cell population. *Haema* 2003, 6:103–106
 181. BRODSKY RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Stem cells and clonality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008:111–115
 182. PU JJ, HU R, MUKHINA GL, CARRAWAY HE, McDEVITT MA, BRODSKY RA. The small population of *PIG-A* mutant cells in myelodysplastic syndromes do not arise from multipotent hematopoietic stem cells. *Haematologica* 2012, 97:1225–1233
 183. ORAZI A, ALBITAR M, HEEREMA NA, HASKINS S, NEIMAN RS. Hypoplastic myelodysplastic syndromes can be distinguished from acquired aplastic anemia by CD34 and PCNA immunostaining of bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 1997, 107:268–274
 184. MATSUI WH, BRODSKY RA, SMITH BD, BOROWITZ MJ, JONES RJ. Quantitative analysis of bone marrow CD34 cells in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006, 20:458–462
 185. MACIEJEWSKI JP, FOLLMANN D, NAKAMURA R, SAUNTHARARAJAH Y, RIVERA CE, SIMONIST ET AL. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood* 2001, 98:3513–3519
 186. ASIMAKOPOULOS JV, TERPOS E, PAPAGEORGIOU L, KAMPOUROPOULOU O, CHRISTOULAS D, GIAKOURIS A ET AL. “PNH-like” erythrocyte populations in patients with autoimmune connective tissue disorders. *Arch Hellen Med* 2013, 30:714–729
 187. ASIMAKOPOULOS JV, TERPOS E, PAPAGEORGIOU L, KAMPOUROPOULOU O, CHRISTOULAS D, GIAKOURIS A ET AL. Presence of CD55- and/or CD59-deficient erythrocytes in patients with rheumatic diseases: An immune-mediated phenomenon? 55th ASH Annual Meeting and Exposition, New Orleans, 2013, Abstract 3429
 188. ASIMAKOPOULOS JV, TERPOS E, PAPAGEORGIOU L, KAMPOUROPOULOU O, CHRISTOULAS D, GIAKOURIS A ET AL. The presence of CD55- and/or CD59-deficient erythrocytic populations in patients with rheumatic diseases reflects an immune-mediated bone-marrow derived phenomenon. *Med Sci Monit* 2014, 20:123–139
- Corresponding author:*
- J.V. Asimakopoulos, Hematology Department and Bone Marrow Transplantation Unit, National and Kapodistrian University of Athens, School of Medicine, “Laiko” General Hospital, 17 Agiou Thoma street, GR-115 27 Athens, Greece
e-mail: jv.asimakopoulos@gmail.com

.....